



Institut für Biochemie und Signaltransduktion, AG Cytoskeletal Dynamics

Mechanismus der Mikrotubuli-modulierenden Aktivität von Centrosomal Protein 55 bei chromosomaler Instabilität

Dissertation

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

vorgelegt von

Stefanie Muhs

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Schlüter und Prof. Dr. rer. nat. Sabine Windhorst

Prüfungskommission: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Holl, Prof. Dr. rer. nat. Zoya Ignatova und Prof.

Dr. rer. nat. Sabine Windhorst

Datum der Disputation: 09.07.2021

Druckfreigabe: 09.07.2021

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von August 2017 bis April 2021 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), am Institut für Biochemie und Signaltransduktion in der Arbeitsgruppe *Cytoskeletal Dynamics* von Frau Prof. Dr. Sabine Windhorst durchgeführt.

I. Publikationsliste

Grueb SS, **Muhs S**, Popp Y, Schmitt S, Geyer M, Lin YN, Windhorst S. The formin Drosophila homologue of Diaphanous2 (Diaph2) controls microtubule dynamics in colorectal cancer cells independent of its FH2-domain. Sci Rep. 2019 Mar 29;9(1):5352. doi: 10.1038/s41598-019-41731-y. PMID: 30926831; PMCID: PMC6441084.

Linxweiler J, Hammer M, **Muhs S**, Kohn M, Pryalukhin A, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Saar M. Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2019 Mar;145(3):551-559. doi: 10.1007/s00432-018-2803-5. Epub 2018 Nov 24. PMID: 30474758.

Bäder S, Glaubke E, Grüb S, **Muhs S**, Wellbrock J, Nalaskowski M, Lange T, Windhorst S. Effect of the actin- and calcium-regulating activities of ITPKB on the metastatic potential of lung cancer cells. Biochem J. 2018 Jun 26;475(12):2057-2071. doi: 10.1042/BCJ20180238. PMID: 29871874.

Heinz LS¹, **Muhs S¹**, Schiewek J, Grüb S, Nalaskowski M, Lin YN, Wikman H, Oliveira-Ferrer L, Lange T, Wellbrock J, Konietzny A, Mikhaylova M, Windhorst S. Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity. Oncotarget. 2017 Nov 1;8(66):110077-110091. doi: 10.18632/oncotarget.22249. PMID: 29299131; PMCID: PMC5746366

¹ geteilte Erstautorenschaft

II. Inhaltsverzeichnis

III. Abkürzungsverzeichnis	VII
IV. Abbildungsverzeichnis	X
V. Tabellenverzeichnis	XII
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung – Theoretischer Hintergrund	3
3.1 Überblick über Ovarialkarzinome	3
3.2 Der Zellzyklus	3
3.2.1 Die Mitose	4
3.3 Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli	8
3.4 Mechanismus der chromosomalen Instabilität und dessen Bedeutung bei Tomorgenese	
3.4.1 Strukturelle CIN durch fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen	13
3.4.2 Entstehung von CIN durch Fehler in der Mitose	13
3.5 Centrosomal Protein 55	14
3.5.1 Die Rolle von CEP55 in der Cytokinese	14
3.5.2 Regulation von CEP55 und dessen Rolle bei der Tumorgenese	17
3.5.3 CEP55 in Zusammenhang mit CIN	18
4. Zielsetzung	19
5. Material und Methoden	20
5.1 Materialen	20
5.1.1 Plasmide	20
5.1.2 Primer	20
5.1.3 Antikörper	22
5.1.4 Puffer und Lösungen	23
5.2.5 Zelllinien und Zellkulturmedien	25
5.2. Molekularbiologische Methoden	25
5.2.1 Klonierung von CEP55WT in den LeGo-iB2 Neo+ Vektor	26
5.2.2 QC Mutagenese zu Herstellung von LeGo-iB2 Neo+ CEP55Y187A	28
5.2.3 SLIC Klonierung	29
5.2.4 KLD Klonierung	29
5.2.5 Transformation	30
5.2.6 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	30
5.2.7 Sequenzierung.	30
5.3 Zellbiologische Methoden	31
5.3.1 Kultivierung der Zellen	31

5.3.2 Best	timmung der Zellzahl	31
5.3.3 Hers	stellung stabiler CEP55 Knockdown Zellen durch lentivirale Transduktion	32
5.3.4 Hers	stellung von Zellen mit stabiler Expression durch lentivirale Transduktion	33
5.3.5 Viab	ilitäts-Assay	33
5.3.6 Migr	ationsanalyse - Wundheilungs-Assay	34
5.3.7 Unte	ersuchung der Kolonieformierungskapazität	34
5.3.8 Unte	ersuchung der Adhäsion	35
5.3.9 Chro	omosomenisolation	35
5.3.10 Mik	krotubuli Live-Cell-Imaging mir SiR-Tubulin	36
5.3.11 Imr	munfluoreszenzfärbung	36
5.4 Proteinb	iochemische Methoden	37
5.4.1 Hers	stellung von Zelllysaten und Bradford-Assay	37
5.4.2 SDS	S-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot	38
5.4.3 Präp	paration von nativem Tubulin aus Schweinehirnen	39
5.4.4 Rek	ombinante Expression und Reinigung von CEP55 Konstrukten	40
5.4.5 Visu	alisierung von Rhodamin-markierten MTs und GFP-CEP55	42
5.4.6 Anal	lyse der MT-Polymerisierung	42
5.4.7 Bind	lung von CEP55 an Tubulin und MTs	43
5.5 In silico	Strukturvorhersagen	44
5.5.1 Sek	undärstruktur Analyse CEP55	44
5.5.2 Hom	nologie-Analyse	44
4.6 Statistik		45
6. Ergebnisse		46
6.1 Rolle voi	n CEP55 in SKOV-3 Ovarialkarzinom Zellen	46
6.1.1 Etab	olierung eines CEP55 Knockdowns in SKOV-3 Zellen	46
	ekt von CEP55 auf Proliferation, Migration, Adhäsion und Koloniebildung in	
	Zellen	
	P55 vermittelt die Trennung des Midbody und reguliert die MT-Stabilität	
	luss der CEP55 Expression auf CIN	51
	luss der CEP55/ALIX Interaktion auf die CEP55 kontrollierte Midbody- n und CIN	54
6.1.6 Die	ALIX Bindeaktivität von CEP55 beeinflusst das Kolonieformierungspotenz	ial 55
	wirkung der CEP55 Rückexpression auf die Midbody-Dynamik SKOV-3 Ze	
	luss der CEP55/ALIX Interaktion auf CIN	
	P55 Effekt auf die Dynamik in Spindel-MTs	
	ose-Checkpoint Aktivierung durch CEP55	
	von CEP55 auf MTs in vitro	
	ombinante Expression von His-GFP CEP55 in <i>E. coli</i>	

6.2.2 Einfluss von CEP55 auf die MT Polymerisierung in vitro	63
6.2.3 Sekundärstruktur Analyse von CEP55	64
7. Diskussion	71
7.1 CEP55 ist nicht essenziell für die Cytokinese	72
7.2 Der Einfluss von CEP55 ist abhängig von der Proteinkonzentration	72
7.3 CEP55 reguliert die MT-Stabilität in der Spindel und am Midbody	73
7.4 CEP55 beeinflusst Entstehung und Dynamik von CIN	74
7.5 Die ALIX Bindeaktivität von CEP55 hat keinen Einfluss auf CIN	75
7.6 CEP55 steigert die MT-Nukleation in vitro	76
7.7 Identifikation der MT-Bindedomäne von CEP55	77
8. Ausblick und Fazit	79
9. Literatur	80
10. Anhang	91
10.1 Vektorkarten	91
10.1.1 LeGo-iB ₂ Neo+ Vektoren	91
10.1.2 psf421 10xHis-GFP Vektoren	92
10.2 Codon-optimierte Sequenz von CEP55	95
10.3 Ergänzende Ergebnisse	96
10.4 Verwendete Gefahrstoffe	99
11. Danksagung	103
12 Fidesstattliche Erklärung	104

III. Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

µm Mikrometer

µM Mikromolar

3D dreidimensional

A Alanin

A. dest Doppelt destilliertes Wasser

Abb. Abbildung Amp Ampicillin

APC/C Anaphase promoting complex/cyclosome

APS Ammoniumpersulfat

AS Aminosäure(n)

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaar

BSA Bovines Serum Albumin

bzw. beziehungsweise

CC Coiled Coil

CIN Chromosomale Instabilität

cm Centimeter

CO₂ Kohlenstoffdioxid

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

DTT Dithiothreitol

E. Coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure

FCS Fetal calf serum (fötales Kälber Serum)

FW Foward g Gramm

GDP Guanosindiphosphat

GFP Grün fluoreszierendes Protein

GTP Guanosintriphosphat

h Stunde(n) His Histidin

HRP Horseradish Peroxidase

IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

kDa Kilodalton

K-MT Kinetochor-Mikrotubuli

L Liter

LB lysogeny broth

M molar

MAP Mikrotubuli assoziiertes Protein

min Minute(n)
ml Milliliter
mM Millimolar
mm Millimeter
MP Milchpulver
MT Mikrotubuli

MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-

sulfophenyl)-2H-tetrazolium

n.s. Nicht signifikant
ng Nanogramm
nm Nanometer
nM Nanomolar

OD Optische Dichte

ORF open reading frame

PAGE Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS Phosphat-buffered-saline

PCR Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PFA Paraformaldehyd

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PTMs Posttranslationale Modifikationen

QC Quickchange Mutagenese

RNA ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

rpm Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RT Raumtemperatur

RV Reverse

SAC Spindle assembly checkpoint
SDS Soudium-Dodecyl-Sulfat

sec Sekunde(n)

shRNA Small hairpin RNA
SiR Silicon Rhodamin

SLIC sequence- and ligation-independent cloning

TB Terrific broth

TBS-T Tris-buffered-saline, 0,1% Tween

TEMED N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

tRNA Transfer-RNA

V Volt

Y Tyrosin

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus	4
Abb. 2: Die fünf Phasen der Mitose	5
Abb. 3: Aufbau der Metaphase-Spindel	6
Abb. 4: Arten der Kinetochor/MT-Bindung	6
Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus und der dynamischen Instabilität von MT	s9
Abb. 6: PTMs an Tubulin Heterodimeren	10
Abb. 7: Dynamik von CIN in Krebszellen	11
Abb. 8: Merkmale von CIN	12
Abb. 9: Lokalisation von CEP55 im Verlauf des Zellzyklus	15
Abb. 10: CEP55 als Gerüstprotein im Midbody	16
Abb. 11: Stabile Reduktion des CEP55 Proteinlevels in SKOV-3 Zellen durch shRNAs	46
Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung von CEP55 in SKOV-3 Kontroll- und CEP55 Knocko	nwok
Zellen	47
Abb. 13: CEP55 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und Migration von	l
SKOV-3 Zellen	48
Abb. 14: Reduktion von CEP55 beeinflusst die Kolonieformierung, zeigt jedoch keinen	
Einfluss auf die Adhäsion	49
Abb. 15: CEP55 Knockdown beeinflusst die Midbody-Dynamik	50
Abb. 16: CEP55 verändert die Stabilität von Midbody-MTs in SKOV-3 Zellen	51
Abb. 17: CEP55 kontrolliert die Stabilität von Spindel-MTs	52
Abb. 18: CEP55 Knockdown beeinflusst das chromosomale Alignment in sh1 SKOV-3 Z	:ellen
	52
Abb. 19: Einfluss von CEP55 auf die Chromosomenanzahl in Kontroll- und CEP55	
Knockdown Zellen	53
Abb. 20: Stabile Rückexpression von CEP55 WT und CEP55 Y187A in CEP55 depletierter	1
SKOV-3 Zellen	54
Abb. 21: CEP55 ^{Y187A} rettet die Koloniebildung nicht vollständig	55
Abb. 22: Die ALIX Bindeaktivität von CEP55 reguliert die Midbody-Trennung, hat aber ke	einer
Einfluss auf die MT-Stabilität	56
Abb. 23: Die CEP55/ALIX Bindung hat keinen Einfluss auf CIN	58
Abb. 24: CEP55 beeinflusst die Bildung von Mikronuklei	59
Abb. 25: CEP55 Knockdown erhöht die MT Geschwindigkeit beim Übergang von Meta-	zu
Anaphase	60
Abb. 26: Einfluss von CEP55 auf die Mitose Checkpoint Aktivierung	61
Abb. 27: Einfluss von CEP55 auf MTs in vitro	63
Abb. 28: Einfluss von CEP55 auf die MT Polymerisierung in vitro	64

Abb. 29: Sekundärstrukturanalyasen bestätigen CC Struktur von CEP55	65
Abb. 30: Modelle möglicher Tertiärstruktur von CEP55 und deren Dimerisierung	
freundlicherweise von Themistoklis Paraschiakos erstellt	66
Abb. 31: Schematische Darstellung trunkierter CEP55 Proteine	67
Abb. 32: CEP55 Core Domäne zeigt keine MT Bindung in vitro	68
Abb. 33: Schematische Darstellung von CEP55 Varianten mit trunkierten N/C-Termini	69
Abb. 34: CEP55-ΔNC bindet nicht an MTs69	
Abb. 35: Trunkierte CEP55 Proteine haben negativen oder keinen Effekt auf die	
Polymerisierung von MTs in vitro	70
Abb. 36: Modell der Bindung von CEP55 an MTs	78
Abb. 37: Vektorkarten der LeGo-iB ₂ Neo+ CEP55 Plasmide	91
Abb. 38: Vektorkarte des psf421 10xHis-GFP CEP55 Plasmids	92
Abb. 39: Vektorkarte des psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔEABR Plasmids	92
Abb. 40: Vektorkarten von psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔCD und CEP55-CD	93
Abb. 41: Vektorkarten von psf421 10xHis-GFP Konstrukten mit CEP55- Δ N, CEP55- Δ C	und
CEP55-ΔNC	94
Abb. 42: Lokalisation von CEP55 am Centrosom	96
Abb. 43: Einfluss von CEP55 auf das Chromosomen-Alignment und die	
Chromosomenanzahl in OVCAR-8 Zellen	96
Abb. 44: GFP zeigt keine Bindung an MTs	97
Abb. 45: Reinigung von Tubulin aus Schweinehirnen	97
Abb. 46: Homologie Analyse CEP55	98

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Expression in humanen Zellen und Bakterien verwendete Plasmide	. 20
Tabelle 2: Klonierungs- und Sequenzierprimer für die Klonierung der CEP55 cDNA in den	
LeGo-iB2-Neo+ Vektor	20
Tabelle 3: Klonierungs- und Sequenzierprimer für die Klonierung der CEP55 cDNA in den	
psf421 10xHis-GFP Vektor	21
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz	. 22
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz	23
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen	23
Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und Medien	. 25
Tabelle 8: Zusammensetzung PCR-Ansatz mit Q5-Polymerase	. 26
Tabelle 9: PCR-Programm für Q5-Polymerase	. 26
Tabelle 10: Zusammensetzung A-Tailing Ansatz	. 27
Tabelle 11: Zusammensetzung Ligationsansatz für die pGEM-T Easy Ligation	27
Tabelle 12: Zusammensetzung Ligationsansatz	. 28
Tabelle 13: Zusammensetzung QC-PCR mit Phusion- Polymerase	. 28
Tabelle 14: PCR-Programm für QC-PCR mit Phusion- Polymerase	. 28
Tabelle 15: Zusammensetzung SLIC Reaktion	. 29
Tabelle 16: Zusammensetzung der KLD Reaktion	30
Tabelle 17: Zusammensetzung für einen Sequenzieransatz	. 31
Tabelle 18: Zusammensetzung der Transfektion für die Herstellung stabiler Knockdown	
Zellen	. 32
Tabelle 19: Zusammensetzung der Transfektion für die Herstellung einer stabilen	
Expression.	. 33

1. Zusammenfassung

Ovarialkarzinome sind durch die Heterogenität der Tumore gekennzeichnet. Ein Grund hierfür ist, dass die meisten Ovarialkarzinomzellen chromosomal instabil sind. Chromosomale Instabilität (CIN) ist eine treibende Kraft bei der Progression von Tumoren und wird mit einer schlechten Prognose assoziiert. CIN kann durch eine fehlerhafte Regulation der Spindel-Mikrotubuli (MT) Dynamik verursacht werden und wird mit einer Fehlregulation unterschiedlicher Proteine in Verbindung gebracht. Eines dieser Proteine ist Centrosomal Protein 55 (CEP55). CEP55 spielt eine essenzielle Rolle bei CIN und Tumorgenese. Es ist in vielen Tumoren überexprimiert und in gesunden Geweben nur in Thymus und Testis nachweisbar. CEP55 bindet und stabilisiert MTs. CEP55 dient als Gerüstprotein, das *ALG-2-interacting protein X* (ALIX) und *Tumor Susceptibility Gene 101* (TSG101) zum Midbody rekrutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der MT-modulierenden Aktivität von CEP55 bei CIN und der Midbody Trennung aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden SKOV-3 Ovarialkarzinom Zellen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass ein CEP55 Knockdown die Midbody Trennungsdauer verlängerte und die korrekte Anlagerung der Spindel-MTs an die Chromosomen verbesserte. In Übereinstimmung damit zeigten die CEP55 Knockdown Zellen weniger Mikronuklei und eine geringere Heterogenität der Chromosomenanzahl. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass CEP55 sowohl die Midbody Dynamik als auch CIN kontrolliert. Eine Rückexpression von Wildtyp CEP55 und einer Mutante mit defizienter ALIX Bindung ergab, dass die CEP55/ALIX Interaktion die Trennung der Midbodies beschleunigt, aber nicht an der Regulation von CIN beteiligt ist. Detaillierte Analysen in Zellen und *in vitro* geben starke Hinweise darauf, dass für diesen Prozess die MT-modulierende Aktivität von CEP55 verantwortlich ist. CEP55 hyperstabilisiert MTs und stört so die korrekte Anlagerung der Spindel-MTs an die Kinetochore der Chromosomen. Außerdem gelang es, die MT-bindende Domäne von CEP55 zu identifizieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine starke CEP55 Expression in Ovarialkarzinom Zellen zur Hyperstabilisierung von Spindel-MTs führt und hierdurch höchstwahrscheinlich CIN fördert. Die Identifikation der MT-Bindedomäne von CEP55 ermöglicht es, nach Substanzen zu suchen, die zur Hemmung der CEP55/MT Interaktion führen. Diese Substanzen können nachfolgend auf ihre CIN-inhibierende Wirkung getestet werden.

2. Abstract

Ovarian carcinomas are characterized by the heterogeneity of the tumors caused mainly by chromosomal instability (CIN). CIN is a hallmark of cancer and is associated with a poor prognosis. CIN can be caused by defective regulation of spindle-microtubule (MT) dynamics, and it has been shown that several proteins are associated with CIN. Among these, Centrosomal Protein 55 (CEP55) plays an essential role in CIN and tumorigenesis. CEP55 binds to and stabilizes MTs and serves as a scaffold protein that recruits ALG-2-interacting protein X (ALIX) and Tumour Susceptibility Gene 101 (TSG101) to the Midbody. It is overexpressed in many tumors but in healthy tissues only in thymus and testis.

This thesis aimed to elucidate the MT-modulating activity of CEP55 in CIN and Midbody separation. For this purpose, the ovarian carcinoma cell line SKOV-3 was used. It could be shown that CEP55 knockdown reduced the speed of Midbody separation and increased proper chromosome alignment. Accordingly, also the number of micronuclei as well as chromosome heterogeneity were reduced in CEP55 knockdown cells. From these results, one can conclude that CEP55 controls Midbody separation and CIN. Re-expression of wildtype CEP55 and an ALIX-binding deficient mutant showed that the interaction between CEP55 and ALIX accelerated Midbody separation but was not required for CEP55-promoted CIN. Detailed analysis in cells and *in vitro* indicated that the MT-modulating effect of CEP55 causes this effect. The protein hyperstabilizes MTs and thereby perturbs the proper attachment of spindle-MTs to chromosomes. In addition, the MT-binding domain inside the CEP55 molecule could be identified.

In summary, it could be shown that strong expression of CEP55 in ovarian carcinoma cells results in hyperstabilization of spindle MTs and thereby, most likely, in stimulation of CIN. Identifying the CEP55 MT-binding domain enables screening for compounds inhibiting the interaction between CEP55 and MTs. In future studies, these compounds can be tested for their inhibitory effect on CIN.

3. Einleitung - Theoretischer Hintergrund

3.1 Überblick über Ovarialkarzinome

Ovarialkarzinome stehen auf Platz sieben der häufigsten Krebserkrankungen weltweit und stellen die tödlichste gynäkologische Krebserkrankung dar (Zhang et al., 2019). Sie sind jährlich für etwa 152.000 Todesfälle verantwortlich (Reid et al., 2017). Da Ovarialkarzinome in frühen Stadien überwiegend asymptomatisch sind, werden sie oft erst spät diagnostiziert, wodurch die geringe durchschnittliche Überlebensrate von nur 40% erklärt wird (Jayson et al., 2014). Die Überlebensrate ist vom Tumorstadium bei der Diagnose abhängig, bei lokal begrenzten Tumoren (Stadium I) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 90% (Stewart et al., 2019). Haben sich jedoch schon Metastasen gebildet (Stadium IV), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 25% (Vargas 2014). 90% der Ovarialkarzinome sind epithelialen Ursprungs (Prat 2012). Sie können in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden, hierzu gehören seröse, muzinöse, klarzellige und endometriotische Tumore (McCluggage 2011). Die serösen Tumore bilden die größte Gruppe und lassen sich in *low-grade* und *high-grade* Tumore einteilen, die Gruppe der *low-grade* serösen Tumore macht jedoch nur 5% aller Ovarialkarzinome aus (Gilks und Prat 2009; Vang et al., 2009). *High-grade* Tumore sind maligner, sie sind chromosomal instabil und metastasieren früher (Lengyel 2010).

Eine wichtige Eigenschaft von Ovarialkarzinomen ist die Heterogenität der Tumore, wodurch die Therapie deutlich erschwert wird (Kossaï et al., 2018). Viele Studien zeigen einen Zusammenhang der Progression von epithelialen Ovarialkarzinomen mit Chromosomaler Instabilität (CIN) (Venkitaraman 2014). Für *high-grade* seröse Karzinome wurden verschiedene Hinweise auf CIN gefunden, wie zum Beispiel Zugewinn oder Verlust von einzelnen Chromosomen oder die Verdopplungen des gesamten Genoms (Nelson et al., 2020). Zur Entstehung einer CIN kommt es während des Zellzyklus durch Fehler in der Replikation oder Verteilung der DNA auf die Tochterzellen (Bakhoum und Landau 2017).

3.2 Der Zellzyklus

Im Verlauf des Zellzyklus wird die Replikation der DNA sowie deren Verteilung auf zwei neue Tochterzellen koordiniert (Coffman 2004). Der Zellzyklus lässt sich in vier Phasen einteilen, bestehend aus G₁-Phase (engl. *gap*, Lücke), Synthese- (S), G₂-Phase und Mitose (Abb. 1) (Bybee und Thomas 1991). Zellen die nicht aktiv proliferieren befinden sich in einem reversiblen Ruhestadium, der G₀-Phase (Pardee 1989). Unter der Bezeichnung Interphase werden G₁-, S- und G₂-Phase zusammengefasst, sie macht etwa 90% des Zellzyklus aus (Schafer 1998). In der G₁-Phase wird entschieden, ob die Zelle in die G₀-Phase eintritt, stirbt oder der Zellzyklus mit der S-Phase und somit mit der Duplikation der DNA fortgesetzt wird (Sherr 1996;

Massagué 2004). Der Übergang von der G₁- zur S-Phase wird durch den G1-S Checkpoint reguliert (Harashima et al., 2013). Auf die S-Phase folgt die G₂-Phase, in der die DNA auf Fehler geprüft und die Zelle auf die Teilung in der Mitose vorbereitet wird (Hartwell und Weinert 1989). Liegt kein Fehler in der verdoppelten DNA vor, kann der G2-M Checkpoint passiert werden und die Zelle tritt in die Mitosephase ein (Taylor und Stark 2001).

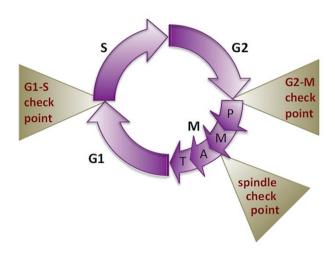


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus. Der Zellzyklus wird in 4 Phasen eingeteilt: G1-, Synthese (S), G2-Phase und Mitose. Der Übergang von G1- zu S-Phase wird durch den G1-S Checkpoint reguliert. In der S-Phase erfolgt die Duplikation der DNA, die in der nachfolgenden G2-Phase auf Fehler durch die Replikation geprüft wird. Wird der G2-M Checkpoint passiert beginnt die Mitose. Sie kann ebenfalls in mehrere Phasen unterteilt werden: Prophase (P), Metaphase (M), Anaphase (A) und Telophase (T). Zwischen Meta- und Anaphase liegt der Spindel Checkpoint, der eine korrekte Trennung der Chromosomen gewährleistet (Harashima et al., 2013).

3.2.1 Die Mitose

Die Mitose ist die letzte und kürzeste Phase im Zellzyklus und lässt sich in fünf Phasen einteilen (Abb. 2): Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Walczak et al., 2010). In der Prophase wird die Zelle auf die Mitose vorbereitet, die Proteinbiosynthese wird heruntergefahren und die Interphase Mikrotubuli (MTs) lösen sich auf (McIntosh 2016). In der Prophase beginnt die Kondensation der in der S-Phase duplizierten Chromosomen zu den Chromatiden (Gadde und Heald 2004). Die Schwesterchromatiden sind durch Cohesin-Komplexe miteinander verbunden, wodurch ihre Struktur stabilisiert wird (Peters et al., 2008). Zeitgleich mit der Chromosomenkondensation kommt es zur Trennung der ebenfalls in der S-Phase duplizierten Centrosomen (Tanenbaum und Medema 2010; Sluder und Khodjakov 2010). Sie wandern zu entgegengesetzten Seiten innerhalb der Zelle und bilden die Spindelpole (Kellogg et al., 1994). Die Nukleation und Dynamik der MTs wird an den Centrosomen erhöht und der Aufbau des Spindelapparats beginnt (Kuriyama und Borisy 1981; Sakai und Ohta 1991; Walczak et al., 2010). Der Übergang von der Prophase in die Prometaphase ist durch den Abbau der Kernhülle gekennzeichnet, welcher eine Interaktion von dem sich weiter ausbildenden Spindelapparat mit den Chromosomen ermöglicht (Rieder 1991). Am Centromer

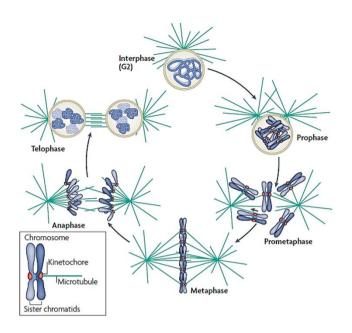


Abb. 2: Die fünf Phasen der Mitose. Nachdem die Zelle aus der G2-Phase in die Mitose eintritt, werden in der Prophase die Chromosomen kondensiert und die Centrosomen trennen sich, um die Spindelpole zu bilden. Beim Übergang von der Prophase in die Prometaphase wird die Kernhülle abgebaut. Es kommt zur Bildung des Spindelapparats und die Spindel-MTs binden an die Kinetochore der Schwesterchromatiden. In der Metaphase sind alle Schwesterchromatiden mit den Spindelpolen verbunden und in der Äquatorialebene angeordnet. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden getrennt und zu den gegenüberliegenden Spindelpolen transportiert. In der anschließenden Telophase dekondensieren die Chromosomen und die Kernhülle wird neu gebildet (Cheeseman und Desai 2008).

der kondensierten Chromosomen werden die Kinetochore gebildet (Rieder und Salmon 1998; Cheeseman und Desai 2008). Kinetochore sind Proteinkomplexe, welche die Anbindung der Chromosomen an die Spindel vermitteln (Mitchison 1989). Die Spindel ist aus drei unterschiedlichen Gruppen von MTs aufgebaut (Abb. 3) (Kline-Smith und Walczak 2004). Die MTs die an die Chromosomen binden werden als Kinetochor-MTs (K-MTs) bezeichnet (Rieder 1991). In humanen Zellen binden etwa 20-30 K-MTs an ein Kinetochor, werden gebündelt und bilden eine Kinetochorfaser (Rieder 2005). Interpolar MTs geben dem Spindelkörper seine Form, sie bilden antiparallele Überlappungen in der Mitte zwischen den Spindelpolen (Glotzer 2009; Tolić 2018). Zusätzlich gibt es die kurzen Astral-MTs, sie wachsen vom Spindelkörper weg und fixieren die Spindel im Zellcortex (Gadde und Heald 2004). Die MTs der Spindel sind hochdynamisch, diese Dynamik wird durch die Interaktion mit diversen MT assoziierten Proteinen (MAPs) koordiniert (Fraschini 2017). Sind die Chromosomen mit der Spindel verbunden, werden diese in der Metaphase in der Äquatorialebene zwischen den Spindelpolen angeordnet (Gadde und Heald 2004). Hierbei wird die exakte Anbindung der Chromosomen durch die Kinetochore kontrolliert (Earnshaw und Pluta 1994).

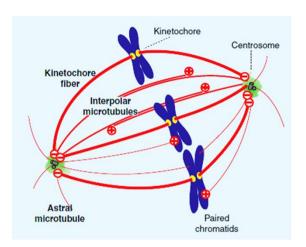


Abb. 3: Aufbau der Metaphase-Spindel. Die Spindel besteht aus drei Arten MTs, deren Minus-Enden an den Spindelpolen (Centrosomen) lokalisiert sind. MTs, die mit den Plus-Enden an die Kinetochore der Chromosomen binden, bilden die Kinetochorfasern. Interpolar-MTs überlappen in der Mitte der Spindel und Astral-MTs sind vom Spindelkörper weg in Richtung Cortex orientiert (Gadde und Heald 2004).

Um eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen zu gewährleisten, müssen die Kinetochore der Schwesterchromatiden an K-MTs des jeweils gegenüberliegenden Spindelpols binden, es entsteht eine bipolar orientierte (amphitelische) Bindung (Abb. 4) (Rieder und Salmon 1998; Cheeseman 2014; Prosser und Pelletier 2017). Bis eine amphitelische Bindung vorliegt kommt es zunächst zu einer monotelischen Bindung, bei der nur ein Kinetochor des Schwesterchromatids mit der Spindel verbunden ist (Nagpal und Fukagawa 2016). Wenn es im Verlauf des K-MT Attachments zu Fehlern kommt entsteht zum Beispiel eine syntelische Bindung, bei der beide Kinetochore mit nur einem Spindelpol verbunden sind (Santaguida und Musacchio 2009). Liegt eine merotelische Bindung vor, wurde ein Kinetochor

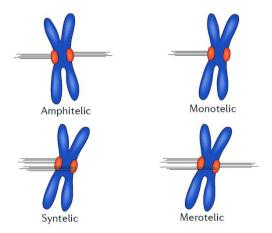


Abb. 4: Arten der Kinetochor/MT-Bindung. Während der Mitose kommt es zur Bindung von MTs an die Kinetochore der Chromosomen. Es wird zwischen verschiedenen Arten der Kinetochor/MT-Bindung unterschieden. Die amphitelische Bindung an MTs der gegenüberliegenden Spindelpole ist die korrekte von der Zelle angestrebte Bindung. Bei einer monotelischen Bindung ist nur ein Kinetochor mit der Spindel verbunden. Zwei weitere fehlerhafte Kinetochor Attachments werden als syntelisch (Bindung beider Kinetochore an einen Spindelpol) oder merotelisch (ein Kinetochor wird von beiden Spindelpolen gebunden) bezeichnet (Prosser und Pelletier 2017).

von K-MTs beider Spindelpole gebunden (Monda und Cheeseman 2018). Inkorrekte Kinetochorbindungen werden von der Zelle vor dem Eintritt in die Anaphase korrigiert (Walczak und Heald 2008). Funktioniert dies nicht, kommt es zu einer fehlerhaften Trennung und es kann zur Entwicklung einer CIN kommen (siehe Punkt 3.4) (Gordon et al., 2012; Vargas-Rondón et al., 2017). Um dies zu verhindern gibt es den Spindle Assembly Checkpoint (SAC). Er verzögert den Fortschritt der Mitose als Reaktion auf eine fehlende bipolare Bindung der Kinetochore (Foley und Kapoor 2013). Ist der SAC aktiviert kommt es zur Bildung des mitotic checkpoint complex (MCC), welcher wiederum den anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) inhibiert und somit den Übergang in die nächste Phase der Mitose verhindert (Musacchio und Salmon 2007). Der SAC wird über eine Veränderung der Kinetochorstruktur durch die Bindung der K-MTs reguliert (Hara und Fukagawa 2020). Kommt es zu einer Verbindung mit beiden Spindelpolen entsteht eine Spannung an den Kinetochoren, wodurch diese gestreckt werden (Nezi und Musacchio 2009). Die Folge ist eine Stabilisierung der K-MT Bindung und die Inhibition des SAC (Waters et al., 1996; Nezi und Musacchio 2009; Monda und Cheeseman 2018). Diese Spannung kann nur bei einer bi-polaren Bindung entstehen, wodurch der SAC aktiviert bleibt, bis ein korrektes Kinetochor/K-MT Attachment vorliegt (Santaguida und Musacchio 2009; Scholey et al., 2003). Wird ein Kinetochor jedoch merotelisch gebunden kann es trotz des Fehlers durch die entstandene Spannung zur Inhibition des SAC und somit zu sogenannten lagging (engl. Hängen) Chromosomen und der Entstehung von CIN (Punkt 3.4) kommen (Cimini et al., 2001; Bakhoum, Thompson, et al., 2009). Hauptgrund für die Entstehung von CIN ist hierbei die übermäßige Stabilisierung der K-MTs, welche die Korrektur der Kinetochor Bindung verhindert (Bakhoum, Thompson, et al., 2009; Thompson et al., 2010; Bakhoum, Kabeche, et al., 2014).

Sind alle Schwesterchromatiden in der Metaphase korrekt mit der Spindel verbunden und in der Äquatorialebene zwischen den Spindelpolen ausgerichtet, kann der SAC inaktiviert werden und der Übergang zur Anaphase findet statt (Lara-Gonzalez et al., 2012). Mit Beginn der Anaphase werden die Cohesine an den Schwesterchromatiden abgebaut, wodurch ihre Trennung möglich wird (Uhlmann 2001; Scholey et al., 2003). Die Chromosomen werden durch die Verkürzung der K-MTs zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen (Mitchison 1989). Parallel hierzu wird die Spindel neu organisiert und auf die Cytokinese vorbereitet (Glotzer 2009). Der Spindelkörper wird durch wachsende interpolar MTs gestreckt und die Spindelpole entfernen sich weiter voneinander (Walczak und Heald 2008; Glotzer 2009). Der überlappende Bereich der interpolar MTs bildet die Zentralspindel, deren weiterer Aufbau durch Zentralspindlin reguliert wird (Antanavičiūtė et al., 2018).

Die Anaphase endet, sobald alle Chromosomen die Pole der Zelle erreichen (Gadde und Heald 2004). In der anschließenden Telophase beginnen die Chromosomen zu

dekondensieren und die Kernhüllen werden aufgebaut (Cheeseman und Desai 2008; McIntosh 2016). Der Spindelapparat löst sich auf und die Zentralspindel bleibt bestehen (Glotzer 2009; Walczak et al., 2010). Die Cytokinese ist der letzte Schritt im Zellzyklus und beginnt bereits im Verlauf der Anaphase (Mierzwa und Gerlich 2014; Antanavičiūtė et al., 2018). Es wird ein kontraktiler Ring aus Aktin und Myosin-II gebildet, welcher für die Abschnürung des Cytoplasmas und die Verdichtung der Zentralspindel sorgt (Glotzer 2001; Mierzwa und Gerlich 2014). Es entsteht eine interzelluläre Brücke aus MT Bündeln in deren Mitte der Midbody entsteht (Hu et al., 2012; Pohl 2017). Am Midbody (auch Flemming-Körper genannt) werden diverse Proteine rekrutiert und reguliert, welche die Trennung der Zellen vermitteln (Paweletz 2001; Doxsey 2005; Peterman und Prekeris 2019). Die Zellteilung endet mit dem Schneiden der Zellmembran und der MTs im Midbody, wodurch zwei vollständige Tochterzellen entstehen (Gershony et al., 2014).

3.3 Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli

MTs sind ein wichtiger Bestanteil des Zytoskeletts und haben verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle. Sie sind essenziell für die Migration der Zellen, die Struktur, den intrazellulären Transport und die Zellteilung (Akhmanova und Steinmetz 2015; de Forges et al., 2012; Brouhard und Rice 2014). MTs sind zylindrische, hohle Filamente mit einem Durchmesser von 25 nm (Hawkins et al., 2010). Sie bestehen aus Heterodimeren, welche aus α - und β -Tubulin aufgebaut sind (Abb. 5) (Bryan und Wilson 1971; Ludueńa et al., 1977). Durch den Einbau dieser Heterodimere entsteht eine Polarisierung der MTs, α-Tubulin befindet sich zum Minus-Ende orientiert und ß-Tubulin zum Plus-Ende (van der Vaart et al., 2009). Die Nukleation der MTs geht in der Regel vom Centrosom aus, welches als sogenanntes MT-Organisationszentrum (microtubule organizing center, MTOC) dient (Kollman et al., 2011). Der Aufbau der MTs beginnt am y-Tubulin Ring Komplex (y-TuRC), welcher aus y-Tubulin und y-tubulin complex proteins 2-6 (GCP2-6) aufgebaut ist, hier wird das Minus-Ende der MTs gebildet (Abb. 5A) (Roostalu und Surrey 2017; Goodson und Jonasson 2018). Der y-TuRC bildet eine Schutzkappe, welche die Nukleation und Depolymerisierung von Tubulin am MT Minus-Ende blockiert (Kollman et al., 2011; Sulimenko et al., 2017). Bei der Polymerisierung von MTs werden Guanosintriphosphat (GTP) gebundene Dimere an das Plus-Ende von wachsenden MTs assoziiert und das GTP vom ß-Tubulin zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert (Weisenberg et al., 1976). Durch eine Verzögerung bei dieser Hydrolyse entsteht am Plus-Ende der MTs eine GTP-Kappe (Margolin et al., 2011). Diese GTP-Kappe bildet einen Schutz vor Depolymerisierung, da GDP-ß-Tubulin Dimere schneller dissoziieren als GTP-ß-Tubulin Dimere (Carlier 1991; Nogales 2000). GTP wird allerdings nicht immer vollständig vom ß-Tubulin hydrolysiert, wodurch entlang der MTs GTP-Inseln entstehen (Abb. 5B) (Dimitrov et al., 2008). MTs sind nicht starr, sondern hoch dynamisch und sie können wachsen und wieder abgebaut werden (Desai und Mitchison 1997). Dieser Wechsel von Polymerisierung und Depolymerisierung wird als dynamische Instabilität beschrieben (Mitchison und Kirschner 1984). Bei einer Depolymerisierung, einer sogenannten Katastrophe, der MTs kann an entstandenen GTP-Inseln eine erneute Polymerisierung starten, dieser Vorgang wird *Rescue* genannt (Abb. 5B) (Dimitrov et al., 2008; Wade 2009; de Forges et al., 2012).

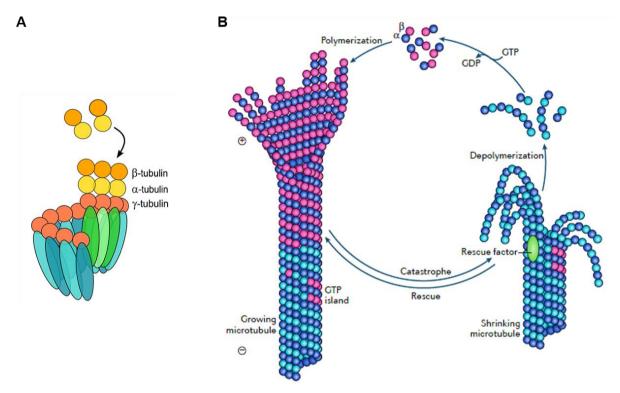


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus und der dynamischen Instabilität von MTs. (A) Schematischer Aufbau des γ-TuRC aus γ-tubulin complex proteins 2–6 (GCP2-6) (blau und grün) und γ-Tubulin (rot). An das γ-Tubulin assoziieren Tubulin Heterodimere über das α-Tubulin (gelb und orange) (Sulimenko et al., 2017). (B) Die dynamische Instabilität von MTs beschreibt einen Kreislauf aus Polymerisierung (*Rescue*) und Depolymerisierung (*Catastrophe*). Die MTs wachsen an ihren Plus-Enden durch die Assoziation neuer GTP gebundener α- und β-Tubulin Heterodimere. Das GTP am β-Tubulin wird zu GDP hydrolysiert, am Plus-Ende entsteht eine Kappe aus GTP-Tubulin. Entlang der MTs kommt es durch unvollständige GTP Hydrolyse zu sogenannten GTP-Inseln. Kommt es zu einer Depolymerisierung, können GTP-Inseln oder Rettungsfaktoren (*Rescue factor*) zu einer erneuten Polymerisierung der MTs führen (Akhmanova und Steinmetz 2015).

Die dynamische Instabilität der MTs ist während der Mitose entscheidend für die Organisation der Spindel und die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (Brouhard und Rice 2014; Manka und Moores 2018). Sie wird durch verschiedene Gruppen von MAPs reguliert (Olmsted 1986; Goodson und Jonasson 2018). Es gibt Proteine wie MAP1 oder MAP2 die zur Stabilisierung von MTs dienen und entlang der MTs gebunden sind (Wade 2009). *Plus-end tracking proteins* wie EB1 oder EB3 binden an die Plus-Enden der MTs, um die Depolymerisierung zu verhindem und Interaktionen von MTs mit unterschiedlichen Organellen und weiteren MAPs zu fördern (van der Vaart et al., 2009; Akhmanova und Steinmetz 2015; Gupta et

al., 2014). Es gibt nicht nur stabilisierende, sondern auch MT destabilisierende Proteine wie das Schneideprotein Spastin, welches unter anderem eine Rolle bei der Cytokinese spielt (McNally und Roll-Mecak 2018; Connell et al., 2009; Matsuo et al., 2013). Es gibt Motorproteine, wie Dyneine und Kinesine, die sich unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) entlang der MTs bewegen und für den intrazellulären Transport verantwortlich sind (Franker und Hoogenraad 2013; Alfaro-Aco und Petry 2015). Ihre Bewegung ist unidirektional also entweder in Richtung Plus- oder Minus-Ende der MTs orientiert (Hirokawa et al., 1998). Während der Mitose bewegen sie die Chromosomen entlang der K-MTs in Richtung Äquatorialebene oder Spindelpol (Sharp et al., 2000). Die Bewegung der Chromosomen zu den Spindelpolen wird durch Depolymerisierung der K-MTs an den Kinetochoren erreicht, eine Bewegung in die Äquatorialebene durch Polymerisierung (Wade 2009).

Eine weitere Möglichkeit die Funktion von MTs zu regulieren sind posttranslationale Modifikationen (PTMs) von α - und/oder β -Tubulin (Janke und Bulinski 2011). Die meisten PTMs befinden sich an den C-terminalen Seitenketten von α - oder β -Tubulin, den Hauptinteraktionsorten der MAPs, wodurch sie auf unterschiedliche Arten die Interaktion von MTs mit MAPs beeinflussen (Gadadhar et al., 2017). Die am besten charakterisierten PTMs an MTs sind Acetylierung, Detyrosinierung, Polyglutamylierung und Polyglycilierung (Abb. 6) (Janke und Magiera

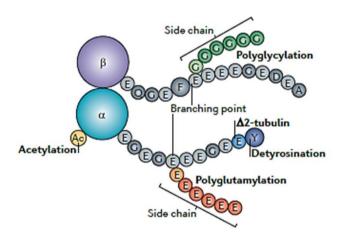


Abb. 6: PTMs an **Tubulin Heterodimeren.** An Tubulin Dimeren kommt es zu unterschiedlichen PTMs. An den Cterminalen Seitenketten von α - und β -Tubulin können Polyglycilierungen und Polyglutamylierungen entstehen Detyrosinierungen entstehen ebenfalls an der C-terminalen Seitenkette jedoch ausschließlich am α -Tubulin. Wird zusätzlich ein Glutaminrest entfernt entsteht $\Delta 2$ -Tubulin. Acetylierungen entstehen am Lysin 40 des α -Tubulin (Janke und Bulinski 2011).

2020). Die Acetylierung von α-Tubulin erfolgt am Lysin 40, welches sich innerhalb der MTs befindet (L'Hernault und Rosenbaum 1985). Änderungen in der Acetylierung der MTs zeigen einen Einfluss auf den intrazellulären Transport durch Kinesin-1 oder Dynein (Dompierre et al., 2007). Bei der Glutamylierung oder Glycilierung werden ein Glutamat oder Glycin an die Seitenketten von α- oder β-Tubulin angefügt. Die Entstehung von Polyglutamylierung oder -

Glycilierung entsteht durch das Anbringen mehrerer Glutamate oder Glycine an die Seitenketten (van Dijk et al., 2007). Polyglycilierte MTs werden überwiegend in Zilien nachgewiesen (Wloga et al., 2017). Polyglutamylierte MTs kommen zum Beispiel in der Spindel vor (Lacroix et al., 2010). Die Detyrosinierung ist spezifisch für MTs und findet ausschließlich am α -Tubulin statt (Prota et al., 2013). Am Ende der C-terminalen Seitenkette von α -Tubulin befindet sich ein Tyrosin, welches abgespalten wird (Westermann und Weber 2003). Dieser Prozess ist reversibel und kann durch die Tubulin Tyrosin Ligase wieder rückgängig gemacht werden (Hallak et al., 1977; Raybin und Flavin 1977). Die Detyrosinierung von α -Tubulin sorgt für eine Stabilisierung der MTs und tritt häufig an der Spindel auf (Gundersen und Bulinski 1986).

3.4 Mechanismus der chromosomalen Instabilität und dessen Bedeutung bei der Tomorgenese

CIN bezeichnet die fortwährende Entstehung von Veränderungen des Genoms, die durch Chromosomen bedingt ist (Sansregret et al., 2018). Bereits 1914 wurde ein Zusammenhang von Veränderungen der Chromosomen und Krebs vermutet (Boveri 1914). Mittlerweile ist bekannt, dass CIN einen entscheidenden Faktor bei der Entwicklung von Tumoren sowie Metastasen darstellt und zu den "hallmarks of cancer" gehört (Turajlic und Swanton 2016; Bach et al., 2019). Sie wird auch als Tumor initiierender Prozess beschrieben (Geigl et al., 2008). Etwa 60-80% aller Tumore zeigen chromosomale Veränderungen, die auf eine CIN hinweisen (Bakhoum und Cantley 2018). Sie trägt zur Heterogenität von Tumoren bei und wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (Dewhurst et al., 2014; McGranahan et al., 2012; Bakhoum und Cantley 2018; Burrell et al., 2013). CIN ist ein dynamischer Prozess, bei dem Zellen kontinuierlich ihren Karyotyp verändern (Abb. 7), wodurch die Diversität der Tumorzellen gefördert

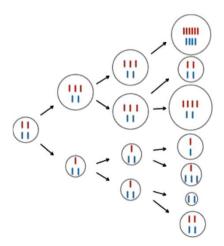


Abb. 7: Dynamik von CIN in Krebszellen. In Krebszellen kommt es zu andauernden Fehlern bei der Trennung der Chromosomen. Die Folge ist eine kontinuierliche Veränderung des Karyotyps und eine Heterogenität der Zellen in einem Tumor (Bakhoum und Landau 2017).

wird (Lengauer et al., 1998). Hierbei zeigen die Zellen innerhalb eines Tumors eine unterschiedliche Anzahl an Chromosomen (Bakhoum und Landau 2017).

CIN lässt sich in zwei Kategorien einteilen welche jedoch für gewöhnlich gemeinsam auftreten: strukturelle und numerische Veränderungen der Chromosomen (Abb. 8) (Roschke und Rozenblum 2013; Geigl et al., 2008; Vargas-Rondón et al., 2017). Aneuploidien und Polyploidien sind die häufigsten chromosomalen Veränderungen, sie machen die numerische CIN aus (Bach et al., 2019). Eine Aneuploidie beschreibt den Zustand einer veränderten Anzahl an Chromosomen (Gordon et al., 2012). Bei polyploiden Zellen wurden ganze Chromosomensätze vervielfältigt (Geigl et al., 2008). Zu strukturellen Veränderungen von Chromosomen gehören Deletionen, Amplifikationen, Translokationen oder Inversionen von Genen und die Entstehung von dizentrischen Chromosomen (Chromosomen mit zwei Centromeren) oder Ringchromosomen (Gollin 2004; Thompson und Compton 2011; Wang et al., 2020). Ebenfalls zur strukturellen CIN gehört die Chromothripsis, sie beschreibt die umfangreiche Neuanordnung von Chromosom-Fragmenten, wobei es zusätzlich zu einem Verlust von Fragmenten kommen kann (Aguilera und García-Muse 2013; Wilhelm et al., 2020).

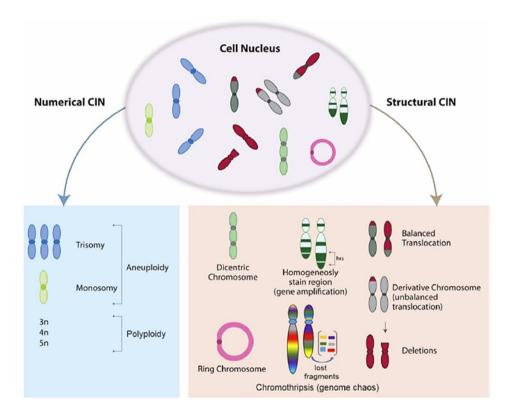


Abb. 8: Merkmale von CIN. Eine CIN ist charakterisiert durch numerische und strukturelle Veränderung der Chromosomen. Bei einer numerischen CIN kommt es zu Aneuploidien (zum Beispiel Trisomie oder Monosomie) oder Polyploidien (vervielfältigte Chromosomensätze). Eine strukturelle CIN ist gekennzeichnet durch Zugewinn, Verlust oder neue Anordnung von Chromosomen-Fragmenten. Die Entstehung von Ringchromosomen oder dizentrischen Chromosomen gehört ebenfalls zur strukturellen CIN (Vargas-Rondón et al., 2017).

3.4.1 Strukturelle CIN durch fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen

Die Ursachen für strukturelle Veränderungen sind oft auf eine fehlerhafte Replikation oder Störungen der DNA-Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche zurückzuführen (Thompson und Compton 2011; Burrell et al., 2013; Wang et al., 2020). Durch die fehlerhafte Reparatur von Doppelstrangbrüchen wird die Bildung von Translokationen gefördert (Schvartzman et al., 2010). Auch bei der Entstehung von dizentrischen Chromosomen oder Ringchromosomen spielen DNA-Reparaturmechanismen eine wichtige Rolle (Thompson und Compton 2011; Gisselsson et al., 2000). Die Enden aller Chromosomen werden durch Telomere, eine Art Schutzkappe, geschützt (Turner et al., 2019). Telomere ermöglichen der Zelle zwischen den Enden der Chromosomen und Brüchen in der DNA zu unterscheiden (Smogorzewska und de Lange 2004). Bei jeder Replikation werden sie allerdings ein Stück kürzer, ein Prozess, dem die Telomerase durch Verlängerung der Telomere entgegen wirkt (Zvereva et al., 2010). Können die Telomere jedoch nicht mehr hergestellt werden, führt dies in einer gesunden Zelle zur Seneszenz oder Apoptose (Turner et al., 2019). Wird dieser Prozess in Tumorzellen umgangen, kommt es zur Reparatur der vermeintlichen Doppelstrangbrüche (der freiliegenden Enden der DNA), indem zwei Chromosomenenden miteinander fusioniert werden (DePinho und Polyak 2004). Es können die Enden von zwei unterschiedlichen Chromosomen betroffen sein oder die beiden Enden eines Chromosoms, wodurch neben azentrischen Chromosomen (ohne Centromer) auch Chromosomen mit zwei Centromeren entstehen können oder ein Chromosom zu einem Ring geschlossen (Ringchromosom) werden kann (Gisselsson et al., 2001; Gollin 2004; Tanaka und Hirota 2016; Sansregret et al., 2018). Die Entstehung dizentrischer Chromosomen kann während der Mitose zur Bildung von Chromosomenbrücken führen (Thompson und Compton 2011: Sansregret und Swanton 2017). Diese können während der Trennung der Zellen brechen und fördern weitere strukturelle Chromosomenveränderungen (Thompson und Compton 2011).

3.4.2 Entstehung von CIN durch Fehler in der Mitose

Chromosomenbrücken entstehen nicht nur durch dizentrische Chromosomen, sondern auch durch Fehler bei der K-MT/Kinetochor Anlagerung während der Mitose, welche zu *lagging* Chromosomen führen (siehe Punkt 3.2.1) (Bakhoum und Landau 2017; McClelland 2017; Vargas-Rondón et al., 2017). Diese können zur Bildung von Mikronuklei beitragen (Potapova et al., 2013). Mikronuklei entstehen durch Chromosomen, die im Lauf der Zellteilung nicht mit in den Nukleus integriert, sondem von einer eigenen Kernhülle umschlossen werden (Geigl et al., 2008; Hintzsche et al., 2017). Sie können in den meisten Tumoren nachgewiesen werden und ihr Vorhandensein wird als Marker für CIN verwendet (Tang et al., 2018). Werden keine Mikronuklei gebildet und die Chromosomen nicht zerrissen, führen *lagging* Chromosomen zu einer veränderten Anzahl an Chromosomen im neu entstandenen Nukleus, es kommt zu einer Aneuploidie (Potapova et al., 2013; Bach et al., 2019; Wilhelm et al., 2020). Polyploide Zellen

können entstehen, indem die Cytokinese durch Chromosomenbrücken verhindert wird und die Zellen wieder fusionieren (Shi und King 2005; Pampalona et al., 2012; Potapova et al., 2013). Die Verdopplung ganzer Genome ist ein Merkmal, welches bei mehreren Krebserkrankungen beobachtet wird, hierzu gehören neben Ovarialkarzinomen auch Mamma-, Lungen- oder kolorektale Karzinome (Carter et al., 2012). Es wird vermutet, dass die Verdopplung von Genomen ein frühes Ereignis in der Karzinogenese ist und anschließend noch weitere Vorgänge für zusätzliche Veränderungen in der Chromosomenanzahl sorgen, wodurch eine CIN entsteht (Davoli und de Lange 2012; Dewhurst et al., 2014; Sansregret et al., 2018). Durch Zugewinn oder Verlust von genetischem Material verändert sich die Fitness der Zellen, es kann zu unkontrollierter Proliferation, erhöhter Migration oder Invasion kommen, welche die Progression von Tumoren fördern (Roschke und Rozenblum 2013; Bach et al., 2019). Eine gut regulierte Zellteilung ist daher essenziell, um die Entstehung von CIN und Karzinomen zu vermeiden.

3.5 Centrosomal Protein 55

Centrosomal Protein 55 (CEP55), auch bekannt als C10orf3 oder FLJ10540, ist ein 55 kDa großes MT-bindendes Protein (Fabbro et al., 2005; Martinez-Garay et al., 2006; Zhao et al., 2006). Es besteht aus 464 Aminosäuren (AS) und weist wie viele andere centrosomale Proteine eine Coiled-Coil (CC) Struktur auf (Martinez-Garay et al., 2006; Jeffery et al., 2016). CEP55 kann Homodimere bilden und interagiert als Gerüstprotein mit diversen Proteinen (Martinez-Garay et al., 2006; Kalimutho et al., 2018). In vitro zeigt CEP55 nicht nur eine MT-Bindung, sondern auch eine MT-Bündelung (Zhao et al., 2006). In vivo konnte eine Stabilisierung von MTs durch CEP55 nachgewiesen werden (Sinha et al., 2020). Während der Mitose ist CEP55 an Centrosom, Spindel und Midbody lokalisiert (Fabbro et al., 2005; Martinez-Garay et al., 2006). Am Ende der Mitose spielt CEP55 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zelltrennung (Fabbro et al., 2005). Allerdings ist die CEP55 vermittelte Zellteilung in den meisten gesunden Geweben nicht essenziell (Tedeschi et al., 2020). Es wird hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert und ist in den meisten adulten Geweben nur in Thymus und Testis nachweisbar (Inoda et al., 2009; Jeffery et al., 2016; Sinha et al., 2020). CEP55 begünstigt die Entwicklung von Tumoren, es zeigt Einfluss auf Proliferation und Zellteilung und es fördert die Entstehung von CIN (Tao et al., 2014; Jeffery et al., 2016; Kalimutho et al., 2018; Sinha et al., 2019).

3.5.1 Die Rolle von CEP55 in der Cytokinese

Vom Zellzyklus abhängig, verändert CEP55 seine Lokalisation in der Zelle (Abb. 9) (Fabbro et al., 2005; Martinez-Garay et al., 2006; Zhao et al., 2006). Fabbro et al. (2005) haben eine

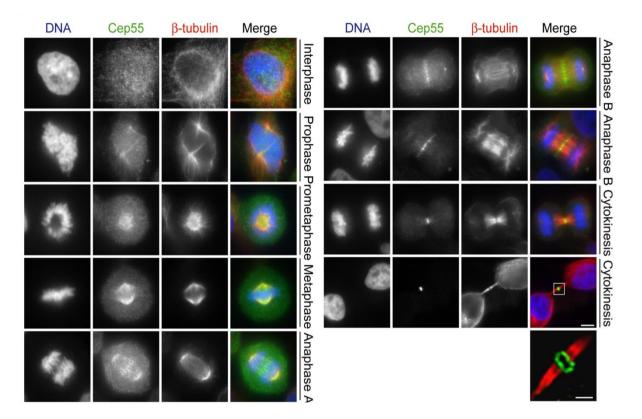


Abb. 9: Lokalisation von CEP55 im Verlauf des Zellzyklus. Immunfluoreszenzfärbung in HeLa Zellen für die Identifikation der CEP55 Lokalisation in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Dargestellt sind Färbungen der DNA (blau), CEP55 (grün) und ß-Tubulin (rot). CEP55 ist in der Interphase diffus in der Zelle verteilt. Im Verlauf der Mitose ist eine Färbung an der sich entwickelnden Spindel, der Zentralspindel und dem Midbody zu sehen (Zhao et al., 2006).

vollständige Translokation von CEP55 während der Mitose, die abhängig von der Phosphorylierung durch Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), extracellular signal-regulated kinase 2 (Erk2) und Polo-like-Kinase 1 (Plk1) gesteuert wird, vorgeschlagen. Konträr hierzu haben Martinez-Garay et al. (2006) die Lokalisation von CEP55 am Centrosom während der gesamten Mitose gezeigt und schlagen die mögliche Rekrutierung von CEP55 an den Midbody aus dem Zytoplasma vor. Auch Zhao et al. (2006) beschreiben eine CEP55 Antikörperfärbung an den Centrosomen in Pro-, Meta- und Anaphase. Während der Interphase ist CEP55 am Centrosom und in der pericentriolaren Matrix lokalisiert und zusätzlich wurde eine diffuse Verteilung im Zytoplasma nachgewiesen (Martinez-Garay et al., 2006; Fabbro et al., 2005; Zhao et al., 2006). Obwohl CEP55 MTs bindet und stabilisiert ist die Lokalisation von CEP55 an das Centrosom unabhängig von dessen MT-Bindeaktivität (Martinez-Garay et al., 2006; Sinha et al., 2020). In der Anaphase ist CEP55 am Spindelpol, an den Spindel-MTs und der Zentralspindel nachweisbar (Martinez-Garay et al., 2006; Zhao et al., 2006). Die Lokalisation von CEP55 an der Zentralspindel und am Midbody wird durch die Interaktion mit Mitotic Kinesin-Like Protein (MKLP1), einem Bestandteil des Zentralspindel-Komplexes, vermittelt (Zhao et al., 2006; Mondal et al., 2012). In MKLP1 Knockdown Zellen konnte CEP55 weder an der Zentralspindel noch am Midbody nachgewiesen werden (Zhao et al., 2006). Von der

Zentralspindel transloziert CEP55 in der Telophase zum Midbody (Martinez-Garay et al., 2006; Zhao et al., 2006).

Am Midbody dient CEP55 als Gerüstprotein und rekrutiert Proteine der ESCRT (*Endosomal sorting complex required for Transport*) Maschinerie, welche für die Trennung der Zellen in der Cytokinese benötigt werden (Abb. 10) (Carlton et al., 2008; Lee et al., 2008; Jeffery et al., 2016). Zwei wichtige Bestandteile sind *ALG-2-interacting protein X* (ALIX) und *Tumor Susceptibility Gene 101* (TSG101) (Carlton et al., 2008; Lee et al., 2008). ALIX und TSG101 sind vor der Cytokinese, wie CEP55, am Centrosomlokalisiert und werden durch die direkte Interaktion mit der ESCRT und ALIX bindenden Region (EABR) von CEP55 zum Midbody rekrutiert (Abb. 10) (Morita et al., 2007; Lee et al., 2008). TSG101 ist eine Untereinheit des ESCRT-I Komplex,

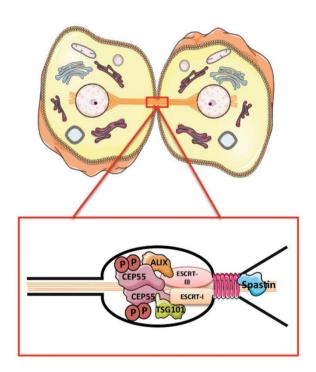


Abb. 10: CEP55 als Gerüstprotein im Midbody. Am Midbody rekrutiert CEP55 über die Interaktion mit TSG101 und ALIX ESCRT-I und ESCRT-III. ESCRT-III bildet ein Filament (pink) um die MTs (orange) und rekrutiert Spastin, welches die MTs schneidet (Jeffery et al., 2016).

über den wiederum der ESCRT-III Komplex zum Midbody rekrutiert wird, ALIX dagegen rekrutiert den ESCRT-III Komplex direkt (Carlton und Martin-Serrano 2007; Morita et al., 2007). Lee et al. (2008) lösten die Kristallstruktur der ALIX-bindenden EABR Domäne (AS 160-217) von CEP55 auf. Sie fanden, dass die EABR Domäne ein Homodimer mit CC Struktur bildet. Außerdem wurde beschrieben, dass ALIX und TSG101 um dieselbe Bindestelle in der EABR Domäne konkurrieren (Lee et al., 2008). Am Midbody müssen demnach mehrere CEP55 Homodimere gebildet werden, die entweder ALIX oder TSG101 binden (Jeffery et al., 2016). Dies passt zu einer CEP55 Ringstruktur, die Zhao et al. (2006) am Midbody gezeigt haben. ESCRT-III bildet in der Trennungszone Filamente, die einen Ring mit 17 nm Durchmesser um die MTs

bilden (Guizetti et al., 2011). Anschließend wird Spastin rekrutiert, um die Midbody-MTs zu schneiden und so die Zellen voneinander zu trennen (Abb. 10) (Connell et al., 2009).

3.5.2 Regulation von CEP55 und dessen Rolle bei der Tumorgenese

Die CEP55 Expression wird durch den Transkriptionsfaktor Forkhead Box M1 (FOXM1) induziert (Gemenetzidis et al., 2009; Waseem et al., 2010). FOXM1 ist in vielen Tumoren überexprimiert und wird mit der Entstehung von CIN assoziiert (Pérez de Castro et al., 2007). In der G2/M Phase wird FOXM1 aktiviert und induziert die Expression von CEP55 und weiteren Proteinen, die am Zellzyklus und der Cytokinese beteiligt sind (Laoukili et al., 2005; Waseem et al., 2010; Jeffery et al., 2016). Passend hierzu haben Zhao et al. (2006) CEP55 in einem Screening für Gene, deren Expression in der G2 oder G2/M Phase induziert wird, gefunden. Ziel dieses Screenings war die Aufklärung weiterer an Mitose und Cytokinese beteiligter Proteine (Zhao et al., 2006). Die Überexpression von CEP55 führte in Kopf-Hals-Karzinomen zu einer Überexpression von FOXM1 und eine Depletion führte zu einer verringerten Expression. was auf einen möglichen positiven Feedbackloop zwischen CEP55 und FOXM1 hinweist (Chen, Chien, et al., 2009; Jeffery et al., 2016). Plk1, welches die Stabilität von CEP55 fördert, steht auch in einem Feedbackloop mit FOXM1 (Fu et al., 2008; Chang et al., 2012). Plk1 erhöht die Phosphorylierung von FOXM1, wodurch dessen Aktivität erhöht wird und da Plk1 ebenfalls ein Target von FOXM1 ist, wird die Transkription gesteigert (Fu et al., 2008). Auch das Tumorsuppressorgen p53 hat einen Einfluss auf die Regulation von CEP55 (Chang et al., 2012). Es reprimiert die Transkription von FOXM1 und Plk1 und beeinflusst auf diese Weise die Expression und Stabilität von CEP55 negativ (Pandit et al., 2009; McKenzie et al., 2010; Chang et al., 2012).

In gesunden, adulten Zellen ist die Expression von CEP55 spezifisch für Thymus und Testis (Fabbro et al., 2005; Inoda et al., 2009). Bei diversen Tumoren kommt es jedoch zu einer CEP55 Überexpression, welche in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose, Aggressivität und Metastasierung gebracht wird (Martinez-Garay et al., 2006; Inoda et al., 2009; Jeffery et al., 2016; Jiang et al., 2018; Sinha et al., 2019). Bei epithelialen Ovarialkarzinomen korreliert eine hohe CEP55-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Invasivität und einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten (Zhang et al., 2016; Si et al., 2019). Neben Ovarialkarzinomen ist eine Überexpression von CEP55 bei Brustkrebs, Magen-, Blasen-, Lungen-, Kolorektalkarzinomen, Gebärmutterhalskrebs, Ösophagus-, Prostata-, oder Pankreaskarzinomen bekannt (Inoda et al., 2009; Wang et al., 2016; Kalimutho et al., 2018; Tao et al., 2014; Singh et al., 2015; Liu et al., 2016; Jiang et al., 2016; Jiang et al., 2018; Ma et al., 2018; Sakai et al., 2006; Inoda et al., 2011; Jiang et al., 2017; Jia et al., 2018; Kulkarni und Uversky 2017; Yang et al., 2020; Qi et al., 2018; Peng et al., 2017). In zellulären Assays konnte ein Einfluss von CEP55 auf Proliferation, Migration, Invasion und die Koloniebildung in verschiedenen

Tumorentitäten nachgewiesen werden (Tao et al., 2014; Singh et al., 2015; Wang et al., 2016; Peng et al., 2017; Kalimutho et al., 2018; Jia et al., 2018).

In mehreren Studien wurde zudem gezeigt, dass eine Überexpression von CEP55 in Krebszellen zu einer Hyperaktivierung des PI3K/Akt Signalwegs kommt (Chen et al., 2007; Wang et al., 2016; Jia et al., 2018; Li et al., 2018; Li et al., 2020). Dies ist zum Beispiel bei Lungen, Leber- oder Magenkarzinomen der Fall, was eine gesteigerte Proliferation, Migration oder Invasion zur Folge hat (Chen et al., 2007; Chen, Lai, et al., 2009; Tao et al., 2014; Jia et al., 2018). Vascular Endothelial Growth Factor A rekrutiert CEP55 an die Plasmamembran, wo es mit P110, der katalytischen Untereinheit von PI3K, interagieren kann (Chen, Lai, et al., 2009). Durch die Interaktion mit P110 ist ein Einfluss von CEP55 auf den PI3K/Akt Signalweg möglich (Chen et al., 2007). P110 wird stabilisiert und die Aktivierung von Akt wird erhöht (Chen et al., 2007; Jeffery et al., 2016).

3.5.3 CEP55 in Zusammenhang mit CIN

Neben der Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs hat CEP55 Einfluss auf die Entstehung von CIN in verschiedenen Tumoren (Jeffery et al., 2016; Kalimutho et al., 2018; Sinha et al., 2020). CEP55 gehört bei Ovarial-, Kolon- und Mammakarzinomen zu einer Signatur von 100 Genen, die bei einer Überexpression mit CIN assoziiert werden (Cheng et al., 2013). In Brustkrebszellen fördert CEP55 den Zugewinn von Chromosomen und verhindert außerdem, dass die Zellen in Mitosearrest gehen (Sinha et al., 2019). Eine CEP55 Überexpression führt durch die Stabilisierung der MTs zu einer fehlerhaften Trennung der Chromosomen in der Anaphase (siehe Punkt 3.2.1) (Sinha et al., 2020). Hierdurch kommt es zur Bildung von Chromosomenbrücken und Mikronuklei, welche wiederum zur Entwicklung einer CIN führen (Sinha et al., 2020). CEP55 kann jedoch nicht nur bei einer Überexpression zur Entstehung einer Aneuploidie führen, sondern auch durch eine Depletion (Fabbro et al., 2005). Allerdings wird bei Brustkrebs das Überleben von aneuploiden Zellen nur bei einer CEP55 Überexpression gefördert (Kalimutho et al., 2018).

Da CEP55 in den meisten Geweben kaum detektierbar ist, in Tumoren dagegen übermäßig exprimiert wird und in Zusammenhang mit deren Malignität gebracht werden kann, stellt es ein vielversprechendes Ziel für neue Therapieansätze dar. Hierfür ist es essenziell, die Aktivitäten von CEP55 vollständig aufzuklären.

4. Zielsetzung

Es ist zwar bekannt, dass CEP55 eine essenzielle Rolle bei der Tumorgenese spielt, allerdings wurde bisher nicht aufgeklärt welche Aktivität von CEP55 dafür verantwortlich ist. Um diese Frage zu beantworten, sollte die Auswirkung eines CEP55 Knockdowns auf die Midbody-Dynamik und CIN untersucht werden. Hierbei wurde sich auf die CEP55 vermittelte Regulation der MT-Dynamik sowie die Rolle der CEP55/ALIX Interaktion fokussiert.

5. Material und Methoden

5.1 Materialen

5.1.1 Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet. Der Leervektorfür die stabile Expression in humanen Zellen LeGo-iB₂ Neo+ wurde freundlicherweise von PD Dr. Kristoffer Riecken (UKE) zur Verfügung gestellt. Der Leervektor für die bakterielle Expression rekombinanter Proteine wurde freundlicherweise von der AG Itzen, (IBS, UKE) zur Verfügung gestellt. Für die Selektion in Bakterien wurden 100 µg/ml Ampicillin (Amp) eingesetzt.

Tabelle 1: Für die Expression in humanen Zellen und Bakterien verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz in Bakterien	Resistenz in humanen Zellen
LeGo-iB ₂ Neo+	Amp	G418
LeGo-iB ₂ Neo+ CEP55 ^{WT}	Amp	G418
LeGo-iB ₂ Neo+ CEP55 ^{Y187A}	Amp	G418
psf421 10xHis-GFP	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔEABR	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-CD	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔCD	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔN	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔC	Amp	/
psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔNC	Amp	/

5.1.2 Primer

Tabelle 2: Klonierungs- und Sequenzierprimer für die Klonierung der CEP55 cDNA in den LeGo-iB2-Neo+Vektor.

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing- Temperatur	Verwendung	
CEP55_BamHI_F W	GCGGATCCATGTCTTCC AGAAGTACC	65 °C	Einfügen einer BamHI Schnittstelle zur Klonie- rung in den LeGo-iB ₂ Neo+	

CEP55_EcoRI_R V	GCGAATTCCTACTTTGA ACAGTATTCCAC		Einfügen einer EcoRI Schnittstelle zur Klonie- rung in den LeGo-iB ₂ Neo+
CEP55_QC_Y18 7A_FW CEP55_QC_Y18 7A_RV	GCATCAATTGCATGTAA TTCTTAAG CTTAAGAATTACATGCA ATTGATGC	64 °C	QC zur Herstellung von CEP55 ^{Y187A} durch den Austausch von Tyrosin (Y) an Stelle 187 durch Alanin (A)
CEP55 Seq_FW CEP55 Seq_RV	GCTGCTCATTCACTCCC ACAGC GTCGCTGTATTTCTTTG TCC	/	Sequenzierung

Nachfolgend stehen die Primer, die für die Klonierung von CEP55 in den psf421 10xHis-GFP Vektor verwendet wurden. Bei Primern für die SLIC Klonierung wurden nur an das Insert bindende Sequenzabschnitte (unterstrichen) zur Bestimmung der Annealing-Temperatur genutzt. Für die Klonierung von CEP55-ΔN wurde CEP55_to psf_RV als RV Primer verwendet. Für die Klonierung von CEP55-ΔC wurde CEP55_to psf_FW als FW Primer verwendet. CEP55-ΔNC wurde durch die Verwendung von CEP55_ΔN_FW und CEP55_ΔC_RV hergestellt.

Tabelle 3: Klonierungs- und Sequenzierprimer für die Klonierung der CEP55 cDNA in den psf421 10xHis-GFP Vektor.

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing- Temperatur	Verwendung
Psf_linear_FW	TAAGCTTAATTAGCTGA GCTTGGACTC	- 64 °C	Linearisierung des psf421 10xHis-GFP
Psf_linear_RV	ATGGCCCTGAAAATAAA GATTCTC	04 C	
CEP55_to psf_FW	GCTGATGAGAATCTTTA TTTTCAGGGCCATTCAA TGTCGTCACGCAGCAC		Amplifikation der Codon- optimierten CEP55 cDNA für die Klonierung
CEP55_to psf_RV	CAACAGGAGTCCAAGC TCAGCTAATTAAGC <u>TTA</u> TTTAGAGCAGTATTCTA CGTGGACTAA	65 °C	in den psf421 durch SLIC Klonierung
CEP55_CD_FW	GCTGATGAGAATCTTTA TTTTCAGGGCCATTCAG TTTTAAAAACAACAACTTA GTGC	59 °C	Amplifikation von CEP55-CD für die Klo- nierung in den psf421 durch SLIC Klonierung
CEP55_CD_RV	CAGGAGTCCAAGCTCA GCTAATTAAGC <u>TTAAAG</u> TGTACACGCCTG		
CEP55_ΔCD_FW	TCCCAGGTAGATTTCGA AAATGAAAAGCTG	70 °C	Amplifikation von CEP55-ΔCD aus dem

CEP55_ΔCD _RV	CAGAAGGCCATCTTTT CCTCGGAAAGG		psf421 Vektor mit an- schließender KLD Klo- nierung
CEP55_ΔEABR _FW CEP55_ΔEABR _RV	CAGCAGACCAAGAAAC CGGAAAGTG GCAGTTAGGCGCTACC GTCTG	70 °C	Amplifikation von CEP55-ΔEABR aus dem psf421 Vektor mit an- schließender KLD Klo- nierung
CEP55_ΔN_FW	CTGATGAGAATCTTTAT TTTCAGGGCCATTCA <u>CT</u> TGAGAAGATTAGAGTCC TAGAAGC	65 °C	Amplifikation von CEP55-ΔN für die Klo- nierung in den psf421 durch SLIC Klonierung
CEP55_ΔC_RV	CAGGAGTCCAAGCTCA GCTAATTAAGC <u>TTAAGA</u> TTTTGGGCTGGCTG	64 °C	Amplifikation von CEP55-ΔC für die Klo- nierung in den psf421 durch SLIC Klonierung
CEP55opti Seq_FW CEP55opti Seq_RV	CCTGAATCAGTTGTTGT ACAGC CTGCTGCGGTAAGCTAT GAG	/	Sequenzierung

5.1.3 Antikörper

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet. Die Primärantikörper wurden sofern nicht anders vermerkt in Blockierlösung verdünnt. Sekundärantikörper wurden in PBS (Immunfluoreszenz) oder TBS-T (Western-Blot) verdünnt.

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Blockierlösung a) Western-Blot b) Immunfluoreszenz	Verdünnung a) Western-Blot b) Immunfluoreszenz	Nummer, Hersteller
CEP55 (D1L4H)	Kaninchen	a) 5% MP b) 1% BSA	a) 1:1000, 5% BSA b) 1:200	#81693, Cell Signaling
Detyrosina- ted α-Tubu- lin	Kaninchen	a) / b) 1% BSA, 0,05% Triton-X-100	a) / b) 1:200	ab48389, Abcam
HSC70	Maus	a) 2,5% BSA oder 5% MP b) /	a) 1:6000 b) /	Sc-7298, Santa Cruz
anti-ß-Tu- bulin	Maus	a) 2,5% BSA b) /	a) 1:1000 b) 1:200, 4% FCS	T4026, Sigma- Aldrich
BubR1	Kaninchen	a) 5% MP b) /	a) 1:2000 b) /	ab172581, Abcam

Phospho	Kaninchen	a) 5% MP	a) 1:2000	ab200061,
BubR1		b) /	b) /	Abcam
(T680)				
Phalloidin	/	1	a) /	ab176753,
iFluor 488			b) 1:2000 PBS	Abcam

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Verdünnung a) Western-Blot b) Immunfluoreszenz	Nummer, Hersteller
HRP Goat Anti-Rabbit	Kaninchen	a) 1:20000	ab205718,
			Abcam
HRP Goat Anti-Mouse	Maus	a) 1:20000	ab97040,
			Abcam
Alexa Fluor® 488	Kaninchen	b) 1:2000	ab150077,
			Abcam
Alexa Fluor® 568	Maus	b) 1:2000	A-11004, In-
			vitrogen

5.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (A. dest) angesetzt. Alle Stocklösungen wurden zur Verwendung auf 1-fache Konzentration verdünnt. Für die Einstellung der pH-Werte wurden NaOH oder HCl verwendet.

Wenn notwendig wurden Puffer filtriert und/oder autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min).

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
2YT	Für 1 L:
	16 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
TB- Medium	Für 900 ml:
	12 g Trypton
	24 g Hefeextrakt
	4 ml Glycerol
	Direkt vor Gebrauch 100 ml 10x TB-Salze zufügen
10x TB-Salze	0,17 M KH2PO4
	0,72 M K2HPO4
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris pH 6,8
	4% SDS
	30% Glycerol
	1,3% Bromphenolblau
	20% Mercaptoethanol

Trenngel 10% bzw. 12%	375 mM Tris pH 8,8
	0,1% SDS
	10% bzw. 12% Acrylamid
	10 μl/ml 10% APS
	i 1 μl/ml TEMED
Sammelgel	125 mM Tris pH 6,8
	0,1% SDS
	4% Acrylamid
	10 μl/ml 10% APS
	1 µl/ml TEMED
PBS	137 mM NaCl
	2,68 mM KCI
	10 mM Na2KHPO4
	1,76 mM KH2PO4
	pH 7,4
SDS Laufpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1% SDS
TBS-T	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,1% Tween 20
Western-Blot-Puffer	2,5 mM Tris
Wooden Blot Fund	19,2 mM Glycin
	0,1% SDS
	20% Methanol
Lysepuffer	20 mM HEPES pH 7,5
	400 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	0,5 mM Benzamidin
Waschpuffer	Lysepuffer
	1 mM PMSF
Dialysepuffer	20 mM HEPES pH 7,5
	250 mM NaCl
	1 mM ß-MeOH
Homogenisierungspuffer	0,1 M MES pH 6,5
The state of the	2 mM EGTA
	0,1 mM EDTA
	0,5 mM MgCl ₂
Polymerisierungspuffer	0,1 M PIPES pH 6,8
	2 mM EGTA
	0,5 mM EDTA
	0,5 mM MgCl ₂
Säulenpuffer	50 mM PIPES pH 6,8
2331011231101	1 mM EGTA
	0,2 mM MgCl ₂
	0,2 1111VI 1VIGOIZ

5.2.5 Zelllinien und Zellkulturmedien

HEK 293T Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Manfred Jücker (IBS, UKE) und SKOV-3 und OVCAR-8 parental Zellen von PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer (Gynäkologie, UKE) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei ATCC® bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und Medien.

Zelllinie	Medium und Zusätze
HEK 293T	DMEM (41965-039, Gibco) mit 10% FCS (10270, Gibco)
	(v/v), Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 μg/ml)
	(15070063, Gibco)
SKOV-3 parental	McCoy's 5A Medium (26600-023, Gibco) mit 10% FCS (v/v),
	2 mM GlutaMAX™-I (13462629, Gibco), Penicillin (100
	units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)
SKOV-3 Knockdown (scr,	McCoy's 5A Medium mit 10% FCS (v/v), 2 mM GlutaMAX™-I,
CEP55 sh1 und sh2)	Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) und
	3 μg/ml Puromycin (P8833, Sigma-Aldrich)
SKOV-3 Rückexpression	McCoy's 5A Medium mit 10 % FCS (v/v), 2 mM GlutaMAX™-
(scr + L, sh1 + L,	I, 3 μg/ml Puromycin und 700 μg/ml G418 (M3118.0050,
sh1 + CEP55WT,	Genaxxon bioscience)
sh1 + CEP55 ^{Y187A})	
OVCAR-8 Rückexpression	RPMI Medium 1640 + GlutaMAX™-I (72400-021, Gibco) mit
(scr + L, sh1 + L,	10% FCS (v/v), 2 μg/ml Puromycin und 500 μg/ml G418
sh1 + CEP55WT,	
sh1 + CEP55 ^{Y187A})	

5.2. Molekularbiologische Methoden

Für die stabile Expression von CEP55 in humanen Zellen wurde die cDNA in den LeGo-iB2 Neo+ Vektor (freundlicherweise von PD Dr. Kristoffer Riecken (UKE) zur Verfügung gestellt) kloniert (Punkt 5.2.1). Die verwendete CEP55 cDNA wurde freundlicherweise von Kerstin Kutsche (UKE) zur Verfügung gestellt. Die cDNA entspricht der Transkript-Variante 1 (NCBI: NM_018131.4:305-1699 Homo sapiens centrosomal protein 55 (CEP55)). Zusätzlich wurde durch Quickchange Mutagenese (QC) eine Mutante hergestellt, bei der die Bindung von ALIX an CEP55 nicht möglich ist (LeGo-iB2 Neo+ CEP55^{Y187A}) (Punkt 5.2.2). Die Vektorkarten der hergestellten Plasmide sind im Anhang (Punkt 10.1.1, Abb. 37) dargestellt.

Für eine rekombinante Expression von CEP55 in *E. coli* wurden der psf421 10xHis-GFP Vektor (freundlicherweise von der AG Itzen (IBS, UKE) zur Verfügung gestellt) und eine für *E. coli* Codon-optimierte Version der CEP55 cDNA verwendet. Hierfür wurden die Tripletts der AS mit dem *Codon Optimization Tool* von idtdna.com auf die Expression in *E. coli* angepasst. Das Verhältnis der tRNA Zusammensetzung variiert von Spezies zu Spezies, dementsprechend

kann eine Anpassung der Sequenz an die *Codon Usage* des Zielorganismus eine reibungslose Translation fördern und so die Ausbeute an rekombinantem Protein erhöhen (Gustafsson 2004). Das Codon-optimierte Gen (Anhang, Punkt 10.2) wurde als Genfragment bei idtdna.com bestellt und mit einer SLIC Reaktion (Punkt 5.2.3) in das Plasmid psf421 10x His-GFP kloniert. Im Anschluss wurden unterschiedliche Konstrukte (Tabelle 1) für die Identifikation der MT-Bindestelle hergestellt. Hierfür wurden SLIC und KLD Klonierungen verwendet (Punkt 5.2.3 und 5.2.4). Für die Klonierung und Sequenzierung der unterschiedlichen Plasmide wurden die verwendeten Primer bei idtdna.com bezogen. Die Vektorkarten der hergestellten Plasmide sind im Anhang (Punkt 10.1.2, Abb. 38-41) dargestellt.

5.2.1 Klonierung von CEP55WT in den LeGo-iB2 Neo+ Vektor

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Für die PCR (Tabelle 8 und 9) der CEP55 cDNA wurden Primer mit Überhängen, mit den eingefügten Schnittstellen BamHI (*forward* Primer (FW)) und EcoRI (*reverse* Primer (RV)) verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 8: Zusammensetzung PCR-Ansatz mit Q5-Polymerase.

Volumen (50 µl)	Komponente
32,5 µl	A. dest
10 µl	5x Q5 Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	Primer FW (10 µM)
2,5 µl	Primer RV (10 µM)
1 µl	Template (10 ng/µl)
0,5 µl	Q5 DNA-Polymerase

Tabelle 9: PCR-Programm für Q5-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	_
Denaturierung	98 °C	15 s	
Primer Annealing	Tabelle 2 und 3	30 s	20 Zyklon
Elongation	72 °C	20-	30 Zyklen
-		30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	•
Hold	4 °C	∞	

Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (740609.50, Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll gereinigt und in einem Volumen von 20 µl eluiert. Um den Erfolg der PCR zu prüfen wurden 4 µl des PCR-Produkts mit Probenpuffer (B7024, NEB) auf ein 1%iges Agarosegel (11406.03, SERVA) in 1x TEA Puffer (42553, SERVA) mit DNA Stain G (39803, SERVA) aufgetragen und bei 120 V getrennt. Als Marker für die Größe der Proben wurde der Quick-Load® 1 kb DNA Ladder (N0468, NEB) verwendet.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zwischenklonierung in das pGEM-T Easy Vektorsystem I (A1360, Promega). Der pGEM-T Easy ist linearisiert mit Poly-T-Überhängen an den Enden. Für eine Ligation mit dem PCR-Produkt mussten zunächst Poly-A-Überhänge an den Enden angefügt werden. Die verwendete GoTaq® DNA-Polymerase (M3001, Promega), besitzt die Eigenschaft am 3'-Ende der DNA einen Adenin Überhang zu bilden. Der A-Tailing Ansatz (Tabelle 10) für 30 min bei 72 °C inkubiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung A-Tailing Ansatz.

Volumen (20 µl)	Komponente
13 µl	PCR-Produkt
4 µl	5x GoTaq® Puffer
2 µl	d A TPs (2 mM)
1 µl	GoTaq® DNA-Polymerase

Für die Ligation mit dem pGEM-T Easy wurde der Ligationsansatz (Tabelle 11) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde in XL1-*Blue E. coli* transformiert (Punkt 5.2.5) und anschließend die Plasmid-DNA isoliert (Punkt 5.2.6).

Tabelle 11: Zusammensetzung Ligationsansatz für die pGEM-T Easy Ligation.

Volumen (20 µl)	Komponente
	2x Ligationspuffer
5 µl	A-Tailing Ansatz
1 µl	pGEM-T Easy
1 µl	T4 DNA Ligase (M1801,
·	Promega)

Um die CEP55^{WT} cDNA in den LeGo-iB₂ Neo+ einzufügen wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Ligation durchgeführt. Für den Verdau wurden die Enzyme BamHI und EcoRI verwendet. Diese Enzyme schneiden die DNA an einer spezifischen, palindromischen Sequenz und bilden einen Überhang am 5'-Ende der DNA. Es wurden je 2 μg DNA von Insert (pGEM-T Easy mit CEP55^{WT}) und Vektor (LeGo iB₂ Neo+) in einem 10 μI Ansatz mit 0,5 μI Enzym BamHI (R0136, NEB) und EcoRI (R0101, NEB) in Puffer 2.1 (B7202, NEB) für 3 h bei 37 °C verdaut. Im Anschluss an den Verdau wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (siehe oben) die entsprechenden Banden bei 1,4 kb (CEP55) und 8,7 kb (LeGo-iB₂ Neo+) ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Für die Ligation mit der Qick Ligase (M2200, NEB) wurde eine molare Ratio von 1:3 (Vektor:Insert) verwendet. Der Ligationsansatz (Tabelle 12) wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend 10 μl in XL1-*Blue E. coli* transformiert (Punkt 5.2.5). Die Plasmide wurden isoliert (Punkt 5.2.6) und der Erfolg der Ligation durch einen Testverdau (Visualisierung durch ein 1%iges Agarosegel) geprüft. Nach erfolgreicher Ligation erfolgte eine Sequenzierung der eingefügten DNA (Punkt 5.2.7).

Tabelle 12: Zusammensetzung Ligationsansatz.

Volumen (20 µl)	Komponente
10 µl	2x Quick Ligase Puffer
100 ng	
48,15 ng	Insert
	Mit A. dest auf 20 µl auffüllen
1 µl	Quick Ligase

5.2.2 QC Mutagenese zu Herstellung von LeGo-iB₂ Neo+ CEP55Y187A

Für die Herstellung einer ALIX binde defizienten Mutante von CEP55 (CEP55^{Y187A}) wurde mit Hilfe der QC die AS Tyrosin (Y) an Stelle 187 durch ein Alanin (A) ersetzt (Lee et al., 2008). Hierfür wurden 2 Basen des Tripletts verändert, TAT wurde zu GCT mutiert. Die QC wurde mit CEP55 im p-GEM T Easy Vektorsystem durchgeführt. Es wurden 2 komplementäre Primer (Tabelle 2), in denen die Mutation in der Mitte liegend eingebracht ist, entworfen und eine PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (M0530, NEB) durchgeführt. Für die QC-PCR wurden zunächst zwei 25 µl Ansätze (Tabelle 13) pipettiert, ein Ansatz für den FW Primer, einen Zweiten für den RV Primer. Die einzelnen Ansätze wurden zunächst für 10 Zyklen amplifiziert (Tabelle 14), zusammen pipettiert und die DNA für weitere 18 Zyklen vervielfältigt.

Tabelle 13: Zusammensetzung QC-PCR mit Phusion- Polymerase.

Volumen (25 µl)	Komponente
15,5 µl	A. dest
5 µl	5x HF Puffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer FW <u>oder</u> RV (10 μM)
2,5 µl	Template (10 ng/µl) Phusion DNA-Polymerase
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase

Tabelle 14: PCR-Programm für QC-PCR mit Phusion- Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer		
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec		_
Denaturierung	98°C	10 sec	10	FW + RV
Primer Annealing	64°C	30 sec	Zyklen	18 Zyk-
Elongation	72°C	2,5 min	Zykien	len
Finale Elongation	72°C	5 min	•	•
Hold	4°C	∞		

Nach der PCR wurde der Ansatz für 3 h mit 1 µl DpnI (#ER1702, Thermo Fisher) behandelt. DpnI ist ein Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA verdaut. Hierdurch wurde das Template abgebaut, ohne das PCR-Produkt zu schädigen. Im Anschluss wurden PCR-Produkt und verdautes Template mittels 1% Agarose Gel getrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Von dem verdauten und gereinigten PCR-Ansatz wurden 10 µl in *E. coli* transformiert (Punkt 5.2.6). Nach der

Isolation der Plasmid DNA (Punkt 5.2.6) wurde der Erfolg der QC durch eine Sequenzierung (Punkt 5.2.7) überprüft. Nachfolgend wurde CEP55^{Y187A} wie unter 5.2.1 beschrieben in den LeGo iB₂ Neo+ kloniert.

5.2.3 SLIC Klonierung

Bei der SLIC (sequence- and ligation-independent cloning) Klonierung wird die Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase genutzt, um ohne Restriktionsenzyme einzelsträngige Überhänge an Insert und Vektor DNA anzubringen (Li und Elledge 2012). Die Fragmente lagern sich durch die entstandenen Überhänge aneinander an und vorhandene Lücken werden nach der Transformation in E. coli bei der Vervielfältigung des Plasmids geschlossen. Der Vektor psf421 10xHis-GFP wurde durch eine PCR (Tabelle 8 und 9) linearisiert. Die cDNA der unterschiedlichen CEP55 Konstrukte wurde mit etwa 30 bp langen Überhängen versehen, welche korrespondierend zur Sequenz des Vektors sind (Tabelle 8 und 9). Für die Bestimmung der Annealing-Temperatur der verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden nur Basen verwendet, die an das zu amplifizierende Gen binden. Für die SLIC Reaktion (Tabelle 15) wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Nach Zugabe der T4 DNA-Polymeræse (M0203, NEB) wurde die Inkubationszeit von exakt 2,5 min sofort gestartet. Anschließend wurde der Ansatz gevortext und mit einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Nach Ende der 2,5 min wurde die Probe sofort für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Der gesamte Ansatz wurde für die Transformation in E. coli XL1-Blue verwendet (Punkt 5.2.5). Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung (Punkt 5.2.7) überprüft.

Tabelle 15: Zusammensetzung SLIC Reaktion.

Volumen (10 µl)	Komponente
	Mit A. dest auf 10 µl
	auffüllen
1 µl	2.1. Puffer
	Vektor
X ng	Insert
0,5 µl	T4 DNA-Polymerase

5.2.4 KLD Klonierung

Die Methode der KLD Klonierung wurde genutzt, um CEP55 Mutanten durch Deletionen oder Insertionen herzustellen. Hierfür wird das Template in einer PCR (Tabelle 8 und 9) mit Primern die den zu deletierenden DNA-Abschnitt flankieren, linearisiert. Für eine Insertion wurden die einzufügenden Basen als Überhang in den Primer eingebaut. Für CEP55-ΔCD wurde ein kleiner Loop (GGCCTTCTGTCCCAGGTA) zwischen AS 126 und AS 362 eingefügt. Eine Liste der verwendeten Primer ist in Tabelle 3 zu finden. Es folgte die Reinigung des PCR-Produkts über ein 1%iges Agarosegel (Punkt 5.2.1) und das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit. Mit dem KLD Enzymgemisch (M0554, NEB) wurden durch die Kinase-Aktivität die Enden des

PCR-Produkts phosphoryliert. Durch die Ligase-Aktivität wurden die Enden miteinander verbunden und so ein neues Plasmid hergestellt. Durch DpnI wurde das methylierte Template verdaut. Der Reaktionsansatz (Tabelle 16) wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* XL1-*Blue* transformiert (Punkt 5.2.5). Nach dem Isolieren der Plasmid-DNA (Punkt 5.2.6) wurde eine Sequenzierung (Punkt 5.2.7) durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung der KLD Reaktion.

Volumen (5 µl)	Komponente
1 µl	PCR Produkt
2,5 µl	2x KLD Reaction Buffer
1 µl	A. dest.
0,5 µl	KLD Enzyme mix

5.2.5 Transformation

Für die Vervielfältigung von Plasmiden oder die Expression von rekombinanten Proteinen durch Bakterien muss zunächst die DNA durch die sogenannte Transformation in kompetente Zellen eingebracht werden. Kompetente Bakterien sind in der Lage freie DNA aus dem umgebenden Medium auf zunehmen. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut, Klonierungsansätze oder 100 ng Plasmid-DNA auf die Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 45 sec bei 42 °C ein Hitzeschock mit nachfolgender erneuter Inkubation auf Eis (1 min) durchgeführt. Zu der Bakteriensuspension wurden 900 µl LB-Medium (X968.4 Roth) pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar Platten mit Amp ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

5.2.6 Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kolonien transformierter Bakterien gepickt und über Nacht in 6 ml LB-Medium mit Amp bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Plasmide wurden mit dem Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (PP-204, Jena Bioscience GmbH) nach Herstellerangaben isoliert und die Konzentration der Plasmid-DNA mittels Mikrovolumen Spektralphotometer (Nanodrop, Thermo Fisher) bestimmt.

5.2.7 Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurden die Plasmide mit den passenden Primern (Tabelle 2 und 3) zur Sanger Sequenzierung bei Microsynth Seqlab eingeschickt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zusammensetzung für einen Sequenzieransatz.

Menge	Komponente
40-100 ng/µl	Plasmid DNA
3 µl	Primer (10 µM)
•	Primer (10 µM) Mit A. dest auf 15 µl
	auffüllen

5.3 Zellbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen (Tabelle 7) wurden im Inkubator bei 37 °C, mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Inkubationsschritte wurden im Inkubator durchgeführt. Die für die unterschiedlichen Zelllinien verwendeten Medien mit Zusätzen sind ebenfalls in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden mit sterilen Materialen, Medien und Puffern an Sicherheitswerkbänken durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

5.3.1 Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung wurden die Zellen alle drei bis vier Tage passagiert. Hierfür wurde das alte Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und für etwa 7-10 min mit 0,05% Trypsin-EDTA (11580626, Gibco) inkubiert, um die adhärenten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Die Proteaseaktivität des Trypsins wurde mit Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und je nach Konfluenz aufgeteilt.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und in Einfriermedium (cryo-safe, KM-11-D, c-c-pro,) oder FCS (10270106, Gibco) + 10% DMSO (D4540, Sigma-Aldrich) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Zum Rekultivieren wurden die Zellen aus dem -80 °C Tiefkühler geholt und schnellstmöglich durch resuspendieren mit 37 °C warmem Medium aufgetaut. Nach 24 h wurde das Medium der frisch aufgetauten Zellen gewechselt, um Reste des Einfriermediums zu entfernen. Nach dem Auftauen wurde der Expressionsstatus der Zellen durch Western-Blot (Punkt 5.4.2) kontrolliert.

5.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst, wie unter Punkt 5.3.1 beschrieben abgelöst und 1:1 mit Trypanblau (T10282, Invitrogen) versetzt. Die Zellsuspension wurde auf die Zählkammer gegeben und im Zellzählgerät (Countes II FL, Invitrogen) automatisiert gezählt.

5.3.3 Herstellung stabiler CEP55 Knockdown Zellen durch lentivirale Transduktion

Für die Herstellung stabiler CEP55 Knockdown Zellen wurden shRNAs benutzt. Es wurde eine lentivirale Transduktion wie in Windhorst et al. (2010) beschrieben durchgeführt. Für die shR-NAs wurden mission shRNA (pLKO.1 shRNA) Plasmide von Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde die shRNA TRCN0000061973 für CEP55 sh1 und TRCN0000061975 für CEP55 sh2 verwendet. Für scrambled sh (scr) Kontrollzellen wurde eine shRNA verwendet welche auf kein bekanntes Gen von bekannten Spezies zielt (SHC016V, Sigma-Aldrich).

Für die Produktion der Viren wurden HEK 293T Zellen verwendet. Es wurden für jede shRNA jeweils 4x10⁶ HEK 293T Zellen in einem Volumen von 10 ml in 10 cm Petrischalen ausgesät. 24 h nach dem Aussäen wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden alle Komponenten (Tabelle 18) in einem Reaktionsgefäß zusammen pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert, bevor die Mischung auf die HEK 293T Zellen gegeben wurde. Nach 4 h Inkubation wurden zusätzlich 5 ml Medium zu den Transfizierten Zellen gegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Transfektion für die Herstellung stabiler Knockdown Zellen.

Menge	Komponente	Beschreibung
200 µl	Opti-MEM™ (31985-06, Gibco)	Minimalmedium
1 µg	shRNA Plasmid	Codiert für shRNA gegen CEP55
750 ng	psPAX2	#12260, Addgene, codiert für
		HIV-Gene gag, pol, rev und tat
250 ng	pMD2.G	#12259, Addgene, codiert für
		VSV-G Hüllprotein
6 µl	FuGENE® (E2311, Promega)	Transfektionsreagenz

Am Tag der Transfektion wurden für jedes Konstrukt, sowie für eine Selektionskontrolle 2x10⁵ SKOV-3 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde der Überstand der HEK 293T Zellen, welcher die Viruspartikel beinhaltet, abgenommen und durch einen 0,45 μm Spritzenaufsatzfilter filtriert. Auf die HEK 293T Zellen wurden vorsichtig 10 ml frisches Medium pipettiert. Das Medium der SKOV-3 Zellen wurde durch 1 ml Medium ersetzt und 2 ml des Virusüberstands auf die SKOV-3 Zellen gegeben. Zur Steigerung der Effizienz der lentiviralen Infektion wurden zusätzlich 8 μg/ml Sequa-brene (S2667, Sigma-Aldrich) auf die Zellen gegeben. Sequa-brene verbessert durch eine Neutralisierung der Ladungen die Bindung der Viruspartikel an die Zellmembran (Denning et al., 2013). Bei den Zellen der Selektionskontrolle wurde das alte Medium durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde nach 48 h wiederholt. 72 h nach der letzten Virusbehandlung wurde mit der Selektion durch 3 μg/ml Puromycin begonnen. Die erfolgreiche Selektion wurde mittels Western-Blot (Punkt 5.4.2) überprüft.

5.3.4 Herstellung von Zellen mit stabiler Expression durch lentivirale Transduktion

Für die Rückexpression von CEP55^{WT} und der ALIX binde defizienten Mutante CEP55^{Y187A} wurde der LeGo-iB₂ Neo+ Vektor verwendet. Die Rückexpression wurde in SKOV-3 CEP55 sh1 Zellen durchgeführt. Für die Herstellung von Kontrollzellen wurde der Leervektor in scr und CEP55 sh1 Zellen eingefügt.

Für die Produktion der Viren wurden 5x10⁶ HEK 293T Zellen einem Volumen von 10 ml Medium in 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Die Komponenten für die Transfektion wurden wie in Tabelle 19 beschrieben angesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Lösung A und B wurden vorsichtig vermischt und anschließend für weitere 20 min bei RT inkubiert, bevor der Transfektionsansatz vorsichtig auf die HEK 293T Zellen getropft wurde. Nach 3 h Inkubation wurden zusätzlich 5 ml Medium auf die HEK 293T Zellen gegeben. Am selben Tag wurden für jedes Konstrukt, sowie eine Selektionskontrolle, 3x10⁵ Zellen der jeweiligen Zielzellen in 6-Well-Platten ausgesät.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Transfektion für die Herstellung einer stabilen Expression.

Lösung	Menge	Komponente	Beschreibung
A	750 µl	OPTI-MEM™	Minimalmedium
	10 µg	Zielplasmid	LeGo-iB2 Neo+ Konstrukte
	10 µg	pMDLg/PRRE Gag-Pol	#12251, Addgene, codiertfür HIV-Gene gag und pol
	5 µg	P_RSV_Rev	#122253, Addgene, codiert für HIV Gen rev
	2 µg	VSV-G pCMV	#8454, Addgene, codiert für VSV-G Hüllprotein
В	750 µl	OPTI-MEM™	Minimalmedium
	40 µl	Lipofectamine 2000	Transfektionsreagenz

Nach 24 h wurden die Virusüberstände von den HEK 293T Zellen abgenommen und mit einem 0,45 μ M Spritzenaufsatzfilter gefiltert. Auf die HEK 293T Zellen wurden vorsichtig 10 ml frisches Medium pipettiert. Das Medium der SKOV-3 Zellen wurde durch 1 ml Medium ersetzt und 2 ml von dem gefilterten Virusüberstand auf die Zielzellen gegeben. Bei der Selektionskontrolle wurde das alte Medium durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde nach 48 und 72 h wiederholt. 72 h nach der letzten Virusbehandlung der Zielzellen wurde mit der Selektion durch 700 μ g/ml G418 (Geneticin) begonnen. Die erfolgreiche Selektion wurde mittels Western-Blot (Punkt 5.4.2) überprüft.

5.3.5 Viabilitäts-Assay

Die Viabilität der Kontroll- und Knockdown Zellen wurde durch den MTS (3-(4,5-dimethylthia-zol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-te-trazolium) Assay bestimmt. Der

MTS Assay basiert auf Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Durch die Dehydrogenase wird das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz in lebenden Zellen zu Formazan (rotbraun) umgesetzt und ins Medium abgegeben (Adan et al., 2016). 1,5x10³ Zellen wurden in Triplikaten in einem Volumen von 100 µl in eine 96-Well-Platte ausgesät. Für den Leerwert wurde zusätzlich ein Well mit 100 µl Medium befüllt. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 h kultiviert. Für die Messung wurden die Zellen wurden mit 20 µl MTS Reagenz (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, G3580, Promega) behandelt und nach 3 h Inkubation die Absorption bei 490 nm im Fluoreszenzspektrometer (Tecan infinite M200) gemessen. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem T-Test geprüft.

5.3.6 Migrationsanalyse - Wundheilungs-Assay

Für die Untersuchung der Migrationsfähigkeit der Zellen wurde der sogenannte Wundheilungs-Assay angewendet. Hierbei wird in einen gleichmäßigen Zellrasen eine "Wunde" eingefügt und beobachtet, wie die Zellen in die Wunde migrieren. Für eine konfluente Zellschicht wurden $2x10^4$ Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurde mit dem IncuCyte® Wound-Maker (Essen Bioscience) in jedem Well eine gleichmäßige Wunde hergestellt. Die abgelösten Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Durch Live-Cell-Imaging im IncuCyte® System wurde die Migration der Zellen in die entstandene Wunde dokumentiert. Für die Analyse wurde mit der IncuCyte® Zoom 2016B Software die prozentuale Konfluenz im Vergleich zur Ursprungswunde berechnet. Jeder Versuch wurde mit jeweils 32 Replikaten durchgeführt. Nach der Bestimmung der Steigung wurde der ungepaarte T-Test verwendet.

5.3.7 Untersuchung der Kolonieformierungskapazität

Eine Eigenschaft, die auf das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen schließen lässt, ist die Bildung von Kolonien aus Einzelzellen. Um die Kolonieformierungskapazität der Zellen zu untersuchen wurde der Kolonieformation-Assay genutzt. Hierfür wurden 3500 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, für 8 Tage kultiviert und evaluiert wie viele Kolonien die einzelnen Zelllinien in diesem Zeitraum generiert haben. Um die Kolonien zählen zu können wurden die Zellen für 15 min bei RT mit 4%PFA/4% Sucrose fixiert und anschließend mit Giemsa (GS500, Sigma-Aldrich) 1:5 verdünnt in kaltem PBS für 15 min gefärbt. Um überschüssige Farbe zu entfernen wurden die Kolonien zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Kolonien mit Hilfe eines Binokulars gezählt. Für die Rückexpression von CEP55 wurden 208 Zellen pro Kammer in 200 μl in *Chamber-Slides* (μ-Slide 8 Well, 80826, Ibidi) ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden wie beschrieben fixiert und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin -iFluor 488 (Tabelle 4) 1:2000 verdünnt in PBS für 30 min bei RT gefärbt. Die Kammern wurden mit der MERGE Funktion des Biorevo, BZ-9000 Keyence Mikroskops gescannt und die Anzahl der entstandenen Kolonien gezählt. Ab einer Anzahl von 8 Zellen wurde eine Kolonie gewertet.

Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde auf die Kontrollzellen (scr bzw. scr + L) normiert und die Signifikanz mit dem ungepaarten T-Test bestimmt.

5.3.8 Untersuchung der Adhäsion

Um die Adhäsionsfähigkeit von SKOV-3 Zellen zu untersuchen wurden *Chamber-Slides* mit Poly-L-Lysin (P4832, Sigma-Aldrich) beschichtet, 3x10⁴ Zellen ausgesät und nach 3 h Inkubation die nicht adhärierten Zellen mit PBS abgewaschen. Die übriggebliebenen adhärierten Zellen wurden mit 4% PFA/Sucrose fixiert und die Zellkerne mittels 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, D1306, Invitrogen) gefärbt. Nach dem Fixieren wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. DAPI wurde 1:2000 in PBS verdünnt und für 5 min bei RT auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die einzelnen Wells der *Chamber-Slides* wurden mit der MERGE Funktion des Biorevo, BZ-9000 von Keyence gescannt und die Anzahl der adhärierten Zellen pro Well mittels *Hybrid Cell Count* Zellzählfunktion der Keyence Software BZ-II Analyzer bestimmt. Die Adhäsion der Zellen wurde auf scr Kontrollzellen normiert.

5.3.9 Chromosomenisolation

Zur Bestimmung der Chromosomenanzahl wurden die Zellen durch die Zugabe von Colchicin in der Metaphase gehalten, wodurch die kondensierten Chromosomen isoliert werden konnten. Jeweils 2x10⁶ Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 ml Medium ausgesät. Nach etwa 6 h Inkubation wurden 60 ng/ml Colchicin (C9754, Sigma-Aldrich) zu den Zellen geben und für weitere 18 h kultiviert. Die behandelten Zellen wurden mit Trypsin abgelöst (Punkt 5.3.1) und in dem abgenommenen Medium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand bis auf 0,5 ml verworfern. Die Zellen wurden langsam (tropfenweise Zugabe) unter vorsichtigem Mischen (Probe durchgehend bei niedrigster Stufe gevortext) mit 10 ml einer kalten, hypotonen Kaliumchlorid-Lösung (75 mM) zum Anschwellen gebracht. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand bis auf 0,5 ml verworfen und die angeschwollenen Zellen langsam mit einer Fixierlösung (tropfenweise Zugabe) aus Methanol und Essigsäure (Verhältnis 3:1) fixiert. Nach anschließender Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde die Fixierung mit Methanol und Essigsäure einmal wiederholt. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand bis auf 0,5 ml verworfen und das Pellet resuspendiert. Objektträger wurden mit einer dünnen Schicht A. dest benetzt und 30 µl Zellsuspension aus einer Entfernung von mindestens 30 cm auf den Objektträger getropft. Die angeschwollenen Zellen platzten durch den osmotischen Druck beim Berühren der Wasserschicht und die Chromosomen wurden freigesetzt. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Chromosomen mit Giemsa 1:5 verdünnt in kaltem PBS für 15 min gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Farbe auf den Objektträgern durch Eintauchen in Leitungswasser

weggewaschen. Direkt vor dem Mikroskopieren wurden die gefärbten Chromosomen mit Eindeckmedium (Fluoromount-G®, 0100-01, SouthernBiotech) und Deckgläschen eingedeckt. Eine weitere verwendete Methode ist das Färben der Chromosomen durch DAPI haltiges Eindeckmedium (VECTASHIELD®Antifade Mounting Medium mit DAPI, H-1200, Vector Laboratories). Aufnahmen wurden mit dem Biorevo, BZ-9000 von Keyence gemacht. Die Chromosomen von mindestens 100 Zellen wurden gezählt und die Signifikanz mittels Zwei-Stichproben F-Test bestimmt.

5.3.10 Mikrotubuli Live-Cell-Imaging mir SiR-Tubulin

Für die Untersuchung der Mikrotubuli Dynamik in lebenden Zellen wurden 1x10⁴ SKOV-3 Zellen ausgesät, für 48 h kultiviert und anschließend mit SiR-Tubulin (#CY-SC002, Spirochome) behandelt. SiR-Tubulin ist ein Molekül welches auf dem Fluorophor Silicon Rhodamin (SiR) und dem Zytostatikum Docetaxel basiert und spezifisch an Mikrotubuli bindet (Lukinavičius et al., 2014). Für die Färbung wurden die Zellen 4 h mit 0,5 µM SiR-Tubulin in Medium inkubiert. Im Anschluss wurde das SiR-Tubulin haltige Medium gegen Medium mit 0,1 µM SiR-Tubulin und 50 nM Hoechst 33342 (62249, Thermo Scientific) für die Färbung der DNA ausgetauscht. Mikroskopiert wurde mit dem Visitron Spinning Disc TIRF confocal Mikroskop (UKE Mikroscopy Imaging Facility – UMIF). Das Mikroskop ist ausgestattet mit einer Inkubationskammer mit 37 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Bei einer 60x Vergrößerung wurden über 15 h alle 5 min Aufnahmen gemacht. In der z-Ebene wurden Stapel mit 0,5 µM Schritten erstellt. Für die Auswertung der Midbody Dynamik wurde die Software Fiji (Schindelin et al., 2012) verwendet. Für die Bestimmung der MT-Geschwindigkeit wurde eine 3D Rekonstruktion von Beginn der Anaphase aus sechs Zeitpunkte rückwirkend mit der Software IMARIS (Oxford Instruments) angefertigt. Aus dieser Rekonstruktion wurde die MT-Geschwindigkeit in µm/h berechnet. Es wurden jeweils mindestens 12 Zellen ausgewertet. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet.

5.3.11 Immunfluoreszenzfärbung

Für alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden jeweils 48 h vor dem Fixieren 2,5x10⁴ Zellen auf ein Chamber-Slide ausgesät. In sämtlichen Wasch- und Blockierungsschritten wurde ein Volumen von 200 µl verwendet, für die Inkubation mit Antikörpern wurde das Volumen auf 130 µl reduziert. Die Waschschritte wurden jeweils dreimal für 5 min mit den jeweiligen Puffern durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 4 und 5 aufgeführt.

Für die Auswertung der Anordnung der Chromosomen (Chromosomen Alignment) der SKOV-3 Zellen in der Metaphase wurden die Spindeln mit einem Antikörper gegen ß-Tubulin und die DNA mit DAPI gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit 4% PFA/4% Sucrose für 15 min bei 37 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen, um die Zellmembran für die Antikörper

durchlässig zu machen dreimal für jeweils 5 min mit 0,1% Triton-X-100/PBS inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurde mit PBS gewaschen. Der Antikörper anti-ß-Tubulin wurde 1:200 in 4% FCS/PBS verdünnt und für mindestens 1 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS. Für ß-Tubulin wurde ein Alexa Fluor 568 gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, dieser wurde 1:2000 in PBS verdünnt und für 1 h bei 37°C mit den Zellen inkubiert.

Für die Untersuchung von stabilisierten Mikrotubuli wurde ein Antikörpergegen detyrosiniertes α-Tubulin verwendet. Die Zellen wurden für 5 min bei -20 °C mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend mit 0,05% Triton-X-100/PBS gewaschen. Zum Blockieren wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin) in 0,05% Triton-X-100/PBS inkubiert. Als nächstes wurde der Antikörper (1:200 in Blockierlösung verdünnt) auf die Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 0,05% Triton-X-100/PBS gewaschen. Der Alexa Fluor 488 gekoppelte Sekundärantikörper wurde 1:2000 in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem mit PBS gewaschen wurde, folgte eine ß-Tubulin Färbung (siehe oben).

Bei der Färbung von CEP55 Bestand der einzige Unterschied zu der Färbung für detyrosiniertes α-Tubulin in der Blockierlösung. Für die CEP55 Färbung wurden 2% BSA in 0,05% Triton-X-100/PBS verwendet. Im Anschluss wurde ebenfalls eine ß-Tubulin Färbung (siehe oben) durchgeführt.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Bradford-Assay

Für die Herstellung von Protein-Lysaten aus humanen Zellen wurden Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät, mit PBS gewaschen und mit 100-200 µl M-PER (78501, ThermoFisher), mit Zusatz von Protease Inhibitor (04693132001, Roche) und Phosphatase Inhibitor (04906845001, Roche), mittels Zellschaber von der 10 cm Schale abgelöst. Eine weitere Möglichkeit war die Verwendung von trypsinierten Zellen (5.3.1), diese wurden pelletiert (1200 rpm, 5 min), gewaschen und anschließend mit MPER lysiert. Die Zelllysate wurden für 5 min bei 80°C eingefroren und danach langsam auf Eis wieder aufgetaut. Durch eine 20 min Zentrifugation bei 13000 g und 4°C wurden die löslichen Proteine (Überstand) von den Zellrückständen (Pellet) getrennt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Lysate wurde der Bradford-Assay verwendet. Dieser Assay basiert auf der Eigenschaft des Coomassie-Farbstoffs bei Bindung an Proteine die Farbe und damit das Absorptionsmaximum zu wechseln (Bradford 1976). Hierdurch kann der

Proteingehalt eines Lysats durch eine Messung der Absorption mit Hilfe eines Standards ermittelt werden. Es wurde eine BSA-Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung verwendet. Es wurden 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg und 3 µg BSA in einem Volumen von 50 µl aufgetragen. Die Protein-Lysate wurden 1:200 mit A. dest verdünnt, von dieser Verdünnung wurden 50 µl für die Messung verwendet. 200 µl Bradford Reagenz (Bio-Rad Cat, LOT 5000006) wurden zum Standard und den zu messenden Lysaten zugefügt, für 5 min bei RT inkubiert und danach die Absorption bei 595 nm im Fluoreszenzspektrometer (Tecan infinite M200) gemessen. Die Lysate wurden mit 4x SDS-Probenpuffer (Tabelle 6) versetzt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Die verdünnten Lysate wurden für 5 min bei 95 °C aufgekocht und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot

Für die Trennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurde die Methode der SDS-PAGE genutzt. SDS denaturiert die Proteine und sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung. Hierdurch können die Proteine durch elektrische Spannung der Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden 10 oder 12%ige SDS-Gele verwendet. Zuerst wurde das Trenngel (10% oder 12%) gegossen (Tabelle 6) und für 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das 4%ige Sammelgel (Tabelle 6) gegossen und ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Die Gele wurden mit Proteinen oder Protein-Lysaten (Punkt 5.4.1) in Probenpuffer beladen und die Proben im Sammelgel bei 80 Volt zu einer klaren Lauffront fokussiert. Im Trenngel wurden die Proteine bei 140 Volt getrennt. Zur Visualisierung aller Proteine im SDS-Gel wurde Roti®-*Blue Quick* (4829, Roth) verwendet.

Zur Visualisierung von ausgewählten Proteinen durch Antikörper wurde der Western-Blot verwendet. Hierfür wurden die Proteine nach Standardverfahren aus dem SDS-Gel durch Elektrophorese für 3 h bei 45 V und 4°C auf eine 0,45 µm Nitrocellulose Membran (GE10600002, Amersham™) geblottet. Die Membranen wurden mit 5% Milchpulver (MP) oder 2,5% BSA, gelöst in *Tris buffered saline* mit 0,1% Tween 20 (TBS-T, Tabelle 6), für 45 min blockiert, um unspezifische Bindestellen zu maskieren. Anschließend wurde der Primärantikörper (Tabelle 4) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 15 min mit TBS-T gewaschen bevor sie mit dem passenden Sekundärantikörper (Tabelle 5) inkubiert wurde. Als Sekundärantikörper wurden HRPgekoppelte Antikörper verwendet, welche 1:20000 in TBS-T verdünnt für 1 h bei RT inkubiert wurden. Vor der Detektion wurde erneut dreimal für je 15 min mit TBS-T gewaschen. Entwickelt wurden die Blots nach 5 min Inkubation mit der ECL Prime Western-Blotting Reagenz (RPN2232, Amersham™) durch Chemilumineszenz im Intas ECL CHEMOCAM Imager. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels Fiji Software. Die Intensität wurde auf HSC70

und anschließend auf ausgewählte Kontrollzellen normiert. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet.

5.4.3 Präparation von nativem Tubulin aus Schweinehirnen

Für Tubulin *in vitro* Versuche wurde natives Tubulin aus frischen Schweinehirnen isoliert. Die Isolation wurde nach Vorlage des Max-Planck-Institute *of Molecular Biology and Genetics* (Hyman Labor) mit einigen Anpassungen durchgeführt. Die Isolation des Tubulins aus dem Gewebe wurde durch eine Reihe von kalten und warmen Zentrifugationen (Depolymerisierungs- und Polymerisierungsschritten) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein Reinigungsschritt über eine Phosphocellulose Matrix, um das Tubulin von MAPs zu trennen.

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben auf 4°C gekühlt verwendet.

Die Hirne wurden morgens frisch (noch warm) vom Schlachthof abgeholt und bis zur Verarbeitung in einer Eis/Salz Lösung gelagert. Es wurde mit 7 Hirnhälften gearbeitet. Die Hirne wurden mit Tüchern von Hirnhäuten, Blutresten und Gefäßen gesäubert, zerkleinert und in 600 ml kalten Homogenisierungspuffer (Tabelle 6) mit 0,1% ß-MeOH und 1 mM ATP (A2383, Sigma-Aldrich) gegeben. Das Homogenat wurde nach der Homogenisierung mit dem Ultraturrax (IKA® T25 easy clean digital) (bei 7000 rpm, für etwa 5 min auf Eis), für 15 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr vorsichtig (um das weiche Pellet nicht zu lösen) in neue Zentrifugationsgefäße umgefüllt und für 60 min bei 4 °C und 34.200 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und die Konzentrationen von MgCl2 auf 3 mM, GTP (G8877, Sigma-Aldrich) auf 0,5 mM und ATP auf 1,5 mM angepasst. Anschließend wurde für die Tubulin-Polymerisierung ein halbes Volumen (auf 37 °C vorgewärmtes) 100%iges Glycerin zu dem Lysat gegeben und das Lysat schnellstmöglich im Wasserbad auf über 30 °C erwärmt.

Ab einer Temperatur von 30 °C wurde das Lysat durch die Polymerisierung deutlich viskos. Anschließend wurde für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Lysat auf Zentrifugationsgefäße aufgeteilt und bei 37 °C für 150 min bei 50.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets mit dem polymerisierten Tubulin in jeweils 5 ml Polymerisierungspuffer (Tabelle 6) mit 0,1% ß-MeOH resuspendiert und mit einem Douncer homogenisiert. Die resuspendierten Pellets wurden vereinigt und ein Bradford Assay (Punkt 5.4.1) zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Sollte die Konzentration über 25 mg/ml liegen muss sie durch Zugabe von Polymerisierungspuffer verringert werden.

Die Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank auf Eis depolymerisiert und am nächsten Tag für 30 min bei 4 °C und 150.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und erneut vereinigt. Nach dem Anpassen der Konzentrationen von MgCl₂ auf 4 mM, GTP auf 0,5 mM

und ATP auf 1 mM wurde erneut ein halbes Volumen (auf 37 °C vorgewärmtes) 100%iges Glycerin zu dem Lysat gegeben und die Tubulinlösung schnellstmöglich im Wasserbad auf über 30 °C erwärmt. Nach dem Beginn der Polymerisierung wurde das Tubulin für 40 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit dem polymerisierten Tubulin bei 29 °C (maximal Temperatur der Zentrifuge) für 60 min bei 150.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets vorsichtig mit einem Spatel in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Pellets wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Vor dem Auftauen der Pellets wurde die P11 Matrix (C2258, Sigma-Adrich) für die Reinigung des Tubulins über die Säule vorbereitet. Hierfür wurde P11 Matrix in 0,5 M NaOH (25-faches Volumen bezogen auf das Trockengewicht der Matrix) aufgenommen, vorsichtig gerührt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit A. dest gewaschen bis der pH-Wert unter 10 lag. Es folgte ein 5 min Inkubationsschritt mit dem 25-fachen Volumen an 0,4 M HCl. Im Anschluss wurde mit A. dest gewaschen bis der pH-Wert wieder über 4 lag. Im letzten Schritt wurde die Matrix mit 3 Säulenvolumen Säulenpuffer (Tabelle 6) equilibriert.

Die eingefrorenen Pellets wurden in 2 ml Polymerisierungspuffer mit 0,1% β-MeOH resuspendiert und anschließend mit einem Douncer homogenisiert, bis keine Stücke mehr übriggeblieben sind. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde erneut ein Bradford Assay (Punkt 5.4.1) durchgeführt. Sollte die Konzentration über 35 mg/ml liegen muss die Konzentration durch Zugabe von Polymerisierungspuffer verringert werden. Die Lösung mit dem Tubulin wurde auf Eis für 40 min zur weiteren Depolymerisierung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in Zentrifugengefäße gefüllt und bei 4 °C und 150.000 g für 30 min zentrifugiert. Die Überstände (insgesamt 2 ml) wurden nach der Zentrifugation direkt auf die vorbereitete P11 Matrix (2 ml) geladen. Die Säule wurde mit insgesamt 10 ml Säulenpuffer gewaschen und der Durchfluss der Säule (Poly-Prep Columns #7311550EDU, BioRad) wurde in 500 μl Fraktionen aufgefangen. Je 20 μl der Fraktionen wurden anschließend für eine SDS-PAGE (Punkt 5.4.2) verwendet.

5.4.4 Rekombinante Expression und Reinigung von CEP55 Konstrukten

Die Codon-optimierten CEP55 Konstrukte wurden mit einem His-GFP-Tag exprimiert. Das GFP-Tag wurde als Möglichkeit zur Visualisierung verwendet. Das His-Tag diente der Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie. Nickel-Chelatkomplexe binden Histidin nicht-kovalent, so kann das rekombinante Protein gebunden werden. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit Imidazol, welches das Histidin kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt. Mit steigender Konzentration konnten hierdurch Proteine ohne Tag entfernt und das Fusionsprotein schließlich eluiert werden.

Für die Expression der rekombinanten His-GFP-CEP55 Proteine wurde die entsprechende Plasmid-DNA (Tabelle 1) in Rosetta 2(DE3)pLysS *E. coli* transformiert (Punkt 5.2.5). Für die Vorkultur wurde eine Kolonie der transformierten Bakterien in 200 ml 2YT Medium (Tabelle 6) mit Amp gegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zum animpfen der Haupt-kultur wurden die Bakterien der Vorkultur pelletiert (5000 rpm 10 min) und in 1 L TB Medium (Tabelle 6) mit Amp resuspendiert. Die Anfangs OD600 der Kultur sollte für eine erfolgreiche Expression zwischen 0,4 und 0,8 liegen. Um verlässliche Werte zu erhalten wurde zur Messung der OD600 eine 1:10 Verdünnung der Bakteriensuspension in A. dest vorgenommen. Die Bakterien wurden bis zu einer OD600 von 3 weiter bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Durch die gute Pufferwirkung des TB-Mediums und den Zusatz von Glycerol kann eine Expression mit hoher Zelldichte durchgeführt werden. Bei erreichter OD600 wurde die Expression der Proteine durch 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Expression wurde über Nacht bei 16 °C und 180 rpm durchgeführt. Die Bakterien wurden geemtet (10 min, 5000 rpm), die Pellets mit PBS gewaschen, erneut pelletiert (10 min, 5000 rpm), in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Reinigung der Proteine wurden die Pellets auf Eis mit 20 ml Lysepuffer (Tabelle 6) aufgetaut und gelöst. Die Bakteriensuspension wurde mit dem Ultraturrax bei 7000 rpm für 30 sec homogenisiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1,8 kbar aufgeschlossen (French press System, Constant Systems Ltd CF1) und sofort 1 mM PMSF zugefügt. 0,1% Triton-X-100 und 25 mM Imidazol wurden mit der Suspension für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 rpm und 4 °C für 30 min wurde das Lysat für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfdreher mit Ni-NTA Agarose Beads (R901, Invitrogen) in einem 50 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Um die Beads zu equilibrieren wurden sie einmal mit A. dest und anschließend zweimal mit Waschpuffer (Tabelle 6) mit 25 mM Imidazol gewaschen. Die Suspension aus Beads und Lysat wurde auf eine Säule (7372532, BioRad) gegeben.

Ungebundene Proteine wurden durch Waschschritte (Puffer auf 4 °C gekühlt) mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen entfernt. Zuerst wurde mit 100 ml 25 mM Imidazol und 0,1% Triton-X-100 in Waschpuffer gewaschen. Es folgte ein 25 min Inkubationsschritt mit 10 mM ATP und 20 mM MgCl₂ in Waschpuffer mit 25 mM Imidazol, um Verunreinigungen durch Chaperone zu entfernen (Morales et al., 2019). Anschließend wurde mit 100 ml 35 mM Imidazol, 0,1% Triton-X-100 und 20 mM MgCl₂ in Waschpuffer gewaschen. Die nächsten Waschschritte erfolgten mit 50 mM, 62,5 mM und 75 mM Imidazol in Waschpuffer mit einem Volumen von jeweils 100 ml. Die Elution wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden die Beads mit Waschpuffer mit 130 mM und anschließend mit 150 mM Imidazol für 10 min inkubiert. Nach der zweiten Elution wurden die Beads mit 15 ml Waschpuffer ohne Imidazol gespült um das restliche gelöste Protein zu eluieren. Die Elutionsfraktionen wurden gepoolt und über

Nacht bei 4 °C mit Dialysepuffer (Tabelle 6) dialysiert (44146.04, SERVA). Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteine durch Zentrifugenfilter (Amicon®Ultra, UFC905024 und UFC903024, Merck) eingeengt. Zur Quantifizierung der Protein konzentration wurden 10 µl der Proteine mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und eine SDS-PAGE mit einem BSA-Standard durchgeführt (Punkt 5.4.2).

5.4.5 Visualisierung von Rhodamin-markierten MTs und GFP-CEP55

Für die Visualierung von MTs durch Mikroskopie wurde Rhodamin-markiertes Tubulin verwendet (#TL590M, Cytoskeleton). Zur Herstellung des verwendeten Rhodamin-Tubulins wurde markiertes Tubulin mit nicht markiertem Tubulin (#T240, Cytoskeleton) im Verhältnis 1:10 vermischt. Hierfür wurden die Tubulin-Arten in BRBR80 Puffer (#BST01, Cytoskeleton) mit 1 mM GTP (#BST06, Cytoskeleton) auf 10 mg/ml verdünnt. Zum markierten Tubulin wurden 20 μl Tubulin, 0,8 mM DTT, 2,7 mM GTP und 10 μl BRB80 Puffer pipettiert. Die Mischung (Endkonzentration 125 μM Tubulin) wurde für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, aliquotiert (je 2 μl), in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

Für die Vorbereitung des Versuchs wurden zu dem Aliquot des hergestellten Rhodamin Tubulin 35 μM Taxol gegeben und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. 1 μl der stabilisierten MTs wurde mit 360 μl BRB80 Puffer mit 20 μM Taxol und 1 mM GTP verdünnt (Endkonzentration 250 nM) und für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei RT wurden die MTs erneut für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurden 250 nM Protein und 250 nM markiertes Tubulin gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 μl der Protein-Tubulin Lösung auf ein Poly-L-Lysin beschichtetes *Chamber-Slide* aufgetragen. Nach weiteren 10 min wurden die Proben mit 30 μl Fluoromount G eingedeckt. Die MTs wurden bei 568 nm mit dem TCS SP8 (Leica) Mikroskop (UKE Mikroscopy Imaging Facility – UMIF) oder dem Biorevo, BZ-9000 Keyence Mikroskop analysiert.

Um die Auswirkungen von GFP-CEP55 auf die Stabilität von MTs aufzuklären wurde eine kälteinduzierte Depolymerisierung durchgeführt. Die Rhodamin-markierten MTs wurden wie beschrieben vorbereitet, für 10 min mit den Proteinen inkubiert (je 250 nM Protein und Tubulin) und anschließend für 1 h bei 4 °C depolymerisiert. Zusätzlich wurden die Proben alle 15 min für 10 sec gevortext. Wie beschrieben wurden die MTs auf ein *Chamber-Slide* gegeben und eingedeckt. Die Proben wurden mit dem Biorevo, BZ-9000 Keyence Mikroskop mikroskopiert.

5.4.6 Analyse der MT-Polymerisierung

Durch MTs wird mehr Licht gebrochen als durch Tubulin Dimere, dies ist durch eine erhöhte optische Dichte messbar, welche proportional zum Wachstum von MTs ansteigt (Gaskin et al.,

1974). Diese Tatsache wurde genutzt um den Einfluss von CEP55 auf die Polymerisierung von MTs in einem Trübungsassay (durch die Messung der Absorption) zu untersuchen. Die GFP-CEP55 Proteine wurden mit Zentrifugenfiltern (Amicon® Ultra, UFC503008 und UFC505008, Merck) zu 80 mM PIPES pH 6,8, 3 mM MgCl₂ und 1 mM EGTA umgepuffert. Für den Versuch wurden je 237 nM Protein und 3 µM Tubulin (Punkt 5.4.3) in einem Volumen von 100 µl mit 10% DMSO und 1 mM GTP eingesetzt. Das Tubulin wurde direkt vor Beginn der Messung aus dem -80°C Tiefkühler genommen, aufgetaut und zu den übrigen auf 37°C vorgewärmten Komponenten gegeben. Die Polymerisierung wurde bei 340 nm und 37°C für 6 h alle 12 sec im Fluoreszenzspektrometer (Tecan infinite M200) gemessen.

5.4.7 Bindung von CEP55 an Tubulin und MTs

Für die Testung der Bindung von Tubulin und Mikrotubuli an unterschiedliche GFP-CEP55 Konstrukte wurde das jeweilige GFP-CEP55 an GFP-Trap® Magnetic Agarose (gtma, ChromoTek) Beads immobilisiert und anschließend mit Tubulin oder polymerisierten MTs inkubiert. Um die Bindung von Tubulin und MTs an die GFP-CEP55 Proteine nachzuweisen wurde ein Western-Blot (Punkt 5.4.2) mit ß-Tubulin Antikörper gemacht.

Die Beads wurden jeweils in Suspension inkubiert und gewaschen. Um den Überstand abzunehmen wurden die Beads durch einen magnetischen Ständer im Reaktionsgefäß fixiert. Für 355 nM Protein wurden 15 µl der Beads-Suspension verwendet. Sie wurden zweimal mit jeweils 1 ml 20 mM HEPES, 250 mM NaCl und 1 mM DTT equilibriert. Anschließend wurden die Proteine zu den Beads gegeben, mit Puffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfdreher inkubiert. In der Inkubationszeit wurden Tubulin und MTs vorbereitet.

Für die Vorbereitung der MTs wurden pro Probe 545 nM Tubulin in BRB80 Puffer verwendet. Um die Pufferbedingungen des aus Schweinehirnen isolierten Tubulins (Punkt 5.4.3) an den BRB80 Puffer anzupassen wurden 30 mM PIPES und 0,8 mM MgCl2 zugegeben. Durch die Zugabe von 1 mM GTP wurde die Polymerisierung gestartet und durch die serielle Zugabe von Taxol wurden die wachsenden MTs stabilisiert. Hierfür wurden initial 0,15 μM Taxol hinzugefügt und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Taxol-Konzentration jeweils auf 1 μM, 5 μM und 20 μM erhöht und erneut für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (Miller et al., 1991). Nach der Polymerisierung der MTs wurden diese auf Eis abgekühlt. Durch Überprüfen der Viskosität der gekühlten MTs wurde eine Depolymerisierung ausgeschlossen. Für die Bindung an das Protein wurde der pH-Wert von 6,8 durch die Zugabe von KOH auf 7,5 erhöht. Für das Tubulin wurden die Pufferbedingungen wie oben beschrieben angepasst. Das Tubulin wurde auf 545 nM in 200 μl BRB80 verdünnt und der pH-Wert auf 7,5

erhöht. Das Tubulin wurde auf Eis gehalten und vor der Inkubation mit den Proteinen stark gevortext.

Im Anschluss an die Inkubation mit den GFP-Proteinen wurde zweimal mit 1 ml 20 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NaCl und 1 mM DTT gewaschen. Das Tubulin beziehungsweise die Mikrotubuli wurden auf die immobilisierten Proteine gegeben und es wurde für 1 h bei 4°C inkubiert. Zwischendurch wurden die Beads vorsichtig durch leichtes Schnipsen aufgewirbelt. Um ungebundene Proteine zu entfernen wurde sechsmal mit je 500 µl Puffer (50 mM HEPES KOH pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2,5 mM KCl und 0,5 mM DTT) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Beads in 40 µl 4x SDS-Probenpuffer (Tabelle 6) aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Für den Western-Blot wurden jeweils 10 µl für eine 10%ige SDS-PAGE verwendet.

5.5 *In silico* Strukturvorhersagen

5.5.1 Sekundärstruktur Analyse CEP55

Um einen besseren Überblick über die Sekundärstruktur von CEP55 zu erhalten wurden verschiedene Programme zur Vorhersage von verschiedenen Strukturmerkmalen verwendet. Für die Analysen von α-Helix-, β-Faltblatt- und *Random Coil* (zufällige Coil) Strukturen wurden PSIPRED, PredictProteinOpen, NetSurfP1.1, NetSurfP2.0 und RaptorX SS8 verwendet (Buchan und Jones 2019; Jones 1999; Yachdav et al., 2014; Petersen et al., 2009; Klausen et al., 2019; Källberg et al., 2012). Für die Aufklärung von CC-Bereichen wurden DeepCoil1, DeepCoil2, Marcoil und Ncoil verwendet (Zimmermann et al., 2018; Gabler et al., 2020; Ludwiczak et al., 2019; Delorenzi und Speed 2002; Lupas et al., 1991). Die Ergebnisse wurden Wahrscheinlichkeiten von 0-1 dargestellt.

5.5.2 Homologie-Analyse

Für die Identifikation der MT-Bindedomäne von CEP55 wurde zusätzliche zur Sekundärstruktur-Analyse eine Homologie-Analyse durchgeführt. Um eine Idee über die mögliche Tertiärstruktur von CEP55 zu erhalten wurde die aus der AS-Sequenz vorhergesagte Sekundärstruktur in Homologie Analysen mit der aufgeklärten Struktur anderer Proteine verglichen. Für die Alignment basierte Homologie-Analyse wurde das MPI Bioinformatics Toolkit HHpred verwendet (Gabler et al., 2020; Hildebrand et al., 2009).

4.6 Statistik

Für statistische Analysen wurden GraphPad Prism und Excel verwendet. Für die Auswertung der Signifikanz von numerischen, normalverteilten und voneinander unabhängigen Daten wurde der ungepaarte T-Test verwendet. Um die Signifikanz von Häufigkeiten zweier Merkmale in zwei Gruppen zu bestimmen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Der Zwei-Stichproben F-Test wurde für die Analyse von Varianzunterschieden bei zwei unabhängigen Proben verwendet. Ab einem p-Wert <0,05 wurde ein Ergebnis als signifikant gewertet; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n.s. nicht signifikant. Die jeweils angewendeten statistischen Tests und die Anzahl der durchgeführten Experimente sind in den zugehörigen Abbildungen dargestellt.

6. Ergebnisse

6.1 Rolle von CEP55 in SKOV-3 Ovarialkarzinom Zellen

6.1.1 Etablierung eines CEP55 Knockdowns in SKOV-3 Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von CEP55 auf Ovarialkarzinom Zellen wurde die Zelllinie SKOV-3 verwendet. SKOV-3 sind adhärent wachsende Zellen mit einer hohen endogenen CEP55 Expression. Um die Auswirkungen von CEP55 untersuchen zu können, wurde das CEP55 Proteinlevel durch eine stabile Expression von shRNAs reduziert. Die cDNA zur Expression der shRNAs wurde durch Lentiviren in die Zellen eingebracht. Nach vierwöchiger Selektion mit Puromycin konnte eine stabile Reduktion des CEP55 Proteinlevels erzielt werden. Es wurden zwei shRNA Zelllinien (sh1 und sh2) sowie eine Kontrollzelllinie (scr) etabliert. In der Linie sh1 wurde ein durchschnittlicher Knockdown von 83% erreicht, bei sh2 gab es eine Reduktion von 66% (Abb. 11).

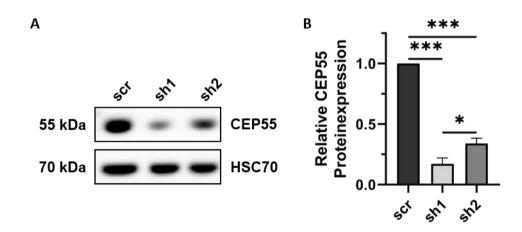


Abb. 11: Stabile Reduktion des CEP55 Proteinlevels in SKOV-3 Zellen durch shRNAs. Durch die stabile Expression von shRNAs erfolgte ein CEP55 Knockdown in SKOV-3 Zellen. (A) Western-Blot Analyse der Kontrollzellen (scr), sowie der CEP55 Knockdown Zelllinien sh1 und sh2 mit Antikörpern gegen CEP55 und HSC70. (B) Die Proteinmenge wurde auf HSC70 und anschließend auf die scr Kontrollzellen normiert. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein ungepaarter T-Test verwendet. *p<0,05, ***p<0,001.

Der Knockdown wurde ebenfalls durch eine Analyse der Lokalisation von CEP55 in Kontrollund Knockdown Zellen validiert. Da CEP55 zu Beginn der Mitose an der Spindel und später am Midbody lokalisiert ist (Zhao et al., 2006), wurden diese mikroskopiert (Abb. 12). In Kontrollzellen ist die Lokalisation von CEP55 an den Centrosomen, der Spindel und im Midbody eindeutig zu sehen. Bei den Knockdown Zellen ist CEP55 weder am Centrosom noch im Midbody nachweisbar, hier treten unspezifische Signale auf. In der Interphase konnte CEP55 in Kontrollzellen ebenfalls am Centrosom nachgewiesen werden (Anhang, Abb. 42).

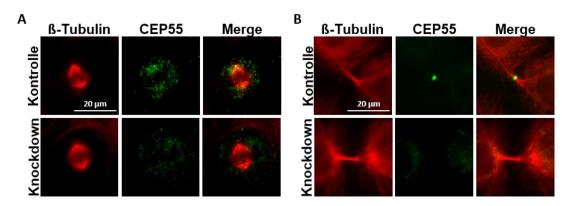


Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung von CEP55 in SKOV-3 Kontroll- und CEP55 Knockdown Zellen. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen ß-Tubulin (rot) und CEP55 (grün) gefärbt. (A) Lokalisation von CEP55 an der Spindel in Kontroll- und Knockdown Zellen. (B) Lokalisation von CEP55 am Midbody in Kontroll- und Knockdown Zellen. Maßstabsbalken 20 µm.

6.1.2 Effekt von CEP55 auf Proliferation, Migration, Adhäsion und Koloniebildung in SKOV-3 Zellen

Um einen Überblick über zelluläre Prozesse von SKOV-3 Zellen mit CEP55 Knockdown zu erhalten wurden Proliferation, Migration, Adhäsion und das Kolonieformierungs-Potenzial untersucht. Diese Faktoren stehen alle im Zusammenhang mit der Malignität und Metastasierung von Krebszellen (Hanahan und Weinberg 2011). Zunächst erfolgte die Analyse von Proliferation und Migration der Zellen (Abb. 13). Zur Messung der Proliferation wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Eine ansteigende Viabilität über die Zeit korreliert mit der Proliferation der Zellen (Adan et al., 2016). Um Effekte durch einen möglichen Unterschied in der Viabilität der Zelllinien auszuschließen wurden die Daten jeweils auf den 24 h-Wert normiert (Abb. 13A). In der Proliferation der Zellen konnten nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede zwischen scr. sh1 und sh2 Zellen festgestellt werden. Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der Zellen wurde ein Wundheilungs-Assay verwendet. Hierfür wurde eine Wunde in eine konfluente Zellschicht eingebracht und die Migration der Zellen in diese durch Live-Cell-Imaging aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch Analyse der ansteigenden Konfluenz der Zellen in der Wunde (Abb. 13B). Die Werte wurden auf den ersten Messpunkt normalisiert. Bei der Messung der Migration konnten in den ersten 24 h leichte Unterschiede zwischen Kontroll- und Knockdown Zellen ausgemacht werden. Eine Auswertung der Steigung zeigte jedoch keine Signifikanz.

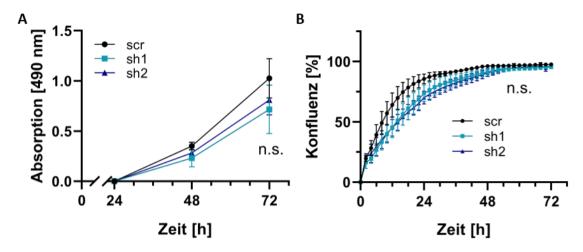


Abb. 13: CEP55 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und Migration von SKOV-3 Zellen. (A) Die Proliferation von 1,5x10³ scr Kontrollzellen und CEP55 sh1 und sh2 Knockdown Zellen wurde mit dem MTS Assay durch eine Messung der Absorption bei 490 nm bestimmt. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 h kultiviert Die Messungen wurden auf die 24 h-Werte normalisiert. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche mit vier Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. n.s. nicht signifikant. (B) Die Analyse der Migration der Zellen erfolgte durch den Wundheilungs-Assay in Kombination mit Live-Cell-Imaging im IncuCyte®System. Ausgewertet wurde die Migration der Zellen in eine Wunde. Dargestellt ist der prozentuale Anstieg der Konfluenz über die Zeit. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche mit 32 Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Es wurde die Steigung der Kurven ausgewertet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. n.s. nicht signifikant.

Als nächstes wurde das Kolonieformierungs-Potenzial untersucht. Die Bildung von Kolonien aus Einzelzellen ist ein wichtiger Teil des Metastasierungsprozesses. Zur Bestimmung der Koloniebildungskapazität wurden 3,5x10³ Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und für 8 Tage kultiviert. Die entstandenen Kolonien wurden fixiert, mit Giemsa-Lösung gefärbt, die Anzahl bestimmt und auf scr Zellen normiert (Abb. 14A). Im Gegensatz zu Proliferation und Migration zeigte der CEP55 Knockdown einen starken Effekt auf das Koloniebildungs-Potenzial. In CEP55 sh1 Zellen war die Koloniebildung um 65% reduziert und in sh2 Zellen um 32% (Abb. 14B).

Anschließend wurde untersucht, ob die Unterschiede in der Kolonieformierung auf eine geänderte Adhäsion zurückzuführen sind. Neben der Migration und dem Kolonieformierungs-Potenzial ist die Adhäsion ebenfalls ein entscheidender Prozess in der Metastasierung von Tumorzellen. Zur Untersuchung dieser wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten *Chamber-Slides* ausgesät. Nicht adhärierte Zellen wurden nach 3 h durch Waschen mit PBS entfernt. Die adhärierten Zellen wurden fixiert, mit DAPI gefärbt und die Anzahl mittels Fluoreszenzmikroskopie durch die Zählung der Zellkerne ermittelt. Die Untersuchung der Adhäsion

auf Poly-L-Lysin ergab geringfügige, zu vernachlässigende Unterschiede (Abb. 14C), demnach hat die CEP55 Expression auf diesen Prozess keinen Einfluss.

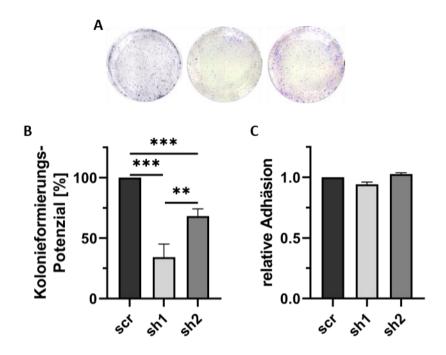


Abb. 14: Reduktion von CEP55 beeinflusst die Kolonieformierung, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Adhäsion. (A) Dargestellt sind exemplarische Beispiele für die Kolonieformation in SKOV-3 scr, CEP55 sh1 und sh2 Zellen. 3,5x10³ Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für 8 Tage kultiviert. Die Kolonien wurden fixiert, mit Giemsa angefärbt und gezählt. (B) Evaluation des Kolonieformierungs-Potenzials, die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde auf die Kontrollzellen normiert. (C) Um die Adhäsion der Zellen zu untersuchen wurden 3x10⁴ Zellen ausgesät und für 3 h kultiviert. Adhärierte Zellen wurden mit DAPI gefärbt und durch die Keyence BZ Analyzer Software ausgewertet. Dargestellt ist die relative Adhäsion normiert auf scr Kontrollzellen. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. **p<0,01, ***p<0,001.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von CEP55 in SKOV-3 weder auf Proliferation noch Migration signifikante Auswirkungen hatte. Außerdem konnten in der Adhäsion der Zellen auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Untergrund keine Unterschiede festgestellt werden. Allerdings wurde das Kolonieformierungs-Potenzial der Zellen durch eine Reduktion von CEP55 stark vermindert. Zudem konnten Unterschiede zwischen CEP55 sh1 und sh2 gezeigt werden. Die unterschiedliche Auswirkung der beiden Knockdown Zelllinien bestätigt nicht nur den Einfluss von CEP55 auf die Koloniebildung, sondern deutet auf eine Abhängigkeit von der CEP55 Proteinkonzentration hierbei hin.

6.1.3 CEP55 vermittelt die Trennung des Midbody und reguliert die MT-Stabilität

CEP55 ist am Midbody lokalisiert, dort werden über ALIX und TSG101 weitere Proteine rekrutiert, welche die Midbody-MTs zu schneiden (Fabbro et al., 2005). Um die Auswirkungen des CEP55 Knockdowns auf die Midbody-Dynamik der Zellen zu untersuchen wurden Live-Cell-

Imaging Analysen durchgeführt. Die MTs der Zellen wurden durch SiR-Tubulin markiert (Punkt 5.3.10) und alle 5 min Aufnahmen gemacht. Ausgewertet wurde die Zeit von der Bildung des Midbody (Abb. 15A, 0 min) bis zur Trennung (Pfeil). In sh1 und sh2 Zellen war die Zeit für die Trennung des Midbody signifikant verlängert. In den Kontrollzellen lag die mittlere Trennungsdauer bei 168 min, in sh1 Zellen bei 296 min und in sh2 Zellen bei 231 min (Abb. 15B).

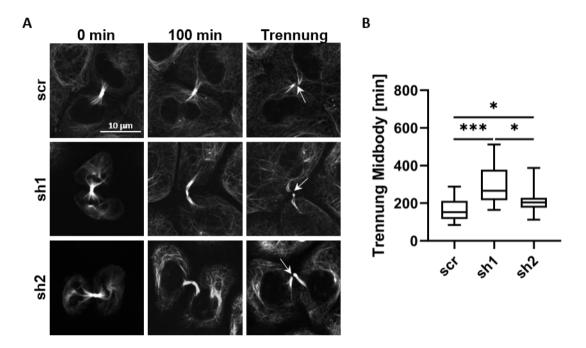


Abb. 15: CEP55 Knockdown beeinflusst die Midbody-Dynamik. Die MTs der Zellen wurden mit SiR-Tubulin markiert und die Midbody-Trennung im Live-Cell-Imaging untersucht. Aufnahmen wurden alle 5 min mit dem Visitron Spinning Disc-TIRF gemacht. **(A)** Dargestellt sind exemplarische Beispiele von SKOV-3 scr, CEP55 sh1 und sh2 Zellen von der Midbody Bildung bis zur Trennung (Pfeile). Maßstabsbalken 10 μm. **(B)** Untersucht wurde die Dauer von Bildung des Midbody nach der Anaphase bis zur finalen Trennung der beiden Zellen. Es wurden mindestens 12 Zellen ausgewertet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. *p<0,05, ****p<0,001.

Die Ergebnisse zeigen, dass CEP55 die Geschwindigkeit der Midbody-Trennung beeinflusst, aber nicht essenziell für Trennung der Zellen ist. Die Unterschiede in den CEP55 reduzierten sh1 und sh2 Zellen lassen erneut auf eine Korrelation zur Proteinmenge von CEP55 schließen.

Im Zusammenhang mit der Trennung des Midbody wurde der Einfluss von CEP55 auf die Stabilität von Midbody-MTs untersucht. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit β-Tubulin für MTs und einem Antikörper gegen detyrosiniertes α-Tubulin verwendet, um stabile MTs zu markieren (Abb. 16A). Midbodies mit stabilen und instabilen MTs wurden gezählt und die Anzahl der Zellen mit stabilen Midbodies auf scr Zellen normiert. Der Anteil an stabilisierten MTs wurde in sh1 Zellen um 26% reduziert, in CEP55 sh2 Zellen um 7% (Abb. 16B). In CEP55 sh1 Zellen war also der Anteil an stabilen Midbodies signifikant verringert, in CEP55 sh2 Zellen dagegen nicht.

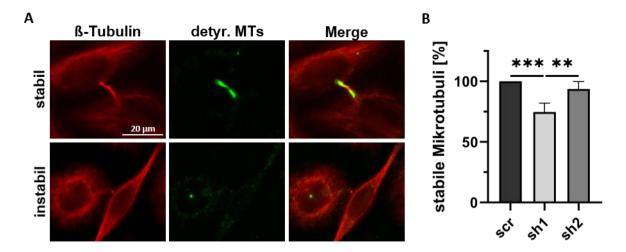


Abb. 16: CEP55 verändert die Stabilität von Midbody-MTs in SKOV-3 Zellen. Zur Untersuchung der Stabilität der Midbody-MTs in Kontroll- und Knockdown Zellen wurden Antikörper gegen β-Tubulin (MTs, rot) und detyrosiniertes α-Tubulin (detyr. MTs, stabile MTs, grün) verwendet. (A) Dargestellt sind exemplarische Beispiele für Midbodies mit stabilen und instabilen MTs. Maßstabsbalken 20 μm. (B) Midbodies mit stabilen und instabilen MTs wurden gezählt und stabile Midbodies auf scr Zellen normiert. Es wurden vier unabhängige Versuche mit jeweils mindestens 30 Zellen durchgeführt. Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. **p<0,01, ***p<0,001.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass CEP55 die Trennung des Midbodies nach der Bildung beschleunigt, jedoch nicht essenziell für sie ist. Zudem reguliert CEP55 die Stabilität der MTs um den Midbody herum.

6.1.4 Einfluss der CEP55 Expression auf CIN

Da gezeigt werden konnte, dass CEP55 die Midbody-MTs stabilisiert, wurde angenommen, dass dies auch für Spindel-MTs zutrifft. Eine CEP55-vermittelte Hyperstabilisierung von Spindel-MTs könnte den fördernden Einfluss von CEP55 auf CIN erklären. Hierzu erfolgte eine Färbung der detyrosinierten, also stabilen Spindel-MTs. In Zellen mit instabilen Spindel-MTs war nur das Centrosom in der Färbung durch detyrosiniertes α-Tubulin sichtbar (Abb. 17A). In sh1 Zellen wurde der Anteil an stabilisierten Spindeln um 27% reduziert, in sh2 Zellen um 19% (Abb. 17B). Dieses Ergebnis zeigt, dass CEP55 auch an der Regulation der Spindel-MT Dynamik beteiligt ist.

Eine veränderte Dynamik der Spindel-MTs kann eine Änderung im Chromosomen-Alignment zur Folge haben (Miao et al., 2021). Um das chromosomale Alignment der Zellen zu untersuchen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit ß-Tubulin, zur Markierung der MTs, sowie eine Färbung der DNA mit DAPI durchgeführt. In der Metaphase der Zellen wurde evaluiert, ob die Chromosomen in der Äquatorialebene zwischen den Spindeln korrekt ausgerichtet sind. Beispiele für eine korrekte (aligned) und eine inkorrekte (nicht aligned) Ausrichtung der Chromosomen sind in Abb. 18A zu sehen. Das Alignment wurde in Kontroll- und Knockdown Zellen

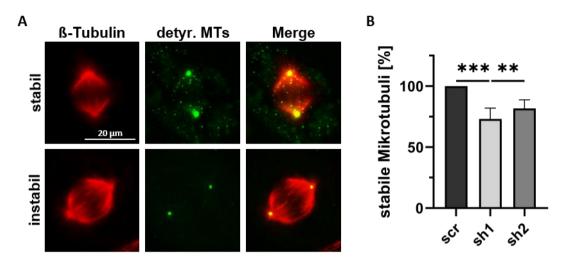


Abb. 17: CEP55 kontrolliert die Stabilität von Spindel-MTs. Zur Untersuchung der Dynamik von Spindel-MTs in Kontroll- und Knockdown Zellen wurden Antikörper gegen β-Tubulin (MTs, rot) und detyrosiniertes α-Tubulin (detyr. MTs, stabile MTs, grün) verwendet. (A) Dargestellt sind exemplarische Beispiele für Spindeln mit stabilen und instabilen MTs. Maßstabsbalken 20 μm. (B) Der Anteil an Zellen mit stabilen Spindeln wurden gezählt und auf scr Zellen normiert. Es wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils mindestens 50 Zellen ausgewertet und Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet **p<0,01, ***p<0,001.

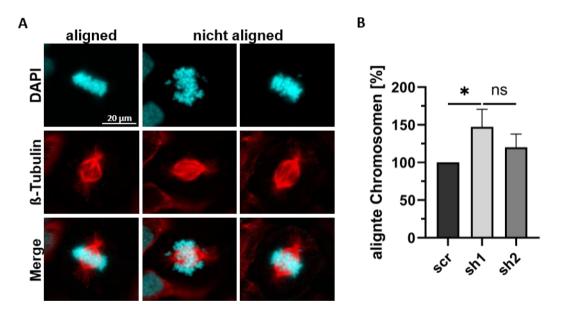


Abb. 18: CEP55 Knockdown beeinflusst das chromosomale Alignment in sh1 SKOV-3 Zellen. Untersucht wurde das Alignment der Chromosomen von Metaphase Zellen durch Fluoreszenzmikroskope. (A) Dargestellt sind exemplarische Beispiele für alignte und nicht alignte Zellen. Zur Visualisierung der Spindel und der Chromosomen wurden in den verwendeten Zelllinien MTs (β-Tubulin, rot) und DNA (DAPI, cyan) gefärbt. Maßstabsbalken 20 μm. (B) Die Anzahl der Zellen mit alignten und nicht alignten Chromosomen wurde bestimmt. Der Anteil der alignten Chromosomen wurde auf scr Zellen normalisiert. Es wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils 40-60 Zellen durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. *p<0,05.

untersucht. Die Anzahl der Zellen mit korrekt ausgerichteten Chromosomen wurde auf scr Zellen normiert (Abb. 18B). In sh1 Zellen war die Anzahl der Zellen mit alignten Chromosomen

um 47% erhöht, in CEP55 sh2 Zellen um 20%. Der Unterschied zu den Kontrollzellen war bei CEP55 sh1 Zellen signifikant, bei CEP55 sh2 Zellen jedoch nicht. Diese Daten zeigen, dass eine hohe CEP55 Expression einen negativen Einfluss auf das chromosomale Alignment hat. Die Unterschiede in den CEP55 sh1 und CEP55 sh2 weisen erneut auf eine Korrelation zur Proteinmenge von CEP55 auf.

Um zu prüfen, ob die fehlerhafte Stellung der Chromosomen in der Metaphase und die veränderte Dynamik der Spindel-MTs die Verteilung der Chromosomen in den Zellen beeinflusst und somit zu einer veränderten Anzahl an Chromosomen führt, wurde dies anschließend untersucht.

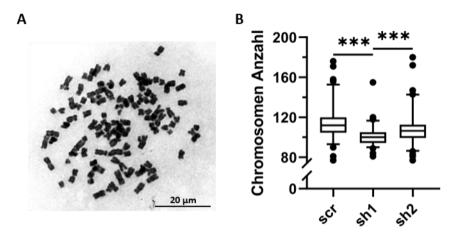


Abb. 19: Einfluss von CEP55 auf die Chromosomenanzahl in Kontroll- und CEP55 Knockdown Zellen. Für die Analyse der Chromosomenanzahl wurden SKOV-3 Zellen durch Colchicin in der Metaphase gehalten und die Chromosomen isoliert. Die isolierten Chromosomen wurden mit Giemsa-Lösung gefärbt und mikroskopiert. (A) Exemplarisches Beispiel isolierter, angefärbter Chromosomen. Maßstabsbalken 20 µm (B) Anzahl der Chromosomen pro Zellkern. Es wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils mindestens 80 Zellen ausgewertet. Die Signifikanz wurde durch den Zwei-Stichproben F-Test bestimmt. ***p<0,001.

Zur Bestimmung der Anzahl wurden Chromosomen aus Metaphase Zellen isoliert und gefärbt (Abb. 19A). In einer gesunden humanen Zelle liegen in der Metaphase 46 Chromosomen vor. SKOV-3 Zellen sind aneuploid und besitzen überdurchschnittlich viele Chromosomen (Hill et al., 1987). In SKOV-3 scr Zellen lag die Anzahl der Chromosomen bei durchschnittlich 113 (Abb. 19B). Bei CEP55 sh1 Zellen war die Anzahl durchschnittlich um 13 reduziert, bei sh2 Zellen um 5. Die Berechnung der Varianz zeigte signifikante Unterschiede zwischen scr und sh1 Zellen. Der Unterschied zu CEP55 sh2 war nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CEP55 einen Einfluss auf CIN in SKOV-3 Zellen hat. Durch eine Reduktion von CEP55 wurde das Alignment der Chromosomen verbessert und die Dynamik der Spindel-MTs signifikant erhöht. Auch bei der Anzahl der Chromosomen konnten signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen durch den stärkeren CEP55 Knockdown in sh1 Zellen festgestellt werden. In keinem Fall konnten für sh2 Zellen signifikante

Unterschiede identifiziert werden. Dies lässt erneut darauf schließen, dass die Effekte von CEP55 nur durch einen starken Knockdown umgekehrt werden können. Die Stabilität der Midbody-MTs wurde ebenfalls nur durch den starken Knockdown reduziert. Allerdings war die Trennungsdauer der Midbodies in beiden Knockdown Zelllinien verlängert. Dies weist darauf hin, dass die MT-stabilisierende Aktivität von CEP55 nicht ausschlaggebend für die Geschwindigkeit der Midbody-Trennung ist.

Insgesamt wurde gezeigt, dass eine hohe CEP55 Expression CIN begünstigt. Die CEP55-vermittelte Dauer der Midbody-Trennung dagegen wird konzentrationsabhängig und von der Stabilität der MTs unabhängig verändert. Die Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der CEP55-vermittelten MT-Stabilisierung bei CIN hin. Die durch CEP55-stimulierte Midbody Dynamik scheint aber durch einen anderen Mechanismus gesteuert zu sein.

6.1.5 Einfluss der CEP55/ALIX Interaktion auf die CEP55 kontrollierte Midbody-Separation und CIN

Um zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich durch den CEP55 Knockdown zustande gekommen sind, sollte der CEP55 Wildtyp (CEP55^{WT}) in den Knockdown Zellen exprimiert werden (Rückexpression). Zusätzlich sollte die Relevanz der CEP55/ALIX Interaktion untersucht werden. Zu diesem Zweck war es geplant eine Rückexpression einer ALIX binde defiziente Mutante von CEP55 in den CEP55 Knockdown Zellen durchzuführen. Um die

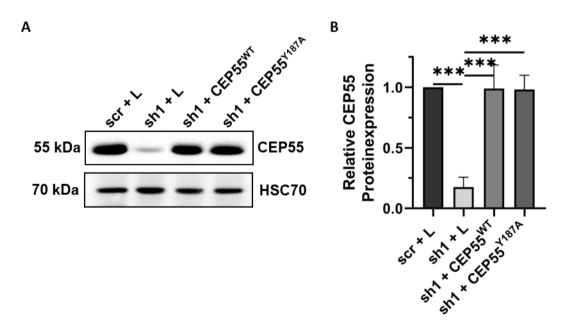


Abb. 20: Stabile Rückexpression von CEP55 WT und CEP55 Y187A in CEP55 depletierten SKOV-3 Zellen. In CEP55 sh1 Zellen wurde durch Lentiviren eine stabile Rückexpression von CEP55 WT und CEP55 Y187A durch geführt. Als Kontrolle wurde der Leervektor in scr und sh1 eingebracht. (A) Western-Blot Analyse von Kontroll- und CEP55 rückexprimierenden Zellen mit Antikörpern gegen CEP55 und HSC70. (B) Die Proteinmenge wurde auf HSC70 und anschließend auf die Kontrollzellen scr + L normiert. Es wurden fünf unabhängige Versuche durch geführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. ***p<0,001.

Bindung von ALIX an CEP55 zu verhindern wurde das Y an Position 187 durch ein A ersetzt. Für die stabile Expression in humanen Zellen wurden die Konstrukte in den LeGo-iB2 Neo+Vektor kloniert (Punkt 4.2.1 und 4.2.2). Die Rückexpression wurde in CEP55 sh1 Zellen vorgenommen. Hierfür wurde die codierende cDNA durch Lentiviren in die Zellen eingebracht und durch Geneticin selektiert. Nach sechswöchiger Selektion wurde die Rückexpression erfolgreich durch Western-Blot nachgewiesen (Abb. 20A). Als Kontrollzellen dienten scr und sh1 Zellen, die zusätzlich mit dem Leervektor (+ L) behandelt wurden. Für sh1 + CEP55^{WT} und CEP55^{Y187A} konnte jeweils eine Rückexpression von 98% erreicht werden (Abb. 20B).

Alle folgenden Experimente wurden mit den Zelllinien scr + L (Kontrolle), sh1 + L (Knockdown Kontrolle), sh1 + CEP55^{WT} und sh1 + CEP55^{Y187A} durchgeführt.

6.1.6 Die ALIX Bindeaktivität von CEP55 beeinflusst das Kolonieformierungspotenzial

In den CEP55 Knockdown Zellen konnte ein starker, konzentrationsabhängiger Effekt auf das Kolonieformierungs-Potenzial der SKOV-3 Zellen nachgewiesen werden. Zur Bestätigung des Effekts durch CEP55 wurde der Versuch erneut mit Kontrollzellen scr + L, sh1 + L und sh1 + CEP55^{WT}, sowie sh1 + CEP55^{Y187A} exprimierenden Zellen durchgeführt (Abb. 21). Die Zellen wurden auf *Chamber-Slides* ausgesät, für 4 Tage kultiviert, anschließend fixiert und mit Alexa Fluor® 488 gekoppeltem Phalloidin das Aktinzytoskelett angefärbt (Abb. 21A).

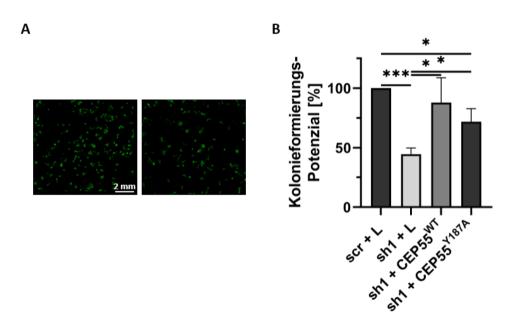


Abb. 21: CEP55^{Y187A} rettet die Koloniebildung nicht vollständig. Die Kolonieformierung wurde in den CEP55 rückexprimierenden, sowie den Kontrollzellen analysiert. (A) Dargestellt sind exemplarische Beispiele für die Kolonieformation. Je 208 Zellen wurden in *Chamber-Slid*es ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Die Kolonien wurden fixiert, Phalloidin gefärbt und gezählt. Maßstabsbalken 2 mm. (B) Evaluation des Kolonieformierungs-Potenzial, die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde auf die Kontrollzellen scr+L normiert. Es wurden drei unabhängige Versuche mit je 8 Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. *<p0,05, ***p<0,001.

Die Koloniebildung wurde durch die Rückexpression von CEP55^{WT} in sh1 Zellen vollständig gerettet. In sh1 + CEP55^{Y187A} Zellen wurde das Kolonieformierungs-Potenzial nur zur Hälfte wiederhergestellt (Abb. 21B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die ALIX Bindeaktivität von CEP55 einen Einfluss auf die Koloniebildung hat. Da der Effekt jedoch teilweise gerettet werden konnte, ist der Einfluss der ALIX Bindung nicht allein für das verringerte Koloniebildungspotenzial verantwortlich.

6.1.7 Auswirkung der CEP55 Rückexpression auf die Midbody-Dynamik SKOV-3 Zellen

Die in Punkt 6.1.3 gezeigten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die MT-modulierende Aktivität von CEP55 keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Midbody-Trennung hat. Da bekannt ist, dass die Rekrutierung von ALIX durch CEP55 wichtig für die Trennung des Midbody ist (Jeffery et al., 2016), wurde der Einfluss der CEP55^{Y187A} Mutante auf diese Prozesse untersucht. Hierzu erfolgte die erneute Analyse der Trennungsdauer und MT-Stabilisierung im Midbody (Abb. 22).

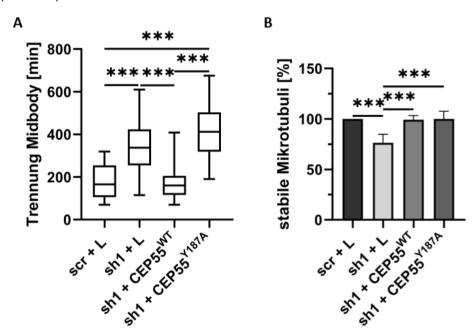


Abb. 22: Die ALIX Bindeaktivität von CEP55 reguliert die Midbody-Trennung, hat aber keinen Einfluss auf die MT-Stabilität. (A) Untersuchung der Midbody-Trennung durch Live-Cell-Imaging in SiR-Tubulin gefärbten Zellen, Aufnahmen wurden alle 5 min gemacht. Ausgewertet wurde die Dauer von Bildung des Midbody nach der Anaphase bis zur finalen Trennung der beiden Zellen. Es wurden mindestens 15 Zellen ausgewertet. Die Signifikanz wurde durch den ungepaarten T-Test bestimmt. (B) Zellen wurden mit Antikörpern gegen β-Tubulin (MTs) und detyrosiniertes α-Tubulin (stabile MTs) gefärbt, um Unterschiede in der Stabilität der Midbody-MTs zu analysieren. Midbodies mit stabilen und instabilen MTs wurden gezählt und stabile Midbodies auf scr + L Zellen normiert. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. ****p<0,001.

Durch die Rückexpression von CEP55^{WT} konnte die verlängerte Trennung der Midbodies vollständig gerettet werden (Abb. 22A). Die CEP55^{Y187A} Mutante hingegen rettete, wie erwartet,

den Knockdown Effekt nicht. Die Stabilität der MTs wurde durch CEP55^{WT} genauso wie durch CEP55^{Y187A} komplett wiederhergestellt (Abb. 22B).

Insgesamt wurde gezeigt, dass die CEP55 vermittelte Trennung des Midbody vollständig durch die ALIX Bindeaktivität vermittelt wird. Die Stabilisierung der Midbody-MTs zeigt allerdings keinen Zusammenhang mit der ALIX Bindeaktivität. Diese Daten belegen die essenzielle Bedeutung der CEP55/ALIX Interaktion für die Beschleunigung der Midbody-Trennung. Zudem bestätigen sie die Vermutung, dass die MT-stabilisierende CEP55 Aktivität keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Midbody-Trennung hat.

6.1.8 Einfluss der CEP55/ALIX Interaktion auf CIN

Um zu testen, ob die Interaktion von CEP55 und ALIX auch einen Einfluss auf CIN hat, wurde der Effekt der Rückexpression von CEP55^{WT} und CEP55^{Y187A} auf CIN-assoziierte Prozesse untersucht.

In sh1 + CEP55^{WT} und sh1 + CEP55^{Y187A} Zellen konnten die Stabilität der Spindel-MTs und das chromosomale Alignment wiederhergestellt werden (Abb. 23A, B). Ebenso die Streuung bei der Verteilung der Chromosomen Abb. 23C). Die Effekte auf das Chromosomen-Alignment und die Chromosomenverteilung wurden bereits in einer weiteren Ovarialkarzinomzelllinie (OVCAR-8) mit den gleichen Ergebnissen reproduziert (Anhang, Abb. 43).

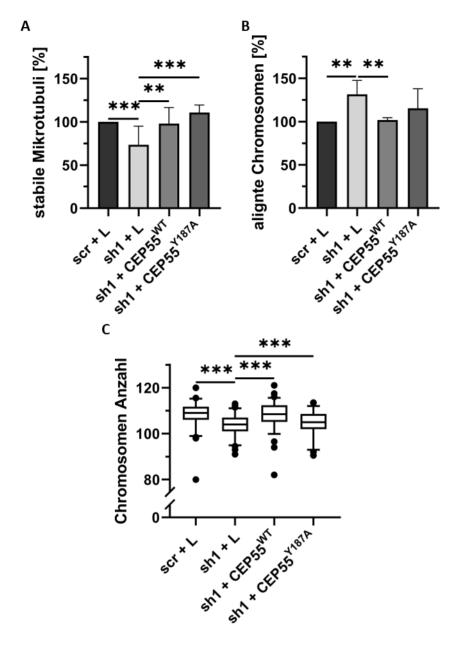


Abb. 23: Die CEP55/ALIX Bindung hat keinen Einfluss auf CIN. Die Stabilität der Spindel-MTs beeinflusst das chromosomale Alignment. Dieses beeinflusst die Aufteilung der Chromosomen und damit die Anzahl. (A) Die Dynamik von Spindel-MTs wurde untersucht. Spindeln mit stabilen und instabilen MTs wurden gezählt und stabile Spindeln auf scr + L Zellen normiert. Es erfolgten drei unabhängige Versuche mit jeweils mindestens 50 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. (B) Das Alignment der Chromosomen von Metaphase Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Anzahl der Zellen mit alignten und nicht alignten Chromosomen wurde bestimmt. Der Anteil der alignten Chromosomen wurde auf scr + L Zellen normalisiert. Mit jeweils 40-60 Zellen wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. (C) Anzahl der Chromosomen pro Kem. Es wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils mindestens 100 Zellen ausgewertet. Die Signifikanz wurde durch den Zwei-Stichproben F-Test bestimmt. **p<0,01, ****p<0,001.

Die Entstehung von Mikronuklei ist ebenfalls ein Prozess, der in Zusammenhang mit CIN steht und durch eine inkorrekte Trennung der Chromosomen bedingt ist (He et al., 2019). Die Entstehung von Mikronuklei wurde in den verwendeten Zelllinien untersucht (Abb. 24). Es konnte

gezeigt werden, dass bei 9% bei Kontrollzellen Mikronuklei vorhanden waren (Abb. 24B). Bei den Knockdown Zellen waren es 5% Zellkerne mit Mikronuklei und damit im Vergleich zu den Kontrollzellen 40% weniger. Die Zellen mit der Rückexpression haben keine Unterschiede zu den scr + L Zellen gezeigt.

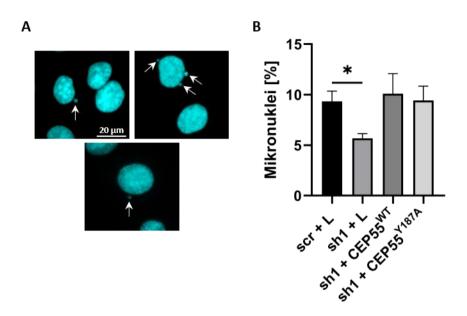


Abb. 24: CEP55 beeinflusst die Bildung von Mikronuklei. Mikronuklei sind ein Anzeichen für CIN. (A) Durch eine Kernfärbung mit DAPI wurde das Vorhandensein von Mikronuklei quantifiziert (Pfeile). Maßstabsbalken 20 μm. (B) Normierung der Anzahl von Zellkernen mit Mikronuklei auf die Gesamtzahl der Zellkerne. Es wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils mindestens 200 Zellkernen durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten T-Test bestimmt. *<p0,05.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die Effekte auf chromosomales Alignment, MT-Stabilität, Anzahl an Chromosomen und Mikronuklei in CEP55 Knockdown Zellen tatsächlich durch die Reduktion von CEP55 entstanden ist. Eine hohe CEP55 Expression verstärkt demnach CIN in den untersuchten Zellen. Zudem wurde gezeigt, dass die ALIX Bindeaktivität von CEP55 bei der MT-Stabilität, dem Chromosomen Alignment und der Entstehung von Mikronuklei keine Rolle spielt.

6.1.9 CEP55 Effekt auf die Dynamik in Spindel-MTs

Die oben gezeigten Daten belegen, dass CEP55 einen Einfluss auf die Stabilität von Spindel-MTs hat (Abb. 17 und 23). Zur Validierung dieser Daten, wurde der Einfluss von CEP55 auf die MT Dynamik während der Mitose durch Live-Cell-Imaging untersucht. Um alle Zellen im gleichen Stadium der Mitose zu untersuchen erfolgte die Analyse von Beginn der Anaphase aus sechs Zeitpunkte rückwirkend (Abb. 25A). Aus diesen Daten wurde eine 3D Rekonstruktion erstellt und die Geschwindigkeit der MTs in µm/h bestimmt.

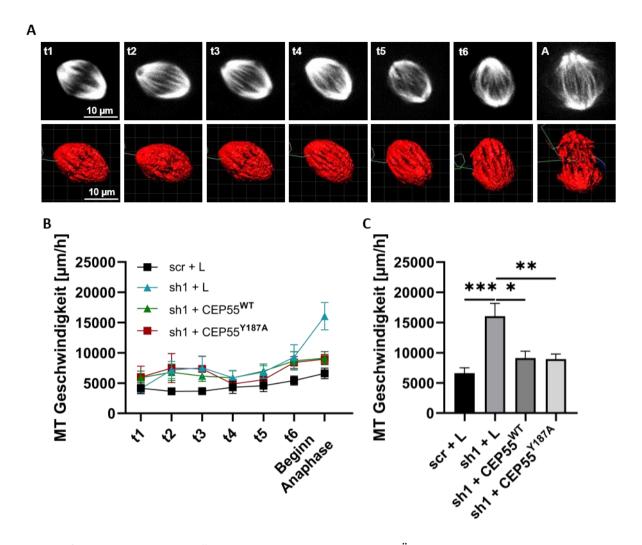


Abb. 25: CEP55 Knockdown erhöht die MT Geschwindigkeit beim Übergang von Meta- zu Anaphase. Die Geschwindigkeit der MTs von der Metaphase bis zum Beginn der Anaphase wurde durch die Auswertung von Live-Cell-Imaging Daten mittels IMARIS Software bestimmt. Es wurde die Geschwindigkeit vom Beginn der Anaphase (A) aus sechs Zeitpunkte (t1-t6) rückwirkend evaluiert. (A) Exemplarische Beispiele für SiR-Tubulin markierte Spindeln (oben) und die 3D Rekonstruktion der IMARIS Software (unten). Maßstabsbalken 10 μm (B) Mittelwerte der ermittelte MT Geschwindigkeit in μm/h aufgetragen über die Zeit. (C) Abgebildet ist die Mittlere MT Geschwindigkeit zu Beginn der Anaphase. Es wurden mindestens 12 Zellen ausgewertet und die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Im Verlauf der Metaphase (t1-t6) zeigten alle Zelllinien eine Schwankung um 5000 μ m/h, mit leichtem Anstieg zum Ende der Metaphase. Die MT Geschwindigkeit in CEP55 Knockdown Zellen (sh1 + L) stieg zu Beginn der Anaphase signifikant an (Abb. 25B, C). Die Geschwindigkeit der sh1 + L Zellen war im Vergleich zur Anfangsgeschwindigkeit 3,9-fach erhöht. Bei scr + L, sh1 + CEP55 $^{\text{WT}}$ und sh1 + CEP55 $^{\text{Y187A}}$ war sie 1,5-1,6-fach erhöht.

Durch die signifikante Veränderung der MT Geschwindigkeit in CEP55 Knockdown Zellen konnte bestätigt werden, dass CEP55 in SKOV-3 Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der MT Dynamik in Mitosezellen spielt. Auch hier war kein Einfluss der CEP55/ALIX Interaktion zu erkennen.

6.1.10 Mitose-Checkpoint Aktivierung durch CEP55

Die veränderte Stabilität und Geschwindigkeit der Spindel-MTs durch den CEP55 Knockdown, sowie das verbesserte Alignment der Chromosomen geben Hinweise auf eine veränderte Mitose Checkpoint Aktivierung. Im Verlauf der Mitose gibt es verschiedene Checkpoint Mechanismen, um eine fehlerhafte Mitose zu unterbrechen. Einer dieser Mechanismen ist die Phosphorylierung von BubR1. Um die Aktivierung dieses Checkpoints zu untersuchen wurde die Phosphorylierung von BubR1 im Western-Blot überprüft. Bei aktiviertem SAC wird BubR1 phosphoryliert, was eine Inhibition des APC/C zur Folge hat und damit die Zelle in der Metaphase gehalten wird (Braunstein et al., 2007).

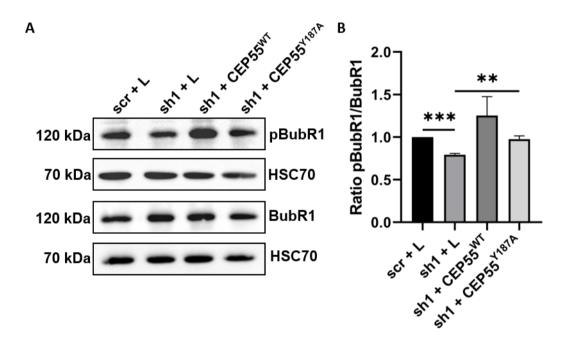


Abb. 26: Einfluss von CEP55 auf die Mitose Checkpoint Aktivierung. Western-Blot Analyse der Proteinlevel von BubR1, an T680 phosphoryliertem BubR1 (pBubR1) und HSC70 in scr + L und sh1 + L Kontrollzellen, sowie CEP55^{Wt} und CEP55^{Y187A} Zellen. **(A)** Exemplarischer Western-Blot. **(B)** Bestimmung der Ratio von pBubR1/BubR1 nach Normalisierung auf HSC70. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. **p<0,01, ****p<0,001.

Im Vergleich zu den scr + L Kontrollzellen war in CEP55 Knockdown Zellen (sh1 + L) pBubR1 signifikant reduziert (Abb. 26). In den Zellen mit der CEP55 Rückexpression gab es keine Unterschiede zu den Kontrollzellen. Der Mitose-Checkpoint wurde in sh1 + L Zellen weniger aktiviert und der Fortschritt der Mitose demnach seltener unterbrochen, was den Einfluss von CEP55 auf die Mitose erneut bestätigt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine starke CEP55 Expression CIN fördert. In Zellen mit einer hohen CEP55 Expression ist das Chromosomen-Alignment verschlechtert, was zwar eine Aktivierung des pBubR1 kontrollierten Mitose-Checkpoints zur Folge hat, aber trotzdem

zur Ungleichverteilung der Chromosomen führt. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit der Rückexpression zeigen, dass die Midbody Dynamik durch die CEP55/ALIX Interaktion kontrolliert wird und weisen stark darauf hin, dass CEP55 CIN durch eine Hyperstabilisierung der Spindel-MTs verursacht.

6.2 Einfluss von CEP55 auf MTs in vitro

Da die oben beschriebenen Daten stark darauf hindeuten, dass CEP55 CIN durch seine MT-stabilisierende Aktivität fördert und diese Beobachtung auch durch Sinha et al. (2020) gemacht wurde, war es von Interesse den Mechanismus der CEP55-kontrollierten MT Dynamik näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Auswirkungen von CEP55 auf MTs mit einem rekombinant exprimierten Protein *in vitro* untersucht. Für die Herstellung der verwendeten rekombinanten Proteine wurde eine für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte cDNA (Anhang, Punkt 10.2) verwendet und in den Vektor psf421 10xHis-GFP kloniert (Punkt 5.2.3 und 5.2.4).

6.2.1 Rekombinante Expression von His-GFP CEP55 in E. coli

Für die Untersuchungen der Auswirkungen von CEP55 auf die MT Dynamik wurde für eine effektivere Expression in E. coli eine Codon-optimierte cDNA verwendet. Die Reinigung und Visualisierung des Proteins erfolgten durch ein His-GFP Tag. Das Protein wurde über eine Affinitätsreinigung mit Ni-NTA Beads gereinigt (Abb. 27A). Die Bindung von GST-CEP55 an MTs wurde bereits durch Zhao et al. (2006) gezeigt. Um die Bindung von GFP-CEP55 an MTs zu validieren und die Lokalisation zu untersuchen wurde Rhodamin-markiertes Tubulin Taxolstabilisiert und mit GFP-CEP55 inkubiert. Eine Bindung von GFP an die MTs konnte ausgeschlossen werden (Anhang, Abb. 44). Das GFP-CEP55 war an der Oberfläche der MTs lokalisiert (Abb. 27B). Dies ließ auf eine mögliche Stabilisierung der MTs durch CEP55 schließen. Um den Einfluss von CEP55 auf die Stabilität von MTs in vitro zu untersuchen, wurde die Methode der kälteinduzierten Depolymerisierung verwendet. Taxol-stabilisierte MTs wurden vorpolymerisiert und nach Inkubation mit CEP55 bei 4 °C depolymerisiert. Als Kontrolle dienten MTs mit Puffer. Vor der Depolymerisierung wurde ein Teil der Probe abgenommen und auf ein Chamber-Slide aufgetragen (Abb. 27C, RT). Im Anschluss an die Depolymerisierung wurde ebenfalls ein Teil aufgetragen und mikroskopiert (4 °C). Das Ergebnis zeigte, dass CEP55 die Depolymerisierung der MTs nicht stabilisieren konnte.

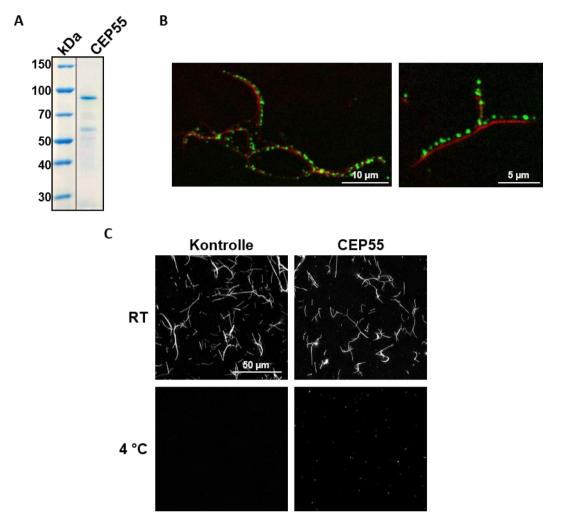


Abb. 27: Einfluss von CEP55 auf MTs *in vitro*. Es wurde der Einfluss von GFP-CEP55 auf MTs in einem zellfreien System untersucht. (A) 10% SDS-Gel des gereinigten GFP-CEP55 (84 kDa) gefärbt mit Roti®-Blue Quick. (B) Repräsentative Aufnahmen der Bindung von GFP-CEP55 (grün) an Rhodamin-markierte MTs (rot). GFP-CEP55 wurde mit Taxol-stabilisierten MTs inkubiert, auf ein *Chamber-Slide* aufgetragen, eingedeckt und mit dem Konfokal Mikroskop Leica TCS SP8 analysiert. Maßstabsbalken 5 und 10 μm. (C) Die Auswirkung von CEP55 auf die Stabilität der MTs wurde durch eine Kälte induzierte Depolymerisierung untersucht. Links: MTs inkubiert mit Puffer Rechts: MTs inkubiert mit rekombinant exprimierten CEP55. Die oberen Aufnahmen zeigen Proben nach 10 min Inkubation mit CEP55 oder Puffer bei RT. Die unteren Aufnahmen zeigen die depolymerisierten MTs nach Inkubation bei 4 °C. Maßstabsbalken 50 μm.

6.2.2 Einfluss von CEP55 auf die MT Polymerisierung in vitro

CEP55 zeigte keinen Einfluss auf die Stabilität der MTs, daher wurde als nächstes die Auswirkung auf die Polymerisierung untersucht. Eine erhöhte Polymerisierung stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar einer Depolymerisierung entgegenzuwirken. Für die Untersuchung der Tubulin Polymerisierung durch GFP-CEP55 wurde natives, aus frischen Schweinehirnen isoliertes

Tubulin verwendet (Anhang, Abb. 45). Die Nukleation der MTs wurde als ansteigende Absorption bei 340 nm gemessen.

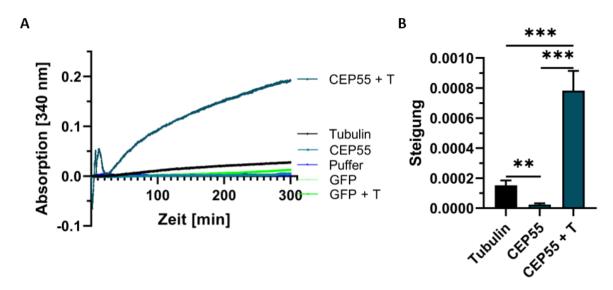


Abb. 28: Einfluss von CEP55 auf die MT Polymerisierung *in vitro*. Es wurde der Einfluss von GFP-CEP55 auf die MT Polymerisierung in einem zellfreien System untersucht. (A) Repräsentative Darstellung der MT Polymerisierung in An- und Abwesenheit von CEP55. Als Kontrollen wurden CEP55 ohne Tubulin, GFP und Puffer verwendet. Die MT Polymerisierung wurde als steigende Absorption bei 340 nm im Tecan Reader gemessen. Es wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt. (B) Mittelwerte der Steigungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen zwischen min 60 und min 100. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte T-Test verwendet. **p<0,01, ***p<0,001.

Die Polymerisierung des Tubulins wurde durch die Zugabe von CEP55, aber nicht durch GFP gesteigert (Abb. 28A). Die Berechnung der Steigung der repräsentativen Kurven erfolgte zwischen min 60 und min 100. Bei Tubulin allein lag die Steigung bei 1,4x10⁻⁴, bei Tubulin mit GFP-CEP55 bei 9,3x10⁻⁴ (Abb. 28B). Die gemessene Absorption korreliert mit der Polymerisierungsgeschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der Polymerisierung wurde durch CEP55 demnach 6,5-fach gesteigert.

CEP55 steigert *in vitro* die Polymerisierung von MTs und stabilisiert in Zellen Spindel- und Midbody-MTs. Da CEP55 die kälteinduzierte Depolymerisierung nicht verhindern konnte ist anzunehmen, dass CEP55 MTs durch Stimulation der Polymerisierung stabilisiert. Um die Effekte der MT Bindung von CEP55 genauer untersuchen zu können, sollte die MT-Bindedomäne des Proteins identifiziert werden. Hierfür wurden einer nach Sekundärstrukturanalyse trunkierte Versionen des Proteins exprimiert und auf ihre MT Bindung getestet.

6.2.3 Sekundärstruktur Analyse von CEP55

Für die Identifikation der MT-Bindedomäne in CEP55 wurden Sekundärstrukturanalysen durchgeführt, um nachfolgend trunkierte Versionen des Proteins herzustellen und auf ihre MT Bindung zu testen. Eine grobe Struktur von CEP55 wurde bereits von Fabbro et al. (2005) und

Martinez-Garay et al. (2006), ebenfalls nach Analyse der Sekundärstruktur beschrieben. Strukturanalysen haben sich seitdem durch neue Algorithmen und Informationen über andere aufgeklärte Strukturen weiterentwickelt und werden immer genauer und aussagekräftiger. Daher wurden nicht die bekannten Strukturen verwendet, sondern neue Analysen durchgeführt.

Es wurden Analysen zur Wahrscheinlichkeit zum Vorkommen von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen, sowie zum Vorkommen von R und CC-Strukturen durchgeführt (Abb. 29A-D). Diese Analysen wurden zusammengefasst und ein Modell der Sekundärstruktur erstellt (Abb. 29E). Sie zeigen einen großen Anteil an α -Helices (Abb. 29A) welche CC Strukturen bilden (Abb. 29D). CCs bestehen aus mindestens zwei α -Helices, die parallel oder antiparallel zueinander sind. Sie folgen einem definierten Heptadenmuster, bei dem an erster und vierter Stelle hydrophobe AS vorkommen, wodurch sie gut vorherzusagen sind (Lupas und Gruber 2005). β -Faltblattstrukturen wurden am C-terminalen Ende des Proteins gefunden (Abb. 29B). Die Bildung von R andom C oil Strukturen wurde besonders für die N- und C-terminalen Enden und die Bereiche zwischen den CCs vorhergesagt (Abb. 29C). Der mittlere

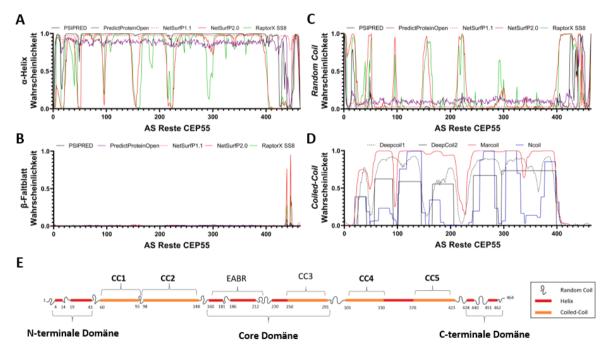


Abb. 29: Sekundärstrukturanalyasen bestätigen CC Struktur von CEP55. Für die Erstellung eines detaillierte ren Modells wurde die Sekundärstruktur von CEP55 analysiert und ein Modell abgeleitet. (A-D) Analysen von α Helix-, β-Faltblatt und *Random Coil* Strukturen wurden mit PSIPRED, PredictProteinOpen, NetSurfP1.1, NetSurfP2.0 und RaptorX SS8 durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit für Coiled-Coil (CC) Strukturen wurde mit Deep Coil1, Deep Coil2, Marcoil und Ncoil durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Wahrscheinlichkeiten zwischen 0 (nicht wahrscheinlich) und 1 (wahrscheinlich) aufgetragen. (E) Modell erstellt aus den zusammengefassten Strukturanalysen. CC Bereiche sind orange, α-Helix-Strukturen rot und unstrukturierte *Random Coil* Bereiche in schwarz dargestellt. AS Grenzen sind unter den definierten Domänen beschrieben. Die Core Domäne beinhaltet die EABR Domäne und CC3. N- und C-Term zeigen die weniger strukturierten Enden des Proteins. Diese Grafik wurde freundlicherweise von Themistoklis Paraschiakos erstellt.

Bereich des Proteins, in dem die EABR Domäne (AS 160-217) und CC3 liegen, wurde als Core Domäne definiert. Die Struktur der EABR Domäne wurde 2008 durch eine Kristallstrukturanalyse aufgeklärt (Lee et al., 2008) und passt zu den durchgeführten Analysen. Die EABR Domäne zeigte in der Kristallstruktur die Bildung eines parallelen Homodimers. Die Bildung von CEP55-Dimeren wurde bereits 2006 gezeigt (Martinez-Garay et al., 2006).

In einer Homologie-Analyse bei der die vorhergesagt Sekundärstruktur von CEP55 mit der bekannten Struktur anderer Proteine verglichen wurde (MPI Bioinformatics Toolkit; HHpred), wurden unter anderen Mysosine, Dyneine, Proteine mit Zinkfinger-Motiv und SMC Proteine gefunden (Anhang, Abb. 46). Bei Zinkfinger-Motiven gibt es unterschiedliche Gruppen, bei denen durch eine Faltung der Proteine in der Mitte N- und C-Terminus in räumlicher Nähe zueinander liegen (Krishna et al., 2003). SMC Proteine bestehen wie CEP55 aus CC-Strukturen. Die CCs entstehen jedoch nicht durch die Bildung von Dimeren, sondern durch eine Faltung des Proteins in der Mitte. Hierdurch liegen N- und C-Terminus auf einer Seite (Truebestein und Leonard 2016). Die Core Domäne zeigt neben der EABR Domäne und CC3 Random Coil Bereiche, die eine Beweglichkeit des Proteins innerhalb der CD zeigen. Dies zeigt die Möglichkeit, dass auch CEP55 CC Domänen bilden könnte, indem das Protein gefaltet wird. Aufgrund dieser Informationen zeigt Abb. 30 mögliche Tertiärstrukturen von CEP55 (Variante A und Variante B) und die mögliche Bildung von Homodimeren. Für Variante A wurde die Bildung von parallelen und antiparallelen Homodimeren vorgeschlagen. Da der Bereich um die EABR

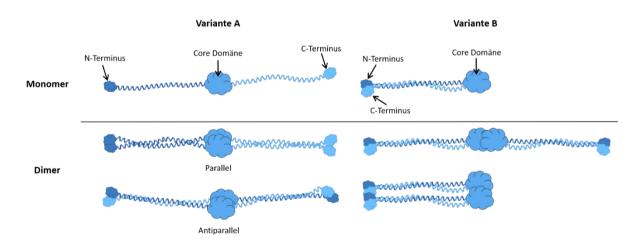


Abb. 30: Modelle möglicher Tertiärstruktur von CEP55 und deren Dimerisierung. Mögliche tertiär Struktur von CEP55 erstellt aufgrund der durchgeführten Sekundärstruktur- und Homologie-Analysen. Die Enden des Proteins zeigen ungeordnete Bereiche definiert als N- und C-Term. Die Core Domäne, in der die EABR Domäne liegt, ist dargestellt als Bereich, der durch die *Random Coil* flexibel ist und potentiell eine geknäulte Struktur aufweist. Variante A zeigt ein langes Protein mit CC Strukturen auf N- und C-terminaler Seite der Core Domäne. Variante B zeigt die mögliche Faltung des Proteins in dem Bereich der Core Domäne. Für die Dimerisierung wurde jeweils zwei Vorschläge dargestellt. Für Variante A ein paralleles und ein antiparalleles Dimer. Für Variante B eine Dimerisierung über die Core Domäne oder über die Core Domäne und N- und C-Term. Diese Grafik wurde freundlicherweise von Themistoklis Paraschiakos erstellt.

Domäne mit den *Random Coil* Strukturen flexibel erscheint, sollte es auch bei einem antiparallelen Homodimer möglich sein in diesem Bereich eine parallele Struktur zu erhalten. Für Variante B wurde die Dimerisierung über die Core Domäne oder die Core Domäne und die Nund C-terminalen Enden vorgeschlagen.

Das Model der CEP55 Sekundärstruktur wurde als Grundlage zur Erstellung von trunkierten Proteinen verwendet. Abb. 31 zeigt die Modelle der trunkierten CEP55 Proteine mit den AS Grenzen. Die Core Domäne wurde mit Anteilen von CC2 und CC4 exprimiert (CD) um die Faltung der Domäne zu unterstützen. Zusätzlich wurde ein Protein mit der fehlenden Core Domäne CEP55-ΔCD verwendet. Eine weitere Mutante ist ΔEABR durch die Deletion der EABR-Domäne (AS 160-217).

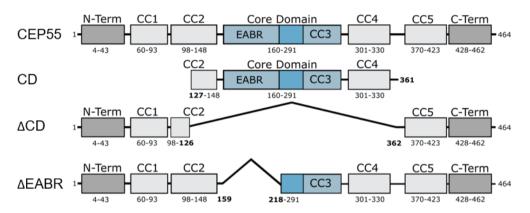


Abb. 31: Schematische Darstellung trunkierter CEP55 Proteine. Dargestellt sind das Volllängen-Protein und die zur Identifikation der MT-Bindedomäne erstellten trunkierten Versionen von CEP55. Eine Mutante stellt die Core Domäne (CD) mit Teilen von CC2 und CC4 dar. ΔCD zeigt die Deletion von CD und ΔEABR die Deletion der ALIX und TSG101 Bindedomäne (AS 160-217). Genaue AS Grenzen sind unter den Modellen dargestellt. Diese Grafik wurde freundlicherweise von Themistoklis Paraschiakos erstellt.

Nach erfolgreicher Synthese der Proteine (Abb. 32A) wurde der MT Bindeversuch mit Rhodamin-markierten MTs wiederholt (Abb. 32B). Das CEP55 Volllängen Protein wurde als Kontrolle mitgeführt. Es konnte eine Bindung von CEP55-ΔEABR und CEP55-ΔCD an MTs gezeigt werden. CEP55-CD hat jedoch nicht an MTs gebunden. Demnach konnten die EABR Domäne, sowie der als Core Domäne definierte Abschnitt von CEP55 als MT Bindedomänen ausgeschlossen werden. Die MT-Bindedomäne muss also in einem Teil des Proteins liegen, der in der Mutante CEP55-ΔCD exprimiert wurde. Dies gibt Hinweise darauf, dass die MT-Bindedomäne im N- oder C-terminalen Bereich des Proteins liegen könnte. Diese Bereiche erwiesen sich als am wenigsten strukturiert. Es wurde mit Deletionen von N- oder C-Terminus fortgefahren. Aufgrund der Hypothese zur Dimerisierung wurde zusätzlich eine Mutante erstellt in der N- und C-Terminus deletiert wurden ΔNC (Abb. 33).

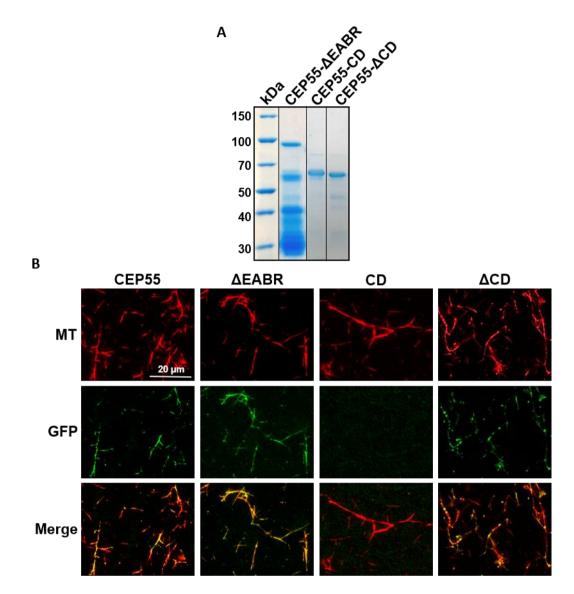


Abb. 32: CEP55 Core Domäne zeigt keine MT Bindung *in vitro*. Untersuchung der MT Bindung von CEP55 und trunkierten CEP55 Proteinen in einem zellfreien System. (A) Gereinigte GFP-CEP55 Proteine ΔEABR (78 kDa), Core Domäne (CD, 58 kDa) und ΔCD (58 kDa). (B) Repräsentative Aufnahmen der Bindung von GFP-CEP55 Konstrukten (grün) an Rhodamin-markierte MTs (rot). Die Proteine wurde mit TaxoI-stabilisierten MTs inkubiert, auf ein *Chamber-Slide* aufgetragen, eingedeckt und mikroskopiert. Gezeigt sind CEP55, CEP55 ΔEABR, CEP55 CD und CEP55 ΔCD. Maßstabsbalken 20 μm.

Um die Bindung der neu hergestellten Proteine (Abb. 34A) zu prüfen, wurden die Proteine an magnetischen GFP-Beads immobilisiert und mit Tubulin beziehungsweise polymerisierten MTs inkubiert. Gebundenes Tubulin bzw. MTs wurden durch Western-Blot mit einem β-Tubulin Antikörper nachgewiesen. Es wurde zu diesem Versuch gewechselt, da der Nachweis der Bindung durch einen Western-Blot sensitiver ist. Außerdem konnte bei der Verwendung von magnetischen Beads durch Waschen mit Puffer ungebundenes Protein entfernt werden. Als Kontrollen wurden GFP, CEP55, CEP55-CD und CEP55-ΔCD mitgeführt.

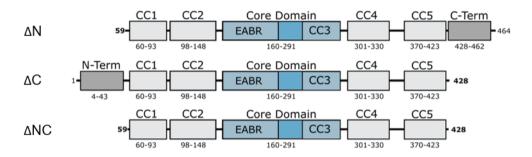


Abb. 33: Schematische Darstellung von CEP55 Varianten mit trunkierten N/C-Termini. Für die Identifikation der MT-Bindedomäne wurden weitere trunkierte CEP55 Proteine hergestellt. Es wurden Mutanten mit fehlender N terminaler Domäne (ΔN) und fehlender C-terminaler Domäne (ΔC) erstellt, sowie eine Doppelmutante (ΔNC). Genaue AS Grenzen sind unter den Modellen dargestellt. CC: *Coilded-Coil*. Diese Grafik wurde freundlicherweise von Themistoklis Paraschiakos erstellt.

Eine Bindung von Tubulin konnte bei allen verwendeten Proteinen außer GFP nachgewiesen werden (Abb. 34B). Bei der Bindung von MTs an die Proteine konnten dagegen eindeutige

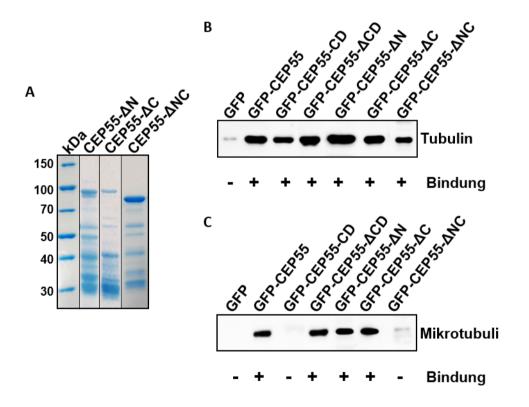


Abb. 34: CEP55-ΔNC bindet nicht an MTs. Um die Bindung von Tubulin und MTs an GFP-CEP55 Proteine zu untersuchen wurden die Proteine an magnetischen GFP-Beads immobilisiert. Zu den Proteinen wurden Tubulin oder polymerisierte MTs gegeben, in Suspension inkubiert und anschließend ungebundene Proteine weggewaschen. Die Beads mit den Proteinen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und aufgekocht. Die gekochten Proben wurden durch SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit einem ß-Tubulin Antikörper die Tubulin-Bindung nachgewiesen. (A) 10% SDS-Gel mit gereinigten His-GFP Proteinen. CEP55-ΔN (78 kDa), CEP55-ΔC (80 kDa) und CEP55-ΔNC (74 kDa). (B) Exemplarischer Western-Blot zur Bindung von Tubulin an CEP55 Proteine und GFP. Bindung von Tubulin (+), keine Bindung (-). (C) Exemplarischer Western-Blot zur Bindung von polymerisierten MTs an GFP und CEP55 Proteine. Bindung von MTs (+), keine Bindung (-).

Unterschiede ausgemacht werden (Abb. 34C). CEP55-CD hat wie erwartet keine MTs gebunden. CEP55, CEP55-ΔCD, CEP55-ΔN sowie CEP55-ΔC hingegen zeigten eine Bindung von MTs. CEP55-ΔNC, die Mutante, bei der das Protein an beiden Enden trunkiert wurde, zeigte keine MTs Bindung. Da CEP55-ΔNC nicht an MTs gebunden hat, ist davon auszugehen, dæs die MT-Bindedomäne in diesen Bereichen liegt. Die Proteine mit den einzelnen deletierten Enden haben an MTs gebunden, daher muss ein Zusammenspiel der beiden Domänen für die MT-Bindung vorliegen.

Bei allen untersuchten Proteinen konnte eine Bindung von Tubulin nachgewiesen werde n, aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der trunkierten Proteine CD, Δ CD und Δ NC auf die MT Polymerisierung untersucht (Abb. 35).

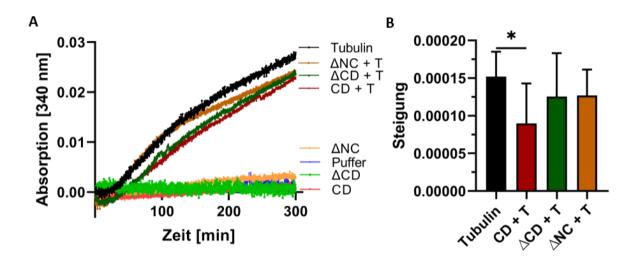


Abb. 35: Trunkierte CEP55 Proteine haben negativen oder keinen Effekt auf die Polymerisierung von MTs in vitro. Die Polymerisierung von MTs unter dem Einfluss trunkierter CEP55 Proteine wurde in einem Trübungs-Assay untersucht. (A) Repräsentative Darstellung der MT Polymerisierung durch trunkierte CEP55 Proteine. Als Kontrollen wurden Proteine und Puffer ohne Zugabe von Tubulin verwendet. Die MT Polymerisierung wurde als steigende Absorption bei 340 nm im Tecan Reader gemessen. Es wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt. (B) Bestimmung der Steigung der repräsentativen Kurven zwischen min 60 und min 100.

CEP55-CD verringerte die Polymerisierungsrate 1,6 fach (Abb. 35B). Das Protein mit der deletierten MT-Bindedomäne CEP55-ΔNC und CEP55-ΔCD hingegen beeinflussten die Polymerisierungsrate nicht (Abb. 35). Möglicherweise reduziert CEP55-CD, welches nicht an MTs aber an Tubulin binden kann, die MT-Polymerisierung durch das Abfangen von Tubulin Dimeren.

In diesem Teil der Arbeit wurden die Einflüsse von CEP55 auf MTs *in vitro* untersucht. Es konnte die Lokalisation von CEP55 entlang der MTs gezeigt werden, sowie die gesteigerte Polymerisierung von Tubulin zu MTs. Außerdem wurden die MT-Bindedomäne von CEP55 identifiziert und Modelle für eine mögliche Tertiär Struktur des Proteins vorgestellt.

7. Diskussion

Ein Kennzeichen von Ovarialkarzinomen ist die Heterogenität der Zellen innerhalb eines Tumors, aber auch zwischen unterschiedlichen Tumoren (Kroeger und Drapkin 2017). Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Auftreten von CIN (Nelson et al., 2020). CIN beschleunigt die Entwicklung von Resistenzen gegen Medikamente und fördert die Metastasierung (Thompson et al., 2010). Sie entsteht durch Fehler in DNA-Reparaturmechanismen oder während der Mitose (Vargas-Rondón et al., 2017). Die Dynamik der Spindel-MTs spielt hierbei eine wichtige Rolle, ist ihre Regulation gestört kann es zu Fehlern kommen, welche eine CIN verursachen können (Cirillo et al., 2017). Aufgrund ihrer essenziellen Rolle bei der Proliferation oder Migration sowie bei der Mitose sind MTs ein bevorzugtes Ziel in der Krebstherapie. Ein Problem hierbei ist die Entwicklung von Resistenzen und die systemische Wirkung der Medikamente, welche starke Nebenwirkungen zur Folge haben (Čermák et al., 2020). Ein Beispiel hierfür ist Paclitaxel, welches häufig für die Therapie von Ovarialkarzinomen eingesetzt wird, es bindet und stabilisiert MTs, wodurch die Mitose blockiert wird (Weaver 2014).

In der Entwicklung neuer Therapieansätze wird es immer interessanter Proteine als Ziele zu wählen, die MT-modulierende Eigenschaften besitzen und deren Expression tumorspezifisch ist. Eine Gruppe von Proteinen, die an der Regulation der MT-Dynamik beteiligt ist, sind Centrosomale Proteine (Kumari und Panda 2018). Eine gestörte Regulation von einigen Centrosomalen Proteinen wird mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Kumar et al., 2013). Zu diesen Proteinen gehört CEP55, es ist in vielen Tumoren überexprimiert und in normalen Geweben kaum nachweisbar (Jeffery et al., 2016; Kalimutho et al., 2018). CEP55 wurde als Tumor assoziiertes Antigen bei Mammakarzinomen identifiziert (Inoda et al., 2009). Es wird mit der Progression von Tumoren und der Entstehung von CIN assoziiert (Jeffery et al., 2016). Diese Eigenschaften von CEP55 machen es zu einem interessanten Ziel für die Tumortherapie. Hierfür muss der Mechanismus durch den CEP55 die Progression von Tumoren fördert vollständig aufgeklärt werden. In einem Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine CEP55 Überexpression eine spontane Tumorgenese ausgelöst werden kann (Sinha et al., 2020).

Ziel dieser Arbeit war es, dazu beizutragen die tumorfördernde Aktivität von CEP55 in Ovarialkarzinom Zellen aufzuklären. Hierbei wurde aufgrund der bekannten MT-Bindung und der Assoziation mit CIN insbesondere die MT-regulierende Aktivität von CEP55 untersucht. Zunächst wurde in den Zellen ein CEP55 Knockdown durchgeführt, um die Auswirkungen auf die Stabilisierung von MTs und die Entstehung von CIN zu untersuchen. Eine anschließende Expression von CEP55^{WT} und CEP55^{Y187A} in den Knockdown Zellen wurde genutzt, um die Spezifizität der Ergebnisse zu validieren und den Einfluss der CEP55/ALIX Interaktion zu

untersuchen. Zusätzlich wurde der Einfluss von CEP55 auf MTs *in vitro* weitergehend untersucht und die MT-Bindedomäne des Proteins identifiziert.

7.1 CEP55 ist nicht essenziell für die Cytokinese

Bisher wurde CEP55 als essenziell für die Zellteilung in Krebszellen angesehen (Carlton und Martin-Serrano 2007; Morita et al., 2007). Während der Cytokinese rekrutiert CEP55 ALIX und TSG101 an den Midbody, zwei Proteine die für den weiteren Aufbau von ESCRT-III notwendig sind, wodurch wiederum die Trennung der Zellen vermittelt wird (Carlton und Martin-Serrano 2007; Carlton et al., 2008). Die Rolle von CEP55 in den meisten adulten, humanen Geweben ist nicht aufgeklärt. Versuche in einem Mausmodell haben gezeigt, dass CEP55 für die Zelltrennung in neuronalen Vorläuferzellen essenziell ist, in anderen embryonalen oder adulten Geweben jedoch nicht benötigt wird (Tedeschi et al., 2020).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEP55 in der Cytokines e für die Trennung der untersuchten Zellen nicht essenziell ist. Es wurde eine verlängerte Trennungsdauer in CEP55 Knockdown und CEP55^{Y187A} Zellen gezeigt (Abb. 23A), wäre die CEP55 vermittelte Rekrutierung des ESCRT-III jedoch essenziell, hätte keine Trennung der Zellen erfolgen können. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass CEP55 eine schnelle Trennung der Midbody MTs durch die Rekrutierung von ALIX und TSG101 vermittelt. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie in embryonalen neuronalen Stammzellen, bei der eine gesteigerte Geschwindigkeit der Zelltrennung am Midbody mit der CEP55 vermittelten ESCRT-III Rekrutierung in Zusammenhang gebracht wird (Little et al., 2021). Daraus wird deutlich, dass CEP55 nur für schnell proliferierende Zellen wichtig ist.

7.2 Der Einfluss von CEP55 ist abhängig von der Proteinkonzentration

Bei verschiedenen Versuchen in dieser Arbeit konnten Unterschiede zwischen Zellen mit einem starken (83%) und einem schwächeren (66%) Knockdown von CEP55 gezeigt werden. Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde zum Beispiel bei der Bildung von Kolonien, der Geschwindigkeit bei der Midbody-Trennung, dem Chrosomosomen-Alignmet und der Chromosomenanzahl nachgewiesen. Auch in anderen Studien wurden konzentrationsabhängige Effekte von CEP55 gesehen. Der Einfluss auf das Koloniebildungs-Potenzial konnte ebenfalls von Kalimutho et al. (2018) gezeigt werden. Der konzentrationsabhängige Effekt auf die Trennungsdauer der Midbody-MTs ist wie bereits beschrieben durch die Rekrutierung von ALIX und TSG101 bedingt. In Zellen mit wenig CEP55 kann die von Zhao et al. (2006) beschriebene Ringstruktur nicht vollständig ausgebildet werden und die Zelle muss die Cytokinese auf einem anderen Weg beenden. In HeLa Zellen scheint eine CEP55 Homöostase besonders wichtig

zu sein, da hier eine Depletion sowie eine Überexpression zur Entstehung von aneuploiden Zellen geführt hat (Fabbro et al., 2005). Aus diesen Daten wird deutlich, wie wichtig eine exakte Regulation von Proteinen ist, die einen Einfluss auf die Mitose haben.

7.3 CEP55 reguliert die MT-Stabilität in der Spindel und am Midbody

Es ist bekannt, dass CEP55 im Verlauf des Zellzyklus an der Spindel sowie am Midbody lokalisiert ist (Martinez-Garay et al., 2006; Fabbro et al., 2005; Zhao et al., 2006). Dies konnte durch eine Antikörperfärbung in SKOV-3 Kontrollzellen bestätigt werden, in Knockdown Zellen wurde wie erwartet kein Signal nachgewiesen (Abb. 12). In vitro wurde eine Bindung von CEP55 an MTs gezeigt (Zhao et al., 2006), diese konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (Abb. 27 B). Aufgrund der sehr distinkten Lokalisation von CEP55 an MT-reichen Strukturen liegt die Annahme nahe, dass ein Einfluss auf die MTs in Zellen besteht. Sinha et al. (2020) haben nach CEP55 Überexpression eine erhöhte Stabilisierung von Spindel und Midbody MTs in Mauszellen gezeigt. Auch in dieser Arbeit konnte eine CEP55 abhängige Stabilisierung der MTs an der Spindel und um den Midbody herum nachgewiesen werden. Durch den CEP55 Knockdown wurde eine reduzierte Stabilität der MTs verursacht. Der Einfluss auf die MT-Stabilität in Interphase Zellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, Martinez-Garay et al. (2006) haben dies in CHO-K1 Zellen analysiert und konnten in der Interphase keine Rolle von CEP55 bei der Stabilisierung von MTs zeigen. In Kombination mit den vorliegenden Daten zur MT Stabilisierung an Spindel und Midbody lässt sich schließen, dass die MT-stabilisierende Aktivität von CEP55 nur in der Mitose wichtig ist. Da die Expression von CEP55 wie bei vielen anderen mitotischen Proteinen während des Übergangs von der G2-Phase in die Mitose induziert wird (Jeffery et al., 2016), ist der fehlende Einfluss auf die MT Dynamik in der Interphase plausibel. Dies bietet auch eine Erklärung für die nur geringen Unterschiede in der Migration zwischen Kontroll- und CEP55 Knockdown Zellen.

Die veränderte MT-Stabilität am Midbody hatte keine Auswirkungen auf die Dynamik bei der Trennung der Zellen. Dies konnte durch Live-Cell-Imaging Analysen mit CEP55^{Y187A} gezeigt werden. Obwohl die Stabilität der Midbody-MTs wiederhergestellt werden konnte, wurde die Trennung der Zellen nicht wieder auf das Niveau der Kontrollzellen beschleunigt. Dies bedeutet, dass die erhöhte CEP55 vermittelte MT-Stabilität am Midbody entweder keinen Einfluss auf die Cytokinese hat oder der Einfluss schon vor dem untersuchten Zeitraum zum Tragen kommt.

7.4 CEP55 beeinflusst Entstehung und Dynamik von CIN

Die Dynamik der Spindel-MTs muss für eine fehlerfreie Mitose exakt reguliert sein (Bakhoum, Genovese, et al., 2009). Durch eine Veränderung der Dynamik kann es zur Entstehung von CIN kommen (McClelland 2017). Sind die MTs der Spindel zum Beispiel übermäßig stabilisiert, kann die Korrektur einer falschen K-MT/Kinetochor-Bindung verhindert werden, wodurch die Trennung der Chromosomen gestört wird (Bakhoum, Genovese, et al., 2009). Eine Folge ist die ungleiche Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Die Förderung einer CIN durch übermäßig stabilisierte Spindel-MTs konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits in Kolonkarzinom-Zellen gezeigt werden (Grueb et al., 2019; Miao et al., 2021). Da CEP55 einen eindeutigen Einfluss auf die Stabilität der Spindel-MTs zeigte, sollte aufgeklärt werden, ob dies die Entstehung von CIN in Ovarialkarzinom Zellen beeinflusst. Hierfür wurde das chromosomale Alignment der Zellen in der Metaphase ausgewertet. Tatsächlich war das Alignment der Chromosomen in der Äquatorialebene während der Metaphase in Zellen mit einer geringen CEP55 Expression deutlich verbessert. Daher lässt sich vermuten, dass CEP55 die K-MT/Kinetochor-Bindung durch eine übermäßige Stabilisierung der K-MTs negativ beeinflusst. Sinha et al. (2020) haben in Mauszellen ebenfalls eine durch CEP55 gesteigerte Stabilisierung von Spindel-MTs nachgewiesen und diese mit der Entstehung von CIN in Verbindung gebracht.

Eine gestörte Ausrichtung der Chromosomen kann zur Entstehung von *lagging* Chromosomen führen, wodurch sich Mikronuklei bilden können (He et al., 2019). Das Vorhandensein von Mikronuklei wird als Marker für eine vorliegende CIN verwendet (Tang et al., 2018). Da in CEP55 Knockdown Zellen ein verbessertes Chromosomen-Alignment nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es seltener zu lagging Chromosomen und damit zu weniger Mikronuklei kommt. Diese Annahme konnte bestätigt werden, wodurch der Einfluss von CEP55 auf CIN weiterhin verdeutlicht wird. In MDA-MB 231 Mammakarzinom-Zellen wurde gezeigt, dass ein CEP55 Knockdown die Häufigkeit von aneuploiden Zellen reduzierte (Kalimutho et al., 2018). Obwohl die untersuchten SKOV-3 Zellen hochgradig aneuploid sind, konnte durch die Reduktion von CEP55 neben der Verbesserung im Chromosomen-Alignment eine signifikante Reduktion in der Chromosomenanzahl erreicht werden. Dies wurde ebenfalls in den weniger aneuploiden OVCAR-8 Zellen gezeigt. Außerdem weisen CEP55 Knockdown Zellen eine geringere Streuung in der Chromosomenanzahl auf. Dies bestätigt den Einfluss von CEP55 auf die Progression von CIN. Ist wenig CEP55 in den Zellen exprimiert, kommt es durch eine erhöhte MT Dynamik zu einem verbesserten Alignment und damit zu einer genaueren Trennung der Chromosomen in der Anaphase, wodurch die Anzahl der Chromosomen reduziert wird und weniger stark schwankt.

Aufgrund der Aneuploidie, dem schlechten Chromosomen-Alignment und den vorhandenen Mikronuklei ist davon auszugehen, dass die K-MT/Kinetochorbindung in Zellen mit hoher CEP55 Expression durch eine Hyperstabilisierung der MTs nicht korrigiert werden kann. In gesunden Zellen signalisiert eine Stabilisierung der K-MTs eine korrekte Bindung an die Kinetochore, der SAC wird inhibiert und es findet der Übergang von der Metaphase in die Anaphase statt (Musacchio und Salmon 2007). Liegt eine merotelische Bindung der Kinetochore vor, würde durch die entstehende Spannung und MT-Stabilisierung eine Inhibition des SAC folgen (Punkt 3.2.1). In Zellen mit hoher CEP55 Expression wurde jedoch, trotz hoher Stabilität der Spindel-MTs, eine erhöhte SAC Aktivität nachgewiesen (Abb. 26). Der Knockdown von CEP55 führte außerdem zu einer starken Beschleunigung der MT-Geschwindigkeit mit Beginn der Anaphase (Abb. 25C). Bei Kontrollzellen und Zellen mit CEP55^{Y187A} konnte dieser Anstieg der Geschwindigkeit nicht nachgewiesen werden. In der Metaphase blieb die Geschwindigkeit der MTs in allen Zelllinien weitgehend stabil und auf einem Niveau. Der Einfluss auf die MT Dynamik kommt in diesem Fall also mit Einsetzen der Anaphase zu tragen.

Zusammengefasst zeigen die Daten bei Zellen mit hoher CEP55 Expression die Inhibition des Übergangs von der Meta- zur Anaphase durch den SAC. Als Folge würde man in diesen Zellen eine verringerte Proliferation erwarten. Dies war allerdings nicht der Fall. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen den aktivierten SAC umgehen können. Eine Umgehung des SAC bedeutet eine vorzeitige Beendigung der Mitose, auch *mitotic slippage* genannt (Burgess et al., 2014). Sie führt zu einer gestörten Trennung der Chromosomen und kann die Cytokinese verhindern, Folge sind eine CIN und die Entstehung von Krebs (Bakhoum, Silkworth, et al., 2014). Die vorliegenden Daten legen eine Rolle von CEP55 bei diesem Prozess nahe. Zudem wurde in Mammakarzinom Zellen gezeigt, dass CEP55 die Apoptose bei einer gestörten Mitose verhindert (Kalimutho et al., 2018). Zusammengefasst kann daraus geschlossen werden, dass eine hohe CEP55 Expression die Entstehung einer CIN durch *mitotic slippage* begünstigen kann.

7.5 Die ALIX Bindeaktivität von CEP55 hat keinen Einfluss auf CIN

Der Einfluss der ALIX Bindeaktivität von CEP55 während der Cytokinese wurde bereits ausführlich aufgeklärt (Morita et al., 2007; Lee et al., 2008). Um auszuschließen, dass diese Interaktion bei CIN fördernden Aktivitäten von CEP55 eine Rolle spielt, wurde in Knockdown Zellen die ALIX binde defiziente Mutante CEP55^{Y187A} exprimiert. Wie erwartet konnte CEP55^{Y187A} die Dauer der Midbody-Trennung nicht wiederherstellen, da hier die Rekrutierung von ALIX durch CEP55 nicht möglich war. Ein weiterer Effekt wurde bei der Untersuchung des Kolonieformierungs-Potenzials gefunden. Hier wurde der Phänotyp des Knockdowns bei CEP55^{Y187A} Zellen nur teilweise wiederhergestellt. Dies zeigt eine Rolle der CEP55/ALIX Interaktion bei der

Koloniebildung. Der Effekt entsteht vermutlich durch den Einfluss der CEP55 Rekrutierung von ALIX während der Cytokinese. Obwohl in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation gefunden wurden, ist hier ein Zusammenhang möglich. In Gliom Zellen wurde gezeigt, dass ein ALIX Knockdown zu einer reduzieren Kolonieformation sowie Proliferation führt, ein Zusammenhang mit CEP55 wurde jedoch nicht untersucht (Zhao et al., 2016). Durch die anteilige Wiederherstellung der Koloniebildung trotz blockierter ALIX-Bindung wurde der Einfluss einer weiteren CEP55 Aktivität gezeigt. Vermutlich handelt es sich hierbei um die MT-modulierende Aktivität von CEP55. Um dies zu bestätigen, müsste eine Mutante von CEP55 mit deletierter MT-Bindedomäne in den Knockdown Zellen exprimiert werden. Durch die Rückexpression von CEP55^{Y187A} konnten in den durchgeführten Analysen keine weiteren ALIX bezogenen Effekte gezeigt werden. Die MT-Stabilisierung und das Chromosomen-Alignment wurden vollständig wiederhergestellt. Auch bei der Dynamik der Spindel und der Aktivierung des SAC waren keine Unterschiede zu den Kontrollzellen zu sehen. Zusammenfassend konnten wie erwartet keine Funktionen der CEP55/ALIX Interaktion bei der Entstehung von CIN nachgewiesen werden.

7.6 CEP55 steigert die MT-Nukleation in vitro

Die CEP55 vermittelte MT-Stabilisierung innerhalb der Zelle wurde durch eine veränderte Detyrosinierung verursacht. Die mikroskopische Untersuchung der Lokalisation von rekombinant hergestelltem CEP55 in einem zellfreien System zeigte eine Bindung entlang der MTs (Abb. 27 B). Aufgrund der Bindung war auch eine direkte Stabilisierung durch CEP55 naheliegend. Daher wurden zwei Möglichkeiten untersucht wie CEP55 *in vitro* auf die Stabilität von MTs einwirken kann, über die Blockierung der Depolymerisierung oder über eine gesteigerte Polymerisierung. Die Depolymerisierung wurde durch CEP55 nicht verhindert, die Polymerisierung dagegen wurde stark erhöht. Eine Nukleations-Aktivität *in vitro* ist nicht unüblich für *in vivo* MT-stabilisierende Proteine, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Stabilisierung *in vivo* nicht durch eine erhöhte Nukleation stattfindet (Goodson und Jonasson 2018).

In Bindeversuchen konnte gezeigt werden, dass CEP55-CD an Tubulin, jedoch nicht an polymerisierte MTs bindet (Abb. 35B, C). Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf eine Rekrutierung von Tubulin Dimeren durch die Core Domäne von CEP55, welche durch die Bindung von CEP55 an MTs die Nukleation erhöht. Dies konnte durch die reduzierte Polymerisierung mit CEP55-CD bestätigt werden. Die Rekrutierung des freien Tubulins ohne eine Bindung an MTs verhindert die Assoziation an die wachsenden MTs. Zusammengefasst, scheint CEP55 MTs durch eine gesteigerte Polymerisierungsrate zu stabilisieren.

7.7 Identifikation der MT-Bindedomäne von CEP55

Um die MT-modulierende Aktivität von CEP55 weiter untersuchen zu können, wurde die MT-Bindedomäne identifiziert. MT-Bindedomänen sind nicht in einer AS Sequenz oder speziellen Tertiärstruktur konserviert. Daher wurden abhängig von der Sekundärstruktur Domänen definiert, um verschiedene trunkierte Proteine herzustellen und auf ihre MT-Bindung zu testen. Bereits durchgeführte Analysen in früheren Studien zeigten unterschiedliche Strukturen. Fabbro et al. (2005) beschrieben einen Aufbau aus drei CC Bereichen zwischen AS 60 und AS 355. Morita et al. (2007) hingegen zeigten eine Aufteilung von CEP55 in zwei CC "Arme" mit einer flexiblen "hinge" (engl. Scharnier) Region in der Mitte. Diese hinge Region wurde später als EABR Domäne (AS 160-217) identifiziert und die Struktur mittels Kristallographie untersucht (Lee et al., 2008). Dieser Bereich ist bisher jedoch der Einzige, der durch Kristallstrukturanalysen aufgeklärt wurde. Für diese Arbeit wurden erneut *in silico* Analysen zur Vorhersage der CEP55 Sekundärstruktur durchgeführt. Das Protein wurde anhand der erhaltenen Daten grob in verschiedene Bereiche eingeteilt (Abb. 29), um die Herstellung von trunkierten Proteinen zu erleichtern.

Durch in silico Strukturanalysen und in vitro Versuche konnte die MT-Bindedomäne von CEP55 als eine Kombination aus N- und C-Terminus identifiziert werden. Demnach müssen beide Termini des Proteins miteinander interagieren, um an MTs binden zu können. Martinez-Garay et al. (2006) haben eine Bildung von CEP55 Homodimeren gezeigt. Von Jefferey et al. (2016) wurde die Bildung eines parallelen CEP55 Homodimers mit der in der Mitte liegender EABR Domäne vorgeschlagen, dieses Modell ist jedoch nicht mit der identifizierten Interaktion von N- und C-Terminus vereinbar. Aufgrund der MT-Bindedomäne ist eine antiparallele Dimerisierung der CEP55 Moleküle naheliegend (Abb. 30, Variante A). Bei diesem Modell würde ein CEP55 Dimer zwei MT-Bindedomänen bilden und hierdurch zu einer Bündelung beziehungsweise Vernetzung mehrerer MTs führen. Im Gegensatz zu Zhao et al. (2006) wurde in dieser Arbeit keine MT-Bündelung durch CEP55 gezeigt. Aufgrund dieser Tatsache gepaart mit der Lokalisation der Bindedomäne und der Homologie-Analyse ist ein Modell denkbar bei dem N- und C-Terminus durch eine Faltung eines Monomers miteinander interagieren (Abb. 30, Variante B). Bei diesem Modell wurden ebenfalls unterschiedliche Möglichkeiten der Dimerisierung vorgeschlagen. Die Struktur eines Monomers bei diesem Modell erinnert an Dimere verschiedener Motorproteine, wie Myosine oder Kinesine. Es wird eine antiparallele CC Struktur gebildet wodurch die Core Domäne mit EABR Domäne auf der gegenüberliegenden Seite des interagierenden N- und C-Terminus liegt und ALIX oder TSG 101 binden kann. Durch die Random Coil Bereiche zwischen den Domänen wird das Protein flexibel (Dunker et al., 2001; Fitzkee und Rose 2004). Hierdurch wird, auch wenn eine antiparallele Bildung der CCs vorgeschlagen wird, die Bildung eines parallelen Dimers der EABR Domäne nicht ausgeschlossen.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein hypothetisches Modell der CEP55/MT Interaktion erstellt (Abb. 36). Dieses Modell zeigt die mögliche Bindung von CEP55 über die identifizierte MT-Bindedomäne entlang eines MTs. Am Plus-Ende des MTs rekrutiert CEP55 über die Core Domäne neue Tubulin Dimere und erhöht so die Nukleation.

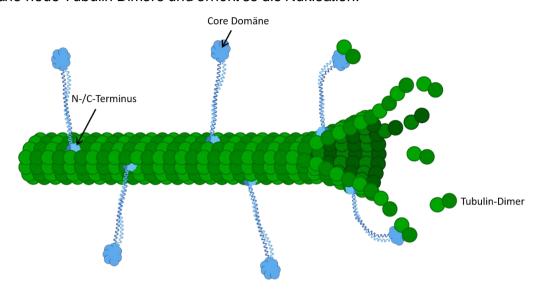


Abb. 36: Modell der Bindung von CEP55 an MTs. CEP55 (blau) bindet über die gesamte Länge des MTs (grün). CEP55 ist in der Core Domäne gefaltet und die benachbarten Enden des N- und C-Terminus (hellblau/dunkelblau) des Proteins, welche die MT-Bindedomäne bilden, an den MT. Der Bereich der Core Domäne bindet Tubulin Dimere (hellgrün/dunkelgrün) und fördert die Nukleation. Diese Grafik wurde freundlicherweise erstellt von Themistoklis Paraschiakos.

Für dieses Modell wurde die Bindung von CEP55 an MTs zugrunde gelegt. Es ist durchaus möglich, dass CEP55 bei der Bindung an MTs eine andere Konformation aufweist als bei der Rekrutierung von ALIX und TSG101 an den Midbody. Da die EABR Domäne keine Rolle bei der Bindung und Stabilisierung von MTs spielt, besteht zudem die Möglichkeit, dass bei der Bindung an MTs keine Dimerisierung der EABR vorliegt.

8. Ausblick und Fazit

Das oben vorgestellte Modell zur 3D Struktur von CEP55 ist hypothetisch. Um nähere Informationen über die Struktur von CEP55 zu erhalten, müssen neben *in silico* Modellierungen weitere Schritte vorgenommen werden. Die beste Methode, um die Struktur eines Proteins aufzuklären ist die Kristallisierung mit anschließender Röntgenstrukturanalyse. Hierbei wäre eine Kristallisierung von CEP55 allein und trunkierten CEP55 Konstrukten denkbar. Die Herstellung von Proteinkristallen ist jedoch nicht trivial, besonders die Kristallisation von langen oder flexiblen Proteinen (Hernandez Alvarez et al., 2008; Zheng et al., 2015). Eine weitere Möglichkeit ist die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS; *small angle X-ray scattering*), hierbei wird die Probe nicht kristallisiert sondern liegt in Lösung vor (Putnam et al., 2007). Um die Struktur von CEP55 gebunden an MTs zu untersuchen stellt zum Beispiel Kryoelektronenmikroskopie eine geeignete Methode dar (Manka und Moores 2018; Benoit et al., 2018).

Für die weitere Aufklärung des CEP55 Mechanismus innerhalb der Zelle sollte in zukünftigen Versuchen eine Rückexpression von CEP55 ohne MT-Bindedomäne (CEP55^{ΔMT}) in den Knockdown Zellen durchgeführt werden. Diese Versuche können zeigen, ob der CINfördernde Einfluss von CEP55 durch die Blockierung der MT-Bindung tatsächlich gestört wird. *In vitro* Versuche zeigten eine stark erhöhte MT Polymerisierung durch den Einfluss von CEP55. Dies könnte bedeuten, dass auch in Zellen neben dem stabilisierenden Einfluss durch eine veränderte Detyrosinierung der MTs zusätzlich ein direkter Einfluss von CEP55 vorliegt, bei dem durch eine erhöhte Polymerisierung einer Depolymerisierung entgegengewirkt wird. Dies könnte ebenfalls durch die Expression von CEP55^{ΔMT} geprüft werden.

Die Interaktion von CEP55 mit unterschiedlichen Proteinen, besonders am Midbody, ist bereits bekannt. Um weitere Funktionen von CEP55 an der Spindel aufzuklären, kann eine CEP55-Immunpräzipitation aus angereicherten Mitosezellen durchgeführt werden. Hierdurch könnten Interaktionspartner identifiziert werden die zum Beispiel, die erhöhte Stabilität der MTs vermitteln.

Zusammenfassend konnten die vorliegenden Daten den direkten Einfluss von CEP55 auf die Tumorgenese zeigen. CEP55 ist nicht essenziell für die Cytokinese, beschleunigt diese allerdings in Tumorzellen. Durch eine Hyperstabilisierung von Spindel-MTs scheint CEP55 die Entstehung von CIN zu fördern. CIN führt zu einer stetigen Diversifizierung der Tumorzellen und erschwert deren Therapie. Gibt es die Möglichkeit den Prozess der CIN zu unterdrücken wird auch die Progression des Tumors gehemmt und somit die Therapie erleichtert. Aufgrund der treibenden Kraft bei der Entstehung von CIN und der tumorspezifischen Expression, stellt CEP55 ein vielversprechendes Ziel für die Therapie dar. Die Identifikation der MT-Bindedomäne ermöglicht die Suche nach Substanzen, welche die CEP55/MT Interaktion blockieren und damit die Entstehung von CIN unterdrücken könnten.

9. Literatur

- Adan, A., Y. Kiraz, and Y. Baran. 2016. 'Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays', *Curr Pharm Biotechnol*, 17: 1213-21.
- Aguilera, A., and T. García-Muse. 2013. 'Causes of genome instability', *Annu Rev Genet*, 47: 1-32.
- Akhmanova, A., and M. O. Steinmetz. 2015. 'Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 711-26.
- Alfaro-Aco, R., and S. Petry. 2015. 'Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece', *J Biol Chem*, 290: 17154-62.
- Antanavičiūtė, I., P. Gibieža, R. Prekeris, and V. A. Skeberdis. 2018. 'Midbody: From the Regulator of Cytokinesis to Postmitotic Signaling Organelle', *Medicina (Kaunas)*, 54.
- Bach, D. H., W. Zhang, and A. K. Sood. 2019. 'Chromosomal Instability in Tumor Initiation and Development', *Cancer Res*, 79: 3995-4002.
- Bakhoum, S. F., and L. C. Cantley. 2018. 'The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment', *Cell*, 174: 1347-60.
- Bakhoum, S. F., G. Genovese, and D. A. Compton. 2009. 'Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability', *Curr Biol*, 19: 1937-42.
- Bakhoum, S. F., L. Kabeche, J. P. Murnane, B. I. Zaki, and D. A. Compton. 2014. 'DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation', *Cancer Discov.* 4: 1281-9.
- Bakhoum, S. F., and D. A. Landau. 2017. 'Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Bakhoum, S. F., W. T. Silkworth, I. K. Nardi, J. M. Nicholson, D. A. Compton, and D. Cimini. 2014. 'The mitotic origin of chromosomal instability', *Curr Biol*, 24: R148-9.
- Bakhoum, S. F., S. L. Thompson, A. L. Manning, and D. A. Compton. 2009. 'Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics', *Nat Cell Biol*, 11: 27-35.
- Benoit, Mpmh, A. B. Asenjo, and H. Sosa. 2018. 'Cryo-EM reveals the structural basis of microtubule depolymerization by kinesin-13s', *Nat Commun*, 9: 1662.
- Boveri, T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren (Fischer).
- Bradford, M. M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Braunstein, I., S. Miniowitz, Y. Moshe, and A. Hershko. 2007. 'Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 4870-5.
- Brouhard, G. J., and L. M. Rice. 2014. 'The contribution of αβ-tubulin curvature to microtubule dynamics', *J Cell Biol*, 207: 323-34.
- Bryan, J., and L. Wilson. 1971. 'Are cytoplasmic microtubules heteropolymers?', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68: 1762-6.
- Buchan, D. W. A., and D. T. Jones. 2019. 'The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on', *Nucleic Acids Res*, 47: W402-w07.
- Burgess, A., M. Rasouli, and S. Rogers. 2014. 'Stressing mitosis to death', Front Oncol, 4: 140.
 Burrell, R. A., S. E. McClelland, D. Endesfelder, P. Groth, M. C. Weller, N. Shaikh, E. Domingo, N. Kanu, S. M. Dewhurst, E. Gronroos, S. K. Chew, A. J. Rowan, A. Schenk, M. Sheffer, M. Howell, M. Kschischo, A. Behrens, T. Helleday, J. Bartek, I. P. Tomlinson, and C. Swanton. 2013. 'Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability'. Nature. 494: 492-96.
- Bybee, A., and N. S. Thomas. 1991. 'Cell cycle regulation', *Blood Rev*, 5: 177-92.
- Carlier, M. F. 1991. 'Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly', *Curr Opin Cell Biol*, 3: 12-7.
- Carlton, J. G., M. Agromayor, and J. Martin-Serrano. 2008. 'Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release', *Proc Natl Acad Sci US A*, 105: 10541-6.

- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano. 2007. 'Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery', *Science*, 316: 1908-12.
- Carter, S. L., K. Cibulskis, E. Helman, A. McKenna, H. Shen, T. Zack, P. W. Laird, R. C. Onofrio, W. Winckler, B. A. Weir, R. Beroukhim, D. Pellman, D. A. Levine, E. S. Lander, M. Meyerson, and G. Getz. 2012. 'Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer', *Nat Biotechnol*, 30: 413-21.
- Čermák, V., V. Dostál, M. Jelínek, L. Libusová, J. Kovář, D. Rösel, and J. Brábek. 2020. 'Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment', *Eur J Cell Biol*, 99: 151075.
- Chang, Y. C., C. H. Wu, T. C. Yen, and P. Ouyang. 2012. 'Centrosomal protein 55 (Cep55) stability is negatively regulated by p53 protein through Polo-like kinase 1 (Plk1)', *J Biol Chem*, 287: 4376-85.
- Cheeseman, I. M. 2014. 'The kinetochore', Cold Spring Harb Perspect Biol, 6: a015826.
- Cheeseman, I. M., and A. Desai. 2008. 'Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 33-46.
- Chen, C. H., C. Y. Chien, C. C. Huang, C. F. Hwang, H. C. Chuang, F. M. Fang, H. Y. Huang, C. M. Chen, H. L. Liu, and C. Y. Huang. 2009. 'Expression of FLJ10540 is correlated with aggressiveness of oral cavity squamous cell carcinoma by stimulating cell migration and invasion through increased FOXM1 and MMP-2 activity', *Oncogene*, 28: 2723-37.
- Chen, C. H., J. M. Lai, T. Y. Chou, C. Y. Chen, L. J. Su, Y. C. Lee, T. S. Cheng, Y. R. Hong, C. K. Chou, J. Whang-Peng, Y. C. Wu, and C. Y. Huang. 2009. 'VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway', *PLoS One*, 4: e5052.
- Chen, C. H., P. J. Lu, Y. C. Chen, S. L. Fu, K. J. Wu, A. P. Tsou, Y. C. Lee, T. C. Lin, S. L. Hsu, W. J. Lin, C. Y. Huang, and C. K. Chou. 2007. 'FLJ10540-elicited cell transformation is through the activation of Pl3-kinase/AKT pathway', *Oncogene*, 26: 4272-83.
- Cheng, W. Y., T. H. Ou Yang, and D. Anastassiou. 2013. 'Biomolecular events in cancer revealed by attractor metagenes', *PLoS Comput Biol*, 9: e1002920.
- Cimini, D., B. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degrassi, and E. D. Salmon. 2001. 'Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells', *J Cell Biol*, 153: 517-27.
- Cirillo, L., M. Gotta, and P. Meraldi. 2017. 'The Elephant in the Room: The Role of Microtubules in Cancer', *Adv Exp Med Biol*, 1002: 93-124.
- Coffman, J. A. 2004, 'Cell cycle development', Dev Cell, 6: 321-7.
- Connell, J. W., C. Lindon, J. P. Luzio, and E. Reid. 2009. 'Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion', *Traffic*, 10: 42-56.
- Davoli, T., and T. de Lange. 2012. 'Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells', *Cancer Cell*, 21: 765-76
- de Forges, H., A. Bouissou, and F. Perez. 2012. 'Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization', *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 266-74.
- Delorenzi, M., and T. Speed. 2002. 'An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions', *Bioinformatics*, 18: 617-25.
- Denning, W., S. Das, S. Guo, J. Xu, J. C. Kappes, and Z. Hel. 2013. 'Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations', *Mol Biotechnol*, 53: 308-14.
- DePinho, R. A., and K. Polyak. 2004. 'Cancer chromosomes in crisis', *Nat Genet*, 36: 932-4. Desai, A., and T. J. Mitchison. 1997. 'Microtubule polymerization dynamics', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 83-117.
- Dewhurst, S. M., N. McGranahan, R. A. Burrell, A. J. Rowan, E. Grönroos, D. Endesfelder, T. Joshi, D. Mouradov, P. Gibbs, R. L. Ward, N. J. Hawkins, Z. Szallasi, O. M. Sieber, and C. Swanton. 2014. 'Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution', *Cancer Discov*, 4: 175-85.

- Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Poüs, and F. Perez. 2008. 'Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues', *Science*, 322: 1353-6.
- Dompierre, J. P., J. D. Godin, B. C. Charrin, F. P. Cordelières, S. J. King, S. Humbert, and F. Saudou. 2007. 'Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation', *J Neurosci*, 27: 3571-83.
- Doxsey, S. J. 2005. 'Molecular links between centrosome and midbody', Mol Cell, 20: 170-2.
- Dunker, A. K., J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner, and Z. Obradovic. 2001. 'Intrinsically disordered protein', *J Mol Graph Model*, 19: 26-59.
- Earnshaw, W. C., and A. F. Pluta. 1994. 'Mitosis', Bioessays, 16: 639-43.
- Fabbro, M., B. B. Zhou, M. Takahashi, B. Sarcevic, P. Lal, M. E. Graham, B. G. Gabrielli, P. J. Robinson, E. A. Nigg, Y. Ono, and K. K. Khanna. 2005. 'Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis', *Dev Cell*, 9: 477-88.
- Fitzkee, N. C., and G. D. Rose. 2004. 'Reassessing random-coil statistics in unfolded proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12497-502.
- Foley, E. A., and T. M. Kapoor. 2013. 'Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 25-37.
- Franker, M. A., and C. C. Hoogenraad. 2013. 'Microtubule-based transport basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis', *J Cell Sci*, 126: 2319-29.
- Fraschini, R. 2017. 'Factors that Control Mitotic Spindle Dynamics', *Adv Exp Med Biol*, 925: 89-101.
- Fu, Z., L. Malureanu, J. Huang, W. Wang, H. Li, J. M. van Deursen, D. J. Tindall, and J. Chen. 2008. 'Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression', *Nat Cell Biol*, 10: 1076-82.
- Gabler, F., S. Z. Nam, S. Till, M. Mirdita, M. Steinegger, J. Söding, A. N. Lupas, and V. Alva. 2020. 'Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit', *Curr Protoc Bioinformatics*, 72: e108.
- Gadadhar, S., S. Bodakuntla, K. Natarajan, and C. Janke. 2017. 'The tubulin code at a glance', *J Cell Sci*, 130: 1347-53.
- Gadde, S., and R. Heald. 2004. 'Mechanisms and molecules of the mitotic spindle', *Curr Biol*, 14: R797-805.
- Gaskin, F., C. R. Cantor, and M. L. Shelanski. 1974. 'Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules', *J Mol Biol*, 89: 737-55.
- Geigl, J. B., A. C. Obenauf, T. Schwarzbraun, and M. R. Speicher. 2008. 'Defining 'chromosomal instability'', *Trends Genet*, 24: 64-9.
- Gemenetzidis, E., A. Bose, A. M. Riaz, T. Chaplin, B. D. Young, M. Ali, D. Sugden, J. K. Thurlow, S. C. Cheong, S. H. Teo, H. Wan, A. Waseem, E. K. Parkinson, F. Fortune, and M. T. Teh. 2009. 'FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation', *PLoS One*, 4: e4849.
- Gershony, O., T. Pe'er, M. Noach-Hirsh, N. Elia, and A. Tzur. 2014. 'Cytokinetic abscission is an acute G1 event', *Cell Cycle*, 13: 3436-41.
- Gilks, C. B., and J. Prat. 2009. 'Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances', *Hum Pathol*, 40: 1213-23.
- Gisselsson, D., T. Jonson, A. Petersén, B. Strömbeck, P. Dal Cin, M. Höglund, F. Mitelman, F. Mertens, and N. Mandahl. 2001. 'Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 12683-8.
- Gisselsson, D., L. Pettersson, M. Höglund, M. Heidenblad, L. Gorunova, J. Wiegant, F. Mertens, P. Dal Cin, F. Mitelman, and N. Mandahl. 2000. 'Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5357-62.

- Glotzer, M. 2001. 'Animal cell cytokinesis', Annu Rev Cell Dev Biol, 17: 351-86.
- Glotzer, M. 2009. 'The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 9-20.
- Gollin, S. M. 2004. 'Chromosomal instability', Curr Opin Oncol, 16: 25-31.
- Goodson, H. V., and E. M. Jonasson. 2018. 'Microtubules and Microtubule-Associated Proteins', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- Gordon, D. J., B. Resio, and D. Pellman. 2012. 'Causes and consequences of aneuploidy in cancer', *Nat Rev Genet*, 13: 189-203.
- Grueb, S. S., S. Muhs, Y. Popp, S. Schmitt, M. Geyer, Y. N. Lin, and S. Windhorst. 2019. The formin Drosophila homologue of Diaphanous2 (Diaph2) controls microtubule dynamics in colorectal cancer cells independent of its FH2-domain', *Sci Rep*, 9: 5352.
- Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mäntler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Müller-Reichert, and D. W. Gerlich. 2011. 'Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments', *Science*, 331: 1616-20.
- Gundersen, G. G., and J. C. Bulinski. 1986. 'Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis', *J Cell Biol*, 102: 1118-26.
- Gupta, K. K., E. O. Alberico, I. S. Näthke, and H. V. Goodson. 2014. 'Promoting microtubule assembly: A hypothesis for the functional significance of the +TIP network', *Bioessays*, 36: 818-26.
- Hallak, M. E., J. A. Rodriguez, H. S. Barra, and R. Caputto. 1977. 'Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin', *FEBS Lett*, 73: 147-50.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hara, M., and T. Fukagawa. 2020. 'Dynamics of kinetochore structure and its regulations during mitotic progression', *Cell Mol Life Sci*, 77: 2981-95.
- Harashima, H., N. Dissmeyer, and A. Schnittger. 2013. 'Cell cycle control across the eukaryotic kingdom', *Trends Cell Biol*, 23: 345-56.
- Hartwell, L. H., and T. A. Weinert. 1989. 'Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events', *Science*, 246: 629-34.
- Hawkins, T., M. Mirigian, M. Selcuk Yasar, and J. L. Ross. 2010. 'Mechanics of microtubules', *J Biomech*, 43: 23-30.
- He, B., N. Gnawali, A. W. Hinman, A. J. Mattingly, A. Osimani, and D. Cimini. 2019. 'Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division', *Oncotarget*, 10: 2660-74.
- Hernandez Alvarez, B., M. D. Hartmann, R. Albrecht, A. N. Lupas, K. Zeth, and D. Linke. 2008. 'A new expression system for protein crystallization using trimeric coiled-coil adaptors', *Protein Eng Des Sel*, 21: 11-8.
- Hildebrand, A., M. Remmert, A. Biegert, and J. Söding. 2009. 'Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred', *Proteins*, 77 Suppl 9: 128-32.
- Hill, B. T., R. D. Whelan, E. M. Gibby, D. Sheer, L. K. Hosking, S. A. Shellard, and H. T. Rupniak. 1987. 'Establishment and characterisation of three new human ovarian carcinoma cell lines and initial evaluation of their potential in experimental chemotherapy studies', *Int J Cancer*, 39: 219-25.
- Hintzsche, H., U. Hemmann, A. Poth, D. Utesch, J. Lott, and H. Stopper. 2017. 'Fate of micronuclei and micronucleated cells', *Mutat Res*, 771: 85-98.
- Hirokawa, N., Y. Noda, and Y. Okada. 1998. 'Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division', *Curr Opin Cell Biol*, 10: 60-73.
- Hu, C. K., M. Coughlin, and T. J. Mitchison. 2012. 'Midbody assembly and its regulation during cytokinesis', *Mol Biol Cell*, 23: 1024-34.
- Inoda, S., Y. Hirohashi, T. Torigoe, M. Nakatsugawa, K. Kiriyama, E. Nakazawa, K. Harada, H. Takasu, Y. Tamura, K. Kamiguchi, H. Asanuma, T. Tsuruma, T. Terui, K. Ishitani, T. Ohmura, Q. Wang, M. I. Greene, T. Hasegawa, K. Hirata, and N. Sato. 2009. 'Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma', J Immunother, 32: 474-85.

- Inoda, S., R. Morita, Y. Hirohashi, T. Torigoe, H. Asanuma, E. Nakazawa, M. Nakatsugawa, Y. Tamura, K. Kamiguchi, T. Tsuruma, T. Terui, K. Ishitani, S. Hashino, Q. Wang, M. I. Greene, T. Hasegawa, K. Hirata, M. Asaka, and N. Sato. 2011. 'The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma', *Exp Mol Pathol.* 90: 55-60.
- Janke, C., and J. C. Bulinski. 2011. 'Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 773-86.
- Janke, C., and M. M. Magiera. 2020. 'The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21: 307-26.
- Jayson, G. C., E. C. Kohn, H. C. Kitchener, and J. A. Ledermann. 2014. 'Ovarian cancer', Lancet, 384: 1376-88.
- Jeffery, J., D. Sinha, S. Srihari, M. Kalimutho, and K. K. Khanna. 2016. 'Beyond cytokinesis: the emerging roles of CEP55 in tumorigenesis', *Oncogene*, 35: 683-90.
- Jia, Y., Z. Xiao, X. Gongsun, Z. Xin, B. Shang, G. Chen, Z. Wang, and W. Jiang. 2018. 'CEP55 promotes the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via the PI3K/Akt pathway', *Onco Targets Ther*, 11: 4221-32.
- Jiang, C., Y. Zhang, Y. Li, J. Lu, Q. Huang, R. Xu, Y. Feng, and S. Yan. 2018. 'High CEP55 expression is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer', *Onco Targets Ther*, 11: 4979-90.
- Jiang, W., Z. Wang, G. Chen, and Y. Jia. 2016. 'Prognostic significance of centrosomal protein 55 in stage I pulmonary adenocarcinoma after radical resection', *Thorac Cancer*, 7: 316-22.
- Jiang, W., Z. Wang, and Y. Jia. 2017. 'CEP55 overexpression predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal squamous cell carcinoma', *Oncol Lett*, 13: 236-42.
- Jones, D. T. 1999. 'Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices', *J Mol Biol*, 292: 195-202.
- Kalimutho, M., D. Sinha, J. Jeffery, K. Nones, S. Srihari, W. C. Fernando, P. H. Duijf, C. Vennin, P. Raninga, D. Nanayakkara, D. Mittal, J. M. Saunus, S. R. Lakhani, J. A. López, K. J. Spring, P. Timpson, B. Gabrielli, N. Waddell, and K. K. Khanna. 2018. 'CEP55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer', EMBO Mol Med, 10.
- Källberg, M., H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, and J. Xu. 2012. 'Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server', *Nat Protoc*, 7: 1511-22.
- Kellogg, D. R., M. Moritz, and B. M. Alberts. 1994. 'The centrosome and cellular organization', *Annu Rev Biochem*, 63: 639-74.
- Klausen, M. S., M. C. Jespersen, H. Nielsen, K. K. Jensen, V. I. Jurtz, C. K. Sønderby, M. O. A. Sommer, O. Winther, M. Nielsen, B. Petersen, and P. Marcatili. 2019. 'NetSurf P-2.0: Improved prediction of protein structural features by integrated deep learning', *Proteins*, 87: 520-27.
- Kline-Smith, S. L., and C. E. Walczak. 2004. 'Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics', *Mol Cell*, 15: 317-27.
- Kollman, J. M., A. Merdes, L. Mourey, and D. A. Agard. 2011. 'Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 709-21.
- Kossaï, M., A. Leary, J. Y. Scoazec, and C. Genestie. 2018. 'Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease', *Pathobiology*, 85: 41-49.
- Krishna, S. S., I. Majumdar, and N. V. Grishin. 2003. 'Structural classification of zinc fingers: survey and summary', *Nucleic Acids Res*, 31: 532-50.
- Kroeger, P. T., Jr., and R. Drapkin. 2017. 'Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer', Curr Opin Obstet Gynecol, 29: 26-34.
- Kulkarni, P., and V. N. Uversky. 2017. 'Cancer/Testis Antigens: "Smart" Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Prostate and Other Cancers', *Int J Mol Sci*, 18.
- Kumar, A., V. Rajendran, R. Sethumadhavan, and R. Purohit. 2013. 'CEP proteins: the knights of centrosome dynasty', *Protoplasma*, 250: 965-83.
- Kumari, A., and D. Panda. 2018. 'Regulation of microtubule stability by centrosomal proteins', *IUBMB Life*, 70: 602-11.

- Kuriyama, R., and G. G. Borisy. 1981. 'Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle', J Cell Biol, 91: 822-6.
- L'Hernault, S. W., and J. L. Rosenbaum. 1985. 'Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine', Biochemistry, 24: 473-8.
- Lacroix, B., J. van Dijk, N. D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D. W. Gerlich, and C. Janke. 2010. 'Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing', J Cell Biol, 189: 945-54.
- Laoukili, J., M. R. Kooistra, A. Brás, J. Kauw, R. M. Kerkhoven, A. Morrison, H. Clevers, and R. H. Medema. 2005. 'FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability', Nat Cell Biol, 7: 126-36.
- Lara-Gonzalez, P., F. G. Westhorpe, and S. S. Taylor. 2012. 'The spindle assembly checkpoint', Curr Biol, 22: R966-80.
- Lee, H. H., N. Elia, R. Ghirlando, J. Lippincott-Schwartz, and J. H. Hurley. 2008. 'Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55', Science, 322: 576-80.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. 'Genetic instabilities in human cancers', Nature, 396: 643-9.
- Lengyel, E. 2010. 'Ovarian cancer development and metastasis', Am J Pathol, 177: 1053-64.
- Li, F., D. Jin, C. Tang, and D. Gao. 2018. 'CEP55 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis via the PI3K/Akt/p21 signaling pathway in human glioma U251 cells', Oncol Lett, 15: 4789-96.
- Li, M. Z., and S. J. Elledge. 2012. 'SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning', Methods Mol Biol, 852: 51-9.
- Li, Y. H., K. C. Xu, G. M. Huang, and H. L. Zang. 2020. 'The function and molecular mechanism of CEP55 in anaplastic thyroid cancer, Eur Rev Med Pharmacol Sci, 24: 9549-55.
- Little, J. N., K. C. McNeely, N. Michel, C. J. Bott, K. S. Lettieri, M. R. Hecht, S. A. Martin, and N. D. Dwyer. 2021. 'Loss of coiled-coil protein Cep55 impairs neural stem cell abscission and results in p53-dependent apoptosis in developing cortex', J Neurosci.
- Liu, L., Q. Mei, J. Zhao, Y. Dai, and Q. Fu. 2016. 'Suppression of CEP55 reduces cell viability
- and induces apoptosis in human lung cancer', *Oncol Rep*, 36: 1939-45. Ludueńa, R. F., E. M. Shooter, and L. Wilson. 1977. 'Structure of the tubulin dimer', *J Biol* Chem, 252: 7006-14.
- Ludwiczak, J., A. Winski, K. Szczepaniak, V. Alva, and S. Dunin-Horkawicz. 2019. 'DeepCoila fast and accurate prediction of coiled-coil domains in protein sequences', Bioinformatics, 35: 2790-95.
- Lukinavičius, G., L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A. Güther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, C. Blaukopf, C. Sommer, D. W. Gerlich, H. D. Arndt, S. W. Hell, and K. Johnsson. 2014. 'Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton', Nat Methods, 11: 731-3.
- Lupas, A. N., and M. Gruber. 2005. 'The structure of alpha-helical coiled coils', Adv Protein Chem, 70: 37-78.
- Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock. 1991. 'Predicting coiled coils from protein sequences', Science, 252: 1162-4.
- Ma, X. P., W. Zhang, B. Q. Wu, and J. Qin. 2018. 'Correlations Between mRNA Levels of Centrosomal Protein 55 (CEP55) and Clinical Features of Patients with Lung Cancer', Med Sci Monit, 24: 3093-97.
- Manka, S. W., and C. A. Moores. 2018. 'Microtubule structure by cryo-EM: snapshots of dynamic instability', Essays Biochem, 62: 737-51.
- Margolin, G., I. V. Gregoretti, T. M. Cickovski, C. Li, W. Shi, M. S. Alber, and H. V. Goodson. 2011. 'The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model', Mol Biol Cell, 23: 642-56.
- Martinez-Garay, I., A. Rustom, H. H. Gerdes, and K. Kutsche. 2006. 'The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody, Genomics, 87: 243-53.

- Massagué, J. 2004. 'G1 cell-cycle control and cancer', Nature, 432: 298-306.
- Matsuo, M., T. Shimodaira, T. Kasama, Y. Hata, A. Echigo, M. Okabe, K. Arai, Y. Makino, S. Niwa, H. Saya, and T. Kishimoto. 2013. 'Katanin p60 contributes to microtubule instability around the midbody and facilitates cytokinesis in rat cells', *PLoS One*, 8: e80392.
- McClelland, S. E. 2017. 'Role of chromosomal instability in cancer progression', *Endocr Relat Cancer*, 24: T23-t31.
- McCluggage, W. G. 2011. 'Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis', *Pathology*, 43: 420-32.
- McGranahan, N., R. A. Burrell, D. Endesfelder, M. R. Novelli, and C. Swanton. 2012. 'Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges', *EMBO Rep*, 13: 528-38.
- McIntosh, J. R. 2016. 'Mitosis', Cold Spring Harb Perspect Biol, 8.
- McKenzie, L., S. King, L. Marcar, S. Nicol, S. S. Dias, K. Schumm, P. Robertson, J. C. Bourdon, N. Perkins, F. Fuller-Pace, and D. W. Meek. 2010. 'p53-dependent repression of pololike kinase-1 (PLK1)', *Cell Cycle*, 9: 4200-12.
- McNally, F. J., and A. Roll-Mecak. 2018. 'Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism', *J Cell Biol*, 217: 4057-69.
- Miao, S., P. Schäfer, J. Nojszewski, F. Meyer, and S. Windhorst. 2021. 'DIAPH1 regulates chromosomal instability of cancer cells by controlling microtubule dynamics', *Eur J Cell Biol.* 100: 151156.
- Mierzwa, B., and D. W. Gerlich. 2014. 'Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control', *Dev Cell*, 31: 525-38.
- Miller, K. G., C. M. Field, B. M. Alberts, and D. R. Kellogg. 1991. 'Use of actin filament and microtubule affinity chromatography to identify proteins that bind to the cytoskeleton', *Methods Enzymol*, 196: 303-19.
- Mitchison, T. J. 1989. 'Mitosis: basic concepts', Curr Opin Cell Biol, 1: 67-74.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. 'Dynamic instability of microtubule growth', *Nature*, 312: 237-42.
- Monda, J. K., and I. M. Cheeseman. 2018. 'The kinetochore-microtubule interface at a glance', *J Cell Sci*, 131.
- Mondal, G., M. Rowley, L. Guidugli, J. Wu, V. S. Pankratz, and F. J. Couch. 2012. 'BRCA2 localization to the midbody by filamin A regulates cep55 signaling and completion of cytokinesis', *Dev Cell*, 23: 137-52.
- Morales, E. S., I. L. Parcerisa, and E. A. Ceccarelli. 2019. 'A novel method for removing contaminant Hsp70 molecular chaperones from recombinant proteins', *Protein Sci*, 28: 800-07.
- Morita, E., V. Sandrin, H. Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist. 2007. 'Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis', *Embo j*, 26: 4215-27.
- Musacchio, A., and E. D. Salmon. 2007. 'The spindle-assembly checkpoint in space and time', Nat Rev Mol Cell Biol, 8: 379-93.
- Nagpal, H., and T. Fukagawa. 2016. 'Kinetochore assembly and function through the cell cycle', *Chromosoma*, 125: 645-59.
- Nelson, L., A. Tighe, A. Golder, S. Littler, B. Bakker, D. Moralli, S. Murtuza Baker, I. J. Donaldson, D. C. J. Spierings, R. Wardenaar, B. Neale, G. J. Burghel, B. Winter-Roach, R. Edmondson, A. R. Clamp, G. C. Jayson, S. Desai, C. M. Green, A. Hayes, F. Foijer, R. D. Morgan, and S. S. Taylor. 2020. 'A living biobank of ovarian cancer ex vivo models reveals profound mitotic heterogeneity', *Nat Commun*, 11: 822.
- Nezi, L., and A. Musacchio. 2009. 'Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint', *Curr Opin Cell Biol*, 21: 785-95.
- Nogales, E. 2000. 'Structural insights into microtubule function', *Annu Rev Biochem*, 69: 277-302.
- Olmsted, J. B. 1986. 'Microtubule-associated proteins', Annu Rev Cell Biol, 2: 421-57.

- Pampalona, J., C. Frías, A. Genescà, and L. Tusell. 2012. 'Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells', *PLoS Genet*, 8: e1002679.
- Pandit, B., M. Halasi, and A. L. Gartel. 2009. 'p53 negatively regulates expression of FoxM1', *Cell Cycle*, 8: 3425-7.
- Pardee, A. B. 1989. 'G1 events and regulation of cell proliferation', Science, 246: 603-8.
- Paweletz, N. 2001. 'Walther Flemming: pioneer of mitosis research', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 72-5.
- Peng, T., W. Zhou, F. Guo, H. S. Wu, C. Y. Wang, L. Wang, and Z. Y. Yang. 2017. 'Centrosomal protein 55 activates NF-kB signalling and promotes pancreatic cancer cells aggressiveness', *Sci Rep*, 7: 5925.
- Pérez de Castro, I., G. de Cárcer, and M. Malumbres. 2007. 'A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy', *Carcinogenesis*, 28: 899-912.
- Peterman, E., and R. Prekeris. 2019. 'The postmitotic midbody: Regulating polarity, stemness, and proliferation', *J Cell Biol*, 218: 3903-11.
- Peters, J. M., A. Tedeschi, and J. Schmitz. 2008. 'The cohesin complex and its roles in chromosome biology', *Genes Dev*, 22: 3089-114.
- Petersen, B., T. N. Petersen, P. Andersen, M. Nielsen, and C. Lundegaard. 2009. 'A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions', *BMC Struct Biol*, 9: 51.
- Pohl, C. 2017. 'The Midbody and its Remnant in Cell Polarization and Asymmetric Cell Division', Results Probl Cell Differ, 61: 165-82.
- Potapova, T. A., J. Zhu, and R. Li. 2013. 'Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos', *Cancer Metastasis Rev*, 32: 377-89.
- Prat, J. 2012. 'New insights into ovarian cancer pathology', *Ann Oncol*, 23 Suppl 10: x111-7. Prosser, S. L., and L. Pelletier. 2017. 'Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 187-201.
- Prota, A. E., M. M. Magiera, M. Kuijpers, K. Bargsten, D. Frey, M. Wieser, R. Jaussi, C. C. Hoogenraad, R. A. Kammerer, C. Janke, and M. O. Steinmetz. 2013. 'Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase', *J Cell Biol*, 200: 259-70.
- Putnam, C. D., M. Hammel, G. L. Hura, and J. A. Tainer. 2007. 'X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution', *Q Rev Biophys*, 40: 191-285
- Qi, J., G. Liu, and F. Wang. 2018. 'High levels of centrosomal protein 55 expression is associated with poor clinical prognosis in patients with cervical cancer', *Oncol Lett*, 15: 9347-52.
- Raybin, D., and M. Flavin. 1977. 'Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin', *Biochemistry*, 16: 2189-94.
- Reid, B. M., J. B. Permuth, and T. A. Sellers. 2017. 'Epidemiology of ovarian cancer: a review', *Cancer Biol Med*, 14: 9-32.
- Rieder, C. L. 1991. 'Mitosis: towards a molecular understanding of chromosome behavior', *Curr Opin Cell Biol*, 3: 59-66.
- Rieder, C.L. 2005. 'Kinetochore fiber formation in animal somatic cells: dueling mechanisms come to a draw', *Chromosoma*, 114: 310-8.
- Rieder, C. L., and E. D. Salmon. 1998. 'The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis', *Trends Cell Biol*, 8: 310-8.
- Roostalu, J., and T. Surrey. 2017. 'Microtubule nucleation: beyond the template', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 702-10.
- Roschke, A. V., and E. Rozenblum. 2013. 'Multi-layered cancer chromosomal instability phenotype', *Front Oncol*, 3: 302.
- Sakai, H., and K. Ohta. 1991. 'Centrosome signalling at mitosis', Cell Signal, 3: 267-72.
- Sakai, M., T. Shimokawa, T. Kobayashi, S. Matsushima, Y. Yamada, Y. Nakamura, and Y. Furukawa. 2006. 'Elevated expression of C10orf3 (chromosome 10 open reading frame 3) is involved in the growth of human colon tumor', *Oncogene*, 25: 480-6.

- Sansregret, L., and C. Swanton. 2017. 'The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Sansregret, L., B. Vanhaesebroeck, and C. Swanton. 2018. 'Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer', *Nat Rev Clin Oncol*, 15: 139-50.
- Santaguida, S., and A. Musacchio. 2009. 'The life and miracles of kinetochores', *Embo j*, 28: 2511-31.
- Schafer, K. A. 1998. 'The cell cycle: a review', Vet Pathol, 35: 461-78.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods*, 9: 676-82.
- Scholey, J. M., I. Brust-Mascher, and A. Mogilner. 2003. 'Cell division', *Nature*, 422: 746-52.
- Schvartzman, J. M., R. Sotillo, and R. Benezra. 2010. 'Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease', *Nat Rev Cancer*, 10: 102-15.
- Sharp, D. J., G. C. Rogers, and J. M. Scholey. 2000. 'Microtubule motors in mitosis', *Nature*, 407: 41-7.
- Sherr, C. J. 1996. 'Cancer cell cycles', Science, 274: 1672-7.
- Shi, Q., and R. W. King. 2005. 'Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines', *Nature*, 437: 1038-42.
- Si, M., J. Zhang, J. Cao, Z. Xie, S. Shu, Y. Zhu, and J. Lang. 2019. 'Integrated Analysis To Identify Molecular Biomarkers Of High-Grade Serous Ovarian Cancer', *Onco Targets Ther*, 12: 10057-75.
- Singh, P. K., A. K. Srivastava, S. K. Rath, D. Dalela, M. M. Goel, and M. L. Bhatt. 2015. 'Expression and clinical significance of Centrosomal protein 55 (CEP55) in human urinary bladder transitional cell carcinoma', *Immunobiology*, 220: 103-8.
- Sinha, D., P. H. G. Duijf, and K. K. Khanna. 2019. 'Mitotic slippage: an old tale with a new twist', *Cell Cycle*, 18: 7-15.
- Sinha, D., P. Nag, D. Nanayakkara, P. H. G. Duijf, A. Burgess, P. Raninga, V. A. J. Smits, A. L. Bain, G. Subramanian, M. Wall, J. W. Finnie, M. Kalimutho, and K. K. Khanna. 2020. 'Cep55 overexpression promotes genomic instability and tumorigenesis in mice', *Commun Biol*, 3: 593.
- Sluder, G., and A. Khodjakov. 2010. 'Centriole duplication: analogue control in a digital age', *Cell Biol Int*, 34: 1239-45.
- Smogorzewska, A., and T. de Lange. 2004. 'Regulation of telomerase by telomeric proteins', *Annu Rev Biochem*, 73: 177-208.
- Stewart, C., C. Ralyea, and S. Lockwood. 2019. 'Ovarian Cancer: An Integrated Review', Semin Oncol Nurs, 35: 151-56.
- Sulimenko, V., Z. Hájková, A. Klebanovych, and P. Dráber. 2017. 'Regulation of microtubule nucleation mediated by y-tubulin complexes', *Protoplasma*, 254: 1187-99.
- Tanaka, K., and T. Hirota. 2016. 'Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1866: 64-75.
- Tanenbaum, M. E., and R. H. Medema. 2010. 'Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly', *Dev Cell*, 19: 797-806.
- Tang, Z., J. Yang, X. Wang, M. Zeng, J. Wang, A. Wang, M. Zhao, L. Guo, C. Liu, D. Li, and J. Chen. 2018. 'Active DNA end processing in micronuclei of ovarian cancer cells', BMC Cancer, 18: 426.
- Tao, J., X. Zhi, Y. Tian, Z. Li, Y. Zhu, W. Wang, K. Xie, J. Tang, X. Zhang, L. Wang, and Z. Xu. 2014. 'CEP55 contributes to human gastric carcinoma by regulating cell proliferation', *Tumour Biol*, 35: 4389-99.
- Taylor, W. R., and G. R. Stark. 2001. 'Regulation of the G2/M transition by p53', *Oncogene*, 20: 1803-15.
- Tedeschi, A., J. Almagro, M. J. Renshaw, H. A. Messal, A. Behrens, and M. Petronczki. 2020. 'Cep55 promotes cytokinesis of neural progenitors but is dispensable for most mammalian cell divisions', *Nat Commun*, 11: 1746.
- Thompson, S. L., S. F. Bakhoum, and D. A. Compton. 2010. 'Mechanisms of chromosomal instability', *Curr Biol*, 20: R285-95.

- Thompson, S. L., and D. A. Compton. 2011. 'Chromosomes and cancer cells', *Chromosome Res*, 19: 433-44.
- Tolić, I. M. 2018. 'Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles', *Eur Biophys J*, 47: 191-203.
- Truebestein, L., and T. A. Leonard. 2016. 'Coiled-coils: The long and short of it', *Bioessays*, 38: 903-16.
- Turajlic, S., and C. Swanton. 2016. 'Metastasis as an evolutionary process', *Science*, 352:169-75.
- Turner, K. J., V. Vasu, and D. K. Griffin. 2019. 'Telomere Biology and Human Phenotype', *Cells*. 8.
- Uhlmann, F. 2001. 'Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis', *Curr Opin Cell Biol*, 13: 754-61.
- van der Vaart, B., A. Akhmanova, and A. Straube. 2009. 'Regulation of microtubule dynamic instability', *Biochem Soc Trans*, 37: 1007-13.
- van Dijk, J., K. Rogowski, J. Miro, B. Lacroix, B. Eddé, and C. Janke. 2007. 'A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation', *Mol Cell*, 26: 437-48.
- Vang, R., M. Shih Ie, and R. J. Kurman. 2009. 'Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems', *Adv Anat Pathol*, 16: 267-82.
- Vargas-Rondón, N., V. E. Villegas, and M. Rondón-Lagos. 2017. 'The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses', *Cancers (Basel)*, 10.
- Vargas, A. N. 2014. 'Natural history of ovarian cancer', Ecancermedicalscience, 8: 465.
- Venkitaraman, A. R. 2014. 'Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2', *Science*, 343: 1470-5.
- Wade, R. H. 2009. 'On and around microtubules: an overview', Mol Biotechnol, 43: 177-91.
- Walczak, C. E., S. Cai, and A. Khodjakov. 2010. 'Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 91-102.
- Walczak, C. E., and R. Heald. 2008. 'Mechanisms of mitotic spindle assembly and function', Int Rev Cytol, 265: 111-58.
- Wang, G., M. Liu, H. Wang, S. Yu, Z. Jiang, J. Sun, K. Han, J. Shen, M. Zhu, Z. Lin, C. Jiang, and M. Guo. 2016. 'Centrosomal Protein of 55 Regulates Glucose Metabolism, Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells via the Akt/mTOR Signaling Pathway', *J Cancer*, 7: 1431-40.
- Wang, W. J., L. Y. Li, and J. W. Cui. 2020. 'Chromosome structural variation in tumorigenesis: mechanisms of formation and carcinogenesis', *Epigenetics Chromatin*, 13: 49.
- Waseem, A., M. Ali, E. W. Odell, F. Fortune, and M. T. Teh. 2010. 'Downstream targets of FOXM1: CEP55 and HELLS are cancer progression markers of head and neck squamous cell carcinoma', *Oral Oncol*, 46: 536-42.
- Waters, J. C., T. J. Mitchison, C. L. Rieder, and E. D. Salmon. 1996. 'The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work', *Mol Biol Cell*, 7: 1547-58.
- Weaver, B. A. 2014. 'How Taxol/paclitaxel kills cancer cells', Mol Biol Cell, 25: 2677-81.
- Weisenberg, R. C., W. J. Deery, and P. J. Dickinson. 1976. 'Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules', *Biochemistry*, 15: 4248-54.
- Westermann, S., and K. Weber. 2003. 'Post-translational modifications regulate microtubule function', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 938-47.
- Wilhelm, T., M. Said, and V. Naim. 2020. 'DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons', *Genes (Basel)*, 11.
- Windhorst, S., R. Fliegert, C. Blechner, K. Möllmann, Z. Hosseini, T. Günther, M. Eiben, L. Chang, H. Y. Lin, W. Fanick, U. Schumacher, B. Brandt, and G. W. Mayr. 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: 5541-54.

- Wloga, D., E. Joachimiak, P. Louka, and J. Gaertig. 2017. 'Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Yachdav, G., E. Kloppmann, L. Kajan, M. Hecht, T. Goldberg, T. Hamp, P. Hönigschmid, A. Schafferhans, M. Roos, M. Bernhofer, L. Richter, H. Ashkenazy, M. Punta, A. Schlessinger, Y. Bromberg, R. Schneider, G. Vriend, C. Sander, N. Ben-Tal, and B. Rost. 2014. 'PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features', *Nucleic Acids Res*, 42: W337-43.
- Yang, L., Y. He, Z. Zhang, and W. Wang. 2020. 'Upregulation of CEP55 Predicts Dismal Prognosis in Patients with Liver Cancer', *Biomed Res Int*, 2020: 4139320.
- Zhang, W., C. Niu, W. He, T. Hou, X. Sun, L. Xu, and Y. Zhang. 2016. 'Upregulation of centrosomal protein 55 is associated with unfavorable prognosis and tumor invasion in epithelial ovarian carcinoma', *Tumour Biol*, 37: 6239-54.
- Zhang, Y., G. Luo, M. Li, P. Guo, Y. Xiao, H. Ji, and Y. Hao. 2019. 'Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: age, period and birth cohort analysis', *BMC Cancer*, 19: 984.
- Zhao, C., N. Ban, S. Dai, X. Zhang, L. Zhang, P. Xu, W. Chen, J. Sun, Z. Bao, H. Chang, D. Wang, and J. Ren. 2016. 'The role of Alix in the proliferation of human glioma cells', *Hum Pathol*, 52: 110-8.
- Zhao, W. M., A. Seki, and G. Fang. 2006. 'Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis', *Mol Biol Cell*, 17: 3881-96.
- Zheng, H., K. B. Handing, M. D. Zimmerman, I. G. Shabalin, S. C. Almo, and W. Minor. 2015. 'X-ray crystallography over the past decade for novel drug discovery - where are we heading next?', *Expert Opin Drug Discov*, 10: 975-89.
- Zimmermann, L., A. Stephens, S. Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. N. Lupas, and V. Alva. 2018. 'A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core', *J Mol Biol*, 430: 2237-43.
- Zvereva, M. I., D. M. Shcherbakova, and O. A. Dontsova. 2010. 'Telomerase: structure, functions, and activity regulation', *Biochemistry (Mosc)*, 75: 1563-83.

10. Anhang

10.1 Vektorkarten

Die dargestellten Vektorkarten wurden mit SnapGene erstellt.

10.1.1 LeGo-iB₂ Neo+ Vektoren

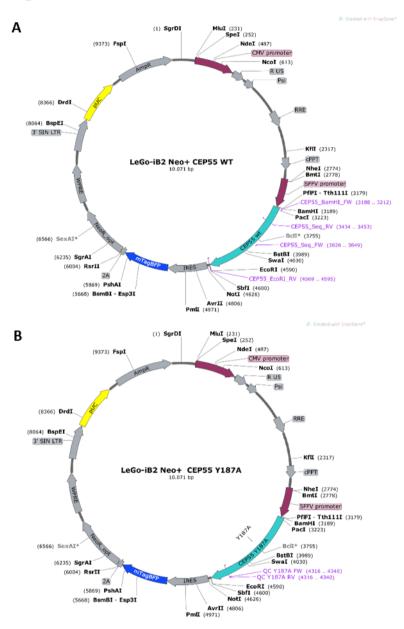


Abb. 37: Vektorkarten der LeGo-iB₂ Neo+ CEP55 Plasmide. (A) Darstellung des LeGo-iB₂ Neo+ CEP55^{WT}. CEP55 wurde über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in das Plasmid eingefügt. (B) Darstellung des LeGo-iB₂ Neo+ CEP55^{Y187A}. Das Y an Stelle 187 wurde mittels *Quickchange Mutagenese* durch ein A ersetzt. verwendete Primer sind in lila dargestellt.

10.1.2 psf421 10xHis-GFP Vektoren

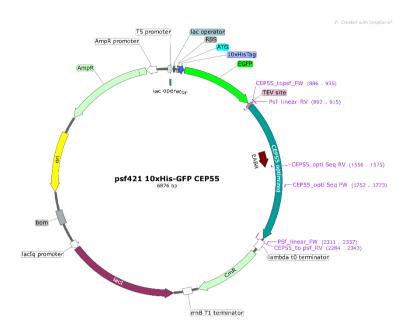


Abb. 38: Vektorkarte des psf421 10xHis-GFP CEP55 Plasmids. Die (für die Expression in *E. coli*) Codon-optimierte CEP55 cDNA wurde durch eine SLIC Klonierung in das Plasmid eingefügt. Die verwendeten Primer sind in lila dargestellt.

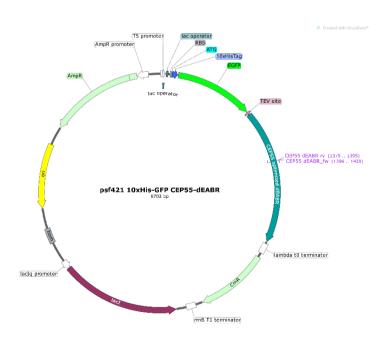


Abb. 39: Vektorkarte des psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔEABR Plasmids. Die EABR Domäne wurde durch eine KLD Klonierung deletiert. Die verwendeten Primer sind in lila dargestellt.

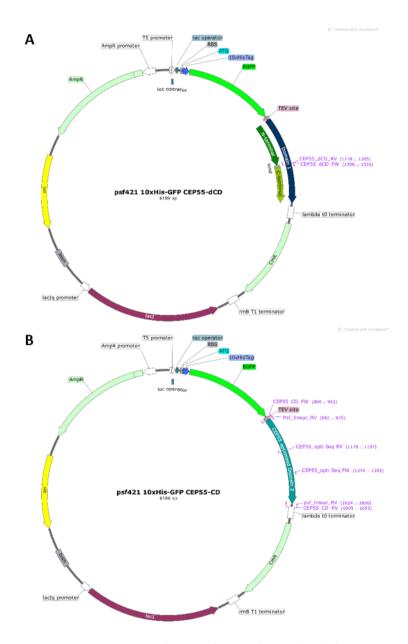


Abb. 40: Vektorkarten von psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔCD und CEP55-CD. (A) Darstellung von psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔCD, hergestellt durch KLD Klonierung. (B) Darstellung von psf421 10xHis-GFP CEP55-CD, hergestellt durch SLIC Klonierung. Die verwendeten Primer sind in lila dargestellt.

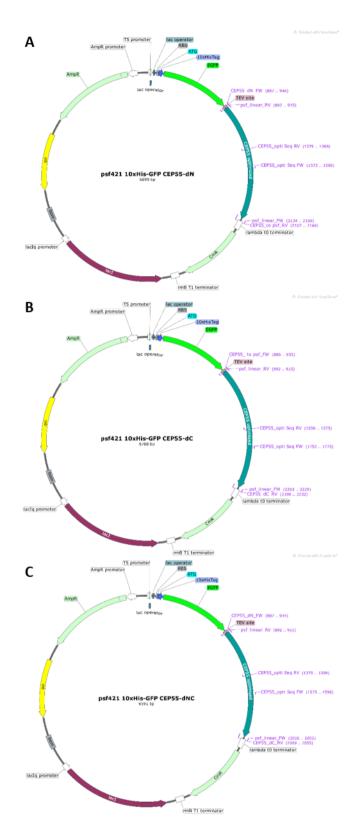


Abb. 41: Vektorkarten von psf421 10xHis-GFP Konstrukten mit CEP55-ΔN, CEP55-ΔC und CEP55-ΔNC. (A) Darstellung des psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔN Plasmids. (B) Darstellung von psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔNC. (C) Darstellung von psf421 10xHis-GFP CEP55-ΔNC. Alle Plasmide wurden Hergestellt durch SLIC Klonierung. Die verwendeten Primer sind in lila dargestellt.

10.2 Codon-optimierte Sequenz von CEP55

Nachfolgend ist die für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte AS Sequenz von CEP55 dargestellt:

ATGTCGTCACGCAGCACTAAAGATTTGATTAAATCTAAATGGGGCTCTAAACCATCTAACTC TAAATCTGAGACCACTCTAGAAAAACTGAAAGGTGAAATAGCACACCTGAAAACTAGTGTTG ATGAAATCACTAGTGGGAAGGGTAAATTGACTGATAAAGAGAGACATAGGCTACTTGAGAAG ATTAGAGTCCTAGAAGCAGAAAAGGAAAAAAACGCATACCAGCTGACGGAGAAAGATAAAGA GATTCAACGCCTAAGAGATCAACTGAAAGCCCGCTATAGTACCACGGCGCTGCTTGAGCAAC TTGAAGAAACCACCCGTGAGGGCGAGCGCCGTGAACAGGTGCTGAAGGCCCTTTCCGAGGAA AAAGATGTTTTAAAACAACAACTTAGTGCCGCCACTAGTAGGATAGCTGAACTTGAAAGTAA GACTAACACCTTGAGACTTTCGCAGACGGTAGCGCCTAACTGCTTTAATAGTAGCATAAATA ACATTCATGAAATGGAAATCCAATTGAAAGACGCGTTAGAAAAAAATCAACAGTGGTTAGTT AAAGACTGAAACGGCAGCTCATAGCTTACCGCAGCAGACCAAGAAACCGGAAAGTGAGGGTT ATCTGCAAGAAGAAAACAGAAATGTTATAACGACCTTCTGGCTTCAGCAAAAAAGGACTTG GAAGTTGAACGGCAAACCATTACCCAGCTTTCATTTGAGCTCAGCGAATTTCGTCGCAAATA ATGTTCAGCACCTGGAAGATGACCGCCATAAAACGGAAAAAATACAAAAACTGCGCGAAGAA AATGATATTGCACGCGGCAAACTGGAAGAGGGAGAAAAAACGCAGCGAGGAACTTCTGTCCCA GGTACAGTTTCTGTACACCTCGCTGCTGAAGCAGCAGGAAGAACAGACACGAGTGGCGTTAT TAGAGCAGCAAATGCAGGCGTGTACACTTGATTTCGAAAATGAAAAGCTGGATCGTCAGCAT GTACAACATCAGCTGCATGTCATACTAAAAGAGCTTCGTAAAGCGCGTAATCAGATCACTCA GTTAGAGAGCTTGAAGCAACTGCACGAGTTTGCGATCACCGAACCGCTGGTCACCTTCCAGG GCGAAACGGAAAATCGGGAGAAAGTGGCAGCCAGCCCAAAATCTCCCACCGCAGCTCTGAAC GAAAGCCTGGTTGAATGTCCGAAATGCAACATTCAGTATCCGGCGACTGAACATCGTGATCT GTTAGTCCACGTAGAATACTGCTCTAAATAA

10.3 Ergänzende Ergebnisse

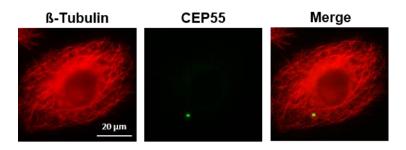


Abb. 42: Lokalisation von CEP55 am Centrosom. Exemplarisches Beispiel der CEP55 Lokalisation am Centrosom scr Zellen in der Interphase. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen β-Tubulin (rot) und CEP55 (grün) gefärbt. Maßstabsbalken 20 μm

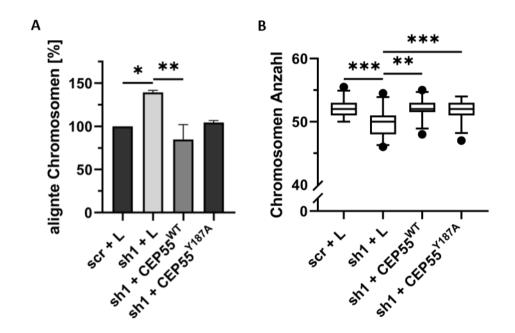


Abb. 43: Einfluss von CEP55 auf das Chromosomen-Alignment und die Chromosomenanzahl in OVCAR-8 Zellen. (A) Das Alignment der Chromosomen von Metaphase Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Anzahl der Zellen mit alignten und nicht alignten Chromosomen wurde bestimmt. Der Anteil der alignten Chromosomen wurde auf scr + L Zellen normalisiert. Mit jeweils 40-60 Zellen wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. (B) Anzahl der Chromosomen pro Kern. Es wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils mindestens 100 Zellen ausgewertet. Die Signifikanz wurde durch den Zwei-Stichproben F-Test bestimmt *p<0.05, **p<0.01, ***rp<0.001.

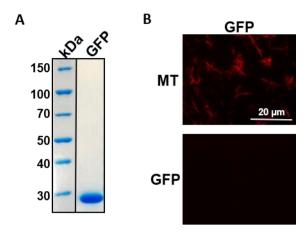


Abb. 44: GFP zeigt keine Bindung an MTs. (A) Gereinigtes GFP Protein (28,8 kDa). (B) Repräsentative Aufnahme der Bindung von GFP (grün) an Rhodamin-markierte MTs (rot). Das Protein wurde mit Taxol-stabilisierten MTs inkubiert, auf ein *Chamber-Slide* aufgetragen, eingedeckt und mikroskopiert. Maßstabsbalken 20 µm.

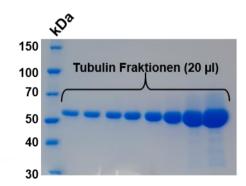


Abb. 45: Reinigung von Tubulin aus Schweinehirnen. Es wurde natives Tubulin aus frischen Schweinehimen isoliert. Aufgetragen auf ein 10% SDS-Gel wurden jeweils 20 µl der unterschiedlichen Fraktionen, gefärbt wurde mit Roti®-Blue Quick.

Nr ^{\$}	Hit [‡]	Name	Probability					
_ 1	3E1R_A	Centrosomal protein of 55 kDa; CEP55, ALIX, cytokinesis, ESCRT, Alternative splicing, Cell cycle, Cell division, Coiled	99.74					
_ 2	7DL2_C	Hamartin; TSC complex, Regulator of cell growth, GTPase-activating protein, Elongated arch-shaped fold, GENE REGULATION;	97.36	0	16	5H07_C	TNFAIP3-interacting protein 2; coiled-coil, complex, signal transduction, SIGNALING PROTEIN; 2.586A {Homo sapiens}	93.8
_ 3	4BWN_B	NF-KAPPA-B ESSENTIAL MODULATOR; SIGNALING PROTEIN, NEMO - IKK GAMMA, NFKB PATHWAY, UBL CONJUGATTION, TRANSCRIPTION REGUL	97.07		17	6N6R_B	TNFAIP3-interacting protein 1; Ubiquitin- binding domain, A20-binding protein, SIGNALING PROTEIN, Ubiquitin; 1.95A (Homo	93.7
_ 4	5Y06_A	msmeg_4306; coiled coil helix, zinc ribbon, hypothetical, zinc-SAD, UNKNOWN FUNCTION; 2.606A {Mycobacterium smegmatis (s	96.77	0	18	6SO3_B	Myosin 2 heavy chain striated muscle; myosin, thick filament, insect flight muscle, MOTOR PROTEIN; 6.2A {Lethocerus indi	93.6
5	40WF_A	NF-kappa-B essential modulator; LUBAC, NF-kappa B, NEMO, HOIP, TRANSCRIPTION- PROTEIN BINDING complex; 2.0A {Mus musculus	96.58		19	6Z47_A	Myosin heavy chain 11; myosin, motor, inhibited state, shutdown state, smooth muscle, CONTRACTILE PROTEIN; HET: PO4, ADP	93.4
6	1I84_V	SMOOTH MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN; muscle protein, smooth muscle, myosin subfragment 2, heavy meromyosin, essential light	96.13	0	20	6Z47_A	Myosin heavy chain 11; myosin, motor, inhibited state, shutdown state, smooth muscle, CONTRACTILE PROTEIN; HET: PO4, ADP	92.6
7	5B83_F	Optineurin; UBIQUITIN, COILED-COIL, CELLULAR, SIGNALING, NFKB PATHWAY, SIGNALING PROTEIN; 2.694A {Homo sapiens}	96.1		21	6SO3_B	Myosin 2 heavy chain striated muscle; myosin, thick filament, insect flight muscle, MOTOR PROTEIN; 6.2A {Lethocerus indi	92.4
_ 8	3NA7_A	HP0958; flagellar biogenesis, flagellum export, C4 Zn-ribbon, Coiled-coil, post- transcriptional, Gene Regulation, Chaper	96.03	0	22	1I84_V	SMOOTH MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN; muscle protein, smooth muscle, myosin subfragment 2, heavy meromyosin, essential light	92.2
9	6Z47_A	Myosin heavy chain 11; myosin, motor, inhibited state, shutdown state, smooth muscle, CONTRACTILE PROTEIN; HET: PO4, ADP	96		23	6SO3_B	Myosin 2 heavy chain striated muscle; myosin, thick filament, insect flight muscle, MOTOR PROTEIN; 6.2A {Lethocerus indi	91.4
10	7KZO_X	Outer dynein arm-docking complex subunit 1; dynein, microtubule, cilia, MOTOR PROTEIN; HET: GTP, GDP; 3.3A	95.66		24	6X0V_G	Centrosome protein Cep215; gamma-TuRC, MZT2, GCP, CDK5Rap2, STRUCTURAL PROTEIN;{Homo sapiens}	91.3
		{Chlamydomona			25	6SO3_B	Myosin 2 heavy chain striated muscle; myosin, thick filament, insect flight muscle, MOTOR PROTEIN; 6.2A {Lethocerus indi	91.3
11	1I84_V	SMOOTH MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN; muscle protein, smooth muscle, myosin subfragment 2, heavy meromyosin, essential light	95.4				III. STORY NOTEIN, SEA [LEGISCEIUS IIIUI	
12	4ILO_B	CT398; hypothetical protein, DNA/RNA binding, coiled-coil, Zn ribbon domain, structural proteomics, UNKNOWN FUNCTION; 2.	95.25					
13	3FX0_B	NF-kappa-B essential modulator; Coiled-coil, Coiled coil, Cytoplasm, Disease mutation, Ectodermal dysplasia, Host-virus	94.63					
14	6Z47_A	Myosin heavy chain 11; myosin, motor, inhibited state, shutdown state, smooth muscle, CONTRACTILE PROTEIN; HET: PO4, ADP	93.95					
15	6YVD_C	Structural maintenance of chromosomes protein 2; Condensin chromosome condensation SMC protein, CELL CYCLE; 7.6A {Saccha	93.95					

Abb. 46: Homologie Analyse CEP55. Es wurde eine Homologie-Analyse mit dem MPI Bioinformatics Toolkit (HHpred) durchgeführt. Dargestellt sind aufgenommene Screenshots der Ergebnisse der Analyse von 1-25.

10.4 Verwendete Gefahrstoffe

Alle durch Zellkultur oder Bakterien kontaminierte Materialen und Flüssigkeiten wurden autoklaviert. Flüssigabfälle aus der Zellkultur wurden vor dem Autoklavieren mit Natriumhypchlorit versetzt.

Chemikalie	Gefahrensymbol	H- und P-Sätze
2-Propanol	(b) (!)	H: 225, 319, 336 P: 210, 280, 305+351+338, 337+313
Acrylamid/Bis-Lösung, 30%	!	H: 302, 315, 317, 319, 340, 350, 361f, 372 P: 201, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 308+313
Ammoniumpersulfat (APS)		H: 272, 302, 315, 317, 319, 334, 335 P: 261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313
Ampicillin	&	H: 317, 334 P: 261, 280, 302+352, 342+311
Dithiotreitol (DTT)	()	H : 302, 319, 315, 335 P : 280, 302+352, 305+351+338, 308+311
Essigsäure	*	H : 226, 314 P : 210, 280, 301+330+331, 303+361+353
Ethanol	(1)	H : 225, 319 P : 210, 233, 305+351+338
Ethidiumbromid	\$	H: 302, 330, 341 P: 201, 260, 280, 304+340, 308+311
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(1)	H: 332, 373 P: 260, 314
Geneticindisulfat (G418)	�	H : 317, 334 P : 260, 302+352, 342+311
Giemsas Azur-Eosin- Methylenblaulösung		H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
Imidazol		H: 302, 314, 360D P: 202, 270, 280, 305+351+338, 310
Kohlenstoffdioxid	\Leftrightarrow	H: 280 P: 403

Methanol, reinst		H: 225, 301+311+331, 370 P: 210, 270, 280, 303+361+353, 304+340, 308+311
N, N, N', N'-Tetramethylethy- lendiamin (TEMED)		H: 225, 302+332, 314 P: 210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+361+338, 310
Natriumazid		H: 300+310+330, 373, 410 P: 270, 273, 280, 302+352, 304+340, 310
Natriumhydroxid (NaOH)		H: 290, 314 P: 233, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Natriumhypochlorit		H : 290, 314, 410 P : 273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Nickel(II)-Sulfat		H: 302+332, 315,317, 334, 341, 350i, 360D, 372, 410 P: 260, 280, 302+352, 342+311
Paraformaldehyd (PFA)		H: 228, 302+332, 315-318, 335, 341, 350 P: 202, 210, 270, 280, 305+351+338, 308+313
Penicillin/ Streptomycin	!	H: 315, 317, 334, 335 P: 280, 261, 264, 284, 271, 302+352, 304+340, 333+313, 342+311, 312
Phalloidin iFluor 488		H: 300+310+330 P: 280, 302+352, 304+340, 308+310
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		H: 301, 314 P: 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Puromycin dihydrochlorid	! >	H: 302
Salzsäure		H : 290, 314, 335 P : 280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
SERVA DNA Stain G	!	H: 315, 319 P: 280, 264, 362+364, 305+351+338, 337+313, 302+352
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)		H: 302, 315, 318, 412 P: 273, 280, 302+352, 305+351+338, 312
Strickstoff, flüssig	\Diamond	H: 281 P: 282, 336+315, 403
Triton-X-100		H: 302, 318, 411 P: 270, 273, 280, 305+351+338, 310

	H : 301+331, 310, 315, 317, 318,
	373.410
V V V	,
	P : 273, 280, 302+352, 304+340,
	305+351+338, 310

H-Satz	Gefahrenhinweise
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Giftig bei Verschlucken.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300+H310+H330 H301	Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen Giftig bei Verschlucken.
H301+H331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
H301+H311+H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H302+H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschä-
	den.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembe-
	schwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (bei Exposition).
H350	Kann Krebs erzeugen (bei Exposition).
H350i H360D	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370	Schädigt die Organe (Auge).
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen (Atmungssystem) bei längerer oder wie-
11070	derholter Exposition (bei Einatmen).
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
· · -	

H411 H412	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P-Satz	Sicherheitshinweise
P201 P202	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie an-
	deren Zünd-quellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Augenschutz tragen.
P282	Schutzhandschuhe mit Kälteisolierung und zusätzlich Gesichtsschild
B004	oder Augenschutz tragen.
P284	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P301+P310	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/
D004 - D040	Arzt anrufen.
P301+P312	BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P301+P330+P331	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbei-
F301+F330+F331	führen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303+P361+P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontami-
1 00011 00111 000	nierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwa-
	schen/duschen.
P304+P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für un-
	gehinderte Atmung sorgen.
P304+P340+P311	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für un-
	gehinderte Atmung sorgen. GIFTINFORMATIONSZENTRUM/ Arzt
	anrufen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit
	Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglich-
	keit entfernen. Weiterspülen.
P308+P310	BEI Exposition oder falls betroffen: Sofort
	GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P308+P311	BEI Exposition oder falls betroffen:
	GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/ anrufen
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche
	Hilfe hinzu-ziehen.
P310	Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P332+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche
	Hilfe hinzuziehen.
P336+P315	Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Be-
	reich nicht reiben. Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hin-
D007 D040	zuziehen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche
D0.40 D0.44	Hilfe hinzuziehen.
P342+P311	Bei Symptomen der Atemwege:
D262+D264	GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
1 700	An emem gut beiurteten Ort aufbewanten.

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Sabine Windhorst bedanken für dieses tolle Projekt und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Danke für die hervorragende Betreuung und Deine Unterstützung und Motivation wenn es mal nicht wie geplant lief.

Prof. Dr. Hartmut Schlüter möchte ich für die Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation danken. Und mein Dank geht auch an Prof. Dr. Ralf Holl und Prof. Dr. Thorsten Schinke für den Beisitz bei meiner Disputation.

Auch möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Itzen für die Bereitstellung des psf421 10xHis-GFP Vektors bedanken. Außerdem bedanke ich mich für die Unterstützung, wenn es um die Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen ging. Vielen Dank an Prof. Dr. Kristoffer Riecken für die Bereitstellung des LeGo-iB₂ Neo+ Vektors. Für die Zelllinien HEK 293T, SKOV-3 und OVCAR-8 bedanke ich mich bei Prof. Dr. Manfred Jücker und PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer.

Ein weiteres Dankeschön geht an Virgilio und Bernd aus der UMIF für die Einarbeitung in die Mikroskope und die Hilfe bei jeglichen Problemen bei der Mikroskopie. Durch euch sind einige der schönen Abbildungen möglich geworden.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der AG *Cytoskeletal Dynamic*s bedanken, mit denen ich im Laufe meiner Doktorarbeit zusammenarbeiten durfte. Besonders erwähnen möchte ich Christine. Vielen Dank für Deine großartige Unterstützung bei sämtlichen Fragen im Laboralltag. Darüber hinaus danke ich Saskia, Selina, Johanna, Shumin, Themis, Jessica, Paula und Willi für die stetige gegenseitige Unterstützung und Ermutigungen, sowie die vielen Gespräche. Paula und Themis möchte ich hierbei noch einmal im Speziellen danken. Paula vielen Dank für Deine Unterstützung durch die Auswertung der Live-Cell-Imaging Daten mit der IMARIS Software. Vielen Dank auch für die vielen motivierenden Gespräche, Diskussionen und Ideen, ob im Labor oder außerhalb. Themis danke für Deine Unterstützung bei den Strukturanalysen und vor allem für die Erstellung der wunderbaren Grafiken. Danke außerdem für die Gesellschaft in der Spätschicht. Es tat immer gut jemanden zu haben, der einem mit Rat und Tat zur Seite stand. Und Danke Euch beiden für die Hilfe beim Korrekturlesen.

Der Sanderstiftung möchte ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke für Eure stetige Unterstützung bei allen meinen Vorhaben. Ihr steht immer hinter mir und ermutigt mich weiterzumachen, wenn es mal einen Tiefpunkt gibt. Ohne Euch wäre nie so weit gekommen. Danke!

12. Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg, den 22.04.21 St. hhy

Stefanie Muhs