

Interaktion von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen: Etablierung der BioID-Methode

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Orczyk, Ralph Rene

aus Stuttgart

Gießen 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,
aus dem Biochemischen Institut.**

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachterin: Frau PD Dr. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 03.11.2022

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pemphigus vulgaris	1
1.2 Desmosomen	3
1.2.1 Struktur der Desmosomen.....	4
1.2.2 Funktion der Desmosomen	7
1.3 Flotilline	8
1.3.1 Aufbau der Flotilline.....	8
1.3.2 Funktion der Flotilline	10
1.3.3 Lokalisation der Flotilline.....	11
1.3.4 Die Rolle in Desmosomen	12
1.4 BioID	14
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	16
2. Material	18
2.1 Materialien und Geräte.....	18
2.2 Chemikalien und Puffer.....	20
2.3 Antikörper	26
2.4 Primer	26
2.5 Plasmide	27
2.6 Bakterienkulturen	28
2.7 Zelllinien und Nährmedien.....	28
3. Methoden.....	30
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	30
3.1.1 Klonierung	30
3.1.2 Bakterielle Transformation	31
3.1.3 Agarosegel-Elektrophorese	32
3.2 Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien.....	32
3.2.2 Transfektion	32
3.2.3 Transduktion	33

3.2.4	Herstellung von Proteinlysaten	34
3.2.5	Immunfluoreszenzfärbung	34
3.2.6	BioID mit Pulldown	35
3.3	Biochemische Methoden	36
3.3.1	SDS PAGE und Western Blot.....	36
3.3.2	Co-Immunpräzipitation	37
3.4	Statistische Auswertung und Bildbearbeitung	37
3.4.1	Statistik.....	37
3.4.2	Elektronische Manipulation der Abbildungen	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Einfluss der Calciumkonzentration auf die Expression von Flot2 und auf seine Interaktion mit Flot1 in hTert Keratinozyten	39
4.2	Klonierung und Expression von Flot2-Fusionsproteinen mit BirA*	42
4.3	Etablierung von Transfektions- bzw. Transduktionsbedingungen.....	44
4.3.1	hTert-Zelllinie	45
4.3.2	Flot2-Knockout HaCaT-Zelllinie.....	46
4.3.3	MDA-MB-231-Zelllinie.....	48
4.3.4	MCF7-Zelllinie	50
4.4	Nachweis der Interaktion von Flot2-Fusionsproteinen mit endogenem Flot1	51
4.5	Etablierung der BioID zur Darstellung des Interaktoms von Flot2 in Flot2-Knockout-HEK	53
5.	Diskussion	56
5.1	Flot2-Mutanten in verschiedenen Zellmodellen.....	58
5.2	Lokalisation von Flot2 in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration	60
5.3	Interaktion von Flot2-Mutanten mit endogenem Flot1	61
5.4	Etablierung einer Methode zur Interaktomdarstellung von Flot2	62
5.5	Ausblick.....	63
6.	Zusammenfassung	65
7.	Summary	67
8.	Abkürzungsverzeichnis	68
9.	Abbildungsverzeichnis	71

10. Tabellenverzeichnis.....	73
11. Literaturverzeichnis.....	74
12. Ehrenwörtliche Erklärung	90
13. Danksagung.....	91

1. Einleitung

1.1 Pemphigus vulgaris

Bei Pemphigus vulgaris handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung (Stanley & Amagai, 2006). Diese gehört zu den blasenbildenden Erkrankungen, die sich sowohl auf der äußeren Haut als auch auf den Schleimhäuten manifestieren können (Bystryn & Rudolph, 2005). Man unterscheidet prinzipiell zwei Hauptformen: Pemphigus foliaceus und Pemphigus vulgaris (Joly & Litrowski, 2011). Daneben existieren Sonderformen, wie zum Beispiel der paraneoplastische Pemphigus (Kim & Kim, 2019).

Beim Pemphigus foliaceus richten sich die Autoantikörper hauptsächlich gegen das Desmoglein 1 (Dsg1), eines der Strukturproteine der Desmosomen, die eher in den oberen Hautschichten zu finden sind (Hashimoto et al., 1990). Bei einem solchen Autoantikörpernachweis findet die Blasenbildung rein epidermal statt und nicht mukosal, damit ergibt sich ein bedeutender Unterschied zwischen Pemphigus foliaceus und vulgaris (Amagai et al., 1999). Damit findet auch die Auflösung des Epithelverbandes überwiegend in den oberen Hautschichten statt. Dagegen sind die Autoantikörper beim Pemphigus vulgaris sowohl gegen Desmoglein 1 als auch gegen Desmoglein 3 (Dsg3) gerichtet (Amagai et al., 1991; Eyre & Stanley, 1988; Koch et al., 1990; Stanley et al., 1984). Innerhalb dieser Klassifikation wird beim Pemphigus vulgaris noch ein sogenannter mukosa-dominanter Typ definiert. Bei diesem Typus kommt es hauptsächlich zur Bildung von Antikörpern gegen Dsg3, es sind jedoch keine gegen Dsg1 nachweisbar. Da Dsg3 vorwiegend in den basalen Schichten der Haut vorkommt, erfolgt daher auch die Auflösung der Hautschichten ebenda. Beim mukosal-kutanem Typus können beide Autoantikörper, sowohl gegen Dsg1 als auch Dsg3, nachgewiesen werden (Amagai et al., 1999).

Pemphigus vulgaris stellt dabei auch den größeren Anteil der beiden Hauptformen in der Bevölkerung dar (Bastuji-Garin et al., 1995). Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt bei 0,1 bis 0,2 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Hahn-Ristic et al., 2002). Damit gehört Pemphigus vulgaris laut Definition zu den seltenen Erkrankungen in Europa. Eine genetische Prädisposition kann nicht ausgeschlossen werden, da festgestellt wurde, dass die Inzidenzrate innerhalb der jüdischen Bevölkerung um das 3,5-fache höher war als die Inzidenzrate der arabischen Bevölkerung Israels (Kridin, 2018).

Der Pathomechanismus ist in der Autoimmunreaktion durch die jeweiligen Antikörper zu erklären. Sie gehören hauptsächlich zum Typ IgG4, auch PV-IgG genannt, die hauptsächlich an extrazelluläre Komponenten von desmosomalen Cadherinen binden (Amagai et al., 1991). Zu dem genauen Mechanismus, welcher zwischen dem IgG und dem Cadherin stattfindet und damit zur Auflösung der Adhäsion von Keratinozyten führt, bestehen zwei Haupthypothesen. In der ersten Hypothese wird angenommen, dass es zu einer sterischen Hinderung der Cadherin-Cadherin-Verknüpfung durch gebundene PV-IgG kommt (Futei et al., 2000). Die zweite Hypothese geht stattdessen davon aus, dass eine Signalkaskade durch die Bindung von PV-IgG an die Cadherine ausgelöst wird (Heupel et al., 2008). In neueren Studien wird davon ausgegangen, dass beide Hypothesen in einer Kombination zum Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris führen (Furue & Kadono, 2017; Saito et al., 2012; Sharma et al., 2007).

Es wurde gezeigt, dass die p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK) und die Sarkoma-assoziierte Kinase (Src) nach der Bindung von PV-IgG phosphoryliert werden und damit Teil der Signalkaskade sind, die PV-IgG initiiert. Dies gilt vor allem für die mukosale Form des Pemphigus vulgaris. Hier konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Src eine protektive Wirkung auf den durch Autoantikörper induzierten Adhäsionsverlust von Keratinozyten hat (Kugelmann et al., 2019). Bei der mukosalkutanen Form spielen darüber hinaus noch die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (Erk) und die durch Calcium aktivierte Proteinkinase C (PKC) eine Rolle (Walter et al., 2017). Die genaue Bedeutung der einzelnen Signalwege für den Pathomechanismus ist Gegenstand aktueller Forschung. Weitere Signalwege, die möglicherweise eine Rolle spielen können, sind zum einen der Acetylcholin-Rezeptor Signalweg (Chernyavsky et al., 2008) oder zum anderen die Antikörper-induzierte Apoptose (Wang et al., 2004). Beide Signalwege können zumindest modulierende Eigenschaften auf die Bindung von PV-IgG an den Cadherinen haben. Im Ergebnis kommt es zur sogenannten Akantholyse, einer Auflösung des Epithelverbands ausgehend vom Stratum spinosum im Falle der Epidermis bzw. vom Stratum intermedium im Falle der Mukosa.

Dabei nimmt man an, dass die Dissoziation der Desmosomen in drei Phasen verläuft. Zunächst bindet der IgG-Antikörper an Dsg3, daraufhin ist eine lineare Anordnung von Dsg3 und anderen desmosomalen Komponenten orthogonal zu den Zellkontakten zu erkennen. Daraufhin kommt es zu einer raschen Internalisierung Dsg3. Der letzte Schritt beinhaltet die vollständige Auflösung des Zell-Zell-Kontaktes. Es konnte jedoch auch

gezeigt werden, dass dieser Vorgang durch eine Überexpression von Dsg3 nach Virustransduktion reversibel ist (Jennings et al., 2011).

Neben diesem 3-Phasen-Modell besteht auch die Wahrscheinlichkeit, dass es nach einer Bindung der IgG-Antikörper an Dsg3 zu einer einfachen Endozytose des Dsg3 (wie im 3-Phasen-Modell) kommt, und dieses direkt lysosomal abgebaut wird (Calkins et al., 2006). Diese Endozytose findet Clathrin- und Dynamin-unabhängig statt, dafür spielen hier aber Cholesterin und damit die sogenannten „lipid rafts“ eine tragende Rolle (Delva et al., 2008). Die Unabhängigkeit von Dynamin in diesem Zusammenhang ist jedoch durchaus in Frage zu stellen, da der Nachweis anhand der Dynamin-2 Mutante „K44A“ erfolgte, und diese heute nicht mehr als ausreichender Beweis für eine Dynamin-Unabhängigkeit eingestuft wird (Mettlen et al., 2018). Darüber hinaus wurde sogar gezeigt, dass eine Inhibierung der Dynamin-abhängigen Endozytose eine erhöhte Menge an Dsg3 an der Plasmamembran induziert und dadurch zu einer Verbesserung der Morphologie von Desmosomen führt (Völlner et al., 2016). Der Vorgang der Endozytose von Dsg3 wird darüber hinaus durch die p38 MAP Kinase reguliert, indem sie die Rab5-Proteine und dessen Effektoren beeinflusst (Jolly et al., 2010). Die Rab5-Proteine spielen eine tragende Rolle in der Endozytose zahlreicher Rezeptoren (Cavalli et al., 2001).

1.2 Desmosomen

Desmosomen, auch Maculae adhaerentes genannt, gehören mit der Zonula adhaerens und der Zonula occludens (auch: *tight junction*) zu den interzellulären Haftkontakten, die einen mechanischen Verbund zwischen Zellen ermöglichen (Lüllmann-Rauch, 2019). Sie selbst haben eine tragende Rolle im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion in Geweben, die hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind (Getsios et al., 2004). Die historische Entdeckung der Desmosomen geht auf den italienischen Pathologen Giulio Bizzozero (1846-1901) zurück. Der Terminus „Desmosom“ wurde allerdings 1920 von Josef Schaffer geprägt und leitet sich dabei aus dem Griechischen von „desmos“ für Band oder Fessel und von „soma“ für Körper ab (Culkins & Setzer, 2007).

Im einschichtigen Plattenepithel sind Desmosomen für die laterale Verknüpfung zuständig, während sie im mehrschichtigen Plattenepithel die Zellen in alle Richtungen untereinander verknüpfen. Abgesehen davon sind sie im Myokard und in Meningealzellen der weichen Hirnhaut zu finden (Lüllmann-Rauch, 2019).

1.2.1 Struktur der Desmosomen

Desmosomen verfügen über eine besondere strukturelle Aufteilung in drei Zonen, die morphologisch voneinander zu differenzieren sind: Die extrazelluläre Kernzone sowie eine innere und eine äußere Verdichtungszone, die sich jeweils intrazellulär befinden. (Kowalczyk et al., 1994).

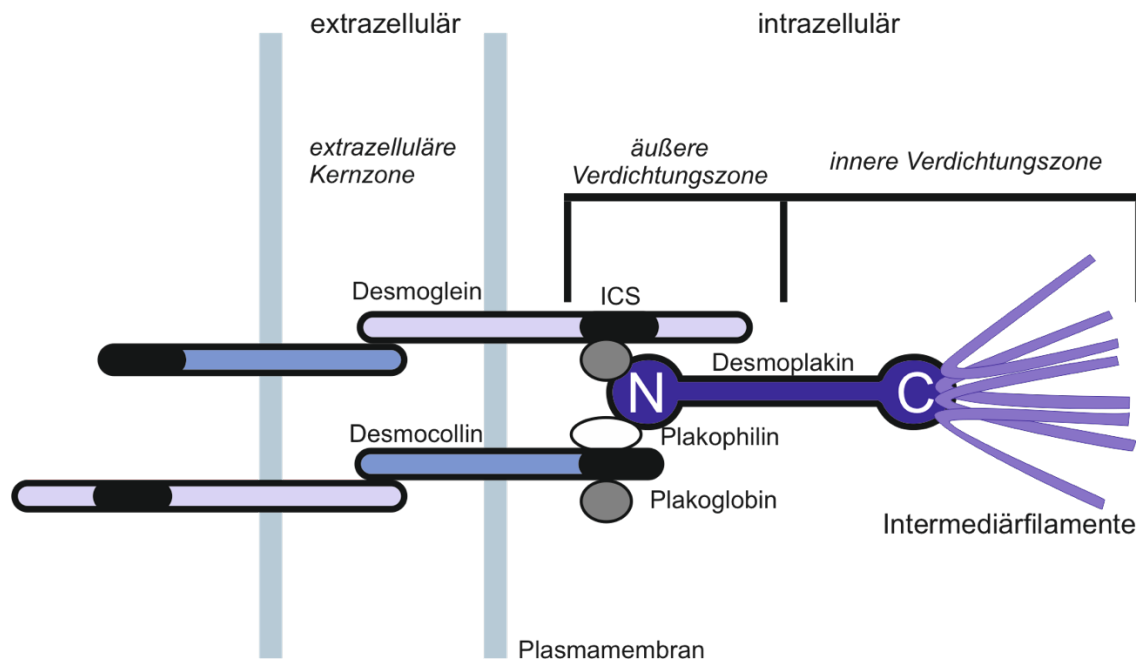


Abbildung 1: Feinstruktur des Desmosoms.

Die desmosomalen Cadherine, Desmogleine und Desmocolline, ragen transmembranär von der extrazellulären Kernzone in die intrazelluläre äußere Verdichtungszone und binden über ihre Intracellulär-Cadherin-like sequence (ICS) Armadillo-Proteine wie Plakophilin und Plakoglobin. Letztere knüpfen wiederum an Plakine, wie Desmoplakin, das eine Verbindung zwischen äußerer und innerer Verdichtungszone vermittelt. Dieses bindet am N-Terminus die Armadillo-Proteine und am C-Terminus die Intermediärfilamente, wodurch eine Verbindung zum Zytoskelett geschaffen wird.

Die transmembranären Glykoproteine bilden dabei die Bestandteile der extrazellulären Kernzone und ragen bis in die äußere Verdichtungszone. Sie interagieren innerhalb der extrazellulären Kernzone mit anderen transmembranären Glykoproteinen. Im Falle des Desmosoms sind jene Glykoproteine die Desmogleine und die Desmocolline. Sie gehören zur Superfamilie der Cadherine, die eine Gruppe von calciumabhängigen Adhäsionsproteinen bilden (Garrod & Chidgey, 2008).

Es existieren drei verschiedene Gene für die Desmocolline (Dsc 1-3), wobei durch alternatives Spleißen jeweils zwei Isoformen (Dsc a und b) entstehen. Desmoglein

hingegen hat vier Iso-formen (Dsg 1-4), die auf vier verschiedenen Genen codiert sind (Collins et al., 1991; Green & Simpson, 2007; Parker et al., 1991). Beide Glykoproteinfamilien verfügen über vier hochkonservierte Cadherin-Domänen, eine variable extrazelluläre Ankerdomäne sowie eine intrazelluläre Ankerdomäne (Trojanovsky et al., 1994). Manipulationen der Expression von desmosomalen Cadherinen wie Dsg1 führen zu schwerwiegenden Störungen der Gewebshomöostase (Merritt et al., 2002; Polivka et al., 2018; Totsuka et al., 2017). Ein klassisches Beispiel für eine solche Störung wurde mit dem Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris bereits erläutert.

Weitergehend haben die Desmocollin a-Isoformen und die Desmogleine eine intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS) gemeinsam (Trojanovsky et al., 1993). Diese ICS ist in der Lage Plakoglobin, einen Vertreter der Armadillo-Protein-Familie, zu binden und spielt damit eine tragende Rolle in der Funktion von Desmosomen (Mathur et al., 1994). Den Desmocollin b-Isoformen hingegen fehlt diese Domäne. Beide Desmocollin-Typen werden gleichermaßen produziert. Die Funktion des Desmocollin b ist weitestgehend ungeklärt (Goonasinghe et al., 2012).

Neben der bereits erwähnten ICS beinhalten die Desmogleine eine intrazelluläre prolin-reiche Verbindungsdomäne (IPL) und darüber hinaus noch sogenannte „repeat unit domains“ (RUDs). Anhand letzterer lassen sich die Isoformen der Desmogleine folgendermaßen bestimmen: Dsg1 beinhaltet fünf repeats, Dsg2 sechs, Dsg3 zwei und Dsg4 drei. Am Ende der Proteinsequenz befindet sich bei allen Desmogleinen noch eine terminale Domäne (DTD) (Garrod & Chidgey, 2008; Holthöfer et al., 2007).

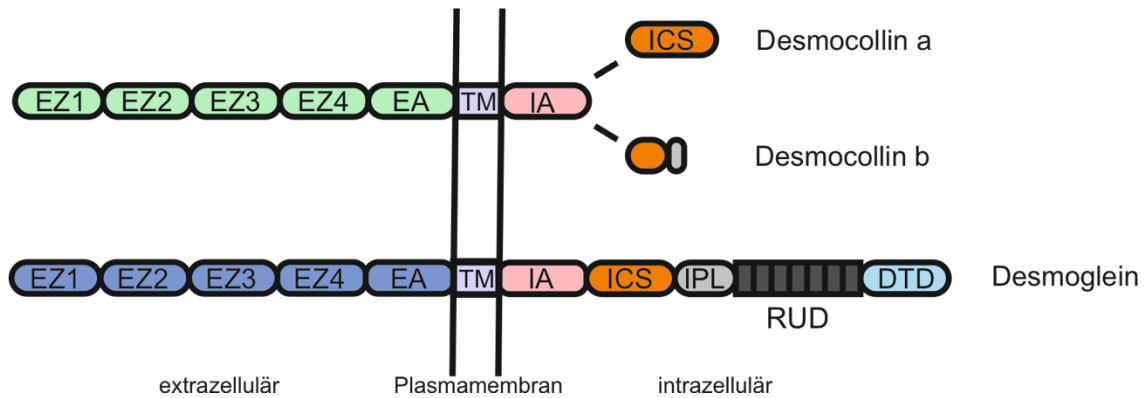


Abbildung 2: Sequenzstruktur der Desmocolline und der Desmogleine.

Desmocolline und Desmogleine teilen sich die Gemeinsamkeit der vier extrazellulären Domänen (EZ1 bis EZ4), sowie einer extrazellulären Ankerdomäne (EA), einer transmembranären Domäne (TM) und einer intrazellulären Ankerdomäne (IA). Während Desmocollin a-Isoformen und Desmogleine eine intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS) beinhalten, verfügen Desmocollin b-Isoformen nicht darüber. Desmogleine besitzen eine intrazelluläre Prolin-reiche Sequenz, eine variable Zahl an „repeat unit domains“ (RUD) und eine terminale Domäne (DTD). Anhand der RUD lässt sich die Isoform wie folgt erkennen: Dsg1: 5, Dsg2: 6, Dsg3: 2, Dsg4: 3.

Die äußere Verdichtungszone besteht neben den hereinragenden Enden der Desmocolline und Desmogleine vor allem aus Proteinen der Armadillo-Familie, die an die genannten Cadherine binden (Garrod & Chidgey, 2008; Kowalczyk et al., 1994). Zu den Armadillo-Proteinen, die auch außerhalb von Desmosomen auftreten gehören, abgesehen von dem bereits erwähnten Plakoglobin, auch γ -Catenin genannt, das β -Catenin, das p120-Catenin, p0071, ARVC, δ -Catenin und die Plakophiline 1 bis 3 (Hatzfeld, 2005, 2007). Alle Armadillo-Proteine sind durch das Vorkommen einer zentralen Domäne aus 42 Aminosäuren charakterisiert (Peifer et al., 1992). Das Plakoglobin stellt einen besonders wichtigen Faktor für die Funktion von Desmosomen dar, da es direkt an Desmocollin und Desmoglein bzw. Cadherine im Allgemeinen binden kann (Witcher et al., 1996). Es kommt am häufigsten in Desmosomen vor, ist jedoch auch in Adhärenzkontakten zu finden (Chitaev et al., 1996).

Darüber hinaus können Armadillo-Proteine Bindungsstellen für Desmoplakin und Keratinfilamente darstellen (Kowalczyk et al., 1999). Eine weitere Funktion ist ihre Beteiligung an der Signaltransduktion, hier seien besonders β -Catenin und γ -Catenin erwähnt, die als Transkriptionsfaktoren fungieren können (Swope et al., 2013). β -Catenin und γ -Catenin interagieren auch mit Flotillinen und Plakoglobin (Kurrle et al., 2013).

Die innere Verdichtungszone besteht aus Proteinen der Plakin-Familie, welche die Bindung zwischen den Intermediärfilamenten, vor allem Keratin- und Vimentinfilamenten, des Zytoskeletts und der äußeren Verdichtungszone vermitteln (Bornslaeger et al., 1996; Green et al., 1992). Der wichtigste Vertreter dieser Familie ist das Desmoplakin, das in der Lage dazu ist, mit Plakoglobin und anderen Armadillo-Proteinen zu interagieren (Garrod & Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004; Kowalczyk et al., 1994). Diese Proteine sind für die korrekte Funktion von Desmosomen essenziell (Gallicano et al., 1998). Das Protein verfügt ebenfalls über zwei Isoformen: Desmoplakin 1 und 2 (Green et al., 1992).

Am N-Terminus des Desmoplakins ist die Bindestelle für Plakoglobin und Plakophilin zu finden (Bornslaeger et al., 2001; Cowin & Burke, 1996). Dagegen finden sich am C-Terminus des Proteins drei Plakin-repeat Domänen (PRD), welche die Bindestelle für die Intermediärfilamente darstellen (Choi et al., 2002; Getsios et al., 2004; Yin & Green, 2004).

1.2.2 Funktion der Desmosomen

Die Funktionen der Desmosomen sind vielfältig. So spielen die desmosomalen Cadherine der Haftkontakte unter anderem wichtige Rollen in der Embryologie, dabei sind sie vor allem für die Implantation unentbehrlich. Darüber hinaus sind sie für das Wachstum der embryonalen Stammzellen verantwortlich (Eshkind et al., 2002). Eine weitere Funktion ist während der Embryogenese der Epidermis zu finden. Hier sind sie für die Differenzierung von Keratinozyten zuständig (Hardman et al., 2005).

Neben den genannten Funktionen stehen die Desmosomen vorrangig für die Integrität von verschiedenen Geweben und sorgen für eine entsprechende mechanische Widerstandsfähigkeit (Getsios et al., 2004). Die Assemblierung und damit deren Adhäsionsvermögen ist calciumabhängig. Der genaue Mechanismus dahinter wurde bisher jedoch nicht vollständig verstanden (Nekrasova & Green, 2013).

Für die fehlerfreie Funktion von Desmosomen im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion ist man der Meinung, dass sowohl Desmocolline als auch Desmogleine notwendig sind (Delva et al., 2009; Owen & Stokes, 2010). Die Expression der beiden desmosomalen Cadherine bzw. derer Isoformen ist jedoch ortsabhängig. So werden Dsg2 und Dsc2 prinzipiell ubiquitär in der Epidermis exprimiert, jedoch ist das Dsg2 zusammen mit dem Dsg3 vor allem in den unteren Schichten der Epidermis zu finden. Dsg1 wird dagegen

vor allem in den oberen Schichten exprimiert. Dsg4 ist vor allem in Haarfollikeln bzw. dem Stratum granulosum lokalisiert (Holthöfer et al., 2007). Dieser Fakt lässt die Theorie zu, dass die unterschiedlichen desmosomalen Cadherine und ihre Kombinationen auch zu unterschiedlichen Funktionen von Desmosomen in unterschiedlichen Geweben führen.

Bei den membranassoziierten desmosomalen Cadherinen werden zwei Pools unterschieden. Zum einen der desmosomale bzw. junctionale Pool, der einen direkten Bezug zu Intermediärfilamenten hat, sowie der nicht-desmosomale Pool, der diesen Bezug nicht hat. Beide Pools sind voneinander abhängig und befinden sich in stetem Austausch (Windoffer et al., 2002). Dennoch weisen die Pools unterschiedliche Eigenschaften bzgl. ihrer Löslichkeit auf. So ist der desmosomale Pool in Detergenzien wie Triton X-100 nicht löslich, während der nicht-desmosomale Pool darin löslich ist. Dadurch ist auch eine Trennung der beiden Pools möglich (Stahley et al., 2014).

1.3 Flotilline

1.3.1 Aufbau der Flotilline

Die kleine Familie der Flotilline besteht aus dem Flotillin 1 und dem Flotillin 2. Diese haben eine Übereinstimmung von etwa 44 % in ihrer Proteinsequenz (Schulte et al., 1997). Sie werden zu den zytosolischen Proteinen gerechnet, da sie entgegen früherer Publikationen keine transmembranäre Domäne besitzen (Gkantiragas et al., 2001; Morrow et al., 2002).

Strukturell sind prinzipiell zwei Domänen zu unterscheiden. Am N-Terminus der Proteine ist eine sogenannte Prohibitin-Homologie-Domäne zu finden. Diese wird auch als „stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C“-Domäne bezeichnet (Tavernarakis et al., 1999). Dieser Abschnitt der Proteinsequenz besitzt phosphorylierbare Tyrosinreste, über dessen Phosphorylierung eine Modulation der Funktion der Flotilline erreicht wird (Kurrle et al., 2012). Beispielsweise wird über die Phosphorylierung von Y160 im Flot1 bzw. Y163 im Flot2 ein Einfluss auf die Endozytose genommen (Neumann-Giesen et al., 2007; Riento et al., 2009).

Am C-Terminus findet sich die konservierte Flotillin-Domäne mit vielen Glutamat- und Alanin-Wiederholungen (Bickel et al., 1997; Schroeder et al., 1994). Die Flotillin-Domäne enthält drei Coiled-Coil-Abschnitte mit der das Protein die Möglichkeit einer

Oligomerisierung bekommt (Neumann-Giesen et al., 2004; Solis et al., 2007). Jene Oligomerisierung spielt eine wichtige Rolle in der Funktion der Flotilline. So kommt es zu einer Heterooligomerisierung im Rahmen der Endozytose von Flotillinen nach einer Stimulation mittels EGF (Babuke et al., 2009). Sie ist jedoch auch eine Voraussetzung für die Verankerung der Flotilline in der Plasmamembran (Solis et al., 2007).

Die Verankerung in der Plasmamembran kommt bei Flotillin 1 auf eine andere Art zustande als es bei Flotillin 2 der Fall ist. Beide binden mit Fettsäuren an die Membran, diese unterscheiden sich jedoch. Flotillin 1 ist über einen Palmitylrest an Cys34 an den Membrane Rafts verankert (Morrow et al., 2002). Flotillin 2 verfügt dagegen über drei Palmitylreste an Cys4, Cys19 und Cys20 und einen Myristylrest an Gly2, über die es an die Membrane Rafts binden kann (Neumann-Giesen et al., 2004). Neben der Acylierung verfügen die Flotilline jedoch auch über die Möglichkeit, über Cholesterin direkt an Membrane Rafts zu knüpfen (Meister & Tikkanen, 2014).

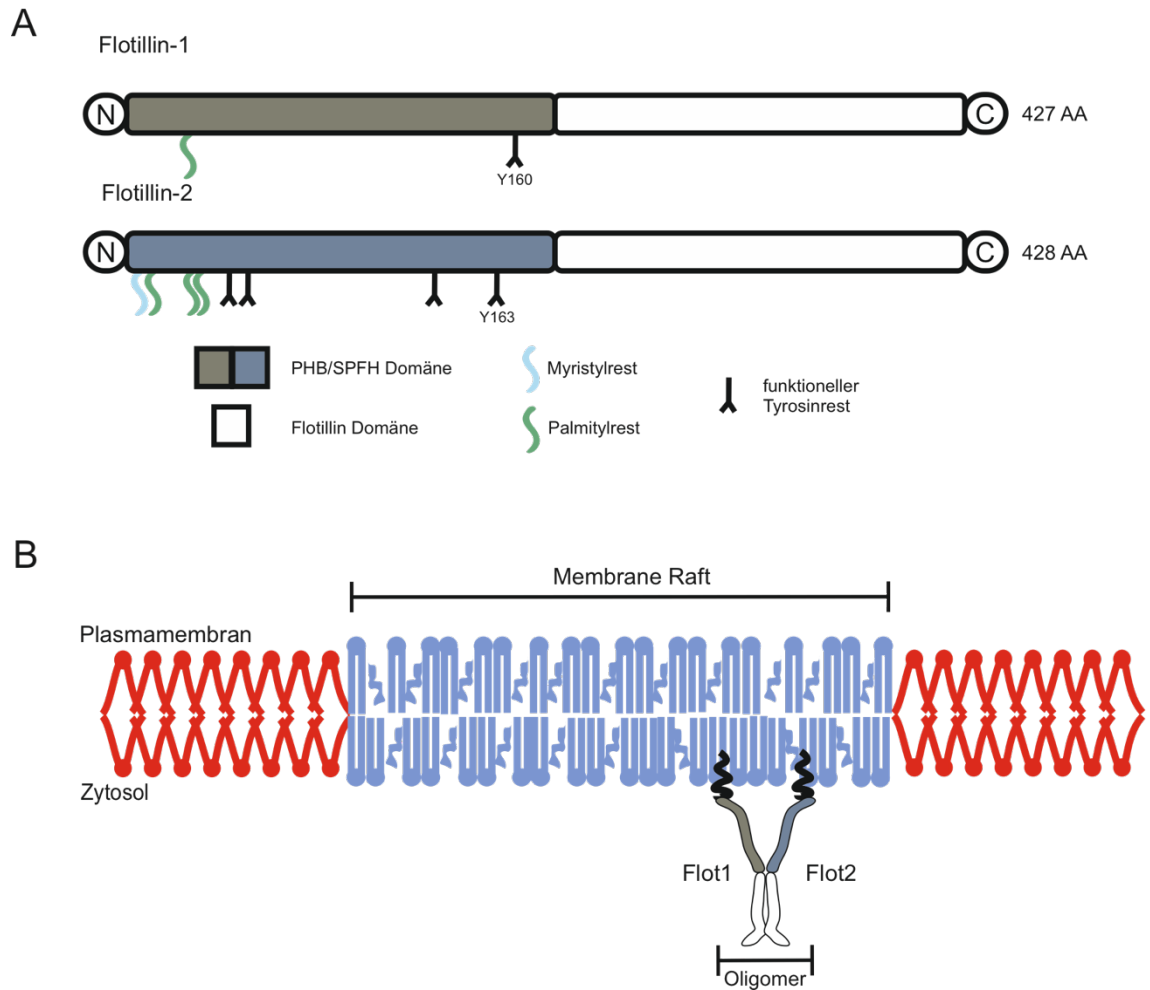


Abbildung 3: Flotilline.

A: Aufbau der Flotilline. Am N-Terminus „prohibitin homology“-Domäne (PHB) bzw. „stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C“-Domäne (SPFH). Am C-Terminus die „Flotillin“-Domäne. Hervorgehoben in Grün bzw. Blau sind entsprechend die Myristyl- und Palmitylreste und die wichtigen Stellen für eine modulierende Phosphorylierung (Y160 bzw. Y163).

B: Mikrodomäne der Flotilline. Membrane Raft in blau dargestellt, der Rest der Plasmamembran in Rot. Flot1 und Flot2 als Oligomer über Myristyl- bzw. Palmitylreste an das Membrane Raft gebunden.

1.3.2 Funktion der Flotilline

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Flotilline vielfältige Funktionen innehaben und an verschiedenen Prozessen beteiligt sind. In ihrer Funktion sind beide Flotilline oft eng miteinander verbunden, dennoch können sie sich durchaus in ihren individuellen Funktionsprofilen untereinander unterscheiden.

So konnte nachgewiesen werden, dass Flot1 einen wesentlichen Regulator im Signalweg des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGFR) darstellt. Es dient hierbei zum einen als

strukturelles Gerüst und zum anderen als Verstärker des Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwegs, der durch Aktivierung des EGF-Rezeptors induziert wird. (Amaddii et al., 2012).

Im Rahmen dessen konnte ebenfalls eine Beteiligung von Flot2 nachgewiesen werden. Dieses übt einen Einfluss auf das Zytoskelett der Zellen aus, wobei es zu einer strukturellen Umorganisation von Aktinfilamenten führt und damit eine Anpassung an die bevorstehenden Wachstums- und Differenzierungsprozesse hervorruft (Neumann-Giesen et al., 2004; Neumann-Giesen et al., 2007).

Beide Flotilline werden im Rahmen dieser Funktionen durch Src-Kinasen nach Stimulation der Zelle mit EGF phosphoryliert. Die direkte Folge ist, dass sie oligomerisieren und anschließend zum späten Endosom transloziert werden. Die Phosphorylierung von Tyr163 am Flot2 spielt in dieser Signalkaskade eine tragende Rolle (Neumann-Giesen et al., 2007).

Im Zusammenhang mit diesen genannten Funktionen sind Flotilline auch an der Zellmigration, Zell-Zell-Adhäsion und an der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt (Banning et al., 2018). In welchem Ausmaß sie daran beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung und diente auch dieser Arbeit als Anlass.

Des Weiteren spielen Flotilline im Rahmen der Clathrin-vermittelten Endozytose eine Rolle (Sorkina et al., 2013). Flot1 ist am endosomalen Transport beteiligt und interagiert dabei mit den Endosomal Sorting Complex Required for Transport-Proteinen (ESCRT) (Meister et al., 2014). Hierbei werden die Flotilline zwischen der Plasmamembran und den Endosomen wiederverwertet. Sie sind auch an der Clusterbildung verschiedener Transportmoleküle vor der eigentlichen Endozytose beteiligt. Hier seien vor allem das Amyloid Precursor Protein (APP), der Dopamin-Transporter (DAT) und der EGFR genannt (Amaddii et al., 2012; Schneider et al., 2008).

1.3.3 Lokalisation der Flotilline

Die Lokalisation der Flotilline unterliegt, wie bereits am Beispiel des EGFR-Signalwegs gezeigt, vielen unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Neumann-Giesen et al., 2007). Dadurch ergeben sich unterschiedliche Lokalisationen von Flotillinen.

Beide Flotilline werden im Rahmen des MAPK-Signalwegs gleichmäßig in ihrer Expression verstärkt (Banning et al., 2012). Dieses Verhalten weist jedoch eine gewisse

Asymmetrie auf. Während die Expression von Flot1 eine nachgewiesene Abhängigkeit von der Expression von Flot2 aufweist, ist andersherum kaum eine Abhängigkeit nachweisbar (Solis et al., 2007). Somit steigt mit der Menge an Flot2 ebenfalls der Gehalt an Flot1 in der Zelle.

Häufig liegt ein Großteil der Flotilline, nach Oligomerisierung, rekrutiert an der Plasmamembran vor (Neumann-Giesen et al., 2004). Grundsätzlich hängt die Lokalisation primär vom Zelltypus ab, so sind bspw. die Flotilline in der HaCaT Zelllinie vor allem endosomal zu finden. Dennoch eignen sich die Flotilline als Marker von Membrane Rafts in der Plasmamembran.

Ein wichtiger Schritt, der die Flotilline zum Binden an die Plasmamembran befähigt, ist die bereits erwähnte Oligomerisierung. Dabei entstehen Cluster aus Flot1 und Flot2 durch Homo- oder auch Heterooligomerisierung (Kokubo et al., 2003; Stuermer et al., 2001). Ein anderer Teil der Flotilline kann an vesikulären Kompartimenten der Zelle gefunden werden. Zu diesen Kompartimenten zählen: frühe und späte Endosomen, Lysosomen, Exosomen und Phagosomen (Babuke et al., 2009; Dermine et al., 2001; Glebov et al., 2006; Staubach et al., 2009; Stuermer et al., 2004).

Die Lokalisation der Flotilline ist letztendlich von einiger Variabilität geprägt. Ausschlaggebend ist dabei auch die reversible Palmitoylierung der beiden Flotilline, wodurch beispielsweise die Affinität zur Plasmamembran reguliert werden kann (Bijlmakers & Marsh, 2003). Hier sei vor allem der Einfluss auf Flot1 erwähnt, das über keinen Myristylrest verfügt und somit eine stärkere Abhängigkeit von seiner Palmitoylierung aufweist (Morrow et al., 2002; Neumann-Giesen et al., 2004).

1.3.4 Die Rolle in Desmosomen

Die ersten Anhaltspunkte, dass Flotilline in der Zell-Zell-Adhäsion eine gewisse Rolle spielen, lieferte eine Untersuchung zum „epidermal surface antigen“ (ESA). Bei ESA handelt es sich um ein Protein, das von einem Antikörper erkannt wird, welcher zu einer Zellablösung führt und damit zu einem Hautbild, das dem bei Pemphigus vulgaris ähnelt. Daraus wurde geschlossen, dass ESA eine Rolle in der Zelladhäsion annimmt. Jedoch stellte ESA zu dem Zeitpunkt ein falsch interpretiertes Flot2 dar: da das Startcodon falsch zugeordnet wurde, fehlte am N-Terminus ein Abschnitt. Dementsprechend entsprach die Struktur in den Grundzügen denen des Flot2. Daher führte das Erkennen einer

Strukturverwandtschaft der beiden Proteine letztendlich zur Definition des Flotillin 2 und zum Verwerfen des Begriffs ESA (Schroeder et al., 1991, 1994).

Dies ließ wiederum den Schluss zu, dass Flotillin 1, neben dem bereits bekannten ESA, ebenfalls eine Funktion im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion erfüllt. Beide Flotilline spielen also eine Rolle im Rahmen der Zelladhäsion. Der wissenschaftliche Nachweis zwischen Flotillinen und der Zelladhäsion wurde bereits 2011 durch Chartier et al. erbracht (Chartier et al., 2011).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Mikrodomänen der Flotilline an der Plasmamembran zelltypabhängig mit bestimmten Adhäsionsproteinen interagieren. Zunächst konnten Adhäsionsproteine von Adhärenzkontakten wie p120-Catenin und β -Catenin nachgewiesen werden (Chartier et al., 2011; Kurrle et al., 2013; Roitbak et al., 2005; Solis et al., 2012, 2013). Weitergehend wurde dabei festgestellt, dass die Flotilline für die Integrität und Stabilität von Zell-Zell-Kontakten notwendig sind, da sie zu diesem Zweck Mikrodomänen mit N- als auch E-Cadherinen ausbilden. Kommt es zu einer Reduktion von Flotillinen, ist die Folge ein Adhäsionsverlust (Guillaume et al., 2013). In HT-29 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von E-Cadherinen und p120-Cateninen in erster Linie mit Flot1-haltigen Membrane Rafts stattfindet (Chartier et al., 2011).

Ähnliche Zusammenhänge konnten auch bei Desmosomen nachgewiesen werden. Dabei hat man hier ebenfalls eine Interaktion von desmosomalen Adhäsionsproteinen mit Flotillinen festgestellt. Man nimmt an, diese Interaktion führe letztendlich zu einer Organisation von Membrane Rafts, die eine Akkumulation von Adhäsionsmolekülen induzieren, um so interzelluläre Haftkontakte aufzubauen (Resnik et al., 2011). Dazu gehört unter anderem die Interaktion mit Plakoglobin, auch γ -Catenin genannt, und Desmoglein 3 (Kurrle et al., 2013; Völlner et al., 2016). Im Rahmen des Aufbaus interzellulärer Haftkontakte dienen die Flotilline dabei unter anderem als Gerüst für die Adhäsionsproteine, könnten aber auch eine Rolle als Signalvermittler einnehmen.

In MCF10A-Zellen konnte festgestellt werden, dass das Fehlen von Flot1 keine Änderungen in der Assoziation von E-Cadherinen und Plakoglobin mit Membrane Rafts zur Folge hatte. Dagegen wurde bei verminderter Expression von Flot2 eine erhöhte Expression beider Adhäsionsproteine als eine Art der Gegenregulation festgestellt (Kurrle et al., 2013).

In HaCaT Zellen wurde eine Co-Lokalisation von Flotillinen mit den Desmogleinen 1 bis 3 nachgewiesen. Hier lag eine Folge des Fehlens von Flotillinen darin, dass die

Expression von Dsg3 abnahm, woraus sich wiederum eine verminderte desmosomale Adhäsion ergab (Völlner et al., 2016). Darüber hinaus konnte auch eine Interaktion von Flotillinen mit der Desmocollin-Isoform a festgestellt werden, nicht jedoch mit der kürzeren Isoform b (Völlner et al., 2016). Dies liegt wahrscheinlich dem Fehlen der ICS in den b-Isoformen zu Grunde. Daher ist davon auszugehen, dass die ICS eine wichtige Rolle für die Bindung von Flotillinen an die genannten desmosomalen Proteine spielt. Weitergehend konnte festgestellt werden, dass Flotillin 2 im Rahmen der pathologischen Prozesse des Pemphigus vulgaris Veränderungen hinsichtlich seiner Lokalisation durchläuft. Dies konnte im Versuch mit PV-IgG in HaCaT Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass Flotillin 2 sich, ähnlich dem Dsg3, nach Zugabe von PV-IgG diffus und ungeordnet in der Zelle darstellt und eine geringere Plasmamembran-assoziierte Fraktion bildet (Völlner et al., 2016). Diese Reaktion lässt den Schluss zu, dass Flotilline neben physiologischen Prozessen auch bei pathologischen Prozessen in der Zelladhäsion eine Rolle spielen. Untermauert wird diese These von Untersuchungen zu den *Disci intercalares* (auch: Glanzstreifen, DI) des Herzwes, da auch hier Flotillin 1 und 2 nachgewiesen werden konnten (Kessler et al., 2019). Die *Disci intercalares* beinhalten drei verschiedene Zellkontakte: die *Fascia adhaerens*, das Desmosom und den Nexus. Damit sind sie sowohl für die Erregung als auch für die mechanische Kontraktion der Kardiomyozyten von wichtiger Bedeutung (Lüllmann-Rauch, 2019). Erhöhte Konzentrationen von Flotillin 2 in den DI wurden bei Patienten mit dilatativer oder mit rechtsventrikulärer arrhythmogener Kardiomyopathie beobachtet (Soni et al., 2016). Des Weiteren konnte ein negativer Einfluss einer Defizienz von Flotillin 2 auf die Erregungsleitung des Herzens festgestellt werden (Kessler et al., 2019).

1.4 BioID

Da Desmosomen unlöslich sind, sind es auch die junktionalen bzw. desmosomalen Pools der desmosomalen Proteine. Dies erschwert die Untersuchung von möglichen Interaktionen zwischen den desmosomalen Proteinen untereinander, aber auch die Interaktion mit anderen Proteinen. Auch die Interaktion des nicht-desmosomalen Pools der Proteine lässt sich nur ungenau untersuchen, da durch die Lösung der Membran in Detergenzien wie Triton X-100 schwache Interaktionen zerstört werden und damit nicht mehr nachweisbar sind. Damit ist auch die Methode der Co-Immunpräzipitation zur

Darstellung von Interaktionen der desmosomalen Proteine nur bedingt geeignet. Diese Umstände kann man mittels des sogenannten Enzym-Labeling umgehen.

Grundsätzlich dient hierbei eine definierte enzymatische Funktion innerhalb eines bestimmten Proteins dazu, dessen Interaktionspartner zu markieren, um diesen dann anhand der Markierung wieder zu identifizieren. Eine solche Methodik findet sich in der BioID, aus dem Englischen für „proximity-dependent biotin identification“, wieder (Roux, 2013). Aus dem Protein, dessen Interaktion untersucht werden soll, werden zunächst Fusionsproteine generiert, die eine Biotinligase, genannt BirA, beinhalten. Jene Biotinligase stammt ursprünglich aus *E. coli* (Roux et al., 2012). Dadurch ist das Fusionsprotein nun prinzipiell in der Lage, andere Proteine zu biotinylieren. Die Biotinylierung findet jedoch nur statt, wenn der potenzielle Interaktionspartner eine Biotinylierungs-Zielsequenz trägt.

Erweitert wird die Methodik durch eine mutierte Variante der Biotinligase. Diese, BirA* genannt, ist weder zur Oligomerisierung noch zur DNA-Bindung in der Lage (Kwon & Beckett, 2000). Der entscheidende Unterschied zwischen BirA* und Wildtyp-BirA liegt jedoch darin, dass BirA* keine spezifische Zielsequenz braucht. BirA* biotinyliert jedes Protein in unmittelbarer Nähe des Fusionsproteins (Rhee & Schulman, 2004). Daher eignet sich BirA* besonders gut für die Identifizierung von bisher unbekanntem Interaktionspartnern. Das Enzym-Labeling findet nach Zugabe von entsprechenden Mengen Biotin ins Medium der Zellen über eine Zeit von 24 Stunden statt. Danach können die Proteine durch Streptavidin Kügelchen isoliert werden. Die Lösung der Proteinkomplexe in entsprechenden Detergenzien hat innerhalb dieses Verfahrens keinerlei negativen Einfluss auf den Nachweis der Interaktion, da die Proteine zuvor biotinyliert wurden und nicht während der Interaktion samt Interaktionspartner isoliert werden müssen (Roux et al., 2018).

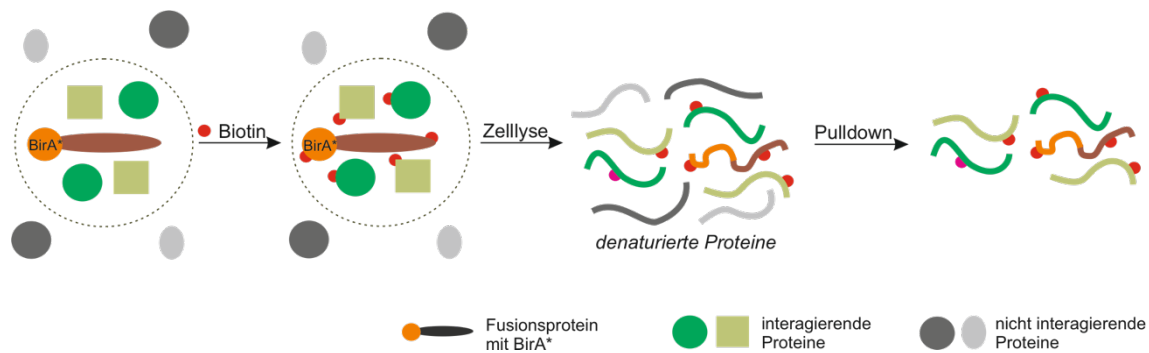


Abbildung 4: Grafische Darstellung der BioID.

Biotinylierung von Proteinen durch BirA* im Umkreis von etwa 10 nm (Roux et al., 2012) findet nach Zugabe von Biotin statt. Anschließende Zellyse und Denaturierung mittels SDS. Durchführung eines Pulldowns mit Streptavidin Kügelchen zur Isolierung biotinylierter Proteine. Identifizierung der Proteine kann anschließend mittels eines Immunoassays wie Western Blot oder einer Massenspektrometrie erfolgen.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Flotilline haben nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf die korrekte Funktion von desmosomalen Haftkontakten (Völlner et al., 2016). Im Falle des Pemphigus vulgaris ist die Funktion dieser desmosomalen Haftkontakte gestört (Amagai et al., 1991).

Im Hinblick auf diese Erkrankung und zur weiteren Untersuchung des Ausmaßes einer möglichen Beteiligung von Flotillin 2 am Pathomechanismus des PV bzw. auch an der physiologischen Funktion der Desmosomen stellt die Darstellung von Interaktionspartnern von Flotillin 2 ein vielversprechendes Hilfsmittel dar.

Die Darstellung der Interaktionspartner von Flotillin 2 brachte jedoch die Problematik mit sich, dass sowohl Desmosomen als auch Flotilline in Detergenzien unlöslich sind. Damit erschwert sich auch der Nachweis von den darin enthaltenen desmosomalen Proteinen bzw. deren Interaktion mit Flotillin 2. Durch Detergenzien, wie bspw. Triton X-100, würden schwache bzw. dynamische Interaktionen zwischen Flotillinen und anderen Proteinen zerstört und nicht mehr nachweisbar sein. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Methode der BioID etabliert werden. Mit Flotillin 2-BirA* interagierende Proteine werden dadurch vorher mittels Biotin markiert und können anhand dessen identifiziert werden.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren zunächst ein geeignetes Zellmodell für die Untersuchung der Desmosomen mittels BioID zu generieren und anschließend mit der

BioID eine Methode zur Untersuchung der Interaktion von Flotillin 2 mit desmosomalen Proteinen zu etablieren.

2. Material

2.1 Materialien und Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 1 aufgeführt. Gebrauchsmaterialien wie Eppendorf-Gefäße wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE), Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, DE) sowie BD Bioscience (Heidelberg, DE) bezogen.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

Geräte- bzw. Materialbezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
Bakterien-Schüttler, KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Bio Photometer Plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
Cellstar® Plastikröhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
CO2 Inkubator für Zellkulturen	Sanyo, Moriguchi (JP)
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Enwickler Maschine, Curix 60	AGFA, Düsseldorf (DE)
Epson Perfection 3200 Photo, Modell 6860B	Seiko Epson Corp., Hirookashiojiri-Shi (JP)
Filterpapier, Protran BA 83	Whatman, Dassel (DE)
Fluoreszenz Mikroskop, LSM T-PMT 710	Carl Zeiss, Göttingen (DE)
Fotoentwickler	Calbe-Chemie, Stadtfeld (DE)
Fotofixierer	Calbe-Chemie, Stadtfeld (DE)
Glaskolben	Schott, Mainz (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Lichtmikroskop, AE 31	Motic, Wetzlar (DE)
Nano Quant Plate®	Tecan, Crailsheim (DE)
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman, Dassel (DE)
Objektträger	Neolab, Heidelberg (DE)

Parafilm „M“ [®]	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (CA)
PCR System 2700	Thermo Scientific, Waltham (US)
Pipettierhilfe accu jet [®]	Brand, Wertheim (DE)
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl und 5, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Röntgenfilm-Kassette	Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
Spannungsquelle (Electrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
Sterilbank, Herasafe KS	Thermo Scientific, Waltham (US)
Tecan Infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Thermocycler (T-Personal Combi)	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
Ultraviolett-Flächenstrahler Nu-72 ML	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB., Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Wärmeschrank	Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau (DE)
Western-Blot-System Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkulturflasche T25 Standard	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellkulturplatte 6, 12, 24 Well	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellkulturschale 60, 100 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham (US)
Zentrifuge, Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (DE)

Zentrifuge, Mikro 200 R	Hettich, Kirchlegern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlegern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

2.2 Chemikalien und Puffer

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Puffer sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
AAVanced™ Concentration Reagent	System Biosciences, Palo Alto (US)
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Biotin	AppliChem, Darmstadt (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Bovine Serum Albumine (BSA)	PAA, Cölbe (DE)
CaCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Cumarinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
CutSmart Puffer	NEB, Frankfurt (DE)

Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
DNA-Größenmarker (DRAMA)	eigene Herstellung
DNA-Ladepuffer (6x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Dynabeads™ Protein A	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare, München (DE)
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)

Luria/Miller Broth-Medium (LB-Medium)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Luminol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
MACSfectin®	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach (DE)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
N-Octyl-β-D-Glucopyranosid (NOG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Nonidet P40 (NP-40)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Oligo-Primer (d'T)	NEB, Frankfurt (DE)
Pansorbin Cells®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) Mononatriumsalz (PIPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)

Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Q5 DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt (DE)
Q5 Reaktionspuffer (10x)	NEB, Frankfurt (DE)
Random Hexamer-Oligonukleotide (d'NTP)	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn (DE)
ROTI® Mount FluorCare 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Shrimp-Alkaline-Phosphatase (rSAP)	NEB, Frankfurt (DE)
T4 DNA-Ligase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
T4 10x Ligase-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Trishydroxymethylaminomethan-HCl sowie -Base (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Tween	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Viromer® RED Transfection Reagent	BioNTech Delivery Technologies GmbH, Halle (DE)
Wasserstoffperoxid 10% (H ₂ O ₂)	AppliChem, Darmstadt (DE)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Hersteller
2x HEPES Buffered Saline (HBS)	50 mM HEPES; 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; NaOH; pH 7,1
Biotin-Lösung	DMF 1,2 mg/ml Biotin
Blockierungspuffer 1	TBS-T 5% Milchpulver
Blockierungspuffer 2	TBS-T 2% BSA
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin; 25 mM Tris-Basis; 10% Methanol
Co-IP Puffer	10 mM Tris-Basis; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; pH 8
ECL-Lösung	1M Tris-HCl; 250 mM Luminol in DMSO 90 mM Cumarinsäure
Immunomix (IMM)	PBS; 1% Triton X-100; 0,5% Desoxycholsäure
Immunomix (IMM) + KCl	PBS; 2M KCl; 1% Triton X-100; 0,5% Desoxycholsäure
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	19 mM Glycin; 25 mM Tris-Basis 0,1% Natriumlaurylsulfat
Neufeld-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 0,6 M NaCl; 0,1% SDS; 0,05% NP-40
Phosphate Buffered Saline (PBS)	150 mM NaCl; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Paraformaldehyd 4% (PFA)	80 mM PIPES (pH 6,8); 2 mM MgCl ₂ ; 4% PFA; 5 mM EGTA (pH 8)

SDS Polyacrylamidgel Trenngel (10%) Sammelgel (4%)	3M Tris-Basis (pH 6,8); 3M Tris-Basis (pH 8,8); SDS (20%); Acrylamid (30%); TEMED; APS (10%)
SDS Probenpuffer (4x)	250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 8% SDS; 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau; 100 mM DTT; 20% Mercaptoethanol
Super optimal broth with catabolite repression-Medium (SOC-Medium)	40 mM Glucose, LB-Medium
Stripping Buffer	0,1 M NaOH
Lyse-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl 2 mM EDTA; 1% NP-40
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8)
TRIS buffered saline + Tween20 (TBS-T)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 0,05 % Tween

2.3 Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirt	WB	IF	Co-IP	Hersteller
GAPDH	Maus	1:10.000	/	/	Abcam, Cambridge (UK)
Flotillin-1	Maus	1:1000	/	/	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Flotillin-2/ESA	Maus	1:1000	1:100	/	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Flotillin-2 (F2C)	Kaninchen	/	/	3 µg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Wirt	WB	IF	Hersteller
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse	Esel	/	1:250	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Anti-Maus HRP	Ziege	1:10.000	/	Dako Denmark A/S, Glostrup (DK)

2.4 Primer

Die in der PCR zur Amplifikation von genetischem Material verwendeten DNA-Primer samt ihrer Sequenzen sind in Tabelle 6 gelistet. Alle Primer stammen vom Hersteller Sigma-Aldrich in Taufkirchen (DE).

Die mit * markierten Primer wurden zur Sequenzierung von PCR-Produkten herangezogen.

Tabelle 6: DNA-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
AAV-MCS-fwd*	CACAGCTCCTGGGCAACGTGC
AAV-MCS-rev*	CTTCCAGGGCCAGGAGAGGC
BamHI-nonstop-R1	CTATAGGATCCCACCTGCGCACCAGTGCC
BirA-linker-BamHI-fwd	CTATAGGATCCATGGGTTTCAGGTTCTACTTCTGG
BirA-rev*	GTCACGCAGTGTCTGAATGTG
R1-EcoRI-fwd	CTATAGAATTCATGGGCAATTGCCACACGG
XhoI-BirA-STOP	CTATACTCGAGTTATTTTTCTGCACTACGCAGG

2.5 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Insert	Referenz
Y163F-BirA*	pcDNA3	Flot 2 (Ratte) mit Biotinligase (E. coli), Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
Reg1-BirA*	pcDNA3	Flot 2 (Ratte) mit Biotinligase (E. coli)	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
BirA*	pcDNA3	Biotinligase (E. coli)	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
Y163F-BirA*	pAAV-MCS	Flot 2 (Ratte) mit Biotinligase (E. coli), Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
Reg1-BirA*	pAAV-MCS	Flot 2 (Ratte) mit Biotinligase (E. coli)	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
BirA*	pAAV-MCS	Biotinligase (E. coli)	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert

2.6 Bakterienkulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Kulturen entsprechen XL-1 Blue. Dabei handelt es sich um einen E. coli-Stamm, hergestellt von Stratagene in La Jolla (US), der im Rahmen dieser Arbeit zur Plasmidamplifikation genutzt wurde. Alle Kulturen wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C inkubiert.

2.7 Zelllinien und Nährmedien

Humane Zelllinien und die Parameter deren Kultivierung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 8 und 9 dargestellt.

Tabelle 8: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Parameter
HaCaT	humane immortalisierte Keratinozyten (Boukamp et al., 1988)	DMEM ++++ bei 8% CO ₂ und 37°C
HEK 293T	humane embryonale Nierenzellen (Graham et al., 1977)	DMEM ++ bei 8% CO ₂ und 37°C
hTert	humane immortalisierte Keratinozyten aus der Vorhaut (Beckert et al., 2019; Ramirez et al., 2003)	KGM +++ bei 5% CO ₂ und 37°C
MCF7	humane Brustkrebszellen (Soule et al., 1973)	DMEM ++ bei 8% CO ₂ und 37°C
MDA-MB-231	humane Brustkrebszellen (Cailleau et al., 1974)	RPMI ++ bei 5% CO ₂ und 37°C

Tabelle 9: Nährmedien und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM ++++	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% FCS, 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 80 ng/ml NEAA 100 ng/ml Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
DMEM ++	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% FCS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
KGM2 +++	Keratinocyte Growth Medium 2 mitgeliefertes Supplement (4 µl/ml Boviner Hypophysen Extrakt; 0,125 ng/ml EGF; 5 µg/ml Insulin; 0,33 µg/ml Hydrocortison; 0,39 µg/ml Adrenalin; 10 µg/ml Transferrin) 0,05 mM CaCl ₂ 30 µg/ml Gentamycin Sulfat*	PromoCell, Heidelberg (DE)
RPMI ++	Roswell Park Memorial Institute 10% FCS, 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

*die Konzentrationsangaben gelten für das gesamte Medium nach Zugabe des mitgelieferten Supplements

Es wurden sowohl Wildtyp- als auch Flotillin-2-Knockout-Zelllinien verwendet. Die Flotillin-2-Knockout HaCaT als auch HEK wurden mittels CRISPR/Cas9 in der AG Tikkanen generiert und standen dadurch zur Verfügung (Kapahnke et al., 2016).

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Klonierung

Zur Amplifizierung aller DNA-Inserts wurde bei der Standard-PCR die Q5-Polymerase verwendet. Das PCR-Protokoll wurde von der Firma NEB übernommen und ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Annealing-Temperaturen wurden unter Zuhilfenahme vom NEB TM-Kalkulator (<https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>) errechnet und sind samt aller anderen Parameter der Tabelle 11 zu entnehmen. Nach der PCR wurde zunächst eine Kontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese, wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben, durchgeführt. Danach erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE). Im Anschluss wurde ein Verdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen (NEB, Frankfurt, DE) durchgeführt, siehe hierzu Tabelle 12.

Mittels Shrimp-Alkaline-Phosphatase (rSAP, 1U) wurden lineare Plasmide dephosphoryliert. Die Inkubation erfolgte hierbei für drei Stunden bei 37 °C. Darauf folgte eine erneute Aufreinigung mittels Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE).

Die Ligation wurde daraufhin bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von zwei Stunden mit der T4 DNA-Ligase (NEB, Frankfurt, DE) durchgeführt.

Tabelle 10: PCR Protokoll

Reagenz	Volumina
5x Q5 Reaktionspuffer mit MgCl ₂	20 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Primer forward (100 mM)	1 µl
Primer reverse (100 mM)	1 µl
Plasmid 5 - 10 ng/µl	1 - 2 µl
Q5 DNA-Polymerase 2000 IU/ml	1 µl
dd H ₂ O	ergänzend auf 100 µl Gesamtvolumen

Tabelle 11: PCR Parameter

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	30 s
Annealing	variabel	30 s
Amplifikation	72 °C	2 min
restliche Amplifikation	72 °C	10 min

Die Schritte 2-4 wiederholen sich 34-mal.

Tabelle 12: Protokoll für den Restriktionsverdau des PCR Produkts

Reagenz	Volumina
gereinigtes PCR-Produkt	30 µl
10x CutSmart Puffer	7 µl
Restriktionsenzym Bam HI 10 U/µl	2 µl
Restriktionsenzym Eco RI/XhoI* 10U/µl	2 µl
dd H2O	ergänzend auf 70 µl Gesamtvolumen

*Für pcDNA3-Konstrukte wurde XhoI verwendet, während bei pAAV-Konstrukten EcoRI verwendet wurde.

3.1.2 Bakterielle Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes E. coli (XL-1 Blue) eingesetzt. Dazu wurden 10 µl einer Ligation hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis gelegt. Danach wurde ein Hitzeschock (45 °C für 60 s) durchgeführt. Die Bakterien wuchsen für 45 Minuten ohne Selektionsdruck in 1 ml SOC-Medium und wurden dann auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Danach wurden einzelne Kolonien gepickt und je eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Zur Vorbereitung für eine Midi Präparation wurde mit 2 ml aus der vorangegangenen Kultivierung eine Kultur von 200 ml angesetzt.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte im ersten Schritt mit Hilfe des Nucleospin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE) für ein Volumen von 5 ml und ggf. mit dem Nucleobond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE) für ein Volumen von 200 ml, jeweils nach den Protokollen des Herstellers.

3.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose-Pulver in 150 ml 0,5x TAE-Puffer gelöst. Das Gel wurde anschließend mit einem Volumen von 20 ml jener Lösung gegossen. Die Konzentration des Ethidiumbromids lag im Gesamtvolumen bei 0,5 ng/ml. Zu einer 10 µl DNA-Probe wurden 2 µl DNA-Ladepuffer (6x) hinzugefügt. Beim verwendeten Marker handelte es sich um einen eigens hergestellten DNA-Größenmarker (DRAMA). Das Gel lief über einen Zeitraum von 30 bis 60 min, abhängig von der erwarteten Größe der DNA, bei einer Spannung von 80 V.

Die Methode diente zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe und dem anschließenden Vergleich mit DNA bekannter Größe oder mit genormten DNA-Markern. Die Beurteilung erfolgte auf einem UV-Flächenstrahler und wurde fotografisch dokumentiert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Die Informationen zur Kultivierung der jeweiligen Zelllinien, sowie die Zusammensetzung der jeweiligen Medien, sind den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen. Zum Passagieren der Zelllinien wurde zunächst das Medium entfernt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mittels 2 ml PBS. Zum Lösen interzellulärer Kontakte ist bei Epithelzellen, insbesondere Keratinozyten, eine Inkubation mit 3 ml einer PBS/EDTA-Lösung vorangegangen. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten in 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels FCS-haltigen Mediums gebremst. Nach Resuspension in Wachstumsmedium erfolgte die Aussaat der Zelllinien.

3.2.2 Transfektion

Die Transfektion der Zelllinien HEK 293T, sowie deren Flotillin-Knockout-Zelllinien, wurde mit dem Reagenz MACSfectin[®] durchgeführt. Die Zellen wurden in der Regel auf einer 12-Well- oder 6-Well-Platte ausgesät und bei einer Konfluenz von mindestens 60% transfiziert. 2 µg (12-Well) bzw. 3 µg (6-Well) DNA wurden zunächst in 100 µl

bzw. 200 µl reinem DMEM gelöst. Anschließend wurden 4 µl bzw. 6 µl MACSfectin[®] Reagenz in derselben Menge DMEM gelöst. Die beiden Ansätze wurden zusammengemischt und resuspendiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert und im Anschluss tropfenweise auf die Zellen, die zuvor mit frischem Medium versetzt wurden, gegeben. Nach vier Stunden wurde in der Regel das Medium der Zellen gewechselt.

Alternativ wurde auch eine Transfektion mittels Viomer[®] RED Transfection Reagent durchgeführt. Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Die HaCaT Zellen, die damit transfiziert wurden, wurden zuvor auf einer 12-Well-Platte ausgesät. Diese hat man dann bis auf eine Konfluenz von etwa 90 % wachsen lassen. 1,4 µg der zu transfizierenden DNA wurden in 90 µl des mitgelieferten Puffers gelöst. In einem zweiten Gefäß wurden 0,56 µl Viomer auf die Wand des Gefäßes appliziert. Im Anschluss wurden 9,5 µl des mitgelieferten Puffers dazugegeben und alles sofort für drei bis fünf Sekunden resuspendiert. Die 90 µl aus dem ersten Gefäß wurden anschließend zum zweiten dazugegeben und wieder resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über eine Zeit von 15 Minuten. 100 µl des Transfektionskomplexes wurden nach einem Mediumwechsel auf die Zellen gegeben. Auch hier wurde nach vier Stunden das Medium der Zellen gewechselt.

3.2.3 Transduktion

Bei Zelllinien, bei denen die Transfektion nach 3.2.2 erfolglos war, wurde die Methodik der Transduktion mittels AAV angewandt. Dazu gehören vor allem die Zelllinien HaCaT, hTert, sowie MCF7.

Zunächst wurden mittels der Calcium-Phosphat-Transfektion AAV-Partikel in HEK 293T auf 10 cm-Schalen hergestellt. Diese Transfektion basiert auf der Bindung von DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Dieses wird anschließend in die Zelle durch Endozytose aufgenommen (Graham & van der Eb, 1973).

Die Transfektion der HEK 293T erfolgte mittels folgender Methodik: 7 µg DNA des jeweiligen Plasmids: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* oder BirA* auf dem pAAV-MCS-Vektor wurden zusammen mit je 7 µg pHelper und pAAV-DJ für eine 10 cm-Schale in 250 µl H₂O und 250 µl 0,5M CaCl₂-Lösung gelöst. pHelper dient dabei als Helferplasmid, das Gene des AAV beinhaltet, um so eine Assemblierung von AAV innerhalb der Zellen zu ermöglichen, während pAAV-DJ das Kapsid codiert. Im

Anschluss wurden 500 µl 2x HBS Puffer hinzugegeben und sofort resuspendiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Danach wurde der Ansatz ins Medium der Zellen gegeben. Die Zellen produzierten dann über den Zeitraum von drei Tagen die entsprechenden AAV-Partikel ins Medium.

Das Medium wurde anschließend entnommen und bei 3.850 g für fünf Minuten zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Daraufhin wurde das Medium mit den AAV-Partikeln im Verhältnis 4:1 mit AAVanced™ Concentration Reagent versetzt und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Das AAVanced™ Concentration Reagent dient dabei zur Isolation der AAV-Partikel aus dem Medium.

Danach wurden die AAV-Partikel bei 3.850 g für 30 Minuten aus dem Reagenz zentrifugiert und das Pellet insgesamt dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde es in PBS resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -150 °C.

Zur Transduktion wurden je nach Versuch unterschiedliche Mengen an Viruspartikeln in das Medium der zu transduzierenden Zellen gegeben. Dabei wird die DNA mit Hilfe der infektiösen AAV-Partikel in die Zelle eingeschleust und führt so zur transienten Expression des jeweiligen Proteins. Die Mengen des Transduktions-Reagenz sind beim entsprechenden Versuch unter dem Punkt Ergebnisse angegeben.

3.2.4 Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in PBS abgetragen. Danach wurden sie für fünf Minuten bei 3.850 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zelllyse wurde je nach anschließendem Verfahren entweder mit Lyse-Puffer oder mit Co-IP Puffer durchgeführt. Dabei enthielten beide je 10 mg/ml Proteaseinhibitor-Cocktail. Der Co-IP Puffer enthielt zusätzlich 100 mg/ml NOG.

Die Lyse fand 30 Minuten unter Eiskühlung statt. Anschließend wurden Zellreste durch eine zwölfminütige Zentrifugation bei 21.380 g und 4 °C entfernt und der Überstand in ein frisches Gefäß übertragen. Die Gesamtproteinmenge des Lysats wurde mittels Bio Photometer Plus (Eppendorf, Hamburg, DE) gemessen.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die entsprechenden Zelllinien wurden zunächst in einer 12-Well-Platte auf Deckgläschen ausgesät und 7 Tage kultiviert. Für die Darstellung von GFP wurden die

Zelllinien zuvor entsprechend 3.2.2 bzw. 3.2.3 mit GFP-pAAV-DJ transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte daraufhin mittels 500 µl vierprozentigem PFA. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur für 20 Minuten statt. Danach wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit dd H₂O. Zum Eindecken wurden 15 µl ROTI[®]Mount FluorCare mit DAPI verwendet.

Zur Darstellung von Flot2 in hTert Zellen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 % für 24 h mit 0,05 mM CaCl₂ bzw. 2 mM CaCl₂ inkubiert. Für die Immunfluoreszenzfärbung von Flot2 wurden die Zellen für acht Minuten bei -20 °C mit Methanol fixiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Im Anschluss wurde für zehn Minuten mit 50 µM Glycin in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen, wurden die Deckgläschen in 50 µl einprozentigem BSA in PBS für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Waschschriff mit PBS.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Deckgläschen mit Anti-Flot2/ESA-Antikörper als Primärantikörper (siehe hierzu Tabelle 4) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach erfolgte nach einem Waschschriff mit PBS eine Inkubation mit Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-mouse (siehe hierzu Tabelle 5) als Sekundärantikörper, ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit H₂O gewaschen und mit 15 µl ROTI[®]Mount FluorCare mit DAPI eingedeckt. Die Lagerung aller Objektträger fand anschließend bei 4 °C statt.

3.2.6 BioID mit Pulldown

Nach der in 3.2.2 beschriebenen Transfektion wurden die Zellen auf 10 cm-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 60 % wurden die Zellen mit DMEM ++, das 2,4 µg/ml Biotin enthielt, für 24 Stunden inkubiert. Die Negativprobe bekam für denselben Zeitraum DMEM ++ mit nur 1% FCS, um den Biotingehalt so gering wie möglich zu halten.

Die Zelllyse fand wie unter 3.2.4 beschrieben in 2 ml Lyse-Puffer statt. Die reinen Lysatproben wurden wie in 3.3.1 beschrieben präpariert.

Die Proteinmenge der Lysate wurde gemessen, um eine Gesamtmenge von 1 mg Protein für den Pulldown sicherzustellen. Pro Lysat wurden 25 µl Dynabeads[™] MyOne[™] Streptavidin C1 benutzt. Diese wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und

anschließend in 500 µl 1% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Rollrad inkubiert. Danach wurden die Beads mit 500 µl Lyse-Puffer gewaschen und anschließend in 20 µl Lyse-Puffer pro Lysat resuspendiert. Je 20 µl der resuspendierten Beads wurden dann zu 2 ml Lysat hinzugefügt und für vier Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads mit folgenden Reagenzien gewaschen: Einmal mit IMM, einmal mit IMM + KCl, dreimal mit dem Neufeld-Puffer und zum Schluss einmal mit PBS. Anschließend wurde wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben verfahren.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS PAGE und Western Blot

Für die SDS PAGE wurden zehnpromtente Polyacrylamid-Laufgele und vierpromtente Polyacrylamid-Sammelgele benutzt. Die zu ladende Gesamtproteinmenge wurde auf 20 µg in einem Volumen von 30 µl angepasst. Die Lysate wurden dann mit 10 µl SDS Probenpuffer (4x) versetzt. Nach einer Co-IP oder einem Pulldown wurden die Beads mit 30 µl SDS Probenpuffer (2x) versetzt. Im Anschluss wurden die Proben bei 95 °C für fünf Minuten gekocht. Die Laufzeit betrug etwa 90 Minuten. Anschließend wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Dauer betrug zwischen 1,5 und 2 Stunden. Zum Nachweis der Proteinübertragung wurde eine Ponceau-Färbung angewandt. Folgend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wurde eine 30-minütige Inkubation mit dem Blockierungspuffer 1 durchgeführt. Bei einer vorangegangenen Biotinylierung wurde der Blockierungspuffer 2 verwendet, da Milch bereits biotinylierte Proteine beinhaltet.

Die Primärantikörper wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T, wurde der entsprechende Sekundärantikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Membran für eine Stunde mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde eine ECL-Lösung für zwei bis fünf Minuten appliziert und das Signal mittels eines Röntgenfilms dargestellt.

Falls nötig, wurde die Membran mit Hilfe von 0,1 M NaOH „gestrippt“, anschließend gewaschen, wieder mit Blockierungspuffer 1 oder 2 versetzt und dann wieder mit einem anderen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.3.2 Co-Immunpräzipitation

Für eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wurden die Zellen zunächst wie in 3.2.4 beschrieben in einem Volumen von 1 ml Co-IP-Lysepuffer lysiert. Die reinen Lysatproben wurden wie in 3.3.1 beschrieben präpariert.

Im Folgenden wurde das Lysat dreimal mit Pansorbin aufgereinigt, um klebriges Material zu entfernen, das unspezifisch an den bei der Co-IP benutzten Kügelchen haften könnte. Hierfür wurde das Pansorbin selbst zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 50 µl Pansorbin zum Lysat hinzugegeben und für 15 Minuten unter Eiskühlung inkubiert. Nach Zentrifugation bei 21.380 g für zwei Minuten wurde das Vorgehen noch weitere zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde eine Zentrifugation bei 21.380 g bei 4 °C für 10 Minuten durchgeführt, um das Pansorbin vollständig aus dem Lysat zu entfernen.

Die Proteinmenge der Lysate wurde gemessen, um eine Gesamtmenge von 1 mg Protein für die Co-IP sicherzustellen.

Pro Lysat wurden 30 µl Dynabeads™ Protein A benutzt. Diese wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 90 µl Co-IP Puffer (ohne NOG) und 10 µl 10 % BSA pro Ansatz resuspendiert. Daraufhin wurden 3 µg Anti-Flot2 Antikörper (F2C, Sigma) pro Lysat hinzugefügt. Die Kügelchen wurden dann für zwei Stunden bei 4 °C in einem Rollrad inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit Co-IP Puffer gewaschen und anschließend in 50 µl Co-IP Lysepuffer (mit NOG und PI) und 100 µl 10% BSA pro Ansatz resuspendiert.

Die präparierten Beads wurden daraufhin mit dem aufgereinigten Lysat versetzt und erneut für 8 Stunden bei 4 °C im Rollrad inkubiert. Diese wurden dann viermal mit Co-IP Puffer (ohne NOG) gewaschen.

Anschließend wurde wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben verfahren.

3.4 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung

3.4.1 Statistik

Alle aufgeführten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

3.4.2 Elektronische Manipulation der Abbildungen

Die dargestellten Abbildungen wurden durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen angepasst. Alle Manipulationen wurden für die gesamte Fläche durchgeführt. Andere Manipulationen wurden nicht durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss der Calciumkonzentration auf die Expression von Flot2 und auf seine Interaktion mit Flot1 in hTert Keratinozyten

Um Flotilline bei der desmosomalen Adhäsion in Keratinozyten zu untersuchen, wurde zunächst ein Versuch mit der hTert-Zelllinie durchgeführt. hTert-Zellen sind Keratinozyten der menschlichen Vorhaut, welche durch Expression der humanen Telomerase sowie der Cdk4-Kinase der Maus immortalisiert wurden (Ramirez et al., 2003). Grundvoraussetzung für eine optimale Adhäsion durch Desmosomen zwischen Zellen ist ein entsprechend hoher Calciumspiegel. Da die Calciumkonzentration nachweislich einen Einfluss auf die Lokalisation der Desmogleine 1 bis 3 in hTert Zellen hat (Hennings & Holbrook, 1983), wurde die Auswirkung der Änderung der Calciumkonzentration nochmals in Bezug auf die Lokalisation des Flot2 untersucht (Beckert et al., 2019).

Es konnte bestätigt werden, dass bei niedrigen Calciumkonzentrationen (0,05 mM) das Flot2 perinukleär angeordnet ist, während bei erhöhter Calciumkonzentration (2 mM) das Flot2 überwiegend im Bereich der Zell-Zell-Kontakte angesiedelt ist. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5 zu sehen. Dadurch eignet sich die hTert-Zelllinie besonders als Modell für Versuche in Bezug auf Zell-Zell-Kontakte in Keratinozyten.

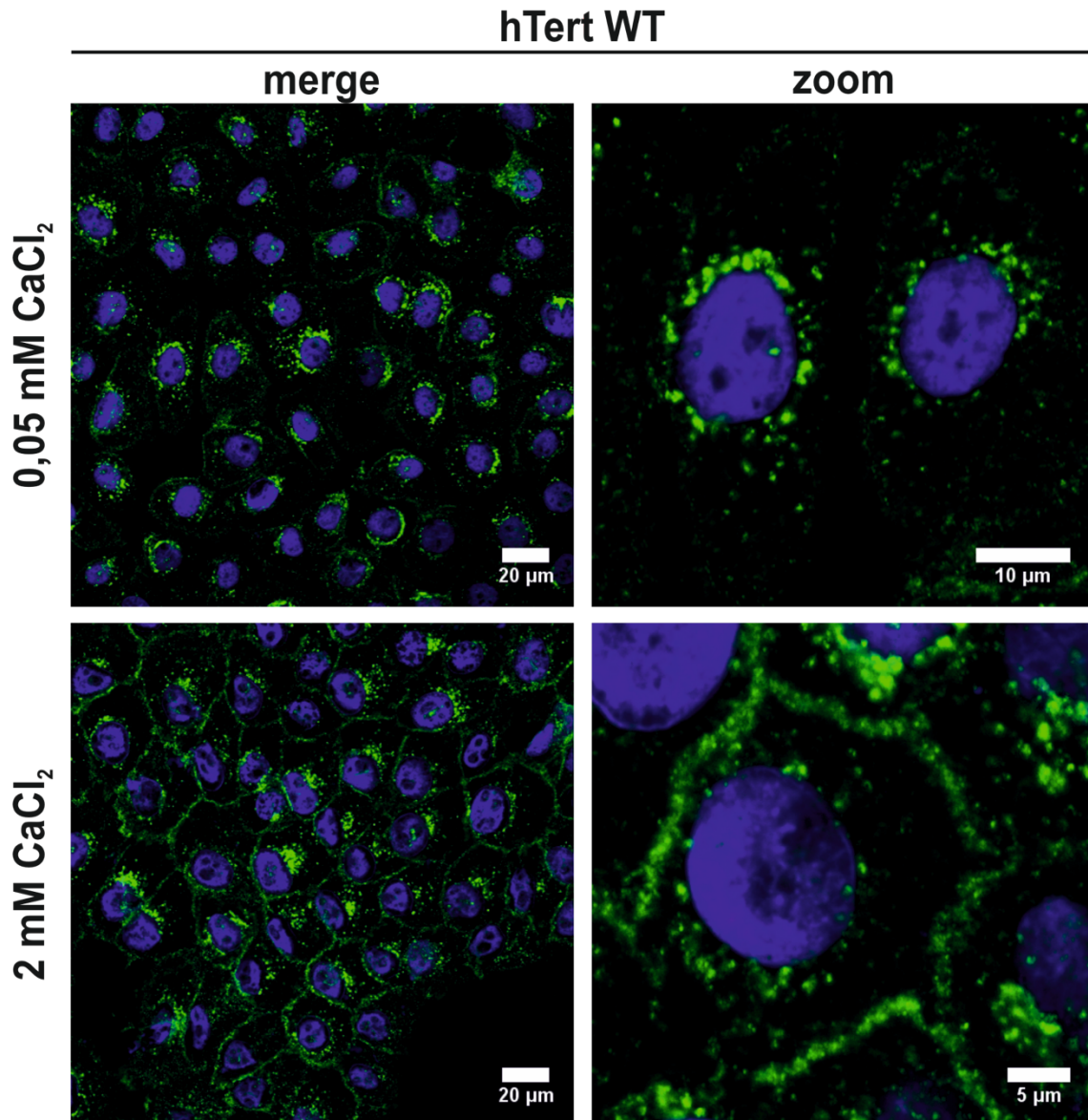


Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin 2 in Wildtyp hTert-Zellen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen.

HTert-Zellen wurden kultiviert, fixiert und mit Anti-Flot2-Antikörpern und Sekundärantikörpern fluoreszierend markiert. Es ist ein positives Signal sowohl für DAPI (blau) als auch für Flotillin 2 (Alexa488, grün) zu sehen. In der oberen Bildreihe sieht man, dass bei einer CaCl₂-Konzentration von 0,05 mM das Flotillin hauptsächlich perinukleär in intrazellulären Vesikeln angeordnet ist. Bei einer CaCl₂-Konzentration von 2 mM kommt es zu einer Umverteilung, und das Flotillin 2 ist vermehrt im Bereich der Zell-Zell-Kontakte zu finden. Die DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

Weitergehend wurde untersucht, ob die Calciumkonzentration einen Einfluss auf die Expression von Flot2 bzw. auf dessen Interaktion mit Flot1 hat. Die auf 10-cm-Schalen ausgesäten hTert-Zellen wurden ab einer Konfluenz von 80-90 % mit KGM2 +++

(siehe hierzu Tabelle 9), das zusätzlich mit 2 mM CaCl_2 versetzt wurde, für 24 Stunden im Zell-Inkubator inkubiert. Die Kontroll-Zellen behielten für diese 24 Stunden ihr Standardmedium mit 0,05 mM CaCl_2 . Im Anschluss wurde eine Immunpräzipitation mittels Anti-Flot2-Antikörper (siehe hierzu Tabelle 4) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumkonzentration keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Expression von Flot2 bzw. Flot1 in hTert hat (Abbildung 6). Nur die Expression von Flot1 fällt bei einer Calciumkonzentration von 0,05 mM etwas geringer aus. Die Interaktion zwischen Flot2 und Flot1 bleibt durch die Calciumkonzentration unbeeinflusst. Flot1 interagiert bei 0,05 mM CaCl_2 gleichermaßen mit Flot2 wie bei 2 mM CaCl_2 . Somit konnten keine quantitativen, Calcium-abhängigen Unterschiede in der Expression von Flot2 bzw. dessen Interaktion mit Flot1 in hTert-Zellen nachgewiesen werden. Der Einfluss der Calciumkonzentration beschränkt sich somit zunächst nur auf die Lokalisation des Flot2 in den hTert Zellen.

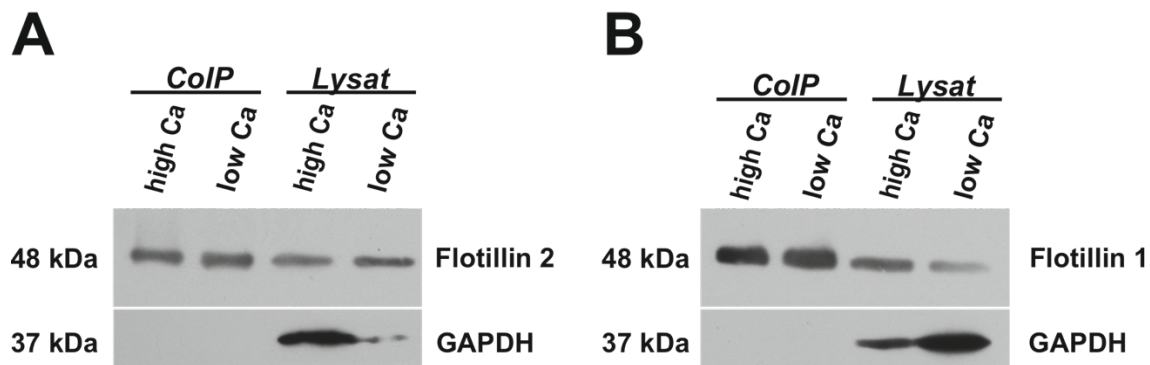


Abbildung 6: Western Blot der hTert-Zellen mit Nachweis von Flot2 (A) bzw. Flot1 (B) nach CoIP und in Lysaten.

Htert-Zellen wurden kultiviert und lysiert. Es wurde je 1 mg Lysat für die Ko-IP verwendet. Es wurde eine Immunpräzipitation mit Anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot bei A mit Anti-Flot2-Antikörpern und bei B mit Anti-Flot1-Antikörpern durchgeführt. Bei 48 kDa sind die Banden für Flot2 bzw. Flot1 zu sehen. Die Expression von Flot2 bzw. Flot 1 scheint durch die unterschiedlichen CaCl_2 -Konzentrationen nicht oder sehr wenig beeinflussbar zu sein (siehe *Lysat*). Nur im Lysat (B) ist bei 0,05 mM CaCl_2 weniger Flot1 exprimiert worden. Die Interaktion von Flot2 und Flot1 wurde mittels CoIP untersucht (siehe *CoIP*). Hier hat sich gezeigt, dass die CaCl_2 -Konzentration keinen Einfluss auf die Interaktion von Flot2 mit Flot1 nimmt. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen; high = 2 mM CaCl_2 , low = 0,05 mM CaCl_2 .

4.2 Klonierung und Expression von Flot2-Fusionsproteinen mit BirA*

Zur Untersuchung der Interaktionspartner von Flot2 in Desmosomen stellt die BioID eine geeignete Methode dar. Hierzu werden Interaktionspartner von einer im Fusionsprotein integrierten, unspezifischen Biotinligase biotinyliert und anhand dieser Biotinylierung präzipitiert. Die so präzipitierten Interaktionspartner lassen sich dann mit verschiedenen Methoden identifizieren. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Flot2-Fusionsproteine mit BirA* in die Plasmide pAAV und pcDNA3 kloniert.

Zum einen sollte eine direkte Transfektion mittels MACSfectin® und zum anderen eine Transduktion der generierten AAV-Partikel durchgeführt werden, um eine höhere Transfektionsrate zu erreichen. Da hTert-Zellen sehr schwer zu transfizieren sind, wurde ein Vergleich zwischen der klassischen Transfektion in pCDNA3 und der Transduktion mit AAV-Partikeln herangezogen.

Bei Reg1-BirA* (auch: R1-BirA*) handelt es sich um den Wildtyp des Ratten Flotillin 2, fusioniert mit der unspezifischen Biotinligase BirA*. Dafür ergibt sich für das Fusionsprotein insgesamt die Molekülmasse 80 kDa, statt der ursprünglichen 48 kDa, die das singuläre Flot2 hat. Die Bezeichnung Reg1 geht auf „Reggie 1“ zurück, was auf einer eigenen Nomenklatur von auf Ratten-cDNA basierenden Proteinen beruht (Schulte et al., 1997).

Y136F bezeichnet eine Mutante, bei der die 163. Aminosäure des Flot2, das Tyrosin, durch Phenylalanin ersetzt wurde, wodurch eine mögliche Phosphorylierung an dieser Stelle verhindert wird (Neumann-Giesen et al., 2007). Fusioniert mit der unspezifischen Biotinligase BirA* bleibt die Größe des Gesamtkonstrukts dieselbe wie beim Fusionsprotein des Wildtyps.

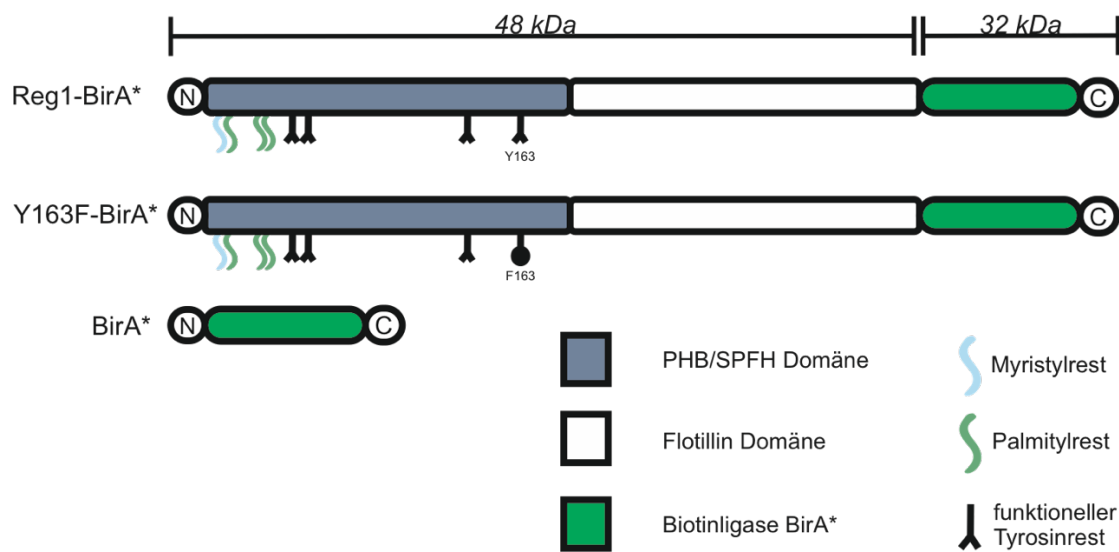


Abbildung 7: Darstellung der klonierten Flot2 Fusionsproteine und der Biotinligase BirA*.

Die Gesamtmasse der beiden Flot2-Fusionsproteine ist gleich und beträgt 80 kDa, dabei macht Flotillin 2 selbst 48 kDa und die Biotinligase jeweils am C-Terminus des Proteins 32 kDa aus. Dabei liegt die Biotinligase jeweils am C-Terminus des Proteins. Der Unterschied der beiden Flot2-Fusionsproteine liegt in der 163. Aminosäure, die entweder Phenylalanin oder Tyrosin ist.

Die erfolgreiche Klonierung wurde zunächst mittels einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Anschließend erfolgte die Transfektion von Flot2-KO HEK Zellen mittels MACSfectin[®] und danach der Nachweis des Fusionsproteins mittels Western Blot und nachfolgender Immundetektion. Der Nachweis der erfolgreichen Expression ist in Abbildung 8 dargestellt. Als Negativkontrolle diente die unspezifische Biotinligase BirA* ohne Flotillin, die im selben Verfahren wie die anderen Konstrukte transfiziert wurde. Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung der Gele wurde immer eine Immundetektion mit GAPDH durchgeführt.

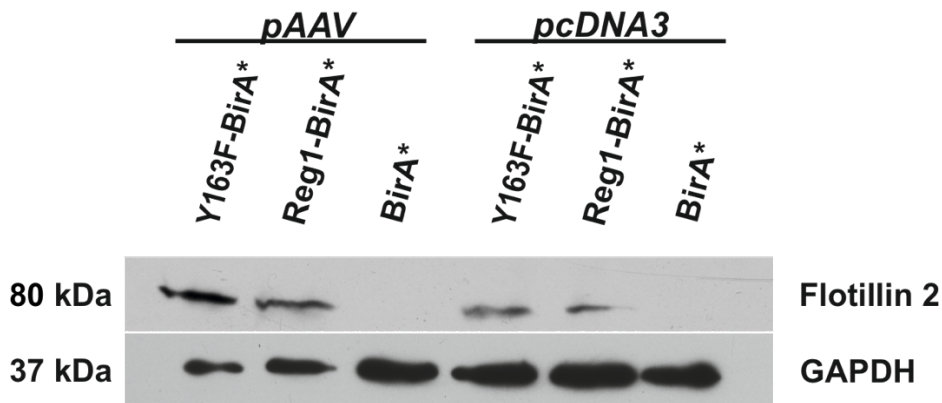


Abbildung 8: Western Blot der HEK 293T-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.

HEK 293T-Zellen wurden transfiziert, kultiviert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 6 μ l MACSfectin[®] und 3 μ g der jeweiligen DNA jeweils auf pAAV- und pcDNA3-Vektoren. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt. Bei 80 kDa sind die Fusionsproteine Y163F-BirA* und Reg1-BirA* nachweisbar, während bei BirA*, der Negativkontrolle, keine Bande zu sehen ist. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

4.3 Etablierung von Transfektions- bzw. Transduktionsbedingungen

Zur Durchführung der Transduktion wurden zunächst AAV-Partikel hergestellt. Diese wurden mittels Calcium-Phosphat-Transfektion für jedes Konstrukt (Y163F-BirA*, Reg1-BirA* und BirA*) auf pAAV in HEK 293T produziert. Dabei wurden jeweils 7 μ g DNA auf pAAV mit je 7 μ g pHelper und 7 μ g pAAV-DJ transfiziert. pHelper dient dabei als Helferplasmid, sodass eine Assemblierung der AAV-Partikel durch virale Proteine in der Zelle stattfinden kann. Das Kapsid kommt aus dem pAAV-DJ-Vektor. Bei AAV handelt sich um Partikel, die ein Hybrid-Kapsid aus verschiedenen AAV-Serotypen (pAAV-DJ) besitzen, damit auch kultivierte Zelllinien infiziert werden. Anschließend wurde in dieser Arbeit versucht, zunächst das bestmögliche Zellmodell zu ermitteln und anschließend in diesem die Methodik der BioID durchzuführen. Daher wurden unterschiedliche Zelllinien zur Transfektion als auch Transduktion herangezogen.

4.3.1 hTert-Zelllinie

In erster Linie ergab die hTert-Zelllinie für die vorgesehenen Zwecke das optimale Modell. Daher wurden zunächst Transfektionsversuche mit dieser Zelllinie unternommen. Aus vorangegangenen Erfahrungen der AG Tikkanen ist diese Zelllinie jedoch sehr schwer zu transfizieren.

Da eine stabile Transfektion mit den Konstrukten erfolglos blieb, wurde eine Transduktion mittels AAV und den entsprechenden Konstrukten aus pAAV-Vektoren erwägt. Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz anhand der Anzahl grüner GFP-exprimierender Zellen wurde zunächst das fluoreszierende GFP-pAAV transduziert. Das Eindeckeln erfolgte dann mit einem Einbettungsmedium mit DAPI, um die Zellkerne zu visualisieren. Jedoch war auch diese Art der Transduktion bei hTert-Zellen erfolglos. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen war selbst bei 15 μl Viren sehr gering. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 zu sehen. Daher wurden weitere Zelllinien in Erwägung gezogen.

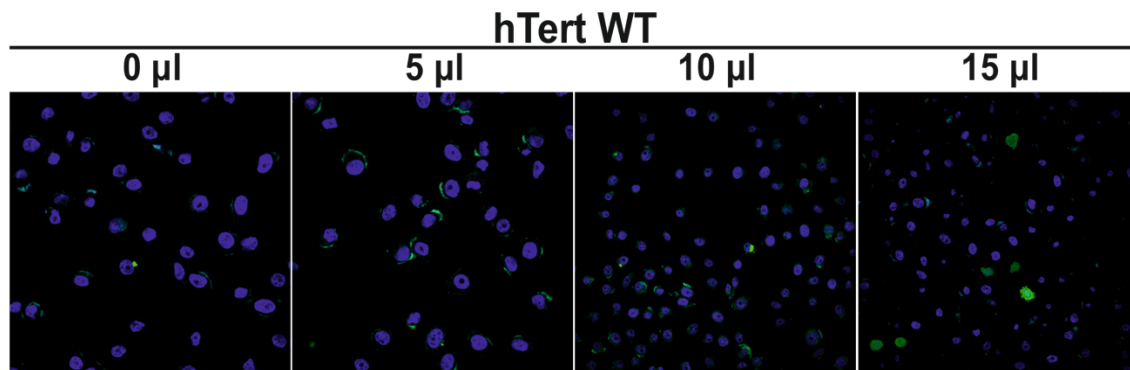


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Wildtyp hTert-Zellen nach Transduktion.

HTert-Zellen wurden mit GFP-AAV-Partikeln transduziert, kultiviert und anschließend fixiert. Es ist ein positives Signal sowohl für DAPI (blau) als auch für GFP ab 15 μl Viruspartikeln (grün) zu sehen. Bei 0 bis 10 μl sind perinukleär auch autofluoreszierende Proteine (grün) erkennbar. Die Menge an Viruspartikeln zur Transduktion wurde linear um 5 μl erhöht. Zellen, die GFP exprimieren, sind grün markiert. Die DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

4.3.2 Flot2-Knockout HaCaT-Zelllinie

Als zweite Möglichkeit wurden HaCaT Zellen in Erwägung gezogen. Diese spontan immortalisierten Keratinozyten stammen aus der Peripherie eines Hautkarzinoms und sind durch die Inaktivierung des p53-Proteins immortalisiert (Boukamp et al., 1988). Ein besonderer Vorteil ergab sich durch das Vorhandensein einer Flot2-Knockout-Zelllinie der HaCaT Zellen in unserer Arbeitsgruppe.

Die AAV-Transduktion wurde nach demselben Schema wie bei der hTert-Zelllinie durchgeführt (siehe Abbildung 10). Das Ergebnis war aussichtsreicher, denn bereits bei einer Menge von 5 μ l Viruspartikel ergaben sich die ersten GFP-positiven Zellen.

Bei einer Menge von 20 μ l Viruspartikel waren 20% GFP-positiv, sodass als Folgeversuch eine Transduktion mit den Konstrukten: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* und BirA* auf pAAV-Vektoren durchgeführt wurde.

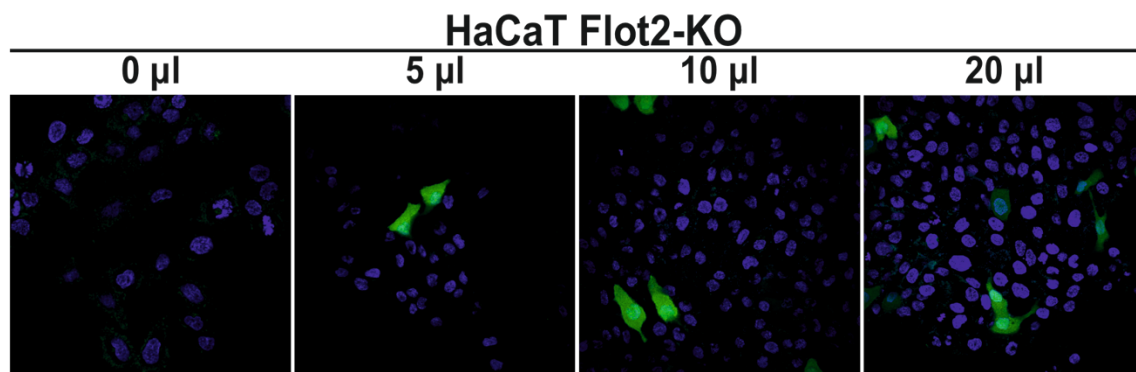


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Flot2-KO HaCaT-Zellen nach Transduktion.

Flot2-KO HaCaT-Zellen wurden mit GFP-AAV-Partikeln transduziert, kultiviert und anschließend fixiert. Es ist ein positives Signal sowohl für DAPI (blau) als auch für GFP (grün) zu sehen. Die Menge an Viruspartikeln zur Transduktion wurde schrittweise auf 20 μ l erhöht. Zellen, die GFP exprimieren, sind grün markiert. Ab einer Menge von 5 μ l sind die ersten GFP-positiven Zellen zu sehen. Ein linearer Anstieg der Transduktionsrate mit steigender Menge an Viruspartikeln war jedoch nicht eindeutig zu erkennen. Die DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

Zur Kontrolle wurde parallel eine Transduktion mit den Proteinen Y163F-BirA*, Reg1-BirA* und BirA* in Flot2-KO HEK Zellen durchgeführt. Die Transduktion erfolgte ebenfalls mit AAV-Partikeln. Abbildung 11 A zeigt die mit bereits 10 bzw. 20 μ l Viruspartikel erfolgreiche Transduktion in Flot2-KO HEK Zellen.

Für die Transduktion der Proteine Y163F-BirA*, Reg1-BirA* und BirA* in Flot2-KO HaCaT Zellen wurden größere Mengen von AAV-Partikeln verwendet, da vorangegangene Transduktionsversuche mit Mengen zwischen 10 und 30 μ l ineffektiv waren.

Einzig die Transduktion mit 150 μ l Viruspartikel, wie in Abbildung 11 B zu sehen, brachte einen kaum sichtbaren Nachweis von Reg1-BirA* im Western Blot. Insgesamt ist die Effizienz dieser Art der Transduktion jedoch zu gering, um damit die Methodik der BioID anzuwenden. Daher wurde die HaCaT-Zelllinie nicht weiterverwendet.

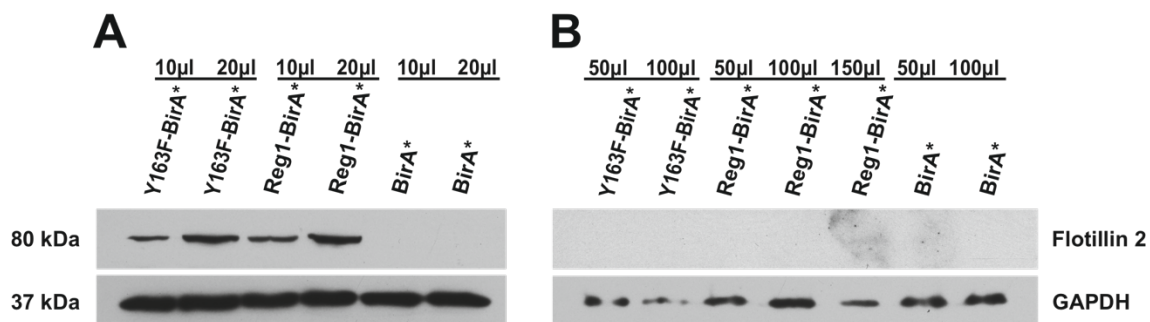


Abbildung 11: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen (A) und Flot2-KO HaCaT-Zellen (B) mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.

Flot2-KO HEK- und Flot2-KO HaCaT-Zellen wurden transduziert, kultiviert und anschließend lysiert. Die Transduktion erfolgte beginnend mit 10 μ l AAV-Partikeln. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Flot2-Antikörpern durchgeführt. Unter A sind bei 80 kDa die Fusionsproteine Y163F-BirA* und Reg1-BirA* nachweisbar, während bei BirA*, der Negativkontrolle, keine Bande zu sehen ist (es existierten keine kommerziellen Antikörper gegen das BirA*-Protein). Unter B ist bei 80 kDa Reg1-BirA* mit 150 μ l AAV-Partikeln kaum nachweisbar. Insgesamt konnte somit keine erfolgreiche Transduktion nachgewiesen werden. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

Darüber hinaus wurde eine Transfektion mittels Viromer[®] RED durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine polymerbasierte Transfektion, die Transfektionskomplexe mit einem Plasmid ausbildet, die wiederum durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Auch hiernach konnte keine erfolgreiche Transfektion in Flot2-KO HaCaT (siehe Abbildung 12) nachgewiesen werden.

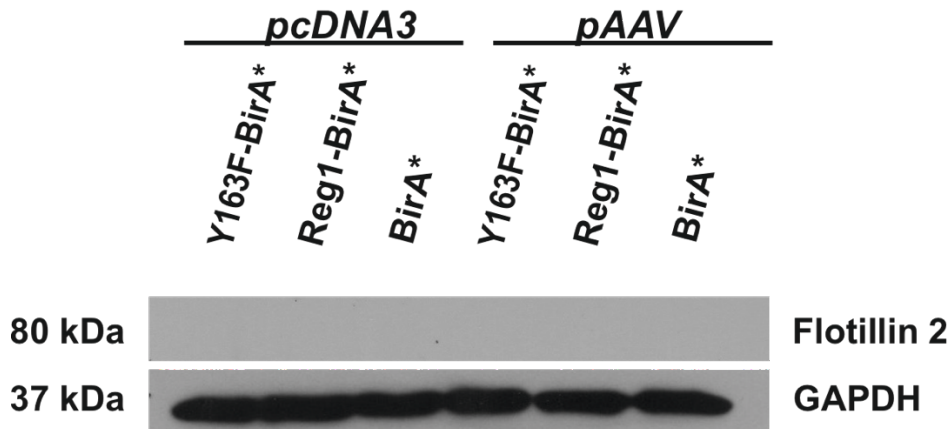


Abbildung 12: Western Blot der Flot2-KO HaCaT-Zellen mit fehlendem Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.

Flot2-KO HaCaT-Zellen wurden transfiziert, kultiviert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte mit 1,4 µg der jeweiligen DNA in insgesamt 100 µl Viromer® RED Transfektionspuffer. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt. Die Expression der Fusionsproteine konnte nicht nachgewiesen werden. Bei 80 kDa sind entsprechend keine Banden zu sehen. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

4.3.3 MDA-MB-231-Zelllinie

MDA-MB-231 Zellen sind humane Brustkrebszellen, die von einer 51-jährigen Patientin gewonnen wurden (Cailleau et al., 1974). Bei dieser Zelllinie fehlen die Chromosomen 8 und 15, damit sind sie aneuploid (Satya-Prakash et al., 1981). Da diese Epithelzellen sind, die einen stabilen Zellverband ausbilden, ist man davon ausgegangen, dass sie sich dadurch auch zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten eignen.

Die Zellen wurden mittels MACSfectin® mit GFP-pAAV transfiziert. Dabei wurden 3 bzw. 4 µl MACSfectin® zu 1 µg DNA verwendet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz weist besonders bei 4 µl MACSfectin® Transfektionsreagenz eine gute Effizienz der Transfektion auf. Dies ist in Abbildung 13 zu sehen.

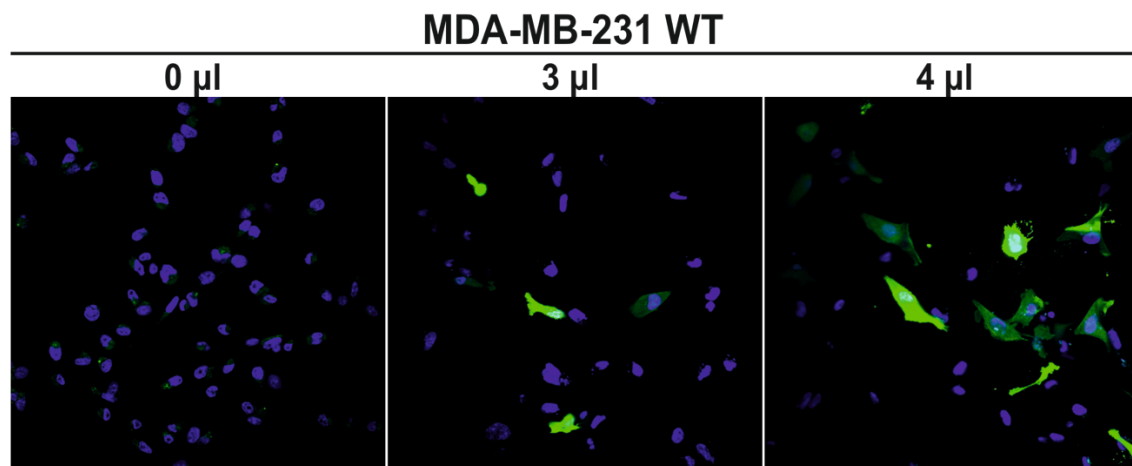


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Wildtyp MDA-MB-231-Zellen nach Transduktion.

MDA-MB-231-Zellen wurden jeweils mit 3 μ l bzw. 4 μ l MACSfectin[®] und je 1 μ g GFP-DNA transfiziert, kultiviert und anschließend fixiert. Es ist ein positives Signal sowohl für DAPI (blau) als auch für GFP (grün) zu sehen. Bei einer Menge von 3 μ l sind bereits GFP-positive Zellen zu sehen. Bei 4 μ l nimmt die Transfektionsrate etwas zu. Die DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

Des Weiteren wurde eine Transfektion mit den zu untersuchenden Konstrukten ebenfalls mit 4 μ l MACSfectin[®] Transfektionsreagenz und 1 μ g jeweiligen DNA durchgeführt. Die Expression von Y163F-BirA* auf pcDNA3 ist deutlich nachweisbar, während Reg1-BirA* auf pcDNA3 einen schwächeren Nachweis zeigt. Die Expression der Konstrukte auf pAAV konnte nicht ausreichend nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt den Western Blot nach entsprechender Immundetektion.

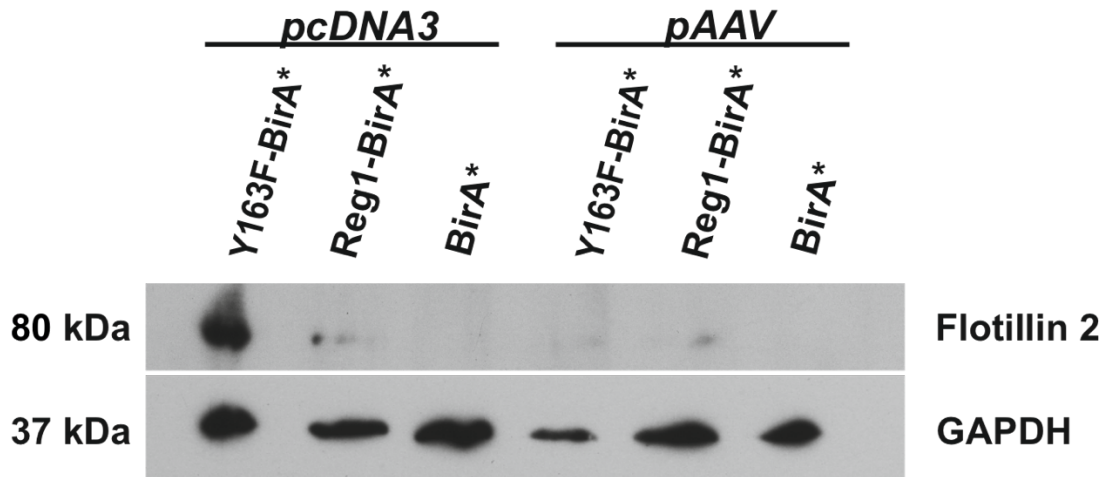


Abbildung 14: Western Blot der MDA-MB-231-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.

MDA-MB-231-Zellen wurden transfiziert, kultiviert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 4 μ l MACSfectin[®] und 1 μ g der jeweiligen DNA jeweils auf pAAV- und pcDNA3-Vektoren. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt. Bei 80 kDa ist das Fusionsprotein Y163F-BirA* auf pcDNA3 nachweisbar, während Reg1-BirA* nur schwach nachgewiesen werden konnte. Bei BirA*, der Negativkontrolle, ist keine Bande zu sehen. Der Nachweis der Fusionsproteine auf pAAV konnte nicht ausreichend erbracht werden, da nur sehr schwache Banden zu sehen sind. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

Auch hier reicht die Transfektionsrate nicht aus, um weitere Experimente mit dieser Zelllinie durchzuführen. Darüber hinaus hat sich im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, dass der Epithelverband sehr weitmaschig ist, was die Anwendung dieser Zelllinie zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten weiter einschränkt.

4.3.4 MCF7-Zelllinie

Auch die MCF7 Zellen sind humane Brustkrebszellen. Sie stammen von einer 69 Jahre alten Frau (Soule et al., 1973). Die MCF7 Zellen bilden als Epithelzellen einen kompakten Zellverband und eignen sich damit gut zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten.

Eine stabile Transfektion war, wie bei der HaCaT-Zelllinie, auch hier nicht möglich. Daher wurde auch hier die Methode der Transduktion angewandt. Zunächst wurde auch hier das GFP-pAAV transduziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Mengen der Viruspartikel wurden aus Erfahrung höher als bei der HaCaT-Zelllinie gewählt. Die

Effizienz der Transduktion ist höher als bei der HaCaT-Zelllinie, was aber möglicherweise auf die erhöhten Mengen der Viren zurückzuführen ist. Das Ergebnis hierzu ist in Abbildung 15 zu sehen.

Damit eignet sich diese Zelllinie für weitere Versuche hinsichtlich der Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten. Hierfür müsste man jedoch eine Flot2-Knockout Zelllinie herstellen, die zum Zeitpunkt dieser Untersuchung nicht zur Verfügung stand.

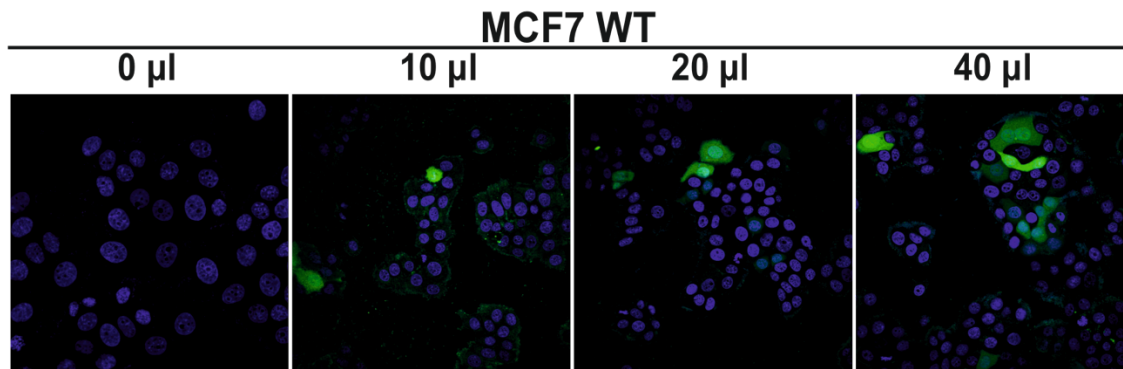


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in MCF7-Zellen nach Transduktion. MCF7-Zellen wurden mit GFP-AAV-Partikeln transduziert, kultiviert und anschließend fixiert. Es ist ein positives Signal sowohl für DAPI (blau) als auch für GFP (grün) zu sehen. Die Menge an Viruspartikeln zur Transduktion wurde linear um 10 µl erhöht. Zellen, die GFP exprimieren, sind grün markiert. Ab einer Menge von 10 µl sind die ersten GFP-positiven Zellen zu sehen. Ein Anstieg der Transduktionsrate mit steigender Menge an Virus-Partikeln ist zu erkennen. Die DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

4.4 Nachweis der Interaktion von Flot2-Fusionsproteinen mit endogenem Flot1

Ein konventionelles Verfahren zum Nachweis einer Interaktion von Proteinen stellt die Co-Immunpräzipitation (CoIP) dar. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Interaktion der Fusionsproteine mit Flot1 in Flot2-KO HEK Zellen analysiert. Dabei ging es insbesondere darum, dass die Fusionsproteine mit Flot1 interagieren. Hierzu wurden sowohl die Proben der CoIP als auch die Proben der entsprechenden Lysate auf einem Western Blot mittels Immundetektion dargestellt. In den Lysaten wurden so in jeder Probe die Fusionsproteine als auch endogenes Flot1 nachgewiesen. Dadurch ist davon auszugehen, dass sowohl die Fusionsproteine als auch das endogene Flot1 exprimiert

werden. Nur dann ist auch das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation zu verwerten. Transfiziert wurden die Fusionsproteine zuvor auf jeweils unterschiedlichen Vektoren: pcDNA3 (siehe Abbildung 16 A) und pAAV (siehe Abbildung 16 B). Bei der Co-Immunpräzipitation wurde Flot2 präzipitiert, und Flot1 sollte dabei kopräzipitieren. Als Negativkontrolle wurde auch hier wieder die reine Biotinligase BirA*, die zuvor transfiziert wurde, verwendet.

Die Kopräzipitation von endogenem Flot1 war mit den Fusionsproteinen auf dem Vektor pcDNA3 erfolgreich. Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnte gezeigt werden, dass sowohl Y163F-BirA* als auch Reg1-BirA* Bindungspartner für endogenes Flot1 der Flot2-KO HEK Zelllinie darstellen. Dabei scheint es zu einer etwas ausgeprägteren Interaktion zwischen Reg1-BirA* mit Flot1 als mit der Mutante Y163F-BirA* zu kommen. Dies wurde bereits mit Flot2-EGFP Fusionsproteinen gezeigt (Babuke et al., 2009). Im Rahmen der CoIP wurden darüber hinaus noch unspezifische Banden bei etwa 70 kDa sichtbar. Hierbei handelt es sich möglicherweise um die schweren Ketten der IgG-Antikörper, die für die Immunpräzipitation verwendet wurden.

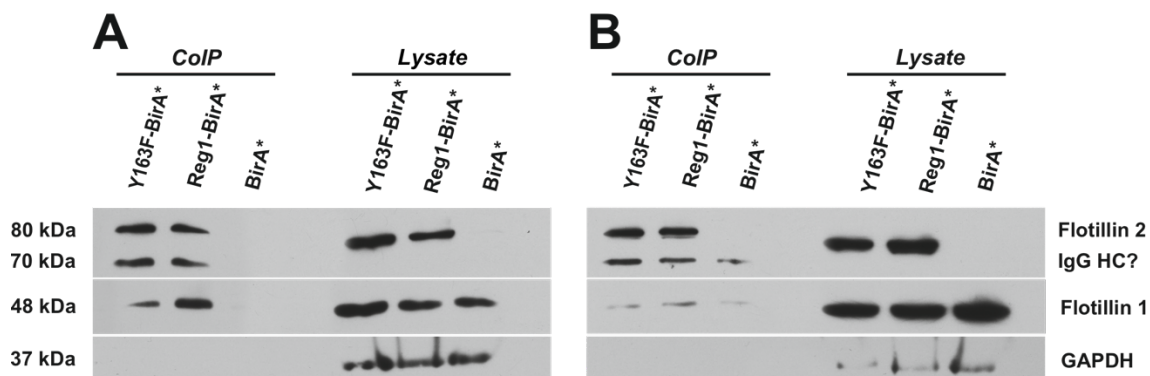


Abbildung 16: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine bzw. von Flot1 auf dem pcDNA3-Vektor (A) und dem pAAV-Vektor (B) nach CoIP und in Lysaten.

Flot2-KO HEK-Zellen wurden transfiziert, kultiviert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 6 μ l MACSfectin[®] und 3 μ g der jeweiligen DNA jeweils auf pAAV- (A) und pcDNA3-Vektoren (B). Es wurde je 1 mg Lysat für die Immunpräzipitation verwendet, die mit Anti-Flot2-Antikörpern durchgeführt worden, wobei Flot1 kopräzipitieren sollte. Zur Kontrolle wurden Lysate verwendet. Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Anti-Flot2- und Anti-Flot1-Antikörpern durchgeführt. Bei 80 kDa sind die Fusionsproteine Y163F-BirA* und Reg1-BirA* jeweils in der CoIP als auch in den Lysaten nachweisbar, während bei BirA*, der Negativkontrolle, keine Bande zu sehen ist. Bei 70 kDa ist eine unspezifische Bande in der CoIP zu sehen, bei der es sich wahrscheinlich um die IgG HC handelt. Die Bande ist bei Y163F-BirA* und Reg1-BirA* auf pcDNA3 nachweisbar, während sie bei allen drei Konstrukten auf pAAV zu sehen ist. Bei 48 kDa ist das endogene

Flot1 nachweisbar. Auf pcDNA3 (A) war das Experiment erfolgreich, während es auf pAAV (B) nicht erfolgreich war, da eine Bande in der Negativkontrolle, bei *BirA** zu sehen ist, die darüber hinaus höher liegt als die anderen Banden. Bei 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

4.5 Etablierung der BioID zur Darstellung des Interaktoms von Flot2 in Flot2-Knockout-HEK

Zur Darstellung des Interaktoms von Flot2 wurde die Methode der BioID (Roux et al. 2012) gewählt. Hierzu wurde nicht die spezifische Biotinligase BirA verwendet, sondern die unspezifische Biotinligase BirA* (Rhee & Schulman, 2004). Diese biotinyliert Proteine in der Nähe jener Fusionsproteine und ist nicht von einer bestimmten Ziel-Sequenz für die Biotinylierung seiner Substrate abhängig. Dabei ist der Aktivitätsradius nicht vollständig geklärt, liegt aber schätzungsweise bei 20-30 nm für mindestens 50% aller biotinylierten Proteine (Roux et al., 2012).

Zur Etablierung der Methodik wurden zunächst verschiedene Zellmodelle erprobt. Das priorisierte Modell der hTert musste dabei verworfen werden, da eine stabile Transfektion sowie eine ausreichende Expression der Fusionsproteine nicht erreicht werden konnte. Darüber hinaus standen zum Untersuchungszeitpunkt keine Flot2-KO hTert-Zellen zur Verfügung. Auch HaCaT-Zellen mussten aus den bereits genannten Gründen verworfen werden. Die MDA-MB-231 Zelllinie konnte nicht verwendet werden, da die Zellverbände zu weitmaschig für die Untersuchung der Zelladhäsion waren und die Transfektionsrate niedrig blieb. Zuletzt bestand die Möglichkeit die MCF7 Zelllinie zu verwenden. Allerdings standen hier zum Untersuchungszeitpunkt keine Flot2-KO Zellen zur Verfügung. Somit wurde zur Etablierung der BioID die Flot2-KO HEK293T-Zelllinie angewandt, da diese im Vergleich mit den anderen genannten Zelllinien eine gute Transfektionsrate aufwies und damit auch eine entsprechende Expression der benötigten Fusionsproteine.

Zunächst wurden die Flot2-Fusionsproteine und das BirA* in die Flot2-KO-HEK Zellen transfiziert und darin exprimiert. Diese wurden anschließend über 24 Stunden mit 2,4 µg/ml Biotin behandelt, sodass eine ausreichende Biotinylierung stattfinden konnte. Die nun biotinylierten Proteine lassen sich mittels Streptavidin Kügelchen isolieren. In diesem Versuch wurde parallel zum vorangegangenen Versuch versucht, zunächst die exprimierten Flot2-Fusionsproteine und das biotinylierte Flot1 nachzuweisen. Die

Negativkontrolle wurde mit Ansätzen ohne Biotin durchgeführt. Parallel wurde auch ein Proteinnachweis in den Lysaten durchgeführt. Hier sollten die Fusionsproteine als auch endogenes Flot1 und GAPDH nachweisbar sein.

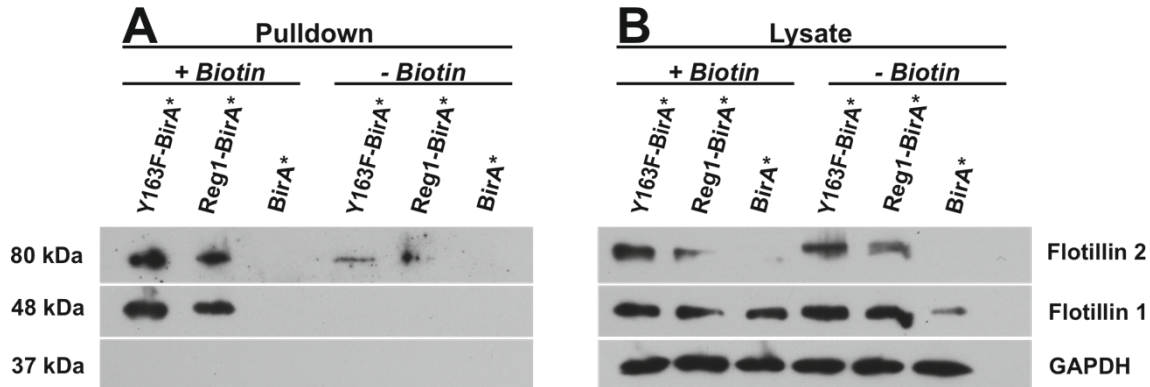


Abbildung 17: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine bzw. Flot1 im Pulldown (A) und in Lysaten (B) nach BioID.

Flot2-KO HEK-Zellen wurden transfiziert, kultiviert und anschließend lysiert. Es wurde je 1 mg Lysat verwendet. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 6 µl MACSfectin® und 3 µg der jeweiligen DNA auf pcDNA3-Vektoren. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Biotin (+*Biotin*) oder nicht (-*Biotin*). Die Immundetektion wurde nach der SDS-Page und dem Western Blot mit Flot2- und Flot1-Antikörpern durchgeführt. Die biotinylierten Fusionsproteine Y163F-BirA* und Reg1-BirA* wurden mittels eines Pulldowns (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, siehe A) isoliert und konnten bei 80 kDa nachgewiesen werden (+*Biotin*). Bei 48 kDa ist das endogene Flot1 nachweisbar. Dieses ist im Pulldown durch die vorangegangene Biotinylierung bei der Interaktion mit Flot2 nachweisbar (+*Biotin*), während es ohne Biotin (-*Biotin*) nicht nachgewiesen werden konnte. Unter A ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle bei 37 kDa ist negativ ausgefallen. In den Lysaten (B) wurden die Fusionsproteine nachgewiesen, während bei BirA*, der Negativkontrolle, keine Bande zu sehen ist. Das endogene Flot1 ist bei 48 kDa, wie auch das GAPDH bei 37 kDa als Ladekontrolle in jedem Fall nachgewiesen.

Im Versuch konnte gezeigt werden, dass Flot1 mit den Flot2-Fusionsproteinen interagiert und somit, sofern Biotin im Medium vorhanden war, biotinyliert wurde (siehe Abbildung 17 A). Ohne Biotin war kein Flot1 in den Pulldowns nachweisbar, während die Fusionsproteine exprimiert und durch das im Nährmedium in geringer Menge vorhandene Biotin auch biotinyliert wurden. Es ist also davon auszugehen, dass sich die Flot 2-Fusionsproteine selbst biotinylieren und damit in den Pulldowns nachweisbar sind. Dies deckt sich mit der Annahme, dass Flot2-Proteine Oligomere bilden (Babuke et al., 2009). Es konnte im Versuch mit dem Pulldown auch kein

GAPDH nachgewiesen werden. Eine Interaktion von GAPDH mit Flot2 ist bisher nicht bekannt, somit bestätigt mein negatives Ergebnis die korrekte Durchführung der BioID. In den Lysaten hingegen (siehe Abbildung 17 B) ist endogenes Flot1 in allen Fällen nachgewiesen worden. Gleichmaßen wurde auch hier die Expression der Fusionsproteine bestätigt. Als Negativkontrolle wurde im Rahmen beider Ergebnisse auch wieder BirA* verwendet.

5. Diskussion

Die Rolle der Flotilline in der Zelladhäsion ist bereits länger bekannt (Chartier et al., 2011; Kurrle et al., 2013). Allerdings beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit den Zusammenhängen zwischen Desmosomen und Flotillinen, insbesondere geht es dabei um die Interaktionen von Flotillinen mit desmosomalen Proteinen in Keratinozyten. Nachdem ein Zusammenhang zwischen Flotillinen und Adhärenzkontakten nachgewiesen werden konnte, wurde schließlich auch eine Interaktion im Rahmen von desmosomalen Haftkontakten nachgewiesen (Bodin et al., 2014; Kurrle et al., 2013; Völlner et al., 2016). Bei Desmosomen konnte sogar ein Adhäsionsverlust gezeigt werden, sobald eine verminderte Expression von Flotillin 2 vorlag (Völlner et al., 2016). Der Adhäsionsverlust, der durch das Fehlen von Flotillin 2 in der HaCaT Zelllinie entstanden ist, war vergleichbar mit dem Adhäsionsverlust, der durch die Wirkung von PV-IgG beim Pemphigus vulgaris entsteht. Zurückzuführen ist dies auf die Interaktion von Flot2 mit Dsg1 und Dsg 3 (Völlner et al., 2016). Da das Adhäsionsvermögen von Desmosomen calciumabhängig ist (Beckert et al., 2019; Nekrasova & Green, 2013), wurde im Rahmen meiner Arbeit untersucht, wie sich Flotillin 2 bzw. dessen Lokalisation in humanen Keratinozyten (hTert-Zellen) bei unterschiedlichen Calciumspiegeln verändert. Dabei konnte ich zeigen, dass Flotillin bei niedrigen Calciumspiegeln wie 0,05 mM hauptsächlich perinukleär angeordnet ist und bei erhöhten Calciumspiegeln wie 2 mM vermehrt im Bereich der Zell-Zell-Kontakte zu finden ist. Die Verbindung zwischen der Calciumkonzentration und Flotillin 2 Lokalisation betont damit auch die Bedeutung von Flotillin 2 für das Adhäsionsvermögen von Desmosomen in Keratinozyten. Dennoch sollte beachtet werden, dass diese Ergebnisse abhängig vom angewandten Zellmodell sind, da Untersuchungen der Lokalisation von Flotillinen in unterschiedlichen Zelltypen auch unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen (Kurrle et al., 2013). Es kann also angenommen werden, dass die Funktion der Flotilline im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion vom Zelltypus abhängt (Guillaume et al., 2013; Kurrle et al., 2013; Solis et al., 2012). Dieser Fakt liefert einen spezifischen Zusammenhang zwischen Flotillin 2 und Keratinozyten. Daher lag der Fokus in dieser Arbeit unter anderem darauf, zunächst ein geeignetes Zellmodell, bevorzugt eine Keratinozyten-Zelllinie, zu finden. Die gesuchte Zelllinie sollte ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten darstellen und damit als Zellverband mit der menschlichen Epidermis vergleichbar sein.

Flotilline spielen auch eine indirekte Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose (Babuke et al., 2009; Schneider et al., 2008; Sorkina et al., 2013). Die Änderung der Lokalisation bei Änderungen der Calciumkonzentration im Rahmen meiner Ergebnisse deutet ebenfalls auf eine Funktion von Flot2 bei Transportprozessen hin. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass Flot2 seine Lokalisation durch PV-IgG ändert. Es ist nicht mehr an der Zellmembran zu finden, sondern liegt ungeordnet in der Zelle vor (Völlner et al., 2016). Hierbei gilt es zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zu der von PV-IgG ausgelösten Endozytose von Dsg3 und der geänderten Lokalisation von Flotillinen im Rahmen des Pemphigus vulgaris gibt, und wenn dem so ist, in welchem Ausmaß Flotilline möglicherweise daran beteiligt sind. Es ist durchaus möglich, dass die Abwesenheit von Flotillinen zu einer verstärkten Internalisierung von Dsg3 führt und somit eine stärkere Akantholyse auslöst. Eine Veränderung des Flot2 könnte jedoch auch zu einer milderen Akantholyse führen, wenn man dem Flot2 eine tragende Rolle als Vermittler der Interaktion zwischen den PV-IgG und dem Dsg3 zuspricht. Das in dieser Untersuchung verwendete Flot2-Fusionsprotein Y163F-BirA* stellt so ein verändertes Flotillin 2 dar, da hier das funktionell wichtige Tyrosin an Stelle 163 durch Phenylalanin ausgetauscht wurde und somit nicht mehr phosphoryliert werden und nicht mehr an bestimmten Signalkaskaden (z.B. des EGF-Rezeptors) teilnehmen kann (Neumann-Giesen et al., 2007). Dieses und weitere Fusionsproteine würden sich für die oben genannte Untersuchung mit PV-IgG eignen. So könnte man weitere mögliche Zusammenhänge von Flotillin 2 mit PV-IgG mittels BioID darstellen. Die BioID wurde in dieser Arbeit als geeignete Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern oder zum Nachweis von bestimmten Interaktionen etabliert. Zunächst sollte man Interaktionspartner unter physiologischen Bedingungen identifizieren, um damit auch potenzielle pathologische Angriffspunkte zu erkennen. Denn nur durch die Kenntnis der physiologischen Interaktionspartner definiert sich eine mögliche Liste von pathologischen Dreh- und Angelpunkten. Diese können dann im Rahmen von pathologischen Prozessen untersucht werden, um ihnen eine entsprechende Rolle zuzuteilen. Dadurch könnte die Rolle von Flotillinen im Rahmen von pathologischen Prozessen besser verstanden werden.

5.1 Flot2-Mutanten in verschiedenen Zellmodellen

Da Y163 als eine der Hauptregulationsstellen im Flot2 identifiziert wurde, war es ein Ziel zunächst die Auswirkungen einer Mutation an dieser Stelle zu untersuchen (Babuke et al., 2009; Neumann-Giesen et al., 2007). Hierfür wurde das Tyrosin in der Proteinsequenz durch ein Phenylalanin ausgetauscht. Damit kann das Y163F nicht phosphoryliert und das mutierte Flot2-Protein nicht endozytiert werden (Babuke et al., 2009; Neumann-Giesen et al., 2007).

Die Folgen dieser Mutation können in Untersuchungen zu Zusammenhängen mit Pemphigus vulgaris vielseitig sein. Es ist beispielsweise nicht auszuschließen, dass es zu einer Hemmung in der Wirkung von PV-IgG kommt, da eine Endozytose des mutierten Flot2 entsprechend nicht mehr möglich ist. Anderenfalls ist es jedoch auch möglich, dass das Desmosom durch die Mutation des Flot2 eine noch größere Instabilität erfährt, und die Wirkung der Autoantikörper noch weiter potenziert wird. Dies gilt es noch zu untersuchen. Im Rahmen meiner Arbeit habe ich einen Vergleich zwischen dem Fusionsprotein des Wildtyps von Flot2, Reg1-BirA*, und der Mutante Y163F-BirA* hinsichtlich deren Interaktion mit endogenem Flot1 gezogen. Hier deutet sich bereits an, dass Y163F-BirA* weniger mit Flot1 interagiert. Letztendlich wäre eine Weiterführung meiner Arbeit herauszufinden mit welchen Proteinen die Y163F-Mutante im Vergleich zum Wildtyp interagieren kann und mit welchen nicht.

Beckert et al. stellten 2019 die hTert Keratinozyten als eines der am besten geeigneten Zellmodelle zur Untersuchung von desmosomaler Adhäsion bzw. von Pathologien in diesem Zusammenhang heraus (Beckert et al., 2019). Meine Versuche im Zellmodell der hTert waren jedoch erfolglos, da eine stabile Transfektion mit entsprechender Proteinexpression nicht möglich war. Neben der Methode der Lipofektion wurden ebenfalls Transduktionen mittels AAV-Partikeln durchgeführt. Die Mengen der hergestellten Viren im Transduktionsreagenz konnten jedoch auf Grund der im Labor noch nicht etablierten Methodik nicht quantifiziert werden. Daher wurde immer ein definiertes Volumen der Viruspartikel (AAV) für die Experimente verwendet, damit die Ergebnisse vergleichbar sind.

Um Interaktionen von Flot2 mit endogenem Flot1 oder anderen Proteinen darzustellen, war ein Zellmodell mit einer Flot2-Knockout-Variante notwendig. Nur auf diese Weise konnte man sicher sein, dass der Nachweis von Flot1 oder anderen Proteinen darauf

beruht, dass zuvor eine Interaktion der Fusionsproteine damit stattfand und nicht mit endogenem Flot2. Flot2-Knockout Zellen waren damit unabdinglich, um die Interaktionen der Flot2-Mutanten korrekt zu analysieren. Zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen standen jedoch keine Flot2-Knockout hTert-Zellen zur Verfügung. Da aber Flot2-Knockout Zellen der Zelllinie HaCaT vorhanden waren, wurden die Hauptversuche zunächst in HaCaT-Keratinocyten durchgeführt. Die Transfektion war jedoch auch in diesem Zellmodell nicht effizient genug. Die transiente Transfektion scheiterte aufgrund einer zu geringen Transfektionsrate. Die stabile Transfektion hingegen funktionierte anfangs gut, die Expression der Proteine nahm dann aber stetig ab. Da eine Resistenz aber weiterhin nachweisbar war, muss davon ausgegangen werden, dass die Expression ausgeschaltet wurde. Da eine ausreichende Expression von Flot2-GFP mittels Immunfluoreszenz ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte, ist dies sehr wahrscheinlich auf den CMV Promotor des genutzten Vektors zurückzuführen (Brooks et al., 2004). Dieser muss eine Unterdrückung der Expression hervorrufen, die wahrscheinlich einer Methylierung der transfizierten DNA zu Grunde liegt (Osterlehner et al., 2011; Yang et al., 2010). Dennoch war es möglich, mittels Transduktion durch AAV einen Nachweis für die Expression von Reg1-BirA* zu erbringen. Dadurch bestätigt sich, dass nicht die Methode der Transfektion die Ursache für die geringe Expression der Proteine in den stabil transfizierten Zellen ist, sondern viel mehr die Repression durch die Promotorregion des Vektors. Zur Lösung dieser Problematik kann also ein anderer Vektor / Promotor für die Erstellung der Plasmide verwendet werden. Nach weiteren Versuchen mit MDA-MB-231 und MCF7 Zellen stellten sich vor allem MCF7, neben HaCaT und hTert, als weiteres mögliches Zellmodell heraus. Sie stellen sich im Gegensatz zu MDA-MB-231 als kompakter Zellverband dar und verfügen damit über ausreichende Adhäsionsstrukturen, um die desmosomale Adhäsion untersuchen zu können. MDA-MB-231 bilden einen losen Zellverband aus, bei dem die Zell-Zell-Adhäsion entsprechend schwach ausgeprägt ist. Daher eignen sie sich wenig als Zellmodell.

Für weitere Untersuchungen sind zusammenfassend hTert Keratinocyten und MCF7 Epithelzellen, wobei hier noch Flot2-KO Zelllinien generiert werden sollten, und HaCaT Keratinocyten geeignet. Für ergänzende Versuche in hTert und HaCaT Keratinocyten muss jedoch zunächst eine stabile Transfektionsmethode für die dauerhafte Expression von Flot2-Mutanten etabliert werden.

5.2 Lokalisation von Flot2 in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Neben der Interaktion konnte auch eine Co-Lokalisation von Dsg3 und Flot2 bei einer entsprechenden Änderung der Calciumkonzentration in zellulärem Medium nachgewiesen werden (Beckert et al., 2019). Die Umverteilung von Flotillin 2 bei höheren Calciumkonzentrationen zu den Zell-Zell-Grenzen hin wurde im Rahmen dieser Arbeit nochmals durch entsprechende Versuche im hTert Zellmodell bestätigt. Darüber hinaus wurde auch untersucht, ob die Calciumkonzentration einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Flot1 und Flot2 ausübt und ob die Expression von Flot2 dadurch beeinflusst wird.

Im Vordergrund stand einen möglichen Einfluss von Calcium auf die Oligomerisierung von Flot1 und Flot2 zu verifizieren bzw. dies als möglichen Störfaktor bei weiteren Untersuchungen auszuschließen. Hierbei ging es auch um den Grad der Oligomerisierung. Da Flot2 in Immunfluoreszenzfärbungen bei höheren Calciumkonzentrationen an der Plasmamembran zu finden ist und Flot1 dies nicht ist, war man in der Annahme, dass die Oligomerisierung sich bei unterschiedlicher Calciumkonzentration auch entsprechend anders verhält (Beckert et al., 2019). Eine Begründung dafür könnte darin liegen, dass die verfügbaren Flot1-Antikörper nicht in der Lage sind, die Lokalisierung korrekt anzuzeigen. Eine Calcium-abhängige Änderung in der Oligomerisierung ist jedoch nach meinen Ergebnissen nicht nachweisbar. Hohe Calciumkonzentrationen korrelieren ebenfalls mit der Differenzierung von Keratinozyten, erhöhter Expression von Desmogleinen und damit der Bildung von Desmosomen (Beckert et al., 2019). In hTert Zellen konnte ich zeigen, dass Flot1 bei 0,05 mM CaCl_2 gleichermaßen mit Flot2 interagiert wie bei 2 mM CaCl_2 . Parallel dazu konnte im gleichen Zellmodell auch kein oder nur ein sehr geringer Einfluss der Calciumkonzentration auf die Expression festgestellt werden. Damit beschränkt sich der Einfluss der Calciumkonzentration zunächst nur auf die Lokalisation von Flot2 in hTert Zellen. Es konnte also, bezogen auf die Calciumkonzentration, weder ein Einfluss auf die Interaktion zwischen den beiden Flotillinen noch ein Einfluss auf die Expression von Flot2 nachgewiesen werden. In Bezug auf Pemphigus vulgaris wurde bereits gezeigt, dass durch die Wirkung von PV-IgG die Endozytose von Flot2 in HaCaT Keratinozyten beobachtet werden kann (Völlner et al., 2016). Auch die Interaktion zwischen Flot2 und Dsg3 und die diffuse

Verteilung von sowohl Flot2 als auch Dsg3 nach Zugabe von PV-IgG sollte man weiter untersuchen. Denkbar wäre beispielsweise, dass die Endozytose von Flot2, ausgelöst durch PV-IgG, verhindert werden könnte, und man damit möglicherweise auch die Änderungen der Lokalisation von Dsg verhindert. Eine Untersuchung wäre mit Hilfe der Mutante Y163F gut möglich, da diese nicht endozytiertbar ist (Neumann-Giesen et al., 2007).

5.3 Interaktion von Flot2-Mutanten mit endogenem Flot1

Die Interaktion in Form einer Heterodimerisierung bzw. einer Oligomerisierung zwischen den endogen exprimierten Varianten von Flot1 und Flot 2 ist bereits mehrfach nachgewiesen worden (Neumann-Giesen et al., 2004; Solis et al., 2007). Diese wird auch als Voraussetzung für eine Bindung an die zelluläre Plasmamembran verstanden. Daneben spielt die Oligomerisierung auch bei der Endozytose von Flotillinen selbst eine große Rolle (Babuke et al., 2009; Solis et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es zunächst zu überprüfen, ob das Fusionsprotein Y163F-BirA* trotz seiner Mutation mit endogen exprimiertem Flot1 interagiert. Da ggf. eine AAV-vermittelte Transduktion durchgeführt werden sollte, wurden entsprechend Konstrukte zum einen auf pcDNA3 und zum anderen auf pAAV Vektoren verwendet. Da für diesen Versuch eine hohe Transfektionsrate und eine damit einhergehende hohe Proteinexpression nötig war, wurde die Transfektion in Flot2-KO HEK Zellen durchgeführt.

Aufgrund des angewandten Verfahrens der Co-Immunpräzipitation ist von einer relativ starken Bindung zwischen Flot2 und Flot1 auszugehen. Im Rahmen der Versuche auf den pcDNA3-Vektoren konnte gezeigt werden, dass auch eine Interaktion der veränderten Flot2-Konstrukte mit endogen exprimiertem Flot1 stattfindet. Das gilt sowohl für die Y163F-Mutante als auch für den Flot2-Wildtyp. Die Menge an Flot1, die mit Flot2 interagiert hat, war dabei scheinbar etwas größer als die Menge, die mit Y163F-BirA* interagiert hat. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Babuke et al. aus dem Jahr 2009 (Babuke et al., 2009). Hinsichtlich der Mutante Y163F-BirA* ist also von einer Beeinträchtigung der Interaktion durch die Mutation auszugehen. Durch die Biotinligase selbst ist aber keine Interferenz in der Heterodimerisierung der Flotilline zu erwarten. Die Versuche mit den pAAV-Vektoren führten nicht zum selben Erfolg, da in

der Negativkontrolle ebenfalls ein Signal beim Flot1 nachweisbar war. Diese lag jedoch etwas höher, daher handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Bande, die aber die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

5.4 Etablierung einer Methode zur Interaktomdarstellung von Flot2

Das Interaktom von Flotillin 2 mit desmosomalen Proteinen mittels Co-Immunpräzipitation darzustellen lässt sich aufgrund der hohen Unlöslichkeit der desmosomalen Proteine nicht durchführen. Mögliche Detergenzien, die zur Lösung jener Proteine verwendet werden können, würden schwache Interaktionen nicht mehr nachweisbar machen. Daher wurde die Methode des Enzym-Labeling, die sogenannte BioID, angewandt (Roux et al., 2012).

Zur Etablierung der Methode der BioID wurde versucht, das zuvor mittels Co-IP erreichte Ergebnis mittels BioID zu reproduzieren, um so zu zeigen, dass die BioID die Voraussetzungen als Methode zur Darstellung des Flotillin-Interaktoms erfüllt. Es wäre also zu erwarten, dass Reg1-BirA* mit dem endogenen Flot1 interagiert und dieses biotinyliert.

Im Rahmen der Versuche konnte ich zeigen, dass Flot1 nach Zugabe von Biotin ins Zellmedium durch die an Flot2 gekoppelte Biotinligase BirA* biotinyliert wurde. Daneben wurden auch die Flot2-Fusionsproteine selbst biotinyliert. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass Hetero-Oligomere und nicht nur Dimere gebildet wurden. Daher ist davon auszugehen, dass mehr als ein Flot2 pro Oligomer vorhanden ist. Die Fusionsproteine Y163F-BirA* und Reg1-BirA* konnten anschließend mittels Streptavidin Kügelchen isoliert und dann mittels Western Blot nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist im Vergleich zur Co-IP nahezu identisch.

Die Flot2-Flot1-Interaktion konnte auch hier im selben Ausmaß nachgewiesen werden wie bei der Co-IP. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode der BioID entsprechend zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin 2 geeignet ist.

Die Darstellung des Interaktoms von Flot2 hilft bei der Aufschlüsselung der vielseitigen Funktionen des Proteins. Bisher ist nicht ausreichend bekannt, inwiefern genau Flotillin 2 an der Homöostase und der Dynamik der Desmosomen beteiligt ist.

Zum einen könnte man in weiteren Versuchen mittels Western Blot bereits in Erwägung gezogene Interaktionspartner, wie Desmogleine oder Desmocolline, nach Biotinylierung

und Pulldown nachweisen, zum anderen ist es aber auch möglich, noch unbekannte und möglicherweise nicht zu erwartende Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie zu identifizieren (Roux et al., 2012). Es gibt auch die Möglichkeit, die verschiedenen Pools der desmosomalen Proteine einander gegenüberstellen, so z.B. den desmosomalen, also Detergenz-unlöslichen Pool gegen den nicht-desmosomalen bzw. Detergenz-löslichen Pool. Diese befinden sich in stetem Austausch (Windoffer et al., 2002). Desmosomale Proteine aus dem Detergenz-löslichen Pool sind dabei alle Cadherine, die mit der Plasmamembran assoziiert sind und noch nicht Bestandteil von Adhäsionskontakten sind. Der Detergenz-unlösliche Pool stellt wiederum die Cadherine dar, die Bestandteile von Desmosomen sind (Stahley et al., 2014). Eine Untersuchung hierzu gäbe einen Aufschluss über die Zusammensetzung von Komplexen zwischen Flotillinen und Desmosomen, da es momentan ungewiss ist, ob Flotilline bevorzugt an den einen oder den anderen Pool binden bzw. ob sie gleichermaßen mit den desmosomalen Proteinen beider Pools interagieren.

Weitergehend kann die BioID auch verwendet werden, um den Einfluss von PV-IgG auf die Interaktionen von Flot2 mit anderen Proteinen zu untersuchen.

Zusammenfassend geht es also darum, die Rolle der Flotilline in der Pathogenese des Pemphigus vulgaris weiter herauszuarbeiten.

5.5 Ausblick

Nach der Etablierung der Methode zur Untersuchung des Interaktoms von Flotillin 2, sollte nun der nächste Schritt die eigentliche Untersuchung sein. Aufgrund der Problematik bzgl. der Transfektion und der Expression der Fusionsproteine im Zellmodell der HaCaT war es im Rahmen meiner Arbeit nicht möglich, eine Interaktion mit Dsg mit BioID zu überprüfen. Sofern die Expression gelingen würde, wäre dies der nächste Schritt. Ein Lösungsansatz hierfür wäre das Verwenden eines geeigneten Vektors mit einem anderen Promotor. Weitere Interaktionspartner von Flot2 könnten dann, wie bereits beschrieben, entweder durch Immunoassays oder eine Massenspektrometrie verifiziert oder identifiziert werden.

Des Weiteren wäre es sinnvoll, auch das Interaktom von Flotillin 1 darzustellen, und dieses mit dem von Flotillin 2 zu vergleichen. Unterschiede oder Gemeinsamkeiten können weitere Untersuchungen nach sich ziehen, die dann die differenzierte Funktion

des jeweiligen Proteins weiter aufschlüsseln. Dadurch lässt sich darstellen, ob eines der Flotilline hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Ansatzes den besseren Angriffspunkt darstellt als das andere.

In Bezug auf Flotillin 1 sollten ebenfalls Untersuchungen in Flot1-KO Zelllinien, analog zu den Untersuchungen in Flot2-KO Zelllinien, in Erwägung gezogen werden. Auch dies hilft ein differenzierteres Bild der beiden Flotillin Proteine zu generieren. Untersuchungen in Doppel-KO Zelllinien können im Zusammenhang mit der Zell-Zell-Adhäsion darüber Aufschluss geben, ob sich nach Zugabe von PV-IgG die Auswirkungen derer noch weiter potenzieren oder ob die Auswirkungen durch das Fehlen der Flotilline sogar milder erscheinen.

Weitergehend sollte man auch die Lokalisation der Interaktion von Flotillinen und desmosomalen Proteinen untersuchen. Hier ist zu differenzieren, ob die Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Proteinpools in Abwesenheit von Flotillinen unterschiedlich ausfällt. Dazu kann man den desmosomalen Pool mit dem nicht-desmosomalen vergleichen, oder den Anteil, der an die Plasmamembran gebunden ist, mit dem, der nicht daran gebunden ist. Diese Vergleiche helfen die Dynamik von Flotillinen und Desmosomen weiter zu verstehen.

Um die Rolle der regulativen Tyrosinreste in Flotillin-2 weiter zu ergründen, können weitere Fusionsproteine mit anderen Flot2-Mutanten mit BirA* generiert werden: Zum einen 6xYF-BirA*, bei dem alle Tyrosinreste in Phenylalanin geändert wurden außer Tyr 28 und Tyr 163, und zum anderen 7xYF-BirA*, bei dem alle Tyrosinreste außer Tyr 28 in Phenylalanin mutiert wurden. Besonders 6xYF-BirA* kann Aufschlüsse hinsichtlich der Funktion von Tyr 163 im Zusammenhang mit desmosomaler Adhäsion geben.

6. Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris ist eine schwere Autoimmunerkrankung, die durch eine Blasenbildung in der Haut und in den Schleimhäuten charakterisiert ist. Die Blasenbildung ist auf eine Akantholyse, d.h. eine Dissoziation des Epithelverbands, zurückzuführen. Diese wird durch Autoantikörper vom Typ IgG, auch PV-IgG genannt, ausgelöst, die vor allem gegen Desmoglein 3 gerichtet sind. Bei Desmogleinen handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, die speziell bei Desmosomen vorkommen. Man unterscheidet hier die Isoformen 1 bis 4. Letztendlich führt die Bindung der PV-IgG an das Desmoglein 3 zu einer Zerstörung von Desmosomen. Desmoglein 3 interagiert unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Funktion von Desmosomen zusammen mit Plakoglobin mit den Flotillinen.

Die Flotillin-Familie besteht aus zwei Proteinen: Flotillin 1 und 2, wobei letzteres in dieser Arbeit untersucht wurde. Flotilline sind hochkonservierte und ubiquitär exprimierte Proteine. Durch Oligomerisierung und zusätzliche Palmitoyl- bzw. Myristoylreste sind sie in der Lage, an die Plasmamembran zu binden. Sie spielen beispielsweise eine Rolle im Signalweg des EGF-Rezeptors und der Clathrin-vermittelten Endozytose.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, eine Methode zu etablieren, um das Interaktom von Flot2 darzustellen, sowie ein geeignetes Zellmodell für weitere Untersuchungen zu identifizieren. Mit Hilfe von Immunassays wurde zunächst die Klonierung und Expression von Flot2-Fusionsproteinen nachgewiesen; hierzu gehören Y163F-BirA* und Reg1-BirA*. Bei ersterem wurde ein Tyrosin an der 163. Stelle in der Aminosäuresequenz des Flot2 durch ein Phenylalanin ausgetauscht, letzteres stellt den Wildtyp von Flot2 dar. Y163 stellt im Flot2 eine wichtige Phosphorylierungsstelle dar und ist damit für die Regulation seiner Funktion wichtig. Beide wurden mit einer bakteriellen Biotinligase fusioniert, wodurch Interaktionspartner von Flot2 anhand ihrer Biotinylierung identifiziert werden können. Unter Zuhilfenahme der Methodik der BioID konnte die Interaktion bei der Flot2-Mutanten mit Flotillin 1 in gleichem Ausmaß nachgewiesen werden wie zuvor mit der Methodik der Co-Immunpräzipitation. Damit eignet sich die BioID zur Untersuchung des gesamten Interaktoms. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression der Flot2 sowie dessen Interaktion mit endogenem Flotillin 1 in hTert Zellen unabhängig vom Calciumgehalt ist. Lediglich die Lokalisation von Flot2 ändert sich, sodass es bei intrazellulären Calciumspiegeln von 2

mmol/l vor allem an der Plasmamembran lokalisiert ist, während es bei Spiegeln von 0,05 mmol/l perinukleär lokalisiert ist. Darüber hinaus konnten die Zelllinien hTert, HaCaT sowie MCF7, als Flot2-Knockout Varianten, als die vielversprechendsten Zellmodelle für weitere Untersuchungen identifiziert werden.

7. Summary

Pemphigus vulgaris is a severe autoimmune disease characterized by blistering of the skin and the mucosa. The blistering is caused by the process of acantholysis, which describes the dissociation of the epithelial layer. This is triggered by auto-antibodies of the type IgG, also known as PV-IgG, which are directed against desmoglein 3.

Desmogleins are transmembrane glycoproteins that are associated with desmosomes. Four different isotypes of Dsg are known. The binding of PV-IgG results in weakening of desmosomal adhesion.

Desmoglein 3 interacts under physiological conditions together with plakoglobin with proteins known as flotillins. The flotillin family consists of two proteins: flotillin 1 and 2, of which the latter was investigated in this study. Flotillins are highly conserved and ubiquitously expressed proteins that are able to attach to the plasma membrane by oligomerization and palmitoyl or myristoyl residues. They play a role in the signaling pathway of the EGF receptor and in clathrin-mediated endocytosis.

The aim of this work was to establish a method to visualize the interactome of Flot2 and to identify a suitable cell model for further investigations. Immunoassays were first used to verify cloning and expression of Flot2 fusion proteins, including Y163F-BirA* and Reg1-BirA*. In the former, a tyrosine at the 163rd position in the amino acid sequence of Flot2 was replaced by a phenylalanine. Y163 represents an important phosphorylation site in Flot2 and is therefore important for the regulation of its function. WT and Y163F mutant were fused with a bacterial biotin ligase, so that interaction partners of Flot2 can be identified based on their biotinylation. Using the BioID method, the interaction of both Flot2 protein variants with flotillin 1 could be detected to the same extent as with the method of the Co-Immunoprecipitation.

Therefore, the BioID is suitable for the analysis of the entire interactome of Flot2.

Furthermore, it was shown that the expression of Flot2 and its interaction with the endogenous flotillin 1 in hTert cells is independent of the calcium concentration. Only the localization of Flot2 changes, so that at intracellular calcium levels of 2 mmol/l, it is mainly found at the plasma membrane, whereas at levels of 0.05 mmol/l it is perinuclearly localized. Furthermore, the cell lines hTert, HaCaT and MCF7, as Flot2-knockout variants, were identified as the most promising cell models for further investigations of flotillin interactome.

8. Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>engl. amino acid</i>
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
APS	Ammoniumpersulfat
APP	Amyloid Vorläufer-Protein
BioID	<i>engl. proximity-dependent biotin identification</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CoIP	Co-Immunpräzipitation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsc1, -2, -3	Desmocollin 1, 2, 3
Dsg1, -2, -3, -4	Desmoglein 1, 2, 3, 4
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>engl. enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>engl. epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Erk	<i>engl. extracellular signal-regulated kinase</i>
ESA	<i>engl. epidermal surface antigen</i>
ESCRT	<i>engl. endosomal sorting complex required for transport</i>
FCS	<i>engl. fetal calf serum</i>
Flot1	Flotillin-1
Flot2	Flotillin-2
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HaCaT	<i>engl. human adult high Calcium low Temperature</i>
HEK	<i>engl. human embryonic kidney cells</i>

HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
hTert	<i>engl. human telomerase reverse transcriptase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IMM	Immunomix
IP	Immunpräzipitation
KD	<i>engl. knockdown</i>
KO	<i>engl. knockout</i>
LB	<i>engl. lysogeny broth</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCF	<i>engl. „Michigan cancer foundation“</i>
MeOH	Methanol
NEAA	<i>engl. non essential amino acids</i>
NOG	N-Octyl- β -D-Glucopyranosid
NP-40	Nonidet P40
p38MAPK	<i>engl. p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proteaseinhibitor
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) Mononatriumsalz
PKC	Proteinkinase C
PV	Pemphigus vulgaris
PV-IgG	Pemphigus vulgaris Autoantikörper vom Typ IgG
RPMI	<i>engl. „Roswell Park Memorial Institute“</i>
rSAP	rekombinante Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	<i>engl. sodium-dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>engl. sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Src	<i>engl. sarcoma-associated kinase</i>
TBS-T	<i>engl. Tris-buffered saline with Tween20</i>

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WB	<i>engl. Western Blot</i>
WT	<i>engl. Wildtype</i>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Feinstruktur des Desmosoms.....	4
Abbildung 2: Sequenzstruktur der Desmocolline und der Desmogleine.....	6
Abbildung 3: Flotilline.....	10
Abbildung 4: Grafische Darstellung der BioID.....	16
Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin 2 in Wildtyp hTert-Zellen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen.....	40
Abbildung 6: Western Blot der hTert-Zellen mit Nachweis von Flot2 (A) bzw. Flot1 (B) nach CoIP und in Lysaten.....	41
Abbildung 7: Darstellung der klonierten Flot2 Fusionsproteine und der Biotinligase BirA*.	43
Abbildung 8: Western Blot der HEK 293T-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.....	44
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Wildtyp hTert-Zellen nach Transduktion.....	45
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Flot2-KO HaCaT-Zellen nach Transduktion.....	46
Abbildung 11: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen (A) und Flot2-KO HaCaT-Zellen (B) mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.....	47
Abbildung 12: Western Blot der Flot2-KO HaCaT-Zellen mit fehlendem Nachweis der Flot2-Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.....	48
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Wildtyp MDA-MB-231- Zellen nach Transduktion.....	49
Abbildung 14: Western Blot der MDA-MB-231-Zellen mit Nachweis der Flot2- Fusionsproteine: Y163F-BirA*, Reg1-BirA* in Lysaten.....	50

Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in MCF7-Zellen nach Transduktion.....	51
Abbildung 16: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine bzw. von Flot1 auf dem pcDNA3-Vektor (A) und dem pAAV-Vektor (B) nach CoIP und in Lysaten.....	52
Abbildung 17: Western Blot der Flot2-KO HEK-Zellen mit Nachweis der Flot2-Fusionsproteine bzw. Flot1 im Pulldown (A) und in Lysaten (B) nach BioID.....	54

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien	18
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung	24
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	26
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 6: DNA-Primer	27
Tabelle 7: Plasmide.....	27
Tabelle 8: Zelllinien	28
Tabelle 9: Nährmedien und deren Zusammensetzung.....	29
Tabelle 10: PCR Protokoll.....	30
Tabelle 11: PCR Parameter.....	31
Tabelle 12: Protokoll für den Restriktionsverdau des PCR Produkts	31

11. Literaturverzeichnis

- Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., & Tikkanen, R. (2012). Flotillin-1/Reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
- Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., & Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(99\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(99)70183-0)
- Amagai, Masayuki, Klaus-Kovtun, V., & Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90360-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90360-B)
- Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., & Tikkanen, R. (2009). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.012>
- Banning, A., Babuke, T., Kurrle, N., Meister, M., Ruonala, M., & Tikkanen, R. (2018). Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with α -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells7040028>
- Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P., & Tikkanen, R. (2012). Transcriptional Regulation of Flotillins by the Extracellularly Regulated Kinases and Retinoid X Receptor Complexes. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045514>
- Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nour, R., Jomaa, B., Zahaf, A., Osman, A. B., Mokhtar, I., Faza, B., Revuz, J., Roujeau, J. C., & Kamoun, M. R. (1995). Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: Unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12612836>

- Beckert, B., Panico, F., Pollmann, R., Eming, R., Banning, A., & Tikkanen, R. (2019). Immortalized human hTert/KER-CT Keratinocytes a model system for research on desmosomal adhesion and pathogenesis of pemphigus vulgaris. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20133113>
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Bijlmakers, M. J., & Marsh, M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. In *Trends in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00008-9)
- Bodin, S., Planchon, D., Morris, E. R., Comunale, F., & Gauthier-Rouvière, C. (2014). Flotillins in intercellular adhesion - From cellular physiology to human diseases. In *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.159764>
- Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S., & Green, K. J. (1996). Breaking the connection: Displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.985>
- Bornslaeger, E. A., Godsel, L. M., Corcoran, C. M., Park, J. K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2001). Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *Journal of Cell Science*.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P., & Rubanyi, G. M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *Journal of Gene Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/jgm.516>

- Bystryn, J. C., & Rudolph, J. L. (2005). Pemphigus. *Lancet*.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66829-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66829-8)
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., & Reeves, W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*.
<https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>
- Calkins, C. C., Setzer, S. V., Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., & Kowalczyk, A. P. (2006). Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512447200>
- Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M. J., Tamura, K., Karin, M., Arkininstall, S., & Gruenberg, J. (2001). The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Molecular Cell*, 7(2).
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00189-7)
- Chartier, N. T., Lainé, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., & Jacquier-Sarlin, M. R. (2011). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Experimental Cell Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.009>
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Piser, T., Karlsson, E., & Grando, S. A. (2008). Differential coupling of M1 muscarinic and $\alpha 7$ nicotinic receptors to inhibition of pemphigus acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704956200>
- ChitaeV, N. A., Leube, R. E., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Franke, W. W., & Troyanovsky, S. M. (1996). The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of binding sites and topogenic potential. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.359>
- Choi, H. J., Park-Snyder, S., Pascoe, L. T., Green, K. J., & Weis, W. I. (2002). Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nature Structural Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nsb818>

- Collins, J. E., Legan, P. K., Kenny, T. P., MacGarvie, J., Holton, J. L., & Garrod, D. R. (1991). Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): Cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.113.2.381>
- Cowin, P., & Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80049-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80049-4)
- Culkins, C. C., & Setzer, S. V. (2007). Spotting desmosomes: the first 100 years. *The Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/sj.skinbio.6250010>
- Delva, E., Jennings, J. M., Calkins, C. C., Kottke, M. D., Faundez, V., & Kowalczyk, A. P. (2008). Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M710046200>
- Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (2009). The desmosome. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 2).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St.-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., & Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M101113200>
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W. W., Windoffer, R., & Leube, R. E. (2002). Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *European Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00278>
- Eyre, R. W., & Stanley, J. R. (1988). Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI113387>

- Furue, M., & Kadono, T. (2017). Pemphigus, a pathomechanism of acantholysis. In *Australasian Journal of Dermatology* (Vol. 58, Issue 3).
<https://doi.org/10.1111/ajd.12562>
- Futei, Y., Amagai, M., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Fujii, Y., & Nishikawa, T. (2000). Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00137.x>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nrm1356>
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. L., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T., & Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*.
<https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1819>
- Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1038/ncb1342>
- Goonasinghe, A., Luan, X. M., Hurlstone, A., & Garrod, D. (2012). Desmosomal cadherins in zebrafish epiboly and gastrulation. *BMC Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-1>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Graham, F. L., & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3)

- Green, K. J., Stappenbeck, T. S., Parry, D. A. D., & Virata, M. L. A. (1992). Structure of desmoplakin and its association with intermediate filaments. *Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1992.tb03777.x>
- Green, Kathleen J., & Simpson, C. L. (2007). Desmosomes: New perspectives on a classic. In *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701015>
- Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S., & Gauthier-Rouvière, C. (2013). Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.133975>
- Hahn-Ristic, K., Rzany, B., Amagai, M., Bröcker, E. B., & Zillikens, D. (2002). Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2002.00384.x>
- Hardman, M. J., Liu, K., Avilion, A. A., Merritt, A., Brennan, K., Garrod, D. R., & Byrne, C. (2005). Desmosomal Cadherin Misexpression Alters -Catenin Stability and Epidermal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.3.969-978.2005>
- Hashimoto, T., Ogawa, M. M., Konohana, A., & Nishikawa, T. (1990). Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12874456>
- Hatzfeld, M. (2005). The p120 family of cell adhesion molecules. In *European Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.016>
- Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.009>

- Hennings, H., & Holbrook, K. A. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Experimental Cell Research*. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90115-5)
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., & Waschke, J. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1825>
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., & Leube, R. E. (2007). Structure and Function of Desmosomes. In *International Review of Cytology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)64003-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)64003-0)
- Ian Gallicano, G., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L., & Fuchs, E. (1998). Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.2009>
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kottke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., Amagai, M., & Kowalczyk, A. P. (2011). Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.389>
- Jolly, P. S., Berkowitz, P., Bektas, M., Lee, H. E., Chua, M., Diaz, L. A., & Rubenstein, D. S. (2010). p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087999>
- Joly, P., & Litrowski, N. (2011). Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clinics in Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.01.013>
- Kapahnke, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/cells5040045>

- Kessler, E. L., van Stuijvenberg, L., van Bavel, J. J. A., van Bennekom, J., Zwartsen, A., Rivaud, M. R., Vink, A., Efimov, I. R., Postma, A. V., van Tintelen, J. P., Remme, C. A., Vos, M. A., Banning, A., de Boer, T. P., Tikkanen, R., & van Veen, T. A. B. (2019). Flotillins in the intercalated disc are potential modulators of cardiac excitability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.11.007>
- Kim, J. H., & Kim, S. C. (2019). Paraneoplastic pemphigus: Paraneoplastic autoimmune disease of the skin and mucosa. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JUN).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01259>
- Koch, P. J., Walsh, M. J., Schmelz, M., Goldschmidt, M. D., Zimbelmann, R., & Franke, W. W. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *European Journal of Cell Biology*.
- Kokubo, H., Helms, J. B., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Horikoshi, Y., & Yamaguchi, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Research*.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04140-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04140-9)
- Kowalczyk, A. P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E. A., Kopp, D. S., Borgwardt, J. E., Corcoran, C. M., Settler, A., & Green, K. J. (1999). The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18145>
- Kowalczyk, A. P., Stappenbeck, T. S., Parry, D. A. D., Palka, H. L., Virata, M. L. A., Bornslaeger, E. A., Nilles, L. A., & Green, K. J. (1994). Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophysical Chemistry*.
[https://doi.org/10.1016/0301-4622\(94\)85023-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(94)85023-2)
- Kridin, K. (2018). Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. In *Immunologic Research*. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-8986-7>

- Kugelmann, D., Rötzer, V., Walter, E., Egu, D. T., Fuchs, M. T., Vielmuth, F., Vargas-Robles, H., Schnoor, M., Hertl, M., Eming, R., Rottner, K., Schmidt, A., Spindler, V., & Waschke, J. (2019). Role of Src and cortactin in pemphigus skin blistering. *Frontiers in Immunology*, *10*(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00626>
- Kurrle, N., John, B., Meister, M., & Tikkanen, R. (2012). Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization. In *Protein Phosphorylation in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/48598>
- Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013). Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084393>
- Kwon, K., & Beckett, D. (2000). Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Science*. <https://doi.org/10.1110/ps.9.8.1530>
- Kyle J. Roux,^{1,2} Dae In Kim,^{1,2} Manfred Raida,³ and Brian Burke. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein. *Jcb*.
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie. In *Taschenlehrbuch Histologie*. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>
- Mathur, M., Goodwin, L., & Cowin, P. (1994). Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*.
- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view. In *Membranes*. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>
- Meister, M., Zuk, A., & Tikkanen, R. (2014). Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *FEBS Journal*, *281*(13). <https://doi.org/10.1111/febs.12834>

- Merritt, A. J., Berika, M. Y., Zhai, W., Kirk, S. E., Ji, B., Hardman, M. J., & Garrod, D. R. (2002). Suprabasal Desmoglein 3 Expression in the Epidermis of Transgenic Mice Results in Hyperproliferation and Abnormal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.16.5846-5858.2002>
- Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 87). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012644>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., & Parton, R. G. (2002). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel Golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209082200>
- Nekrasova, O., & Green, K. J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. In *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.004>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., Herzog, V., & Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: Role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20031100>
- Neumann-Glesen, C., Fernow, I., Amaddii, M., & Tikkanen, R. (2007). Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.03336>
- Osterlehner, A., Simmeth, S., & Göpfert, U. (2011). Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(11). <https://doi.org/10.1002/bit.23216>
- Owen, G. R., & Stokes, D. L. (2010). Exploring the nature of desmosomal cadherin associations in 3D. In *Dermatology Research and Practice* (Vol. 2010, Issue 1). <https://doi.org/10.1155/2010/930401>

- Parker, A. E., Wheeler, G. N., Arnemann, J., Pidsley, S. C., Ataliotis, P., Thomas, C. L., Rees, D. A., Magee, A. I., & Buxton, R. S. (1991). Desmosomal glycoproteins II and III. Cadherin-like junctional molecules generated by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*.
- Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., & Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins β -catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.681>
- Polivka, L., Hadj-Rabia, S., Bal, E., Leclerc-Mercier, S., Madrange, M., Hamel, Y., Bonnet, D., Mallet, S., Lepidi, H., Ovaert, C., Barbet, P., Dupont, C., Neven, B., Munnich, A., Godsel, L. M., Campeotto, F., Weil, R., Laplantine, E., Marchetto, S., ... Smahi, A. (2018). Epithelial barrier dysfunction in desmoglein-1 deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.007>
- Ramirez, R. D., Herbert, B. S., Vaughan, M. B., Zou, Y., Gandia, K., Morales, C. P., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2003). Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206046>
- Resnik, N., Sepčić, K., Plemenitaš, A., Windoffer, R., Leube, R., & Veranič, P. (2011). Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189464>
- Rhee, E. C., & Schulman, H. (2004). Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase - Choi-Rhee - 2008 - Protein Science - Wiley Online Library. *Protein Science*.
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.039024>

- Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R., & Wandinger-Ness, A. (2005). A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochemical Journal*.
<https://doi.org/10.1042/BJ20050645>
- Roux, K. J. (2013). Marked by association: Techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells. In *Cellular and Molecular Life Sciences*.
<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1287-3>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B., & May, D. G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*.
<https://doi.org/10.1002/cpps.51>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Saito, M., Stahley, S. N., Caughman, C. Y., Mao, X., Tucker, D. K., Payne, A. S., Amagai, M., & Kowalczyk, A. P. (2012). Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. *PLoS ONE*, 7(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050696>
- Satya-Prakash, K. L., Pathak, S., Hsu, T. C., Olivé, M., & Cailleau, R. (1981). Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*.
[https://doi.org/10.1016/0165-4608\(81\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0165-4608(81)90057-1)
- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S. W., & Simons, M. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008>
- Schroeder, W. T., Siciliano, M. J., Stewart-Galetka, S. L., & Duvic, M. (1991). The human gene for an epidermal surface antigen (M17S1) is located at 17q11-12. *Genomics*. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90166-C](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90166-C)

- Schroeder, W. T., Stewart-Galetka, S., Mandavilli, S., Parry, D. A. D., Goldsmith, L., & Duvic, M. (1994). Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA). *Journal of Biological Chemistry*.
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. O. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*.
- Sharma, P., Mao, X., & Payne, A. S. (2007). Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. In *Journal of Dermatological Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.005>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Solis, G. P., Hülsbusch, N., Radon, Y., Katanaev, V. L., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2013). Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0854>
- Solis, G. P., Schrock, Y., Hülsbusch, N., Wiechers, M., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2012). Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1006>
- Soni, S., Raaijmakers, A. J. A., Raaijmakers, L. M., Damen, M. J. A., van Stuijvenberg, L., Vos, M. A., Heck, A. J. R., van Veen, T. A. B., & Scholten, A. (2016). A proteomics approach to identify new putative cardiac intercalated disk proteins. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152231>
- Sorkina, T., Caltagarone, J., & Sorkin, A. (2013). Flotillins Regulate Membrane Mobility of the Dopamine Transporter but Are Not Required for Its Protein Kinase C Dependent Endocytosis. *Traffic*. <https://doi.org/10.1111/tra.12059>

- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma^{1,2}. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
- Stahley, S. N., Saito, M., Faundez, V., Koval, M., Mattheyses, A. L., & Kowalczyk, A. P. (2014). Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087809>
- Stanley, J. R., Koulu, L., & Thivolet, C. (1984). Distinction between epidermal antigens binding Pemphigus vulgaris and pemphigus follaceus autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI111426>
- Stanley, John R., & Amagai, M. (2006). Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. In *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra061111>
- Staubach, S., Razawi, H., & Hanisch, F. G. (2009). Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800793>
- Stuermer, C. A.O., Lang, D. M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S. O., & Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.3031>
- Stuermer, Claudia A. O., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Hanwehr, S. H. von, Guse, A. H., & Plattner, H. (2004). PrP c capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction . *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2150fje>
- Swope, D., Li, J., & Radice, G. L. (2013). Beyond cell adhesion: The role of armadillo proteins in the heart. In *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.025>

- Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyrpides, N. C. (1999). The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01467-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01467-X)
- Totsuka, A., Omori-Miyake, M., Kawashima, M., Yagi, J., & Tsunemi, Y. (2017). Expression of keratin 1, keratin 10, desmoglein 1 and desmocollin 1 in the epidermis: Possible downregulation by interleukin-4 and interleukin-13 in atopic dermatitis. *European Journal of Dermatology*, 27(3).
<https://doi.org/10.1684/ejd.2017.2985>
- Troyanovsky, S. M., Eshkind, L. G., Troyanovsky, R. B., Leube, R. E., & Franke, W. W. (1993). Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90075-2)
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Leube, R. E., & Franke, W. W. (1994). Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10790>
- Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep28820>
- Walter, E., Vielmuth, F., Rotkopf, L., Sárdy, M., Horváth, O. N., Goebeler, M., Schmidt, E., Eming, R., Hertl, M., Spindler, V., & Waschke, J. (2017). Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Scientific Reports*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03697-7>

- Wang, X., Brégégère, F., Frušić-Zlotkin, M., Feinmesser, M., Michel, B., & Milner, Y. (2004). Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis*.
<https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000018795.05766.1f>
- Windoffer, R., Borchert-Stuhlträger, M., & Leube, R. E. (2002). Desmosomes: Interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *Journal of Cell Science*.
- Witcher, L. L., Collins, R., Puttagunta, S., Mechanic, S. E., Munson, M., Gumbiner, B., & Cowin, P. (1996). Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10904>
- Yang, Y., Mariati, Chusainow, J., & Yap, M. G. S. (2010). DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *Journal of Biotechnology*, 147(3–4).
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.04.004>
- Yin, T., & Green, K. J. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.09.005>

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Im Anschluss möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion in welcher Form auch immer unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Tikkanen, durch die ich überhaupt erst die Möglichkeit bekommen habe eine Promotion am Biochemischen Institut zu machen. Durch ihre stete Unterstützung in allen Fragen und Problematiken habe ich mich zu jeder Zeit sehr gut betreut gefühlt.

Selbstverständlich gilt mein Dank darüber hinaus der gesamten Arbeitsgruppe Tikkanen. Danke an Benedikt Beckert, Dr. Antje Banning, Dr. Anna Zakrzewicz und Dr. Miroslava Didiasova, die mich in allen fachlichen Fragen unterstützt haben und mit mir geduldig nach möglichen Problemlösungen gesucht haben. Insbesondere bei Benedikt Beckert muss ich mich für seine herausragende Expertise beim gesamten Thema „Pemphigus vulgaris“ bedanken. Darüber hinaus danke ich Ralf Füllkrug, Petra Janson sowie ihrer Nachfolgerin Simone Kegel für die Unterstützung und Anleitung bei der praktischen Durchführung meiner Versuche. Auch bei meinen Laborkolleginnen Aileen Ritter und Nadine Boettcher möchte ich mich für die unterhaltsame Laborzeit und auch so manche Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, bedanken. Ohne sie hätte ich nie eine akademische Laufbahn einschlagen können und so wäre mir auch die Möglichkeit einer Promotion nie gegeben worden. Danke, dass ihr mich immer unterstützt. Weiterer Dank gilt meiner Verlobten, Annika. Danke, dass du mich immer motivierst noch weiter zu gehen und nie meine Ambitionen (oder auch mal den Kopf) zu verlieren. Danke auch an meine Schwester Nella, meinen Schwager Giacomo und meine beiden Neffen, Elias und Noah, die immer so viel Vertrauen in mich haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken. Danke an Scherwin, Diyar und Ahmed. Ihr wart durch die schon vorhandene Erfahrung immer eine Stütze für mich. Besonders bei Ahmed möchte ich mich für die stete Motivation bedanken.