

Interaktion von Flotillinen mit Syntenin und Syndecanen bei der Entstehung von Exosomen aus Brustkrebszellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität

vorgelegt von Aileen Ritter aus
Fritzlar

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-
Universität
Biochemisches Institut

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gerhild Euler

Tag der Disputation: 10.05.2023

Für meine wundervolle Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Brustkrebs	1
1.2 Exosomen	2
1.2.1 Entstehung von Exosomen	3
1.2.2 Exosomale Funktionen und Inhalte	5
1.3 Flotilline	7
1.3.1 Funktionen der Flotilline	8
1.4 Syntenin-1	10
1.4.1 Funktionen von Syntenin-1	11
1.5 Syndecane	12
1.5.1 Funktionen von Syndecanen	14
1.7 Ziele der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Geräte und Materialien	17
2.2 Chemikalien	19
2.2 Puffer	22
2.3 Antikörper	23
2.4 Primer	25
2.5 Kommerziell erworbene Kits	26
2.7 Bakterienstämme	26
2.8 Zelllinien	26
3 Methoden	27
3.1 Molekular- und Mikrobiologische Methoden	27
3.1.1 RNA-Isolierung	27
3.1.2 cDNA-Synthese	27
3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
3.1.4 Elektrophorese im Agarose-Gel	28
3.1.5 Gelextraktion des PCR-Produktes	29

3.1.6 Restriktionsverdau	29
3.1.7 Ligation	29
3.1.8 Transformation in <i>E.coli</i> XL-1 blue	29
3.1.9 Mini-Plasmid-Präparation	29
3.1.10 Midi-Plasmid-Präparation	30
3.1.11 DNA-Konzentrationsmessung	30
3.1.12 Proteininduktion	30
3.1.13 Kontrolle der Proteininduktion und Konzentrationsbestimmung	31
3.1.14 Proteinaufreinigung	32
3.2 Zellbiologische Methoden	32
3.2.1 Auftauen von Zellen	32
3.2.2 Einfrieren von Zellen	33
3.2.3 Ermittlung der Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer	33
3.2.4 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien	33
3.2.5 Passagieren der Zellen	33
3.2.6 Transiente Transfektion mit MACSfectin™	34
3.2.7 Stabile Transfektion durch Elektroporation mittels Neon™	34
Transfektionssystem	34
3.2.8 Generierung von Einzelzellklonen	36
3.2.9 Screening der Einzelzellklone	36
3.2.10 Zellernte	37
3.2.11 Zelllysate zur Proteinanalyse	37
3.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.2.13 Zelllysate für Ko-Immunpräzipitation und GST-Pulldown	38
3.2.14 Immunfluoreszenz-Färbung	38
3.3 Biochemische Methoden	39
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.3.2 Western Blot	39
3.3.3 Indirekter GST-Pulldown	40
3.3.4 Ko-Immunpräzipitation	41
3.3.5 Exosomen-Isolierung: Ultrazentrifugation	42
3.4 Auswertung und Abbildungen	42
4 Ergebnisse	44
4.1 Syntenin-1 interagiert mit Flotillin-1	44

4.1.1 Expression von Syntenin-1-GST-Fusionsproteinen	44
4.1.2 Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 bei indirektem Pulldown	46
4.1.3 Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 in der Ko-Immunpräzipitation	47
4.1.4 Lokalisation von Flotillin-1 und Syntenin-1 in Brustkrebszellen	49
4.2 Proteininteraktion zwischen Syndecanen 1,2,3 und 4 und Flotillin-1	51
4.2.1 Klonierung von Syndecanen 1,2,3 und 4	51
4.2.2 Expression von Syndecan-GST-Fusionsproteinen	53
4.2.3 Proteininteraktion von Syndecanen und Flotillin-1	53
4.2.4 Ko-Lokalisation von Flotillin-1 und Syndecan-1 in Brustkrebszellen	55
4.3 Charakterisierung von Flotillin-1-KO-MCF7-Zellen und ihren Exosomen	56
4.3.1 Generierung und Charakterisierung von Flotillin-1-KO-MCF7-Zellen	56
4.3.3 Sequenzierungen	59
4.3.5 Veränderte Menge von Flotillin-2 bei Flotillin-1-Knockout	60
4.3.4 Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 in Flotillin-1-KO-Zellen	62
4.3.5 Charakterisierung von Exosomen aus MCF7-Wildtyp-Zellen und Flotillin-1-KO-Zellen	64
5 Diskussion	67
5.1 Flotillin-1 interagiert mit Syntenin-1	70
5.2 Flotillin-1 interagiert mit Syndecanen	72
5.3 Generierung und Charakterisierung von Flotillin-1-Knockout-MCF7-Zellen	73
5.4 Charakterisierung der Exosomen	75
5.5 Fazit/ Ausblick	76
6 Zusammenfassung	78
7 Summary	79
8 Anhang	IV
8.1 Tabellenverzeichnis	IV
8.2 Abbildungsverzeichnis	V
8.3 Abkürzungsverzeichnis	VI

9	Literaturverzeichnis	IX
10	Erklärung zur Disputation	XXII
11	Danksagung	XXIII

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

Brustkrebs ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau und ebenso die häufigste Krebstodesursache bei Frauen. Bei ungefähr jedem vierten neu diagnostizierten Krebs bei Frauen handelt es sich um Brustkrebs (Bray et al., 2018; Jemal et al., 2011). Aufklärung der molekularen Mechanismen, wie die Tumorphagenese, Metastasierung und Therapieresistenzen, ist essenziell, um Brustkrebs besser verstehen und erkennen zu können und so auch bessere (Früh-) Diagnostik und Therapien anzubieten.

Die von Tumorzellen ausgeschütteten Vesikel bieten vielfältige Möglichkeiten in der Diagnostik von etwaigen Krankheitsstadien und Medikamentenresistenzen, da sie beispielsweise in einer sogenannten Flüssigbiopsie (*liquid biopsy*) aus Blutproben des Patienten gewonnen werden können und ihre Zusammensetzung sehr individuell mit dem jeweiligen Tumor und dessen aktueller Stoffwechsellage und Stadium zusammenhängt. Diese neue Form der Diagnostik kann beispielsweise im Serum des Patienten zirkulierende DNA des Tumors, miRNA und auch die bereits erwähnten extrazellulären Vesikel erfassen (Hannafon et al., 2016; Übersichten in Domínguez-Vigil et al., 2018; Piombino et al., 2021).

Tumorzellen schütten höhere Mengen solcher Vesikel (u.a. Exosomen) aus als gesunde Zellen, und diese Exosomen besitzen eine spezielle Zusammensetzung verschiedener Bestandteile, wie miRNA (Gonzalez-Villasana et al., 2019; Hannafon et al., 2016). Es ist also möglich, durch diese Exosomen an detaillierte Informationen des Tumors und seines Stoffwechselzustandes zu gelangen. Auch Aussagen über das Ansprechen einer Therapie sind ein Bestreben der aktuellen Forschung, da extrazelluläre Vesikel in Zusammenhang mit Entwicklung von Resistenzen gegen Therapien gebracht werden konnten (Lv et al., 2014; Safaei et al., 2005).

1.2 Exosomen

Extrazelluläre Vesikel können in zwei große Gruppen unterteilt werden: die Ektosomen und die Exosomen. Während Ektosomen durch Abschnürung aus der Plasmamembran nach extrazellulär entstehen, sind Exosomen endosomalen Ursprungs (Übersicht in Kalluri & LeBleu, 2020).

Bereits im Jahr 1985 wurden von Pan et al. transferrinhaltige Vesikel entdeckt, die über Endozytose eines Transferrin-Rezeptors aufgenommen und anschließend aufbereitet und erneut ausgeschüttet werden. 1987 wurden diese Vesikel das erste Mal als Exosomen bezeichnet, als Johnstone et al. entdeckten, dass der Transferrin-Rezeptor durch Freisetzung dieser intraluminalen Vesikel aus der Zelle geschleust wurde. Dies stellte einen alternativen Weg zur Entsorgung von zellulärem Abfall zum sonstigen Abbau in Lysosomen dar. Außerdem wurde erkannt, dass Exosomen mittels Ultrazentrifugation bei 100 000 x g isoliert werden können und ca. 30-100 nm groß sind (Johnstone et al., 1987; Pan et al., 1985).

Exosomen konnten bisher unter anderem in Blutplasma, Liquor, Pleuraerguss, Urin, Synovialflüssigkeit, humaner Muttermilch, Flüssigkeit des bronchoalveolären Systems und in Speichel nachgewiesen werden und sind an zahlreichen physiologischen und pathologischen Abläufen beteiligt (Admyre et al., 2007; Bard et al., 2004; Caby et al., 2005; Michael et al., 2010; Pisitkun et al., 2004.; Prado et al., 2008; Skriner et al., 2006; Street et al., 2012).

Verschiedene Stimuli beeinflussen die Ausschüttung von Exosomen. Falguière et al. zeigten, dass der Prozess der endosomalen Einwärtsknospung von ALIX (Apoptosislinked Gene 2 Interacting Protein X), Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) und auch von dem pH-Wert und der Temperatur abhängig ist (Falguière et al., 2008). Hypoxische Umgebung, die häufig in der Tumorumgebung herrscht, ist ein Stimulus, der zu erhöhter Ausschüttung von Exosomen führt, wie King et al. in verschiedenen Brustkrebslinien zeigen konnten (King et al., 2012). Nicht nur die Menge der Exosomen verändert sich unter hypoxischen Bedingungen, auch die Zusammensetzung wird modifiziert und macht es so möglich, die Antwort der Empfängerzelle auf die Hypoxie zu beeinflussen (Eldh et al., 2010).

1.2.1 Entstehung von Exosomen

Eine Zelle verfügt über verschiedene Mechanismen der Endozytose. Sie kann Clathrinabhängig und -unabhängig geschehen, wobei die Clathrin-unabhängige Endozytose weiter in Dynamin-abhängigen und -unabhängigen Wegen unterteilt werden kann (Übersicht in Meister & Tikkanen, 2014).

Die dadurch entstandenen frühen Endosomen durchlaufen einen Prozess der Reifung und werden zu späten Endosomen (Stoorvogel et al., 1991). Anschließend kommt es in diesen späten Endosomen zu einer erneuten Einstülpung der umgebenden Doppellipidschicht nach innen. So entstehen die sog. intraluminalen Vesikel (ILV), und dieses Kompartiment wird als multivesikulärer Körper (MVK) bezeichnet (siehe Abb. 1).

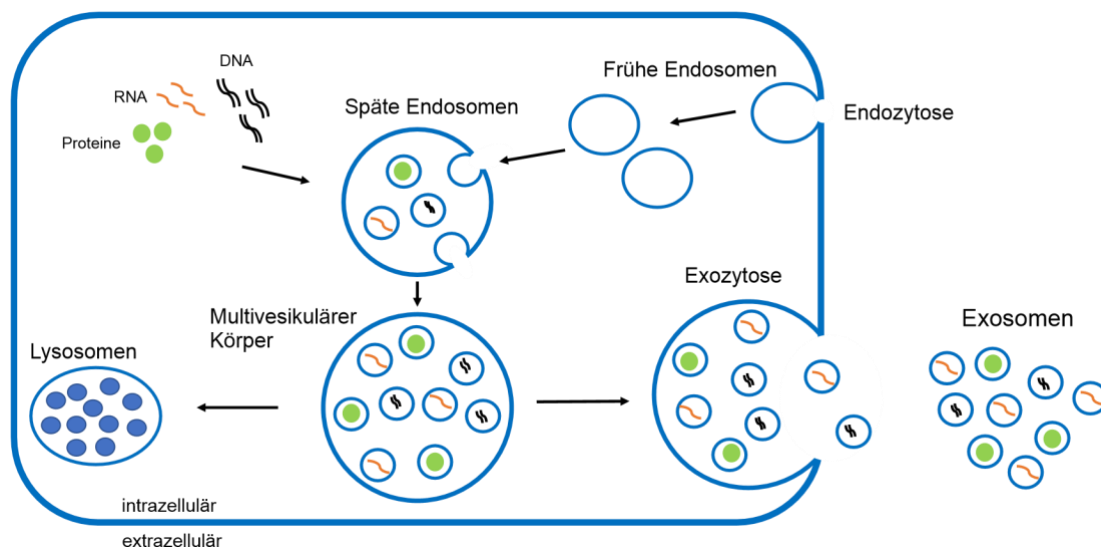


Abbildung 1: Entstehung von Exosomen. Exosomen entstehen aus endosomalen Vesikeln. Durch Knospung der äußeren Membran von späten Endosomen kommt es zur Bildung multivesikulärer Körper, die wiederum mit der Plasmamembran verschmelzen können und so die Vesikel als Exosomen nach extrazellulär freisetzen. Die Exosomen enthalten daher Proteine, RNA und DNA der Ursprungszelle. Ein alternativer Weg zur extrazellulären Abgabe ist der Abbau im lysosomalen System. Modifiziert nach Gurunathan et al., 2019.

Der *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) bezeichnet eine Gruppe von vier (ESCRT 0-III) Proteinkomplexen, die sich in der Membran der MVK befinden und den Inhalt der ILV koordinieren. Sie sind ebenfalls an der Knospung und Abschnürung der Plasmamembran während der Exosomenentstehung beteiligt (Colombo et al., 2013; Übersichten in Urbanelli et al., 2013; Wollert & Hurley, 2010). Beginnend mit ESCRT-0 werden ubiquitinierte Proteine erkannt und anschließend mit Hilfe der

weiteren ESCRTs in ILV verpackt, die abgeschnürt werden. Die Interaktion von ESCRT0 und ESCRT-I wird zum Teil durch Flotillin-1 vermittelt (Meister et al., 2017). Die Bildung des MVK kann auch unabhängig von ESCRT geschehen, wobei nach Depletion aller ESCRTs der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor-Rezeptor) nicht mehr in intraluminalen Vesikeln, aber weiterhin in MVK nachweisbar war (Stuffers et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit der Entstehung von MVK ist ein Zusammenspiel von Syndecan-1 und Syntenin-1. Syntenin-1 bindet an die zytosolische Komponente von Syndecan-1 und führt so zur Bindung von ALIX und ESCRT-I-III, welche zur Einwärtsknospung der Membran führen. Dieser Entstehungsweg erklärt, weshalb sich Syntenin-1 und Syndecan-1 in bestimmten Exosomen nachweisen lassen (Baietti et al., 2012). Der zuletzt beschriebene Weg wird auf zytosolischer Seite von dem ADPRibosylierungsfaktor 6 (Adenosindiphosphat-Ribosylierungsfaktor 6, einer GTPase) und der Phospholipase-D2 reguliert (Ghossoub et al., 2014). Auch Heparinase ist Teil des Regulationsprozesses, jedoch auf der luminalen Seite, indem sie die Heparansulfatketten des Syndecans schneidet und somit einen positiven Effekt auf die Exosomenentstehung hat. Heparinase fördert nicht nur die Exosomensekretion, sondern führt ebenfalls zu einer höheren Syndecan-1- und VEGF-Konzentration (vascular endothelial growth factor) in den ausgeschütteten Vesikeln (Roucourt et al., 2015; Thompson et al., 2013). Ein weiterer Bestandteil des Prozesses der Exosomenentstehung und -sortierung sind Ceramide und *lipid rafts*, wobei die Entstehung über die Sphingolipide unabhängig von ESCRT stattfindet (de Gassart et al., 2003; Trajkovic et al., 2008). Auch Wei et al. beschrieben eine ESCRT-unabhängige Entstehung von Exosomen. Das durch Phosphorylierung aktivierte Rab31-Protein führte mithilfe von Flotillin zur Bildung von EGFR-positiven ILV und somit MVK, unabhängig von ESCRT. Außerdem konnte eine Ko-Lokalisation von EGFR und Rab31 in den MVK gezeigt werden (Wei et al., 2021).

Desweiteren ist die Tyrosinkinase Src an der Regulation beteiligt. Imjeti et al. zeigten, dass sie die endosomale Reifung stimuliert, indem sie Tyrosinreste von Syntenin und Syndecan phosphoryliert (Imjeti et al., 2017). Ein weiteres positiv regulatorisches Protein der Exosomengenese in Brustkrebszellen ist Leptin, welches zu den Adipokinen gehört und bei Adipositas höhere Konzentrationen aufweist und mit Brustkrebs assoziiert ist. Über die Interaktion mit Tsg 101 und Hsp90 (Heat shock protein 90) erhöht es die Ausschüttung von Exosomen und fördert so das Voranschreiten von Tumoren (Giordano et al., 2019).

Fusioniert der MVK schließlich mit der Plasmamembran werden die enthaltenen ILV nach extrazellulär freigesetzt und als Exosomen bezeichnet (Raposo et al., 1996). Dieser Schritt ist abhängig von Rab-Proteinen, wie Rab11, Calcium und SNARE-Proteinen (Soluble NSF-Attachment Receptor) (Fader et al., 2009; Savina et al., 2005). Alternativ kann der Inhalt der MVK auch lysosomal abgebaut werden (siehe Abb. 1). Ob die intraluminalen Vesikel ausgeschüttet oder abgebaut werden, hängt von verschiedenen regulatorischen Prozessen, wie Rab7 ab (Vanlandingham & Ceresa, 2009). In die Zielzelle werden Exosomen teilweise mittels Phagozytose aufgenommen, die von Dynamin und PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) abhängig ist (Feng et al., 2010). Viele Details der Aufnahme und Wirkung von Exosomen bleiben jedoch weiterhin unklar.

1.2.2 Exosomale Funktionen und Inhalte

Exosomen setzen sich aus verschiedenen Inhalten der Ursprungszelle zusammen. Bereits 1996 entdeckten Raposo und die Arbeitsgruppe, dass T-Zellen antigenspezifisch auf Exosomen aus B-Lymphozyten reagieren können, und Exosomen somit an der Antigenpräsentation beteiligt zu sein scheinen (Raposo et al., 1996). Aufgrund ihrer Entstehung durch Reifung von Endosomen und erneute Invagination der umgebenden Membran besitzen sie eine Membran, die in ihrer Orientierung der Zellmembran entspricht (siehe Abb. 2). Auffällig ist die Anreicherung von Sphingomyelin in der exosomalen Membran, verglichen mit der Membran der Ursprungszelle (Laulagnier et al., 2004). Exosomen enthalten angereicherte Proteine, sogenannte Marker-Proteine, wie CD63, CD9, ALIX, Tsg 101, Syntenin-1 und auch Flotillin-1 (siehe Abb. 2) (Baietti et al., 2012; de Gassart et al., 2003; Keerthikumar et al., 2015).

Ein breites Feld der Funktionen von Exosomen ist die interzelluläre Kommunikation. Durch enthaltene mRNA und miRNA, die am Zielort ihre Funktion beibehält, beeinflussen Exosomen das Syntheseverhalten ihrer Zielzelle (Valadi et al., 2007). In humaner Muttermilch besitzen Exosomen eine immunregulatorische Funktion (Admyre et al., 2007).

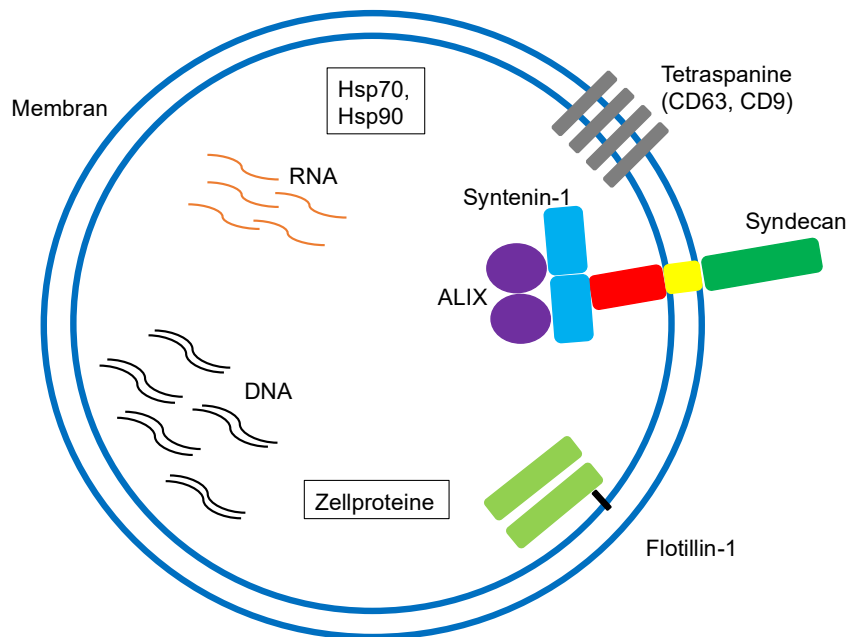


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Exosoms mit enthaltenen Bestandteilen. Dargestellt ist ein Exosom mit der abgrenzenden Membran. Enthalten sind DNA, RNA und verschiedene Proteine der Ursprungszelle. Besonders wichtig für diese Arbeit ist das Vorkommen von Syndecan in der Membran, welches an die PDZ-Domäne von Syntenin-1 bindet. Syntenin-1 wiederum bindet an ALIX und bildet so einen trimeren Komplex. Auch Flotillin-1 und Tetraspanine kommen in Exosomen vor und sind als Markerproteine für Exosomen bekannt. Modifiziert nach Gurunathan et al., 2019.

1.2.2.1 Exosomen in der Tumorphathogenese

Exosomen spielen ebenfalls eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren. So konnten Hood et al. zeigen, dass die von Melanomzellen ausgeschütteten Exosomen den SentinelLymphknoten für die Metastasierung des Tumors vorbereiten (Hood et al., 2011). Auch die Tatsache, dass von Tumorzellen ausgeschüttete Exosomen Apoptose-Inhibitoren enthalten, trägt wahrscheinlich zum Schutz der Tumorzellen bei (Valenzuela et al., 2015; L. Yang et al., 2013). Die Weitergabe von Resistenzen gegen Chemotherapeutika wie Docetaxel und der Abbau von Chemotherapeutika bei Resistenzen, wie Cisplatin, geschieht ebenfalls aufgrund von Exosomen (Lv et al., 2014; Safaei et al., 2005). Auch proangiogenetisch wirkende Inhalte wie MTA1 (metastasis-associated protein 1), ATF2 (activating transcription factor 2) und Serin-Threonin-Kinasen wurden in Exosomen gefunden und können so das Einsprossen neuer Gefäße fördern (Yi et al., 2015). Der Transport der miRNA scheint ein wichtiger Bestandteil der Kommunikation von Tumorzellen mit ihrer Umgebung, insbesondere den TAMs (tumor associated macrophages), zu sein und hilft so das Wachstum und die Metastasierung zu vereinfachen (Übersicht in Yang et al., 2011). Ebenfalls die miRNA betreffend, zeigten

Hannafon et al., dass die Exosomen von Brustkrebszellen erhöhte Anteile von miRNA-21 und miRNA-1246 enthielten, und diese miRNAs erhöht im Plasma der Patienten nachweisbar waren, was die mögliche Bedeutung von Exosomen in der Diagnostik von Brustkrebs unterstreicht (Hannafon et al., 2016). Auch Shimomura et al. schlugen verschiedene miRNAs als Biomarker für die Diagnostik bei Brustkrebs vor, darunter miRNA-1246 (Shimomura et al., 2016). Auch in Studien zu Ovarialtumoren wurde miRNA in Exosomen gefunden und als diagnostischer Marker vorgeschlagen (Taylor & GercelTaylor, 2008).

1.3 Flotilline

Im Jahr 1997 wurden in zwei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen die sogenannten Flotilline entdeckt. Schulte et. al entdeckten die an der Zellmembran vorkommenden Flotilline bei ihrer Forschung zur neuronalen Regeneration bei Goldfischen und gaben den Proteinen den Namen „Reggie“ (Schulte et al., 1997). Zeitgleich entdeckten Bickel et. al diese Proteine in *membrane rafts* und nannten sie „Flotilline“. Diese Namensgebung ist heutzutage der offizielle Standard geworden, wobei Flotillin-1 Reggie-2 entspricht und Flotillin-2 Reggie-1. Flotilline kommen ubiquitär in Säugetierzellen, Bakterien, Pilzen (außer *Saccharomyces cerevisiae*) und Pflanzen vor und sind mit den *lipid rafts* der Zellmembran assoziiert. Es wird funktionell zwischen Flotillin-1 und -2 unterschieden, wobei sie eine 50%ige Übereinstimmung der mRNA und eine 44%ige Übereinstimmung der Proteinsequenz zeigen. Beide Proteine sind ungefähr 47 kDa schwer (Bickel et al., 1997; Edgar & Polak, 2001; Schulte et al., 1997; Übersicht in Banning et al., 2014).

Strukturell setzen die Flotilline sich aus einem N- und einem C-terminalen Bereich zusammen, wobei der C-terminale Bereich mit seinen Alanin- und Glutamat Wiederholungen (Flotillin-Domäne) der Oligomerisierung dient, und der N-terminale Bereich auch SPFH-Domäne (Somatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C) genannt wird. Diese SPFH-Domäne kommt in den verschiedenen Proteinen der SPFH-Proteinfamilie vor, aber ihre Funktion ist bisher weitgehend unbekannt. Ein Merkmal der SPFH-Proteinfamilie ist die Bildung von Homo- und Hetero-Oligomeren, welche auch bei Flotillinen zu finden ist. So stabilisieren Flotilline sich gegenseitig, wobei hierzu auch die Flotillin-Domäne benötigt wird. Der N-terminale Bereich der Proteine ist für

Interaktionen mit der Zellmembran relevant, welche durch Fettsäuremodifikationen und hydrophobe Aminosäurereste vermittelt werden (Solis et al., 2007; Übersicht in Morrow & Parton, 2005).

Die Proteine beeinflussen sich gegenseitig, sodass ein mit siRNA durchgeführter Knockdown von Flotillin-2 auch geringere Expression von Flotillin-1 nach sich zieht. Jedoch scheint Flotillin-1 stärker abhängig von der Flotillin-2 Expression zu sein, da der Effekt andersherum geringer ausgeprägt ist (Neumann-Giesen et al., 2004; Solis et al., 2007).

Auf zellulärer Ebene sind Flotilline überwiegend an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran nachweisbar, wo sie mit Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen in Verbindung gebracht werden (Bickel et al., 1997; Neumann-Giesen et al., 2004). Desweiteren sind sie beispielsweise in Endosomen, Exosomen und perinukleär im Golgi-Apparat nachweisbar (de Gassart et al., 2003; Gkantiragas et al., 2001; Übersicht in Meister & Tikkanen, 2014). Insbesondere nach Stimulation der Zellen mit epidermal-growth-factor (EGF) konnten beide Flotilline verstärkt intrazellulär nachgewiesen werden (Neumann-Giesen et al., 2004).

1.3.1 Funktionen der Flotilline

Flotilline spielen unter anderem eine Rolle bei Axonregeneration, Phagozytose, Insulinsignalwegen und Regulation von Zell-Zell-Kontakten (Baumann et al., 2000; Dermine et al., 2001; Kurrle et al., 2013; Schulte et al., 1997; Völlner et al., 2016).

Desweiteren konnte bereits 2010 ein Mitwirken der Flotilline am intrazellulären Transport von Choleratoxin nachgewiesen werden, woraufhin eine Teilnahme der Flotilline am intrazellulären endosomalen Transport angenommen werden kann (Saslowsky et al., 2010). Flotilline werden nach EGFR-Stimulation per Endozytose aufgenommen und sind selbst an der Aktivierung beziehungsweise Phosphorylierung des EGF-Rezeptors beteiligt, denn Amaddii et al. konnten zeigen, dass in Flotillin-1 Knockdown-Zellen der EGF-Rezeptor nach Stimulation geringer und langsamer autophosphoryliert wurde. Somit scheint Flotillin-1 ein Faktor bei der Aktivierung von dem MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein Kinase) zu sein (Amaddii et al., 2012; Neumann-Giesen et al., 2004). Über die Interaktion mit dem Fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2) ist Flotillin-1 ebenfalls an der Regulation unterschiedlicher Rezeptor-Tyrosin-Signalwege beteiligt (Tomasovic et al., 2012). Wei et al. zeigten, dass Flotilline auch in der Exosomenentstehung einen entscheidenden Einfluss auf einen

ESCRT-unabhängigen Weg über Rab31 haben, denn nach Flotillin-1-Knockdown wurden weniger Exosomen nachgewiesen. Außerdem zeigten sie, dass die SPFH-Domäne des Flotillins mit Rab31 interagiert (Wei et al., 2021).

1.3.1.1 Flotilline in der Tumorphagenese

Besonders interessant für diese Arbeit ist der Einfluss von Flotillinen auf das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen. Wie bereits erklärt, spielen Exosomen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese, und Flotilline, vor allem Flotillin-1, sind unter anderem in Exosomen nachweisbar. Auch Flotilline selbst wurden mehrfach in Zusammenhang mit klinischen Stadien verschiedener Tumore gebracht.

Liu et al. konnten anhand von Gewebeproben nachweisen, dass bei einem Zervixkarzinom höhere Konzentrationen von Flotillin-2 vorliegen, und eine positive Korrelation der Flotillin-2-Expression und des Tumorstadiums sowie des Lymphknotenstatus besteht (Liu et al., 2015). Beim hepatozellulären Karzinom wurden positive Zusammenhänge zwischen der Expression von Flotillin-1 und dem klinischen Stadium der Patienten bestätigt (Zhang et al., 2013).

Lin et al. zeigten mittels immunhistochemischer Untersuchungen, dass in Brustkrebs-Gewebeproben höhere Konzentrationen von Flotillin-1 vorlagen, und die Höhe der Expression negativ mit dem klinischen Stadium und der Überlebensrate der Patienten korrelierte. Es bestand ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der Flotillin-1-Expression und der Ki67-Expression (ein Marker für die proliferative Aktivität), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Flotillin-1 vor allem in schnell wachsenden Tumoren in höherer Konzentration vorliegt. Ein Knockdown von Flotillin-1 führte sowohl *in vitro* als auch in Mausmodellen zu langsamerem Wachstum der MCF7-Zellen. (Lin et al., 2011). Ebenfalls in MCF7-Zellen konnten nach Knockdown von Flotillin-1 erhöhte Spiegel von EGFR nachgewiesen werden, welche mit einer erhöhten Aktivierung des MAPK-Signalweges einherging (Kurrle et al., 2013). In derselben Studie wurde herausgefunden, dass die erhöhte EGFR-Expression abhängig von der Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase ist. Dieses Enzym weist häufig Mutationen in Tumoren auf (Kurrle et al., 2013). Ein weiterer wichtiger Aspekt scheint die Interaktion von der miRNA-124 und Flotillin-1 zu sein. MiRNA-124 ist eine microRNA, welche die Ausbreitung und Metastasierung von Brustkrebs zu hemmen scheint und so als möglicher Tumorsuppressor fungiert (Han et al., 2013). Einhergehend mit diesen Ergebnissen zeigten Li et al. ebenfalls, dass miRNA-124 in 7 verschiedenen Brustkrebszelllinien

(eingeschlossen MCF7) geringer exprimiert wurde als in vergleichbarem gesundem Gewebe. Auch in histologischen Proben von Brustkrebspatienten konnte eine reduzierte Expression nachgewiesen werden, welche insbesondere in Patienten mit bereits bestehenden Lymphknotenmetastasen noch deutlicher erniedrigt war. Belegt werden konnte dies auch durch den Nachweis von geringerem Wachstum der Brustkrebszellen, die eine ektope Produktion von miRNA-124 aufwiesen. Außerdem wurde eine negative Korrelation von miRNA-124 und der Flotillin-1-Expression gezeigt, da miRNA-124 die Flotillin-1-Expression hemmt. Dies erklärt den inversen Zusammenhang von miRNA124 und Flotillin-1 in Brustkrebszellen (Li et al., 2013).

1.4 Syntenin-1

Syntenin-1 ist ein zur PDZ-Proteinfamilie (postsynaptic density protein, disc-large, zonulin-1) gehörendes Protein, welches 1997 erstmals als intrazellulärer Interaktionspartner von Syndecanen identifiziert wurde (Grootjans et al., 1997). Syntenin-1 wurde auch als *melanoma differentiation-associated gene 9* (MDA-9) in Melanomzellen nach Behandlung mit Interferon- γ entdeckt (Lin et al., 1998).

Strukturell gesehen besteht Syntenin-1 aus einer N-terminalen Domäne, zwei PDZ-Domänen und einer C-terminalen Domäne, wobei beide PDZ-Domänen für die Interaktion mit Syndecanen benötigt werden (Grootjans et al., 1997, 2000). Die N-terminale Domäne beinhaltet einen autoinhibitorischen Teil, der über Phosphorylierung die Bindung von Syntenin an die Plasmamembran schwächt, während die C-terminale Domäne ebenfalls an der Regulation der Bindung von Syntenin-1 an der Plasmamembran beteiligt ist (Wawrzyniak et al., 2012). Die Bindung von Syntenin-1 an die Plasmamembran wird auch durch die Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) kontrolliert (Zimmermann et al., 2002). Syntenin-1 kann bereits in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung von Haut, Haarfollikeln, Herz, Lunge, Leber und des Rückenmarks im Mausmodell nachgewiesen werden (Jeon et al., 2013). Intrazellulär befindet sich Syntenin-1 vor allem an der Plasmamembran, in Vesikeln und im Zytoplasma (Grootjans et al., 1997).

Syntenin-2 wurde 2001 gefunden und gehört ebenfalls zur Familie der PDZ-Proteine. Syntenin-1 und -2 bilden miteinander sowohl Homo- als auch Heterodimere (Koroll et al., 2001).

1.4.1 Funktionen von Syntenin-1

Aufgrund der PDZ-Domäne interagiert Syntenin-1 mit zahlreichen Partnern und ist an verschiedenen Prozessen der Zelle beteiligt. Die PDZ-Domänen von Syntenin-1 interagieren unter anderem direkt mit CD63, einem Tetraspanin, dass auch als exosomal Marker bekannt ist. Die endozytotische Aufnahme von CD63 wird ebenfalls von Syntenin-1 reguliert (Latysheva et al., 2006). Ein weiterer Interaktionspartner von Syntenin-1 ist ALIX, wobei ALIX mit der N-terminalen Domäne interagiert. Syntenin, ALIX und Syndecan bilden einen trimeren Komplex, der für die Exosomenentstehung aus den MVK entscheidend ist. Interessanterweise führte ein Knockdown von Syntenin1 zu einer geringeren Menge ausgeschütteter Exosomen, beeinflusste jedoch nicht den Inhalt der Exosomen (Baietti et al., 2012). Wie bereits unter 1.2.1 erwähnt, wird Syntenin1 durch die Tyrosinkinase Src phosphoryliert und so die Exosomenentstehung reguliert (Imjeti et al., 2017). Über die Interaktion mit dieser Tyrosinkinase trägt Syntenin-1 ebenfalls zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (nuclear factor kappa B) bei, welcher wichtig für die Motilität und das invasive Wachstum von Zellen ist (Boukerche et al., 2010).

Syntenin-1 ist ein Interaktionspartner der Syndecane und durch seine Interaktion mit PIP2 relevant für das *Recycling* von Syndecanen, damit Syndecane zur Plasmamembran zurückkehren können, nachdem sie an der Endosomenentstehung teilgenommen haben. Die Entstehung von Syndecan-haltigen Endosomen scheint jedoch unabhängig von Syntenin-1 zu sein (Zimmermann et al., 2005). Eine weitere Funktion von Syntenin ist die regulatorische Funktion auf die Signalwege des Syndecan-4. Choi et al. konnten zeigen, dass Syntenin-1 durch Bildung von Dimeren und Bindung dieser Dimere an Syndecan-4-Dimere einen inhibitorischen Einfluss auf Syndecan-4-Funktionen hat (Choi et al., 2016).

1.4.1.1 Syntenin-1 in der Tumorgenese

Syntenin wurde als *melanoma differentiation-associated gene-9 (MDA-9)* schon 1998 mit Melanomen in Verbindung gebracht (Lin et al., 1998). Es wurde seitdem mehrfach positiv mit schlechter Prognose und Tumoraggressivität korreliert. In kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass eine hohe Syntenin-1-Expression mit höheren Tumorstadien und verstärkter Invasivität des Tumors assoziiert ist. Möglicherweise geschieht dies aufgrund einer Veränderung der

extrazellulären Matrix durch Aktivierung verschiedener Metalloproteinasen (Kim et al., 2014).

Auch in Brustkrebszellen wurde bereits die Syntenin-Expression mit ihren Einflüssen untersucht. Yang et al. fanden heraus, dass Metastasen-bildende Brustkrebs-Zelllinien, wie MDA-MB-435, höhere Syntenin-Spiegel aufwiesen, als weniger invasive Zelllinien, wie MCF7 (Y. Yang et al., 2013). Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang von Syntenin-Expression und der Invasivität des Tumors hin. In weiteren Experimenten zeigten sie, dass eine Syntenin-Überexpression von Brustkrebszellen *in vitro* zu verstärkter Zellmigration und *in vivo* zu stärkerem Tumorwachstum und Metastasierung führte. Eine mögliche Erklärung liefert die erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinases 1/2) nach Syntenin-Überexpression, die zur Aktivierung des MAPK-Signalweges beiträgt. Nicht zuletzt konnte ein negativer Zusammenhang der Gesamtüberlebensrate von Brustkrebspatientinnen und der Syntenin-Expression gefunden werden (Y. Yang et al., 2013). Kashyap et al. konnten ebenfalls eine reduzierte Zellmigration von MCF7-Zellen nach Syntenin-1 Knockdown und einen erhöhten Anteil der Zellen in G1-Phase des Zellzyklus feststellen (Kashyap et al., 2015).

1.5 Syndecane

Syndecane gehören zu den Proteoglykanen, die aus einem Core-Protein und angehängten Kohlenhydratketten, wie Glykosaminoglykanen, bestehen. Das erste Syndecan (Syndecan-1) wurde 1989 entdeckt (Saunders et al., 1989). Mittlerweile werden in Säugetieren vier Syndecane unterschieden, von denen mindestens eins in fast allen Gewebearten nachweisbar ist. Lediglich B-Lymphozyten scheinen, abhängig von ihrem Entwicklungsstadium, keine Syndecane zu exprimieren. Syndecan-1 ist dabei vorwiegend in epitheliale Gewebe und Leukozyten vorhanden, Syndecan-2 in Endothelzellen und Fibroblasten, Syndecan-3 in neuronalem Gewebe und Syndecan-4 in sehr vielen Gewebearten bis auf Erythrozyten (Kim et al., 1994).

Es handelt sich bei den Syndecanen um transmembrane Proteine, welche eine intrazelluläre, eine transmembranöse und eine extrazelluläre Domäne (Ektodomäne) besitzen (siehe Abb. 3). An die extrazelluläre Domäne sind Heparan- und Chondroitinsulfatketten gebunden, welche mit vielen Adhäsions- und Signalmolekülen interagieren können. Syndecan-1 weist eine Größe von 33 kDa auf, Syndecan-2 ist 23 kDa, Syndecan-3 41 kDa und Syndecan-4 22 kDa schwer (Übersicht in Gondelaud &

Ricard-Blum, 2019). Durch ihre angehängten Kohlenhydratketten erscheinen sie in Western Blots allerdings deutlich größer.

Der intrazelluläre Abschnitt ist in drei Teile unterteilt, eine C1-Region, die mit dem transmembranen Anteil verbunden ist, eine C2-Region, die das intrazelluläre Ende des Syndecans darstellt und eine dazwischenliegende V-Region (siehe Abb. 3). Die V-Region stellt dabei die Syndecan-spezifische Region dar, welche je nach Syndecan unterschiedlich ist. Die C-Regionen sind in den Syndecanen identisch. In der C2-Region wurde bei allen Syndecanen eine sogenannte EFYA-Sequenz entdeckt, die für die Interaktion mit Proteinen der PDZ-Familie, wie Syntenin, verantwortlich ist (Grootjans et al., 1997).

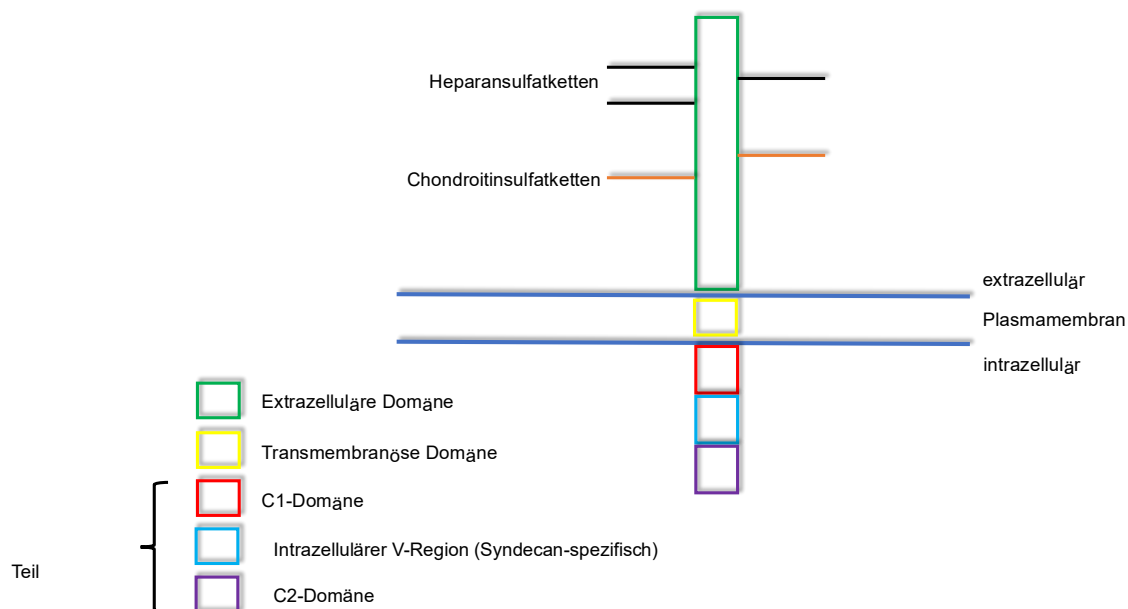


Abbildung 3: Struktur der Syndecane. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Struktur von Syndecan-1 mit drei Heparansulfatketten und zwei Chondroitinsulfatketten am extrazellulären Teil. Bestehend aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und intrazellulären Teil durchziehen die Syndecane die Plasmamembran. Der intrazelluläre Abschnitt kann weiter unterteilt werden in die C1-Domäne (rot), die V-Region (hellblau), welche die spezifische Region des jeweiligen Syndecans ist, und die C2-Domäne (lila), welche das intrazelluläre Ende der Syndecane bildet. Die Abbildung wurde nach Couchman et al., 2015 modifiziert.

Eine Besonderheit der Syndecane ist das sogenannte *Shedding*, das auch während physiologischer Bedingungen stattfindet (Kim et al., 1994). Durch *Shedding* wird die

Ektodomäne der Syndecane losgelöst und kann so möglicherweise als parakriner oder autokriner Stimulus wirken. An Syndecan-1 und Syndecan-4 wurden multiple *Shedding* Stellen gefunden, welche vor allem von Matrix-Metalloproteasen und auch anderen Proteinasen, wie Thrombin und Plasmin, gespalten werden können (Manon-Jensen et al., 2013).

1.5.1 Funktionen von Syndecanen

Da sich Abschnitte der Syndecane auf der Zelloberfläche, in der Zellmembran und im Zellinneren befinden, sind sie an zahlreichen Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, extrazellulären Proteinen und intrazellulären Molekülen beteiligt. Sie können dabei als Adhäsionsmoleküle und als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie VEGF und FGF, fungieren (Übersichten in Gondelaud & Ricard-Blum, 2019; Kwon et al., 2012). Damit stellen Syndecane eine Verbindung der Zelle zur extrazellulären Matrix her und sind an Signaltransduktionen beteiligt. Syndecane scheinen ebenfalls eine Rolle bei Entzündungen, Leukozytenadhäsionen, Wundheilung, Angiogenese und endothelialen Funktionen zu haben (Echtermeyer et al., 2001; Elenius et al., 2004; Voyvodic et al., 2014).

Syndecane unterliegen zahlreichen regulatorischen Prozessen. Choi et al. zeigten, dass Syndecan-4 Dimere bildet, und die Interaktion mit Syntenin-Dimeren einen inhibitorischen Einfluss auf Syndecan-vermittelte Signalwege hat (Choi et al., 2016). Auch die Kohlenhydratketten der Syndecane sind an solchen Prozessen beteiligt. Baietti et al. zeigten, dass die Interaktion von Syntenin-1 und Syndecanen die Entstehung von Exosomen beeinflusst, und die Heparansulfatketten dafür notwendig sind (Baietti et al., 2012). Roucourt et al. gingen einen Schritt weiter und untersuchten den Einfluss von Heparinase auf die Entstehung von Syndecan- und Syntenin-haltigen Exosomen. Sie zeigten, dass nach exogener Zufuhr von Proheparinase eine verstärkte Produktion von Syndecan-, Syntenin- und CD63-positiven Exosomen zu beobachten war. Ein Knockdown der endogenen Heparinase führte zu geringeren Mengen von Syntenin-1 und CD63 in Exosomen. Insgesamt zeigte diese Studie eine Abhängigkeit der Exosomenproduktion von der Heparinaseaktivität an den Heparansulfatketten der Syndecane (Roucourt et al., 2015).

1.5.1.1 Rolle der Syndecane in der Tumorgenese

Syndecane weisen diverse Zusammenhänge mit Tumorphagenese auf, die je nach Tumor- und Gewebeart stark variieren. Barbareschi et al. konnten bereits 2003 anhand von immunhistochemischen Untersuchungen und mRNA-Analysen zeigen, dass eine hohe Expression von Syndecan-1 häufig mit einem großen, Hormonrezeptor-negativem Tumor, einem hohen Mitoseanteil und einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs assoziiert ist. Dagegen zeigten Lendorf et al., dass eine hohe Syndecan-4-Expression tendenziell mit einem Hormonrezeptor-positiven Tumor assoziiert war, welcher zahlreiche Behandlungsoptionen bietet. Syndecan-1 und Syndecan-4 scheinen daher unabhängige Parameter in Brustkrebs-Erkrankungen zu sein (Barbareschi et al., 2003; Lendorf et al., 2011).

Desweiteren scheint Syndecan-1 an der Bildung von Lungenmetastasen bei Brustkrebs-Erkrankungen beteiligt zu sein. Im späten Stadium der Metastasierung konnte durch KOMäuse eine Abhängigkeit von Syndecan-1 nachgewiesen werden (Chute et al., 2018). Auch ein Knockdown von Syndecan-2 führte zu geringerem Tumorwachstum, verbesserte die Überlebensraten in Mäusen und verstärkte die Apoptose der Tumorzellen (Sun et al., 2014).

Im Gegensatz zur Tumor-supportiven Rolle bei Brustkrebs, zeigt Syndecan-1 eine eher protektive Funktion in Lungenkarzinomen. Parimon et al. fanden eine höhere Lebenserwartung bei Patienten mit erhöhter Syndecan-1-Expression in Lungenkarzinomen. In Zell- und Mausmodellen konnte außerdem gezeigt werden, dass der Verlust von Syndecan-1 zu verstärktem Tumorwachstum und einer Veränderung der Zusammensetzung der Exosomen hin zu Tumorwachstums-fördernden Inhalten (miRNA) führte (Parimon et al., 2018).

Wie bereits erwähnt, können die Ektodomänen der Syndecane durch *Shedding* abgespalten werden. Dies scheint auch eine Rolle bei Tumorgenese zu spielen, denn Seidel et al. konnten zeigen, dass Patienten mit multiplem Myelom erhöhte Level an gespaltenem Syndecan-1 aufwiesen, und Patienten mit erhöhten Syndecan-1-Spiegeln eine geringere Lebenserwartung hatten, woraufhin sie Syndecan-1 als prognostischen Marker vorschlugen (Seidel et al., 2000).

Eine Überexpression von Syndecan-4 führte zu geringerer Migration von Melanomzellen, sowie weniger Tendenz zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen.

Die Ausbreitung von Melanomzellen konnte durch die Komplexbildung von Syndecan4 und Syntenin-1 negativ beeinflusst werden (Choi et al., 2016).

1.7 Ziele der Arbeit

Es ist bekannt, dass Exosomen wichtige Faktoren bei der Krebsentstehung und Metastasierung sind. Für die Entstehung der Exosomen sind verschiedene Proteine wichtig, wie zum Beispiel ESCRT-Komplexe, Flotillin-1 und Syntenin-1. Die Interaktion von ESCRT-Proteinen und Flotillin-1 ist bereits bekannt, ebenso die Interaktion von Syntenin-1 mit Syndecanen, was zur Rekrutierung von ALIX und schlussendlich zur Entstehung von intraluminalen Vesikeln beiträgt (Baietti et al., 2012; Meister et al., 2017). In dieser Arbeit soll die Interaktion von Flotillin-1 mit Syntenin-1 in MCF7-Zellen genauer untersucht werden, um die an der Interaktion beteiligte Domäne des Syntenins zu charakterisieren und eine mögliche Ko-Lokalisation in der Zelle festzustellen. Unbekannt ist weiterhin, ob Flotillin-1 ebenfalls mit Syndecanen interagiert, die bei der Exosomenentstehung mit Syntenin-1 interagieren. Daher soll eine Interaktion von Flotillin-1 und den Syndecanen mittels Pulldown-Experimenten und immunhistochemischer Untersuchungen überprüft werden.

Darüberhinaus soll die Rolle von Flotillin-1 in der Exosomenentstehung mit Hilfe von Flotillin-1-Knockout-Zellen genauer beleuchtet werden, ebenso wie die Expression von Syntenin-1 in diesen Exosomen.

2 Material

2.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1: Geräte und Materialien

Produktname	Hersteller
Acrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	GE Healthcare, München, Deutschland
Agarose-Gelelektrophorese Kammer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
B & W Isoplate™-96 Well-Platte, schwarz-weiß	Saveen & Werner AB, Limhamn, Schweden
Bakterienschüttler, KS-15	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Beckman Optima™ LE-80K Ultracentrifuge	Beckman, Kalifornien, USA
Bio Photometer Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Cellstar® Plastikröhrchen 15ml, 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entwickler Maschine, Curix 60	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Filterpapier Protran BA 83	Whatman, Dassel, Deutschland
Glaskolben	Schott-AG, Mainz, Deutschland
Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Inkubator, Sanyo	EWALD, Innovationstechnik GmbH, München Deutschland
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM710 Meta	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar, Deutschland
Mikrotestplatte 96 Well F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nano Quant plate™	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Neon™ transfection system 10 µl Kit Tips	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Neon™ transfection system 10 µl Kit Tubes	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Neon™ transfection system Device	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Neon™ transfection system Pipette	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Neon™ transfection system Pipette Station	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	VWR International, Darmstadt, Deutschland
PCR-Gerät T personal Kombi	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Petrischale, Glas, 20 cm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipetten, Filter Tips	nerbe plus, Winsen, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm, Super RX-N	FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 14 ml	FALCON, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
SDS-Gel Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spannungsquelle, Elektrophoresis power supply, EPS 301	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer, BioPhotometer Plus	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland

Sterilbank, Herasafe KS	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Tecan infinite M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Ultraschallgerät, Sonoplus	Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland
Ultraviolettstrahler NU-72 ML	Benda Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Vortex V-1 Plus	Biosan, Riga, Lettland
Waage Toledo, PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Western-Blotsystem, Criterion Blotter	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 6; 12; 24, 48, 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 6-Well)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckmann® Instruments, Kalifornien, USA
Zentrifugen, Micro 200 R, Micro 22 R, Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlegern, Deutschland

2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10x CutSmart-Puffer	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
10x Ligase-Puffer	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
10x PCR-Puffer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4'-6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bradford Reagenz	BioRad, München, Deutschlad
Bromphenolblau, Na-Salz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie brilliant blue G-250	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC-H ₂ O)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glucose	gibco®Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Dann-Größenmarker	eigene Herstellung
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desoxynucleosid-Triphosphat-Mix (dNTPs)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Dynabeads Protein A	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
ECL-Lösung	eigene Herstellung
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Exosome-depleted FBS	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	gibco®Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Glutathione-sepharose-beads 4B	GE Healthcare, München, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozyme	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MACSfectin™ Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (3M)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Octyl-beta-D-glucopyranoside	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pansorbin cells	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinmarker	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Puromycin (10 mg/ml)	invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Q5-Reaction buffer	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Ligase	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Puffer

Tabelle 3: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5% Milchpulver in TBST
CO-IP-Puffer	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure
DMEM ++	500 ml DMEM; 10% FCS; 1% Penicillin; 1% Streptomycin
ECL-Lösung	5 mM Tris pH 8; 250 mM Luminol; 90 mM Cumarinsäure
Entfärber, Coomassiegel	7,5% Essigsäure; 7,5% Ethanol
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes pH 6,8; 2 mM MgCl ₂ ; 5 mM EDTA pH 8; 4% PFA
GST Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,01% Triton X-100; 1 mM DTT; 40 mM reduziertes Glutathion

Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
LB-Agar	15 g Agar-Pulver; 1 L LB-Medium
Luria/ Miller Medium (LB-Medium)	20 g LB-Brühe; 1 L destilliertes Wasser
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	150 mM NaCl; 20 mM Natriumdihydrogenphosphat
Ponceau Färbelösung	5% Essigsäure; 1% Ponceau S
Proteinladepuffer, 4x	0,1% Bromphenolblau; 100 mM DTT; 10% Glycerin; 2% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 6,8
SOC-Medium	40 mM Glucose; LB-Medium
Stripping Puffer	0,1 M Natriumhydroxid
TAE Puffer, 1x	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA pH 8
TBST	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween
Transferpuffer für Western Blot	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 10% Methanol

2.3 Antikörper

Tabelle 4: primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	WB	IF	COIP	Hersteller
CD-63	Maus	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Flotillin-1	Kaninchen			3 µl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Flotillin-1	Kaninchen		1:50		Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA

Flotillin-1	Maus	1:1000			BD, Heidelberg, Deutschland
Flotillin-2 /ESA	Maus	1:1000	1:100		BD, Heidelberg, Deutschland
GAPDH	Maus	1:10 000			Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Syndecan-1 (sc-12765)	Maus	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Syndecan-1 (sc-390791)	Maus		1:100		Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Syntenin-1 (sc-100336)	Maus	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Syntenin-1 (sc-515538)	Maus		1:150		Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

Tabelle 5: sekundäre Antikörper

Antikörper	WB	IF	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen/ Horseradish Peroxidase	1:10 000		Dako, Wiesentheid, Deutschland
Ziege anti-Maus/ Horseradish Peroxidase	1:10 000		Dako, Wiesentheid, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen/ AlexaFluor 488		1:250	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich
Ziege anti-Maus/ CY3		1:250	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

2.4 Primer

Tabelle 6: Primer

Primer	5'-3'-Sequenz
Flot-1-fwd	CTATAGGTACCTCCCTCTCCCTACCAACTTCCC
Flot-1-rev	CTATAGAATTCTGCAGGCAAGGGTTGAGAAGAC
Syn1-CT-fwd- BamHI	CTATA GGATCCTACCGCATGAAGAAGAAGGAC
Syn1- CTSTOP-XhoI	CTATACTCGAGTCAGGCATAGAATTCCTCCTGTTTG
Syn2-CT-fwd- BamHI	CTATAGGATCCCGCATGAGAAAGAAGGATGAAGG
Syn2- CTSTOP-XhoI	CTATACTCGAGTTACGCATAAACTCCTTAGTAGG
Syn3-CT-fwd- BamHI	CTATAGGATCCTATCGTATGAAGAA AAAGGATGAG GG
Syn3- CTSTOP-XhoI	CTATACTCGAGCTAGGCATAGAACTCCTCCTGC
Syn4-CT-fwd- BamHI	CTATAGGATCCCGTATGAAGAAGAAGGATGAAGG
Syn4- CTSTOP-XhoI	CTATA CTCGAG TCACGCGTAGAACTCATTGG

2.5 Kommerziell erworbene Kits

Tabelle 7: Kommerziell erworbene Kits

Kit	Hersteller
Neon®Kits 10 µL	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Phire™ Tissue Direct Master Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Femto Trial Kit (stark)	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Pico Trial Kit (schwach)	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.7 Bakterienstämme

Tabelle 8: Bakterienstämme

Bezeichnung	Bakterium	Anwendung	Referenz
Rosetta (DE3) pLysS	Escherichia coli	Proteinexpression	Merck, Darmstadt, Deutschland
XL-1 Blue	Escherichia coli	Plasmidamplifikation	Agilent/ Stratagene, La Jolla, Vereinigte Staaten

2.8 Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung
MCF7	Adenokarzinomzellen der weiblichen Mamma
HEK293T	Embryonale Nierenzellen des Menschen
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen

3 Methoden

3.1 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolierung

Um Syndecan-Fusionsproteine für Pulldown-Experimente herzustellen, wurde zunächst RNA von Syndecan-exprimierenden Zellen benötigt. Da nicht alle Syndecane ubiquitär exprimiert werden, wurden unterschiedliche Zelllinien zur RNA-Isolierung verwendet. Die RNA von Syndecan 1 und 4 wurde aus MCF7-Wildtyp-Zellen gewonnen. Die Isolierung der RNA für Syndecan 3 erfolgte aus SH-SY5Y-Zellen. Für Syndecan 2 wurde bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene cDNA aus Fibroblasten verwendet.

Die zuvor in einem 6-Well ausgesäten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 90% zweimalig mit PBS gewaschen, in PBS mithilfe eines Zellschabers abgelöst, und bei 1 000 x g und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 600 µl Trizol aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 120 µl Chloroform hinzugefügt, die Probe für 15 Sekunden geschüttelt und anschließend für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein 15minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12 000 x g. Die dabei entstandene obere Phase wurde abgenommen und mit 300 µl Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut für 10 Minuten bei 4°C und 12 000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurden 480 µl 75%iger Ethanol hinzugefügt, resuspendiert und 5 Minuten bei 4°C 7 500 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt um die RNA zu waschen. Das Pellet wurde für 20 Minuten an der Luft getrocknet, bevor es in 30 µl DEPC-H₂O gelöst wurde.

3.1.2 cDNA-Synthese

Um aus der gewonnen RNA cDNA herzustellen, wurde 1 µg der RNA mit 2 µl 1 pmol/µg d(T)₂₃VN (Oligo d'T) und 1 µl 10 mM dNTP in einem Eppendorfgefäß vermischt und mit der entsprechenden Menge DEPC-H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz denaturierte für 5 Minuten bei 65°C.

Nach der Denaturierung erfolgte eine kurze Zentrifugation und es wurden folgende Komponenten auf Eis hinzugefügt:

Reagenz	Volumen in μl
5x ProtoScript II Buffer	4
0,1 M DTT	2
ProtoScript II RT (200 U/ μl)	1
RNAse Inhibitor (40 U/ μl)	0,2
DEPC- H_2O	2,8

Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 65°C um die Enzymaktivität zu stoppen.

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung der DNA, welche hier das Template darstellt. Der PCR-Ansatz setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen: 20 μl 5x Q5-Reaktions-Puffer mit Magnesiumchlorid, 2 μl dNTPs (10 mM), 1 μl vorwärts Primer (100 μM), 1 μl rückwärts Primer (100 μM), 74 μl DEPC- H_2O , 1 μl DNA-Template und 1 μl Q5-Polymerase.

Um das Template zu amplifizieren, wurde der PCR-Ansatz für 2 Minuten bei 98°C denaturiert. Im Anschluss wurde in 35 Zyklen bei 98°C für 30 Sekunden denaturiert, bei 65°C für 30 Sekunden hybridisiert und bei 72°C für 30 Sekunden die DNA elongiert.

Zuletzt erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 72°C.

3.1.4 Elektrophorese im Agarose-Gel

Zur Größenauftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1%iges Agarosegel (gelöst in 0,5x TAE-Puffer) mit 1:10 000 Ethidiumbromid verwendet. Das Ethidiumbromid dient der Darstellung der DNA unter UV-Lichteinwirkung. Die Agarose wurde bis zum Kochen erhitzt, anschließend mit Ethidiumbromid versetzt und in die Gießkammer gegeben. Bei Raumtemperatur wurde das Gel fest, und die Proben und ein Größenmarker konnten mit Ladepuffer versetzt aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese lief bei 120 V für 30 Minuten in TAE-Puffer. Das Gel wurde auf einem UV-Tisch angestrahlt und die erwünschten Proben mit einem Skalpell herausgeschnitten.

3.1.5 Gelextraktion des PCR-Produktes

Im Anschluss wurde das PCR-Fragment aus der Elektrophorese mit dem Gel und PCR Clean-up Kit von Nucleospin entsprechend des Hersteller-Protokolls isoliert und aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl NE-Puffer.

3.1.6 Restriktionsverdau

30 µl des aufgereinigten PCR-Produktes wurden über Nacht mit 5 µl 10x CutSmartPuffer, je 2 µl der Enzyme BamHI und XhoI und 21 µl DEPC-H₂O bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurde der verdaute Ansatz erneut mit dem Gel und PCR Clean-up Kit von Nucleospin aufgereinigt und in 10 µl NE-Puffer eluiert.

10 µl (entsprechend 5 µg) des verwendeten Vektors (pGEX-4-T1) wurden ebenfalls über Nacht bei 37°C zum Restriktionsverdau inkubiert. Hier wurden 4 µl CutSmart-Puffer, 2 µl XhoI, 2 µl BamHI und 22 µl DEPC-H₂O verwendet.

3.1.7 Ligation

Die Ligation des PCR-Produktes und des dephosphorylierten Vektors erfolgte über Nacht bei 16°C. Es wurden 1 µl 10x Ligase-Puffer, 6 µl des PCR-Produktes, 2 µl des dephosphorylierten Vektors und 1 µl T4-DNA-Ligase verwendet.

3.1.8 Transformation in *E.coli* XL-1 blue

Um das hergestellte Plasmid zu vervielfältigen, wurde das Plasmid in chemisch kompetente *E.coli* XL-1 blue transformiert. Es wurden 100 µl der *E.coli* XL-1 blue 30 Minuten auf Eis mit 10 µl des Ligationsansatzes inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Die Bakterien wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 500 µl SOC-Medium versorgt, bevor sie für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und 200 µl des erneut resuspendierten Pellets auf einer LB-Agar-Platte mit enthaltenem Ampicillin ausgestrichen, um die transformierten Bakterien über Nacht bei 37°C wachsen zu lassen. Zur Expression der Syndecan- und Syntenin-GST-Fusionsproteine wurden die Plasmide in *E.coli* Rosetta nach dem beschriebenen Vorgehen transformiert und ausplattiert.

3.1.9 Mini-Plasmid-Präparation

Am darauffolgenden Tag wurden von den LB-Agar-Platten jeweils 6 Einzelkolonien in ein Rundbodenröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht

bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde eine Isolation der PlasmidDNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit dem Plasmid Kit von Nucleospin durchgeführt. Die entstandene DNA wurde zur Bestätigung der erfolgreichen Klonierung bei Microsynth Seqlab GmbH sequenziert.

3.1.10 Midi-Plasmid-Präparation

Die Midi-Plasmid-Präparation wurde nach den Hersteller-Anweisungen mit dem NucleoBond® Xtra Midi EF Kit durchgeführt. Hierzu wurde am vorherigen Tag jeweils ein Erlenmeyerkolben mit 150 ml LB-Medium mit 250 µg/ml Ampicillin und 1 ml aus dem Rundbodenröhrchen befüllt. Der befüllte Erlenmeyerkolbe schüttelte über Nacht bei 37°C und 5 x g.

3.1.11 DNA-Konzentrationsmessung

Um die Konzentration der DNA aus der Midi-Plasmid-Präparation zu ermitteln, wurden auf der TECAN Nano Quant Platte mit 3 µl des entsprechenden Lösungsmittels ein Nullabgleich durchgeführt, und anschließend 3 µl der Proben in Duplikaten bei 260 nm gemessen.

3.1.12 Proteininduktion

Damit ein indirekter Pulldown mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt werden konnte, mussten die hergestellten Plasmide in *E.coli* Rosetta transformiert werden und diese anschließend zur verstärkten Proteinexpression angeregt werden. Von den ausplattierten und transformierten *E.coli* Rosetta wurden 5 ml LB-Medium mit 250 µg/ml Ampicillin in Rundbodenröhrchen mit jeweils einer Kolonie angeimpft und über Nacht im Inkubator bei 37°C geschüttelt.

Am darauffolgenden Tag wurde jeweils 1 ml der Kultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und die optische Dichte im Photometer gemessen. Als Leerwert wurde 1 ml des verwendeten LB-Mediums genutzt. Die optische Dichte bei Beginn sollte ungefähr 0,06 betragen. Pro Probe wurden 2 Erlenmeyerkolben bestückt. Die Erlenmeyerkolben wurden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte gemessen. Betrug die optische Dichte zwischen 0,4 und 0,6, wurde von jedem Erlenmeyerkolben eine 1 ml Probe entnommen und in jeden Erlenmeyerkolben 100 µl 1M IPTG gegeben, um die Proteinsynthese zu induzieren. Dies geschah über Nacht im Schüttelinkubator bei 20°C.

Am nächsten Tag wurde erneut die optische Dichte bestimmt und eine angepasste Probenmenge entnommen. Die Konzentration der entnommenen Proben sollte äquivalent sein, da so eine Vergleichbarkeit in der Gelelektrophorese möglich ist. Deshalb wurde anhand der gemessenen optischen Dichte und des zuvor entnommenen Volumens (1 ml) bestimmt, welches Volumen nach der Induktion zu entnehmen war, um die gleiche Bakterienanzahl zu gewährleisten.

Die entnommenen Proben wurden zentrifugiert, das Pellet in 40 µl 2x Ladepuffer gelöst, und hiervon 20 µl auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der restliche Teil der Kultur wurde in einem Falcon für 5 Minuten bei 3 850 x g zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren.

3.1.13 Kontrolle der Proteininduktion und Konzentrationsbestimmung

Zur Kontrolle des Erfolges der Proteininduktion wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit den nicht-induzierten und induzierten Proben durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die entnommene Menge der induzierten Probe entsprechend der optischen Dichte an die nicht-induzierte Probe angepasst.

Als Größenorientierung in der Gelelektrophorese wurde der BioRad-Proteinmarker verwendet. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach stattgefundener Elektrophorese für 20 Minuten mit der Coomassie-Färbelösung angefärbt. Die Entfärbung wurde über Nacht mittels Coomassie-Entfärber durchgeführt. Am nächsten Tag konnten die sichtbaren Banden beurteilt und mittels Scanner dokumentiert werden.

Verlief die Induktion erfolgreich, wurde das GST-Fusionsprotein, wie unter 3.1.14 beschrieben, aufgereinigt, und mit dem nun aufgereinigten Protein eine erneute SDS-Gelelektrophorese zur Bestimmung der Konzentration durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl der Proteinprobe mit 90 µl Wasser verdünnt und von dieser Verdünnung 10 µl (entsprachen 1 µl der Probe) mit 20 µl 2x Ladepuffer und 30 µl (entsprachen 3 µl der Probe) mit 10 µl 4x Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Als dritte Konzentration wurden 5 µl der Proteinprobe mit 7 µl 4x Ladepuffer versetzt auf das Gel aufgetragen. Als Vergleichskonzentrationen wurden 0,5 µg, 1 µg und 2 µg BSA mit 7 µl 4x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Anhand der bekannten BSA-Konzentrationen konnten die Konzentrationen der GST-Fusionsproteine bestimmt werden. Diese wurden anschließend in jeweils 5 µg oder 10 µg aliquotiert und für indirekte Pulldown-Experimente verwendet.

3.1.14 Proteinaufreinigung

Die exprimierten GST-Fusionsproteine wurden mithilfe des Glutathion-S-TransferaseTags (GST-Tag) und Glutathion-Beads aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde zu dem GST-Lysepuffer frisch 1,5 μ M Aprotinin, 23 μ M Leupeptin, 1,5 μ M Pepstatin A, 1 mM PMSF und 1 mM DTT hinzugefügt. Von diesem angesetzten Puffer wurden 10 ml für ein Pellet aus 200 ml Bakterienkultur verwendet.

Um das Bakterienpellet zu lösen, wurde nach Zugabe des Puffers für 1 Minute bei 85% Amplitude und 50% Power das Ultraschallgerät verwendet. Im nächsten Schritt wurde pro 5 ml Suspension 33 μ l Lysozym hinzugefügt und 15 Minuten lang auf Eis lysiert. Danach wurde wiederholt das Ultraschallgerät angewendet und die Suspension schließlich für 10 Minuten bei 7 670 x g zentrifugiert.

Bereits während das Pellet auf Eis lysierte, wurden die Glutathion-Beads gewaschen. Pro 50 ml Bakterienkultur wurden 100 μ l der Beads verwendet. Der erste Waschschriff wurde mit 1 ml destilliertem Wasser durchgeführt, der darauffolgende mit 1 ml PBS und der letzte Waschschriff mit 1 ml GST-Lysepuffer. Zwischendrin erfolgte jeweils eine 3minütige Zentrifugation bei 2 460 x g. Abschließend wurde pro Ansatz in 100 μ l GSTLysepuffer resuspendiert.

Zu diesen gereinigten Beads wurde der Überstand der lysierten und zentrifugierten Bakterienkultur hinzugefügt, und dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C rotiert, um eine Bindung des Glutathions an den GST-Tag des aufzureinigenden Proteins zu erzielen. Am nächsten Tag wurden die GST-gebundenen Proteine durch 3-malige Hinzugabe von 5 ml 0,1% Triton in PBS, zwischenzeitlicher Zentrifugation bei 2 460 x g für 3 min und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Derselbe Ablauf wurde drei Mal mit 5 ml PBS und als letztes 3 Mal mit 5 ml 10% Glycerin in PBS durchgeführt. Die finale Resuspension erfolgte pro Probe in 800 μ l 10% Glycerin in PBS.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden bei -150°C in FCS mit 10% DMSO in Kryo-Röhrchen gelagert. Um die Zellen erneut kultivieren zu können, wurden diese im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und der Inhalt des Kryo-Röhrchens in ein mit 5 ml Medium befülltes Falcon gegeben. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen, wurde für 1 Minute bei 380 x g zentrifugiert und das so entstandene Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und in eine sterile Kulturflasche mit 5 ml DMEM + + überführt.

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Um die gewünschte Zelllinie einzufrieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste von abgestorbenen Zellen zu entfernen, und für 5 Minuten mit PBS/EDTA behandelt. Die Ablösung erfolgte durch 5-minütiges Trypsinieren. Diese Ablösungsreaktion wurde durch FCS mit 10% DMSO gestoppt und 1 ml der Lösung in ein Kryo-Röhrchen überführt. So konnten die Zellen bei -180°C gelagert werden.

3.2.3 Ermittlung der Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer

Um die Neubauer-Zählkammer zur Ermittlung der Zellzahl nutzen zu können, wurde ein Deckgläschen auf der Kammer befestigt und dieses mit 20 µl der Zellsuspension, die beim Passagieren der Zellen nach Abstoppen der Ablösungsreaktion entstanden ist, beschickt. Die Zählkammer gliedert sich in 4 große Quadrate, welche sich jeweils in 16 weitere Quadrate aufteilen lassen. Um die Anzahl der Zellen bestimmen zu können, wurde die beschickte Kammer unter dem Lichtmikroskop platziert und die Zellen in den Quadraten wurden gezählt. Die addierte Zahl wird durch 4 dividiert und danach mit 10^4 multipliziert, um so die Zahl der Zellen pro Milliliter zu erhalten.

3.2.4 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Die eukaryotischen Zellen wurden in DMEM ++, welches 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt, bei 37°C und 8% CO₂ kultiviert. Für die Exosomen-Isolierungen wurde Dulbecco's Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% Exosomen-freies FBS für 24 h auf die Zellen gegeben und anschließend verwendet.

Die verschiedenen Knockdown-Zellklone wurden unter Selektionsdruck in DMEM ++ mit zusätzlichem Puromycin (2 µg/ml) kultiviert. Die Standard-Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen T25 mit 5 ml DMEM ++.

3.2.5 Passagieren der Zellen

Wenn die Konfluenz der Zellen ungefähr 80-90% betrug, wurden die Zellen zum Aussäen für verschiedene Experimente verwendet oder ein Teil der Zellen verworfen, um weiteres Wachstum zu ermöglichen. Im ersten Schritt wurde das Medium entfernt, und die Zellen in den T25 Zellkulturflaschen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Als nächstes erfolgte je nach Zelllinie eine unterschiedlich lange

Inkubationszeit mit 1 ml PBS mit Zusatz von EDTA, um die Calcium-abhängigen Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Die MCF7-Zellen wurden hiermit 5 Minuten inkubiert, die HEK293T Zellen wiederum 90 Sekunden.

Nach Entfernung des PBS/EDTA wurde die Ablösungsreaktion der Zellen vom Boden der Flaschen mit 500 µl Trypsin durchgeführt, welches bei der MCF7-Zelllinie für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion der HEK-Zellen wurde direkt nach Hinzugabe des Trypsins durch 1 ml DMEM ++ abgestoppt. Beide Zelllinien wurden nach der Zugabe von 1 ml Medium resuspendiert, und ein Teil der Suspension entweder in neue Zellkulturflaschen überführt, in den bereits Bestehenden belassen, oder für Experimente auf unterschiedliche Formate ausgesät.

3.2.6 Transiente Transfektion mit MACSfectin™

Um eine Überexpression des Syntenins für die Ko-Immunpräzipitation herbeizuführen, wurden die HEK-Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, bis eine 80%ige Konfluenz gegeben war.

Unmittelbar bevor die Transfektion erfolgte, wurde das Medium der Zellen entfernt und neues hinzugegeben. Um ein Well zu transfizieren, wurden 2 Ansätze vorbereitet: In jeweils 200 µl DMEM (ohne FCS, Streptomycin und Penicillin) wurden einmal 2 µg DNA gelöst und einmal 6 µl MACSfectin™. Wurden mehrere Wells transfiziert, veränderten sich die verwendeten Mengen entsprechend. Die beiden Ansätze wurden anschließend vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch aus DMEM, DNA und MACSfectin™ kreisförmig in das Well getropft und verteilt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in eine 10 cm Schale überführt und bei 90-100%iger Konfluenz aus diesem Format geerntet.

3.2.7 Stabile Transfektion durch Elektroporation mittels Neon™

Transfektionssystem

Um den Flotillin-1-Knockout herbeizuführen, wurden die MCF7-WT-Zellen mittels Elektroporation und dem CRISPR/CAS9-System stabil transfiziert, und anschließend die erfolgreich transfizierten Zellen selektiert.

Im ersten Schritt wurde das Medium aus der T25 Flasche entfernt und die Zellen mit PBS und anschließend PBS/EDTA gewaschen um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Abgelöst wurden die Zellen, wie beim Passagieren, durch 5-minütiges inkubieren in 500 µl Trypsin

gelöst in PBS/EDTA. Beendet wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 2 ml DMEM++.

Die Suspension aus Zellen, Trypsin und Medium wurde in ein 15 ml-Falcon überführt und 5 Minuten bei 380 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml PBS gelöst. Die Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer entsprechend den Hinweisen des Herstellers gezählt, und die gewählte Zellzahl (hier 350 000) in dem entsprechenden Volumen des Puffers R gelöst (hier 35 µl). Es wurden jeweils 2 Ansätze durchgeführt. Der erste Ansatz wurde mit 2 µg des F1G20-Plasmids transfiziert. Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein bereits in der Arbeitsgruppe verwendetes gRNA-Plasmid für einen Flotillin-1-Knockout. Für den zweiten Ansatz setzte sich die DNA aus 1,5 µg F1G20-Plasmid und 0,5 µg eines PX459-Plasmids, welches neben Cas9 auch eine Puromycin-Resistenz enthielt, zusammen, um über eine spätere Puromycin-Selektion die Wahrscheinlichkeit der stabil transfizierten Zellklone zu erhöhen. Um die Transfektion mittels Elektroporation durchzuführen, wurden die Zellen in Puffer R aufgenommen und anschließend diese Zellsuspension mit der beschriebenen DNA-Menge gemischt.

Das Neon-Röhrchen wurde mit 3 ml Puffer E befüllt und in die Halterung des NeonElektroporators eingebracht. Mithilfe der 10 µl Pipettenspitzen des Herstellers wurden 10 µl der Zell- und DNA-Mischung aufgenommen und in das Röhrchen mit Puffer E eingefügt. Dann erfolgte die Elektroporation mit 850 V und 3 Pulse für je 30 ms. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf einer 6 cm Schale belassen und bei 37°C im Brutschrank in 5 ml DMEM ++ kultiviert. 24 Stunden später wurde bei den mit F1G20 und PX459 transfizierten Zellen eine Puromycin-Selektion durchgeführt, indem das DMEM ++ entfernt wurde und durch DMEM ++ ersetzt wurde, welches zusätzlich 2 µg/ml Puromycin enthielt. Dieses Medium wurde nach 24 Stunden wieder entfernt, und die überlebenden Zellen wurden weiter in DMEM ++ kultiviert.

Es erfolgte ein weiterer, unabhängiger Ansatz, um die Chancen des Knockouts zu verbessern. Hier wurden ebenfalls die MCF7-WT-Zellen verwendet, allerdings wurde die Anfangskonzentration stark erhöht. So wurden insgesamt 1,6 Millionen Zellen in 20 µl Puffer R aufgenommen und hiervon einmal 10 µl mit 1,5 µg F1G20 und 0,5 µg PX459 vermischt und transfiziert. Danach wurden zur Zell-Puffer-Mischung 10 µl Puffer R hinzugefügt, um die Konzentration ein wenig zu verringern, und hiervon erneut 10 µl abgenommen und elektroporiert. So wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, aus der 4 unterschiedlich konzentrierte Ansätze entstanden. Die Elektroporation erfolgte hier mit

950 V und 2 Pulse für 40 ms. Schlussendlich wurde nach der Elektroporation wie oben beschrieben vorgegangen. Der erste Ansatz der Verdünnungsreihe wurde als Reserve in FCS mit 10% DMSO eingefroren, und die 3 anderen Ansätze wurden auf jeweils eine 96-Well-Platte verteilt, sodass rechnerisch in jedem Well ein Zellklon vorhanden sein sollte.

3.2.8 Generierung von Einzelzellklonen

Nach ungefähr 3 Tagen (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) in der 6 cm großen Schale wurden die Zellen wie beim Passagieren abgelöst und in 96-Well-Platten überführt. Hierzu wurde erneut die Neubauer-Zählkammer angewendet, und für den Ansatz ohne Puromycin-Selektion anschließend eine Mischung aus 20 ml DMEM + + und 5 µl Zellsuspension erstellt, da 1 µl der Zellsuspension 20 Zellen enthielt und ungefähr 100 Zellen für eine 96-Well-Platte benötigt wurden. Ziel war es, jedes Well mit genau einer Zelle zu befüllen, um letztendlich Einzelzellklone zu erhalten. Die bereits gefüllten Wells wurden zwischendurch mikroskopiert, um die Anzahl der Zellen einschätzen zu können. Hierbei wurde ersichtlich, dass wenig Zellen vorhanden waren, weshalb ab der Hälfte der Wells für jede Reihe der Platte zusätzlich 6 µl der Zellsuspension zur Mischung hinzugefügt wurden. Der zweite Ansatz wurde aufgrund der vorangegangenen Schwierigkeiten ohne die Zählkammer vereinzelt. Es wurden 20 µl Zellsuspension in 20 ml Medium aufgenommen und so jede Reihe der 96-Well-Platte befüllt. Vor dem Befüllen der letzten Reihe wurden 10 µl der nicht verwendeten Zellsuspension zur restlichen Mischung hinzugefügt, um die Zellzahl zu erhöhen.

3.2.9 Screening der Einzelzellklone

Um die Zellklone zu identifizieren, in welchen das CRISPR/CAS9-System zu einem erfolgreichen Flotillin-1 Knockout geführt hat, wurden die transfizierten Zellen wie unter 3.2.8 beschrieben auf 96-Well-Platten vereinzelt und anschließend je nach Wachstum auf das nächst größere Format umgesetzt. So wurden die einzelnen Klone vermehrt, bis jeweils zwei 12-Well-Felder bewachsen waren. Die mit dem Puromycin-Plasmid transfizierten Zellen wurden unter Selektionsdruck mit 2 µg/µl Puromycin kultiviert. Von der 12-Well-Platte wurde ein Feld als Lysat zur Proteinanalyse erstellt (siehe 3.2.11), und die Zellen des anderen Feldes bei -150°C in FCS mit 10% DMSO eingefroren, um bei bestätigtem Knockout-Ergebnis die Zellen wieder auftauen zu können. Mit dem hergestellten Lysat wurde ein Western Blot durchgeführt und zunächst der Anti-Flotillin1-

Antikörper verwendet. Die geladene Proteinmenge wurde mittels GAPDH überprüft. Als Negativkontrolle wurde ein Lysat der MCF7-WT-Zellen aufgetragen. Zeigte ein Zellklon kein Flotillin-1-Signal, wurden die Zellen aufgetaut (s. 3.2.1) und entsprechend weiter kultiviert.

Um den Knockout sequenziell nachzuweisen, wurden die kultivierten Zellen auf eine 24Well-Platte überführt und eines dieser Wells bei 80-90% Konfluenz nach den Herstellerangaben des Thermo Scientific Phire Tissue Direct PCR Master Mix-Kits aufgearbeitet. So konnte eine direkte PCR aus der genomischen DNA ohne vorherige Isolation der DNA erfolgen. Amplifiziert wurde die Stelle, an der die gRNA gebunden hatte. Die Annealing-Temperatur für die verwendeten Flotillin-1-Primer lag bei 60°C. Im Anschluss wurde mit dem PCR-Produkt eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (s. 3.1.4), die DNA aus dem Agarose-Gel mit dem Nucleospin® Gel und PCR-Clean-up Kit aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt. Die Sequenzen wurden abschließend mittels Blast® (Webadresse: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert und mit der humanen Flotillin-1-Sequenz verglichen.

3.2.10 Zellernte

Um Reste des Kulturmediums zu entfernen, wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen. Geerntet wurden die Zellen mit einem Zellschaber in PBS und für 2 Minuten bei 3850 x g und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden entsprechend der weiteren Vorgehensweise bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

3.2.11 Zelllysate zur Proteinanalyse

Entsprechend der Pelletgröße wurde Lysepuffer mit 1% Protease-Inhibitor-Cocktail zum Zellpellet hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die abschließende Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 25 150 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde als Lysat zu verschiedenen Analysezwecken eingesetzt und das Pellet verworfen.

3.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsmessung wurde mithilfe des Photometers durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml Bradford-Lösung mit 3 µl des Lysates oder mit 3 µl Puffer, zur Verwendung als Leerwert, vermischt. Die Extinktion wurde bei 600 nm gemessen.

3.2.13 Zellysate für Ko-Immunpräzipitation und GST-Pulldown

Um Lysate für die Ko-Immunpräzipitations- und Pulldown-Experimente herzustellen, wurden 10 cm große Schalen konfluenten Zellen verwendet. Nachdem das Medium entfernt worden war, wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, um Zelltrümmer und Überreste des Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden in 5 ml PBS mit einem Zellschaber geerntet, 2 Minuten bei 3 850 x g zentrifugiert, und das entstandene Pellet in 2 ml CoIP-Puffer, welcher zuvor mit 10% NOG und 1% Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt worden war, für 30 Minuten auf Eis lysiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 25 150 x g für 12 Minuten bei 4°C. Wurde das Experiment nicht am selben Tag wie die Ernte durchgeführt, wurde das Pellet nach der 2-minütigen Zentrifugation und Entfernung des Überstandes bei -20°C gelagert und unmittelbar vor dem Experiment in CoIP-Puffer lysiert.

3.2.14 Immunfluoreszenz-Färbung

Um eine topographische Nähe von Proteinen sichtbar machen zu können, wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Dafür wurden MCF7-Zellen auf eine 12-Well-Platte auf Deckgläschen ausgesät und bis 80-90% Konfluenz in DMEM ++ kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz konnte eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden. Zuerst wurde das Medium entfernt und die Zellen anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte für 8 Minuten bei -20°C durch 1 ml Methanol pro Well. Anschließend wurde das Methanol durch mehrmaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 50 µM Glycin in PBS für 10 Minuten und im Anschluss mit 1%igem BSA für 30 Minuten. Im nächsten Schritt inkubierte für 1 Stunde der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 1% BSA/PBS. Hierzu wurden die Deckgläschen aus der Wellplatte entfernt und in eine abgedunkelte, feuchte Kammer überführt, um eine Inkubation bei feuchter Atmosphäre zu gewährleisten. Nach dem Rückführen in die Well-Platte erfolgten erneut drei Waschschritte mit PBS, bevor die Deckgläschen wieder in die abgedunkelte Kammer überführt wurden, und der sekundäre Antikörper (Verdünnung 1:250) für eine Stunde inkubierte. Abschließend wurde drei Mal mit PBS und im letzten Schritt mit destilliertem H₂O gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträgern mit 12 µl des Eindeckmedium 50 mg/ml DABCO-versetztem GelMount befestigt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel.

10%iges Trenngel, 1 mm

Acrylamid 30%	13,4 ml
APS 10%	0,4 ml
destilliertes Wasser	21 ml
SDS 20%	0,2 ml
TEMED	0,064 ml
Tris pH 8,8 (3 M)	5 ml

4%iges Sammelgel, 1 mm

Acrylamid 30%	2,55 ml
APS 10%	0,075 ml
destilliertes Wasser	11,7 ml
SDS 20%	0,075 ml
TEMED	0,064 ml
Tris pH 6,8 (3 M)	0,624 ml

Zur Proteinanalyse wurden Proteine in SDS-Polyacrylamid Gelen bei 20 mA für 1 Stunde und 30 Minuten ihrer Größe nach im Lämmli-Puffer aufgetrennt. Die Proben für das jeweilige Gel wurden mithilfe der Bradford Konzentrationsmessung und destilliertem H₂O auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht und mit 4x Ladepuffer für 4 Minuten bei 94°C aufgekocht. Zur Größenorientierung wurden 2,5 µl des Proteinmarkers BioRad Precision Plus Protein Standard™ in eine separate Tasche des Gels pipettiert.

3.3.2 Western Blot

3.3.2.1 Transfer des Polyacrylamid-Gels

Anschließend wurden die Proteine innerhalb von 90 Minuten bei 400 mA auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschah in einer Blotkammer, befüllt mit Blotting-Puffer, in der das Gel und die Nitrocellulosemembran auf jeder Seite von einem

Filterpapier und einem Schwamm umgeben war. Um die vollständige und korrekte Übertragung abzusichern, wurde diese Membran im Anschluss mit einer Ponceau-SLösung angefärbt und durch Waschen mit TBST nach der Beurteilung wieder entfärbt.

3.3.2.2 Immundetektion

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 5%ige Lösung von Milchpulver in TBST für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschritte mit TBST für jeweils 10 Minuten, bevor der entsprechende sekundäre Antikörper, der bereits mit HRP (Merrettichperoxidase) gekoppelt war, bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert wurde. Danach wurde erneut drei Mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und schließlich die detektierten Proteine mit einer ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) auf Super RX Röntgenfilmen detektiert. Es wurde 1 ml der ECL-Lösung pro Membran verwendet und 1 Minute inkubiert. Die Zeit der Detektion anhand des Röntgenfilms variierte je nach Stärke und Zweck der Signale und der verwendeten Antikörper.

3.3.2.3 Strippen der Membranen

Um einen weiteren primären Antikörper verwenden zu können, wurde zwei Mal für 10 Minuten 0,1 M Natriumhydroxid als Stripping-Puffer verwendet. Zwischen den beiden Stripping-Schritten wurde mit TBST gewaschen und im Anschluss an das Denaturieren des gebundenen Antikörpers wiederholt mit 5%iger Milch in TBST geblockt, um erneut die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Es erfolgte eine erneute Inkubation eines primären Antikörpers über Nacht. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Ablauf.

3.3.3 Indirekter GST-Pulldown

Zur Durchführung des indirekten GST-Pulldowns sollte das Lysat mithilfe von Pansorbin-Beads gewaschen werden. Pro Lysat, welches aus einer 10-cm Schale hergestellt wurde, wurden 150 µl der Pansorbin-Beads verwendet. Diese wurden mit 1 ml PBS und anschließend Zentrifugationsschritt zwei Mal gewaschen. Nach dem zweiten Waschschritt wurden die Pansorbin-Beads in 300 µl CoIP-Puffer resuspendiert. Um das Lysat zu klären, wurden jeweils 100 µl der Pansorbin-Suspension mit dem Lysat 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden bei 3 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Nach

der dritten Inkubationszeit wurde bei 25 150 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand als Lysat für den indirekten Pulldown verwendet. Ein Aliquot des Lysates wurde als Kontrolle für die SDS-PAGE verwendet.

Die GST-Fusionsproteine (5 µg der Syntenine, 10 µg der Syndecane) wurden auf Eis aufgetaut und mit je 100 µl 10% BSA für 5 Minuten inkubiert. GST wurde in der äquivalenten Menge als Negativkontrolle verwendet. Es wurden 900 µl des vorgereinigten Lysats zu den Fusionsproteinen pipettiert und dies über Nacht bei 4°C rotiert, um eine effiziente Bindung zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei einer 3-minütigen Zentrifugation bei 16 090 x g gesammelt und fünf Mal mit 1 ml CoIP-Puffer gewaschen. Bevor eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, wurden die Proben in 20 µl 2x LB DTT 4 Minuten bei 94°C gekocht. Zu der Gelprobe des gereinigten Lysates wurden vor dem Kochen 10 µl 4x LB DTT hinzugegeben.

3.3.4 Ko-Immunpräzipitation

Auch bei der Methode der Ko-Immunpräzipitation war eine vorangehende Klärung des Lysates mit vorher gereinigten Pansorbin-Beads nötig. Um 150 µl Pansorbin-Beads zu waschen, wurde 1 ml PBS verwendet und für 90 Sekunden bei 1 700 x g zentrifugiert.

Dies wurde zwei Mal durchgeführt. Zuletzt wurden die Pansorbin-Beads in 150 µl CoIPPuffer pro Probe resuspendiert.

Anschließend wurden je 50 µl der gewaschenen Pansorbin-Beads zu den Lysaten gegeben, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 2 Minuten bei 25 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde umgefüllt und dieser Vorgang zwei Mal wiederholt. Beim letzten Waschvorgang wurde für 10 Minuten zentrifugiert. 30 µl des gewaschenen Lysates wurden als Positivkontrolle für die SDS-PAGE genutzt.

Bereits während die Lysate inkubierten, wurde die Kopplung des Antikörpers und der magnetischen Protein-A-Beads durchgeführt. Pro Probe wurden jeweils 30 µl der magnetischen Beads zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Schließlich wurden die ProteinA-Beads in jeweils 90 µl CoIP-Puffer und 10 µl 10% BSA in PBS resuspendiert. Um den Antikörper zu binden, wurden die Protein-A-Beads für 3 Stunden mit 3 µg des polyklonalen Flotillin-1-Antikörpers auf einem Drehrad gerollt.

Im Anschluss wurden die inzwischen Antikörper-beladenen Beads zweimal in 1 ml CoIPPuffer gewaschen und kurz zentrifugiert, um Flüssigkeitsrückstände entfernen zu können. Resuspendiert wurden die Beads in 50 µl Lysepuffer pro IP-Probe mit Zugabe

von 100 µl 10% BSA in PBS, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. 150 µl der Antikörper-gebundenen Beads wurden über Nacht im Kühlschrank mit 900 µl des jeweiligen Lysates inkubiert und gerollt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben mithilfe eines Magneten viermal mit 1 ml CoIP-Puffer gewaschen und zuletzt in 35 µl 2x LB DTT resuspendiert und 4 Minuten bei 94°C gekocht. Die Proteinauftrennung und Detektion erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

3.3.5 Exosomen-Isolierung: Ultrazentrifugation

Die Isolierung der Exosomen wurde jeweils mit den Flotillin-1-KO-Zellen und den Wildtyp-Zellen durchgeführt. Zur Isolierung wurde die Methode der Ultrazentrifugation gewählt.

Hierzu waren die Zellen zuvor auf 10 cm großen Schalen ausgesät wurden. Zeigten sich diese Schalen 90-95% konfluent, so wurde das Medium für 24 Stunden durch Dulbecco's Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% Exosome-free-FBS ersetzt, um nur die von den Zellen ausgeschütteten Exosomen zu erhalten.

Pro Probe für die Zentrifugation wurden zwei 10 cm große Schalen, entsprechend 10 ml Medium, verwendet. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und in Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden verworfen. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 800 x g für 10 Minuten bei 4°C und diente vor allem dem Entfernen von Zelltrümmern. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand bei 10 000 x g für 10 Minuten bei 4°C erneut zentrifugiert. In diesem Schritt wurden die Mikropartikel entfernt und verworfen.

Die finale Zentrifugation zur Isolierung der Exosomen wurde für 3 Stunden bei 4°C und 100 000 x g durchgeführt. Anschließend wurde das entstandene Pellet in PBS resuspendiert und wie bereits beschrieben für eine SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

Als Kontrolle wurde das entsprechende Lysat der jeweiligen Zelllinie verwendet.

3.4 Auswertung und Abbildungen

Alle dargestellten Experimente wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mindestens dreimalig durchgeführt und mithilfe von Microsoft PowerPoint beschriftet und abgebildet. Diese Arbeit wurde im Rahmen des Trainee-Programms der Justus-Liebig-Universität Gießen verfasst.

4 Ergebnisse

4.1 Syntenin-1 interagiert mit Flotillin-1

4.1.1 Expression von Syntenin-1-GST-Fusionsproteinen

Aus vorherigen Yeast-Two-Hybrid-Experimenten der Arbeitsgruppe Tikkanen war bereits bekannt, dass Flotillin-1 und Syntenin-1 miteinander interagieren (M. Meister & R. Tikkanen, nicht veröffentlicht). Als weitere Möglichkeit zum Nachweis einer ProteinProtein-Interaktion *in vitro* und zu einer genaueren Charakterisierung dieser Interaktion bietet sich die Durchführung eines indirekten Pulldown-Experimentes mit GSTFusionsproteinen an. Hierzu wurden die gewünschten Proteine als Fusionsprotein mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag exprimiert. Anschließend wurden GlutathionSepharose-Kügelchen zur Aufreinigung verwendet, da sie kovalent an den GST-Tag binden.

Um die für die Interaktion benötigten Teilsegmente genauer zu untersuchen, wurden Syntenin-1-GST-Fusionsproteine exprimiert, die unterschiedliche Domänen des Syntenins umfassten (siehe Abb. 4). Es handelte sich um das gesamte Syntenin-1, die Nterminale Domäne (NTD) und die C-terminalen PDZ-Domänen, jeweils mit einem Nterminalen GST-Tag versehen.

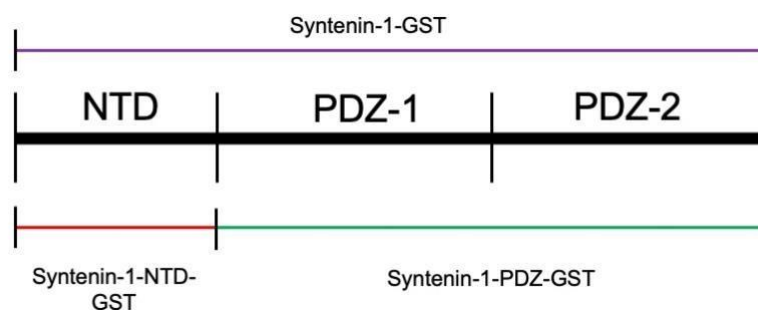


Abbildung 4: Syntenin-1-Struktur. Schematische Darstellung der Syntenin-1-Struktur mit ihren verschiedenen Domänen. Die gesamte Länge des Syntenin-1 im GST-Fusionsprotein ist Lila dargestellt. In Rot abgebildet ist der NTD-Teil und Grün das Fusionsprotein, welches die zwei PDZ-Domänen enthält. Modifiziert nach Baietti et al., 2012.

Es wurden bereits zuvor mit den jeweiligen Plasmiden transformierte Rosetta *E.coli* verwendet, die in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Die Sequenzen (siehe Abb. 5) lagen im pGEX-4-T1-Vektor vor. Zusätzlich wurde nur GST ohne Anhang exprimiert und das GST als Negativkontrolle verwendet.

atgtctctctatccatctctcgaagacttgaaggtagacaaagtaattcaggctcaaact

```

M S L Y P S L E D L K V D K V I Q A Q T
gctttttctgcaaaccctgccaatccagcaattttgtcagaagcttctgctcctatccct
A F S A N P A N P A I L S E A S A P I P
cacgatggaaatctctatcccagactgtatccagagctctctcaatacatggggctgagt
H D G N L Y P R L Y P E L S Q Y M G L S
ttaaatgaagaagaaatacgtgcaaattgtggccgtgggtttctgggtgcaccacttcagggg
L N E E E I R A N V A V V S G A P L Q G
cagttggtagcaagaccttccagtataaactatatgggtggctcctgtaactggtaatgat
Q L V A R P S S I N Y M V A P V T G N D
gttggaattcgtagagcagaaattaagcaagggttcgtgaagtcattttgtgtaaggat
V G I R R A E I K Q G I R E V I L C K D
caagatggaaaaattggactcaggcttaaatcaatagataatgggtatatttggttcagcta
Q D G K I G L R L K S I D N G I F V Q L
gtccaggctaattctccagcctcatttggttggtctgagatttggggaccaagtacttcag
V Q A N S P A S L V G L R F G D Q V L Q
atcaatggtgaaaactgtgcaggatggagctctgataaagcgcacaagggtgctcaaacag
I N G E N C A G W S S D K A H K V L K Q
gcttttgagagaagattaccatgaccattcgtgacaggccctttgaacggacgattacc
A F G E K I T M T I R D R P F E R T I T
atgcataaggatagcactggacatgttggttttatctttaaaaatggaaaaataacatcc
M H K D S T G H V G F I F K N G K I T S
atagtgaagatagctctgcagccagaaatgggtcttctcacggaacataacatctgtgaa
I V K D S S A A R N G L L T E H N I C E
atcaatggacagaatgtcattggattgaaggactctcaaattgcagacatactgtcaaca
I N G Q N V I G L K D S Q I A D I L S T
tctgggactgtagtactattacaatcatgcctgcttttatctttgaacatattattaag
S G T V V T I T I M P A F I F E H I I K
cggatggcaccaagcattatgaaaagcctaattggaccacaccattcctgaggttttaa
R M A P S I M K S L M D H T I P E V -

```

Abbildung 5: Sequenzen und Aminosäureabfolge der klonierten Syntenin-Konstrukte. In Lila hervorgehoben die NTD-Domäne. In Blau sind die PDZ-Domänen markiert.

Um eine Induktion der Expression der Fusionsproteine durchführen zu können, wurden die Rosetta *E.coli* zum Expandieren in selektives LB-Medium mit 250 µg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Nach erfolgter Induktion mit 0,15mM IPTG über Nacht bei 20°C wurde eine Gelelektrophorese der Bakterienlysate und eine Coomassie-Färbung zur Prüfung der erfolgreichen Induktion durchgeführt. In allen Proben war eine deutlich verstärkte Expression der gewünschten Proteine sichtbar (siehe Abb. 6). Außerdem wurden weitere, in Rosetta *E.coli* vorkommende endogene Proteine in ihrer Expression potenziert.

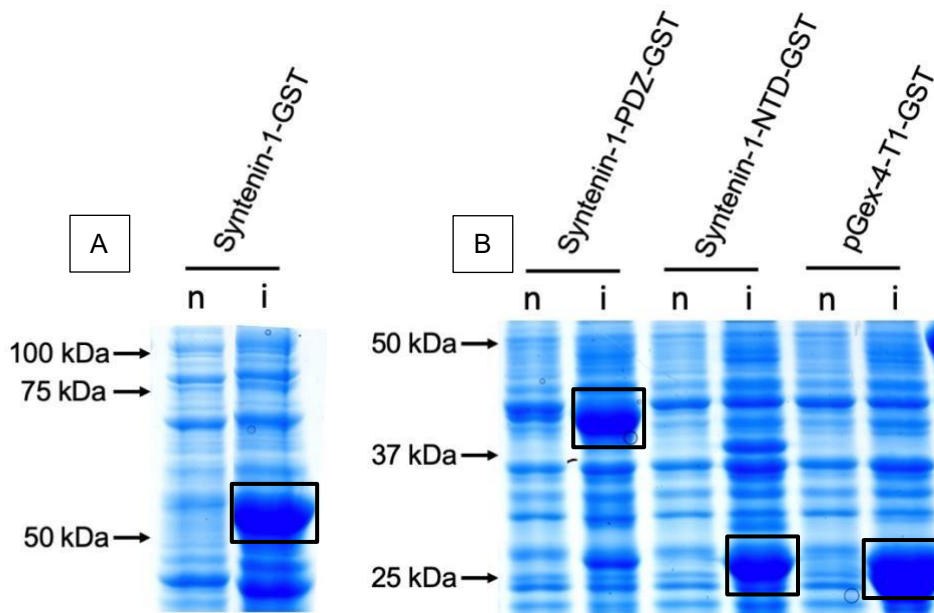


Abbildung 6: Coomassie-Färbung nach Proteininduktion der Syntenin-1-GST-Fusionsproteine. Die Induktion wurde bei einer optischen Dichte von 0,4-0,6 (gemessen bei 600 nm) mit 0,15 mM IPTG bei 20°C über Nacht durchgeführt. Bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese wurde die Probe der Bakterienlysate vor der Induktion (n, nicht induziert) und die jeweilige induzierte Probe (i, induziert) aufgetragen. Die Kästen markieren jeweils die induzierten Fusionsproteine. **A** Das Fusionsprotein mit gesamter Länge des Syntenins besitzt eine Molekularmasse von ungefähr 60 kDa. **B** Das Fusionsprotein mit den PDZ-Domänen ist ca. 43 kDa groß. Das Fusionsprotein mit der N-terminalen Domäne zeigt sich bei ca. 27 kDa. Als Negativkontrolle wurde das GST-Tag verwendet (pGEX-4-T1-GST), welches bei ungefähr 25 kDa zu sehen ist.

4.1.2 Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 bei indirektem Pulldown

Um Syntenin-1 als Interaktionspartner von Flotillin-1 zu verifizieren, wurde mit den rekombinanten Fusionsproteinen ein indirekter Pulldown durchgeführt. Mit den Proben aus den Pulldowns wurde eine SDS-Gelelektrophorese und ein anschließender Western Blot durchgeführt (siehe Abb. 7). Hier wurde Flotillin-1 mit einem Anti-Flotillin-1 Antikörper detektiert. Da nicht-transfizierte MCF7-Lysate verwendet wurden, handelte es sich um endogenes Flotillin-1. Die an der Interaktion beteiligten Domänen des Syntenins sollten durch Verwendung der aus den verschiedenen Domänen der Syntenin1 bestehenden Teilfragmente ebenfalls näher charakterisiert werden. Es wurde die gleiche Menge (5 µg) von allen Fusionsproteinen verwendet. Zum Konzentrationsvergleich wurde nur das Protein mit der kompletten Länge betrachtet, während die Abbaufragmente der PDZ-Domäne nicht berücksichtigt wurden.

Es zeigte sich eine deutlich erkennbare Interaktion des Syntenin-1-GST (entsprechend des gesamten Syntenin-1) und der Syntenin-1 PDZ-Domänen mit Flotillin-1 (siehe Abb. 7). Ebenfalls sichtbar war eine Interaktion von Flotillin-1 mit dem N-terminalen Teil des Syntenin-1-Proteins. Dieses Signal erschien allerdings deutlich schwächer, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass zwar beide Anteile des Syntenin-1 mit Flotillin-1 interagieren können, aber die PDZ-Domänen einen wichtigeren Teil der Interaktionsdomäne zu bilden scheinen. Alle Signale zeigten sich, der Größe von Flotillin-1 entsprechend, bei 47 kDa.

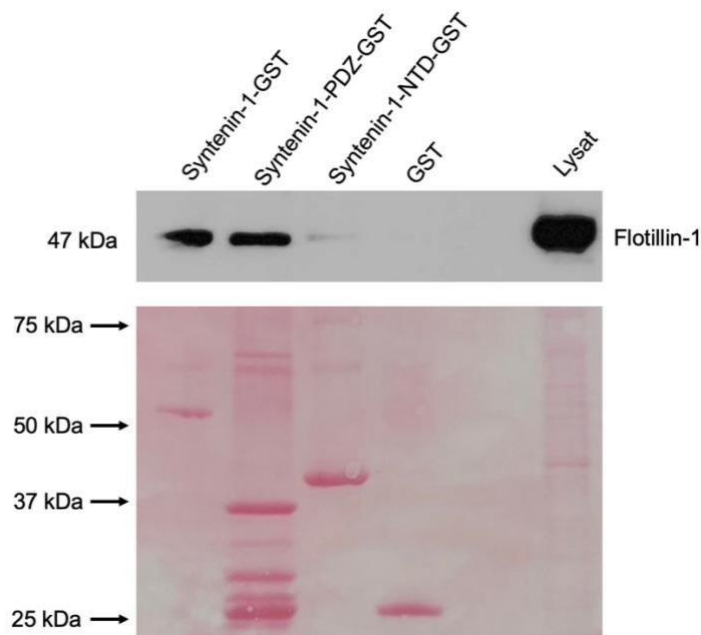


Abbildung 7: Nachweis der Proteininteraktion von Flotillin-1 und Syntenin-1. Dargestellt ist der Western Blot mit den GST-Pulldown-Proben und die gefärbte Nitrocellulosemembran. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden mit vorgereinigtem Lysat der MCF7-Zellen über Nacht inkubiert. Jede Probe enthielt 5 µg des GST-Fusionsproteins und wurde mit 900 µl Lysat inkubiert. GST wurde als Negativkontrolle verwendet. Es erfolgte eine Gelelektrophorese zur Größenauftrennung der Proteine und ein anschließender Western Blot. Die Nitrocellulosemembran wurde in der Ponceau-Lösung angefärbt, um die Übertragung und äquivalente Menge der Fusionsproteine zu sichern. Zur Detektion im Western Blot wurde ein monoklonaler Anti-Flotillin-1-Antikörper aus der Maus verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3 Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 in der Ko-Immunpräzipitation

Das Ergebnis des durchgeführten GST-Pulldowns lieferte klare Hinweise für eine Interaktion von Flotillin-1 und Syntenin-1 *in vitro*. Allerdings handelte es sich

ausschließlich um einen Nachweis einer Interaktion mit den hergestellten Fusionsproteinen. Eine Möglichkeit, eine Interaktion unter physiologischeren Bedingungen nachzuweisen ist die Ko-Immunpräzipitation. Hierzu wurde der AntiFlotillin-1-Antikörper zunächst nicht-kovalent an Protein A-Kügelchen gebunden. Der an die Kügelchen gebundene Antikörper wurde mit einem Lysat inkubiert, um das Antigen Flotillin-1 und seine assoziierten Interaktionspartner ebenfalls zu binden. So wurde nach mehreren Waschschritten nicht nur das gebundene Antigen präzipitiert, sondern zusätzlich ebenfalls die Interaktionspartner. Der Nachweis der Interaktion erfolgte im Western Blot durch Detektion des gesuchten Interaktionspartners mithilfe des entsprechenden spezifischen Antikörpers (hier Anti-Syntenin-1).

Die Expression von Syntenin-1 in HEK-Zellen wurde vor der Ko-Immunpräzipitation durch eine Transfektion mit Syntenin-1-Flag-pCDNA erhöht. Es wurde jeweils ein 6Well mit 2 µg DNA transfiziert, nach 24 Stunden geerntet und in CoIP-Puffer lysiert. Eine Probe des Lysates wurde als Kontrolle verwendet.

Wie der Western Blot in Abbildung 8 zeigt, konnte die Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 auch in der Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden. Es zeigten sich Signale für Syntenin-1 bei ca. 33 kDa in beiden Lysaten, wobei im Lysat der transfizierten Zellen zwei Syntenin-1-Signale auftraten, was auf das Flag-Tag der verwendeten DNA zurückzuführen ist. Die untere Bande stellte das endogene Syntenin-1 dar und die obere Bande das durch Transfektion überexprimierte Syntenin-1 mit Flag-Tag. Dies zeigte, dass die Transfektion erfolgreich durchgeführt wurde. Auch in den präzipitierten Proben zeigten sich Signale, was eine Interaktion nahelegte. Das Signal der transfizierten und präzipitierten Probe enthielt ebenfalls das endogene und das überexprimierte Syntenin-1. Flotillin-1 war in allen Proben auf einer Höhe von 47 kDa nachweisbar, allerdings in den Lysat-Proben schwach.

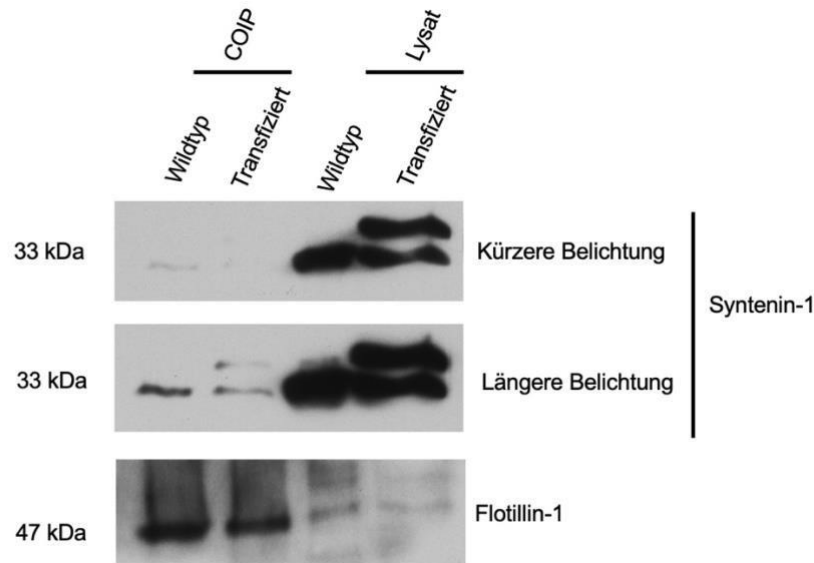


Abbildung 8: Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 mittels Ko-Immunpräzipitation. Dargestellt ist der Western Blot mit den Proben der Ko-Immunpräzipitation. Ein polyklonaler Flotillin-1 Antikörper wurde mit magnetischen Kügelchen verbunden und in CoIP-Puffer gelöst. Nach erfolgter Präzipitation, Waschen und Denaturierung wurde am folgenden Tag das gebundene Proteingemisch mit Ladepuffer auf ein Polyacrylamid-Gel geladen. Zu sehen ist jeweils die ko-immunpräzipitierte Probe von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen und eine Probe des jeweiligen Lysates. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Syntenin-1-Antikörper und zur Kontrolle nachfolgend mit einem monoklonalen Anti-Flotillin-1-Antikörper. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend betrachtet konnte auch unabhängig von der durchgeführten Transfektion eine Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 nachgewiesen werden, was die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit erneut bestätigte.

4.1.4 Lokalisation von Flotillin-1 und Syntenin-1 in Brustkrebszellen

Ein weiterer bedeutsamer Punkt zur Charakterisierung einer Interaktion ist die mögliche gemeinsame zelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine. Um die Topographie der Proteine im intakten Zellverband darzustellen, wurden MCF7-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und fixiert. Anschließend wurden Flotillin-1 und Syntenin-1 durch spezifische Antikörper und Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper markiert, und die Proben fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen (siehe Abb. 9).

Flotillin-1 zeigte sich in allen Proben vorwiegend an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Im Vergleich dazu zeigte sich Syntenin-1 vor allem perinukleär, vereinbar mit der Lokalisation des endoplasmatischen Retikulums. Eine

klare Ko-Lokalisation der untersuchten Proteine zeigte sich in den durchgeführten Doppelfärbungen nicht.

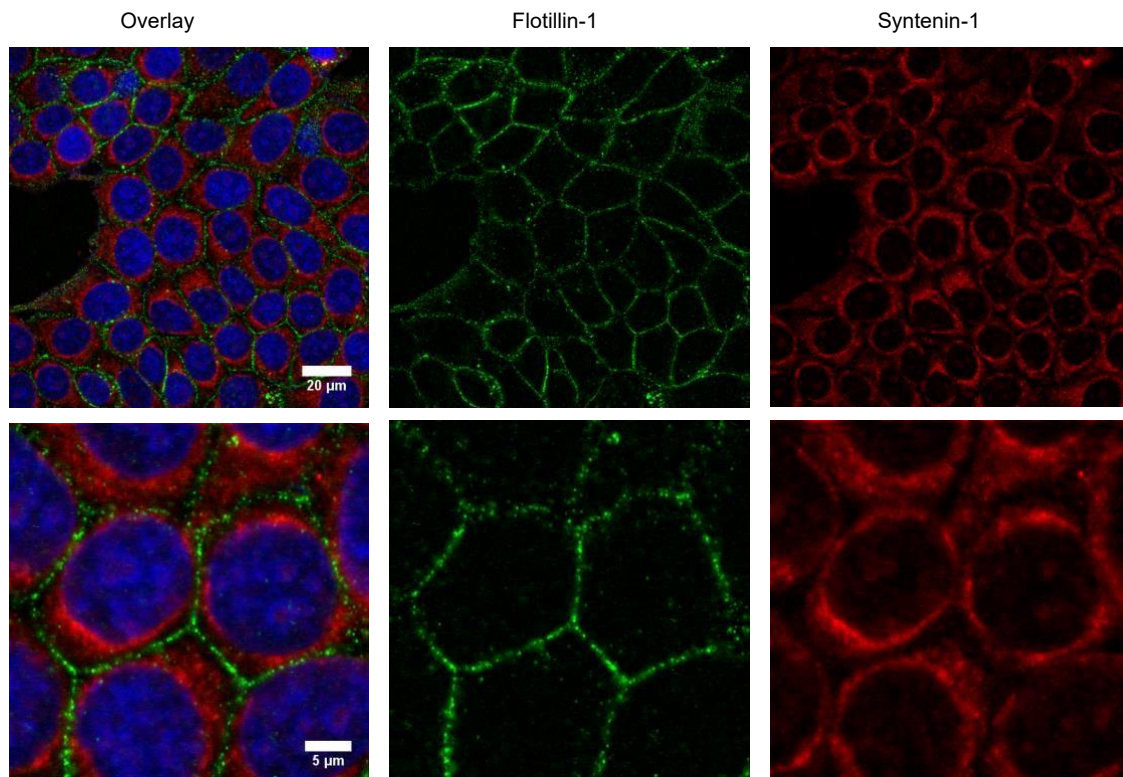


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin-1 und Syntenin-1. MCF7-WT-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und bei 80-90%iger Konfluenz mit Methanol fixiert. In Grün dargestellt ist Flotillin-1, hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Ein geringerer Teil von Flotillin-1 zeigt sich in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma. In Rot angefärbt ist Syntenin-1 abgebildet. Auffällig ist eine überwiegende perinukleäre Lokalisation. Verwendet wurde ein monoklonaler Anti-Flotillin-1-Antikörper und ein polyklonaler Anti-Syntenin-1-Antikörper. Die DAPI-Färbung markiert in Blau den Nucleus der einzelnen Zellen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend betrachtet, konnte eine Interaktion von Syntenin-1 mit Flotillin-1 sowohl im indirekten Pulldown-Experiment als auch in der Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die PDZ-Domäne des Syntenin-1 schien stärker mit Flotillin-1 zu interagieren als die NTD-Domäne. Eine Ko-Lokalisation im intakten Zellverband der Brustkrebszellen zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung nicht.

4.2 Proteininteraktion zwischen Syndecanen 1,2,3 und 4 und Flotillin-1

4.2.1 Klonierung von Syndecanen 1,2,3 und 4

Aus vorherigen Arbeiten ist bereits bekannt, dass Exosomen aus sogenannten späten Endosomen bzw. multivesikulären Körpern entstehen, und bei dieser Reifung verschiedene Proteine wie ESCRT und ein Triplet aus ALIX, Syntenin-1 und Syndecanen beteiligt (Baietti et al., 2012). In den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 mit Syntenin-1 interagiert. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage nach einer möglichen Interaktion von Syndecanen mit Flotillin-1. Da Flotillin-1 insbesondere an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist (siehe Abb. 10), war vordergründig von einer möglichen Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne der Syndecane auszugehen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde RNA aus verschiedenen Zelllinien isoliert, um die Syndecane 1 bis 4 zu klonieren, da nicht alle Syndecane ubiquitär exprimiert werden (C. W. Kim et al., 1994). Für Syndecan-1 und -4 wurde RNA aus MCF7-Zellen isoliert, da Syndecan-1 vor allem in epithelialen Zellen nachweisbar ist, während Syndecan-4 ubiquitär exprimiert wird. Für Syndecan-3 wurden aufgrund der vorherrschenden Expression in neuronalem Gewebe SH-SY5Y Zellen verwendet, und für Syndecan-2 wurde bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene cDNA aus Fibroblasten verwendet. Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese anschließend mittels PCR mit spezifischen Primern für die jeweiligen Syndecane amplifiziert, um den zytoplasmatischen Teil der Syndecane in den Vektor (pGEX-4-T1) einbringen zu können. Das Plasmid wurde in *E.coli* XL-1 Blue transformiert und nach positivem Ergebnis der Sequenzierung zur Proteinexpression in Rosetta *E.coli* transformiert.

Syndecan-1 (Referenzsequenz: NM_001006946)

1201 ggtgggtttc atgctgtacc gcatgaagaa gaaggacgaa ggcagctact ccttgaggga
1261 gccgaaacaa gccaacggcg gggcctacca gaagcccacc aaacaggagg aattctatgc
1321 ctgacgcggg agccatgcgc cccctccgcc ctgccactca ctaggcccc acttgccctct

tac cgc atg aag aag aag gac gaa ggc agc tac tcc ttg gag gag ccg aaa caa gcc aac
Y R M K K K D E G S Y S L E E P K Q A N
ggc ggg gcc tac cag aag ccc acc aaa cag gag gaa ttc tat gcc tga
G G A Y Q K P T K Q E E F Y A -

Syndecan-2 (Referenzsequenz: NM_002998.4)

961 gtgtatcgca tgagaaagaa ggatgaagga agctatgacc ttggagaacg caaaccatcc
1021 agtgctgctt atcagaaggc acctactaag gagttttatg cgtaa aactc caacttagtg

cgc atg aga aag aag gat gaa gga agc tat gac ctt gga gaa cgc aaa cca tcc agt gct
R M R K K D E G S Y D L G E R K P S S A
gct tat cag aag gca cct act aag gag ttt tat gcg taa
A Y Q K A P T K E F Y A -

Syndecan-3 (Referenzsequenz: NM_014654.4)

1381 ggtcacactg ctcatctatc gtatgaagaa aaaggatgag ggcagctaca cgctggaggga
1441 acccaagcag gcgagcgtca cataccagaa gcttgacaag caggaggagt tctatgccta
1501 gtggagccac agtgccctcc tgcagcctca acaccaccct gctgtccagt cccagcctg

tat cgt atg aag aaa aag gat gag ggc agc tac acg ctg gag gaa ccc aag cag gcg agc
Y R M K K K D E G S Y T L E E P K Q A S
gtc aca tac cag aag cct gac aag cag gag gag ttc tat gcc tag
V T Y Q K P D K Q E E F Y A -

Syndecan-4 (Referenzsequenz: NM_002999.4)

541 gctcatgtac cgtatgaaga agaaggatga aggcagctat gacctgggca agaaacccat 601
ctacaagaaa gccccacca atgagttcta cgcgtga agc ttgcttgtgg gcactggctt

cgt atg aag aag aag gat gaa ggc agc tat gac ctg ggc aag aaa ccc atc tac aag aaa
R M K K K D E G S Y D L G K K P I Y K K
gcc ccc acc aat gag ttc tac gcg tga A P T N E F Y A -

Abbildung 10: DNA- und Protein-Sequenz der klonierten zytoplasmatischen Domänen der Syndecane. Gezeigt sind die in pGEX-4-T1 klonierten Sequenzen von zytoplasmatischen Domänen von Syndecan 1, 2, 3 und 4. Unterhalb der DNA-Sequenz sind die jeweiligen Aminosäuresequenzen gezeigt. Der translatierte Bereich ist blau hervorgehoben.

4.2.2 Expression von Syndecan-GST-Fusionsproteinen

Die mit den oben dargestellten Plasmiden transformierten Rosetta *E.coli* wurden mit 0,15 mM IPTG zur Proteininduktion angeregt. Wie auch bei Expression der Syntenin-GST-Fusionsproteine, wurde vor und nach der Induktion eine Probe entnommen, die in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht wurde (siehe Abb. 11). Alle Syndecan-Fusionsproteine wurden nach der Induktion verstärkt exprimiert. Sichtbar war außerdem eine Steigerung der Expression von anderen, endogenen Proteinen in den transformierten und induzierten Rosetta *E.coli*.

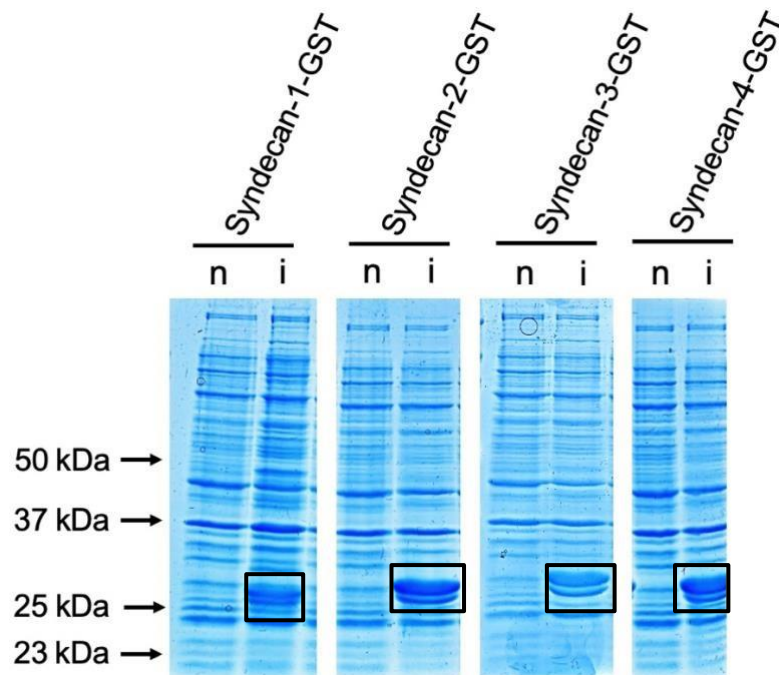


Abbildung 11: Coomassie-Färbung nach Proteininduktion der Syndecan-GST-Fusionsproteine. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden jeweils mit einer Probe vor (n, nicht-induziert) und nach (i, induziert) der Induktion (0,15 mM IPTG) beladen. Die Fusionsproteine mit den zytoplasmatischen Domänen zeigen sich bei einer Größe von 25 kDa bis 30 kDa und sind durch die Kästen hervorgehoben.

4.2.3 Proteininteraktion von Syndecanen und Flotillin-1

Wie bereits zum Nachweis der Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 angewandt, wurde ein indirekter GST-Pulldown auch zur Beantwortung der Fragestellung nach einer Interaktion von Syndecanen und Flotillin-1 durchgeführt. Hierbei wurden die zuvor aufgereinigten GST-Fusionsproteine mit den zytoplasmatischen Domänen der Syndecane verwendet. Als Negativkontrolle wurde GST verwendet, welches bereits aus den

vorherigen Experimenten zum Interaktionsnachweis von Syntenin-1 und Flotillin-1 vorhanden war.

Im mit den Proben des GST-Pulldowns durchgeführten Western Blot zeigte sich eine Interaktion von Flotillin-1 mit der zytoplasmatischen Domäne von Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3 und Syndecan-4 (siehe Abb. 12). Die Signale erschienen alle ungefähr gleich intensiv auf einer Höhe von 47 kDa, übereinstimmend mit der Größe von Flotillin-1.

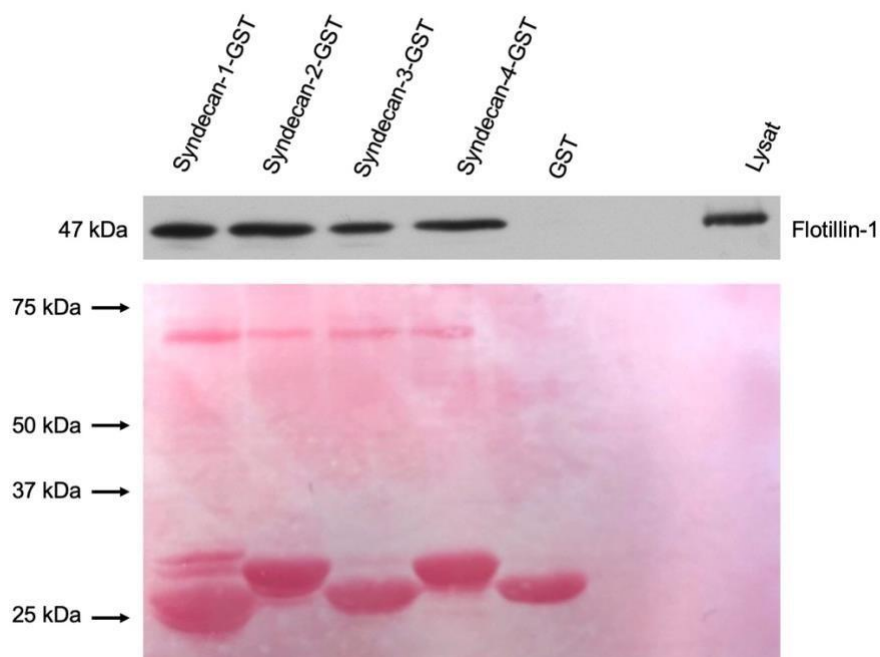


Abbildung 12: Proteininteraktion von Flotillin-1 und Syndecanen. Western Blot und die PonceauFärbung des GST-Pulldowns. Zunächst wurden die Syndecan-Fusionsproteine mit Lysat der MCF7-Zellen inkubiert und am folgenden Tag mehrfach gewaschen. Es wurden jeweils 10 µg der Fusionsproteine und GST verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Flotillin-1-Antikörper. Anhand der Ponceau-Färbung sind die äquivalenten Mengen der aufgetragenen Fusionsproteine beurteilbar. Jede Probe eines Fusionsproteins zeigt im Western Blot ein Signal auf Höhe des Flotillin-1 (47 kDa). Die Negativkontrolle (GST) zeigt kein Signal für Flotillin-1. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 Ko-Lokalisation von Flotillin-1 und Syndecan-1 in Brustkrebszellen

Nachdem im Western Blot mit indirektem Pulldown eine Interaktion von Flotillin-1 und Syndecan-1 nachgewiesen wurde, sollte als weiterführende Charakterisierung dieser Wechselwirkung die mögliche Ko-Lokalisation im intakten Zellverband untersucht werden. Hierzu wurden erneut, wie oben bereits beschrieben, MCF7-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und mit Antikörpern gefärbt. Mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden schließlich die Ergebnisse dokumentiert (siehe Abb. 13). Flotillin-1 zeigte sich an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Syndecan-1 hingegen erschien verstärkt perinukleär und im Zytoplasma in Vesikeln lokalisiert. Ein geringer Teil war auch an der Plasmamembran erkennbar. Eine partielle Ko-Lokalisation von Syndecan-1 und Flotillin-1 (grün) war in intrazellulären Vesikeln und an der Plasmamembran (siehe Markierungen) sichtbar.

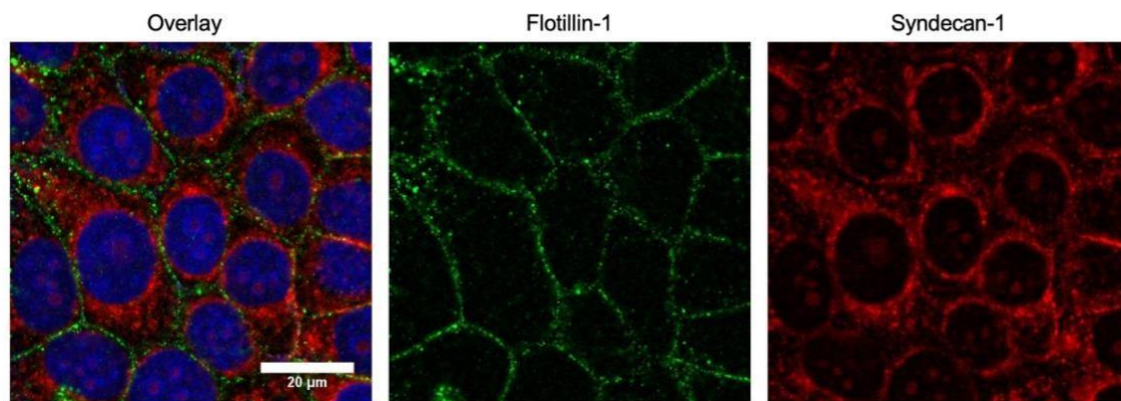


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin-1 und Syndecan-1. MCF7-WTZellen wurden auf Deckgläschen bis zur geeigneten Konfluenz kultiviert und mit Methanol fixiert. Für die

Markierung wurden ein monoklonaler Anti-Flotillin-1-Antikörper und ein polyklonaler Anti-Syndecan-1-Antikörper sowie Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. In Grün dargestellt ist Flotillin-1, nachweisbar vor allem an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln. In Rot ist die Lokalisation von Syndecan-1 erkennbar. Die Markierungen (Kästchen) zeigen eine mögliche partielle Ko-Lokalisation (gelb) von Flotillin-1 und Syndecan-1 im Bereich von intrazellulären Vesikeln und der Plasmamembran. Die DAPI-Färbung markiert den Zellkern bzw. die DNA der Zellen blau. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Im indirekten Pulldown gelang der Nachweis einer Interaktion von Flotillin-1 mit allen untersuchten Mitgliedern der Syndecan-Familie. Flotillin-1 schien mit jedem der vier Syndecane ähnlich stark zu interagieren. In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich eine partielle Ko-Lokalisation von Flotillin-1 und Syndecan-1 im Bereich der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln.

4.3 Charakterisierung von Flotillin-1-KO-MCF7-Zellen und ihren Exosomen

4.3.1 Generierung und Charakterisierung von Flotillin-1-KO-MCF7-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits eine Interaktion von Flotillin-1 mit Syndecanen und Syntenin-1 belegt werden. Damit die Rolle von Flotillin-1 in der Entstehung von Exosomen und der Einfluss von Flotillin-1 auf Syntenin-1 und Syndecan-1 im Zellverband genauer untersucht werden konnte, waren Flotillin-1-Knockout-Zellen wünschenswert. Somit sollte der Einfluss der Abwesenheit von Flotillin-1 auf die Menge der ausgeschütteten Exosomen und den Syntenin-1-Gehalt der Exosomen untersucht werden, ebenso wie die Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecanen in F1KO-Zellen. Auch die Expression von Syntenin-1 und Syndecan-1 im Vergleich zu WT-Zellen sollte auf diesem Wege genauer beleuchtet werden.

Zur Generierung des Flotillin-1-Knockouts wurde das bakterielle DNA-Editierungssystem CRISPR/CAS9 verwendet. Hierbei handelte es sich um eine in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Methode, mit deren Hilfe ein Knockout des Flotillin-1-Gens durchgeführt werden konnte (Kapahnke et al., 2016). Die Transfektion wurde mithilfe des Neon™ Transfection Kit durch Elektroporation durchgeführt. Die verwendete gRNA stammte von der Horizon Discovery Group, UK und wurde in ein pD1301-AD Plasmid kloniert (Kapahnke et al., 2016).

Tabelle 10: Verwendete Flotillin-1 gRNA

	Abkürzung	Identifikationsnummer	gRNA-Sequenz (5'-3')
Flotillin - 1	G-20	165723	CTCCAGCCACCATGACTGGG

Nach erfolgreichem Züchten der Einzelzellklone wurde pro Klon eine Probe als Lysat verarbeitet. Mit dem gewonnenen Lysat wurde anschließend eine Gelelektrophorese und ein Western Blot zur Detektion der vorhandenen Proteine durchgeführt. Als Kontrolle wurde stets ein Lysat vom MCF7-WT aufgetragen. Primär wurde eine Vielzahl von Klonen getestet, woraus schließlich die in Abb. 14 gezeigten Klone ausgewählt und weiter charakterisiert wurden. Zur Charakterisierung der KO-Zellklone wurden verschiedene Antikörper, entsprechend der zu untersuchenden Proteine wie Syndecan-1 und Syntenin-1, verwendet. Auch der Einfluss des Flotillin-1-Knockouts auf die Flotillin2-Expression sollte beleuchtet werden (siehe Abb. 14).

Es zeigten sich in den Lysaten der F1KO-Klone Syndecan-1-Signale auf einer Höhe von 125 kDa in allen aufgetragenen Proben. Auffällig ist, dass das Signal von Klon 30 verstärkt erschien, sowohl im Vergleich zum Wildtyp, als auch im Vergleich zu den anderen KO-Klonen. Die Größe des Syndecans erklärte sich durch die Glykosylierung dieses Proteins. Die Expression von endogenem Flotillin-1 war nur in Wildtyp-Zellen nachweisbar, was für den effizienten Knockout des Proteins in Klon 14, 19 und 30 sprach. Klon 30 zeigte ein sehr schwaches, deutlich höher als endogenes Flotillin-1 gelegenes Signal. Signale für Flotillin-2 erschienen in Klon 14 und 19 stark abgeschwächt, verglichen mit den Wildtyp-Zellen. Im Lysat von Klon 30 zeigte sich ein etwas stärkeres Signal für Flotillin-2 auf einer Höhe von ca. 47 kDa. Auch Syntenin-1 war in allen Lysaten nachweisbar und zeigte sich auf einer Höhe von 33 kDa. Syntenin-1 schien in Klon 19 intensiviert zu sein, trotz gleicher aufgetragener Proteinmengen. Zur Sicherung äquivalenter Proteinmengen wurde ein Anti-GAPDH-Antikörper verwendet, der in allen 4 Lysaten gleich intensiv erschien.

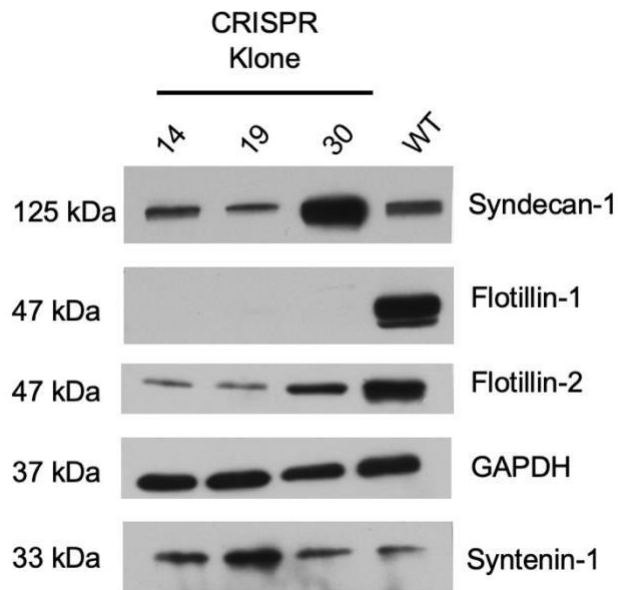


Abbildung 14: Expression von Flotillinen, Syndecan-1 und Syntenin-1 in Flotillin-1-Knockout- und Wildtyp-Lysaten. Dargestellt ist ein Western Blot mit Detektion verschiedener Proteine mit spezifischen Antikörpern in Knockout-Klonen. Die drei gezeigten Klone waren zuvor zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden. Verwendet wurde ein Anti-Syndecan-1-, ein Anti-Flotillin-1-, ein Anti-Flotillin-2-, ein Anti-GAPDH- und ein Anti-Syntenin-1-Antikörper. Zum Vergleich wurde ein Wildtyp-Lysat aufgetragen. Zur Sicherung äquivalenter Konzentrationen wurde ein Anti-GAPDH-Antikörper verwendet, der gleich intensive Signale in allen Proben zeigt. Syndecan-1 ist in allen Proben nachweisbar und besitzt ein Molekulargewicht von 125 kDa aufgrund von Glykosylierung. Flotillin-1 (ca. 47 kDa) ist lediglich in Wildtyp-Zellen nachweisbar. Flotillin-2 erscheint ebenfalls auf einer Höhe von 47 kDa und ist in Klon 14 und 19 weniger intensiv darstellbar als im Wildtyp. Syntenin-1 ist in Klon 19 intensiver, aber in allen Proben nachweisbar. Klon 30 zeigt ein sehr schwaches Signal, welches deutlich höher als das endogene Flotillin-1 liegt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Sequenzierungen

Um das Flotillin-1-Knockout auch auf genomischer Ebene zu sichern und die durch CRISPR/Cas9 entstandenen Veränderungen zu charakterisieren, wurde eine Sequenzierung der drei ausgewählten Klone durchgeführt. Hierzu wurde mithilfe von PCR-Primern, welche die Flotillin-1-gRNA-Stelle flankierten, die genomische DNA der Klone mit dem Phire Tissue Direct PCR Master Mix-Kit amplifiziert und anschließend das entstandene Produkt nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese mit dem Nucleospin® Gel und PCR-Clean-up Kit aufgereinigt und zur Sequenzierung versandt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der humanen Wildtyp-Flotillin-1-Sequenz verglichen, um die genomischen Änderungen im *FLOT1*-Gen zu identifizieren. In Klon 14 und 19 zeigte sich eine Insertion einer Base (Adenosin) im Vergleich zum Wildtyp. Klon 30 zeigte jedoch die gleiche Sequenz wie die Referenzsequenz und somit keine sichtbare Mutation im *FLOT1*-Gen (siehe Abb. 15).

Klon 14: Insertion eines zusätzlichen A

```
Referenzsequenz 207 GGGTTCTGCCGAAGCCCCC-AGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTG 265
                    |||
Klon 14 185 GGGTTCTGCCGAAGCCCCCAAGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTG 244
                    |||
Referenzsequenz 266 CATCCAACAGATCCAGAGG 284
                    |||
Klon 14 245 CATCCAACAGATCCAGAGG 263
```

Klon 19: Insertion eines zusätzlichen A

```
Referenzsequenz 207 GGGTTCTGCCGAAGCCCCC-AGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTG 265
                    |||
Klon 19 182 GGGTTCTGCCGAAGCCCCCAAGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTG 241
                    |||
Referenzsequenz 266 CATCCAACAGATCCAGAGG 284
                    |||
Klon 19 242 CATCCAACAGATCCAGAGG 260
```

Klon 30: Keine nachweisbare Mutation

```
Referenzsequenz 207 GGGTTCTGCCGAAGCCCCCAGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTGC 266
                    |||
Klon 30 189 GGGTTCTGCCGAAGCCCCCAGTCATGGTGGCTGGAGGGCGTGTCTTTGTCCTGCCCTGC 248
                    |||
Referenzsequenz 267 ATCCAACAGATCCAGAGG 284
                    |||
Klon 30 249 ATCCAACAGATCCAGAGG 266
```

Abbildung 15: Sequenzen der Flotillin-1-KO-Klone. Abgebildet ist die *FLOT-1*-Referenzsequenz mit den jeweiligen Sequenzierungen der Klone darunter. Klon 14 und Klon 19 zeigen ein inseriertes Adenosin (in Blau markiert). In Klon 30 lässt sich keine Mutation ausmachen. Bei der Referenzsequenz handelt es sich um die Sequenz des humanen *FLOT-1*-Wildtyps (NM_005803.2). Die Sequenzierung wurde jeweils einmalig pro Klon durchgeführt.

Aufgrund der oben aufgeführten Sequenzierungsergebnisse wurde auf weitere Ausführung von Experimenten mit Klon 30 verzichtet und im weiteren Verlauf Klon 14 und Klon 19 genauer charakterisiert. Bei den folgenden Abbildungen ist jeweils Klon 14 exemplarisch dargestellt.

4.3.5 Veränderte Menge von Flotillin-2 bei Flotillin-1-Knockout

Die Lokalisation und Menge von Flotillin-2 im Flotillin-1-Knockout sollte mit Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht werden, da bereits bekannt war, dass sich Flotillin-1 und Flotillin-2 in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen (vgl. Kapitel 1.3). Wie bereits oben beschrieben, wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, gefärbt, und die Ergebnisse in einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop festgehalten. Dargestellt sind Doppelfärbungen von Flotillin-1 und Flotillin-2 in Klon 14 (siehe Abb. 16).

Im Overlay der Doppelfärbung zeigte sich ein gemeinsames Auftreten von Flotillin-1 und -2 in intrazellulären Vesikeln und an den Plasmamembranen der Zellen. Flotillin-1 und 2 fanden sich dementsprechend in Wildtyp-Zellen vor allem an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln wieder. In der Färbung der F1KO-Zellen erschien lediglich ein schwaches Hintergrundsignal von Flotillin-1. Flotillin-2 war, im Unterschied zum Wildtyp, in seiner Expression vermindert, vor allem in Betracht auf die intrazellulären Vesikel.

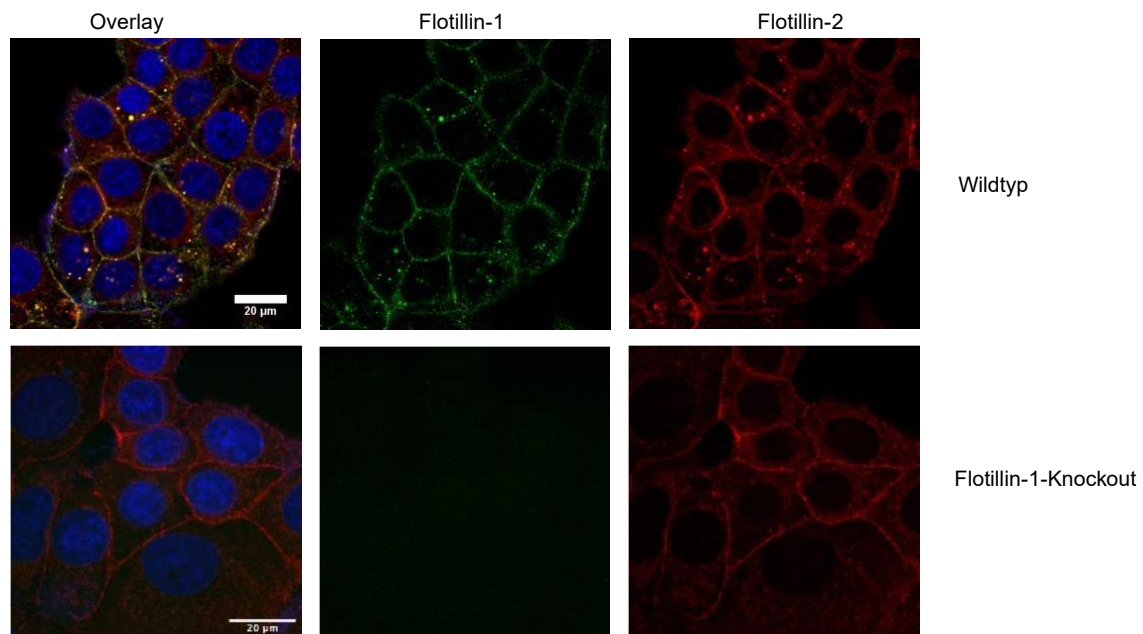


Abbildung 16: Doppelfärbung von Flotillin-1 und Flotillin-2. Abgebildet sind MCF7-WT und Flotillin1-Knockout-Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und gefärbt wurden. Es wurde ein monoklonaler Anti-Flotillin-2- (Maus) und ein polyklonaler Anti-Flotillin-1-Antikörper (Kaninchen) verwendet. Im Overlay sind die Doppelfärbung und die DAPI-Färbung (Blau) eingeblendet. Flotillin-1 ist in Grün gefärbt und zeigt nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal im Knockout. In Rot ist Flotillin-2 angefärbt, welches sich im Knockout vermindert färbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

4.3.4 Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 in Flotillin-1-KO-Zellen

Ebenso wie bereits für Flotillin-2 durchgeführt, sollten die Flotillin-1-Knockout-Zellen bezüglich einer möglicherweise veränderten Lokalisation und Expression von Syndecan1 und Syntenin-1 im intakten Zellverband überprüft werden. Wie in vorherigen Experimenten beschrieben, wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die Detektion erfolgte durch jeweils zwei spezifische Antikörper und Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper. Die Dokumentation wurde mit einem konfokalen Laser-Scan Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Bei den dargestellten Färbungen handelt es sich um Doppelfärbungen von Klon 14, um die Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 im F1KO darzustellen (siehe Abb. 17).

Flotillin-1 zeigte lediglich ein Hintergrundsignal in beiden Doppelfärbungen, was den Knockout erneut bestätigte und eine Beurteilung der Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 im Vergleich zum Wildtyp erlaubte. Verglichen mit den Färbungen in Wildtyp-Zellen (Kapitel 4.1.4) befand sich Syntenin-1 nach erfolgtem F1KO weiterhin vorwiegend perinukleär, möglicherweise im Bereich des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparats. Syndecan-1 zeigte sich dem Wildtyp entsprechend (Kapitel 4.2.4) ebenfalls hauptsächlich um den Zellkern herum konzentriert und in intrazellulären Vesikeln.

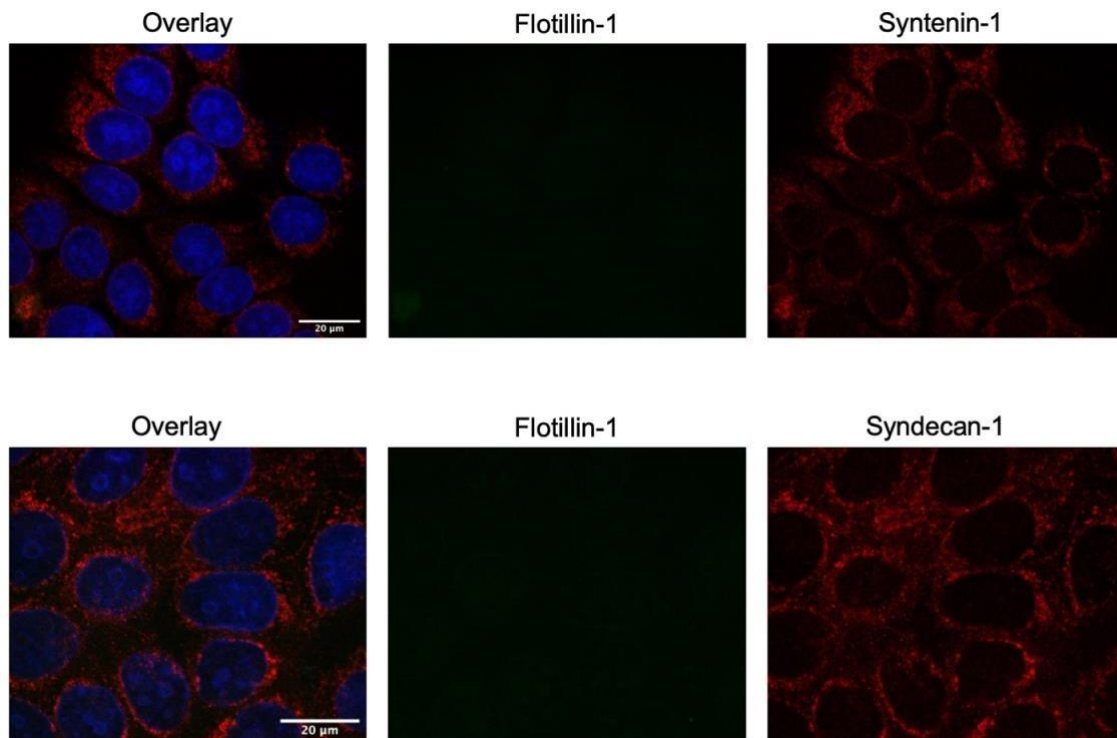


Abbildung 17: Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 in Flotillin-1-Knockout-Zellen. Die KOZellen wurden auf Deckgläschen bis zum Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz kultiviert, fixiert und gefärbt. Es wurde ein primärer Anti-Flotillin-1-, Anti-Syntenin-1- und Anti-Syndecan-1-Antikörper und fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Dargestellt ist jeweils jeder Antikörper einzeln und im Overlay. Beim Overlay handelt es sich um eine Zusammenführung beider Färbungen inklusive DAPI (Blau). Flotillin-1 ist fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar. Nur ein schwaches Hintergrundsignal kann wahrgenommen werden. Syntenin-1 zeigt sich vor allem perinukleär, wie auch Syndecan-1. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst zeigten zwei von drei KO-Klonen die gleiche Mutation. Nach erfolgreichem F1KO war Flotillin-2 sowohl im Western Blot als auch nach Immunfluoreszenzfärbung vermindert. Syntenin-1 schien leicht verstärkt im Western Blot, allerdings ließ sich keine deutliche Veränderung in der Immunfluoreszenzfärbung einsehen. Syndecan-1 zeigte keinerlei Veränderungen.

4.3.5 Charakterisierung von Exosomen aus MCF7-Wildtyp-Zellen und Flotillin-1-KO-Zellen

Es ist bekannt, dass sowohl Flotillin-1, als auch Syntenin-1 Bestandteile von Exosomen sind. Nach erfolgreichem F1KO in MCF7-Zellen ergab sich die Möglichkeit der Untersuchung von Exosomen dieser Zellen im Vergleich zu Exosomen der WildtypZellen. Insbesondere durch die in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktion von Syntenin-1 von Flotillin-1 wird die Frage nach einer Veränderung der Menge von Exosomen und den Gehalt von Syntenin-1 in Exosomen der F1KO-Zellen aufgeworfen.

Als Methode der Exosomen-Isolierung wurde die Ultrazentrifugation gewählt. So konnten durch verschiedene Zentrifugationsschritte Exosomen der KO- und WildtypZellen gesammelt werden. Vorher wurde für 24 Stunden Exosomen-freies Medium auf MCF7-WT- und MCF7-F1KO-Zellen belassen, sodass die Zellen Exosomen bilden und ausschütten konnten. Als Kontrolle wurde jeweils das Lysat der Zellen aufgetragen.

Im durchgeführten Western Blot zeigten sich intensive Flotillin-1-Signale in Lysat und den Exosomen der Wildtyp-Zellen (siehe Abb. 18). Außerdem war ein weniger intensives Vorkommen von Flotillin-1 in der Probe der Exosomen der KO-Zellen erkennbar, obwohl sich kein Flotillin-1 in dem Lysat der Zellen abbildete. Als exosomaler Marker und Kontrolle wurde ein Anti-CD63- Antikörper genutzt, welcher in fast allen Proben ein ungefähr gleich starkes Signal lieferte. Syntenin-1 zeigte sich seiner Größe entsprechend bei 33 kDa in allen Proben. Bemerkenswert ist die Intensivierung des Syntenin-1-Signals in den Exosomen (Anreicherung), verglichen mit dem jeweiligen Lysat. Auch ein Unterschied vom Synteningehalt der Lysate ließ sich ausmachen. Das Lysat der WTZellen zeigte ein stärkeres Syntenin-1-Signal als das KO-Lysat.

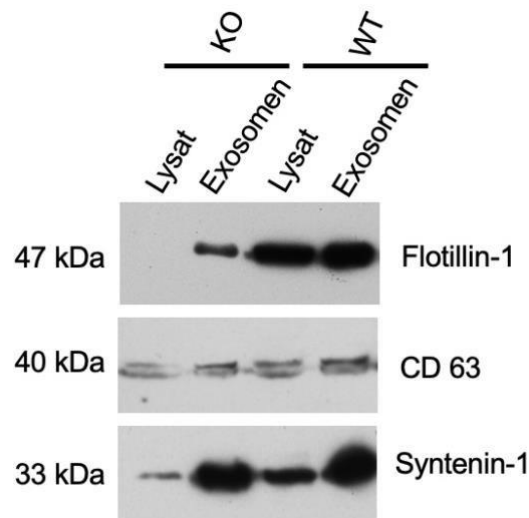


Abbildung 18: Exosomen-Isolierung aus Flotillin-1-Knockout- und Wildtyp-Zellen. Abgebildet ist ein Western Blot mit Proben der isolierten Exosomen und der entsprechenden Lysate. Mittels Ultrazentrifugation wurden aus je 20 ml Medium Exosomen isoliert und das entstandene Pellet in PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, und eine Detektion mit verschiedenen Antikörpern (Anti-Flotillin-1, Anti-CD63 und Anti-Syntenin-1) erfolgte im Western Blot. Alle Schritte wurden identisch mit den KO-Zellen und den Wildtyp-Zellen durchgeführt. Flotillin-1 zeigt sich auf einer Höhe von 47 kDa, CD63 bei ca. 40 kDa und Syntenin-1 bei ca. 33 kDa. Das Syntenin-1-Signal scheint in Exosomen intensiviert zu sein und im KO-Lysat abgeschwächt. Flotillin-1 ist in den KO-Exosomen, im Wildtyp-Lysat und in den Wildtyp-Exosomen nachweisbar. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend betrachtet, konnte eine Interaktion von Syntenin-1 mit Flotillin-1 sowohl im indirekten Pulldown-Experiment als auch in der Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die PDZ-Domäne des Syntenin-1 schien stärker mit Flotillin-1 zu interagieren als die NTD-Domäne. Eine Ko-Lokalisation im intakten Zellverband der Brustkrebszellen zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung nicht. Auch eine Interaktion von Flotillin-1 mit den Proteinen der Syndecan-Familie konnte im indirekten Pulldown nachgewiesen werden. Syndecan-1 und Flotillin-1 zeigten eine partielle Ko-Lokalisation an Plasmamembranen und in intrazellulären Vesikeln. Um den Einfluss von Flotillin-1 auf den Syntenin-Gehalt von Brustkrebszellen und ihren Exosomen genauer zu untersuchen wurden F1KO-Zellen mithilfe von CRISPR/CAS9 generiert und charakterisiert. Flotillin-2 erschien im Western Blot und in der Immunfluoreszenzfärbung

in den KO-Zellen vermindert. Die Exosomen zeigten im Vergleich zu den Lysaten ein etwas stärkeres Syntenin-Signal.

5 Diskussion

Bei Brustkrebs handelt es sich um die häufigste Krebstodesursache bei Frauen. Trotz intensiver Forschung der letzten Jahre sind viele Mechanismen der Tumorentstehung und des Tumorwachstums weiterhin unklar. Vor allem die Bildung von Metastasen und Therapieresistenzen stellt ein bedeutsames Problem in der Behandlung und Heilung von Brustkrebs-Patienten dar.

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass sowohl Exosomen als auch Flotilline mit Tumorentstehung und -metastasierung in Verbindung stehen und verschiedene Funktionen zu übernehmen scheinen. Exosomen bereiten beispielsweise den SentinelLymphknoten auf die Metastasierung des Primärtumors vor (Hood et al., 2011), geben Resistenzen gegen Chemotherapeutika weiter (Safaei et al., 2005), fördern die Angiogenese (Yi et al., 2015) und schützen möglicherweise Tumorzellen vor dem Zelltod durch inhibitorisch auf die Apoptose wirkende Proteine wie Survivin (Valenzuela et al., 2015; L. Yang et al., 2013). Diese Eigenschaften machen Exosomen zum interessanten Gegenstand der Forschung, da sie ein breites Spektrum an Ansatzpunkten zum Verständnis von Tumoren bieten. Exosomen können auch zur Diagnostik mittels sogenannter *liquid biopsy* eingesetzt werden (Übersicht in Domínguez-Vigil et al., 2018). In dieser Arbeit ist die Interaktion von Flotillin-1 mit Syntenin-1 genauer untersucht wurden, ebenso wie eine Interaktion von Flotillin-1 mit Syndecanen. Auch die Rolle von Flotillin-1 in der Exosomenentstehung und die Expression von Syntenin-1 in Exosomen von F1KO-Zellen ist beleuchtet wurden.

Baietti et al. beschäftigten sich mit dem Weg der Bildung von Exosomen über Syntenin-1 (Baietti et al., 2012). So zeigten sie in Yeast-Two-Hybrid-Screenings und einer KoImmunpräzipitation, dass Syntenin-1 mit der N-terminalen Domäne von ALIX interagiert, und sich in vitro ein trimerer Komplex aus Syndecan, Syntenin-1 und ALIX bildet, was funktionell Ähnlichkeiten zur viralen Knospung bei HIV-1 aufweist. Zur Isolierung der Exosomen nutzten sie, wie auch in meiner Arbeit verwendet, die Methodik der Ultrazentrifugation und konnten darstellen, dass eine Syntenin-1-Überexpression in MCF7-Zellen zum verstärkten Vorkommen von Syndecanen, ALIX, CD63 und Hsp70 in Exosomen führte. Dies erfolgte allerdings nicht, wenn das überexprimierte Syntenin-1 Mutationen in den mit ALIX-interagierenden Bereichen (LYPX(n)L-Bereich) enthielt, oder wenn gleichzeitig über eine RNA-Interferenz die ALIX-Expression gehemmt wurde. Weiterhin verursachte eine Depletion der Syndecane einen Rückgang von exosomalem Syntenin-1, ALIX, CD63 und Hsp70. Dies lässt darauf schließen, dass eine gewisse

Abhängigkeit von Syntenin-1 und Syndecanen in ihrer exosomalen Lokalisation besteht. Ungeklärt bleibt, ob eine Flotillin-1-Depletion einen ähnlichen Effekt auf das exosomale Vorkommen der Proteine haben könnte.

Bezüglich dieser Frage kamen Baietti et al. zu dem Schluss, dass die CD63-positiven Exosomen, die über die Interaktion von Syntenin-1, ALIX und Syndecanen entstehen, wenig bis gar kein Flotillin-1 enthalten. Diese Schlussfolgerung sollte allerdings kritisch hinterfragt werden, denn es handelt sich um Experimente mit Knockdowns (Zielprotein reduziert), keine Knockouts (Zielprotein nicht vorhanden), die ausschließlich zeigten, dass ein Knockdown von Syntenin-1 oder ALIX keinen Einfluss auf die exosomale Lokalisation von Flotillin-1 hat. Daraus lässt sich jedoch umgekehrt nicht schließen, ob Flotillin-1 für die Entstehung der Syntenin-haltigen Exosomen benötigt wird oder notwendig ist, damit Syntenin-1 und ALIX in den Exosomen lokalisiert sein können. Auch eine Teilnahme von Flotillin-1 am Komplex aus Syndecan, Syntenin-1 und ALIX kann nicht sicher ausgeschlossen werden (siehe Abb. 19). Flotillin-1 selbst könnte beispielsweise über die bekannte Interaktion mit ESCRT (Meister et al., 2017) in die Exosomen gelangen oder über diese Interaktion die Inkorporation von Syntenin-1 und ALIX in die Exosomen vermitteln. Um dieser Frage nachzugehen sollte Flotillin-1 ausgeknockt werden, was in dieser Arbeit geschah. Vorstellbar ist außerdem auch eine Ausschüttung verschiedener Exosomen mit unterschiedlichen Markern je nach Zellart und Malignitätsgrad der Zellen. Auch eine Beeinflussung der Funktionalität der Exosomen durch Flotillin-1-Depletion ist nicht auszuschließen (siehe Abb. 19). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch der von Wei et al. beschriebene Weg zur Bildung von Exosomen über die Interaktion von Rab31 mit Flotillin-1. Hierbei handelt es sich um einen ESCRT-unabhängigen Entstehungsweg, der über eine Aktivierung von Rab31 durch EGFR auch in der Lage ist, Tetraspanine wie CD63 und damit einhergehend Syntenin-1 in die Exosomen zu befördern. Außerdem zeigten sie, dass nach Knockdown von Flotillin-1 weniger Exosomen produziert wurden (Wei et al., 2021). Dieser Bildungsweg liefert ebenfalls eine Erklärung für das mögliche Vorhandensein von Syntenin-1 und Flotillin-1 in denselben Exosomen.

Spätes Endosom/MVK

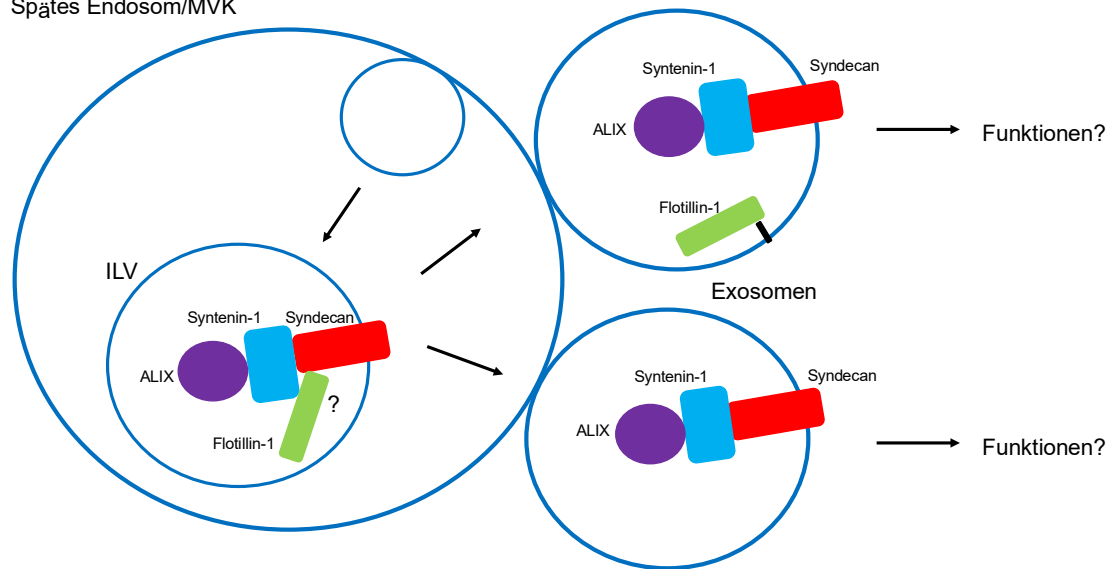


Abbildung 19: Bildung von Exosomen mit und ohne Flotillin-1. Durch Interaktionen von Syndecan (rot), Syntenin-1 (blau) und ALIX (lila) entstehen letztendlich Exosomen. Fraglich ist die Beteiligung von Flotillin-1 (dargestellt in grün) an dem trimeren Komplex bestehend aus Syndecan, Syntenin-1 und ALIX (dargestellt mit Fragezeichen). Unklar ist ebenfalls, ob Exosomen, die kein Flotillin-1 enthalten andere oder beschädigte Funktionen aufweisen als Flotillin-1-positive Exosomen. Möglich ist ein Vorkommen von Syntenin-1 und Flotillin-1 sowohl in denselben Exosomen, als auch in unterschiedlichen Exosomen mit verschiedenen Funktionen, je nach Vorhandensein von Flotillin-1.

Die Proteine Flotillin-1 und -2 sind an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, so unter anderem Zell-Zell-Adhäsion, Axonregeneration, Phagozytose und Insulinsignalweg (Baumann et al., 2000; Dermine et al., 2001; Schulte et al., 1997; Völlner et al., 2016). Auch im Feld der Krebsforschung besteht Interesse an Flotillinen, denn Lin et al. zeigten, dass eine Überexpression von Flotillin-1 in Brustkrebszellen mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einherging (C. Lin et al., 2011). Außerdem bestand ein positiver Zusammenhang der Flotillin-1-Expression und der Ki-67-Expression. Dabei handelt es sich um einen Marker für die proliferative Aktivität der Zellen. Flotilline sind desweiteren als exosomale Markerproteine bekannt und scheinen die Zusammensetzung von Exosomen zu beeinflussen (Phuyal et al., 2014). Unklar ist bisher, inwiefern Flotillin-1 die Entstehung und Ausschüttung von Exosomen beeinflusst, und ob und wie es dabei mit den beteiligten Proteinen, wie Syntenin-1 und Syndecan, interagiert. Eine bereits bekannte Interaktion von Flotillin-1 mit der ESCRT-0- und ESCRT-I-Untereinheit identifizierte es als einen wichtigen Faktor bei der Reifung von späten Endosomen und

möglicherweise als Faktor für die Cargo-Beladung von intraluminalen Vesikeln (Meister et al., 2017).

Daher war es sinnvoll, die Rolle von Flotillin-1 bezüglich der Entstehung und Zusammensetzung von Exosomen weiter zu untersuchen. Die Interaktion von Flotillin-1 mit Syntenin-1 wurde in meiner Arbeit detaillierter beleuchtet, ebenso wie eine Interaktion von Flotillin-1 mit Syndecanen. Um den Einfluss von Flotillin-1 auf diese Proteine und die Exosomenentstehung besser zu verstehen, wurden F1KO-MCF7-Zellen etabliert und charakterisiert. Die Exosomen-Isolierung erfolgte mittels Ultrazentrifugation und die anschließende Charakterisierung mithilfe von spezifischen Antikörpern im Western Blot.

5.1 Flotillin-1 interagiert mit Syntenin-1

Aus vorherigen Yeast-Two-Hybrid-Experimenten innerhalb der Arbeitsgruppe Tikkanen war bekannt, dass Flotillin-1 mit Syntenin-1 interagiert. Ein Ziel meiner Arbeit war es daher, diese Interaktion von Flotillin-1 und Syntenin-1 genauer zu untersuchen und die dafür verantwortlichen Bereiche zu identifizieren.

Dazu wurden Fusionsproteine der verschiedenen Domänen des Syntenins hergestellt (vgl. Abb. 4) und mittels indirektem Pulldown die Interaktion mit Flotillin-1 untersucht (vgl. Abb. 7). Dabei wurde die bereits bekannte Interaktion der Proteine erneut bestätigt, und es stellte sich heraus, dass Flotillin-1 mit beiden Teilabschnitten des Syntenins interagiert, die PDZ-Domänen jedoch einen wichtigeren Teil für die Interaktion mit Flotillin-1 darzustellen scheinen. Auch mit der Ko-Immunpräzipitation konnte die Interaktion unter physiologischeren Bedingungen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8). Durch die Generierung von Fusionsproteinen mit verschiedenen Domänen wird die Identifikation der an der Interaktion beteiligten Domäne im Pulldown möglich. Allerdings lässt sich dieses Ergebnis nicht vollständig auf den intakten Zellverband *in vivo* übertragen, da es sich lediglich um die Interaktion der synthetisch hergestellten und isolierten Fusionsproteine handelt. Die Ko-Immunpräzipitation ermöglicht dabei den Nachweis der Interaktion im Lysat der Zellen, da das Antigen Flotillin-1 mit seinen gebundenen Proteinen präzipitiert wird, wobei auch hier durch die Zerstörung der Integrität der Zelle Veränderungen auftreten können. Ein weiterer Nachteil der Ko-Immunpräzipitation ist die vorangehende Transfektion der Zellen, wobei sich in meiner Arbeit auch in der nicht transfizierten Kontrolle eine Interaktion von endogenen Flotillin-1 und Syntenin-1 zeigte. Weiterführende Versuche können die Etablierung von Punktmutationen in den

interagierenden Bereichen beider Proteine und erneute Pulldown- und KoImmunpräzipitations-Experimente beinhalten, um detaillierte Ergebnisse über die Interaktionsfläche und Aminosäurereste zu gewinnen.

Eine Interaktion, die größtenteils mit der PDZ-Domäne des Syntenins erfolgt, erscheint auch im Kontext der Literatur plausibel, da die PDZ-Domäne unter anderem an der Interaktion mit CD63 (Latysheva et al., 2006) und Syndecanen (Grootjans et al., 2000) beteiligt ist. PDZ steht dabei für *Post synaptic density disc large zonula occludens*, hervorgehend aus den drei ersten Entdeckungen der PDZ-Domäne. Sie stellen dabei Verbindungsstellen verschiedener Proteine dar und sind häufig an der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt (Übersicht in Manjunath et al., 2018).

Zur Visualisierung einer gemeinsamen Lokalisation im intakten Zellverband wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hier zeigte sich Syntenin-1 in den Wildtyp- und den F1KO-Zellen auffällig perinukleär betont, möglicherweise am endoplasmatischen Retikulum, was nicht der bisher beschriebenen und erwarteten Lokalisation entspricht. Grootjans et al. beschrieben Syntenin-1 vorwiegend an der Plasmamembran, in Vesikeln und im Zytoplasma lokalisiert (Grootjans et al., 1997). Es ist nicht auszuschließen, dass die Methode trotz mehrfacher Durchführung keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferte. Eine Veränderung der experimentellen Durchführung, wie Antikörperkonzentrationen, Inkubationszeiten und Färbung könnte weitere Einsichten bringen. Insbesondere der Antikörper kann ein Problem darstellen und endogenes Syntenin-1 nicht erkennen oder unspezifische Signale, sowohl im Wildtyp als auch im F1KO-Vergleich, anfärben. Zur Abklärung des Sachverhaltes sollte der Antikörper in Syntenin-1-KO-Zellen verifiziert und andere Anti-Syntenin-1-Antikörper getestet werden.

Eine Ko-Lokalisation von Syntenin-1 und Flotillin-1 war in den hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen nicht zu erkennen (vgl. Abb. 9). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine Ko-Lokalisation an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln zeigen würde, wenn ein anderer Anti-Syntenin-1-Antikörper verwendet werden würde. Flotillin-1 zeigte sich, wie erwartet, an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln. Vorstellbar ist auch eine erst nach Stimulation der Zelle mit bestimmten Reizen vorhandene Ko-Lokalisation, die in diesen Experimenten nicht erfasst wurde. Eine Generierung von Syntenin-1-KO-Zellen zur Eruierung des verwendeten Antikörpers trägt zur Lösung der Fragestellungen bei. Eine Immunfluoreszenzfärbung dieser Zellreihe kann ebenfalls Aufschluss über mögliche

Lokalisationsänderungen von Flotillin-1 und einen Vergleich der Färbung mit dem selbem Antikörper gegenüber den Wildtyp-Zellen bieten.

5.2 Flotillin-1 interagiert mit Syndecanen

Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion mit Syntenin-1 und bekannten Interaktionen von Syntenin-1, ALIX und Syndecanen (Baietti et al., 2012) wurde die Frage aufgeworfen, ob Flotillin-1 möglicherweise zusätzlich mit Syndecanen interagiert. In diesem Zuge wurden Fusionsproteine der zytoplasmatischen Domänen der Syndecane erstellt (vgl. Abb. 10) und in indirekten Pulldown-Experimenten eine Interaktion mit Flotillin-1 nachgewiesen (vgl. Abb. 12). Dabei zeigte sich eine nahezu gleichmäßige Interaktion von Flotillin-1 mit allen vier Syndecanen. Auch hier gilt, dass diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden sollten, da es sich ausschließlich um Interaktionen der Fusionsproteine handelt, und diese keineswegs auch *in vivo* nachweisbar sein muss. Ungewiss bleibt dementsprechend, ob es sich lediglich um eine Interaktion der Fusionsproteine handelt oder ob diese Interaktion auch im intakten Zellverband anzutreffen ist. Ein nächster Schritt, um eine Interaktion auch *in vivo* nachzuweisen, wäre eine Ko-Immunpräzipitation. Auch die Generierung von Punktmutationen im zytoplasmatischen Teil der Syndecane ist eine Möglichkeit, die interagierenden Regionen genauer zu identifizieren.

Wie auch bei Syntenin-1, wurde die Frage nach der Ko-Lokalisation der Proteine im Zellverband durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Dort konnte eine gemeinsame Lokalisation von Flotillin-1 und Syndecan-1 beobachtet werden. Syndecan1 zeigte sich perinukleär und in Vesikeln im Zytoplasma, zu geringeren Teilen auch an der Plasmamembran. In den intrazellulären Vesikeln und an der Plasmamembran war eine partielle Ko-Lokalisation mit Flotillin-1 sichtbar (vgl. Abb. 13). Flotillin-1 zeigte sich auch hier erwartungsgemäß an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln. Eine *in vivo* vorliegende Interaktion ist durch die Ko-Lokalisation von Syndecan-1 und Flotillin-1 im intakten Zellverband durchaus wahrscheinlich. In Zukunft sollten diese Fluoreszenz-Färbungen auch für die in dieser Arbeit nicht dargestellten Syndecane 2, 3 und 4 durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Experimente waren allerdings keine etablierten, spezifischen Antikörper für die weiteren Syndecane in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann von einer Interaktion der Syndecane mit

Flotillin-1 ausgegangen werden, welche aber weiterer Bestätigung und Charakterisierung bedarf. Vorstellbar ist eine Interaktion über die C2-Region der Syndecane, da es sich hierbei um die identische, intrazelluläre Region der Syndecane handelt.

5.3 Generierung und Charakterisierung von Flotillin-1-Knockout-MCF7-Zellen

Trotz der bereits dargestellten Studienlage zu Flotillin-1, Syntenin-1 und Exosomen in der Entstehung von Tumoren und die Rolle der Exosomen dabei, bleibt unklar, inwiefern sich Flotillin-1 und Syntenin-1 in den gleichen Exosomen nachweisen lassen und ob Flotillin-1 die Entstehung von Syntenin-1-haltigen Exosomen beeinflusst. Einen Schritt zurückgehend ist zusätzlich nicht bekannt, ob eine Depletion von Flotillin-1 das zelluläre Vorkommen oder die Lokalisation von Syntenin-1 oder Syndecanen verändert. Damit die Bedeutung von Flotillin-1 in diesen Fragestellungen eruiert werden kann, wurden in dieser Arbeit F1KO-MCF7-Zellen mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie erstellt und anschließend untersucht (vgl. Abb. 14). Nach dem Screening zahlreicher Zellklone wurden drei Zellklone ohne Flotillin-1-Expression nachgewiesen. Insgesamt wurden verhältnismäßig wenige KO-Klone gefunden, was höchstwahrscheinlich auf die Zellbeschaffenheit zurückzuführen ist. Ein Testen der Transfektionsbedingungen zur Optimierung kann im weiteren Verlauf zeigen, ob eine höhere Rate der Transfektion möglich ist.

Von den drei nachgewiesenen KO-Klonen war Flotillin-1 in Klon 14 und Klon 19 nicht nachweisbar, was auf einen erfolgreichen Knockout hindeutet. Allerdings wurden verschiedene Flotillin-1 mRNA-Varianten beschrieben, die zu einem veränderten Protein translatiert werden können, (Kapahnke et al., 2016). Von Kapahnke et al. wurden mRNAVarianten gefunden, die aufgrund der Indel-Mutation ein vorzeitiges Stopp-Codon enthielten oder aufgrund der Leserasterverschiebung ein fehlendes Exon aufwiesen. Das entstandene verkürzte Protein konnte im Western Blot nachgewiesen werden, jedoch nur nach Inhibierung des Abbaus. Diese Effekte sind auch in der vorliegenden Arbeit denkbar, da in den KO-Klonen 14 und 19 die gleiche Indel-Mutation wie im Kapahnke et al. zu finden war. In den Sequenzierungen zeigten Klon 14 und Klon 19 identische Mutationen, die Insertion eines zusätzlichen Adenosins, wie sie auch bereits in HeLaZellen von Kapahnke et al. beschrieben wurde (vgl. Abb. 15).

In Klon 30 zeigte sich ein sehr schwaches Signal, welches deutlich höher als das endogene Flotillin-1 im Wildtyp lag. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um ein unspezifisches Hintergrund-Signal handelt. Klon 30 zeigte keine nachweisbare

Mutation in der Sequenzierung, obwohl sowohl im Western Blot, als auch in hier nicht dargestellten IF-Färbungen von Klon 30 kein endogenes Flotillin-1 nachweisbar erschien. Zu beachten ist hierbei, dass sehr kleine Abschnitte des Genoms der Zellen sequenziert wurden. Eventuell liegt die Mutation bei Klon 30 an anderer Stelle im *FLOT1*-Gen, die hier nicht erfasst wurde. Ein Scheitern der angewandten Methodik zur Sequenzierung sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden und kann ein Grund für den fehlenden Mutationsnachweis sein. Ein erneuter Versuch der Sequenzierung, der zusätzlich andere Teile des *FLOT1*-Gens miteinbezieht, sollte ggf. durchgeführt werden. Klon 30 wurde für die weiteren Experimente aufgrund der fehlenden Entschlüsselung der Mutation nicht verwendet und nicht weiter charakterisiert.

Im Western Blot der Lysate zeigten sich für alle betrachteten Klone Syndecan-1-Signale, die aufgrund der Glykosylierungen bei 125 kDa erschienen. Klon 30 zeigte dabei ein besonders starkes Signal im Vergleich zu den weiteren KO-Klonen und zum Wildtyp. Klon 19 schien etwas weniger Syndecan-1 zu enthalten, hingegen aber vermehrt Syntenin-1. Diese Ergebnisse ließen sich in Klon 14 jedoch nicht bestätigen. Dieser enthielt mit den Wildtyp-Zellen vergleichbare Mengen der Proteine.

Fluoreszenzmikroskopisch zeigte Flotillin-1 in den KO-Klonen kein Signal (nur ein Hintergrundsignal), und weder Syntenin-1 noch Syndecan-1 zeigten deutliche Veränderungen (vgl. Abb. 17). Flotillin-2 zeigte sich sowohl im Western Blot in allen KO-Klonen, als auch in den Immunfluoreszenzfärbungen in Klon 14 vermindert im Vergleich zum Wildtyp. Bereits Neumann-Giessen et al. zeigten, dass eine Verminderung eines der Flotilline stets mit einer verminderten Nachweisbarkeit des anderen einhergeht (Neumann-Giesen et al., 2004).

Lin et al. präsentierten Ergebnisse, die unter anderem besagten, dass nach einem Flotillin1-Knockdown die MCF7-Zellen langsamer wachsen (C. Lin et al., 2011). Dies konnte in dieser Arbeit in KO-Zellen jedoch nicht beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um eigene Beobachtungen während der Arbeit in der Zellkultur. Trotzdem könnte eine generelle Verminderung der Exosomen vorliegen, wenn das Wachstum der KO-Zellen eingeschränkt wäre.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten unter Berücksichtigung der subjektiven Interpretation der Ergebnisse eingeordnet werden. Eine Quantifizierung der Signale würde objektivere Ergebnisse erzielen, wurde allerdings wegen der starken Unterschiede zwischen den Klonen nicht vorgenommen. Abgesehen davon, sollten in nachfolgenden Versuchen auch Syndecan-2, -3 und -4 in den KO-Zellen betrachtet

werden, denn eine Interaktion mit Flotillin-1 konnte für alle vier Syndecane nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnten keine klaren Auswirkungen des Fehlens von Flotillin-1 auf die Quantität von Syntenin-1 oder Syndecan-1 in den Zellen festgestellt werden.

5.4 Charakterisierung der Exosomen

Ein abschließendes Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Flotillin-1 in der Entstehung von Exosomen zu untersuchen. Mithilfe der in meiner Arbeit hergestellten F1KO-Zellen war es möglich, Exosomen aus den F1KO-Zellen mit Wildtyp-Zellen zu vergleichen. Die Exosomen-Isolierung wurde methodisch mittels Ultrazentrifugation durchgeführt.

Bei der gewählten Methodik besteht prinzipiell die Gefahr, dass andere Partikel wie Mikrovesikel ebenfalls isoliert werden und fälschlicherweise als Exosomen identifiziert werden. Um dieses Problem zu eliminieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zentrifugationsschritte durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.5). Zelltrümmer wurden beim ersten Schritt bei 800 x g entfernt und Mikropartikel bei 10 000 x g. Anschließend wurden in 2 Schritten bei 100 000 x g die Exosomen isoliert, um sicherzustellen, dass es sich ausschließlich um Exosomen handelt. Eine Alternative zur Ultrazentrifugation stellt die Isolierung der Exosomen mit kommerziell erwerblichen Kits oder mittels Ultrafiltration dar. In dieser Arbeit konnten keinen Exosomen mithilfe von erwerblichen Kits isoliert werden, wobei eine Isolierung mit einem geeigneten Kit besser vergleichbarere Ergebnisse liefern könnte als die Ultrazentrifugation.

Der Vergleich der Exosomen der Wildtyp- und der KO-Zellen brachte unerwartete Ergebnisse, da in mehrfach durchgeführten Experimenten in den Exosomen der KO-Zellen im Western Blot Flotillin-1 nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht im Lysat der KO-Zellen (vgl. Abb. 18). Zurückzuführen ist dieser Sachverhalt möglicherweise auf eine Kontamination während der Isolierung bzw. Zellkultur oder ein Vorkommen von Flotillin-1 in den verwendeten Reagenzien, wie beispielsweise dem Exosomen-freien Serum. Deswegen sollten in anschließenden Versuchen die Bestandteile der verwendeten Reagenzien und insbesondere des Mediums auf Anwesenheit von Flotillin-1 untersucht werden, da für die Exosomen-Isolierung der Zellkultur-Überstand verwendet wurde, nicht jedoch die Zellen selbst. Theoretisch denkbar ist ebenfalls eine Anreicherung der durch Mutation veränderten Flotillin-1-Variante aus den Zellen, welche aber im Lysat auch bei langen Belichtungszeiten nicht nachweisbar war (Kapahnke et al., 2016). Auffallend in dem vorliegenden Western Blot (vgl. Abb. 18) ist auch, dass das KO-Lysat weniger

Syntenin-1 als das WT-Lysat zu enthalten scheint und sich Syntenin-1 stärker in den Exosomen der KO-Zellen anzureichern scheint. Das Verhältnis von Syntenin-1 in Lysat und Exosomen war in den KO-Zellen deutlich höher als in den Wildtyp-Zellen. Dies könnte daraufhin deuten, dass sich Syntenin-1 in den KO-Exosomen in Abwesenheit von Flotillin-1 stärker anreichert. Eine insgesamt veränderte Menge an Exosomen in den F1KO-Zellen kann aber anhand der gleichmäßigen CD-63-Verteilung nicht bestätigt werden. Generell ist eine Verminderung der Exosomenmenge nach Flotillin-1-Knockout denkbar, da Wei et al. zeigten, dass ein Flotillin-1-Knockdown mit einer verminderten Exosomenproduktion einherging (Wei et al., 2021). Knockdown und Knockout können sich jedoch auch unterscheiden und verschiedene Effekte haben.

Die Interpretation dieser Ergebnisse muss äußerst vorsichtig geschehen, da das Ergebnis ebenfalls nicht quantifiziert und nur subjektiv bewertet wurde. Eine Quantifizierung der Ergebnisse wurde aufgrund des Flotillin-1-Signals in den isolierten Exosomen der Knockout-Zellen nicht vorgenommen, da die Anwesenheit von Flotillin-1 einen unklaren Einfluss auf die Ergebnisse hat. Eine Wiederholung des Experiments unter Bedingungen wo kein Flotillin-1 in den KO-Exosomen sichtbar ist, sollte durchgeführt und mithilfe einer Quantifizierung interpretiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass ohne Flotillin-1-Signal in den KO-Exosomen deutlichere Unterschiede im Vergleich der beiden Zelllinien zu finden wären. Im Anschluss wäre eine massenspektrometrische Untersuchung der gewonnenen Exosomen eine sichere und weitere Methode, um die verschiedenen Proteine nachzuweisen. Da Syndecane in dieser Arbeit nicht in den Exosomen dargestellt wurden, bleibt unklar, ob diese sich unterschiedlich stark in den Wildtyp- und KO-Exosomen nachweisen lassen würden.

5.5 Fazit/ Ausblick

Die Entstehung von Exosomen erfordert zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen und Entwicklungsschritte. Ein Großteil der Schritte ist bisher nicht ausreichend charakterisiert, weswegen in dieser Arbeit die Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 genauer beleuchtet und die Interaktion von Syndecanen mit Flotillin-1 herausgestellt wurde. Da diese Interaktion aber vorerst nur *in vitro* in indirekten Pulldown-Experimenten nachgewiesen wurde, sollte in Zukunft auch eine Ko-Immunpräzipitation von Syndecanen mit Flotillin-1 zum erneuten Nachweis folgen.

Weiterhin wurden F1KO-MCF7-Zellen mit dem CRISPR/Cas9-System erstellt und auf ihre Proteinzusammensetzung und -lokalisationen untersucht. Dabei zeigten zwei der drei

KO-Klone eine Mutation, die in der Arbeitsgruppe bereits in HeLa-Zellen bei Flotillin1-Knockout aufgetreten war und zu einem verkürzten Flotillin-1-Protein führen kann. Die Experimente zum Vergleich der Wildtyp- und KO-Zellen erbrachten keine sicher interpretierbaren Veränderungen bezüglich der ausgeschütteten Exosomen oder der enthaltenen Menge an Syntenin-1. Es sollte herausgestellt werden, wo das Signal für Flotillin-1 in den Exosomen der KO-Zellen herkommt und anschließend die Experimente wiederholt und quantifiziert werden. So könnte eine Exosomen-Isolierung erneut mittels erwerblichen Kits oder Ultrafiltration durchgeführt werden. Nach Aufklärung der Flotillin-1-Vorkommnisse kann insbesondere eine massenspektrometrische Analyse der Exosomen aus den KO-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen zur Untersuchung der Unterschiede in der Zusammensetzung verwendet werden.

Die durchgeführte Arbeit gibt neue Hinweise auf eine Beteiligung von Flotillin-1 am Entstehungsweg der Exosomen über die Interaktionen mit Syntenin-1 und Syndecanen. Vorstellbar ist eine Teilnahme von Flotillin-1 am trimeren Komplex von Syntenin-1, Syndecan und ALIX (vgl. Abb. 19), den Baietti et al. beschrieben, obwohl in ihrer Studie Flotillin-1 und Syntenin-1 nicht in denselben Exosomen nachweisbar waren (Baietti et al., 2012). Unklar bleibt auch, inwiefern die Funktionalität der Exosomen von Flotillin-1 beeinflusst wird.

Interessant wäre zukünftig ein Vergleich mit den verstärkt malignen MDA-MB435Zellen oder weniger malignen MCF10-Brustepithelzellen, um die Frage nach unterschiedlich zusammengesetzten Exosomen der Zellen, je nach Malignität, zu vergleichen. Yang et al. zeigten, dass MDA-MB435-Zellen mehr Syntenin-1 enthalten, als die hier untersuchten MCF7-Zellen (Y. Yang et al., 2013). Außerdem wurden nach Überexpression von Syntenin-1 vermehrte Phosphorylierungen von ERK1/2 gefunden, die den MAPK-Signalweg aktivieren. Bezüglich des MAPK-Signalweges konnte eine erhöhte Aktivierung auf Grund von Hochregulation des EGFR nach Flotillin-1Knockdown in MCF7-Zellen von Kurrle et al nachgewiesen werden (Kurrle et al., 2013). Diese Ergebnisse deuten auf einen möglichen Zusammenhang von Flotillin-1 und Syntenin-1 bei der Regulierung des MAPK-Signalwegs hin.

Kleine Zusammenhänge, die zum Gesamtverständnis der exosomalen Entstehungswege beitragen, können im weiteren Verlauf das Verständnis der Tumorprogression verbessern und zu neuen Therapieansätzen mit Heilungsmöglichkeiten führen.

6 Zusammenfassung

Exosomen sind extrazelluläre Vesikel, die an unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Bei der Entstehung der Exosomen spielen verschiedene Proteine eine Rolle, z.B. die ESCRT-Komplexe, Syntenin-1, Syndecane und ALIX. Vor meiner Arbeit war bereits bekannt, dass Flotillin-1 mit ESCRT-Komplexen interagiert und als exosomaler Marker dient. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Interaktionen von Flotillin-1 mit Syntenin-1 und Syndecanen zu untersuchen, sowie den Einfluss eines Flotillin-1-Knockouts auf die Bildung von Exosomen zu untersuchen. Hierzu wurden indirekte Pulldown-Experimente mit Fusionsproteinen, KoImmunpräzipitationen, Immunfluoreszenzfärbungen und Isolierung von Exosomen durchgeführt. Ich konnte zeigen, dass Flotillin-1 mit Syntenin-1 und dessen Teilfragmenten interagiert. Die PDZ-Domänen scheinen dabei einen wichtigeren Teil der Interaktionsdomäne zu bilden. Eine Ko-Lokalisation der Proteine zeigte sich jedoch nicht. Ebenfalls gelang der Nachweis einer Interaktion von Flotillin-1 mit allen vier Syndecanen. Hier zeigte sich zusätzlich eine Ko-Lokalisation von Flotillin-1 und Syndecan-1 im Bereich der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln.

Mittels CRISPR/Cas wurden Flotillin-1-Knockout-Zellen erzeugt und mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Die Expression von Syndecan-1 wurde durch den Knockout von Flotillin-1 nicht beeinflusst, während Flotillin-2 deutlich vermindert war. Die Syntenin-1-Expression schien dagegen leicht erhöht.

Exosomen wurden mit Hilfe der Ultrazentrifugation aus Wildtyp- und KO-Zellen gewonnen und verglichen. Eine Veränderung der Menge an Exosomen nach Flotillin-1KO war nicht zu erkennen. Flotillin-1 zeigte sich jedoch auch in den Exosomen der KO-Zellen, obwohl es in den Zelllysaten nicht detektierbar war. Deshalb sollte die Interpretation dieses Experiments äußerst vorsichtig geschehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine mögliche Beteiligung von Flotillin-1 bei der Bildung von Exosomen durch die nachgewiesenen Interaktionen mit Syntenin-1 und Syndecanen hin. Denkbar ist eine Veränderung der Zusammensetzung der bestimmten Exosomen, ohne eine Veränderung der ausgeschütteten oder gebildeten Menge. Hierzu sind weitere Untersuchungen jedoch nötig.

7 Summary

Exosomes are a class of extracellular vesicles that participate in different physiological and pathological processes. Various proteins participate in their biogenesis, such as ESCRT, Syntenin-1, Syndecan and ALIX. Previous studies present Flotillin-1 as a protein interacting with ESCRT and as an exosomal marker. Major aim of the present study was to examine the possible interactions of flotillin-1 with syntenin-1 and syndecans. The role of flotillin-1 in the biogenesis and release of exosomes was to be characterized through flotillin-1 knockout.

Indirect pulldowns with fusion proteins, co-immunoprecipitation, immunofluorescence microscopy and exosome isolation experiments were performed. I was able to show that Flotillin-1 interacts with syntenin-1 and its subdomains, although the PDZ-domain seems to be the most important part for the interaction. There was no co-localization in the cells. Additionally, I showed an interaction of flotillin and the cytoplasmic domains of all four syndecans. Flotillin and Syndecan-1 co-localized on the plasma membrane and in intracellular vesicles.

To compare the exosomes from flotillin-1 knockout and wildtype cells, knockout cells were generated with the CRISPR/CAS system and characterized through western blotting and in immunofluorescence experiments. Syndecan-1 expression did not seem to be influenced by the knockout, whereas flotillin-2 expression was reduced. Syntenin-1 seemed to be slightly elevated.

Exosomes were isolated by ultracentrifugation, but they showed no change in their quantity after flotillin-1 knockout. Surprisingly, flotillin-1 was detected in the knockout exosomes although it was not detectable in the lysate. Therefore, these results should be interpreted very cautiously.

The results of the present study provide an indication for flotillin-1 being a part of exosome biogenesis by means of an interaction with syntenin and syndecans. It is thus possible that flotillin-1 influences the cargo loading of specific exosomes, without necessarily changing their quantity. This will require further studies.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien	17
Tabelle 2: Chemikalien	19
Tabelle 3: Puffer	22
Tabelle 4: Primäre Antikörper	23
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 6: Primer	24
Tabelle 7: Kommerziell erworbene Kits	25
Tabelle 8: Bakterienstämme	26
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 10: Verwendete Flotillin-1 gRNA	55

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Exosomen	3
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Exosoms mit enthaltenen Bestandteilen	6
Abbildung 3: Struktur der Syndecane	13
Abbildung 4: Syntenin-1-Struktur	44
Abbildung 5: Sequenzen und Aminosäureabfolge der klonierten Syntenin- Konstrukte	45
Abbildung 6: Coomassie-Färbung nach Proteininduktion der Syntenin-1-GST- Fusionsproteine	46
Abbildung 7: Nachweis der Proteininteraktion von Flotillin-1 und Syntenin-1	47
Abbildung 8: Interaktion von Syntenin-1 und Flotillin-1 mittels Ko- Immunpräzipitation	49
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin-1 und Syntenin-1	50
Abbildung 10: DNA- und Protein-Sequenz der klonierten zytoplasmatischen Domänen der Syndecane	52
Abbildung 11: Coomassie-Färbung nach Proteininduktion der Syndecan-GST- Fusionsproteine	53
Abbildung 12: Proteininteraktion von Flotillin-1 und Syndecanen	54
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Flotillin-1 und Syndecan-1	55
Abbildung 14: Expression von Flotillinen, Syndecan-1 und Syntenin-1 in Flotillin-1-Knockout- und Wildtyp-Lysaten	58
Abbildung 15: Sequenzen der Flotillin-KO-Klone	60
Abbildung 16: Doppelfärbung von Flotillin-1 und Flotillin-2	61
Abbildung 17: Lokalisation von Syntenin-1 und Syndecan-1 in Flotillin-Knockout-Zellen	63
Abbildung 18: Exosomen-Isolierung aus Flotillin-1-Knockout- und Wildtyp-Zellen	65
Abbildung 19: Bildung von Exosomen mit und ohne Flotillin-1	69

8.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
ALIX	Apoptosis-linked Gene 2 Interacting Protein X
APS	Ammoniumpersulfat
ARF6	Adenosindiphosphat-Ribosylierungsfaktor 6
ATF2	Activating Transcription Factor 2
BSA	Bovine Serum Albumin
C-terminal	Carboxy-Terminus
cDNA	komplementäre DNA
COIP	Ko-Immunpräzipitation
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ associated protein 9
crRNA	CRISPR RNA
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindole
DEPC-H ₂ O	Diethyl-Pyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosid-Triphosphat-Mix
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ERK 1/2	extracellular-signal regulated kinases
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
F1KO	Flotillin-1-Knockout
FCS	fetales Kälberserum
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
Flot-1	Flotillin-1
Flot-2	Flotillin-2
FRS2	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor-Substrat 2
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

gRNA	guide-RNA
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Merrettichperoxidase
Hsp90	Heat shock protein 90
IF	Immunfluoreszenz
ILV	intraluminale Vesikel
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTA1	Metastasis associated Protein 1
MVK	multivesikulärer Körper
N-terminal	Amino-Terminus
NF- κ B	nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
NTD	N-terminale Domäne
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDZ	postsynaptic density protein, disc-large, zonulin-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
SNARE	soluble NSF attachment receptor

SPFH-Domäne	Somatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C-Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	Tumor-associated macrophages
TBC1D2B	TBC1 Domain Family Member 2B
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TracrRNA	transactivating RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsg 101	Tumor susceptibility gene 101
U	Enzymeinheit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9 Literaturverzeichnis

- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- 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*, 287(10), 7265–7278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Banning, A., Kurrle, N., Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer. *Cells*, 3(1), 129–149. <https://doi.org/10.3390/cells3010129>
- Barbareschi, M., Maisonneuve, P., Aldovini, D., Cangi, M. G., Pecciarini, L., Mauri, F. A., Veronese, S., Caffo, O., Lucenti, A., Palma, P. D., Galligioni, E., & Doglioni, C. (2003). High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*, 98(3), 474–483. <https://doi.org/10.1002/cncr.11515>
- Bard, M. P., Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luider, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L. A. A., van Meerbeeck, J. P., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C., & Lambrecht, B. N. (2004). Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(1), 114–121. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0238OC>
- Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407(6801), 202–207. <https://doi.org/10.1038/35025089>
- Berger, T., Ueda, T., Arpaia, E., Chio, I. I. C., Shirdel, E. A., Jurisica, I., Hamada, K., You-Ten, A., Haight, J., Wakeham, A., Cheung, C. C., & Mak, T. W. (2013). Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene*, 32(41), 4989–4994. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.499>

- 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*, 272(21), 13793–13802. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Boukerche, H., Aissaoui, H., Prévost, C., Hirbec, H., Das, S. K., Su, Z. Z., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2010). Src kinase activation is mandatory for MDA-9/syntenin-mediated activation of nuclear factor- κ B. *Oncogene*, 29(21), 3054–3066. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.65>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 17(7), 879–887. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- Choi, Y., Yun, J. H., Yoo, J., Lee, I., Kim, H., Son, H. N., Kim, I. S., Yoon, H. S., Zimmermann, P., Couchman, J. R., Cho, H. S., Oh, E. S., & Lee, W. (2016). New structural insight of C-terminal region of Syntenin-1, enhancing the molecular dimerization and inhibitory function related on Syndecan-4 signaling. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36818>
- Chute, C., Yang, X., Meyer, K., Yang, N., O’Neil, K., Kasza, I., Eliceiri, K., Alexander, C., & Friedl, A. (2018). Syndecan-1 induction in lung microenvironment supports the establishment of breast tumor metastases. *Breast Cancer Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0995-x>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Couchman, J. R., Gopal, S., Lim, H. C., Nørgaard, S., & Multhaupt, H. A. B. (2015). Syndecans: From peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. In *International Journal of Experimental Pathology* (Vol. 96, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1111/iep.12112>
- de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., & Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13), 4336–4344.

- <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871>
- 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*, 276(21), 18507–18512.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M101113200>
- Domínguez-Vigil, I. G., Moreno-Martínez, A. K., Wang, J. Y., Roehrl, M. H. A., & Barrera-Saldaña, H. A. (2018). The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 2). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., & Goetinck, P. F. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2).
<https://doi.org/10.1172/JCI10559>
- Edgar, A. J., & Polak, J. M. (2001). Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (Vol. 33). www.elsevier.com/locate/ijbcb
- Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., & Lötval, J. (2010). Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE*, 5(12), 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015353>
- Elenius, V., Götte, M., Reizes, O., Elenius, K., & Bernfield, M. (2004). Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41928–41935.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M404506200>
- Fader, C. M., Germán Sánchez, D., Mestre, M. B., & Colombo, I. (2009). TIVAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1793).
- Falguière, T., Luyet, P.-P., Bissig, C., Scott, C. C., Velluz, M.-C., Gruenberg, J., & Schmid, S. L. (2008). In Vitro Budding of Intraluminal Vesicles into Late Endosomes Is Regulated by Alix and Tsg101. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4942–4955. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5), 675–687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>

- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>
- Giordano, C., Gelsomino, L., Barone, I., Panza, S., Augimeri, G., Bonofiglio, D., Rovito, D., Naimo, G. D., Leggio, A., Catalano, S., & And, S. (2019). Leptin modulates exosome biogenesis in breast cancer cells: An additional mechanism in cell-to-cell communication. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/jcm8071027>
- Gkantiragas, I., Brü, B., Stü, E., Kaloyanova, D., Li, X.-Y., Lö, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T., & Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched Microdomains at the Golgi Complex. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).
- Gondelaud, F., & Ricard-Blum, S. (2019). Structures and interactions of syndecans. In *FEBS Journal* (Vol. 286, Issue 15, pp. 2994–3007). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14828>
- Gonzalez-Villasana, V., Rashed, M. H., Gonzalez-Cantú, Y., Bayraktar, R., MenchacaArredondo, J. L., Vazquez-Guillen, J. M., Rodriguez-Padilla, C., Lopez-Berestein, G., & Resendez-Perez, D. (2019). Presence of Circulating miR-145, miR-155, and miR-382 in Exosomes Isolated from Serum of Breast Cancer Patients and Healthy Donors. *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6852917>
- Grootjans, J. J., Reekmans, G., Ceulemans, H., & David, G. (2000). Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19933–19941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002459200>
- Grootjans, J. J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A. N., Gise'le Degeest, G., Du'rrdu'rr, J., & David, G. (1997). Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. In *Cell Biology* (Vol. 94). www.pnas.org.
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Han, Z. B., Yang, Z., Chi, Y., Zhang, L., Wang, Y., Ji, Y., Wang, J., Zhao, H., & Han, Z. C. (2013). MicroRNA-124 suppresses breast cancer cell growth and motility by targeting CD151. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(6), 823–832. <https://doi.org/10.1159/000350100>

- Hannafon, B. N., Trigos, Y. D., Calloway, C. L., Zhao, Y. D., Lum, D. H., Welm, A. L., Zhao, Z. J., Blick, K. E., Dooley, W. C., & Ding, W. Q. (2016). Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0753-x>
- Hood, J. L., San Roman, S., & Wickline, S. A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Research*, 71(11), 3792–3801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4455>
- Imjeti, N. S., Menck, K., Egea-Jimenez, A. L., Lecointre, C., Lembo, F., Bouguenina, H., Badache, A., Ghossoub, R., David, G., Roche, S., & Zimmermann, P. (2017). Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(47), 12495–12500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713433114>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jeon, H. Y., Das, S. K., Dasgupta, S., Emdad, L., Sarkar, D., Kim, S. H., Lee, S. G., & Fisher, P. B. (2013). Expression patterns of MDA-9/syntenin during development of the mouse embryo. *Journal of Molecular Histology*, 44(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s10735-012-9468-1>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In *Science* (Vol. 367, Issue 6478). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- 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), 45. <https://doi.org/10.3390/cells5040045>
- Kashyap, R., Roucourt, B., Lembo, F., Fares, J., Carcavilla, A. M., Restouin, A., Zimmermann, P., & Ghossoub, R. (2015). Syntenin controls migration, growth, proliferation, and cell cycle progression in cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00241>

- Keerthikumar, S., Gangoda, L., Liem, M., Fonseka, P., Atukorala, I., Ozcitti, C., Mechler, A., Adda, C. G., Ang, C.-S., & Mathivanan, S. (2015). Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*, 6(17), 15375–15396. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3801>
- Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L., & Bernfield, M. (1994). Members of the Syndecan Family of Heparan Sulfate Proteoglycans Are Expressed in Distinct Cell-, Tissue-, and Development-specific Patterns. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 5).
- Kim, W. Y., Jang, J. Y., Jeon, Y. K., Chung, D. H., Kim, Y. G., & Kim, C. W. (2014). Syntenin increases the invasiveness of small cell lung cancer cells by activating p38, AKT, focal adhesion kinase and SP1. *Experimental and Molecular Medicine*, 46(4). <https://doi.org/10.1038/emm.2014.1>
- King, H. W., Michael, M. Z., & Gleadle, J. M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-421>
- Koroll, M., Rathjen, F. G., & Volkmer, H. (2001). The Neural Cell Recognition Molecule Neurofascin Interacts with Syntenin-1 but Not with Syntenin-2, Both of Which Reveal Self-associating Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10646–10654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010647200>
- Kurre, N., Ockenga, W., Meister, M., Völlner, F., Kühne, S., John, B. A., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013). *Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/575>
- Kwon, M. J., Jang, B., Yi, J. Y., Han, I. O., & Oh, E. S. (2012). Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. In *FEBS Letters* (Vol. 586, Issue 16, pp. 2207–2211). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.037>
- Latysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N. A., Overduin, M., & Berditchevski, F. (2006). Syntenin-1 Is a New Component of Tetraspanin-Enriched Microdomains: Mechanisms and Consequences of the Interaction of Syntenin-1 with CD63. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7707–7718. <https://doi.org/10.1128/mcb.00849-06>
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., & Record, M. (2004). Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. In *Biochem. J* (Vol. 380).

- Lendorf, M. E., Manon-Jensen, T., Kronqvist, P., Multhaupt, H. A. B., & Couchman, J. R. (2011). Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(6), 615–629.
<https://doi.org/10.1369/0022155411405057>
- Li, L., Luo, J., Wang, B., Wang, D., Xie, X., Yuan, L., Guo, J., Xi, S., Gao, J., Lin, X., Kong, Y., Xu, X., Tang, H., Xie, X., & Liu, M. (2013). *Microrna-124 targets flotillin-1 to regulate proliferation and migration in breast cancer*.
<http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/163>
- Lin, C., Wu, Z., Lin, X., Yu, C., Shi, T., Zeng, Y., Wang, X., Li, J., & Song, L. (2011). Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a. *Clinical Cancer Research*, 17(10), 3089–3099. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3068>
- Lin, J. J., Jiang, H., & Fisher, P. B. (1998). Melanoma differentiation associated gene-9, mda-9, is a human gamma interferon responsive gene. *Gene*, 207(2), 105–110.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00562-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00562-3)
- Liu, Y., Lin, L., Huang, Z., Ji, B., Mei, S., Lin, Y., & Shen, Z. (2015). High expression of flotillin-2 is associated with poor clinical survival in cervical carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1), 622–628.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755754>
- Lv, M. meng, Zhu, X. ya, Chen, W. xian, Zhong, S. liang, Hu, Q., Ma, T. fei, Zhang, J., Chen, L., Tang, J. hai, & Zhao, J. hua. (2014). Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of Pglycoprotein. *Tumor Biology*, 35(11), 10773–10779.
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-2377-z>
- Manjunath, G. P., Ramanujam, P. L., & Galande, S. (2018). Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. In *Journal of Biosciences* (Vol. 43, Issue 1, pp. 155–171). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s12038-017-9727-0>
- Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. B., & Couchman, J. R. (2013). Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS Journal*, 280(10), 2320–2331. <https://doi.org/10.1111/febs.12174>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell

- communication. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 9–17). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Meister, M., Bänfer, S., Gärtner, U., Koskimies, J., Amaddii, M., Jacob, R., & Tikkanen, R. (2017). Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo. *Oncogenesis*, 6(6). <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.47>
- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view. In *Membranes* (Vol. 4, Issue 3, pp. 356–371). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>
- Morrow, I. C., & Parton, R. G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: Rafts worms and anaesthetics. In *Traffic* (Vol. 6, Issue 9, pp. 725–740). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00318.x>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Uers, G. L. ", 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. In *Biochem. J* (Vol. 378).
- Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101(3), 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- Parimon, T., Brauer, R., Schlesinger, S. Y., Xie, T., Jiang, D., Ge, L., Huang, Y., Birkland, T. P., Parks, W. C., Habel, D. M., Hogaboam, C. M., Gharib, S. A., Deng, N., Liu, Z., & Chen, P. (2018). Syndecan-1 Controls Lung Tumorigenesis by Regulating miRNAs Packaged in Exosomes. *American Journal of Pathology*, 188(4), 1094–1103. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.009>
- Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS Journal*, 281(9), 2214–2227. <https://doi.org/10.1111/febs.12775>
- Piombino, C., Mastrolia, I., Omarini, C., Candini, O., Dominici, M., Piacentini, F., & Toss, A. (2021). The role of exosomes in breast cancer diagnosis. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030312>
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (n.d.). *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403453101
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. v, Melief, C.

- J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3). <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Roucourt, B., Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P., & David, G. (2015). Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Research*, 25(4), 412–428. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.29>
- Safaei, R., Larson, B. J., Cheng, T. C., Gibson, M. A., Otani, S., Naerdemann, W., & Howell, S. B. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), 1595–1604. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT05-0102>
- Saslowsky, D. E., Cho, J. A., Chinnapen, H., Massol, R. H., Chinnapen, D. J. F., Wagner, J. S., de Luca, H. E., Kam, W., Paw, B. H., & Lencer, W. I. (2010). Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4399–4409. <https://doi.org/10.1172/JCI42958>
- Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., & Bernfield, M. (1989). Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), 1547–1556. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1547>
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, 6(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 124(2), 577–587. <https://doi.org/10.1242/dev.124.2.577>
- Seidel, C., Sundan, A., Hjorth, M., Turesson, I., Dahl, I. M., Abildgaard, N., Waage, A., & Borset, M. (2000). Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*, 95(2), 388–392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627439>
- Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Tamura, K., & Ochiya, T. (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Science*, 107(3), 326–334. <https://doi.org/10.1111/cas.12880>

- 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*, 403(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geute, H. J., Oorschot, V., & Schwartz, A. L. (1991). Late Endosomes Derive from Early Endosomes by Maturation. In *Cell* (Vol. 65).
- Street, J. M., Barran, P. E., Mackay, C. L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T. S., Chalmers, R. T. A., Webb, D. J., & Dear, J. W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Translational Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-5>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Sun, M., Gomes, S., Chen, P., Frankenberger, C. A., Sankarasharma, D., Chung, C. H., Chada, K. K., & Rosner, M. R. (2014). RKIP and HMGA2 regulate breast tumor survival and metastasis through lysyl oxidase and syndecan-2. *Oncogene*, 33(27), 3528–3537. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.328>
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>
- Thompson, C. A., Purushothaman, A., Ramani, V. C., Vlodavsky, I., & Sanderson, R. D. (2013). Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10093–10099. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.444562>
- Tomasovic, A., Traub, S., & Tikkanen, R. (2012). Molecular networks in FGF signaling: Flotillin-1 and Cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029739>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867). <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. In *Genes* (Vol. 4, Issue 2, pp. 152–170).

- <https://doi.org/10.3390/genes4020152>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valenzuela, M. M. A., Ferguson Bennit, H. R., Gonda, A., Diaz Osterman, C. J., Hibma, A., Khan, S., & Wall, N. R. (2015). Exosomes Secreted from Human Cancer Cell Lines Contain Inhibitors of Apoptosis (IAP). *Cancer Microenvironment*, 8(2), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12307-015-0167-9>
- Vanlandingham, P. A., & Ceresa, B. P. (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12110–12124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809277200>
- 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*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep28820>
- Voyvodic, P. L., Min, D., Liu, R., Williams, E., Chitalia, V., Dunn, A. K., & Baker, A. B. (2014). Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9547–9559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541573>
- Wawrzyniak, A. M., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & Ivarsson, Y. (2012). Extensions of PSD-95/discs large/ZO-1 (PDZ) domains influence lipid binding and membrane targeting of syntenin-1. *FEBS Letters*, 586(10), 1445–1451. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.024>
- Wei, D., Zhan, W., Gao, Y., Huang, L., Gong, R., Wang, W., Zhang, R., Wu, Y., Gao, S., & Kang, T. (2021). RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Research*, 31(2), 157–177. <https://doi.org/10.1038/s41422020-00409-1>
- Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290), 864–869. <https://doi.org/10.1038/nature08849>
- Yang, L., Wu, X. H., Wang, D., Luo, C. L., & Chen, L. X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro.

- Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1272–1278.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1634>
- Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J. D., & Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 10.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-117>
- Yang, Y., Hong, Q., Shi, P., Liu, Z., Luo, J., & Shao, Z. (2013). Elevated expression of syntenin in breast cancer is correlated with lymph node metastasis and poor patient survival. *Breast Cancer Research*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/bcr3442>
- Yi, H., Ye, J., Yang, X.-M., Zhang, L.-W., Zhang, Z.-G., & Chen, Y.-P. (2015). Highgrade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 8, Issue 5). www.ijcep.com/
- Yu, D. dan, Wu, Y., Shen, H. yu, Lv, M. meng, Chen, W. xian, Zhang, X. hui, Zhong, S. liang, Tang, J. hai, & Zhao, J. hua. (2015). Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. In *Cancer Science* (Vol. 106, Issue 8, pp. 959–964). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cas.12715>
- Zhang, S. H., Wang, C. J., Shi, L., Li, X. H., Zhou, J., Song, L. B., & Liao, W. T. (2013). High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064709>
- Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Victor Small, J., Vandekerckhove, J., David, G., & Gettemans, J. (2002). PIP 2-PDZ Domain Binding Controls the Association of Syntenin with the Plasma Membrane ronal synapses (Gonzalez-Mariscal et al., 2000; Tsunoda. In *Molecular Cell* (Vol. 9).
- Zimmermann, P., Zhang, Z., Degeest, G., Mortier, E., Leenaerts, I., Coomans, C., Schulz, J., N’Kuli, F., Courtoy, P. J., & David, G. (2005). Syndecan recycling is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Developmental Cell*, 9(3), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.07.011>

10 Erklärung zur Disputation

„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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 und indirekt 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

11 Danksagung

Mein Dank gilt jedem, der mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und mir zur Seite gestanden hat.

Ein besonderer Dank für diese Dissertation geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen, die mir diese Arbeit mit meinem gewünschten Thema im biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin an der Justus-Liebig-Universität ermöglicht hat. Danke für alle bereitgestellten Materialien und die intensive, fachliche Unterstützung. Danke für deine seelische Unterstützung mit einem stets offenen Ohr, tollen Ideen und fantastischen Lösungsansätzen für alle auftretenden Probleme.

Danke an Dr. Anka Zakrzewicz und Dr. Mirka Didiasova für den schönsten Sitzplatz zwischen euch mit viel gemeinsamen lachen, anregenden Gesprächen und hilfreichen Ratschlägen. Danke an Dr. Antje Banning für die lehrreichen Worte und Hilfe bei allen Schwierigkeiten. Ein herzliches Dankeschön an Ralf Füllkrug, Petra Janson und Simone Kegel für die wunderbare Einarbeitung und zuverlässige Unterstützung in allen Phasen der Laborarbeit. Danke an Benedikt Beckert für die unterhaltsamen Kaffeepausen und die guten Ratschläge.

Ein ausdrücklicher Dank gilt an dieser Stelle meinen Zahnmedizin-Kollegen in dieser Zeit, insbesondere Nadine Böttcher, die mich in den gemeinsamen Kaffeepausen immer aufgebaut hat. Ohne euch wäre die Zeit im Labor nicht das Gleiche gewesen.

Danke an alle meine Freunde, die mich nicht nur über die Zeit der Doktorarbeit, sondern auch im ganzen Studium unterstützt haben. Ihr seid wunderbar und ich bin sehr froh euch kennen und Freunde nennen zu dürfen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die grenzenlose Unterstützung danken. Ohne eure Unterstützung wäre weder das Medizinstudium, noch diese Arbeit möglich gewesen. Danke für die unerschöpfliche Geduld, das offene Ohr und alle Möglichkeiten, die ihr mir immer gegeben habt!