

Philipp Siebrasse

Charakterisierung der Promotorregionen
von Flotillin-1 und Flotillin-2

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



schön merkt man's
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Charakterisierung der Promotorregionen von Flotillin-1 und Flotillin-2

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

vorgelegt von

Herrn Philipp Siebrasse
aus Neumünster

Gießen 2017

Aus dem Fachbereich 11 Humanmedizin am Biochemischen Institut
Direktor Prof. Dr. Lienhard Schmitz der Justis - Liebig - Universität

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andre Menke

Tag der Disputation: 14.02.2017

INHALTSVERZEICHNIS.....	I -II
1 Einleitung	3
1.1 Flotilline.....	3
1.1.1 Geschichte der Flotilline.....	3
1.1.2 Struktur der Flotilline	4
1.1.3 Vorkommen & Verbreitung der Flotilline	5
1.1.4 Funktionen der Flotilline.....	5
1.1.4.1 Signaltransduktion	5
1.1.4.2 Regeneration von Axonen und neuronale Differenzierung.....	6
1.1.4.3 Endozytose	7
1.1.4.4 Funktion während der Zellproliferation	7
1.1.4.5 Flotilline in Lymphozyten	7
1.1.4.6 Flotilline in der Onkologie	8
1.1.4.7 Flotilline in neurodegenerativen Erkrankungen	9
1.1.4.8 Assoziation mit weiteren Proteinen	10
1.1.5 Regulation der Flotilline	11
1.1.5.1 Regulation der Flotilline auf transkriptioneller Ebene	11
1.1.5.2 Regulation der Flotilline auf Proteinebene.....	11
1.2 EGF Rezeptor.....	12
1.2.1 Signaltransduktion und deren Einfluß auf die Genexpression	12
1.3 Ziele dieser Arbeit	13
2 Material & Methoden	14
2.1 Materialien & Geräte	14
2.1.1 Puffer & Lösungen	14
2.1.2 Zellkultur	15
2.1.3 Bakterienmedien	15
2.1.4 Zelllinien.....	15
2.1.5 Enzyme und Kits	16
2.1.6 Vektoren.....	16
2.1.7 Stimulationsfaktoren und Inhibitoren.....	16
2.1.8 Sonstiges	16
2.2 DNA - Analyse	17
2.2.1 Herstellung genomischer DNA.....	17
2.2.2 PCR	17
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	19
2.2.4 Restriktionsverdau	19
2.2.5 Ligation	20
2.2.6 TA – Klonierung	20
2.2.7 Transformation.....	21
2.2.8 Plasmidpräparation	21
2.2.9 DNA Präzipitation.....	22
2.3 Klonierung der Konstrukte.....	22
2.3.1 Umklonierung in den pGL3-Basic Vektor.....	24
2.3.2 Anfertigung eines Glycerolstocks.....	25
2.3.3 Sequenzierung.....	25
2.4 Zellkultur	25
2.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen.....	25
2.4.2 Passagieren der HeLa-Zellen	26

2.4.3	Transfektion von HeLa-Zellen.....	26
2.4.4	Stimulation und Inhibition von HeLa-Zellen	27
2.4.5	Ernte der HeLa-Zellen.....	27
2.4.6	Transfizierte Promotorkonstrukte.....	27
2.5	Reportergen Assay und Biolumineszenz.....	28
2.6	Methoden zur Sequenzanalyse.....	29
2.7	GenBank Nummern der genomischen Sequenzen.....	29
2.8	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Allgemeine Erkenntnisse über Flotillin Promotorregionen.....	31
3.2	Promotoranalysen.....	31
3.2.1	Vergleich der Flotillin Promotoren.....	32
3.2.2	Potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren.....	32
3.2.2.1	Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1	33
3.2.2.2	Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren für Flotillin-2.....	37
3.2.2.3	Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren der Flotilline	40
3.3	Promotoraktivität der Flotilline-1/-2.....	43
3.4	Promotoraktivität nach EGF Stimulation	46
3.5	Promotoraktivität nach PMA Stimulation.....	53
4	Diskussion	54
4.1	Bedeutung von ERK in der Signalkaskade der Flotilline	55
4.2	Wechselwirkungen von Akt und Flotillinen	57
4.3	Die Rolle von mTOR in der Flotillinsignalkaskade	58
4.4	Rolle der PKC bei den Flotillinen.....	60
4.5	Transkriptionelle Regulation anderer SPFH Familienmitglieder	61
4.6	Mögliche Folgen einer erhöhten Flotillinexpression	62
5	Ausblick	64
6	Zusammenfassung.....	65
6.1	Abstract.....	66
7	Abkürzungsverzeichnis	67
8	Darstellungs- ,Abbildungs- , Tabellenverzeichnis	69
8.1	Abbildungsverzeichnis	69
8.2	Tabellenverzeichnis	70
9	Literaturverzeichnis	71
10	Anhang	83
11	Publikationsverzeichnis	88
12	Ehrenwörtliche Erklärung	89
13	Danksagung	90

1 Einleitung

1.1 Flotilline

1.1.1 Geschichte der Flotilline

Die cDNA von Flotillin-2/ESA wurde 1994 von der Gruppe um Madeleine Duvic entdeckt und als "epidermal surface antigen (ESA)" bezeichnet [1].

Die hochkonservierten Flotillin-Proteine wurden 1997 gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Zum einen wurden sie bei Läsionen an Ganglienzellen des optischen Nervs bei Goldfischen entdeckt und aufgrund ihrer vermuteten Funktion bei Regenerationsprozessen als `Reggies` bezeichnet [2].

Zum anderen wurden sie von Bickel als `Flotilline` bezeichnet, da sie in der frei flottierenden Lipid Raft Fraktion als unlösliche Strukturen nachweisbar waren [3].

In der Nomenklatur hat sich der Name der Flotilline durchgesetzt, wobei Flotillin-1 dem Reggie-2 und Flotillin-2 dem Reggie-1 entspricht. Flotilline sind in ihrer Proteinsequenz miteinander 47% identisch und 70% homolog.

Zwischen Vertebraten und Invertebraten sind sie zu 64% identisch. Unter Vertebraten konnte sogar eine 90% Homologie nachgewiesen werden [4].

1.1.2 Struktur der Flotilline

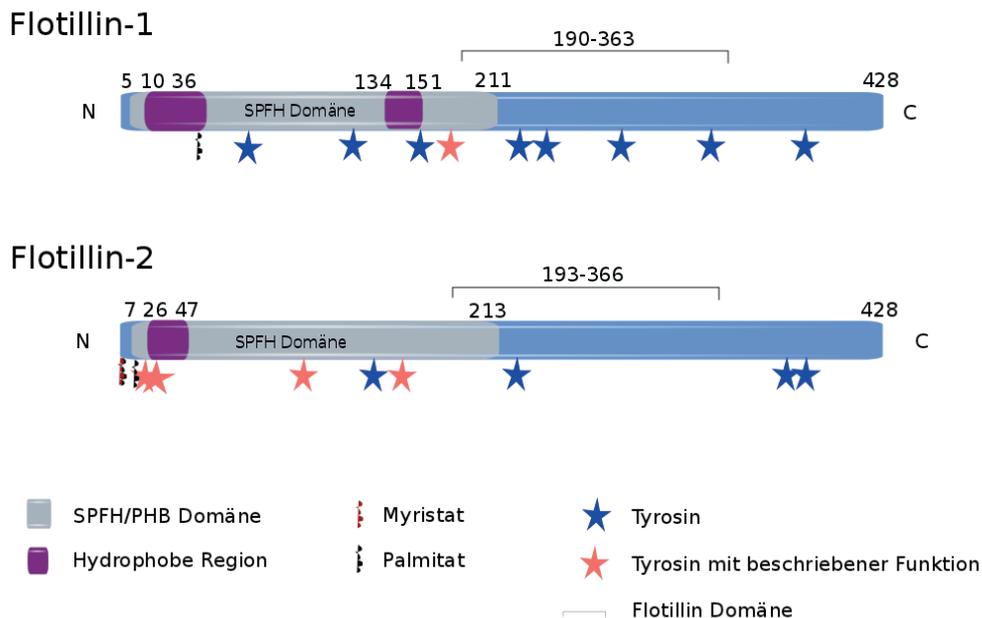


Abb. 1.: Schematische Darstellung der Flotilline

Die humanen Flotilline bestehen aus 428 Aminosäuren. Am N-Terminus befindet sich eine SPFH/PHB Domäne (grau). Flotillin-1 besitzt zwei, Flotillin-2 nur eine hydrophobe Region (lila). Am C-Terminus befinden sich EA-Repeats und Sequenzen die Coiled Coils ausbilden können. Die Zahlen markieren die äußeren Aminosäuren der Domänen. Flotillin-1 ist an der Aminosäure Cystein34 palmytiert, Flotillin-2 an Glycin2 myristyliert und an Cysteinen 4, 19, 20 palmytiert. Die Tyrosine sind durch blaue Sterne gekennzeichnet, wobei diejenigen mit beschriebener Funktion in rot hervorgehoben sind. (Darstellung verändert nach Babuke und Tikkanen 2007)

Die Abb. 1 zeigt schematisch die Domänenstruktur der 428 Aminosäuren großen Flotilline. Charakteristisch für Flotilline ist, dass sie zur SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C) Superfamilie gehören. Am N-Terminus befindet sich eine SPFH/PHB (Prohibitin Homologie) Domäne mit bisher noch unbekannter Funktion [5]. Es wird vermutet, dass die SPFH/PHB-Domäne einen Einfluß auf die Raft-Assoziation und Interaktion der Proteine hat [4, 6]. Flotilline sind durch Fettsäuremodifikationen und Oligomerisierung direkt an die Innenseite der Plasmamembran gebunden [7-9]. Glutamin und Alanin-Wiederholungen (sogenannte EA-Repeats) befinden sich am C-Terminus. Man nimmt an, dass die Homo- bzw.-Heterooligomerisierung am C-Terminus eine Organisation von Rafts, Membraneinstülpung und Vesikelknospung ermöglicht [10, 11]. Flotilline durchspannen die Plasmamembran nicht. Dennoch können sie mit anderen Proteinen auf der gegebenüberliegenden Seite der Plasmamembran assoziieren und interagieren [12]. Für Flotillin-2 konnte gezeigt werden, dass es mit dem hydrophoben N-Terminus an die Plasmamembran binden kann und über irreversible Myristylierung an Glycin 2 und via reversible Palmytilyierungen an Cystein 4, 19 und 20 gebunden ist [7]. Flotillin-1 hat eine

reversible Palmylierungen an den Cysteinresten 5, 17 und 34 und zwei hydrophobe Domänen [5].

1.1.3 Vorkommen & Verbreitung der Flotilline

Flotilline werden ubiquitär exprimiert, wobei sie jedoch in unterschiedlicher Weise und Häufigkeit in verschiedenen Geweben vorkommen. Flotillin-2 konnte vermehrt in Geweben von Leber, Milz, Herz und Gehirn, und Flotillin-1 in Muskelzellen und Lungenparenchym nachgewiesen werden [13-15]. In Axonen, neuronalen Wachstumskegeln, Bereichen von Neuronen und Lymphozyten werden Flotilline ebenfalls vermehrt exprimiert [2, 16, 17]. Erst vor Kurzem konnten Flotilline auch in Prokaryoten nachgewiesen werden [18].

Ähnlich anderer Raft-assoziiertes Proteine können Flotilline mit Lipidstrukturen, sogenannten `lipid bodies` interagieren [19]. Die Proteinsynthese der Flotilline erfolgt an freien Ribosomen. Der Transport zur Plasmamembran muss also kotranslational oder posttranslational erfolgen [5, 20, 21]. Flotilline assoziieren an der Plasmamembran in laterale beweglichen Membranzusammenschlüssen und bilden Homo- bzw. Heterooligomere [10, 11]. Eine Internalisierung der Flotilline in das Zellinnere erfolgt hauptsächlich via Clathrin- oder Caveolin-unabhängiger Endozytose [5, 8, 10, 17, 22]. Für Flotillin-1 konnte nachgewiesen werden, dass es Zellzyklus-abhängig in den Zellkern transloziert. Flotillin-1 befindet sich aber auch in späten Endosomen, Vesikeln und Lysosomen und kann zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Organellen reversibel eingebaut werden [23, 24].

1.1.4 Funktionen der Flotilline

1.1.4.1 Signaltransduktion

Flotilline sind an verschiedenen Signalwegen sowie an Endo- und Phagozytosewegen beteiligt. Auf diese Weise können sie beispielsweise die Weiterleitung von Signalen via Membranrezeptoren fördern, die Raft-getriggerte Endozytose und Phagozytose sowie das Zytoskelett und das neuronale Wachstum beeinflussen [2, 8, 16, 22, 25-28]. Bei der IgE-vermittelten Aktivierung von Mastzellen und der Aktivierung der Kinase Fyn spielt Flotillin-1 eine wichtige Rolle [29]. Flotilline können so beispielsweise an Glycosyl-Phosphatidylinositol-Proteine (sogenannte GPI-Anker) der Plasmamembran [16], an das zelluläre Prionprotein PrP^C [30], an Thy-1, F3/Contactin [17] und SRC-Kinasen [21] binden oder die Aktivierung der p38 abhängigen MAP-Kinasen beeinflussen [31]. Amadrii konnten experimentell zeigen, dass ein Flotillin-1 Knockdown zur verminderten EGF-induzierten Phosphorylierung und Clustering des EGFR und zur ineffizienten Aktivierung von downstream gelegenen Signalwegen (MAPK, Akt) führt.

Anhand dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass Flotillin-1 eine wichtige Rolle als Trägerprotein / Scaffolding Protein in der frühen Phase der Rezeptoraktivierung sowie der späten Phase der Aktivierung der MAPK-Signalkaskaden spielt. Darüber hinaus ist es gut vorstellbar, dass auch weitere Rezeptortyrosinkinasen einer Steuerung durch Flotillin-1 unterliegen [32].

Der Insulinrezeptor ist ein solches Beispiel. Insulin ist ein körpereigenes Peptidhormon, das bei hohen Blutzuckerspiegeln die Aufnahme von Glukose in Fett- und Muskelzellen erleichtert. Die Signalkaskade endet schließlich mit dem insulinabhängigen Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran und der Aufnahme von Glukose in die Zelle [33]. Es ist bekannt, dass Flotillin-1 eine Rolle bei der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme aufgrund seiner Interaktion mit dem Protein CAP zugeschrieben wird [34]. CAP steht für ‚c-Cbl-associated protein‘, ist aufgebaut aus drei SH3-Domänen am C-Terminus und ähnelt in seinem Aufbau der Struktur von Sorbin. Hingegen gibt es auch Studien, die eine Flotillin-unabhängige Funktion von CAP bei der Insulin-Signaltransduktion beschreiben [35]. Tomasovic konnte zeigen, dass Flotillin-1 und CAP hochsensible Regulatoren in der Insulinsignalkaskade, aber auch in verschiedenen weiteren Signalkaskaden sind [36].

1.1.4.2 Regeneration von Axonen und neuronale Differenzierung

Eine erhöhte Expression von Flotillinen wurde ursprünglich während der Regeneration von retinalen Ganglienzellen des Sehnervs in Goldfischen beobachtet [2]. In weiteren Untersuchungen zeigte die Gruppe um Munderloh, dass eine Herunterregulierung der Flotilline eine bis zu 70% Reduktion der Aktivität der Regeneration in Zebrafischen auslöst, und Flotilline somit eine essentielle Funktion während der Regeneration von Axonen besitzen [16, 37]. Während der frühen Embryogenese und Segmentation bei Zebrafischen und Fruchtfliegen spielen Flotilline eine wichtige Rolle und zeigen eine erhöhte Expression im ZNS [38-40]. Durch Überexpression der Flotilline in unterschiedlichen Tiermodellen, kommt es zur Veränderung im Phänotyp [41, 42]. Darüber hinaus zeigt die Interaktion von Flotillin-1 mit Molekülen des ZNS wie beispielsweise Neuroglobin, dass ein neuroprotektiver Mechanismus beeinflusst werden kann [43]. Zusammenfassend haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass Flotilline eine große Rolle bei der Differenzierung und Regulation der Regeneration in Fischen und in der Fruchtfliege einnehmen.

1.1.4.3 Endozytose

Flotilline werden nach Wachstumsfaktorstimulation endozytiert. Die Endozytose von Flotillin-2 ist hierbei abhängig von Tyrosin 163 und die von Flotillin-1 von Tyrosin 160 [5, 44].

Ait-Slimane hat herausgefunden, dass eine verringerte Expression von Flotillin-2 die Endozytose von GPI-verankerten Proteinen in Leberzellen inhibiert. Das lässt darauf schließen, dass die Endozytose von GPI-verankerten Proteinen auf eine Clathrin und Flotillin-abhängige Signalkaskade angewiesen ist [45]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Flotillin-1-haltige Mikrodomänen wichtig für die Endozytose des Proteinkinase-C-getriggerten Dopamintransporter/DAT sind und dass sie an deren Assoziierung mit der Plasmamembran beteiligt sind [46, 47]. Beim Niemann-Pick Syndrom assoziieren Flotilline mit dem Rezeptor NPC1L1, der für eine erhöhte Cholesterinaufnahme in die Leberzellen sorgt [48]. Ein Knockdown der Flotilline vermindert die Aufnahme von Cholesterin und die Endozytose von NPC1L1 deutlich.

1.1.4.4 Funktion während der Zellproliferation

Flotilline können auch in den Zellkern translozieren und in die Regulation der Zellproliferation eingreifen. Dabei interagiert Flotillin-1 mit dem mitogenen Protein PTOV1 während der S-Phase des Zellzyklus [24]. Das Fehlen von Flotillin-1 oder PTOV1 kann die Zellproliferation hemmen, während man nach einer Überexpression eine erhöhte Proliferation beobachtet [24]. Des Weiteren scheint Flotillin-1 entscheidend für die mitogenen Regulatoren Aurora A und Aurora B zu sein, mit denen es über seine SPFH-Domäne interagiert und in den Zellkern transloziert [49].

1.1.4.5 Flotilline in Lymphozyten

Der Einfluß der Flotilline auf die Reorganisation des Zytoskeletts findet sich auch in Lymphozyten wieder. Bei der Chemotaxis, Adhäsion, Mobilisierung von Calcium oder der Rac-Aktivierung hat sich gezeigt, dass Flotillin-1 ein wichtiger Interaktionspartner ist [50]. In T-Lymphozyten sind Flotilline an einem der Zellpole als sogenannte vorassemblierte Plattform, einer Makrodomäne, assoziiert. Auf diese Weise kann es zur Aktivierung und Interaktion mit verschiedensten Molekülen kommen [17, 51]. Bei Aktivierung werden Signalmoleküle wie beispielsweise Thy-1, TCR/CD3, Fyn, PSGL-1, ERM, Ick und LAT an die zuvor gebildete Reggie/Flotillin-Makrodomäne rekrutiert, welches zusätzlich durch Chemokine verstärkt werden kann [51-53]. Des Weiteren assoziieren Vimentin und IKK β nach Aktivierung der Zelle mit Flotillinkomplexen [54, 55]. Eine trans-negative Flotillin-2 Mutante, welche in die Assemblierung der Reggie/Flotillin-Makrodomäne eingreift, konnte

in weiteren Untersuchungen die Raft Polarisation und die Bildung von Makrodomänen in zuvor aktivierten T-Lymphozyten blockieren [52].

1.1.4.6 *Flotilline in der Onkologie*

Im Hinblick auf Tumorgenese und Metastasierung könnten Flotilline in Zukunft von besonderem medizinischem Interesse sein. Die indirekte/direkte Aktivierung des MAPK Signalweges und die damit verbundene Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren spielt in der Karzinogenese eine wesentliche Rolle. Momentan geht man davon aus, dass die Ursache für die Entwicklung einer großen Anzahl unterschiedlichster Tumoren an der Deregulierung verschiedenartiger Kinasen wie beispielsweise Raf, MEK und ERK liegt [56]. Bei einer Überexpression der Ras GTP-ase kommt es initial zur veränderten Aktivierung von ERK [57]. Eine Überexpression der Raf Kinase, bei Abwesenheit von Flotillin-2, hat eine Überexpression von ERK zur Folge [58]. *In vivo* und *in vitro* konnte mittels Knockdown von Flotillin-1 die Proliferation und Differenzierung von Brustkrebszellen inhibiert werden [59]. Kurrle konnte zeigen, dass es in MCF-7 Brustkrebszellen beim Knockdown von Flotillin-1 zur Hochregulierung und Überexpression von EGFR und einer gesteigerten Aktivierung der MAPK Signalwege kam, wobei eine direkte Inhibierung des EGFR zu einer verringerten Aktivierung auch der MAPK Signalwege führte [60]. Dabei ist die Ursache noch unklar und könnte möglicherweise daran liegen, dass beim Knockdown der Flotilline, Homooligomere ausgebildet werden, welche dann zum beschriebenen Effekt führen. Eine Tumorprogression konnte auch unter Hochregulierung von Flotillin-1 in Brustkrebszellen und bei Endometriumtumoren beobachtet werden [61, 62].

Die Stärke der Flotillin-Überexpression hat in weiteren Studien gezeigt, dass sie direkt mit dem klinisch pathologischen Stadium der pTNM Klassifikation korreliert [63]. Darüber hinaus wurde in Melanomzellen eine Überexpression von Flotillinen und eine Malignisierung beobachtet [27]. Perou machte schon früh darauf aufmerksam, dass Flotillin-2 bei Überexpression von ErbB in weiblichen Brustkrebszellen hochreguliert ist [64]. Darüber hinaus wurden Mutationen upstream vom EGFR in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, die für eine Deregulierung verantwortlich gemacht werden [65]. Durch Regulierung der Flotillin-2 Transkriptionsaktivität, wird auch die Signalkaskade des proinflammatorischen Zytokins IL-6 reguliert, welches mit vielen Erkrankungen assoziiert ist [66]. Das Flotillin-2 Protein und deren mRNA sind sowohl in verschiedenen, tumorösen Geweben als auch in metastatischen Gewebetypen stark erhöht [67-69]. Des Weiteren interagiert Flotillin-2 mit dem Thrombinrezeptor PAR-1 [27, 43]. PAR-1, ein transmembranöser G-Protein gekoppelter Rezeptor ist dabei essentiell für die Tumorprogression in Melanomzellen. Berger zeigte anhand eines Flotillin-2 Knockout bei

Mäusen, dass die Ausbildung von Lungenmetastasen von Brustzelltumoren deutlich geringer in Mäusen ohne Flotillinexpression war, während im Vergleich dazu keine wesentlichen Veränderungen bei primären Brustzelltumoren beobachtet werden konnte [70]. Die Unterdrückung der Flotillin-2 Expression durch verschiedene siRNAs resultierte in deutlich geringeren Mengen an PAR-1 mRNA. Ein siRNA Knockdown von Flotillin-2 in Hela-Zellen sowie ein Knockout im Mausmodell verstärkte die Phosphorylierung von ERK, MEK und CRAF. Auf diese Weise führt ein Flotillin-2 Knockdown/Knockout eher einer Verstärkung, während ein Flotillin-1 Knockdown zu einer Inhibition der ERK Signalkaskade führt.

Schlussfolgernd geht man davon aus, dass Flotillin-2 und dessen Interaktionspartner sowie die Inhibition von Flotillin-1 einen Einfluss auf die Progression von Tumoren haben könnten, eine exogene medikamentöse Intervention jedoch mit Risiken der kompletten Deregulation und Wachstumsantwort der Zellen einhergehen könnte [69].

1.1.4.7 Flotilline in neurodegenerativen Erkrankungen

Hinsichtlich der Rolle von Flotillinen in neurodegenerativen Erkrankungen gibt es eine große Anzahl an Studien zu Prionenerkrankungen (BSE, Scrapie, CJD), Morbus Parkinson, cerebraler Amyloidose und der Alzheimer Demenz (AD), in denen versucht wird die jeweils vorhandenen Pathomechanismen zu erörtern. Prionenerkrankungen haben ihre Ursache in einer fehlerhaften Faltung des Proteins PrP^c [71, 72]. Bei Prionenerkrankungen wie JC, BSE, Skrapie beeinflussen Flotillin-Raft-Komplexe die Umwandlung des gesunden PrP^c-Protein in das krankmachende PrP^{Sc}-Protein [73-75]. Flotillin/PrP^c-Komplexe wurden auch in lipidreichen Vesikeln vom Jurkat T-Zelltyp gefunden [19]. Die Expression von Flotillin-1 war bei Untersuchungen in der Substantia nigra bei Patienten mit Morbus Parkinson und AD erhöht [76]. Des Weiteren konnte in Flotillin-1 positiven endozytotischen Vesikeln eine vermehrte Anreicherung des β -Amyloids, eines pathologischen Markerproteins der AD nachgewiesen werden [77]. Im Zusammenhang mit AD konnte eine erhebliche Ansammlung von Flotillin-1 in Lysosomen von Neuronen nachgewiesen werden, in denen die Neurofibrillen gänzlich zerstört waren [78]. Diese Ergebnisse sind deshalb so faszinierend, da es beim Morbus Alzheimer unter anderem durch Aggregation von Komponenten der extrazellulären Fragmente zur Entstehung von pathologischen Plaques kommt.

Fernerhin wurde in Neuroblastomen und Hippokampuszellen die Endozytose des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch siRNA-Knockdown von Flotillin-2 verhindert [79]. APP, ein in Neuronen exprimiertes Transmembranprotein, geht nicht allein Bindungen mit Flotillin-2 ein. Flotillin-1 kann direkt an die intrazelluläre Domäne des APP binden [80]. Mit Hilfe proteolytischer Prozessierung durch β - und γ -Sekretasen, kommt es zur Freisetzung β -

Amyloids(A β) in den Extrazellularraum und ins Zytosol. John konnten nachweisen, dass beide Flotilline in unterschiedlicher Weise an die Protease BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) binden und die Produktion des β -Amyloids beeinflussen können [81]. Anhand eines Knockout-Mausmodells untersuchte Bitsikas die Gehirne von 12 Wochen alten Mäusen auf cerebrale Amyloidose und fand heraus, dass bei Flotillin-1/-2 Knockout jeweils geringe Mengen an A β vorhanden waren, welches für eine essentielle Rolle der Flotilline-1/-2 bei dem Transport und der Prozessierung von APP spricht [82]. Schlussendlich zeigen alle diese Ergebnisse, dass die Fotilline eine wesentliche Bedeutung in der Progression neurodegenerativer Erkrankungen haben.

1.1.4.8 Assoziation mit weiteren Proteinen

Auf der Ebene der Reorganisation des Zytoskeletts wurde der Einfluss von Flotillinen schon mehrfach diskutiert [7, 17, 26]. Flotilline haben die Eigenschaft, mit dem Aktin-Zytoskelett zu interagieren [30, 52]. Die Überexpression von Flotillin-2 triggert die Ausbildung von filopodienartigen Fortsätzen [7, 26]. Ein weiterer möglicher Mechanismus von Flotillin-1 mit dem Zytoskelett, ist die Interaktion mit Proteinen der Vinexin-Gruppe [83]. Die Interaktion von Flotillin-1 und CAP, Vinexin- α oder ArgBP2, welche alle zur SOHO Familie gehören, bestätigen die Annahme, dass Flotillin-1 eine große Bedeutung in der Organisation des Aktinzytoskeletts einnimmt. Flotillin-2 kann mit F-Aktin und Kinesin KIF9 über seine SPFH Domäne interagieren [9]. Ein Knockdown von Flotillin-2 führte zur Verminderung der Degradation durch Podosomen [84]. Die Flotillin-Mikrodomänen können mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts wie beispielsweise Myosin2a und Spectrin wechselwirken. Das lässt vermuten, dass Flotilline wichtig für die neutrophile Migration, Formation und die Regulation von Myosin2a sind [85].

In demselben Maße konnte gezeigt werden, dass Flotilline mit dem ABC-Transporter ABCA1 interagieren, welcher für den transmembranösen Transport von Cholesterin wichtig ist [86]. In einer jüngst veröffentlichten Studie von Kurrle konnte nachgewiesen werden, dass Flotilline nicht allein in Zell-Zell-Adhäsionskontakten in unterschiedlichen Epithelzellen lokalisieren, sondern darüber hinaus eine wichtige Funktion bei der Adhäsion von Desmosomen über eine direkte Interaktion mit γ -Catenin spielen. γ -Catenin ist bisher eines der wenigen Proteine, welches in beiden Strukturen, Desmosomen und Adhäsionsverbindungen, nachgewiesen werden konnte [87]. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere Interaktionspartner hinzukommen könnten.

1.1.5 Regulation der Flotilline

1.1.5.1 Regulation der Flotilline auf transkriptioneller Ebene

Der Genlocus für das Flotillin-2-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 17q11-12 und setzt sich aus 11 Exons zusammen. Das Gen für Flotillin-1 liegt auf dem Chromosom 6p21.3 und beinhaltet 13 Exons [14, 88]. Obwohl Flotilline nachweislich mit einer Überexpression bei der Tumorprogression assoziiert sind, sind bisher nur Einzelheiten über die transkriptionelle Regulation bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Flotilline ein direktes Ziel der p53 Familie und somit der Tumorsuppressorgene p73 und p63 sind [89]. Lopez-Casas hat nachweisen können, dass es unter erhöhter Zelldichte bei 3T3-Fibroblasten zur Hochregulierung von Flotillin-1 mRNA kommt, während die Expression von Flotillin-2 konstant bleibt [28]. Des Weiteren wurden proximal des Transkriptionstartpunktes potentielle Transkriptionsbindesstellen für Sp1, AmL-1a, MZF1,c-Ets1 und Lyf-1 ausgemacht, die jedoch nicht weiter untersucht wurden [28].

Für beide Flotilline konnte mittels Microarray-Experimenten eine erhöhte Expression nach Stimulation mit G-CSF (Granulocyte-colony-stimulating-factor) festgestellt werden [90]. Ebenfalls konnte vor kurzem in der Fruchtfliege eine transkriptionelle Regulierung von Flotillin-2 bei embryonaler Wundreaktion gezeigt werden [91]. Hierbei sind die Transkriptionsfaktoren Grh, AP-1 und die ETS-Familie maßgeblich beteiligt.

1.1.5.2 Regulation der Flotilline auf Proteinebene

Untersuchungen zu Flotillinen haben gezeigt, dass eine deutliche Abhängigkeit zwischen den beiden Proteinen besteht [92]. Die Stabilität beider Flotillin-Proteine hängt von der Anwesenheit des jeweils anderen ab. Wird die Expression von Flotillin-2 in Zellen mittels RNAi oder in Drosophila durch Gen-Inaktivierung oder Knockout unterbunden, ist für Flotillin-1 ebenfalls ein vermindertes Proteinniveau detektierbar. Weiter konnte beobachtet werden, dass Flotillin-2 in C2C12-Myoblasten während der Differenzierung *in vitro* hochreguliert wird [15]. Eine Behandlung mittels IL-11 in humanen Epithelzellen des Endometriums führte zur Hochregulierung von Flotillin-1 [93]. Bei „stroke prone spontaneously hypertensive“ (SHRSP) Ratten, die ein Modell der humanen Insulin-Resistenz und somit auch des Typ 2 Diabetes mellitus darstellen, wurde eine erhöhte Flotillin-Expression nachgewiesen [94]. Monje konnten zeigen, dass das Trainieren von Mäusen mit dem Morris-Wasserlabyrinth mit einer erhöhten hippocampalen Expression der Flotilline einherging, sodass davon auszugehen ist, dass Flotillinen evolutionär eine wichtige Rolle beim Lernen zukommt [95]. Darüber hinaus erkannte Wu, dass die Proteinexpression von Flotillin-2 eine wichtige Rolle bei der Spermiogenese von Mäusen zukommt, welches den evolutionär wichtigen Charakter bestätigt [96].

1.2 EGF Rezeptor

1.2.1 Signaltransduktion und deren Einfluß auf die Genexpression

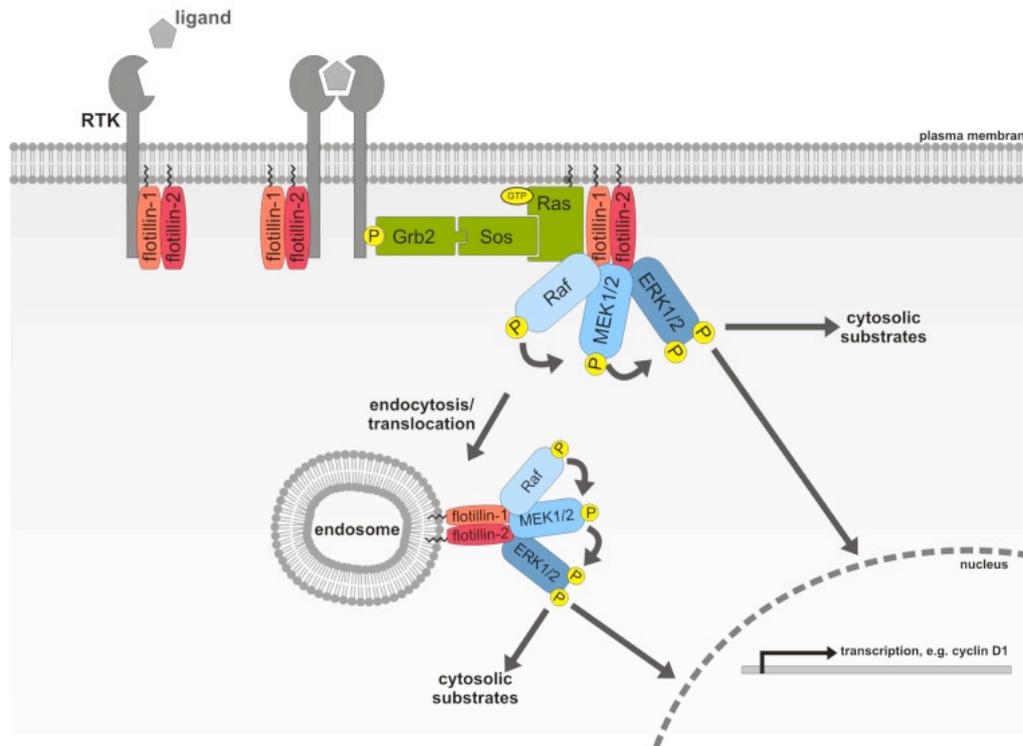


Abb. 2 EGFR, Flotilline und Transkriptionsfaktoren

Verschiedene Wachstumsfaktoren (ligand) können über den EGFR (RTK) unterschiedliche Signalkaskaden (grün) Raf/ERK/MEK mit Flotillinen (rot) interagieren und via verschiedenartige Transkriptionsfaktoren die Aktivität und somit die Differenzierung, Proliferation, Oncogenese, Angiogenese und die Regulation von Flotillinen im Nucleus (grau) beeinflussen (Mit Genehmigung aus Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount, Meister et al. IJMS 2013)

Der EGFR/ErbB1 (Epidermal growth factor receptor) ist Teil der ErbB Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, zu denen auch ErbB2/Her2, ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4 gehören. Die ErbBs sind an Zellprozessen wie Entwicklung, Metabolismus und Physiologie beteiligt und werden hauptsächlich in Zellen des Meso- und Ektoderm exprimiert [97-99]. Ursprünglich wurde der EGFR als transmembranäres Glykoprotein von ca. 170 kDa in der Membran von A431 Epidermoidzellen nachgewiesen. Alle weiteren Rezeptoren der Familie wurden beim Screening einer cDNA Bibliothek ermittelt [100, 101]. Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Domäne zur Bindung eines Liganden, einem transmembranären Anteil, einem 38 Aminosäuren langem juxtamembranösen Part, einer Tyrosinkinase-Domäne und einem 255 Aminosäure langem C-Terminus mit Tyrosinresten [102, 103]. Am C-Terminus befindet sich ebenfalls eine Glycin-reiche ATP-Bindungsstelle mit weiteren Bindungsstellen, welche durch Ligandenbindung stimuliert werden können [104]. Als Liganden können neben EGF auch TGF- α , HB-EGF, Amphiregulin, β -Cellulin, Epigen und Neuregulin-1-4 an den Rezeptor binden [105-107]. Häufig kommt es bei EGFR Überexpression oder Mutation zum Wegfall von inhibierenden Signalkaskaden, sodass

mitogenes, antiapoptotisches, angiogenes und proinvasives Verhalten der Krebszellen dominieren. Zusätzlich zu der schlechten Prognose einer Überexpression von EGFR spielen bei der Tumorgenese die EGFR-Liganden eine wichtige Rolle [108]. Über die extrazelluläre Bindung natürlicher Liganden (z.B. EGF, TGF- α) an den EGFR, kann dieser auch Dimere mit sich selbst oder anderen Liganden der ErbB Familie bilden, welches zur Autophosphorylierung und weiter distal, zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie RAS/RAF/ERK/PI3K/Akt und STAT führen kann [109].

Bei Aktivierung kommt es zur Ausbildung von Dimeren und einer Konformationsänderung im Bereich der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und einer Autophosphorylierung am C-Terminus. Intrazellulär findet man nach diesem Schritt eine Vielzahl an Signalkaskaden, wobei Phosphotyrosinreste direkt und indirekt weitere Adapterproteine oder Bestandteile von weiteren Signalkaskaden wie beispielsweise G-Proteine (G α q), MAPKs (Erk1/2, JNK und p38) oder PLCy1 aktivieren [22, 110, 111].

Die Phosphorylierung von EGFR kann weitere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise STAT1, STAT3 und STAT5 aktivieren, welche die Genexpression im Zellkern beeinflussen können [112]. EGFR aktiviert darüber hinaus über die PI3K weitere Faktoren wie BAD, FOXO, mTOR, VEGF und HIF-1 α Vertreter [113, 114]. Vielerorts findet man EGFR in monoubiquitiniert Form vor. Die Ubiquitin Markierung von EGFR durch eine E3-Ligase, welche an das phosphorylierte Tyrosin 1045 am C-Terminus bindet, ermöglicht die Rezeptorendozytose in frühe Endosomen (EEs) und die Zerlegung des EGFR [115]. Der EGF Rezeptor kann wieder in die Plasmamembran aufgenommen und somit recycelt werden [116, 117].

1.3 Ziele dieser Arbeit

Flotilline wurden vor ca. 20 Jahren entdeckt. Obwohl die Proteine ubiquitär exprimiert werden und in verschiedenen Signalkaskaden vorkommen, ist über ihre transkriptionelle Regulation bislang noch sehr wenig bekannt.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Promotorregionen der Flotilline auf potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen hin zu untersuchen, welche einen regulierenden Einfluss auf die Flotillinexpression haben. Darüber hinaus wurden Deletionsmutanten der Promotoren generiert und der Einfluß von externen Effektoren und Inhibitoren auf die Promotoraktivität untersucht.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien & Geräte

Die in der Dissertation verwendeten Materialien & Geräte sind in der folgenden Liste nach Bezeichnung und Hersteller aufgelistet.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller
Agarose Gelelektrophorese Kammer	neoLab, Heidelberg (DE)
Blot-Kammer (Hoefer TE 22)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Falcons-Röhrchen (15 bzw. 50 ml)	BD, Heidelberg (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Inkubator	Sanyo, Munchen (DE)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg (DE)
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl, 5, 10 ml)	Eppendorf ,Wesseling-Berzdorf (DE)
Reaktionsgefäße (0,5, 1, 2 ml)	Eppendorf ,Wesseling-Berzdorf (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Schüttler (KS 15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Parafilm	PechineyPlastic Packaging, IL (US)
Schwenker	Edmund Bühler, Hechingen (DE)
Eppendorfgefäß (Eppi) 1,5ml	Sarstedt, Nürnberg (DE)
Spannungsquelle (Electrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Lumimometer, TECAN infinite M200	TECAN, Crailsheim (DE)
Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls)	Bandelin, Berlin (DE)
Zellkultur-Flaschen	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkultur-Platten (24-Well)	TPP, Trasadingen (CH)
Vortexer	Biovortex, Linköping (SE)
Wasserbad	B.Braun Biotech, Meisungen (DE)
Thermocycler	Biometra, Göttingen (DE)
Erlenmeyerkolben	Schott AG, Mainz (DE)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one, Kremsmünster (A)
Zentrifugen	
Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Mikro 22 R	Hettich, Kirchlegern (DE)
Universal 32 R	Hettich, Kirchlegern (DE)
Mikroskop	
Licht-Mikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)

2.1.1 Puffer & Lösungen

Puffer für die DNA Gelelektrophorese

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Puffer für die DNA Gelelektrophorese und die Zusammensetzung des DNA Gels

TAE Puffer	Zusammensetzung DNA Gel
40 mM Tris Acetat, pH=8	1% Agarose in TAE Puffer
1mM EDTA	1:10 EtBr (1%)

2.1.2 Zellkultur

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Zellkultur und deren Hersteller

Name	Beschreibung	Hersteller
Ampicillin	K029.1	Roth, Karlsruhe (DE)
DMEM +/+	10% Fötales Kälber Serum, 1% Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
DMEM -/-	Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe (DE)
dNTPs 10mM	10mM dNTP Mix	Roche Applied Science (DE)
FCS	Fötales Kälberserum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Firefly Reagenz	Beetle Juice KIT	PJK GmbH, Kleinblittersdorf (DE)
Kanamycin	T7832.2	Roth, Karlsruhe (DE)
Lipofectamine 2000	Cat.No. 11668-027 Cat.No. 11668-019	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
OptiMEM	OptiMEM Reduced Serum Medium	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PBS 1%	Phosphat gepufferte Saline	150mM NaCl, 20mM NaH ₂ PO ₄
PLB	Passive Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim (DE)
Renilla Reagenz	Renilla-Juice Luciferase Assay	PJK GmbH, Kleinblittersdorf (DE)
Trypsin	Protease	Roth, Karlsruhe (DE)

2.1.3 Bakterienmedien

Tab. 4: Auflistung der in der Dissertation verwendeten Medien

Medium	Konzentration
LB-Broth Medium (Luria/Miller, von Roth)	25 g/l
SOC Medium	LB + 20mM Glukose

Die LB-Medien wurden von der AG-Tikkanen zur Verfügung gestellt. Bei Ampicillinresistenz wurden dem LB-Medium 0,1 mg/ml Ampicillin, hinzugegeben. Bei Kanamycinresistenz sind es 0,2 mg/ml Kanamycin.

2.1.4 Zelllinien

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Zelllinie und Medium mit Angabe des Herstellers

Name	Beschreibung	Referenz
HeLa-Zellen	Henrietta Laks (†1951), Humane Gebärmutterhalskarzinomzellen	ATCC, Rockville (US)
E.coli XL-1 blue	Bakterienstamm zur DNA-Vervielfältigung	Stratagene, La Jolla (US)

2.1.5 Enzyme und Kits

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Enzyme und Kits mit Angabe des Herstellers

Enzyme	Hersteller
Taq Polymerase (1U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
EcoRI (20U/μl)	Hoffmann La-Roche, Basel (CH)
Hind III (10U/μl)	NEB, Frankfurt (DE)
NcoI (20U/μl)	Fermenter, St.Leon-Rot (DE)
BamHI (20U/μl)	Hoffmann La-Roche, Basel (CH)
T4-Ligase (1U/μl)	Hoffmann La-Roche, Basel (CH)
Hot Star Taq Plus	Qiagen, Venlo (NL)
Kits	
Gen Elute Plasmid Miniprep Kits	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Gen Elute Plasmid Midiprep Kits	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
PCR Cloning Kit	Qiagen, Venlo (NL)
High Pure PCR Product Purification Kit	Hoffmann La-Roche, Basel (CH)

2.1.6 Vektoren

Tab. 7: Auflistung der in der Thesis verwendeten Vektoren mit Angabe des Herstellers

Vektor	Hersteller
pDrive Vektor	Promega GmbH, Mannheim (DE)
pGL3-Basic Vektor	Promega GmbH, Mannheim (DE)
pRL-TK Vektor	Promega GmbH, Mannheim (DE)

2.1.7 Stimulationsfaktoren und Inhibitoren

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Stimulationsfaktoren und Inhibitoren mit Angabe des Herstellers

Bezeichnung	Konzentration	Funktion	Hersteller
EGF	10 ng /ml	Epidermaler Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
PMA	20 ng /ml	Kanzerogener PKC-Aktivator	Calbiochem, Nottingham (UK)
U0126	10 μM	MEK ½ Inhibitor	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland

2.1.8 Sonstiges

Tab. 9: Auflistung sonstiger in der Dissertation verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
Agarose	Roth, Karlsruhe (DE)
EDTA	Roth, Karlsruhe (DE)
100%Ethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethanol Waschlösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid(EtBr)	Roth, Karlsruhe (DE)
Garnelenphosphatase/SAP	Hoffman-La Roche, Basel (CH)
Glycerol	Roth, Karlsruhe (DE)
10xLadepuffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
NaCl (6M)/Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumacetat (3M)	Roth, Karlsruhe (DE)
Neutralization Solution	Roth, Karlsruhe (DE)

Trichlormethan	Roth, Karlsruhe (DE)
DEPC-H ₂ O	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
X-Gal	Qiagen, Venlo (NL)
IPTG	Qiagen, Venlo (NL)
Tris Acetat	Roth, Karlsruhe (DE)

2.2 DNA - Analyse

2.2.1 Herstellung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden HeLa-Zellen verwendet. Zunächst wurde eine konfluente 15 cm Schale mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und die Zellsuspension 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Lysepuffer pH 8 resuspendiert. Danach wurde das Eppendorfgefäß (Eppi) bei 4°C, 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nach Verwerfen des Überstands mit dem Pellet wiederholt. Anschliessend wurde das Pellet in 1000 µl Kernlysepuffer pH 8 aufgenommen und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Lösung 333 µl gesättigte NaCl (6 M) und ca. 2 ml Chloroform zugegeben. Das Gemisch wurde erneut bei 4°C, 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi gegeben. Zum Fällen der DNA wurde dem Ansatz 600 µl 100% Ethanol beigefügt. Mittels einer letzten Zentrifugation bei 4°C und 5 min bei 13000 rpm, mit anschließendem Verwerfen des Überstands war die Präparation der DNA vollzogen. Das trockene Pellet wurde in 60 µl ddH₂O aufgenommen.

Tab. 10: Auflistung der in der Thesis verwendeten Lysepuffer und Kernlysepuffer

Lysepuffer pH8	Kernlysepuffer pH 8
10mM Tris	10mM Tris
11%(w/v) Saccharose	1%(w/v)SDS
5mM MgCl ₂	10mM EDTA
1%(v/v) Triton X-100	10mM Natrium-Citrat

2.2.2 PCR

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich *in vitro* DNA-Fragmente vervielfältigen. Für diesen Vorgang benötigt man zwei synthetisch hergestellte, sogenannte Oligonukleotide als Primer. Die gewählten Primer binden oberhalb (upstream) des ATG Startcodons von Flotillin-1 und Flotillin-2, sind jeweils zu ihrem zu synthetisierenden Strang komplementär und definieren auf diese Weise den zu amplifizierenden Bereich. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches eine DNA-Matrize während mehrerer

Replikationszyklen beliebig häufig amplifizieren kann. Alle verwendeten Primer wurden mit Restriktionsschnittstellen entworfen.

Eine PCR besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, die in mehreren Zyklen wiederholt werden. Zuerst wird die DNA erhitzt, damit sich die komplementären Doppelstränge voneinander trennen. Anschließend hybridisieren die Primer mit der jeweiligen Sequenz der Einzelstränge. Im nächsten Schritt werden die Primer von der Polymerase verlängert. Da die PCR mit der Taq Polymerase von Invitrogen bei ersten Versuchen nicht erfolgreich war, wurde die Hot Star Taq Polymerase von Qiagen verwendet.

Ansatz für eine PCR:

1 µl genomisch DNA (HeLa)
1 µl dNTP (10mM)
1 µl Primer forward (25 µM)
1 µl Primer reverse (25 µM)
10 µl 5xPuffer HF bzw. GC
10 µl 5xQ-Solution
25,5 µl DEPC-H₂O
0,5 µl (2,5 units) Hot Star Plus DNA Polymerase

Zyklen an PCR Maschine:

1. 95°C – 5 min
2. 94°C – 1 min
3. 63°C – 45 s
4. 72°C – 1,5 min
5. 72°C – 10 min
6. 4°C

Die Schritte 2.–4. wurden bis zu 35x wiederholt. Nach der PCR wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgebracht, ausgeschnitten und mit dem high pure PCR product purification Kit von Hoffmann La-Roche aufgereinigt.

Tab. 11: Auflistung der in der Dissertation verwendeten Primer

Oligonucleotid	Sequenz (5' ->3') (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen)
Flotillin-2 2130 fwd	CAGAGGT <u>ACCTGGTGTGCTT</u> GAGAAAGGCT
Flotillin-2/1385fwd	TAGCT <u>AAGCTT</u> GTAATACACACCA
Flotillin-2/930fwd	TCTAAGAAGCTTCACCGAATTCAGG
Flotillin-2 560 fwd	AGAGGTACCGAGTTT <u>GCAATGTGATG</u> CACT
Flotillin-2 rev	TTAAGCTTGGCGGCGCGGCACGGAGGGCC
Flotillin-1 2600 fwd	GAGGTACCCTGTGGCTAAAGTGAGCCCCTC
Flotillin-1/1330fwd	ACCTGAAGCTTCGGCAAAGTAGGAG
Flotillin-1 630 fwd	CCAGGTACCCCGGCTGGGCCCCGAGAGCCAG
Flotillin-1/375fwd	CCGAGAAGCTTGCCGGGCTGCCGCC
Flotillin-1 rev	AAAAGCTTGTTCAAGCTGGAGCTGGAGGAG

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese kann man Nucleinsäuren ihrer Größe nach auf einem Agarosegel auftrennen. Parallel zur DNA wird ein Marker mit bekannter Größe aufgetragen. Es wurde bei allen Versuchen der GeneRuler DNA Ladder verwendet. Die Agarose fungiert als Trennmatrix, welche abhängig von der Größe der aufzutrennenden Nucleinsäuren, in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt werden kann. Die negative Ladung der DNA lässt die Nucleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und Konformation im Agarosegel wandern. Dabei kann man einen zirkulären Vektor von einem verdauten, linearisierten Vektor unterscheiden. Um die DNA später sichtbar zu machen, wird dem Gel das kanzerogene Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid wird in die Nucleinsäuren eingelagert und verändert deren Absorptionsspektrum, welche anschließend durch ultraviolettes Licht als Bandenmuster sichtbar gemacht werden können. Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt.

2.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind die molekularen Scheren der Biotechnologie. Sie sind spezielle Enzyme, die bestimmte kurze Nucleotidsequenzen erkennen und an diesen Stellen in der DNA schneiden können. Dabei erkennt jede Restriktionsendonuklease eine spezifische Basensequenz. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Sequenz, an der sie schneiden. Ein Restriktionsverdau ist die Spaltung von DNA an gezielten Positionen. Beim analytischen Restriktionsverdau dienen die Spaltprodukte zur Überprüfung der eingesetzten DNA, beim präparativen Restriktionsverdau werden die Spaltprodukte für Klonierungen eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Zugabe von BSA, Temperatur) der Restriktionsendonukleasen wurden den entsprechenden Katalogen (NEB, Promega) entnommen. Mit Hilfe von BioLabs NEBcutter wurden die

Restriktionsschnittstellen innerhalb einer bekannten Sequenz identifiziert. Beim Restriktionsverdau wurde die zu spaltende DNA mit einer Pufferlösung und den jeweiligen Enzymen versetzt. Dazu wurden beispielsweise in 1,5 ml Eppendorfgefäße jeweils 2 µl des Puffers mit jeweils 16 µl DNA und 60 µl H₂O versetzt. Anschließend wurde dem Gemisch je 1µl Restriktionsenzym (20 Units) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 15min bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.5 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Reaktion, bei der zwei DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Sie wird durch das Enzym Ligase katalysiert.

Ein Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

11,5 µl PCR-Produkt

1 µl pGL3-Basic Vektor (geschnitten und desphosphoryliert) (ca. 100 ng DNA)

1,5 µl 10xLigasepuffer

1 µl T4-Ligase

Die Ligation dauerte bei 16°C im Thermocycler mit anschließender Hitzeinaktivierung, 12 Stunden. Zur Amplifikation der ligierten Vektoren wurden die Produkte in chemisch kompetente E. coli vom Stamm XL1-blue transformiert.

2.2.6 TA-Klonierung

Bei der TA-Klonierung wurde der pDrive Cloning Vektor 3.85 kb (PCR Cloning Kit, Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Die TA-Klonierung ist eine besondere Form der Klonierung bei der man keine Restriktionsschnittstellen benötigt. Bei dieser Methode macht man sich überhängende Adenin- und Thyminbasen auf unterschiedlichen Sequenzabschnitten zu nutzen, die komplementär hybridisieren. Das ermöglicht die problemlose später anstehende Ligation. Bei Amplifikation mittels PCR fügt die Taq Polymerase normalerweise mindestens einen Adenosinrest an das 3'-Ende. Anschließend kann dieses PCR Produkt in einem industriell hergestellten linearen Vektor mit komplementärem 5'Thymine Überhang kloniert werden. Diese Klonierungsmethode beschleunigt den Prozess um ein Vielfaches. Der größte Nachteil der TA-Klonierung ist allerdings, dass mit dieser Methode zunächst die Richtung der Klonierung nicht bestimmt werden kann. Das bedeutet, dass das Gen eine fünfzigprozentige Chance hat, in entgegengesetzter Richtung im Vektor zu liegen.

2.2.7 Transformation

Bei der Transformation wurden Plasmid und Bakterien zueinander gegeben. Für diesen Vorgang wurden kompetente E.colis verwendet. Ein Gemisch von jeweils 5 µl Plasmid und 50 µl kompetenter XL-1-blue E.colis wurde miteinander vermengt und ca. 10 min auf Eis gelagert, bevor es im Wasserbad 30 s lang bei 42°C in einen Hitzeschock überführt wurde. Auf Eis gelagert, wurde dem Gemisch anschließend 250 µl SOC-Medium zugegeben. Nach einer Stunde, 37°C und 250 rpm im Schüttler wurden die Bakterien auf zwei Ampicillin-bzw. Kanamycinplatten ausgelegt, die vorher mit einer Mischung aus 40µl X-Gal (Qiagen) und 4µl IPTG (Qiagen) bestrichen wurden. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Blau/Weiß-Selektion.

2.2.8 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation Minipräp (für größere Volumina Midipräp), ist eine molekularbiologische Methode zur Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA. Die Minipräp erfolgte mit dem Gen Elute Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich. Bei der Minipräp wurden 2 ml Bakterienkultur in Eppis gegeben. Diese wurden anschließend bei 13000 rpm, 5 min zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde, sodass nur noch das Pellet übrig blieb. Sonach wurde das Pellet in 200 µl Resuspension Solution resuspendiert. Dem Gemisch wurde anschließend 200 µl Lysis Solution hinzugegeben. Danach wurde 350 µl der Neutralization Solution hinzugefügt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm, wurden 500 µl des Überstandes durch einen Filter, in einem neuen Eppi 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. In Folge wurden 750 µl Ethanol-Waschlösung verwendet, um den Filter 1 min bei 12000 g in der Zentrifuge zu waschen. Die Zentrifugation wurde danach noch zweimal wiederholt.

Bei Verwendung von insgesamt 2 ml Bakterienkultur wurde das oben genannte Pellet in 10-25 µl Elutionspuffer aufgenommen. Eine weitere Methode Plasmide zu isolieren, bedient sich der Möglichkeit, größere Mengen zu verwenden und diese später mittels chemischer Methoden zu fällen. Die vorangegangene Fällung unter Verwendung eines Filters, wurde bei dieser Methode durch die chemische Fällung mittels Isopropanol ersetzt. Bei der `Plasmid Preparation light` wurde ein Pellet aus 4 ml Bakteriensuspension gewonnen. Der bei 13000 rpm, 2 min abzentrifugierte Überstand wurde dabei verworfen. In 100 µl Resuspensionspuffer wurde das Pellet aufgenommen und mittels Vortexer gelöst. Anschließend wurde unter leichtem Schütteln 100 µl eines zweiten Lysepuffers, sowie 100 µl eines dritten Neutralisationspuffers hinzugegeben, bevor das Gemisch erneut 10 min bei 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Es folgte die Fällung in 210 µl Isopropanol mit Vortexen und 15 min Zentrifugation

bei 14000 rpm, sowie einer Waschung mit 200 µl 70% Ethanol mit anschließender 10 min Zentrifugation bei 14000 rpm, wobei erneut jedes Mal der Überstand verworfen wurde. Nachdem das Eppi für ca. 30 min bei Raumtemperatur trocknen konnte, wurde es in jeweils 20-50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

Bei Verwendung größerer Mengen Bakterienkultur wurden Midipräps durchgeführt. Die Midipröp ist ebenfalls eine molekularbiologische Methode zur Gewinnung von Plasmid DNA aus E.colis. Zur Isolierung wurden 50 ml LB – Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zwecks Selektion versetzt. Die das gewünschte Plasmid enthaltenden kompetenten E.coli Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze aus dem im 80°C Gefrierschrank gelagerten Kryoröhrchen herausgenommen und in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225 rpm über Nacht vermehrt. Die Isolierung des amplifizierten Plasmids erfolgte nach dem Protokoll des Gen Elute Plasmid Midiprep Kit von Sigma. Am Ende der Präparation wurde das Pellet aus insgesamt 50 ml Bakterienkultur in 250 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.9 DNA Präzipitation

Als Präzipitation oder Fällung bezeichnet man in der Chemie das Ausscheiden eines gelösten Stoffes aus seiner Lösung, mittels Fällungsmittel. Mit Hilfe einer Präzipitation kann auf diese Weise DNA von wässrigen Lösungen abgetrennt werden. Dieses Ziel wird durch das sogenannte Aussalzen erreicht, bei dem eine hohe Konzentration an Neutralsalzen zur DNA gegeben wird. Diese Neutralsalze haben die Aufgabe, die Hydrathülle der DNA zu vermindern und damit die Löslichkeit herabzusetzen. Nach der Isolierung von Plasmid-DNA, wurde diese mit Hilfe der Ethanol-Fällung aufkonzentriert. Hierzu wurde die DNA mit 1/10 des Probenvolumens an 3 M Natrium Acetat (pH 5,2) und dem zweifachen Volumen 100% Ethanols versetzt und mindestens 15 min bei -20°C präzipitiert. Erst die Zugabe des zweifachen Volumens an reinem Ethanol führte zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes und zur Ausfällung. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert und pelletiert. Das Pellet wurde mit 250 µl, 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Waschgang wurde dieses erneut 5 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Um überschüssige Ethanolreste zu entfernen wurden die Proben anschließend in einem Heizblock bei 60°C getrocknet. Dem trockenen Pellet wurde DEPC-H₂O hinzugegeben und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.3 Klonierung der Konstrukte

Die Klonierung der Promotorkonstrukte erfolgte zunächst mittels TA-Klonierung, da eine direkte Ligation in pGL3-Basic Vektor nicht erfolgreich war.

Die resultierenden langen Konstrukte galten als Vorlage für weitere PCR Amplifikationen kürzerer Konstrukte, welche zunächst in den pDrive Vektor und später in den pGL3-Basic Vektor kloniert wurden.

Insgesamt wurden bei der Klonierung in den pDrive Vektor 1 µg pDrive Vektor, 4 µl aufgereinigtes PCR-Fragment und 5 µl 2xLigationsmix benutzt. Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert.

Tab. 12: Auflistung der TA-Klonierung mit pDrive Vektor

TA-Klonierung pDrive Vektor
1 µl pDrive Vektor
4 µl aufgerinigtes PCR-Produkt
5 µl 2x Ligationsmix
1,5 h, 4°C im Kühlschrank
Hitzeinaktivierung 10 min, 70°C

Bei der anstehenden Transformation wurden jeweils 5 µl Ligationsansatz in 50 µl kompetente XL-1-blue Bakterien gebracht. Der restliche Ligationsansatz wurde bei -20 °C eingefroren. Um anschließend die positiven Klone zu ermitteln wurde der Ansatz auf Kanamycinplatten mit einer Mischung von jeweils 40 µl X-Gal (50 mg/ml) und 4 µl IPTG (1 M) aufgebracht. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C inkubiert und mittels der Blau/Weiß-Selektion die positiven Klone ausgewählt.

Noch am selbigen Tag wurden die positiven, weißen Klone in 5 ml LB-Medium und Kanamycin angeimpft, um am darauffolgenden Tag aus 4 ml Übernachtskultur Minipräps herzustellen. Die gewonnenen Minipräps wurden zu Kontrollzwecken daraufhin mit EcoRI geschnitten.

Da der pDrive Cloning Vektor zwei EcoRI Schnittstellen besitzt, wurde das entsprechende Enzym für die Kontrollspaltung in allen Experimenten verwendet. Bei 37°C wurden die Konstrukte mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert.

Tab.13: Auflistung der Kontrollspaltung mit EcoRI

Kontrollspaltung mit EcoRI
je 3 µl Plasmid-DNA
je 5,75 µl H ₂ O
je 1 µl 10xPuffer H
je 0,25 µl EcoRI

Anschließend wurde ein 1% Agarosegel beladen, um die positiven Klone zu detektieren. Die Plasmide der positiven Klone wurden anschließend mit HindIII 1 h bei 37°C im Brutschrank geschnitten, um die Richtung des Inserts festzustellen. Die visuelle Kontrolle der positiven Fragmente erfolgte erneut auf einem 1% Agarosegel.

Tab. 14: Auflistung der Kontrollspaltung mit HindIII

Kontrollspaltung mit HindIII
je 5 µl Plasmid-DNA
je 3,75 µl H ₂ O
je 1 µl 10xPuffer
je 0,25 µl HindIII

2.3.1 Umklonierung in den pGL3-Basic Vektor

Die Flotillin-Promotorfragmente wurden mit Hilfe von HindIII (F1-1330, F1-375, F2-1385, F2-930) bzw. mit HindIII und KpnI (F1-2660, F1-630, F2-2130, F2-560) aus dem pDrive-Vektor herausgeschnitten, in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation in den pGL3-Basic Vektor und eine erneute Transformation der Ligationsansätze in XL-1 blue Bakterien und ein Ausplattieren auf Ampicillinplatten.

Der pGL3-Basic Vektor von Promega verfügt über eine HindIII und eine KpnI Schnittstelle in welche die Fragmente einkloniert wurden.

Hierfür wurden jeweils 1 µl geschnittener, dephosphorylierter pGL3-Basic Vektor mit 1 µl 10 xLigasepuffer, 7 µl Insert und 1 µl Ligase, 12 h bei 16°C im Thermocycler inkubiert.

Die geschnittenen pGL3-Basic Vektoren wurden zuvor dephosphoryliert. Zu 44 µl pGL3-Basic Vektor (geschnitten mit KpnI, HindIII, 2,2 µg DNA) wurden 5 µl SAP 10 xPuffer und 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase gegeben. Die Lösung wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 65°C im Heizblock durchgeführt.

Anschließend wurde erneut eine Transformation durchgeführt an dessen Ende wieder die jeweiligen Klone gepickt werden mussten. Aus den Klonen wurde eine Übernachtskultur angelegt an die eine Minipröp im Anschluss folgte. Nach einer erneuten Kontrollspaltung mit HindIII bzw. HindIII und KpnI wurde dann ein Gel angefertigt.

Um die Richtung der mit HindIII geschnittenen Konstrukte festzustellen wurden die positiven Flotillin-1 Klone mit NcoI, die positiven Flotillin-2 Klone mit EcoRI geschnitten und

anschließend ein 1% Agarosegel aufgebracht. Bei den anderen Konstrukten war die Richtung der Konstrukte bereits durch KpnI vorgegeben.

Tab. 15: Auflistung der Kontrollspaltung mit NcoI und EcoRI

Kontrollspaltung mit NcoI	Kontrollspaltung mit EcoRI
je 5 µl Plasmid-DNA	je 5 µl Plasmid-DNA
je 3,8 µl H ₂ O	je 3,8 µl H ₂ O
je 1 µl 10xPuffer Tango	je 1 µl 10x Puffer
je 0,2 µl NcoI	je 0,2 µl EcoRI

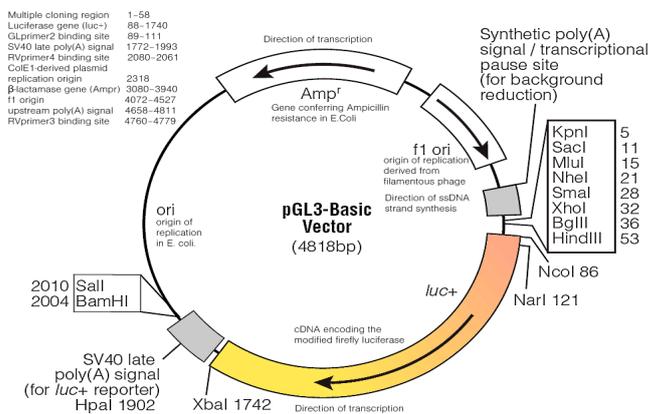


Abb.3 Zeigt pGL3-Basic Vektor Plasmid

Der pGL3-Basic Vektor (Promega) zeigt die Luciferase (gelb), sowie die einzelnen möglichen Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen. (Quelle: <http://vesuvias.files.wordpress.com/2009/07/pgl2basic1.png>)

2.3.2 Anfertigung eines Glycerolstocks

Von den positiven Klonen wurden Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurden 800µl Übernachtkultur in 200 µl Glycerol gegeben und das Gemisch anschließend bei -80°C tiefgefroren.

2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA – Konstrukte erfolgt mittels Eurofins mwg Operon, Europe.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Zelllinie HeLa stammt von humanen Zervixkarzinomzellen. Die Zellen wurden in Kulturflaschen in 5 ml „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM, Gibco, Invitrogen, Karls-

ruhe, Germany) mit einem Glukoseanteil von 4,5 g/l, bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 10% Fötale Kälberserum (FCS, Gibco) und 1% (100 U/ml) Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) beigefügt, um möglichen Kontaminationen vorzubeugen.

2.4.2 Passagieren der HeLa-Zellen

Spätestens alle drei Tage wurde das Medium in den Flaschen gewechselt. Waren die Zellen zu 100% konfluent, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl 1x Trypsinlösung hinzugegeben und die Kulturflasche bei 37°C für einige Minuten inkubiert um anschließend in 2 ml DMEM suspendiert zu werden. Die trypsinisierten Zellen wurden im Verhältnis von 1:10 bzw. 1:5 verdünnt und auf neue Zellkulturgefäße ausgesät, um für weitere Versuche verwendet zu werden. Die 24 well Platten wurden mit 0,5 ml/ well Zellsuspension beimpft.

2.4.3 Transfektion von HeLa-Zellen

Die Aussaat für eine 24-well Platte erfolgte immer 24 h vor Transfektion in 0,5 ml/well DMEM+/+. Es musste darauf geachtet werden, dass die HeLa-Zellen bei Transfektion in der 24-well Platte eine Konfluenz von 75-85% erreicht hatten.

Die Transfektion der Plasmid-DNA erfolgte mit Lipofectamine 2000. Auf diese Weise konnte der gewünschte DNA-Abschnitt, welcher auf der Plasmid-DNA kodiert war und in die Zelle eingebracht wurde, später exprimiert werden. Lipofectamine 2000 ist ein Reagenz, das einen Komplex mit der Plasmid-DNA bildet und aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften idealerweise mit der hydrophoben Plasmamembran fusioniert. Somit wird eine Transfektion von eukaryotischen Zellen mit hoher Effizienz ermöglicht.

Je nach Anforderung des Experiments, wurden verschiedene Promotorkonstrukte und der Kontrollvektor pGL3-Basic Vektor transfiziert.

Zu Beginn wurden pro well 50 µl OptiMEM, 0,63 µl LF2000 (entspricht 4 µl LF2000 pro µg DNA) in ein Eppi pipettiert. Das Gefäß wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 50 µl OptiMEM pro well mit 7,5 ng pRL-TK in einem zweiten Eppi vermengt. Anschließend wurde zu jedem Eppi ca. 150 ng eines spezifischen Promotorkonstruktes gegeben. Der Ansatz mit der DNA wurde zu dem Ansatz mit LF2000 gegeben. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben, nach 6h Inkubationszeit bei 37° C das Medium DMEM +/+ hinzu serumfreiem DMEM -/- gewechselt (500 µl/well)

und die Platte für weitere 24 h bei 37° C inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden in weiteren Experimenten stimuliert bzw. inhibiert.

2.4.4 Stimulation und Inhibition von HeLa-Zellen

Um eine möglichst effiziente Stimulation mit Kanzerogenen und Wachstumsfaktoren zu erreichen, lässt man die Zellen mindestens 18 h in serumfreiem DMEM -/- hungern. Damit möchte man verhindern, dass andere Faktoren als die später eingesetzten Substanzen zur gleichen Zeit auf die Zellen wirken und somit die Ergebnisse negativ beeinflussen. Nach 24 h Inkubation in serumfreiem Medium, wurden die Zellen für weitere 24 h behandelt.

Es wurde unter anderem mit FCS 10% stimuliert. Die Stimulation mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml hEGF erfolgte in serumfreiem DMEM -/-. Dabei wurde das Hungermedium gegen das Medium mit dem hEGF-Zusatz vollständig ersetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Referenz dienen unstimulierte HeLa-Zellen.

PMA (Phorbo-12-myristat-13-acetat) ist ein starker Tumorpromotor im Mehrstufenkarzinogese - Modell und ein Aktivator der Proteinkinase C. Um die Auswirkungen des Karzinogens auf die Promotoraktivität zu prüfen, wurden die Zellen in Hungermedium DMEM -/- zuvor gezüchtet um anschließend mit 10 ng/ml PMA über Nacht stimuliert zu werden.

Zur Überprüfung bestimmter Signaltransduktionswege und der Flotillin Promotoraktivität wurden ebenfalls bestimmte Inhibitoren verwendet. Der MEK1/2 Inhibitor (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis 2- aminophenylthio-butadiene) U0126 ist ein stark selektiver Inhibitor von MEK1 und MEK2, welche die MAPK/ERK Kinasen aktivieren.

2.4.5 Ernte der HeLa-Zellen

Die Ernte der HeLa-Zellen erfolgte nach 8 h, 16 h, 24 h bzw. 48 h Stimulation nach Behandlung auf Eis. Unbehandelte Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Dieses wurde kurz darauf abgesaugt. Mit einer Multipette wurde zur Lyse der Zellen 120 µl 1xPLB Puffer in jedes Well gegeben. Anschließend wurden die HeLa-Zellen für 15 min auf einen Schwenker gestellt. Die Zellsuspension wurde in ein neues Eppi überführt und im Kühlschrank gelagert.

2.4.6 Transfizierte Promotorkonstrukte

Mit Hilfe dieser Methode wurden folgende Konstrukte in die Zellen eingebracht:

Flot1 – 2600, Flot1 – 1330, Flot1 – 630, Flot1 – 375 (S. 83-84)

Flot2 – 2130, Flot2 – 1385, Flot2 – 930, Flot2 – 560. (S. 84-86)

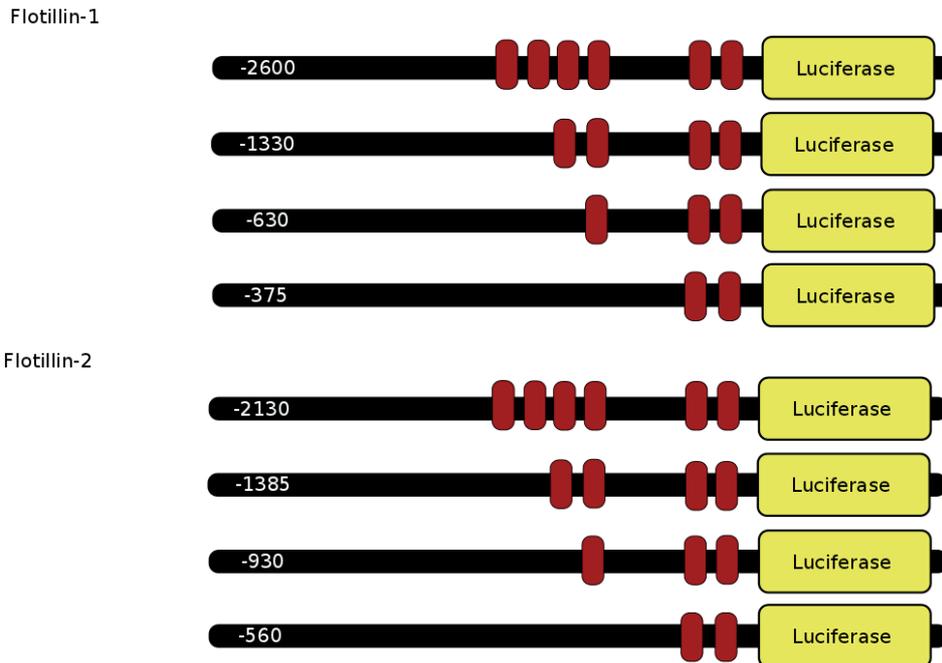


Abb.4 Promotorkonstrukte

(Flot1 – 2600, Flot1 – 1330, Flot1 – 630, Flot1 – 375, Flot2 – 2130, Flot2 – 1385, Flot2 – 930, Flot2 – 560) in unterschiedlicher Länge vom Startcodon(ATG) mit den möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen(rot) sowie der Luciferase(gelb).

2.5 Reportergen Assay und Biolumineszenz

Zur Analyse der regulatorischen Loci im Flotillin-1 und Flotillin-2 Gen, wurden unterschiedlich lange Promotorkonstrukte in einen Reportergenvektor kloniert, der ein Luciferasegen enthält. Das Gen der Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* fungiert dabei als Reportergen. Mit Hilfe der auf die Oxidation des Käfer-Luciferins zurückzuführenden Biolumineszenz lässt sich die Aktivität gut nachweisen. Nachdem die HeLa-Zellen geerntet und lysiert wurden, wurden die Lysate zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Luciferaseaktivität wurde mit dem Lumimometer (Tecan infinite M200 reader) ermittelt. Dabei erfolgt der quantitative Nachweis über die Messung von Lichtemissionsreaktionen in RLUs (relative light units). Nach der automatischen Injektion des Substrats durch das Luminometer, startet die lichtemittierende Reaktion und ist bei einer Zugabe des Substrats im Überschuss über einen bestimmten Zeitraum proportional zur Luciferaseaktivität der Probe. Dadurch kann das Niveau der Transkription indirekt bestimmt werden. Charakteristisch für die Firefly-Luciferase ist die Erzeugung von Biolumineszenz. Das besondere an diesem System ist, dass sie die höchst gemessene Quantenausbeute von 0,41 (max.1) erreicht. Die Firefly Luciferase ist ein 61 kDa großes

Protein. Das oxidative Enzym katalysiert die Biolumineszenzreaktion, die, die Substrate Luciferin, Sauerstoff, ATP und Magnesium benötigt, um Licht zu erzeugen. Die Firefly Luciferase produziert bei dieser Reaktion ein grün-gelbliches Licht von ca. 550–570 nm. Zur Normalisierung der Transkriptionseffizienz wurde die gleiche Messung mit einem Renilla refominans Vektor und dem zu untersuchenden cotransfizierten Konstrukten durchgeführt. Die Renilla-Luciferase ist ein 36 kDa großes grün-fluoreszierendes Protein. Das Substrat Coelenterazine reagiert unter Verbrauch von Sauerstoff und Abspaltung von Kohlenstoffdioxid. Dabei kommt es zur Erzeugung von einem blauen Licht von 480 nm. Auf diese Weise kann eine zuvor mit Reagenzien vorbereitete weiße 96 Well Platte mit Hilfe von automatischer Injektion und Messung analysiert werden. Pro well wurden 20µl Lysat vorgelegt und 85 µl Renilla Reagenz mit Coelenterazin bzw. 85 µl Firefly Reagenz verwendet, welches automatisch injiziert wurde. Die Messung erfolgte für 3 s im Luminometer, Tecan Reader. Bei den einzelnen Versuchen wurde jeweils mit Triplikaten gearbeitet. Um die relative Luciferaseaktivität zu erhalten, dividiert man die Firefly Messergebnisse durch die Renilla Messergebnisse. Jede Probe wurde einmalig gemessen. Aus den Triplikaten, wurde später der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung errechnet und graphisch illustriert.

2.6 Methoden zur Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA bezieht sich in der Molekularbiologie auf die computergestützte Analyse der typischen Gensequenz, Abfolge und Position der Basenpaare in der DNA. Mittels großer genomischer Datenpools können mit Hilfe von Stringalgorithmen spezifische DNA-Sequenzen nacheinander auf Teilsequenzen, sogenannte `sequence alignments` untersucht werden. In dieser Doktorarbeit wurde mit dem in der Bioinformatik bekanntem BLAST Algorithmus (heuristisches paarweises Alignment) gearbeitet, auf dessen Algorithmus verwandte Programme wie Kalign und Mulan zurückgreifen. Potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen wurden mit dem Programm MatInspector von Genomatix anhand der ausgewählten Sequenzen eruiert.

2.7 GenBank Nummern der genomischen Sequenzen

Tab. 16: Auflistung der in der Dissertation verwendeten genomischen Sequenzen

GenBank Referenz	Gen
AB088101; nucleotide	Flotillin-1(FLOT-1) homo sapiens
NC_000017; nucleotide	Flotillin-2 (FLOT-2) homo sapiens
NC_000083.5: nucleotide	Flotillin-1(FLOT-1) mus musculus
NC_000077.5: nucleotide	Flotillin-2 (FLOT-2) mus musculus

2.8 Statistische Auswertung

Alle durchgeführten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+/- SD) der Aktivitäten der einzelnen Promotorkonstrukte. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Division von Firefly Aktivität zu Renilla Aktivität erhalten. Zur statistischen Auswertung wurde bei allen Versuchen die Software GraphPadPrism 5 (San Diego, CA, USA) verwendet, wobei ein bzw. zweiseitige ANOVA-Tests mit anschließendem Bonferroni-Test vollzogen wurden, da hierbei zwei Parameter berücksichtigt werden konnten. Allein bei der Messung des PMA-Effektes im Vergleich zu unstimulierten Zellen wurde ein Student's T-Test verwendet. Statistische Werte $p < 0,05$ entsprechen dem Signifikanzniveau (*), während Werte mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) und solche mit $p < 0,001$ als hochsignifikant (***) markiert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Erkenntnisse über Flotillin Promotorregionen

Die für diese Doktorarbeit ausgesuchten Flotillin Promotorregionen wurden zunächst mit Bioinformatik analysiert. Beim Flotillin-1 Gen befindet sich das Startcodon im Bereich des zweiten Exons, während es sich für das Flotillin-2 Gen im ersten Exon befindet. Allgemein bekannt ist, dass sich das Flotillin-1 Gen in der humanen Genomsequenz in direkter Umgebung des IER3-Gens (immediate early response gene 3) befindet. Die Aufgabe des IER3-Gens besteht darin, die Zelle vor Apoptose durch Mediatoren zu schützen [118]. Für jedes Flotillin-Gen wurden bei den durchgeführten Experimenten je vier unterschiedliche Promotorkonstrukte von je unterschiedlicher Länge konstruiert. Die Promotorkonstrukte von Flotillin-1 hatten eine Länge von 2600, 1330, 630, 375 bp. Das längste Promotorkonstrukt von Flotillin-1 enthält demzufolge die gesamte Sequenz des IER3-Gens, während die kürzeren Promotorkonstrukte entweder in der 3'UTR Region des IER3-Gens (F1-1330), in der 567 bp großen intergenetischen Region zwischen IER3 und dem Flotillin-1 Gen (F1-630), oder im ersten Exon des Flotillin-1 Gens (F1-375) starten. Für die Promotorkonstrukte von Flotillin-2 wurden Konstrukte in einer Länge von 2130, 1385, 930, 560 bp hergestellt. Über Flotillin-2 wissen wir, dass es benachbart von DHRS13 liegt, einem Gen zugehörig zur Dehydrogenase/Reduktase Familie. Die beiden längsten Flotillin-Promotorkonstrukte F2-2130 und F2-1385 beinhalten die kodierende Region des Gens DHRS13, während die beiden kürzeren Konstrukte F2-930 und F2-560 in einer 3'UTR Region des DHRS13 beginnen [119].

3.2 Promotoranalysen

Nachdem die funktionellen Promotorregionen in den humanen Genen von Flotillin-1 und Flotillin-2 identifiziert waren, wurden die Sequenzen sowohl untereinander als auch mit den murinen Sequenzen verglichen. Dabei wurden sogenannte Alignments angefertigt und murine sowie humane Promotorbereiche auf ihre Homologie hin untersucht. Es wurde insbesondere nach konservierten Regionen gesucht. Bei weiteren Untersuchungen wurde darüber hinaus ermittelt, ob potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen existieren und inwieweit diese an der Regulation der Flotillin-1 und Flotillin-2 Promotorregionen beteiligt sein könnten.

3.2.1 Vergleich der Flotillin Promotoren

Die Nukleotidsequenzen der murinen und humanen Flotillin-1 und Flotillin-2 Promotorregionen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Aufgrund dieser Tatsache darf man annehmen, dass diese konservierten Regionen der Promotoren eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen. Anlässlich dieser These sollte der Vergleich ausgewählter muriner und humaner Promotorsequenzen zeigen, ob sich tatsächlich konservierte Bereiche in den Promotorregionen befinden. Zu Beginn lag jeweils die humane DNA Sequenz vor. Anhand des bekannten Startcodons (ATG), wurde ein Promotorbereich von 2600 bp für Flotillin-1 und 2130 bp für Flotillin-2 vor dem Translationsstartpunkt (ATG), auf dem DNA Strang ausgewählt.

Da unterschiedliche Alignment-Programme im Internet zur freien Verfügung stehen, wurde bereits an dieser Stelle eine Auswahl getroffen. Insgesamt wurden die Promotoralignments der Konstrukte mit BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Kalign (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign>) und Mulan (<http://mulan.dcode.org>) durchgeführt. Schlussendlich wurden allein die Ergebnisse der Alignments von Mulan zur Auswertung herangezogen. Die automatische Einteilung in verschiedene Sequenzbereiche sowie die bessere Übersicht der Ergebnisse waren hierfür entscheidend. Mittels dieser Methode konnte für Flotillin-1 eine Homologie zwischen Mensch und Maus von 61% (1573 bp/2600 bp) ermittelt werden. Für Flotillin-2 betrug der Test auf Homologie 40% (857 bp/2130 bp). Die unterschiedlich langen Sequenzabschnitte unterscheiden sich in ihrer Länge und Homologie. Die größte Übereinstimmung der Basenpaare von 77% befindet sich in dem längsten Abschnitt mit insgesamt 818 bp von 1061 bp.

Die Abb. 5 Längster Abschnitt mit einer Homologie 77% (S. 84)

Die Promotorsequenz von Flotillin-2 wurde von Mulan automatisch in vier unterschiedlich große Abschnitte unterteilt und analysiert. Bei der Sequenz mit der größten Homologie von 80% findet sich eine Basenübereinstimmung von 392 bp von 489 bp.

Die Abb.6 Längster Sequenzabschnitt mit einer Homologie von 80% (S. 85)

3.2.2 Potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Bei der Analyse der homologen Bereiche wurden viele potentielle Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotorregionen von humanem und murinem Flotillin-1 und Flotillin-2 gefunden. Für Flotillin-1 wurde beispielsweise eine 2600 bp, für Flotillin-2 eine 2130 bp umfassende Region des Promotors stromaufwärts (upstream) des ermittelten

Translationsstartpunktes mit den Programmen MatInspector und DiAlign professional (Genomatix Software GmbH, München) auf potentielle Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren untersucht [120, 121]. Das frei im Internet verfügbare Programm enthält eine Sammlung von bekannten Transkriptionsfaktorbindestellen verschiedener Spezies. Für weiterführende Experimente waren vor allem die Promotorregionen interessant, welche in beiden Spezies, Maus und Mensch, als potentiell mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen von dem Programm ausgewiesen wurden. Um möglichst nur Transkriptionsfaktoren mit einer hohen Sequenzübereinstimmung zu erhalten und dabei möglichst viele falsch positive Treffer zu vermeiden, wurde ein Schwellenwert von 90% (0,9) gewählt. Der Standardwert von Genomatix beträgt nur 75% (0,75). Für Flotillin-1 wurden innerhalb der 2600 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes (ATG) insgesamt 653 potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen von Genomatix gefunden. Bei dem Transkriptionsfaktorscreening von Flotillin-2 konnte Genomatix 555 potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen ausfindig machen. Die humane Sequenz wurde als Referenzsequenz genommen. Das bedeutet, dass potentielle Transkriptionsfaktoren, die einen Wert >0,9 im humanen Sequenzscreening erreichten gleichzeitig im murinen Sequenzscreening mit einem Wert <0,9 angegeben werden konnten. Ein konservierter Promotorbereich zeichnet sich durch die gleiche Position und Sequenz im Genom aus. Für viele der Transkriptionsfaktoren (z.B. ETS Familie) besteht die Möglichkeit, dass eine Transkriptionsfaktorbindestelle mehrere Male im Promotorbereich vorkommt. Das lässt vermuten, dass diese Transkriptionsfaktoren einen funktionell großen Einfluss auf die Transkription des untersuchten Gens haben könnten. Die nachfolgenden Tabellen beschreiben alle potentiellen Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1 und Flotillin-2, >2000bp upstream vom Translationsstartcodon entfernt liegend. Bei der computer-basierten Analyse der zwei Flotilline habe ich mich dabei auf 19 besonders interessante, potentielle Transkriptionsfaktoren konzentriert, die wir in unserer Publikation (Banning et al.) weiter untersucht haben.

3.2.2.1 Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1

Tab. 17: Auflistung potentieller humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1

Matrix Familie	Detail Familien Information	Anzahl Treffer murin	Anzahl Treffer human	Funktion (von MatInspector)
PTBP	Plant TATA binding protein factor	1	1	Bindet Intron-mPNA
TF2B	RNA Polymerase II transcription factor IIB	2	2	Thealeave Inhibitor, Leberzellkarzinom
ABDB	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	4	5	Regeneration, Wachstumsregulierung, Formations

AP2F	Activator protein 2	5	5	Entwicklung des Kraniaum & Extremitäten/ Embryogenese
BRNF	Brn POU domain factors	1	1	Proliferation & Differenzierung des Ske- letts / retinaler Ganglienzellen
CEBP	Ccaat/Enhancer Binding Pro- tein	2	2	Proliferation & Differenzierung
CREB	cAMP-responsive element binding proteins	8	4	Zellproliferation & Leukozytogenese
CTCF	CTCF and Boris gene family	12	13	Unterschiedliche Zelluläre Prozesse
DLXF	Diastal-less homeodomain transcription factors	2	2	Cephale Differenzierung in Neuronen
DMRT	DM domain-containing tran- scription factors	1	2	Sexualentwicklung und Evolution
E2FF	E2F-myc activator/ cell cy- cle regulator	12	13	Zellexpansionskontrolle, kardiale Ent- wicklung, Neurogenese
EBOX	E-Box binding factor	5	4	Myoblastendifferenzierung, Expression von ER-Chaperonen
EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C&related factors	26	25	Zellwachstum, Migration, ERK1/2 Phosphorylierung, Überexpression in Tumorzellen, Alzheimers Demenz
ETSF	Human & murine ETS1 fac- tors	26	15	Wichtige Rolle während Inflammation , Mucushyperproduktion in COPD, Diffe- renzierung in Prostata -CA
FHKD	Fork Head domain factors	7	7	Nachweislich in Rhabdomyosarkom, Rolle bei Aquaporinen
GATA	GATA binding factors	4	2	Hämatopoese, Endometriumdifferen- zierung
GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA bind- ing domain	4	6	Syncytiotrophoblastbildung
GLIF	GLI zinc finger family	7	4	Embryonale, neuronale Entwicklung, Os- teoblastdifferenzierung
HAML	Human acute myelogenous leukemia factors	2	2	Osteoblastendifferenzierung
HAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	7	5	Hämatopoese und Kardiogenese
HASF	HIF-1 ancillary sequence fami- ly	3	1	Effluxpumpfunktion
HBOX	Homeobox transcription factor	3	3	Entwicklung und Differenzierung in Neu- ronen

HDBP	Huntington`s disease gene regulatory region	1	5	Regulation essentieller Zellprozesse
HICF	Krueppel-likeC2H2 zinc finger factors hypermethylated in cancer	2	2	Transkriptionsunterdrückung
HOMF	Homeodomain transcripton factors	7	13	Frühe Embryogenese
HOXC	HOX-PBX complexes	1	1	Bildung & Differenzierung während der Embryogenese, Differenzierung von Neuroblastomen
HOXF	Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A,B,C,D	8	7	Axonproliferation, Pharyngealentwicklung
INSM	Insulinoma associated factors	5	5	Embryonale Differenzierung, Neuroendokrine Entwicklung
IRFF	Interferon regulatory factors	3	6	Regulation von Typ I Interferonen
KLFS	Krueppel like transcription factor	23	12	Zellwachstum, Differenzierung ZNS Transformation Anti& Proliferation in Krebszellen, Embryonale Entwicklung
LHXF	Lim homeodomain factors	3	3	Entwicklung der Neuroglia, Migration
MAZF	Myc associated zinc fingers	4	7	Retinale & pituitare Entwicklung, Regulation von Neuroglia, Muskelentwicklung
MEF3	MEF3 binding sites	4	1	Muskelentwicklung, Myogenese
MOKF	Mouse Krueppel factor	4	2	Retinale Entwicklung
MYBL	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	9	8	Hämoglobinproduktion
MYOD	Myoblast determining factors	5	4	Myogenese
MZF1	Myeloid zinc finger1 factors		1	Zellwachstum, Krebsentwicklung
NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	7	10	Proinflammatorische Antwort während Infektionen, essentiell für Tumor progression
NGRE	Glucocorticoid response elements	4	5	Glukokortikoideffekt
NKX1	NK1 homobox transcription factors	2	2	Homeobox Gene, Neurogenese
NKX6	NK6 homeobox transcription factors	3	5	Homeobox Gene, β -Zellproliferation
NOLF	Neuron-specific olfactory fac-	3	3	Adipozyten, Osteoblasten, retinale Ent-

	tor			wicklung, B-Zell Differenzierung
NR2F	Nuclear receptor subfamily2 factors	1	1	Neuronale / Hippokampale Differenzierung
PAX3	PAX-3 binding sites	2	1	Neuronale Differenzierung, Melanozyten Entwicklung
PAX5	PAX-5 B-cell-specific activator protein	7	8	Krebsentwicklung, Gastrische B-Zell entwicklung, Lymphome, Leukämie
PAX6	PAX-4/PAX-6 paired domain sites	2	2	Neurogenese, Retinogenese, Regulation Differenzierung des Hippokampus
PBXC	PBX-1MEIS1 complexes	2	1	Tumorgenese
PCBE	PREB core-binding element	1	1	Humane Entwicklung, Pankreas
PDX1	Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	2	2	Pankreas und B-Zell Differenzierung
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	14	11	Tumorwachstum/Entwicklung
V\$RUSH	SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DANN binding motif	1	2	Tumore des Magens
RXRF	RXR heterodimer binding sites, human Retinoid X receptor	12	15	Fundamentale Biologische, Zelluläre, Differenzierungsprozesse
SATB	Special AT-rich sequence binding protein	1	1	Homeobox, Regulation von Stammzellen
SORY	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	8	7	Pituitare Adenome
SP1F	GC-Box factors SP1/GC	21	27	Modulator von Zellwachstum, Apoptose, Immunantwort etc.
SPZI	Testis-specific bHLH-Zip transcription	5	2	Zellproliferationsregulator, Spermatogenese
STAT	Signal transducer and activator of transcription	9	9	Organogenese
XBBF	X-box binding factors	4	5	T-Zell Regulation
ZBPF	Zinc binding protein factors	31	16	Modulator von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose
ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	13	13	Tumorentwicklung, Chondrozytendifferenzierung

3.2.2.2 Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren für Flotillin-2

Tab. 18: Auflistung potentieller humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-2

Matrixfamilie	Detail Familien Information	Anzahl Treffer murin	Anzahl Treffer human	Funktion (von MatInspector)
INRE	Core promotor initiator elements	4	1	Repressor von SOS Regulierung in Bacillus subtilis
TF2B	RNA polymerase II transcription factor IIB	1	2	Expression begünstigt Überleben
ABDB	Abdominal-B type homeodomain transcription factor	7	6	Regeneration, Wachstumsregulierung und- differenzierung
AP1R	MAF and AP1 related factors	10	4	B-Zell spez. Transkriptionsrepressor
AP2F	Activator protein 2	3	8	Differenzierungsrepressor, Entwicklung des Kraniaum & Extremitäten/ Embryogenese
ATBF	AT-binding transcriptin factor	1	4	Zellwachstumsinhibitor & maligne Transformation zum HCC
BARB	Barbiturate-inducible element box from pro+eukaryotic genes	1	1	Interaktive CytochromP450 Enzyme, α -1 Glycoprotein Genregulator
BCL6	POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	4	4	Verhindert die Entwicklung von B-Zellen, Protoonkogenen, Geschlechtsdifferenzierung, B-Zell- Lymphomen
BRNF	Bm POU domain factor	9	11	Ganglienzell Differenzierung, Neurogenese, Osteoclastogenese
CARE	Calcium –response elements	1	1	Regulierung von p53 Signalkaskaden, Wachstumsförderung
CDXF	Vertebrate caudal related homeodomain protein	4	3	Embryonale Entwicklung, Regulierung von Proliferation & Differenzierung
CEBP	Ccaat/Enhancer Binding Protein	5	6	Proliferation & Differenzierung
CREB	cAMP-responsive element binding proteins	3	7	Zellproliferation, Leukogenese
CSEN	Calsenilin, presenilin binding protein, EF hand transcription factor	3	1	Transkriptionsrepressor
CTCF	CTCF and BORIS gene family	11	11	Unterschiedliche Zelluläre Prozesse
DLXF	Distal-less homeodomain transcription factors	4	7	Plazentawachstum, Großhirnentwicklung, Neurogenese

DMRT	DM domain-containing transcription factors	13	1	Sexualentwicklung und Evolution
E2FF	E2F-myc activator/ cell cycle regulator	14	5	Zellexpansions-Kontrolle; T-Zelle, cardiale Entwicklung, Neurogenese
EBOX	Ebox bindin factor	4	3	Myoblastendifferenzierung, Expression von ER-Chaperonen
EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C&related factors	4	6	Zellwachstum, Migration, ERK1/2 Aktivierung, Überexpression in Tumoren, AD
ETSF	Human & murine ETS1 factors	16	9	Rolle während Inflammation, Mucus hyperproduction bei COPD, Differenzierung in Prostata-CA
EVI1	EVI1-myeloid transforming protein	10	9	Leukogenese, beeinflusst (MDS & AML) Leukemie
FKHD	Fork Head domain factors	7	7	Rolle in Rhabdomyosarkomen Aquaporinen
GATA	GATA binding factors	11	6	Hämatopoese, Endometriumdifferenzierung
GCMF	Chorion-specific transcription factors	6	8	Syncytiotrophoblastformation
GLIF	GLI zinc finger family	2	4	Embryonale, neuronale Entwicklung, Osteoblastendifferenzierung
HAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	9	3	Hämatopoese und Kardiogenese
HBOX	Homeobox transcription factors	7	14	Entwicklung und Differenzierung in Neuronen
HDBP	Huntington`s disease gene regulatory region	2	2	Regulation essentieller Zellprozesse
HICF	Krueppel-likeC2H2 zinc finger factors hypermethylated in cancer	5	3	Transkriptionaler Repressor
HOMF	Homeodomain transcription factors	15	13	Frühe Embryogenese, Entwicklung des Vestibularorgans
HOXF	Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A,B,C,D	9	22	Axonproliferation, Entwicklung der Pharyngealbögen
INSM	Insulinoma associated factors	2	1	Embryonale Differenzierung, Neuroendokrine Entwicklung
IRFF	Interferon regulatory factors	2	1	Regulierung von Typ1 Interferonen
KLFS	Krueppel like transcrption	13	15	Modulator des Zellwachstums, Diffe-

	factors			renzierung ZNS Transformation Anti-& Proliferation in Krebs-, Embryonale Entwicklung
LHXF	Lim homrodomain factors	6	20	Entwicklung der Neuroglia, Regulator Migration
MAZF	Myc associated zinc fingers	4	2	Retinale & pituitare Entwicklung, Regulation von Neuroglia, CN8 Expression & Differenzierung, Muskelentwicklung
MOKF	Mouse Krueppel like factor	5	2	Retinale Entwicklung
MYBL	Cellular and viral Myb-like transcriptional regulators	11	5	Hämoglobinproduktion
MYOD	Myoblast determining factors	7	6	Myogenese
MZF1	Myeloid zinc finger 1 factors	1	1	Zellproliferation, Krebsentwicklung
NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	2	4	Proinflammatorische Antwort, Kontrolle der Immunantwort während Infektionen, essentiell für die Tumorprogression
NKX1	NK1 homobox transcription factors	2	3	Homeobox Gene, Neurogenese
NKX6	NK6 homeobox transcription factors	5	6	Homeobox Gene, β -Zellproliferation
NOLF	Neuron-specific olfactory factor	3	3	Adipozyten, Osteoblasten, retinal Entwicklung, B-Zell-Differenzierung
NR2F	Nuclear receptor subfamily2 factors	9	6	Neuronale / Hippokampale Differenzierung
PAX3	PAX-3 binding sites	2	1	Neuronale Differenzierung, Melanozyten Entwicklung
PAX5	PAX-5 B-cell-specific activator protein	9	4	Krebszellentwicklung, gastrische B-Zellentwicklung, Rolle in Lymphomen, Leukämia
ePAX6	PAX-4/PAX-6 paired domain sites	3	4	Neurogenese, Retinogenese, Regulation Differenzierung des Hippokampus
PBXC	PBX1-MEIS1 complexes	3	1	Tumorgenese
PCBE	PREB core-binding element	1	1	Humane Entwicklung, Pankreas
PDX1	Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	4	7	Pankreas und B-Zell Differenzierung
PLAG	Pleomorphic adenoma gene	15	7	Tumorstadium/Entwicklung
RUSH	SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING fin-	3	2	Rolle bei Magentumoren

	ger DNA binding motif			
RXR	RXR heterodimer binding sites, human Retinoid X receptor	6	11	Fundamentale Biologische, Zelluläre, Differenzierungsprozesse
SORY	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	19	11	Hypophysenadenom
SP1	GC-Box factors SP1/GC	9	9	Modulator von Zellwachstum, Apoptose, Immunantwort etc.
STAT	Signal transducer and activator of transcription	12	8	Organogenese
XBBF	X-box binding factors	12	8	T-Zell Regulierung
ZBPF	Zinc binding protein factors	6	6	Modulator von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose
ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	10	8	Tumorentwicklung, Chondrozytendifferenzierung

3.2.2.3 Potentielle humane/murine Transkriptionsfaktoren der Flotilline

Tab. 19: Auflistung potentieller humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1 & 2

Matrix Familie	Detail Familien Information	Funktion (von MatInspector)
TF2B	RNA Polymerase II transcription factor IIB	Thealeave Inhibitor, Leberzell-CA
ABDB	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	Regeneration, Wachstumsregulierung und Entwicklung
AP2F	Activator protein 2	Entwicklung des Kranium & Extremitäten/ Embryogenese
BRNF	Brn POU domain factors	Proliferation & Differenzierung des Skeletts, retinaler Ganglienzellen
CEBP	Ccaat/Enhancer Binding Protein	Proliferation & Differenzierung
CREB	cAMP-responsive element binding proteins	Zellproliferation & Leukozytogenese
CTCF	CTCF and Boris gene family	Unterschiedliche Zelluläre Prozesse
DLXF	Diastal-less homeodomain transcription factors	Cephale Differenzierung in Neuronen
DMRT	DM domain-containing transcription factors	Sexualentwicklung und Evolution
E2FF	E2F-myc activator/ cell cycle regulator	Zellexpansions-Kontrolle; T-Zelle, kardiale Entwicklung, Neuroge-

		nese
EBOX	E-Box binding factor	Myoblastendifferenzierung, Expression von ER-Chaperonen
EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C&related factors	Zellwachstum, Migration, ERK1/2 Kontrolle, Überexpression in Tumoren, AD
ETSF	Human & murine ETS1 factors	Rolle während Inflammation, Mucus hyperproduction bei COPD, Differenzierung in Prostata-CA
FHKD	Fork Head domain factors	Rhabdomyosarkom, Aquaporine
GATA	GATA binding factors	Hämatopoese, Endometriumdifferenzierung
GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	Syncytiotrophoblastformation
GLIF	GLI zinc finger family	Embryonale, Neuronale Entwicklung, Osteoblasten Differenzierung
HAND	Twist subfamily of class B I bHLH transcription factors	Hämatopoese und Kardiogenese
HDBP	Huntington`s disease gene regulatory region	Regulation essentieller Zellprozesse
HBOX	Homeobox transcription factor	Entwicklung und Differenzierung in Neuronen
HICF	Krueppel-likeC2H2 zinc finger factors hypermethylated in cancer	Transkriptionsrepressor
HOMF	Homeodomain transcripton factors	Frühe Embryogenese
HOXF	Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A,B,C,D	Axonproliferation, Entwicklung der Pharyngealbögen
INSM	Insulinoma associated factors	Embryonale Differenzierung, Neuroendokrine Entwicklung
IRFF	Interferon regulatory factors	Regulation von Typ I Interferon
KLFS	Krueppel like transcription factor	Modulator Zellwachstum, Differenzierung CNS Transformation Anti-& Proproliferation in Krebszellen, Embryonale Entwicklung, Reguliert Typ-1 Interferone
LHXF	Lim homeodomain factors	Entwicklung der Neuroglia
MAZF	Myc associated zinc fingers	Retinale & pituitare Entwicklung, Regulation von Neuroglia,CD8 Expression & Differenzierung, Muskelentwicklung
MOKF	Mouse Krueppel factor	Retinale Entwicklung
MYBL	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	Hämoglobinproduktion
MYOD	Myoblast determining factors	Myogenese
MZF1	Myeloid zinc finger1 factors	Zellproliferation, Krebszellentwicklung

NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	Proinflammatorische Antwort, Kontrolle der Immunantwort während Infektionen, essentiell für die Tumormprogression
NKX1	NK1 homobox transcription factors	Homeobox Gene, Neurogenese
NKX6	NK6 homeobox transcription factors	Homeobox Gene, β -Zellproliferation
NOLF	Neuron-specific olfactory factor	Adipozyten, Osteoblasten, retinal Entwicklung, B-Zell Differenzierung
NR2F	Nuclear receptor subfamily2 factors	Neuronale / Hippokampale Differenzierung
PAX3	PAX-3 binding sites	Neuronale Differenzierung, Melanozyten Entwicklung
PAX5	PAX5 B-cell-specific activator protein	Krebszellentwicklung gastrische B-Zell Entwicklung, Lymphome, Leukämie
PAX6	PAX-4/PAX-6 paired domain sites	Neurogenese, Retinogenese, Regulation/ Differenzierung des Hippokampus
PBXC	PBX-1-MEIS1 complexes	Tumorgenese
PCBE	PREB core-binding element	Humane Entwicklung, Pankreasdifferenzierung
PDX1	Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	Pankreas und B-Zell-Diferenzierung
PLAG	Pleomorphic adenoma gene	Tumorwachstum/Entwicklung
RUSH	SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif	Magenkarzinom
RXRF	RXR heterodimer binding sites, human Retinoid X receptor	Fundamentale Biologische, Zelluläre, Differeziierungsprozesse
SORY	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	Hypophysenadenom
SP1F	GC-Box factors SP1/GC	Modulator von Zellwachstum, Apoptose, Immunantwort etc.
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Organogenese
XBBF	X-box binding factors	T-Zell Regulierung
ZBPF	Zinc binding protein factors	Modulator von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose
ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	Tumorentwicklung, Chondrozytendifferenzierung

3.3 Promotoraktivität der Flotilline-1/-2

Die unterschiedlichen Promotorkonstrukte von Flotillin-1 oder Flotillin-2 wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der leere Kontrollvektor pGL3-Basic Vektor transfiziert.

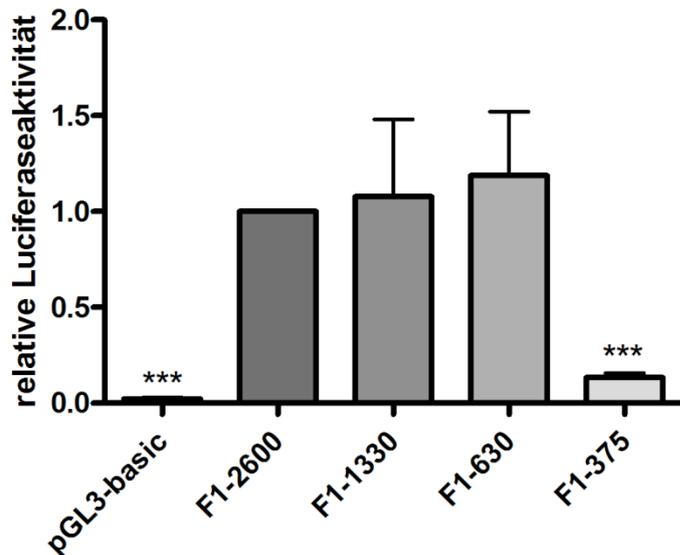


Abb. 7: Flotillin-1 Promotorbasalaktivität in serumfreiem Medium

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F1-2600 ist das Referenzkonstrukt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Zellen sind 48h in Hungermedium, DMEM -/- inkubiert worden. (***) $p \leq 0,001$. Anzahl der Versuche $n > 3$. Ernte 48h nach Transfektion.

Die Abb. 7 zeigt die Mittelwerte der Aktivitäten der Flotillin-1 Promotorkonstrukte (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und den Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). Insgesamt wurde 48 h in Hungermedium, DMEM-/- (0% FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mit Hilfe des Tecan Readers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte Promoterkonstrukt F1-2600 auf 1 gesetzt. Der Kontrollvektor ohne spezifisches Promotorkonstrukt hat im Versuch die geringste Gesamtaktivität.

Deutlich zu erkennen ist, dass sich die relative Luciferaseaktivität der Konstrukte F1-630, F1-1330 und F1-2600 auf einem gleichen Niveau befindet. Das Konstrukt F1-375 hat im Vergleich zu F1-2600 eine signifikant geringere Aktivität von $p < 0,001$. Da das Luciferaseaktivitätsniveau des Konstruktes F1-375 im Vergleich zu den anderen Konstrukten signifikant vermindert ist, vermute ich, dass sich zwischen der Base F1-375 und F1-630 eine wichtige genregulatorische Sequenz befindet, die ein Mindestaktivitätsniveau ermöglicht.

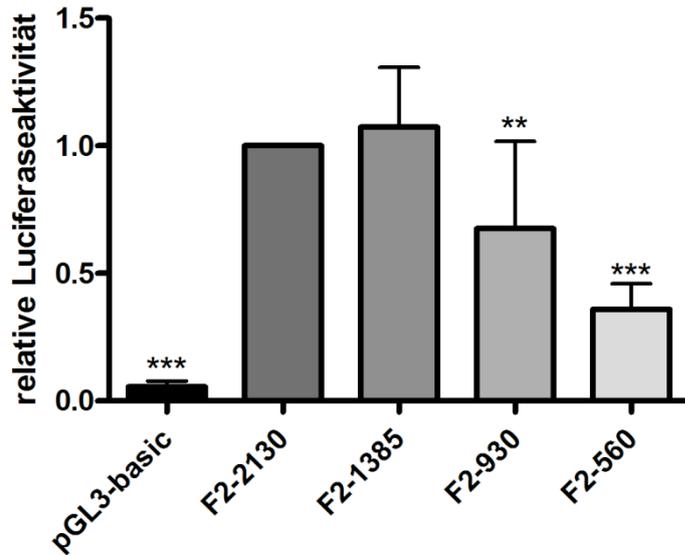


Abb. 8: Flotillin-2 Promotorbasalaktivität in serumfreiem Medium

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F2-2130 ist das Referenzkonstrukt. Die Zellen sind 48h in Hungermedium, DMEM -/- inkubiert worden. (***) $p \leq 0,001$, (*) $p \leq 0,05$. Anzahl der Versuche $n > 3$. Ernte 48h nach Transfektion.

In der Abb. 8 wurde die Flotillin-2 Promotorregion in Hungermedium/ serumfreiem Medium untersucht. Dafür wurden die Promotorkonstrukte (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und der Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor) für 48 h in Hungermedium, mit DMEM-/- (0% FCS) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mit Hilfe des Tecan Readers ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte Promotorkonstrukt F2-2130 auf 1 gesetzt.

Insgesamt betrachtet hat das Konstrukt F2-1385 das höchste relative Luciferaseaktivitätsniveau, wobei im Vergleich zum Konstrukt F2-2130 kein signifikanter Unterschied bestand. Das kleinste Konstrukt F2-560 zeigt eine signifikant geringere relative Luciferaseaktivität.

Die Luciferaseaktivität des Konstrukts F2-930 ist signifikant geringer mit ($p < 0,05$) als F2-2130. Der Kontrollvektor hat im Versuch die geringste Luciferaseaktivität.

In der Folge kann man annehmen, dass sich in dem Bereich zwischen der Base 560 und den längeren Konstrukten mit den höchsten relativen Luciferaseaktivitäten eine regulatorische Region befindet, die zu einer erhöhten Promotoraktivität führt. Die Region scheint eine entsprechend hohe Basalaktivität zu ermöglichen. Die deutlich verminderte Basalaktivität des Konstruktes F2-560 deutet darauf hin, dass diesem Konstrukt bereits essentielle Elemente der Genregulation fehlen und sich diese möglicherweise weiter upstream befinden.

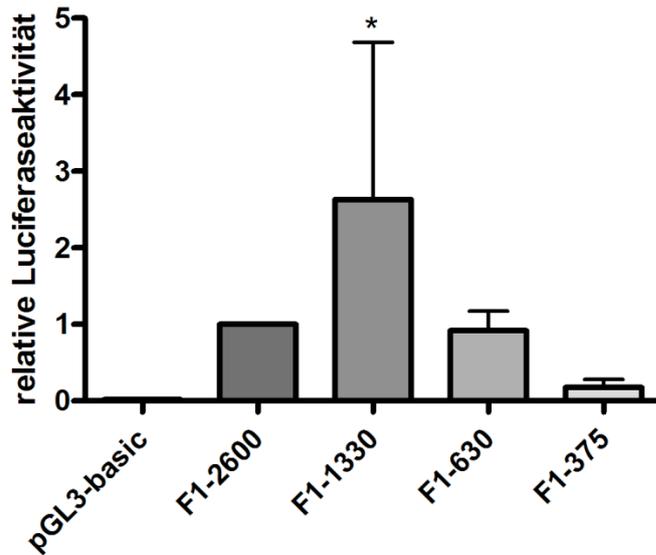


Abb. 9: Promotoraktivität der Flotillin-1 bei FCS 10%

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F1-2600 ist das Referenzkonstrukt. Die Zellen sind 48h in DMEM +/- inkubiert worden. Anzahl der Versuche ist gleich n= >3. Ernte 48h nach Transfektion.

Die Abb. 9 veranschaulicht graphisch die Mittelwerte der Promotoraktivitäten von Flotillin-1. Die Promotorkonstrukte (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und der Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor) wurden 48h mit DMEM+/+ (10% FCS) stimuliert. Nachfolgend wurden die Zellen 48h nach Transfektion geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla und Fireflyaktivität mit Hilfe des Tecan Readers gemessen. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte Promotorkonstrukt F1-2600 auf 1 gesetzt.

Das Konstrukt F1-1330 weist im Vergleich zum Konstrukt F1-2600 die höchste, signifikante relative Luciferaseaktivität auf. Dabei ist die Standardabweichung des Konstruktes F1-1330 jedoch sehr hoch. Die relative Luciferaseaktivität der beiden Konstrukte F1-630 und F1-2600 unterscheiden sich hierbei nicht.

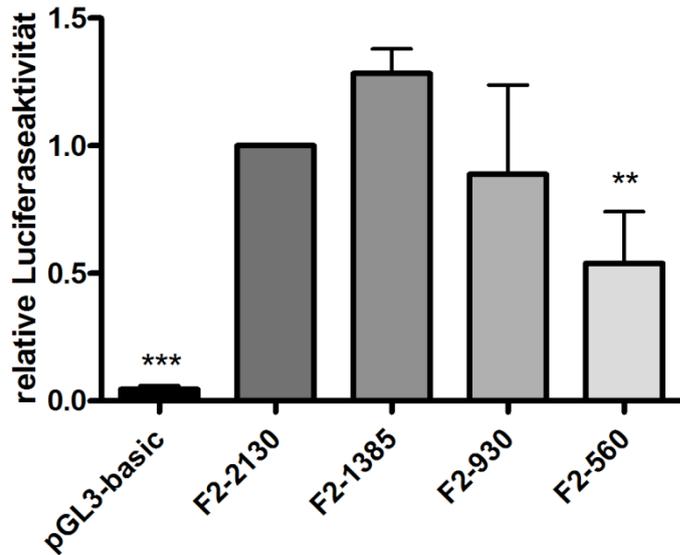


Abb. 10: Promotoraktivität der Flotillin-2 bei FCS 10%

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F2-2130 ist das Referenzkonstrukt. Die Konstrukte wurden 48h in DMEM +/- inkubiert. Die zwei Sterne über dem Konstrukt F2-560 zeigen das Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$. Anzahl der Versuche ist gleich $n = >3$. Ernte 48h nach Transfektion.

Die Abb. 10 zeigt die Promotoraktivität der Flotillin-2 Promotorkonstrukte (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und des Kontrollvektors (pGL3-Basic Vektor). Die transfizierten Zellen wurden für 48 h mit DMEM+/+ (10% FCS) stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mittels Tecan Readers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte Promotorkonstrukt F2-2130 auf 1 gesetzt.

Die Konstrukte F2-2130, F2-1385 und F2-930 weisen die höchsten relativen Luciferaseaktivitäten auf. Das Konstrukt F2-560 hat im Vergleich zu F2-2130 eine signifikant geringere relative Luciferaseaktivität ($p < 0,01$). Anhand dieser unterschiedlichen Luciferaseaktivitätsniveaus kann man davon ausgehen, dass sich zwischen F2-560 und den Konstrukten mit den höchsten relativen Luciferaseaktivitäten eine besonders wichtige genregulatorische Einheit befindet die eine erhöhte Promotoraktivität ermöglicht. Die im Vergleich wesentlich verminderte relative Luciferaseaktivität des Konstruktes F2-560 zeigt, dass diesem Konstrukt bereits wesentliche Steuerelemente der Genregulation fehlen.

3.4 Promotoraktivität nach EGF Stimulation

Amadii haben nachweisen können, dass Flotillin-1 ein starker Regulator am EGFR ist, der die weiter distal/downstream gelegenen ERK Signalkaskaden aktivieren kann. In der Signalkaskade verbindet sich Flotillin-1 zu einem Komplex mit EGFR, und interagiert mit CRAF, MEK1, ERK und KSR1 [32]. Aufgrund der essentiellen Rolle von Flotillin-1 in der EGFR-Signalkaskade habe ich analysiert, ob im Umkehrschluss die Expression der Flotilline durch äußere Einflußnahme mittels EGF Rezeptoraktivierung reguliert werden könnte.

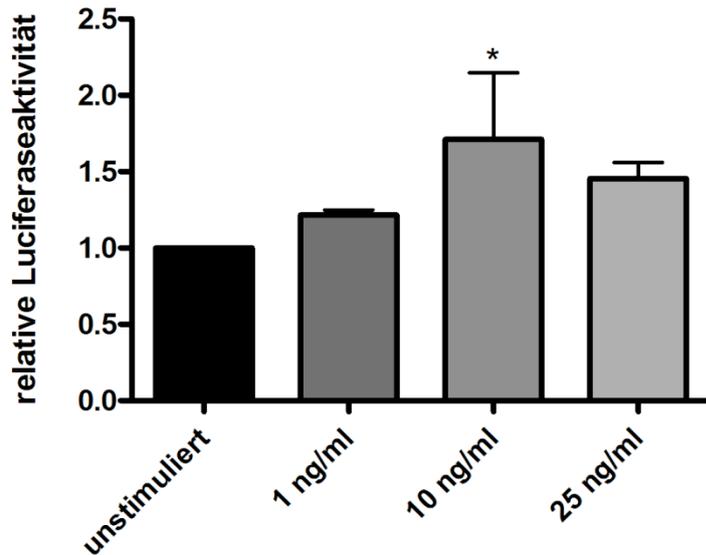


Abb. 11: Flotillin-1 Promotoraktivität nach Stimulation mit unterschiedl. EGF Konz.

HeLa-Zellen mit transfiziertem Promotorkonstrukt F1-2600, stimuliert mit verschiedenen EGF-Konzentrationen (unstimuliert, 1ng/ml, 10ng/ml, 25ng/ml). Das Unstimulierte, ist das Referenzkonstrukt. Die Zellen sind 24h in EGF oder 48h unstimuliert inkubiert worden. (*) $p \leq 0,05$. Anzahl der Versuche $n = >3$. Ernte nach 24h Stimulation bzw. 48h nach Transfektion.

Die Abb. 11 stellt die Unterschiede des größten Promotorkonstruktes, F1-2600, stimuliert mit unterschiedlichen EGF Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Zellen dar. Die Promotorkonstrukte wurden für 24 h mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml EGF stimuliert, bzw. 24 h in unstimuliertem Zustand inkubiert. In Folge wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla und Fireflyaktivität mit Hilfe des Luminometers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das unstimulierte Promotorkonstrukt auf 1 gesetzt. Deutlich zu erkennen ist, dass der Ansatz, welcher mit einer EGF- Konzentration von 10 ng/ml stimuliert wurde, im Vergleich zu den anderen Konzentrationen die höchste relative Luciferaseaktivität besitzt. Im einseitigen ANOVA zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Man darf deshalb davon ausgehen dass, das Optimum für eine Stimulation mit EGF bei einer Konzentration von 10 ng/ml liegt, woraufhin für weitere Experimente diese Konzentration verwendet wurde.

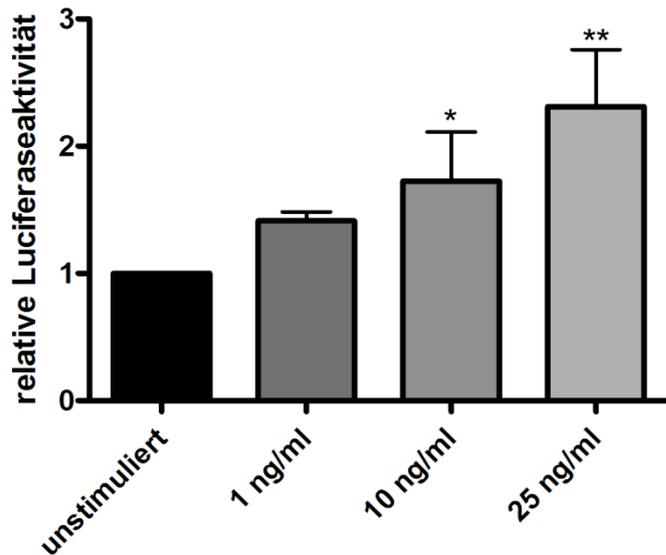


Abb. 12: Flotillin-2 Promotoraktivität nach Stimulation mit unterschiedl. EGF Konz.

HeLa-Zellen mit transfiziertem Promotorkonstrukt F2-1385, stimuliert mit verschiedenen EGF-Konzentrationen (unstimuliert, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml) bzw. unstimuliert. Das unstimulierte ist das Referenzkonstrukt. Die Zellen sind 24 h in EGF oder 48 h unstimuliert inkubiert worden. (**) $p < 0,01$. Anzahl der Versuche $n > 3$. Ernte nach 24 h Stimulation bzw. 48 h nach Transfektion.

In Abb. 12 ist das Promotorkonstrukt F2-1385, stimuliert mit unterschiedlichen EGF Konzentrationen im Vergleich zum Unstimulierten dargestellt. Bei diesem Experiment ist die Entscheidung auf das Konstrukt F2-1385 gefallen. Zwar ist es nicht das längste Konstrukt, dennoch hat es in den vorausgegangenen Experimenten die höchste Aktivität gezeigt. Bei den Messungen wurden die mit Promotorkonstrukten transfizierten Zellen für 24 h mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml EGF stimuliert bzw. für 24 h unstimuliert inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mit Hilfe des Tecan Readers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das Unstimulierte Promotorkonstrukt auf 1 gesetzt.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen, die mit einer EGF Konzentration von 10 ng/ml stimuliert wurden, die zweithöchste relative Luciferaseaktivität ($p < 0,05$) im Vergleich zu den anderen Konzentrationen besitzen, wobei sich für eine Konzentration von 25 ng/ml eine deutlich geringere Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,01$) zeigt. In den darauffolgenden Experimenten wurde aufgrund der Praktikabilität und insbesondere im Hinblick eines Vergleichs mit Flotillin-1 eine EGF Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

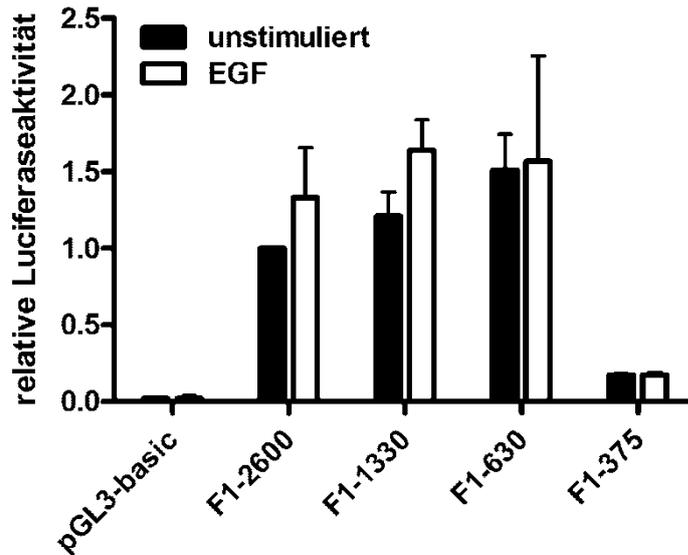


Abb. 13: EGF Stimulation vs. unstimulierte Flotillin-1 Promotorregion

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F1-2600 ist das Referenzkonstrukt. Die Zellen sind 24 h in EGF oder 48 h unstimuliert inkubiert worden. Anzahl der Versuche $n > 3$. Ernte nach 24 h Stimulation bzw. 48 h nach Transfektion.

Für diesen Versuch wurden die unterschiedlichen Promotorkonstrukte von Flotillin-1 während der Stimulation mit EGF und im Vergleich mit Hungermedium auf ihre relative Luciferaseaktivität hin untersucht (Abb. 13). Die Promotorkonstrukte (F1-2600, F1-1330, F1-630, F1-375) und der Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor) wurden dafür 24 h mit 10 ng/ml EGF stimuliert, bzw. 48 h in Hungermedium, DMEM/- inkubiert. Die Zellernte erfolgte nach 48 h. Anschließend wurde die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mit Hilfe des Luminometers durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte unstimulierte Promotorkonstrukt F1-2600 auf 1 gesetzt.

Zu erkennen ist, dass es bei der Stimulation insbesondere der Promotorregionen (F1-630, F1-1330, F1-2600) mit EGF zu einer Zunahme des Promotoraktivitätsniveaus kommt, dessen Unterschied statistisch gesehen jedoch nicht signifikant ist. Die Ergebnisse zeigen auch hier wie bei den vorigen Ergebnissen im Vergleich zum kleinsten Konstrukt F1-375 einen Unterschied auf.

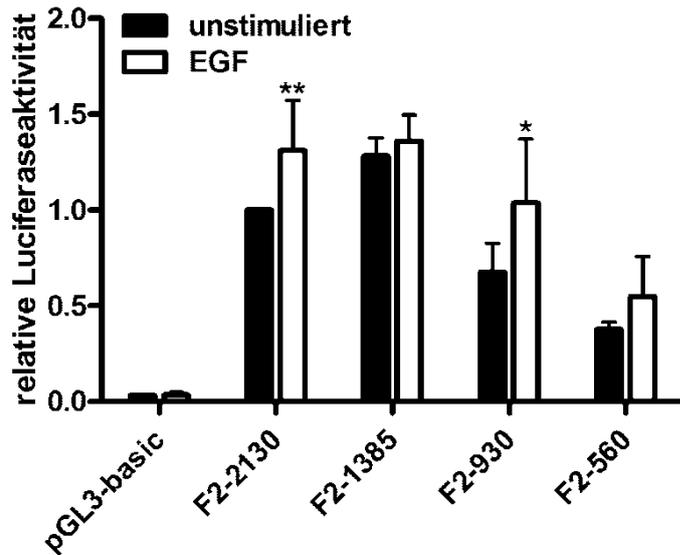


Abb. 14: EGF Stimulation vs. unstimulierte Flotillin-2 Promotorregion

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und dem Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor). F2-2130 ist das Referenzkonstrukt. Die Konstrukte sind 24h in EGF bzw. 48h unstimuliert inkubiert worden. Die zwei Sterne über dem Konstrukt F2-2130/EGF zeigt das Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$. Der Stern über dem Konstrukt F2-930/EGF zeigt das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten stehen im Vergleich zu F2-2130 unstimuliert. Anzahl der Versuche ist gleich $n > 3$. Ernte nach 24h Stimulation bzw. 48h nach Transfektion.

In Abb. 14 sind die Flotillin-2 Promotorkonstrukte mit EGF stimuliert und unstimuliert aufgetragen. Die Promotorkonstrukte (F2-2130, F2-1385, F2-930, F2-560) und der Kontrollvektor (pGL3-Basic Vektor) wurden dafür 24 h mit 10 ng/ml EGF stimuliert bzw. 48 h unstimuliert inkubiert. Alle Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität mit Hilfe des Tecan Readers ermittelt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das größte unstimulierte Promotorkonstrukt F2-2130 auf 1 gesetzt.

Es zeigt sich, dass die mit EGF stimulierten Konstrukte F2-2130, F2-1385 und F2-930 die höchsten relativen Luciferaseaktivitäten mit $p < 0,01$ und $p < 0,05$ aufweisen. Das Konstrukt F2-560 zeigt eine geringere relative Luciferaseaktivität. Ebenfalls bei diesem Experiment deutlich zu erkennen ist, dass die Stimulation der Zellen mittels EGF, gegenüber den unstimulierten Zellen zur Promotoraktivitätszunahme führt. Bei den Konstrukten F2-2130 und F2-930 ist dieser Unterschied statistisch signifikant.

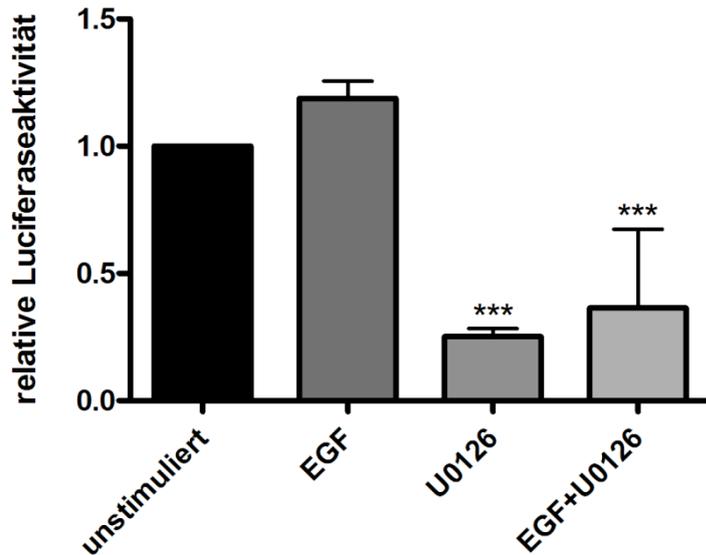


Abb. 15: Stimulation der Flotillin-1 Promoterregion mit EGF/ Inhibition mit U0126

HeLa Zellen mit transfiziertem Promotorkonstrukt F1-2600 stimuliert mit EGF, inhibiert mit U0126 und mit beiden zur selben Zeit. Das unstimulierte ist jeweils das Referenzkonstrukt. Die drei Sterne (***) über dem Konstrukt U0126 zeigen ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$. Ebenfalls zeigen die drei Sterne (***) über dem Konstrukt EGF+U0126 ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$. Anzahl der Versuche ist gleich $n = >3$. Ernte nach 24 h Stimulation bzw. 48 h nach Transfektion.

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der Promotoraktivität durch EGF auf die Aktivierung der MAPK ERK zurückgeführt werden kann wurde ein für MAPK spezifischer Inhibitor von MEK verwendet, welcher sich in der Signalkaskade proximal/upstream von ERK befindet und somit essentiell für dessen Aktivierung ist. Ziel war es, die unterschiedlichen Effekte von Stimulatoren und Inhibitoren auf das Promotorkonstrukt zu untersuchen. Es sollte verdeutlicht werden, wie stark der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die DNA-Sequenz im Vergleich zueinander, aber auch im Vergleich zu potentiellen Konkurrenten ist. Die Promotorkonstrukte wurden für 24 h mit 10 ng/ml EGF, 10 μ M U0126, oder mit 10 ng/ml EGF+ 10 μ M U0126 stimuliert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivitätsmessung mit Hilfe des Tecan Readers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das unstimulierte Promotorkonstrukt auf 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 gezeigt.

Man erkennt deutlich, dass nach Gabe von U0126 allein oder in Kombination mit EGF nur eine geringe relative Luciferaseaktivität erreicht wird. Damit liegen beide Werte signifikant unterhalb der Aktivität der unstimulierten Zellen ($p \leq 0,001$). Auf der anderen Seite bewirkte die Stimulation mit EGF wie auch in vorangegangenen Experimenten nach 24 h einen leichten, jedoch bei der Messung nicht signifikanten Anstieg des Promotoraktivitätsniveaus. Interessant sind an dieser Stelle die beiden supprimierten Konstrukte. Der Effekt der Inhibition mittels U0126 verdeutlicht, dass die basale Promotoraktivität von MEK und somit von ERK abhängt, die Inkubation der Zellen mit dem MEK Inhibitor UO126 nicht nur das ansonsten starke EGF-induzierte Signal unterdrücken, sondern auch in signifikanter Weise die basale Promotoraktivität herunterregulieren kann. Daraus lässt sich folgen, dass bereits die basale Expression der Flotilline abhängig von

MAPK ERK ist. Diesen Effekt konnte man insbesondere für Flotillin-1 beobachten, welches nachweislich selbst die MAPK-Signalkaskade beeinflusst[32].

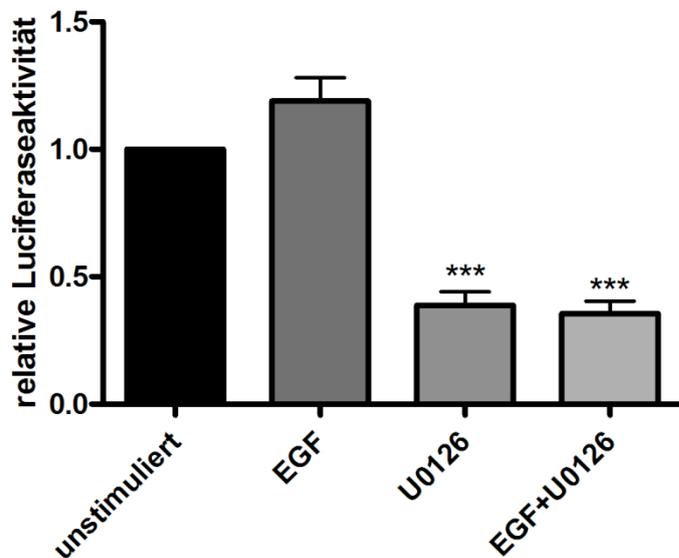


Abb. 16: Stimulation der Flotillin-2 Promotorregion mit EGF/Inhibition mit U0126

HeLa-Zellen mit transfiziertem Promotorkonstrukt F2-1385, stimuliert mit EGF, inhibiert mit U0126 und mit beiden zur selben Zeit. Das unstimulierte ist jeweils das Referenzkonstrukt. (***) $p \leq 0,001$. (***) des Konstrukt EGF+U0126 mit Signifikanzniveau ($p \leq 0,001$). Anzahl der Versuche $n > 3$. Ernte nach 24h Stimulation bzw. 48h nach Transfektion.

Die Abb. 16 zeigt die Zellen transfiziert mit dem Promotorkonstrukt F2-1385, behandelt mit EGF, U0126 oder EGF+U0126 im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Versuchsreihe wurde durchgeführt, um den Effekt mittels EGF im Vergleich zu dem Effekt des Inhibitors U0126 deutlich zu veranschaulichen. Die Promotorkonstrukte wurden für 24h mit 10 ng/ml EGF, 10 μ M U0126, oder mit 10 ng/ml EGF+ 10 μ M U0126 inkubiert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla- und Fireflyaktivität bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das Unstimulierte Promotorkonstrukt auf 1 gesetzt. Der einseitige ANOVA zeigte, dass die Konstrukte U0126 und EGF+U0126 nur eine relativ geringere Luciferaseaktivität erreichen. Beide Werte liegen mit ($p < 0,001$), signifikant unterhalb der Aktivität des unstimulierten Konstruktes. Die Stimulation mittels EGF zeigte auch hier erneut einen leichten, nicht-signifikanten Anstieg der Promotoraktivität. Nachdem hiermit ein effektiver Suppressor untersucht wurde, beschlossen wir die Auswirkungen einer Stimulation weiter zu untersuchen. Dazu wurde in weiteren Untersuchungen der EGF-unabhängige starke Stimulator der Proteinkinase C, PMA verwendet.

3.5 Promotoraktivität nach PMA Stimulation

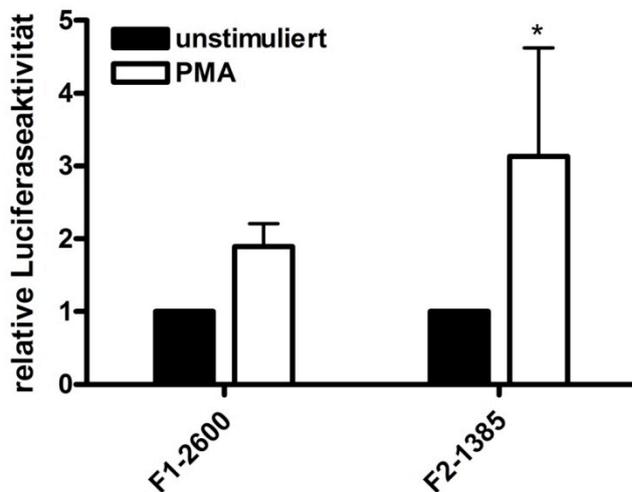


Abb.17: Stimulation mit PMA

HeLa-Zellen mit transfizierten Promotorkonstrukten F1-2600 und F2-1385 für 24h stimuliert mit PMA. Das unstimulierte Konstrukt ist jeweils das Referenzkonstrukt. Die zwei Sterne(**) über dem Konstrukt F1-2600 zeigt das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Anzahl der Versuche ist gleich $n = >3$. Ernte nach 24h Stimulation bzw. 48h nach Transfektion.

PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C, einem Mitglied der Ser/Thr-Kinasefamilie mit wichtiger Funktion während des Zellwachstums, der Proliferation und der Tumorgenese [122]. Unabhängig von der Stimulation des Rezeptors imitieren Phorbolster wie PMA den natürlichen Aktivator Diacylglycerol. Eine Aktivierung von PKC bewirkt eine weitere Aktivierung von Raf-Kinasen, und aktiviert die weiter distal gelegene ERK [123]. Die Aktivierung der Promotorkonstrukte ist in Abb. 17 dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht die Stimulation der Promotorkonstrukte F1-2600 und F2-1385, stimuliert mit PMA, im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Promotorkonstrukte wurden für 24 h mit 20 ng/ml PMA stimuliert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität der Renilla und Fireflyaktivitätsmessung mit Hilfe des Tecan Readers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der Wert für das unstimulierte Promotorkonstrukt auf 1 gesetzt.

Es zeigt sich, dass beide Konstrukte im Vergleich zum unstimulierten Konstrukt eine deutlich höhere, im Falle von F2-1385 auch signifikante ($p < 0,05$) relative Luciferaseaktivität erreichten. Schlußfolgernd deuten meine Ergebnisse darauf hin, dass PMA eine deutlich höhere Promotoraktivität der Promotorregionen beider Flotilline bewirkt, welche auf die Aktivierung von ERK1/2 zurückzuführen sind.

4 Diskussion

Flotilline nehmen eine wichtige Funktion in Signalkaskaden ein und sind eng mit malignen und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert [81, 124]. Über die transkriptionelle Aktivität, Regulation und Interaktion der Flotilline mit ihrer Umgebung ist noch vieles weiterhin unklar. In dieser Doktorarbeit wurden Promotoranalysen bezüglich der transkriptionellen Regulation von humanen und murinen Flotillinen durchgeführt. Die ausgewählten proximalen Promotorregionen wurden auf wichtige regulatorische Sequenzen hin untersucht, welche die Flotilline in ihrer Expression beeinflussen können. Ein Sequenzvergleich mit anschließendem Screening auf potentielle Transkriptionsfaktoren mit der Software MatInspector von Genomatix hat gezeigt, dass viele verschiedene potentielle Transkriptionsfaktoren an die ausgewählten Promotorsequenzen binden können. Über die in dieser Doktorarbeit präsentierten Ergebnisse hinaus ist es vorstellbar, dass sich weiter proximal oder in den gespleissten Introns der untersuchten Promotorregionen weitere regulatorische Einheiten befinden.

Um genaueres über die allgemeine Regulation der Flotilline herauszufinden, wurden allein Transkriptionsfaktoren, die einen Einfluss auf normale Gewebetypen haben, ausgesucht. Transkriptionsfaktoren, deren Einfluss bisher experimentell *in vitro* nur mit Hilfe spezieller Gewebetypen wie beispielsweise Nebenhodenzellen oder Hippokampusneuronen ermittelt werden konnten, wurden nicht weiter untersucht.

Flotilline können durch Transkriptionsfaktoren wie Egr1, SRF, RXR α , RAR α und PPAR γ reguliert werden [119]. Insbesondere wurden die Transkriptionsfaktorfamilien EGRF, ETSF und RXRF analysiert und der Einfluss verschiedener Stimuli wie EGF, Retinsäure und PMA auf die MAPK Signalkaskaden sowie Transkription untersucht [119]. Darüber hinaus konnte unsere Gruppe zeigen, dass Flotilline auch von ERK und über den Retinoid X Rezeptor beeinflusst werden können [119].

Da Flotilline eine wichtige Rolle bei der Regeneration, dem Wachstum und der Migration einnehmen, wurde insbesondere beim Promotorsequenzscreening nach potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen gesucht, die Einfluss auf eben o.g. Prozesse haben. Alle Untersuchungen wurden in HeLa-Zellen durchgeführt, da diese für Reporteranalysen geeignet sind. Die hier untersuchten Promotorkonstrukte von Flotillin-1 als auch Flotillin-2 ließen sich durch Stimulation der Zellen mit EGF, 10% FCS und PMA aktivieren. PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C Isoformen α , β I, β II, γ (Gruppe der cPKC) und δ , ϵ , η , θ (Gruppe der nPKC). EGF ist ein Wachstumsfaktor, der über den EGFR eine Vielzahl von Signalkaskaden in der Zelle aktivieren kann. EGF wurde für die hier durchgeführten Experimente ausgewählt, da Flotillin-1 ein wichtiger Regulator der EGFR-Signalkaskade ist [32].

Nach Aktivierung des EGFR bzw. der PKC kommt es zur direkten und auch indirekten Beeinflussung verschiedener Signalwege in der Zelle, die nachfolgend als mögliche transkriptionelle Regulatoren der Flotillin-Expression diskutiert werden.

4.1 Bedeutung von ERK in der Signalkaskade der Flotilline

Die MAPK Familienmitglieder ERK 1-8 werden von extrazellulär reguliert und sind Ziel von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Ionenkanälen, RTKs und Integrinen, über welche sie verschiedenartig aktiviert werden können. ERK ist deshalb von großem Interesse, da es bei Aktivierung durch Phosphorylierung als Shuttle zwischen dem Cytoplasma und dem Nucleus hin- und hertranslozieren kann und somit eine Schlüsselposition in der Signalkaskade der Flotilline einnimmt. Fukuda konnte nachweisen dass, das MEK Exportsignal an ERK im Cytoplasma gebunden die nukleäre Translokation von ERK verhindern kann [125].

Sobald ERK aktiviert wird, kommt es zur Ausbildung von Dimeren und zur Translokation in den Nucleus. Flotillin-1 beeinflusst MAPK, da es ebenfalls direkt mit dem MEK/ERK-Komplex interagieren kann [32]. Im Nucleus kann das aktivierte ERK verschiedene Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren. Ein besonders interessanter Transkriptionsfaktor ist Elk-1, der an sechs verschiedenen Stellen von ERK phosphoryliert wird. Weitere Zellzyklusmoleküle die von ERK durch Phosphorylierung aktiviert werden sind sogenannte 'early response genes'. Hierzu zählt man beispielsweise Net, SAP, c-Myc, c-Fos, Egr-1 und Cyclin-D [126-131].

Elk-1 gehört zur ETS-Transkriptionsfaktorfamilie, auch bekannt unter „E26 Transformation-specific Sequence“, und besteht aus mehreren hochkonservierten DNA Bindungsdomänen, welche an unterschiedlichen Prozessen wie Zellwachstum oder Differenzierung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen genauso wie an der Entwicklung verschiedener maligner Prozesse beteiligt sind [132, 133]. Patki konnte nachweisen, dass Elk-1 in Prostatazelltumoren mit dem Androgenrezeptor direkt interagieren kann [134].

Elk-1 bildet einen Komplex mit dem „Serum Response Factor“ (SRF) und bindet an eine 3'-DNA-Sequenz, die als „Serum Response Element“ (SRE) bezeichnet wird [135]. In der ETS-Transkriptionsfamilie gibt es Mitglieder die unterschiedliche Gene hoch-, aber auch herunterregulieren und später posttranskriptionell modifizieren können. Mittels Phosphorylierung, Sumoylierung oder Acetylierung können die ETS-Mitglieder positiv oder negativ beeinflusst werden [136-138]. SRF-Zielgene konnten bisher im Zusammenhang mit Wachstums- und Differenzierungsprozessen und Hormonsignalkaskaden nachgewiesen werden [139, 140]. Typische Elk-1/SRF -Zielgene sind Egr-1-3, das Protoonkogen c-Fos, GABPDA Regionen, die durch Glukose regulierten LXRβ Gene, verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMP) darunter auch MMP-1, MMP-3, MMP-9, welches insbesondere in Gliomen überexprimiert wird, uPa, Integrin-β3, TBP, Nur77, CHERP Gene und die AP-1 Komponente JunB [141-143].

Die Flotilline gehören ebenfalls zu den SRF-Zielgenen [119]. Durch Kotransfektion der Flotillin-Promotorkonstrukte mit einem SRF-Expressionsplasmid ließ sich die Promotoraktivität beider Flotilline im Experiment deutlich steigern. Des Weiteren führte eine Überexpression von SRF zu einer erhöhten Flotillinexpression auf mRNA und Proteinebene [119]. In dieser Doktorarbeit konnten beim Screening der Promotoren mit MatInspector von Genomatix, für die Sequenzen von Flotillin-1 und Flotillin-2 zahlreiche Transkriptionsfaktorbindestellen der ETS-Familie gefunden werden. Ein weiterer wichtiger potentieller Regulator der Flotillin-Expression, der infolge einer ERK-Aktivierung vermehrt exprimiert wird, ist der Transkriptionsfaktor Egr-1. Meine Analyse hat ergeben, dass sich in der Promotorregion der Flotilline ca. 25 potentielle murine und humane Egr1-Bindestellen befinden.

Egr-1 gehört zur Gruppe der `early growth response genes` und zur Zinkfinger-Familie der Transkriptionsfaktoren, die in vielen verschiedenen Geweben vorkommen. Egr-1 wird insbesondere im Gehirn exprimiert und kann durch bestimmte Stimuli überexprimiert werden [144, 145]. Die Egr-1 Promotorregion enthält fünf Regionen, an die mittels Elk-1/SRF Dimere gebunden werden kann und ist für die Expression von Genen verantwortlich, die wesentlich für Wachstum und Apoptose sind wie beispielsweise p53, TGFB1 und PTEN [146-149]. Darüber hinaus kann Egr-1 im Zusammenhang mit mitogenen Aktivitäten neben Proliferation und Differenzierung auch pathologische Prozesse wie Inflammation und eine Apoptose induzieren [150-153]. Insbesondere scheint Egr-1 bei der Entwicklung von Malignomen in unterschiedlichen Geweben eine wichtige Rolle zu spielen [154-156]. In Prostatakrebszellen konnte Gregg eine erhöhte Egr-1 Expression via ERK Signalkaskade mittels EGF stimulieren [157]. Roberts konnte nachweisen, dass Mutationen proximal von ERK gelegen häufig zur Ausbildung von unterschiedlichen Tumoren führen [158].

Insgesamt gibt es bislang widersprüchliche Ergebnisse zur proapoptotisch bzw. zellprotektiven Funktion von Egr-1. Höchstwahrscheinlich kommt es vielmehr auf die Zellart und die Art des Stimulus an.

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Flotilline Zielgene von Egr-1 sind. Sowohl die Promotoraktivität als auch die Flotillin mRNA und Proteinmenge ließen sich durch Überexpression von Egr-1 erhöhen [119]. In der Signalkaskade aktiviert ERK1/2 via p90RSK zuerst die Transkriptionsfaktoren SRF und Egr-1, die beide mehrere Bindungstellen in den Promotoren der Flotilline haben. Aus ähnlichen Beobachtungen folgerte Chang, dass ERK das Potenzial dazu hat, über die Kontrolle von Zellzyklusmolekülen die Zellproliferation zu beeinflussen [159].

Während es beim Knockdown von Flotillin-1 in HeLa-Zellen zu einer verminderten Expression kommt, zeigen neueste Ergebnisse bei einem Knockdown von Flotillin-2 eine deutlich verringerte Expression beider Proteine in unterschiedlichen Zelllinien. Banning konnte entgegen vermuteter Inhibition mittels siRNA Knockdown von Flotillin-2 in HeLa-Zellen eine signifikante Steigerung

der Aktivierung durch Phosphorylierung von ERK, MEK, CRAF und MAPK Substraten beobachtet [69]. Diese Ergebnisse konnten nicht allein *in vitro*, sondern auch *in vivo* im Mausmodell mit Hilfe eines Knock-Outs bestätigt werden, bei denen es zur Hochregulierung von Genen die für Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind kam [69].

Durch die Behandlungen der HeLa-Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 ließ sich sowohl die basale als auch die EGF-stimulierte Promotoraktivität hemmen und die essentielle Bedeutung von MAPK ERK für die basale Expression der Flotilline bestätigt.

4.2 Wechselwirkungen von Akt und Flotillinen

In den in dieser Doktorarbeit untersuchten Promotorregionen der Flotilline kommen sieben murine und humane potentielle Foxo (FHKD), sieben murine und zehn humane NFκB sowie acht murine und vier humane CREB Transkriptionsfaktorbindestellen vor.

Diese Transkriptionsfaktorbindestellen haben gemeinsam, dass sie mit Akt interagieren können. Die von Staal zuerst beschriebene Proteinkinase Akt (auch bekannt unter Protein Kinase B), welche N-terminal eine PH Domäne und C-terminal eine hydrophob regulatorische Einheit besitzt, besteht aus drei Isoformen, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und unter anderem an Zellzyklus, Angiogenese, Zelladhäsion, Proliferation, Glukoseaufnahme in die Zelle und am Überleben der Zelle beteiligt sind [160, 161]. Außerhalb der Zelle kann es beispielsweise via EGFR zur Aktivierung des komplexen PI3K/Akt/mTOR Signalweges kommen [162, 163]. Die Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade ist wichtig für verschiedene essentielle Funktionen wie die Proteinsynthese, Proliferaton und die Versorgung von Zellen mit Nährstoffen, aber auch für die Onkogenese [164]. Verschiedene Studien haben bestätigt, dass Akt durch Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 aktiviert wird [165, 166]. Allein die Dephosphorylierung von Thr308 und Ser473 mittels PP2 (protein phosphatase 2) und PHLPP (PH domain leucine rich repeat phosphatase) und das in Krebszellen mutierte PTEN (phosphatase and tensin homology) können die Aktivierung beenden [167-169].

Kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, dissoziiert dieses von der Plasmamembran via Cytosol in den Nucleus wo es eine Vielzahl von Substraten phosphoryliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Akt via mTORC1 die Proteinsynthese und Proliferation kontrolliert [170]. Die Überexpression der Proteinkinase Akt führt zur Entwicklung von Krebszellen [171]. Interessanterweise reguliert Akt auch die Insulinsignalkaskade [172]. Obwohl man bisher die Zusammenhänge im Einzelnen noch nicht genau kennt, scheint es, als wäre die Aktivierung von Akt kardiovaskulär- und neuroprotektiv [173, 174]. Akt kann auch GTPasen wie Rab und RhoA regulieren, die das Zellwachstum beeinflussen können [149, 175-177]. Darüber hinaus konnte Chen nachweisen, dass Akt verschiedene Knochenmarksspezifische Gene wie Runx2 regulieren kann, die zur Entwicklung von mesenchymaler Progenitorzellen hin zu Osteoblasten essentiell sind [178]. Akt interagiert darüber hinaus auch mit einer

zunehmenden Anzahl von Transkriptionsfaktoren. Hierzu gehören o.g. „Forkhead box O“ (FOXO/FHKD) Transkriptionsfaktoren, die durch Akt-Phosphorylierung gehemmt werden und somit nicht mehr aus dem Nucleus in das Cytoplasma shuttlen. Bei Hemmung der Akt-Signalkaskade, kann FOXO (FHKD) übernehmen und es scheint als würde es dann über das Überleben der jeweiligen Zelle entscheiden [179, 180].

Der Transkriptionsfaktor CREB ist wichtig für das Überleben unterschiedlicher Zellen und konnte nachweislich in verschiedenen Studien durch Akt ebenfalls aktiviert werden [181-183]. Ein weiterer wichtiger und vielseitiger Transkriptionsfaktor ist NFκB. Romashkova konnte nachweisen, dass NFκB via Akt den Platelet-derived growth factor (PDGF) direkt aktivieren kann und somit das Überleben und Wachstum der Zelle sichern kann [184].

4.3 Die Rolle von mTOR in der Flotillinsignalkaskade

An dieser Stelle sollen die Eigenschaften des Moleküls mTOR in der Signalkaskade PI3K/AKT/mTOR näher erläutert werden. Diese Signalkaskade interagiert mit den Flotillinen, bisher ist jedoch nicht viel über die damit zusammenhängende Expression der Flotilline oder deren Einfluß bekannt.

Die atypische Serin-&-Threonin Kinase mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) ist eines der besterforschten Substrate unterhalb von Akt und kann von Wachstumshormonen, Stress, Energiebedarf, Hypoxie, Aminosäuren, Zytokinen wie TNFα und Medikamenten wie beispielsweise Rapamycin beeinflusst werden [185]. mTOR wird von Akt an Thr2446 und Ser2448 phosphoryliert und besteht aus zwei großen Komplexen, mTORC1 (gebunden an Raptor) und mTORC2 (gebunden an Rictor) die auf unterschiedliche Weise aktiviert werden können [186, 187]. Die Komplexe bestehen jeweils aus mehreren Proteinkomponenten und werden durch unterschiedliche Effektoren, wie Akt/PKB, ERK1/2 oder RSK1 beeinflusst [188]. Viele dieser Stimuli aktivieren mTORC1 via TSC [189-191]. Darüber hinaus kann mTORC1 auch mit Kinasen der AGC Familie, SGK-1 und PKC interagieren [192-195]. Weiter upstream gelegene Effektoren sind unter anderem PA (Phosphatidylsäure), MAP4k3 und Rag GTPasen [196-201]. Eine der wichtigsten Aufgaben von mTORC1 ist die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren für die Proteinsynthese [202-204]. Dass mTOR weiter downstream den Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert konnte durch Düvel beschrieben werden. HIF-1 stimuliert die gleichen Gene der Glykolyse wie der Transkriptionsfaktor C-Myc. C-Myc, welches vermutlich 15% aller Gene reguliert, kann darüber hinaus auch downstream von mTOR aktiv Gene der Glykolyse regulieren. Des Weiteren geht man davon aus, dass mTORC1 die Funktion von Lysosomen via v-ATPase Expression beeinflusst [205, 206]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist PGC-1, welcher hauptsächlich im Stoffwechsel der Mitochondrien intrazellulär eine Rolle spielt und diese beeinflusst. Eine Inhibition von mTOR in Myokardzellen

führt downstream zu einer Reduktion von PGC-1, zu Schäden innerhalb des Mitochondrienstoffwechsels und zu einem möglichen Zusammenbruch der Atmungskette [207]. mTORC1 kann die Kinasenkomplexe ULK1/Atg13/FIP200 und mTORC1/TFEB aktivieren, die für die Autophagie essentiell sind [208-211]. Rosenbluth konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor p73, welcher hauptsächlich an der zellulären Autophagie beteiligt ist, bei erhöhter Aktivität von mTOR gehemmt werden kann [212, 213]. Eine Überlegung von Rosenbluth war es bei Ausfall von intaktem p53 in Tumorzellen mTOR zu inhibieren, um einen initiierten Zelltod via Autophagie über eine Hochregulierung von p73 zu erreichen. Auch Sasaki konnte beobachten, dass die Regulation der Flotillin-2 Transkription auf das endogene p73 angewiesen ist [89].

Im menschlichen Gehirn kommt mTORC1 auch in verschiedenen Strukturen vor und ist aller Wahrscheinlichkeit nach an neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS beteiligt, bei denen es einen Einfluss auf das Ubiquitin-Proteasom-System und die Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen in Neuronen hat [32]. Über einen Mechanismus an dem auch Neuropeptid Y und S6K1 beteiligt sind, reduziert mTORC1 die Aufnahme von Nährstoffen [214, 215]. Eine weitere Aufgabe von mTORC1 ist die Lipidsynthese [216]. Eine lipidreiche Diät unterbricht die Möglichkeit von Leptin das hypothalamische mTORC1 zu aktivieren, somit eine weitere Nahrungsaufnahme, und damit die Gefahr der Entwicklung von Adipositas und Diabetes zu unterbrechen [215, 217].

Bezüglich der Funktion der Sterolbiosynthese können die Transkriptionsfaktoren SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein) und SREBP2 downstream von mTOR aktiviert werden, die darüber hinaus noch am Pentosephosphatweg und dem Zellwachstum beteiligt sind [205, 218]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor nennt sich PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) und ist ein Agonist der Fettregulation und -aufnahme. Es konnte gezeigt werden, dass er von mTOR downstream hochreguliert wird und es bei Aktivierung zu einer erheblich vermehrten Aufnahme von Fetten in die Zelle führen kann [219]. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei mTORC1 Inhibition nicht nur die Adipogenese sondern auch die Aufrechterhaltung der Fettzellen gestoppt werden konnte [220-222]. Bei Verlust von mTORC1 in Fettzellen blieb das Gewicht hingegen unverändert [223]. Aus diesen Beobachtungen folgerte Joshi, dass durch mTOR – Inhibition eine gleichzeitige grenzenlose Fettaufnahme über die spezifischen Transkriptionsfaktoren PPAR und SREBP ebenfalls verhindert werden könnte [224]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mTORC1 Gene der Ketogenese aktivieren kann und NCOR, ein Repressor von PPARy beeinflusst wird [225, 226].

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Regulation der Flotilline durch PPARy nachweisen [119]. Eine erhöhte Expression von mTORC1 führt im Muskel von Patienten mit Adipositas zu einer S6K1 Feedback Hemmung der Insulinsignalkaskade, welche die Aufnahme von Glucose in die Muskulatur unterbricht und somit zu einer erhöhten systemischen Insulinresistenz und zu Proteinkatabolismus führt [227-229]. Eine weitere Erhöhung von mTORC1 konnte in hypertropher

Muskulatur nachgewiesen werden, wobei ein Fehlen mit einer verfrühten Todesrate einherging [230]. Weitere Studien haben gezeigt, dass mTORC1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression von Krebszellen spielt [189, 205, 231, 232]. Es scheint, als das mTORC2 eine große Rolle in Gliomen und Prostatakrebs einnimmt, da sie hier häufig überexprimiert sind [233-235]. Für das Nierenzellkarzinom, welches auf eine Tsc1/2 Mutation zurückzuführen ist, ist mittlerweile der mTOR Inhibitor Temsirolimus zugelassen [236]. Rapamycin hingegen konnte bisher in klinischen Studien nicht überzeugen, da es nur eine teilweise Hemmung vermitteln kann und noch andere, unbekannte Faktoren und Mechanismen bei der Hemmung eine Rolle spielen [237-241]. Die Therapie von Individuen unter Rapamycin ging häufig mit der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms einher [242-244]. Brachmann konnte zeigen, dass es in der Zukunft interessant sein könnte, einen Inhibitor zu entwickeln, der auf der einen Seite mTORC1/2 und PI3K hemmen und damit die Phosphorylierung von Akt, S6K1 und 4E-BP1 verhindern könnte und auf der anderen Seite eine generelle Inhibition der gesunden Zellen unterbleibt [245]. Insbesondere in Patienten mit Brustkrebs welcher unter anderem auf eine Störung von mTOR zurückzuführen ist, gibt es positive Ergebnisse bei Studien mit Inhibitoren [246-248]. Darüber hinaus konnte herausgefunden werden, dass die Stimulation von mTOR die Lebenserwartung drastisch senken kann, wobei die Hemmung von mTOR mit Rapamycin diese verlängert [249-252].

Im Gegensatz zu mTORC1, ist bisher nicht viel über mTORC2 bekannt, außer das es von Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann, in der Insulinsignalkaskade vorkommt und Ribosomen für dessen Aktivierung vorhanden sein müssen [253].

4.4 Rolle der PKC bei den Flotillinen

Bis heute sind mindestens 10 verschiedene PKC-Isoformen beschrieben worden, die in klassische, neue und atypische Serin-Threonin-Kinasen unterteilt werden und mit unterschiedlichen Funktionen wie Zellmigration, Suppression von Tumoren und Regulation der Apoptose assoziiert werden [254-256]. Die unterschiedlichen Isoformen werden am häufigsten in T-Zellen exprimiert. Obwohl die genauen Mechanismen hinter den verschiedenen PKC-Isoformen nicht gänzlich geklärt sind, ist man sich sicher, dass unterschiedliche Signalkaskaden existieren und diese auch eine Rolle in der Signalkaskade der Flotilline spielt [254, 257-259]. PKC-Isoformen können komplexe Signalkaskaden wie MEK/ERK, JNK, p53, NFκB und Jak/Stat und p38 aktivieren, mit Cytokin- und Adhäsionsrezeptoren und weiteren Signalkaskaden interagieren [260-266]. Kishimoto konnte nachweisen, dass PKC via PLC (Phospholipase C) durch Phosphorylierung des EGFR über eine komplizierte Signalkaskade, an dessen Ende es zur Bereitstellung der Second-Messenger DAG (Diacylglycerol) und IP3 (Inositoltrisphosphat) kommt, aktiviert werden kann [267]. Um eine PKC-Aktivierung zu erreichen wird häufig das stark kanzerogene PMA als Stimulus verwendet. Da PMA chemisch gesehen dem lipidem DAG sehr ähnelt und auch die PKC ak-

tivieren und somit Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung nehmen kann, habe ich es es in meinen Experimenten ebenfalls verwendet [268].

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) aktiviert die Proteinkinase C, woraufhin es zur Bereitstellung der Second Messenger IP3 und DAG kommt. Die Isoformen binden mit ihrer C1-Domäne an den N-Terminus des DAG Rezeptors, welches zur Translokation führt [122, 255, 269]. Hwang et al konnten bestätigen, dass die Aktivierung von PKC mittels PMA eine Translokation der PKC-Isoformen hin zur Plasmamembran bewirkt, was zur Proliferation, Differenzierung, maligner Transformation und somit zu Krebszellen führt [270].

Bei den klassischen PKCs kommt es durch erhöhte Calciumlevel zu einer Aktivierung. Anschließend kommt es zu einer Bindung, Aktivierung und Hochregulation von PKC- η , γ und δ mRNA und somit zu einer gesteigerten Expression und Zellproliferation [271].

Mittels Phosphorylierung kann PKC, Transkriptionsfaktoren und weitere MAPK Signalkaskaden aktivieren [272]. Yokoyama konnte zeigen, dass PMA dosisabhängig die Aktivität der Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun steigern kann. Darüber hinaus kam es zur Beeinflussung der Gene Aggrecan und collagen type2 und zu einer erhöhten Transkription – und Proteinexpression mit Aktivierung von ERK1/2, p38, JNK [273]. Die Aktivierung dieser auch als `early- response- genes` bekannten Gene wie c-fos, c-jun und Egr- wurde ebenfalls von Dunmon bestätigt [274]. Darüber hinaus aktiviert PMA eine PKC δ abhängige, mTORC2 unabhängige Signalkaskade die CREB und NFkB beeinflussen kann [275]. Eine stetige Stimulation mittels PMA führt zu einer erhöhten Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NFkB [276]. Neben NFkB konnte auch der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert werden, welcher für die Differenzierung und Regulation der Transkription verantwortlich ist [277]. Via PKC konnte durch PMA eine Aktivierung von Genen in Glioblastomen ausgelöst werden [278]. Auch während der Adhäsion, Differenzierung, Aktivierung von T-Zellen kann der `PKC Effekt` mittels PMA getriggert werden [279]. Des Weiteren hat Manicassamy herausgefunden, dass PMA durch PKC- δ Aktivierung eine Inhibition oder Aktivierung des Calciumioneneinstroms in T-Zellen bewirkt [280]. PMA kann in Zellen ganz gezielt den Zelltod hervorrufen, welcher sich aber von den beiden grundlegenden Mechanismen Apoptose und Nekrose wesentlich unterscheidet [281, 282].

Cremona konnte zeigen, dass Flotillin-1 essentiell für die PKC- induzierte Endozytose und Internalisierung bei zwei verschiedenen neuronalen Transportsystemen, des EAAT2 (glial glutamate transporter) und des DAT (Dopamin transporter) ist [46]. Sorkina konnte diese Beobachtungen nicht teilen, und führte die DAT-Endozytose eher auf Clathrin als auf Flotillin zurück. Flotilline haben bei der Interaktion mit der PKC eher eine modulierende Funktion [47].

4.5 Transkriptionelle Regulation anderer SPFH Familienmitglieder

Proteine, die eine Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C (SPFH) Domäne haben, auch bekannt als PHB-Domäne, lassen sich in verschiedenen Spezies von Pro- und Eukaryoten nachweisen [4, 6,

25]. Sie kommen ubiquitär in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor. Diese Proteine haben die Neigung zu oligomerisieren, co- und post-translational modifiziert zu werden und subzelluläre `Sortieranlagen` zu bilden. Darüber hinaus lassen sich SPFH Domänen in cholesterinreichen Regionen der Plasmamembranen, in frühen Endosomen, im Golgi-Komplex, in Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum nachweisen [4, 6, 9, 25, 39, 283-285]. Bisher wurden den verschiedenen Mitgliedern der SPFH Familie unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben wie die Ionenkanalregulierung, Membranprotein-Chaperonfunktion, Vesikel- und Proteintransport, Mechanotransduktion, die Bildung von Mikrodomänen und spezialisierten Membranstrukturen [6, 39, 286, 287]. Prohibitine (PHB1 und PHB2), welche meist an der Innenseite der Membran von Mitochondrien lokalisieren, wurden ursprünglich als negative Regulatoren der Zellproliferation bezeichnet, von denen auch der Name Prohibitin kommt [288, 289].

Theiss und Kathitias konnten in Kolontumoren zeigen, dass Prohibitin durch das Akutphaseprotein IL-6 und das Zytokin TNF α hochreguliert wird, um weiter mit STAT3 und p53 zu interagieren [290, 291]. Des Weiteren kann PHB1 vom Zytokin TNF α negativ beeinflusst werden [292]. Trotz dieser unterschiedlichen Funde, sind der genaue Mechanismus der Regulation und die Transkriptionsfaktoren die, die PHB Mitglieder beeinflussen, bisher unklar. Der onkogenetische Transkriptionsfaktor c-Myc hat nachweislich Bindungsstellen in der PHB Promotorregion und erhöht auf diese Weise in vielen Tumoren die Expression seiner Zielgene [293]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von Myoblasten die Transkriptionsfaktoren MyoD und MEF2 aktiviert werden und bei stetiger Expression PHB2 inhibieren können [294-296]. Der Einfluß von Vitamin D auf Prohibitin konnte von Peng erarbeitet werden. Stomatin konnte durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 und durch die Verwendung von Glucocorticoiden in unterschiedlichen Geweben hochreguliert werden [297, 298].

4.6 Mögliche Folgen einer erhöhten Flotillinexpression

Es ist bekannt, dass Flotillin-1 und Flotillin-2 in unterschiedlichen Tumoren hochreguliert sind. Song konnte z.B. nachweisen, dass Flotillin-1 in humanen ESCC (oesophageal squamous cell carcinoma cells) hochreguliert ist. Die Hochregulierung von Flotillin-1 ging einher mit erhöhter Aggressivität und klinischer Progression des Tumorwachstums, wobei eine Herunterregulierung mittels Knockdown/Silencing diese verringerte. Die Höhe der Flotillin-1 Proteinlevel korrelierten bei ESCC-Patienten negativ mit der Überlebensrate und positiv mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und dem Stadium der Erkrankung [299]. Ähnliche Beobachtungen konnte Wang für das Kleinzellige Lungenkarzinom durchführen [300]. In Untersuchungen zum kolorektalen Karzinom konnten Thorn bestätigen, dass eine Korrelation zwischen der Überexpression von Flotillin-1 und dem Schweregrad des infiltrativen Phenotyps existiert [301]. *In vitro* und *in vivo* konnte Lin die essentielle Rolle von Flotillin-1 im Zusammenhang mit der

Proliferation und Tumorgenese in humanen Brustkrebszellen nachweisen. Dazu konnte mittels Knockdown von Flotillin-1 die Expression von Protein und mRNA in Brustkrebszellen inhibiert werden, welches auf Ebene der Signaltransduktion auf die Suppression von Akt und der daraufhin erhöhten Transkriptionsaktivität von FOXO3a, sowie der hochregulierten Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21(cip1) und p27(kip1) und der Inhibierung des CDK Regulators CyclinD zurückzuführen war [59]. Flotillin-1 und Flotillin-2 sind wesentlich an der Stabilisierung eines Komplexes aus Hsp90 und ErbB2 an der Plasmamembran in Brustkrebszellen beteiligt und ihr Expressionslevel korreliert mit der Prognose von Brustkrebs [302]. Koh konnten ähnliche Beobachtungen bezüglich Tumorwachstum und metastatischem Potenzial bei Brustkrebszellen durchführen [303]. Einen Zusammenhang einer erhöhten Expression von Flotillin-1 in HCC (Hepatozellulärem Karzinom), Flotillin-2 in Zervixkarzinom und einer damit assoziierten kürzeren Überlebensrate und schlechteren Prognose konnte auch durch Zhang und Liu gezeigt werden [304, 305]. Für Flotillin-2 konnten Wang et al. nachweisen, dass im Vergleich zu nichtkanzerösen Zellen eine Überexpression in malignen Brustkrebszellen mit einem schlechteren klinischen Stadium, histopathologischen Differenzierungsgrad, ErbB-2 Expressionslevel und einer verminderten Überlebensrate korreliert [67]. Kurrle führten daraufhin einen Knockdown an Flotillin-1 in MCF7 Zellen durch, welcher zu einer Hochregulierung von EGFR und einer erhöhten Aktivität der MAPK Signalwege führten. Diese durch einen Knockdown induzierte, erhöhte Aktivität konnte anschließend durch EGFR Inhibitoren gesenkt werden [60]. Bei metastatischen Melanomzellen konnte Hazarika ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Expressionslevel von Flotillin-2 und der Progression von Melanomzellen, erhöhter PAR-1 Expression und einer erhöhten Tendenz zur Transformation von SB2 Melanomzellen hinzu metastatischen Zellen *in vivo* nachweisen [27]. Berger konnten darüber hinaus bei FLOT2 Knockouts eine Inhibition in Lungenmetastasen *in vivo* nachweisen, ohne den Primärtumor zu beeinflussen [70]. Ähnliche Beobachtungen konnte Zhu in malignen Epithelzellen des Magens machen, bei denen die Expression von Flotillin-2 mit dem Histopathologischen Stadium und dem Expressionsgrad von ErbB-2 korrelierte. Umgekehrt konnte beim Flotillin-2 Knockdown eine verminderte Expression von ErbB-2 in SGC-7901 malignen Magenkarzinomzellen bestätigt werden [68]. Darüber hinaus wurden Flotilline in mehreren Analysen als unabhängiger Biomarker für die Prognose des Mammakarzinoms, der Lymphknotenmetastasen, des Magenkarzinoms und des oralen Squamosazelltumors vorgeschlagen [59, 67, 68, 306]. Bei Nasopharynxkarzinomen konnte ebenfalls eine Hochregulierung von Flotillin-1 nachgewiesen werden, welche zu einer aggressiven Invasion und Metastasierung des Primärtumors führte [307]. Im Vergleich zu Krebserkrankungen konnten Thomas in neurodegenerativen Erkrankungen wie AD bislang keinen Zusammenhang zwischen klinischem Stadium, Schweregrad, Progression der Erkrankung und erhöhten Expressionslevel von Flotillin-1/-2 nachweisen [308].

Zusammengefasst zeigen die oben genannten Ergebnisse, dass eine Überexpression von Flotillinen unterschiedliche physiologische wie auch pathologische Effekte fördert. In zukünftigen Untersuchungen wäre interessant herauszufinden, ob Flotilline als Therapieziele in der Onkologie Anwendung finden könnten.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Regulation der Promotorregion der Flotilline durch verschiedene Stimulatoren und Inhibitoren näher untersucht. Hierbei konnte der Einfluss potentieller Transkriptionsfaktoren auf das Aktivitätsniveau unterschiedlich hergestellter Promotorkonstrukte ermittelt werden. Daraus konnten unterschiedliche Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Promotorregionen gezogen werden, die eine bestimmte Anzahl von Basen benötigen um einen bestimmten Effekt im Aktivitätsniveau zu erzielen. In Zukunft könnte man den direkten Einfluß der erfolgreich getesteten Transkriptionsfaktoren auf die transkriptionelle Regulation der Flotilline mittels Expressionsplasmiden, in welche die cDNA der entsprechenden Transkriptionsfaktoren inkloniert wurde, untersuchen. Weiterhin wäre es von Interesse die Transkriptionsfaktoren in mutierter Variante beispielsweise als dominant negative Proteine zu überexprimieren. Mittels Knockdown bzw. Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren wäre es interessant, das Expressionsniveau der Flotilline auf mRNA und Proteinebene zu beobachten. Hierbei sollte man insbesondere die Transkriptionsaktivität und die mögliche Aktivierung von Onkogenen überprüfen, welche die Karzinogenese fördern. Ein weiteres wichtiges Ziel wäre die Überprüfung der MAPK Signalkaskade. Es ist anzunehmen, dass bei Mutationen wichtiger Schlüsselstellen eventuell weitere Signalkaskaden mit pathogenem Potenzial für den Organismus aktiviert werden, welche in Folge dessen weitere für die Zelle pathogene hochreaktionsfreudige Faktoren/Moleküle aktiviert oder sogar produziert.

Die in meinen Experimenten verwendeten HeLa-Zellen unterliegen aufgrund ihrer hohen Pathogenität einem völlig veränderten Stoffwechsel. Es wäre deshalb von großem Interesse, den Einfluss von EGF, PMA, UO126 und der unterschiedlichen Promotorkonstrukte bei völlig physiologischem Stoffwechsel zu untersuchen. Schlussendlich sollte man weitere Untersuchungen auf Ebene der Translation durchführen. Insbesondere hierbei würden sich mRNA Knockdowns nützlich zeigen. Die Proteinexpression ist schließlich essentiell, um über den Abbau bzw. die Expression auf Proteinebene und deren Folgen für den gesamten Stoffwechsel der Zelle und den Einfluss der Flotilline auf den Organismus, Rückschlüsse ziehen zu können.

6 Zusammenfassung

Die Flotillin-Familie besteht aus zwei evolutionär hochkonservierten Membranproteinen, die in verschiedenen Organismen ubiquitär exprimiert werden. Flotilline sind mit Membranmikrodomänen mittels Lipidmodifikationen und Oligomerisierung assoziiert. Da Flotilline N-terminal eine s.g. SPFH-Domäne besitzen, gehören sie zusammen mit Stomatin, Prohibitin und Hf1K zur SPFH-Familie. Am C-Terminus der Flotilline befinden sich mehrere Glutamat- und Alanin Wiederholungen, welche vermutlich Coiled Coil-Strukturen bilden und für die Oligomerisierung wichtig sind. Durch Stimulation mit EGF können Flotilline an Tyrosinresten phosphoryliert werden. Flotilline spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Mechanismen wie bei der Wachstumssignaltransduktion, der Insulinsignalkaskade, Phagozytose, der Regulierung des Aktinzytoskeletts und dem Membrantransport. Hingegen ist bisher nicht viel über potentielle Transkriptionsfaktoren, Effektoren und Inhibitoren der Flotillinexpression bekannt.

In dieser Arbeit war es daher das Ziel, die Promotorregionen der Flotilline näher zu charakterisieren. Hierfür wurden zunächst biometrische Sequenzvergleiche durchgeführt unterschiedlich große Promotorregionen der Flotilline in Form von Deletionskonstrukten in einen Reportergenvektor kloniert und diese Konstrukte anschließend in HeLa-Zellen transfiziert. Um unterschiedliche Effekte verschiedener, äußerer Einflüsse zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen mit EGF, PMA oder dem MEK1/2-Inhibitor UO126 behandelt. Die Aktivität beider Promotoren ließ sich durch EGF und PMA steigern, wobei PMA den stärksten Effekt erzielte. Die basale sowie die EGF-induzierte Promotoraktivität wurden mittels MEK1/2-Inhibitor UO126 gehemmt, was darauf hindeutete, dass die Transkription der Flotilline durch die MAPK-Kinase ERK1/2 reguliert wird.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine bestimmte Anzahl von Basen in den Promotorregionen vorhanden sein muss, um ein bestimmtes Aktivitätsniveau zu erreichen. Zusammenfassend sprechen diese Resultate dafür, dass sich innerhalb der hier untersuchten Promotorregionen wichtige genregulatorische Sequenzen befinden, welche die Expression der Flotilline beeinflussen und durch verschiedene externe Signale moduliert werden können.

6.1 Abstract

The family of the flotillins encounters two highly evolutionary conserved membrane proteins, which are ubiquitarily expressed among different organisms. Flotillins are associated with membrane microdomains via lipid-modification and oligomerisation. With an n-terminal SPFH-domain, flotillins belong together with stomatin, prohibitin and Hf1K to the SPFH-family. On the c-terminus of the flotillins are several glutamate and alanine repeats, forming coiled-coils and enabling oligomerisation. EGF-stimulation of flotillins enables a phosphorylation of the tyrosines. Flotillins play a major role in different physiological mechanisms e.g. growth signal transduction, insulin signaling, phagocytosis, regulation of the actin cytoskeleton and transport along the membrane. Nevertheless not many details are fully elucidated when it comes to potential transcription factors, effectors and inhibitors of the flotillin-expression.

In this thesis, the primary aim was therefore, to depict a better characterization of the promoter region of the flotillins. With the help of biometric sequence alignments of different sized promoter regions of the flotillins, I was able to introduce those deletion-constructs into a reporter gene vector, which were later on transfected into HeLa-cells.

During the next step of my experiments, I exposed those cloned and later transfected cells to EGF, PMA or the MEK1/2 inhibitor UO126.

The activity of the promoter was raised by exposure to EGF and PMA, whereas PMA had the most powerful effect. The basal and the EGF-induced promoter activity were inhibited using the MEK 1/2 inhibitor UO126. Those results point towards that the transcription of the flotillins is regulated by MAPK kinase ERK 1/2.

Furthermore, I showed that a specific number of bases in the promoter region were necessary to enable a specific level of activation.

Altogether these findings suggest an important regulatory sequence in those promoter regions that were further investigated in this thesis, which can have a tremendous effect on the expression of the flotillins, being modulated by external signals.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Dechiffrierung	Abkürzung	Dechiffrierung
4E-BP1	Engl. eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1; Regulator der Proteintranslation	ERM	Familie Aktin-bindender Proteine
AD	Alzheimers Demenz	F-Aktin	Dynamische Aktinfilamente
AGC Familie	cytoplasmic serine/threonine kinases	F3/Contactin	CNTN1 Modulator der Neurogenese
BACE1	Beta-secretase 1	FOXO	Forkhead-Box-Protein O3, Transkriptionsfaktor
BAD	Proapoptotisches BCL-2 Mitglied	Fyn	Kinase
BSE	Bovine, spongiforme Enzephalopathie,	GLUT4	Glukosetransporter 4
CAP	Engl. c-Cbl-associated protein	GPI Anker	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Proteine
CJD	Creutzfeldt Jakob Erkrankung, Prionerkrankung	HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
Clathrin	Protein der Endozytose	HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
CRAF	Proteinkinase reguliert Differenzierung	IKK β	Kinase, Regulator des Endothels
DAT	Dopamintransporter	IL11	Interleukin 11
EGF	Engl. Epidermal-growth -factor	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
EGFR/ErBb	Engl. Epidermal growth factor receptor	JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Epigen	Engl. Epithelial mitogen, Protein	Kinesin KIF9	Engl. Motor protein
ERK1/2	MAP-Kinase	KSR1	Engl. Kinase suppressor of RAS1; Enzym

Abkürzung	Dechiffrierung	Abkürzung	Dechiffrierung
Lck	Kinase	Rapamycin	Sirolimus, Immunsuppressivum
MEK1/2	Engl. Mitogen-activated protein kinase kinase	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
miR-124	Engl. miR-124 microRNA precursor, non-coding RNA	S6K1	Engl. protein S6 kinase 1, Regulator der Protein Translation
mTOR	Engl. mechanistic Target of Rapamycin	Scrapie	Prionerkrankung
NCOR	Nuclear receptor co-repressor 1, Protein	SOHO Familie	Engl. Sorbin Homology, Adapterprotein
Neuregulin1-4	Protein;Essentiell für die Entwicklung des Herz und ZNS	SPFH/PHB	Konservierte Region benannt nach den Proteinen Stomatins, Prohibitins, Flotillins and HflK/C
Neuroglobin	Sauerstofftransportierendes Protein im ZNS	STATS	Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transcription, eine Familie DNA-bindender Proteine
Neuropeptid Y	Neuropeptid des ZNS und PNS	TCR/CD3	T-Zell Rezeptor Proteinkomplex zur Aktivierung von T-Lymphozyten
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like protein 1	TGF- α	Engl. Transforming growth factor alpha
P38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen	Thy-1	GPI-Anker
PAR-1	Protease-aktivierte Rezeptoren	v-ATPase	Engl. Vacuolar-type H ⁺ -ATPase
PSGL-1	Engl. P-selectin glycoprotein ligand-1	VEGF	Engl. Vascular Endothelial Growth Factor; Signalmolekül der Vaskulogenese/Angionese
PTOV1	Gen aus Prostataadenocarcinom; Überexpression	Vimentin	Intermediärfilament des Zytoskeletts
Rac	GTP-bindender Proteine, ProteinkinaseB	β -Cellulin	Polypeptid hergestellt von Inselzellen
Raf	Engl. Rat fibrosarcoma; Proteinkinase		

8 Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Flotilline.....	2
Abb. 2: EGFR, Flotilline und Transkriptionsfaktoren.....	10
Abb. 3: Zeigt pGL3-Basic Vektor Plasmid.....	23
Abb. 4: Promotorkonstrukte.....	26
Abb. 5 Längster Abschnitt mit einer Homologie 77%.....	30
Abb. 6 Längster Sequenzabschnitt mit einer Homologie von 80%.....	30
Abb. 7: Flotillin-1 Promotorbasalaktivität in serumfreiem Medium.....	41
Abb. 8: Flotillin-2 Promotorbasalaktivität in serumfreiem Medium.....	42
Abb. 9: Promotoraktivität der Flotillin-1 bei FCS 10%.....	43
Abb. 10: Promotoraktivität der Flotillin-2 bei FCS 10%.....	44
Abb. 11: Flotillin-1 Promotoraktivität nach Stimulation mit unterschiedl. EGF Konz.	45
Abb. 12: Flotillin-2 Promotoraktivität nach Stimulation mit unterschiedl. EGF Konz.	46
Abb. 13: EGF Stimulation vs. unstimulierte Flotillin-1 Promotorregion.....	47
Abb. 14: EGF Stimulation vs. unstimulierte Flotillin-2 Promotorregion.....	48
Abb. 15: Stimulation der Flotillin-1 Promoterregion mit EGF/ Inhibition mit U0126.....	49
Abb. 16: Stimulation der Flotillin-2 Promotorregion mit EGF/Inhibition mit U0126.....	50
Abb. 17: Stimulation mit PMA.....	51

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung.....	12
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Puffer für die DNA Gelelektrophorese und die Zusammensetzung des DNA Gels.....	12
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Zellkultur und deren Hersteller.....	13
Tab. 4: Auflistung der in der Thesis verwendeten Medien.....	13
Tab. 5: Auflistung der verwendeten Zelllinie und Medium mit Angabe des Herstellers.....	13
Tab. 6: Auflistung der verwendeten Enzyme und Kits mit Angabe des Herstellers.....	14
Tab. 7: Auflistung der in der Thesis verwendeten Vektoren mit Angabe des Herstellers.....	14
Tab. 8: Auflistung der verwendeten Stimulationsfaktoren und Inhibitoren mit Angabe des Herstellers.....	14
Tab. 9: Auflistung sonstiger in der Thesis verwendeter Chemikalien mit Angabe des Herstellers.....	14
Tab. 10: Auflistung der in der Thesis verwendeten Lysepuffer und Kernlysepuffer.....	15
Tab. 11: Auflistung der in der Dissertation verwendeten Primer.....	17
Tab. 12: Auflistung der TA-Klonierung mit pDrive Vektor.....	21
Tab. 13: Auflistung der Kontrollspaltung mit EcoRI.....	21
Tab. 14: Auflistung der Kontrollspaltung mit HindIII.....	22
Tab. 15: Auflistung der Kontrollspaltung mit NcoI und EcoRI.....	23
Tab. 16: Auflistung der in der Thesis verwendeten genomischen Sequenzen.....	27
Tab. 17: Auflistung der potentiellm humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1.....	31
Tab. 18: Auflistung potentieller humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-2.....	35
Tab. 19: Auflistung potentieller humaner/muriner Transkriptionsfaktoren für Flotillin-1 & 2.....	38

9 Literaturverzeichnis

1. Schroeder, W.T., et al., *Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA)*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19983-91.
2. Schulte, T., et al., *Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration*. Development, 1997. **124**(2): p. 577-87.
3. Bickel, P.E., et al., *Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13793-802.
4. Rivera-Milla, E., C.A. Stuermer, and E. Malaga-Trillo, *Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(3): p. 343-57.
5. Morrow, I.C., et al., *Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48834-41.
6. Morrow, I.C. and R.G. Parton, *Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics*. Traffic, 2005. **6**(9): p. 725-40.
7. Neumann-Giesen, C., et al., *Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 509-18.
8. Glebov, O.O., N.A. Bright, and B.J. Nichols, *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(1): p. 46-54.
9. Langhorst, M.F., et al., *Linking membrane microdomains to the cytoskeleton: regulation of the lateral mobility of reggie-1/flotillin-2 by interaction with actin*. FEBS Lett, 2007. **581**(24): p. 4697-703.
10. Frick, M., et al., *Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding*. Curr Biol, 2007. **17**(13): p. 1151-6.
11. Solis, G.P., et al., *Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains*. Biochem J, 2007. **403**(2): p. 313-22.
12. Bauer, M. and L. Pelkmans, *A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5559-64.
13. Babuke, T. and R. Tikkanen, *Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(9): p. 525-32.
14. Edgar, A.J. and J.M. Polak, *Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(1): p. 53-64.
15. Volonte, D., et al., *Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12702-9.
16. Lang, D.M., et al., *Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons*. J Neurobiol, 1998. **37**(4): p. 502-23.
17. Stuermer, C.A., et al., *Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(10): p. 3031-45.
18. Bramkamp, M. and D. Lopez, *Exploring the existence of lipid rafts in bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2015. **79**(1): p. 81-100.
19. Reuter, A., et al., *PrPc and reggies/flotillins are contained in and released via lipid-rich vesicles in Jurkat T cells*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(16): p. 2092-9.
20. Langhorst, M.F., et al., *Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(4): p. 211-26.
21. Liu, J., et al., *The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16125-34.

22. Neumann-Giesen, C., et al., *Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 395-406.
23. de Gassart, A., et al., *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4336-44.
24. Santamaria, A., et al., *PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1900-11.
25. Dermine, J.F., et al., *Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18507-12.
26. Hazarika, P., et al., *Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation*. J Cell Biochem, 1999. **75**(1): p. 147-59.
27. Hazarika, P., et al., *Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7361-9.
28. Lopez-Casas, P.P. and J. del Mazo, *Regulation of flotillin-1 in the establishment of NIH-3T3 cell-cell interactions*. FEBS Lett, 2003. **555**(2): p. 223-8.
29. Kato, N., M. Nakanishi, and N. Hirashima, *Flotillin-1 regulates IgE receptor-mediated signaling in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 147-54.
30. Stuermer, C.A., et al., *PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1731-3.
31. Sugawara, Y., et al., *The lipid raft proteins flotillins/reggies interact with Galphaq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase*. Cell Signal, 2007. **19**(6): p. 1301-8.
32. Amaddii, M., et al., *Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7265-78.
33. Czech, M.P., *Lipid rafts and insulin action*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 147-8.
34. Baumann, C.A., et al., *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 202-7.
35. Mitra, P., X. Zheng, and M.P. Czech, *RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and Crkl function in the regulation of GLUT4 by insulin*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37431-5.
36. Tomasovic, A., S. Traub, and R. Tikkanen, *Molecular networks in FGF signaling: flotillin-1 and cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29739.
37. Munderloh, C., et al., *Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons*. J Neurosci, 2009. **29**(20): p. 6607-15.
38. Galbiati, F., et al., *Identification, sequence and developmental expression of invertebrate flotillins from Drosophila melanogaster*. Gene, 1998. **210**(2): p. 229-37.
39. Langhorst, M.F., A. Reuter, and C.A. Stuermer, *Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2228-40.
40. von Philipsborn, A.C., et al., *Restricted expression of reggie genes and proteins during early zebrafish development*. J Comp Neurol, 2005. **482**(3): p. 257-72.
41. Hoehne, M., et al., *Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in Drosophila: they are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development*. Mol Cell Neurosci, 2005. **30**(3): p. 326-38.
42. Pandur, P.D., et al., *Xenopus flotillin1, a novel gene highly expressed in the dorsal nervous system*. Dev Dyn, 2004. **231**(4): p. 881-7.
43. Wakasugi, K., et al., *Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(2): p. 453-60.
44. Riento, K., et al., *Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 912-8.
45. Ait-Slimane, T., et al., *Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(17): p. 3792-800.
46. Cremona, M.L., et al., *Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT*. Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 469-77.
47. Sorkina, T., J. Caltagarone, and A. Sorkin, *Flotillins regulate membrane mobility of the dopamine transporter but are not required for its protein kinase C dependent endocytosis*. Traffic, 2013. **14**(6): p. 709-24.
48. Ge, L., et al., *Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 551-6.

49. Gomez, V., et al., *Regulation of aurora B kinase by the lipid raft protein flotillin-1*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20683-90.
50. Giri, B., et al., *CXCL12-induced partitioning of flotillin-1 with lipid rafts plays a role in CXCR4 function*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2104-16.
51. Affentranger, S., et al., *Dynamic reorganization of flotillins in chemokine-stimulated human T-lymphocytes*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 28.
52. Langhorst, M.F., et al., *Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 711-3.
53. Valensin, S., et al., *F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 435-46.
54. Slaughter, N., et al., *The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation*. Clin Immunol, 2003. **108**(2): p. 138-51.
55. Tu, X., et al., *Proteome analysis of lipid rafts in Jurkat cells characterizes a raft subset that is involved in NF-kappaB activation*. J Proteome Res, 2004. **3**(3): p. 445-54.
56. Kim, E.K. and E.J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(4): p. 396-405.
57. Schubert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 295-308.
58. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-67.
59. Lin, C., et al., *Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(10): p. 3089-99.
60. Kurrle, N., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 575.
61. Li, L., et al., *Microrna-124 targets flotillin-1 to regulate proliferation and migration in breast cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 163.
62. Winship, A.L., K. Rainczuk, and E. Dimitriadis, *Flotillin-1 protein is upregulated in human endometrial cancer and localization shifts from epithelial to stromal with increasing tumor grade*. Cancer Invest, 2016. **34**(1): p. 26-31.
63. Wang, X., et al., *Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 190.
64. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
65. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. Gene, 2006. **366**(1): p. 2-16.
66. Kamimura, D., K. Ishihara, and T. Hirano, *IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **149**: p. 1-38.
67. Wang, X., et al., *Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes*. J Transl Med, 2013. **11**(1): p. 190.
68. Zhu, Z., et al., *Flotillin2 expression correlates with HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62365.
69. Banning, A., C.R. Regenbrecht, and R. Tikkanen, *Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model*. Cell Signal, 2014. **26**(2): p. 198-207.
70. Berger, T., et al., *Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model*. Oncogene, 2013. **32**(41): p. 4989-94.
71. Chiesa, R. and D.A. Harris, *Fishing for prion protein function*. PLoS Biol, 2009. **7**(3): p. e75.
72. Malaga-Trillo, E., et al., *Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein*. PLoS Biol, 2009. **7**(3): p. e55.
73. Kazlauskaitė, J. and T.J. Pinheiro, *Aggregation and fibrillization of prions in lipid membranes*. Biochem Soc Symp, 2005(72): p. 211-22.
74. Pimpinelli, F., S. Lehmann, and I. Maridonneau-Parini, *The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(8): p. 2063-72.
75. Weissmann, C., *The state of the prion*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(11): p. 861-71.
76. Jacobowitz, D.M. and A.T. Kallarakal, *Flotillin-1 in the substantia nigra of the Parkinson brain and a predominant localization in catecholaminergic nerves in the rat brain*. Neurotox Res, 2004. **6**(4): p. 245-57.
77. Rajendran, L., et al., *Increased Abeta production leads to intracellular accumulation of Abeta in flotillin-1-positive endosomes*. Neurodegener Dis, 2007. **4**(2-3): p. 164-70.

78. Girardot, N., et al., *Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003. **29**(5): p. 451-61.
79. Schneider, A., et al., *Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons*. *J Neurosci*, 2008. **28**(11): p. 2874-82.
80. Chen, T.Y., et al., *The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **342**(1): p. 266-72.
81. John, B.A., et al., *Flotillins bind to the dileucine sorting motif of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting*. *FEBS J*, 2014. **281**(8): p. 2074-87.
82. Bitsikas, V., et al., *The role of flotillins in regulating abeta production, investigated using flotillin 1-/-, flotillin 2-/- double knockout mice*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85217.
83. Kioka, N., K. Ueda, and T. Amachi, *Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction*. *Cell Struct Funct*, 2002. **27**(1): p. 1-7.
84. Cornfine, S., et al., *The kinesin KIF9 and reggie/flotillin proteins regulate matrix degradation by macrophage podosomes*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(2): p. 202-15.
85. Ludwig, A., et al., *Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(4): p. 771-81.
86. Bared, S.M., et al., *Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(12): p. 5399-407.
87. Kurrle, N., et al., *Flotillins directly interact with gamma-catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e84393.
88. Schroeder, W.T., et al., *The human gene for an epidermal surface antigen (M17S1) is located at 17q11-12*. *Genomics*, 1991. **11**(2): p. 481-2.
89. Sasaki, Y., et al., *Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of p53 family members*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(3): p. 395-406.
90. Iida, S., et al., *Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation*. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(2): p. 481-90.
91. Juarez, M.T., et al., *Duox, Flotillin-2, and Src42A are required to activate or delimit the spread of the transcriptional response to epidermal wounds in Drosophila*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(12): p. e1002424.
92. Babuke, T., et al., *Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis*. *Cell Signal*, 2009. **21**(8): p. 1287-97.
93. Yap, J., et al., *Proteomic analysis identifies interleukin 11 regulated plasma membrane proteins in human endometrial epithelial cells in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. **9**: p. 73.
94. James, D.J., et al., *Skeletal muscle of stroke-prone spontaneously hypertensive rats exhibits reduced insulin-stimulated glucose transport and elevated levels of caveolin and flotillin*. *Diabetes*, 2001. **50**(9): p. 2148-56.
95. Monje, F.J., et al., *Flotillin-1 is an evolutionary-conserved memory-related protein up-regulated in implicit and explicit learning paradigms*. *Ann Med*, 2013. **45**(4): p. 301-7.
96. Wu, Y., et al., *Flotillin-2 is an acrosome-related protein involved in mouse spermiogenesis*. *J Biomed Res*, 2012. **26**(4): p. 278-87.
97. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(5): p. 341-54.
98. Kainulainen, V., et al., *A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(12): p. 8641-9.
99. Vaskovsky, A., et al., *ErbB-4 activation promotes neurite outgrowth in PC12 cells*. *J Neurochem*, 2000. **74**(3): p. 979-87.
100. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(5): p. 361-70.
101. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer*. *FEBS J*, 2010. **277**(2): p. 301-8.
102. Gullick, W.J., et al., *The structure and function of the epidermal growth factor receptor studied by using antisynthetic peptide antibodies*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1985. **226**(1242): p. 127-34.
103. Red Brewer, M., et al., *The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain*. *Mol Cell*, 2009. **34**(6): p. 641-51.
104. Huse, M. and J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 275-82.

105. Jones, J.T., R.W. Akita, and M.X. Sliwkowski, *Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 227-31.
106. Linggi, B. and G. Carpenter, *ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(12): p. 649-56.
107. Schneider, M.R. and E. Wolf, *The epidermal growth factor receptor ligands at a glance*. J Cell Physiol, 2009. **218**(3): p. 460-6.
108. Meert, A.P., et al., *Is there a relationship between c-erbB-1 and c-erbB-2 amplification and protein overexpression in NSCLC?* Lung Cancer, 2005. **47**(3): p. 325-36.
109. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. Cell, 2002. **110**(6): p. 763-73.
110. Chen, X.W., et al., *RalA-exocyst-dependent recycling endosome trafficking is required for the completion of cytokinesis*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38609-16.
111. Huang, Y., et al., *Growth hormone-induced phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor in 3T3-F442A cells. Modulation of EGF-induced trafficking and signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18902-13.
112. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
113. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.
114. Wendel, H.G., et al., *Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy*. Nature, 2004. **428**(6980): p. 332-7.
115. Marmor, M.D. and Y. Yarden, *Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases*. Oncogene, 2004. **23**(11): p. 2057-70.
116. Baulida, J., et al., *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 5251-7.
117. Pinkas-Kramarski, R., et al., *Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2452-67.
118. Wu, M.X., *Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 11-8.
119. Banning, A., et al., *Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45514.
120. Cartharius, K., et al., *MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites*. Bioinformatics, 2005. **21**(13): p. 2933-42.
121. Quandt, K., et al., *MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(23): p. 4878-84.
122. Newton, A.C., *Protein kinase C: poised to signal*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E395-402.
123. Gan, X., et al., *PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC-delta phosphorylation and cell migration downstream of Galpha12*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 686-96.
124. Banning, A., et al., *Flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and cancer*. Cells, 2014. **3**(1): p. 129-49.
125. Fukuda, M., Y. Gotoh, and E. Nishida, *Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1901-8.
126. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors*. Gene, 2004. **324**: p. 1-14.
127. Cruzalegui, F.H., E. Cano, and R. Treisman, *ERK activation induces phosphorylation of Elk-1 at multiple S/T-P motifs to high stoichiometry*. Oncogene, 1999. **18**(56): p. 7948-57.
128. Gille, H., A.D. Sharrocks, and P.E. Shaw, *Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 414-7.
129. Rao, V.N. and E.S. Reddy, *elk-1 proteins interact with MAP kinases*. Oncogene, 1994. **9**(7): p. 1855-60.
130. Seth, A., et al., *A phosphorylation site located in the NH2-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression*. J Biol Chem, 1991. **266**(35): p. 23521-4.
131. Yang, S.H., et al., *The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 710-20.
132. Seth, A. and D.K. Watson, *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2462-78.
133. Wasylyk, B., S.L. Hahn, and A. Giovane, *The Ets family of transcription factors*. Eur J Biochem, 1993. **211**(1-2): p. 7-18.

134. Patki, M., et al., *The ETS domain transcription factor ELK1 directs a critical component of growth signaling by the androgen receptor in prostate cancer cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(16): p. 11047-65.
135. Finkbeiner, S. and M.E. Greenberg, *Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression*. J Neurobiol, 1998. **37**(1): p. 171-89.
136. Cowley, D.O. and B.J. Graves, *Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 366-76.
137. Tootle, T.L. and I. Rebay, *Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily*. Bioessays, 2005. **27**(3): p. 285-98.
138. van den Akker, E., et al., *FLI-1 functionally interacts with PIASxalpha, a member of the PIAS E3 SUMO ligase family*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38035-46.
139. Miano, J.M., *Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(6): p. 577-93.
140. Sarkar, A., et al., *Serum response factor expression is enriched in pancreatic beta cells and regulates insulin gene expression*. FASEB J, 2011. **25**(8): p. 2592-603.
141. Boros, J., et al., *Overlapping promoter targeting by Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor family members*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(22): p. 7368-80.
142. Hahne, J.C., et al., *Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth*. Oncogene, 2005. **24**(34): p. 5384-8.
143. Nilsson, M., et al., *Elk1 and SRF transcription factors convey basal transcription and mediate glucose response via their binding sites in the human LXRB gene promoter*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4858-68.
144. Lee, J.L., *Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning*. Nat Neurosci, 2008. **11**(11): p. 1264-6.
145. Maddox, S.A., M.S. Monsey, and G.E. Schafe, *Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala*. Learn Mem, 2011. **18**(1): p. 24-38.
146. Arora, S., et al., *Egr1 regulates the coordinated expression of numerous EGF receptor target genes as identified by ChIP-on-chip*. Genome Biol, 2008. **9**(11): p. R166.
147. Baron, V., et al., *The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(2): p. 115-24.
148. Krones-Herzig, A., et al., *Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5133-43.
149. Sakamoto, K.M., et al., *5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8*. Oncogene, 1991. **6**(5): p. 867-71.
150. Liu, C., et al., *Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1*. Cancer Gene Ther, 1998. **5**(1): p. 3-28.
151. Milbrandt, J., *A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor*. Science, 1987. **238**(4828): p. 797-9.
152. Silverman, E.S. and T. Collins, *Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology*. Am J Pathol, 1999. **154**(3): p. 665-70.
153. Sukhatme, V.P., et al., *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization*. Cell, 1988. **53**(1): p. 37-43.
154. Baron, V., et al., *Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1002**: p. 197-216.
155. Virolle, T., et al., *Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 11802-10.
156. Wang, B., et al., *A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3071-7.
157. Gregg, J. and G. Fraizer, *Transcriptional Regulation of EGR1 by EGF and the ERK Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells*. Genes Cancer, 2011. **2**(9): p. 900-9.
158. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-310.
159. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
160. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
161. Yang, Z.Z., et al., *Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32124-31.

162. Chaqour, B., R. Yang, and Q. Sha, *Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20608-22.
163. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 150-8.
164. Vanhaesebroeck, B., L. Stephens, and P. Hawkins, *PI3K signalling: the path to discovery and understanding*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(3): p. 195-203.
165. Bozulic, L. and B.A. Hemmings, *PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 256-61.
166. Surucu, B., et al., *In vivo analysis of protein kinase B (PKB)/Akt regulation in DNA-PKcs-null mice reveals a role for PKB/Akt in DNA damage response and tumorigenesis*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 30025-33.
167. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
168. Brognard, J., et al., *PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms*. Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 917-31.
169. Leslie, N.R., et al., *The significance of PTEN's protein phosphatase activity*. Adv Enzyme Regul, 2009. **49**(1): p. 190-6.
170. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
171. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
172. Logie, L., et al., *Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2218-27.
173. Burke, R.E., *Inhibition of mitogen-activated protein kinase and stimulation of Akt kinase signaling pathways: Two approaches with therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disease*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(3): p. 261-77.
174. Dudek, H., et al., *Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt*. Science, 1997. **275**(5300): p. 661-5.
175. Peck, G.R., et al., *Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30016-23.
176. Ramm, G., et al., *A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 29174-80.
177. Sano, H., et al., *Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14599-602.
178. Chen, J., et al., *Serum response factor regulates bone formation via IGF-1 and Runx2 signals*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(8): p. 1659-68.
179. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 689-701.
180. Rena, G., et al., *Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17179-83.
181. Du, K. and M. Montminy, *CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32377-9.
182. Li, B., M.A. Kaetzel, and J.R. Dedman, *Signaling pathways regulating murine cardiac CREB phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(1): p. 179-84.
183. Wang, J.M., et al., *The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6195-206.
184. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.
185. Reiling, J.H. and D.M. Sabatini, *Stress and mTOR signaling*. Oncogene, 2006. **25**(48): p. 6373-83.
186. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. Cell, 2002. **110**(2): p. 177-89.
187. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. 1296-302.
188. Roux, P.P., et al., *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13489-94.
189. Feng, Z., et al., *The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8204-9.

190. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
191. Smith, E.M., et al., *The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18717-27.
192. Garcia-Martinez, J.M. and D.R. Alessi, *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)*. Biochem J, 2008. **416**(3): p. 375-85.
193. Guertin, D.A., et al., *Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1*. Dev Cell, 2006. **11**(6): p. 859-71.
194. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity*. Cell, 2006. **127**(1): p. 125-37.
195. Sarbassov, D.D., S.M. Ali, and D.M. Sabatini, *Growing roles for the mTOR pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 596-603.
196. Bryk, B., et al., *MAP4K3 regulates body size and metabolism in Drosophila*. Dev Biol, 2010. **344**(1): p. 150-7.
197. Findlay, G.M., et al., *A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling*. Biochem J, 2007. **403**(1): p. 13-20.
198. Kim, E., et al., *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 935-45.
199. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
200. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. Science, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.
201. Yan, L., et al., *PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 633-42.
202. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 307-18.
203. Mayer, C., et al., *mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 423-34.
204. Shor, B., et al., *Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15380-92.
205. Duvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 171-83.
206. Pena-Llopis, S. and J. Brugarolas, *TFEB, a novel mTORC1 effector implicated in lysosome biogenesis, endocytosis and autophagy*. Cell Cycle, 2011. **10**(23): p. 3987-8.
207. Zhu, Y., et al., *Regulation of fatty acid metabolism by mTOR in adult murine hearts occurs independently of changes in PGC-1alpha*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(1): p. H41-51.
208. Ganley, I.G., et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12297-305.
209. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1981-91.
210. Jung, C.H., et al., *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1992-2003.
211. Settembre, C. and A. Ballabio, *TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes*. Autophagy, 2011. **7**(11): p. 1379-81.
212. Rosenbluth, J.M., et al., *A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(19): p. 5951-64.
213. Rosenbluth, J.M. and J.A. Pietsenpol, *mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73*. Autophagy, 2009. **5**(1): p. 114-6.
214. Blouet, C., H. Ono, and G.J. Schwartz, *Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis*. Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 459-67.
215. Cota, D., et al., *The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity*. J Neurosci, 2008. **28**(28): p. 7202-8.
216. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis*. Curr Biol, 2009. **19**(22): p. R1046-52.
217. Ozcan, U., et al., *Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis*. Mol Cell, 2008. **29**(5): p. 541-51.

218. Espenshade, P.J. and A.L. Hughes, *Regulation of sterol synthesis in eukaryotes*. *Annu Rev Genet*, 2007. **41**: p. 401-27.
219. Blanchard, P.G., et al., *Major involvement of mTOR in the PPARgamma-induced stimulation of adipose tissue lipid uptake and fat accretion*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(6): p. 1117-25.
220. Gagnon, A., S. Lau, and A. Sorisky, *Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion*. *J Cell Physiol*, 2001. **189**(1): p. 14-22.
221. Kim, J.E. and J. Chen, *regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis*. *Diabetes*, 2004. **53**(11): p. 2748-56.
222. Polak, P., et al., *Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration*. *Cell Metab*, 2008. **8**(5): p. 399-410.
223. Kumar, A., et al., *Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism*. *Diabetes*, 2010. **59**(6): p. 1397-406.
224. Joshi, S.K., et al., *mTOR regulates fatty infiltration through SREBP-1 and PPARgamma after a combined massive rotator cuff tear and suprascapular nerve injury in rats*. *J Orthop Res*, 2013. **31**(5): p. 724-30.
225. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(5): p. 649-88.
226. Dowell, P., et al., *Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15901-7.
227. Khamzina, L., et al., *Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance*. *Endocrinology*, 2005. **146**(3): p. 1473-81.
228. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity*. *Nature*, 2004. **431**(7005): p. 200-5.
229. Wang, X. and C.G. Proud, *The mTOR pathway in the control of protein synthesis*. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 362-9.
230. Bentzinger, C.F., et al., *Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy*. *Cell Metab*, 2008. **8**(5): p. 411-24.
231. Cetin, B., et al., *Acute cholecystitis in a patient with metastatic renal cell carcinoma treated with everolimus*. *J Oncol Pharm Pract*, 2011. **17**(3): p. 274-8.
232. Hsieh, A.C., et al., *Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(3): p. 249-61.
233. Guertin, D.A., et al., *mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 148-59.
234. Hietakangas, V. and S.M. Cohen, *TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 282.
235. Masri, J., et al., *mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor*. *Cancer Res*, 2007. **67**(24): p. 11712-20.
236. Wander, S.A., B.T. Hennessy, and J.M. Slingerland, *Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(4): p. 1231-41.
237. Chresta, C.M., et al., *AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 288-98.
238. Feldman, M.E., et al., *Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2*. *PLoS Biol*, 2009. **7**(2): p. e38.
239. Garcia-Martinez, J.M., et al., *Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR)*. *Biochem J*, 2009. **421**(1): p. 29-42.
240. Thoreen, C.C., et al., *An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 8023-32.
241. Yu, K., et al., *Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin*. *Cancer Res*, 2009. **69**(15): p. 6232-40.
242. Aggarwal, D., M.L. Fernandez, and G.A. Soliman, *Rapamycin, an mTOR inhibitor, disrupts triglyceride metabolism in guinea pigs*. *Metabolism*, 2006. **55**(6): p. 794-802.
243. Fraenkel, M., et al., *mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 945-57.
244. Houde, V.P., et al., *Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue*. *Diabetes*, 2010. **59**(6): p. 1338-48.

245. Brachmann, S., et al., *PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(2): p. 194-8.
246. Noh, W.C., et al., *Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **110**(3): p. 477-83.
247. Sawyers, C.L., *Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs?* *Cancer Cell*, 2003. **4**(5): p. 343-8.
248. Yu, K., et al., *mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2001. **8**(3): p. 249-58.
249. Bjedov, I., et al., *Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster**. *Cell Metab*, 2010. **11**(1): p. 35-46.
250. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. *Nature*, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
251. Kapahi, P. and B. Zid, *TOR pathway: linking nutrient sensing to life span*. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2004. **2004**(36): p. PE34.
252. Vellai, T., et al., *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans**. *Nature*, 2003. **426**(6967): p. 620.
253. Zinzalla, V., et al., *Activation of mTORC2 by association with the ribosome*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 757-68.
254. Griner, E.M. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 281-94.
255. Newton, A.C., *Regulation of protein kinase C*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): p. 161-7.
256. Steinberg, S.F., *Structural basis of protein kinase C isoform function*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(4): p. 1341-78.
257. Basu, A. and U. Sivaprasad, *Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision*. *Cell Signal*, 2007. **19**(8): p. 1633-42.
258. Caino, M.C., et al., *Non-small cell lung carcinoma cell motility, rac activation and metastatic dissemination are mediated by protein kinase C epsilon*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31714.
259. Mischak, H., et al., *Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(9): p. 6090-6.
260. Abou-Kandil, A., et al., *Differential role of PKC-induced c-Jun in HTLV-1 LTR activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in different human T-cell lines*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29934.
261. Aziz, M.H., et al., *Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8828-38.
262. Boyle, W.J., et al., *Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity*. *Cell*, 1991. **64**(3): p. 573-84.
263. Garg, R., et al., *Activation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) in prostate cancer is mediated by protein kinase C epsilon (PKCepsilon)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(44): p. 37570-82.
264. Ng, S.W., et al., *Cysteinyl leukotriene type 1 receptor desensitization sustains Ca²⁺-dependent gene expression*. *Nature*, 2012. **482**(7383): p. 111-5.
265. Satoh, A., et al., *PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **287**(3): p. G582-91.
266. Yoshida, K., H. Liu, and Y. Miki, *Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5734-40.
267. Kishimoto, A., et al., *Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(6): p. 2273-6.
268. Castagna, M., et al., *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
269. Hurley, J.H., et al., *Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains*. *Protein Sci*, 1997. **6**(2): p. 477-80.
270. Hwang, Y.P., et al., *Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase Cdelta/p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression*. *Mol Nutr Food Res*, 2010. **54**(7): p. 977-90.
271. Arai, F., et al., *The expression and role of non-canonical (PKC) signaling in nucleus pulposus cell metabolism*. *J Orthop Res*, 2012. **30**(9): p. 1478-85.

272. Ueda, Y., et al., *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23512-9.
273. Yokoyama, K., et al., *C-Fos regulation by the MAPK and PKC pathways in intervertebral disc cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73210.
274. Dunnmon, P.M., et al., *Phorbol esters induce immediate-early genes and activate cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells*. J Mol Cell Cardiol, 1990. **22**(8): p. 901-10.
275. Liu, X., et al., *Phorbol ester-induced human cytomegalovirus major immediate-early (MIE) enhancer activation through PKC-delta, CREB, and NF-kappaB desilences MIE gene expression in quiescently infected human pluripotent NTera2 cells*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8495-508.
276. Fiume, G., et al., *Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF-kappaB via physical interaction with IkappaB-alpha and p65*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(8): p. 3548-62.
277. Lallena, M.J., et al., *Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2180-8.
278. Press, R.D., et al., *Control of the expression of c-sis mRNA in human glioblastoma cells by phorbol ester and transforming growth factor beta 1*. Cancer Res, 1989. **49**(11): p. 2914-20.
279. Baier, G., *The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 64-79.
280. Manicassamy, S., et al., *Differential roles of PKC-theta in the regulation of intracellular calcium concentration in primary T cells*. J Mol Biol, 2006. **355**(3): p. 347-59.
281. Suzuki, K. and H. Namiki, *Phorbol 12-myristate 13-acetate induced cell death of porcine peripheral blood polymorphonuclear leucocytes*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(6): p. 367-72.
282. Takei, H., et al., *Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(2): p. 229-40.
283. Pearce, M.M., et al., *SPFH2 mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and other substrates in mammalian cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20104-15.
284. Salzer, U. and R. Prohaska, *Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts*. Blood, 2001. **97**(4): p. 1141-3.
285. Tavernarakis, N., M. Driscoll, and N.C. Kyrpides, *The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(11): p. 425-7.
286. Huber, T.B. and T. Benzing, *The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(3): p. 211-6.
287. Reuter, A.T., C.A. Stuermer, and H. Plattner, *Identification, localization, and functional implications of the microdomain-forming stomatin family in the ciliated protozoan Paramecium tetraurelia*. Eukaryot Cell, 2013. **12**(4): p. 529-44.
288. Lee, M.H., et al., *ASURA (PHB2) Is Required for Kinetochores Assembly and Subsequent Chromosome Congression*. Acta Histochem Cytochem, 2011. **44**(6): p. 247-58.
289. Nuell, M.J., et al., *Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1372-81.
290. Kathiria, A.S., et al., *Prohibitin attenuates colitis-associated tumorigenesis in mice by modulating p53 and STAT3 apoptotic responses*. Cancer Res, 2012. **72**(22): p. 5778-89.
291. Theiss, A.L., et al., *Interleukin-6 transcriptionally regulates prohibitin expression in intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12804-12.
292. Theiss, A.L., et al., *Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4412-23.
293. Coates, P.J., et al., *Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence*. Exp Cell Res, 2001. **265**(2): p. 262-73.
294. McKinsey, T.A., et al., *Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 106-11.
295. Molkenin, J.D. and E.N. Olson, *Defining the regulatory networks for muscle development*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(4): p. 445-53.
296. Sun, L., et al., *Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 14): p. 3021-9.
297. Chen, J.C., et al., *Up-regulation of stomatin expression by hypoxia and glucocorticoid stabilizes membrane-associated actin in alveolar epithelial cells*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(7): p. 863-72.
298. Wang, Y., et al., *Distribution of stomatin expressing in the central nervous system and its up-regulation in cerebral cortex of rat by hypoxia*. J Neurochem, 2011. **116**(3): p. 374-84.

299. Song, L., et al., *Flotillin-1 promotes tumor necrosis factor-alpha receptor signaling and activation of NF-kappaB in esophageal squamous cell carcinoma cells*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 995-1005 e12.
300. Wang, Y.L., et al., *Expression of flotillin-2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with tumor progression and patient survival*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 601-7.
301. Thorn, C.C., et al., *Laser microdissection expression profiling of marginal edges of colorectal tumours reveals evidence of increased lactate metabolism in the aggressive phenotype*. Gut, 2009. **58**(3): p. 404-12.
302. Pust, S., et al., *Flotillins as regulators of ErbB2 levels in breast cancer*. Oncogene, 2013. **32**(29): p. 3443-51.
303. Koh, M., et al., *A novel role for flotillin-1 in H-Ras-regulated breast cancer aggressiveness*. Int J Cancer, 2016. **138**(5): p. 1232-45.
304. Zhang, S.H., et al., *High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e64709.
305. Liu, Y., et al., *High expression of flotillin-2 is associated with poor clinical survival in cervical carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 622-8.
306. Wen, Q., et al., *FLOT-2 is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(7): p. 8236-43.
307. Cao, S., et al., *Upregulation of flotillin-1 promotes invasion and metastasis by activating TGF-beta signaling in nasopharyngeal carcinoma*. Oncotarget, 2015.
308. Thomas, R.S., et al., *Clathrin-mediated endocytic proteins are upregulated in the cortex of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(4): p. 656-61.

10 Anhang

Flot1-2600Flotillin1 2600 fwd; Flotillin1 prom rev

5'-

AtgctcgcacatgtgctgcagcccgggatctcaccacccccactcagactcaCacactcacaacgtgcagttgggcccctaggattgtcatgt
caagtctccaccActcccttgtttaatcgtcggattccagcccgtgctgccaaccgctccccaGctgcgggaggaggagtagaaggaccg
cccaatctcaggagcacataaattaCctctgccggcagccgaccctcacttggccttacactccgctcggctcaccatgtGtactctgcagctgc
accgacatgacatcctgcaggccccgacccccggcCcctccaccatcccgggacccccggcgggctccggtcctgagatctcaccctcGac
cctctcccggagcccgcagcggcccctgccgggcccagcgcctctcgcgGgcaccgaaagcgcagccgcagggttctcaccctcgatgg
tgagtatcgcgaAgtgggcattcgcggggtgcgctgccctggagtcactggggaaacgaccgactccagAggcctcgcacctgactgtcctgtt
ttgtctcccctaggctccggcggcagctgCcagtcgaggaaccgaaccagccaaaaggcttcttctgctgctcaccatcgtcttctgcagatcct
gatggctgaagaggggtgcccggcccctgctccagaggacgcccctaacgcccacccctggcggcccaccctgtgtccccctcctcgagc
ccttaatctgactcggagccctcggactacgctctggacctcagcacttctccagcaacacccggcgccttctaactgtgactccccgactccc
caaaaagaatccgaaaaccacaagaacaccaggcgtacctggtgcgcgagagcgtatcccaactgggactccgaggcaactgaaact
agaactacagcggagacgcccaccgggtgctgagcgggaccgagcgcacagagaccgagcgcataagagaccgagcagagcccag
ctggggctaggccccgggtgggaaggagagcgtcgttaatttcttattgtcctaattaataattatgtattatgtacgtcctcctaggatgagatg
tgtacgtaataattttaaactatgcaaggggtgagatgttccccctgctgtaaatgcaggctccttggtattattgagcttgggactggtggaagca
ggacactggaactgcggcaaatgaggagaagaatggggaggactcgggtgggggaggacgtcccggctgggatgaagtctggtggtggtc
gtaagtttagaggtgactcctccagcatcacaactcctgctactgtgtgagactcgggaccattaggaatgagatccgtgagatcctc
catctctgaaagtcgctttaggggtgctgcaggtagaggggtgggggtggtgggctgtcacggagcgcactgtcgcagatcgcctagatgtctgta
acacaataaaatgattactgtctgcagctgtgagtgatcttgcgaagcgcgactccccactcctccggccttcagatggcaaggaccggcggg
aggcgcgctggccgagctcccagcccgcacctcctggcccaggagcccctttctggagtcacagaaccagcatccgggtgccggatgta
gtcttctcattgccagctcgcggtttcccaggtagtggcccgcggcgaatccgagatgtggcaatcaccttacgcccagggtgccaggcggaggta
agtccctcaccggggggcggagcgtggcgcggcgtggcgggattcccggctcaagaaggcgggtgactggggcggcagggatgtggccctcc
ccgggctaaccaggcagcccggctggcccgcagagccagcggcggcgggctgaggactctagcggggcctgcccggaaagggggcggg
cgagcgcactggccgaggcgggccaagtgggggtgcttagtccgttgcggggggcggggtcgcgtctgcccagcaacggggtgcggcagg
gtggggaacgcgggagcggggccagctcccaggaaagctggtctgcgagcggcccctgcccggctcccaggctcctgcccagccccgctcc
cgagaccccagcccggctgcccggcgtcccggaaaggtgagtgggggaggggagatggagcctggggctgcccgagaagcagggagagag
gggaaaggtctgcaggcctctggcgcggggacccttatacaaggagcggcgaaggggagggaccatacgcaggcgggagaagag
gtagctgggatcttaaggatgttagggaaaagccttagcggacccatgggtgtagaaggacgggcccgtgcccggatgcagactgggagggcc
tgacgggaaagggaaaggatggcccctgtggaagcgcagcgcctccccatccgcaaaggcttccctcctcctccagctccagcctga
acatg-3'

Flot1-1330

5'tgtctccccttaggtccggcgcagctgccagtcgaggaaccgaaccagccaaaaggcttcttctgctgctcaccatcgtcttctgcca
atcctgatggctgaagaggggtgcccggcggcccctgctccagaggacgcccctaacgccc-
catcccctggcggccaccctgtgtccccctcctcagccccttaactctgacttcg-
gagccctcggactacgctctggacctcagcacttctccag-
caacacccggcgccttctaactgtgactccccgactccccaaaagaatccgaaaaac-
cacaagaacaccaggcgtacctggtgcgcgagagcgtatcccaactgg-
gacttccgaggcaactgaaactcagaacactacagcggagacgcccaccgggtgctt-
gaggcgggaccgagcgcacagagaccgagcgcataagagac-
cgaggcacagcccagctggggctaggcccgggtggaaggagagcgtcgttaatttct-
tattgtcctaattaataattatgtattatgtacgtcctcctaggatgagatg-
tacgtaataattttaaactatgcaaggggtgagatgtccccctgctg-
taaatgcaggtcttggatattttagccttgggactggtggaagcaggacactg-
gaactgcggcaagtaggagaagaatggggaggactcgggtgggggaggac-
gtcccggctgggatgaagtctggtgggtggtgtaagttaggaggtgactg-
catcctccagcatcacaactccgtctgctactgtgagactcggcggaccattaggaatgagatccgtgagatccttccatcttct-
gaatgagatccgtgagatcctccatcttctgaagtcgctttaggggtgctgaggtagaggggtgggggtggtgggctgtcac-
gaagtgcctttaggtggctgaggttagaggggtgggggtggtgggctgtcac-
ggagcgcactgtcagatcgcctagatgtctgtgaacacaataaaatgat-
ttactgtctgcagctttagtcttcttgaagcgcgactccccac-
tctcccggccttcagatggcaaggaccggcgggaggcggcctggccgag-
tcccagcccgcacctcctggcccaggagcccctttctggagtcacagaaccag-
catccgggtgccggatgtagcttctcattgccagctctgcccgtttccaggtagt-
gccccggcgaatccgagatgtggcaatcaccttacgcccagggtgccaggcg-
gaggtcaagctccctaccggggggcggagcgtggcgcggcgtggcgggat-

tccggctcaagaagggcgggtgactggggcggcagggatgtggcctccccgggctaac-
caggcagcccggctgggcccagagaccagcggggcgggctgctg-
gactctagcggggcctgcccggaaagggcgggcccagcgcactgggcccagggcggggcgaagtgggggtgcttagtccgtt-
tgggcccaggcggggcgaagtgggggtgcttagtccgtt-
gcgggggcggggctgctgctgcccagcaacggggtgcccaggggtggggaacgcgggagcggggccagctcccaggaaa-
gagcggggccagctcccaggaaagctggtctgagcggcccctgcccggctcccaggctcctgcgcgacccccccctcccga-
gctggtctgagcggccccctgcccggctcccaggctcctgcgcgacccccccctcccga-
gacccagccgggctgcccggcctgcccggaaaggtgagtgggggagggga-
gatggagcctggggctgcccgagaagcagggagagaggggaaaggtctg-
caggcctctgggcccggggacctttatcaaagggagcggcgaggggaagggagggac-
catacgcaggcggagaagaggtagctggggatctaaggattttgtagggaaaa-
gccttagcggaccatgggtgtagaagggacgggcccgtggcggatgcagactgg-
gagggcctgacgggaaagggaaaggtggggcccctgtggac-
gccacagcgcgcttccccatccgcaaaggtttccctccctcctccagctccagcctgaacctg-3'

Flot1-630

5'Agagccagcggcggggcgggtgctgaggactctagcggggcctgcccggaaagggcgggcccagcgcactgggcccagggcgggg-
gaagtgggggtgcttagtccgttgcggggggcgggctgctgcccagcaac-
gggggtgcccaggggtggggaacgcgggagcggggccagctcccaggaaa-
gctggtctgagcggccccctgcccggctcccaggctcctgcgcgacccccccctcccga-
gacccagccgggctgcccggcctgcccggaaaggtgagtgggggagggga-
gatggagcctggggctgcccgagaagcagggagagaggggaaaggtctg-
caggcctctgggcccggggacctttatcaaagggagcggcgaggggaagggagggac-
catacgcaggcggagaagaggtagctggggatctaaggattttgtagggaaaa-
gccttagcggaccatgggtgtagaagggacgggcccgtggcggatgcagactgg-
gagggcctgacgggaaagggaaaggtggggcccctgtggac-
gccacagcgcgcttccccatccgcaaaggtttccctccctcctccagctccagcctgaacctg-3'

Flot1-375

5'ccgagaccccagccgggctgcccggcctgcccggaaaggtgagtgggggaggggagatggagcctggggctgcccgagaagcagggga-
gagaggggaaaggtctgagccctggtggcgggggac-
ctttatcaaagggagcggcgaggggaagggagggaccatacgcaggcggagaa-
gaggtagctggggatctaaggattttgtagggaaaagccttagcggaccatgggtg-
tagaagggacgggcccgtggcggatgcagactgggagggcctgacgg-
gaaagggaaaggtggggcccctgtggacgccacagcgcgcttccccatccg-
caaaggtttccctccctcctccagctccagcctgaacctg-3'

Flot2-2130

5'cagaggccctaaggcagaagttcctggtgcttgagaaggctaattgggctggaacagagtgaggggggagagtggaagaggtga-
ggctatagagaggcactgtgctgtagggttggaggagggttac-
tataggcattctgctttactctgagtgagataattggggatccagagcaaaccttt-
gtcttatggaagaggtataccaggataacaagatctgtcatattcatattaccatactg-
cattttagatgactgcctaaggctcattagtaattataatagcagatgcacaatt-
agcctttatgaagctttattacactccatataactaatgtccaaaatagtggtg-
tatactgcaagtaactaataaatgctggttaacaaggaacaggactgagctagaa-
gaaaagatggagagagactgagaattgttcagacatgggacacag-
catgaacaaaatctgggatggtgggtgaacaagcagctggtggaagcga-
gaggctcatgaggaaatgagtgaaatcacctcgcagaagccccgaatgctggtaaa-
tactatcctggttccctgaaaccagattctgcccctgttcttagctgttc-
tattttttgtgtgttttttttaagagacagagctgactatggtgccag-
tctggtctcaaacctcctgggctcaagtgatcctcctgctccgctcccag-
tagctgtgactgtaatacacaccactgtgcttagcccagctcctttcttctcctgcc-
tacagggcctgtgaactcggagctgttctgcccagctgctggtgagctgcccac-
ttttgcccattggctggtgctcggggcaccagaggggggagccaga-
caccctgtattgtctctacaagagggcatcgagcccctcagtgggagatattt-
gccaaactgcatggaagaggtgctccagctgcccagacgaccggcagccatcggc-
tatgggagccagcaagaggtgagggctgggctgggctggggag-
gatgctgaacccgatgaagaccccagctgagggactcagagggcccatcttctaa-
gacccccccacctgaggagcccacagtttctcaacctaccccagccctcagagctcac-

cagattgtctaagatgacgcaccgaattcaggctaaagttgagcctga-
gatccagctctcctaaccctcaggccaggatgcttgccatggcacttcatggcctt-
gaaaacctcggatgtgtgagggccatgccctggacactgacgggtttgatcttgac-
ctccgtggtacttctggtggcccaagctgtgccctggacatctctttcctggtt-
gaaggaataatgggtgatttcttctgagagtacagtaaccccagatggagaga-
taggggtatgctagacactgtgcttctcgaaatttgatgtag-
tatttcaggccccacccttattgattctgatcagctctggagcagaggcagggtt-
gcaatgtgatgactgccaacattgagaattagtgaaactgatcccttgaaccgttagc-
taggtagttaaattaccccattgtaatagaagcgggaatt-
aggctcccagactaaggactgcctagggtctcacagttagtagggaggggcctgg-
gatctgaaccaagggtctgaggccaggccgactgccgtaagatgggtgctga-
gaagtgagtcaggccaggccagctggtatcgagggtcccatgggagtaaggggac-
gcctccgggcggtatgagggtcgggtcatctgtatctgaagcccctcgaataaa-
gcggttgaccgccgaagctgcgtcactcctgcctcaacgcgcccggccccgcctccgcccacactccggcggggctgacgaccg-
gcccggccccgcctccgcccacacttccggcggggctgacgaccg-
cagaggggcgggcgagcgcgagcggcgccggcgctgggggtggcgggga-
taggctgggcgggccgctgcagaccgctgctgtgtccgggtctgtgctgcccaggggcctccgtgcccggcgccatg-3'

Flot2-1385

5'gtagctgtgactgtaaatacacaccactgtgcctagcccactccttcttctcctgacaggcctgtaactcggagctgttctcgcgc-
atgttctggatggctgcccactttgcccattggcttgctggtgctccgggac-
caagagggggtcccagacacccctgtattgtctctacaagagggcatcgagcccctcagtgaggatattttgccaactgcatgtggaa-
catcgagcccctcagtgaggatattttgccaactgcatgtggaa-
gaggtgcctcagctgcccagacgaccggcgagcccctcggctatgggaggccagcaa-
gaggtggcagggtcgggctgggaggatgctgaaccgatgaagaccccagctgag-
gactcagaggcccacttcttaagcacccccaccctgaggagcccacag-
tttcaaccttaccagcccctcagagctaccagattgttaagatgacgcac-
cgaattcaggctaaagttgagcctgagatccagctccttaaccctcaggccaggatgcttgcattcatggtccttgaacacctcg-
gatgcttgcattgacacttcatggtccttgaacacccctcggatgtgtgagggccatgccctggacactgacgggtttgatcttgac-
gatgtgtgagggccatgccctggacactgacgggtttgatcttgac-
ctccgtggtacttctggtggcccaagctgtgccctggacatctctttcctggtt-
gaaggaataatgggtgatttcttctgagagtacagtaaccccagatggagaga-
taggggtatgctagacactgtgcttctcgaaatttgatgtag-
tatttcaggccccacccttattgattctgatcagctctggagcagaggcagggtt-
gcaatgtgatgactgccaacattgagaattagtgaaactgatcccttgaaccgttagc-
taggtagttaaattaccccattgtaatagaagcgggaatt-
aggctcccagactaaggactgcctagggtctcacagttagtagggaggggcctgg-
gatctgaaccaagggtctgaggccaggccgactgccgtaagatgggtgctga-
gaagtgagtcaggccaggccagctggtatcgagggtcccatgggagtaaggggac-
gcctccgggcggtatgagggtcgggtcatctgtatctgaagcccctcgaataaa-
gcggttgaccgccgaagctgcgtcactcctgcctcaacgcgcccggccccgcctccgcccacacttccggcggggctgacgaccg-
gcccggccccgcctccgcccacacttccggcggggctgacgaccg-
cagaggggcgggcgagcgcgagcggcgccggcgctgggggtggcgggga-
taggctgggcgggccgctgcagaccgctgctgtgtccgggtctgtgctgcccaggggcctccgtgcccggcgccatg-3'

Flot2-930

5'agattgtctaagatgacgcaccgaattcaggctaaagttgagcctgagatccagctctcctaaccctcaggccaggatgcttgccatggcac-
ttcatggtccttgaacacccctcggatgtgtgagggccatgccctggacactgacgggtt-
gtgatcttgacctcgtggtacttctggtggcccaagctgtgccctg-
gacatctcttctggttgaaggaataatgggtgatttcttctgagagtacag-
taaccccagatggagagataggggtatgctagacactgtgcttctcgaaattt-
ggatgtagtattttagggccccacccttattgattctgatcagctctggag-
cagaggcagggttgaatgtgatgactgccaacattgagaattag-
tgaactgatcccttgaaccgcttagctaggtagttaaattaccccattgtaataga-
gcggaattaggctcccagactaaggactgcctagggtctcacagttagtaggag-
gaggcctggatctgaaccaagggtctgaggccaggccgactgccgtaa-
gatgggtgctgagaagttagtcaggccaggccagctggtatcgagggtcccatgggag-
taaggggacgctccgggcggtatgagggtcgggtcatctgtatctgaagcccctcg-
gaataaagcgttgaccgccgaagctgcgtcactcctgcctcaac-
gcccggccccgcctccgcccacacttccggcggggctgacgaccg-

cagagggcgcgggcgagcgagcggcgccggcctggtggggtggcgga-
taggctggcgcgccggcgctgcagaccgctgctgttgcgggtctgtgcggtcccaggggcctccgtgcccggcgccatg-3'

Flot2-560

5'ggcaggagtttgcaatgtgatgactgccaacattgagaattagtgaaactgatcccttgcaaccgtctagctaggtagtaaattacccccat
gtaatgaagcgaattaggctcccagctaaaggactcgccctagggtctcacagtgag-
taggaggaggcctgggatctgaaccaagggtctgaggccaggcggactgcccgtaa-
gatgggtgctgagaagtgcaggcagggcagctggtatcagggtgcccattgggag-
taaggggacgcttccggcggatgcagggtgggtcatctgtatctgaagcccctcg-
gaataaagcgcgttgaccgccaagctgcgctcactcctgcctcaac-
gcccggccccgcccctccgcccacacttccggcggggctgcgaccg-
cagagggcgcgggcgagcgagcggcgccggcctggtggggtggcgga-
taggctggcgcgccggcgctgcagaccgctgctgttgcgggtctgtgcggtcccaggggcctccgtgcccggcgccatg-3'

Die Abb. 5 Längster Abschnitt mit einer Homologie 77%

```
***** ORTHOLOGOUS BLOCKS *****  
::: block no. 1, score=78225.0, strand:+, base position:494-1555  
hFlotlhuman ACCATGTCTCACTCTGCGAGCTGCGACCGGACCGATGACCATCTTCGAGGCCCGACCGCG  
mFlotlmouse AITATGTGCCACTGCGGCAACCATCTCCACACCTGACTGGCTGAGGCCCGCTTCCCA 553  
* * * * *  
  
hFlotlhuman GCGCCCTCCACCATCCCGGGACCGCGGGGGCTCCGGSTCCTGAGATCTTCACCTTCGAC  
mFlotlmouse GCTCCCTCCACCGGCGGAACTCCCGGGGGCTCTGCTCCCGAAATTTTCACCTTCGAC 613  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CCTCTCCCGGAGCCCGCAGCGGCCCTGCGGGGCGCCCGAGCGCTCTCGCGGGCACCGA  
mFlotlmouse CCTCTCCCGGAGCGGGCGGTGCTCCACCGCGCTTTGAACAATCTTCGCGGGCACCGA 673  
* * * * *  
  
hFlotlhuman AAGCGCAGCGCAGGGTTCTTACCCCTGAGTGGTGGATATGCGCGAAGTGGGCATTGCG  
mFlotlmouse AAACGCGAGCGGAGGGTGCCTTACCCCTGAGTGGTGGATATGCGCGAAGTGGGCATTGCG 733  
* * * * *  
  
hFlotlhuman GGGTGGCGCTGCGCTGGAGTCACTGGGAAAGGACCGGACTCCAGAGGCGCTCGACCTGACC  
mFlotlmouse AGSTCCGCTGCGCTGGAACTTGTAGGTAAACAATAGGCGCAGGAGACCTTCGATCTGAGC 793  
* * * * *  
  
hFlotlhuman TGTCTCCTGTTTGTCTCCCTTAGSTCCCGCGCGAGCTGCGACTCGAGGAAACCGAACCC  
mFlotlmouse TTTC-CCTCTTTTATCTGCTC--AGSTCCCGCGCGAGCTAACCAACGAGGAAACCAACT 850  
* * * * *  
  
hFlotlhuman AGCCAAAAGGCTTCTCTTTCTGCTGCTCACCATCGTCTTCTGCGAGATCCTGATGGGTGA  
mFlotlmouse TGCCAAAGGGTCTCTTTCTGCTGCTGCGCATCATCTTCTGCGAGATTTGATGGGTGA 910  
* * * * *  
  
hFlotlhuman AGAGGCTGTGCGCGCGCCCTGCTCCAGAGGACCGCCCTAACCGCG-----  
mFlotlmouse AGAGGCTGTGCGCGCGCCCTGCTCCAGAGGATGCTAACCGCGCGGTGACACCTGAGCG 970  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CATCCCTGGCGCCACCCCTGTGCTCCCGGCTCCGAGCCCTTAACTGACTTCGGAGC  
mFlotlmouse CATTTCT-GCGCCATTACTGCGCCCGGCTCCGAGCCCTTGAACCTGACCTCGAGGT 1029  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CCTCGGACTAGCTCTGAGCTCAGCACTTTCTCCAGCAACCGCGCGCTCTCTAAC  
mFlotlmouse CCTCGGACTAGCTCTGAGCTTAAAGCTTTCTCCAGCAACCGCGCGCTCTCTAAC 1089  
* * * * *  
  
hFlotlhuman TGTGACTCCCGCACTCCCGAAAGAAATCCGAAAACCAAGAAACACACAGAGGCTAC  
mFlotlmouse CGCGATGGTCACTCC-----GAAGAAACAAAGGCAACATGG-----ATGGGTAC 1136  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CTGGTGGCGAGAGCGTATCCCGAACTGGGACTTCCGAGGCAACTGAACTCAGAACAAT  
mFlotlmouse CTGGTGGCGAGAGCGTATCCCGAACTGGGACTTCTAAGGCAACGCTAATCAGAACAAT 1196  
* * * * *  
  
hFlotlhuman ACAGCGGAGACGCCACCGCTGCTGAGGCGGGAACGAGGCGCACAGAGCCGAGGGCA  
mFlotlmouse ACCGCCAAGA-GACACC-----GCGGGTCC----- 1220  
* * * * *  
  
hFlotlhuman TAGAGACCGAGGACAGCCAGCTGGGGCTAGGCGCGGTTGGGAA-GGAGAGGCTCGTTAA  
mFlotlmouse -----TGGCTAGGCCACTGGGAGCGGACAGAGAC----- 1250  
* * * * *  
  
hFlotlhuman TTTATTCTTATTGCTCCTAATTAATATTTATATGTATTTATGTACCTCCTAGGTGA  
mFlotlmouse ---TTCTCCGTG--TCTAATTAATATT--TATGTATTTATGTATATCCTCCTAGGTGA 1302  
* * * * *  
  
hFlotlhuman TGGAGTGTGTACGTAATATTTATTTAACTTATGCAAGGGTGTGAGATGTCC-CCCTG  
mFlotlmouse AGGAGGGGTGTATGTAATATTTATTTAACTTATGCAAGGGTGTGAGATGTCCCTCCTG 1362  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CTGTAATGCGACTCTCTGGTATTATTGAGCTTTGTGGGACTGGTGGAGCGAGGACAC  
mFlotlmouse CTGT-AACACA-----GATATTATTACGATTTATAGGGTCCGT-----AAGACA- 1406  
* * * * *  
  
hFlotlhuman CTGGAAGTGGCGAAAGTAGSAGAAAGAAATGGGAGGACTCGGGTGGGGAGGACGTCGC  
mFlotlmouse ---GATGTGGGA-----GGGAGGACCGGGT--GGTAGGACTCCCA 1444  
* * * * *  
  
hFlotlhuman GCCTGGGATGAAGTCTGCTGCTG--STCGTAACTTTAGSAGGTG-ACTGCATCCTCCAGC  
mFlotlmouse GCTTGGGATGATGCTGCGGGGGTGAATAGATTAGGGGTAACACTCCGCTCTCCAGC 1504  
* * * * *  
  
hFlotlhuman ATCTCAACTCCGCTGCTACTGTGTGAGACTTCCGCGGACCATAGGAATGAG  
mFlotlmouse ACTTCAACTCTGTA-GTCTGT--TGTAGGCTTTGGAAGACCCCTGGGAATCCG 1555  
* * * * *
```

Die Abb.6 Längster Sequenzabschnitt mit einer Homologie von 80%

```

::::: block no. 1, score=57176.0, strand:+, base position:791-1280
mFlot2mouse TCTTTTCTTCTGCCCCACAGGACCTGTGAACCTGGAGCTCTTCTGCTCATCTTCTGGA
hFlot2human TCTTTTCTTCTGCCCCACAGGACCTGTGAACCTGGAGCTGTCTCTGCTCATCTTCTGGA 850
*****

mFlot2mouse TGGCTGCTCTTATTTTGGCCCCACTGGCTTGGCTGGTGGTCCGGGCACCTCAAGGGGGT
hFlot2human TGGCTGCTCTTATTTTGGCCCCACTGGCTTGGCTGGTGGTCCGGGCACCTCAAGGGGGT 910
*****

mFlot2mouse GCCCAGACACCCCTGTACTGCGCTCTGCAGGAGGCGATTGAGCCCTCAGCGGGAGATAT
hFlot2human GCCCAGACACCCCTGTATTGTGCTCTACAGAGGCGCATGAGCCCTCAGSTGGGAGATAT 970
*****

mFlot2mouse TTGCCCCAAGTGGCCAGTGGAGGAGGTCTCCCGAGCTGCTAGAGATGACCCAGGCTGCTCA
hFlot2human TTGCCCCAAGTGGCCAGTGGAGAGGTGCTCCAGCTGCCCCAGAGACCCGGCAGCCCAT 1030
*****

mFlot2mouse AGGCTATGGAAAGCTACCCAGAAAGTGGCAGGCTTGCACCTGGAGACGATGATGATGAC
hFlot2human AGGCTATGGGAGGCCAGCAGAGGCTGGCAGGCTTGGGCTGGG---GAGGATGCTGAA 1087
*****

mFlot2mouse CCTGATGAAGAGCCCGAACCCTGAGGATCCCGAGGCCCATCTTCTCAGAGCGCCCCCAGC
hFlot2human CCTGATGAAGAGCCCGCAGTCTGAGGACTCAGAGGCCCATCTTCTCAGAGCACCCCCAC 1147
*****

mFlot2mouse CCTGAGAAAACCCAGTTTCTGGACCTTCTCATAGCTATCAGGCTCGCAAGACTTATCC
hFlot2human CCTGAGGAGCCACAGTTTCTCAACCTTACCCAGCCCTCAGAGCTCACCAGATTTGTCT 1207
*****

mFlot2mouse AAATTGACACAGCGAAGARTICAGGTGAAGGATGAACCTACACCCCTAAGTTTCTTAACCC
hFlot2human AAGATGACCGCAC---GARTICAGGCTAAGTTGAGCCTGAGATCCAGCTCTCTTAACCC 1264
*****

mFlot2mouse CCGGGATAGAATGCTT
hFlot2human TCAGGCCAGGATGCTT 1280
*****

```

11 Publikationsverzeichnis

Banning, A., Ockenga W., Finger F., Siebrasse P., *Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e45514.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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 oder 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

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mit ihrer Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich meiner stets gut gelaunten, optimistischen und hilfsbereiten Doktermutter, Frau **Prof. Dr. Ritva Tikkanen** für die Ermöglichung meiner medizinischen Doktorarbeit am Biochemischen Institut und bei meiner mit Engelsgeduld gesegneten Mentorin und Betreuerin Frau **Dr. Antje Banning** für ihre ausdauernde Unterstützung.

Ferner möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Tikkanen für die stetige Hilfe, wertvollen Tipps und Unterstützung herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich für die intensive Vorkorrektur und Durchsicht meiner Doktorarbeit, die aufgrund mehrerer Auslandsaufenthalte und Auswanderung nach Schweden in größeren Abständen erfolgt ist.

Darüber hinaus möchte ich **Melanie Meister, Nina Kurrle, Ana Tomasovic** und **Ralf Füllkrug** für ihr ständige Hilfsbereitschaft bei meinen Experimenten im Labor sowie der Anwendung der unterschiedlichen Programme zur Statistischen Auswertung danken.

Außerdem danke ich Bincy Anu John und Petra Janson für eine angenehme Zeit in der AG Tikkanen.

Ich habe die gemeinsame Zeit in der AG Tikkanen sehr genossen und bin dem gesamten Team deshalb sehr dankbar für die professionelle Weiterbildung und den respektvollen Umgang der stets in der Einrichtung herrschte.

Meiner **Familie** bin ich zu Dank verpflichtet, da sie mich in allen Lebenslagen unterstützten, und besonders meinen Eltern, die mein Studium finanziell ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich meiner Freundin **Luca** für die anhaltende emotionale Unterstützung bei der Umsetzung meiner Pläne bedanken.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6552-2



9 783835 196552 2