

# Die Rolle von Flotillin-1-Mutanten im EGFR/MAPK-Signalweg

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

vorgelegt von Kebbeh, Junma  
aus Frankfurt

Gießen 2023

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin  
der Justus- Liebig- Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachter: PD Dr. Schreckenberger

Tag der Disputation: 27.10.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Familie der Flotillin-Proteine</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	<i>Ursprung der Flotilline</i> .....	1
1.1.2	<i>Vorkommen &amp; Lokalisation der Flotilline</i> .....	1
1.1.3	<i>Struktur der Flotilline</i> .....	2
<b>1.2</b>	<b>Funktionen der Flotilline</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	<i>Signaltransduktion</i> .....	4
1.2.2	<i>Endozytose</i> .....	5
<b>1.3</b>	<b>Die Phosphorylierung von Flotillinen</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4</b>	<b>Der EGF-Signalweg</b> .....	<b>7</b>
1.4.1	<i>EGF-Rezeptor</i> .....	7
1.4.2	<i>MAP-Kinase Signalkaskade</i> .....	8
<b>1.5</b>	<b>Die Rolle der Flotilline im EGF-Signalweg</b> .....	<b>10</b>
<b>1.6</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte und Materialien</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe</b> .....	<b>18</b>
2.4.1	<i>Primärantikörper</i> .....	18
2.4.2	<i>Sekundärantikörper</i> .....	19
<b>2.5</b>	<b>Antibiotika</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Kit</b> .....	<b>20</b>
<b>2.7</b>	<b>Bakterien-Stämme</b> .....	<b>20</b>

<b>2.8</b>	<b>Plasmide und Vektoren .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellbiologische Standardmethoden .....</b>	<b>22</b>
3.1.1	<i>Kultivierung von HeLa- und HEK-Zellen.....</i>	22
3.1.2	<i>Splitten der HeLa- und HEK-Zellen.....</i>	22
3.1.3	<i>Transiente Transfektion der HeLa- und HEK-Zellen mit Plasmid-DNA.....</i>	23
3.1.4	<i>Stimulation der HeLa- und HEK-Zellen mit EGF.....</i>	23
3.1.5	<i>Immunfluoreszenz.....</i>	23
3.1.6	<i>Auftauen von HeLa- und HEK-Zellen .....</i>	24
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.2.1	<i>Plasmid Amplifikation, Aufreinigung.....</i>	24
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	<i>Herstellung von Proteinlysaten aus HEK- und HeLa-Zellen .....</i>	25
3.3.2	<i>Co-Immunopräzipitation .....</i>	25
3.3.3	<i>SDS PAGE und Western Blot.....</i>	26
3.3.4	<i>Immundetektion.....</i>	26
<b>3.4</b>	<b>Bildbearbeitung .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	<i>Elektronische Manipulation der Abbildungen.....</i>	27
3.4.2	<i>Statistik.....</i>	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung der zellulären Lokalisation von mutierten Flotillinen.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Effekt der Flotillin-1-Mutanten auf den EGF-Rezeptor und MAPK-Signalweg in HEK-Zellen .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Interaktion von Flotillin-1 und endogenem Flotillin-2.....</b>	<b>37</b>
4.3.1	<i>Oligomerisierung von Flotillin-1-Einzelmutanten mit Flotillin-2 .....</i>	38
4.3.2	<i>Oligomerisierung von Flotillin-1-Doppelmutanten mit Flotillin-2.....</i>	39
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Lokalisation und zelluläre Verteilung von Flotillin-Mutanten .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Rolle der Flotilline bei der EGFR-Aktivierung und in der MAPK-Signalkaskade .....</b>	<b>42</b>

<b>5.3</b>	<b>Transfektionseigenschaften von HeLa- und HEK-Zellen.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4</b>	<b>Oligomerisierung von Flotillinen.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Flotilline als MAPK-Gerüstprotein .....</b>	<b>49</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>60</b>
<b>12</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>14</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....</b>	<b>72</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der Flotillin-Proteine

### 1.1.1 Ursprung der Flotilline

Die Proteinfamilie der Flotilline besteht aus zwei homologen Proteinen, Flotillin-1 und Flotillin-2. Erstmals wurde die copy-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) von Flotillin-2 im Jahr 1994 entdeckt und als *epidermal surface antigen* (ESA) bezeichnet (Schroeder *et al.*, 1994). Im Jahre 1997 konnten Schulte *et al.* beobachten, dass bei einer Sehnervenläsion des Goldfisches die retinalen Ganglienzellen überlebten und es zu einer Regeneration der Axone und der Neuronen kam. Aufgrund der vermuteten Beteiligung der Flotilline an dem Regenerationsvorgang wurden sie von der Arbeitsgruppe „Reggies“ bezeichnet (Schulte *et al.*, 1997). Gleichzeitig entdeckten Bickel *et al.*, dass dieselben Proteine in frei flottierenden Fraktionen, sogenannten „Lipid Rafts“, in Detergenz-unlöslicher Form vorkamen. Daraufhin nannte man sie Flotilline (Bickel *et al.*, 1997). Durch die unterschiedliche Namensgebung von den zwei Arbeitsgruppen entspricht Flotillin-1 dem Reggie-2 und Flotillin-2 dem Reggie-1.

Die Aminosäuresequenzen von Flotillin-1 und Flotillin-2 sind zu ca. 44% identisch und weisen zwischen verschiedenen Spezies eine hohe Ähnlichkeit auf. 99% der Proteinsequenz in der Maus sind mit dem des Menschen identisch, wohingegen Maus Flotillin-1 ca. 61% identisch zu Flotillin-1 in der Fruchtfliege ist. Zwischen Invertebraten und Vertebraten konnte eine Homologie von 64% beobachtet werden und unter den Vertebraten von 90% (Schulte *et al.*, 1997).

### 1.1.2 Vorkommen & Lokalisation der Flotilline

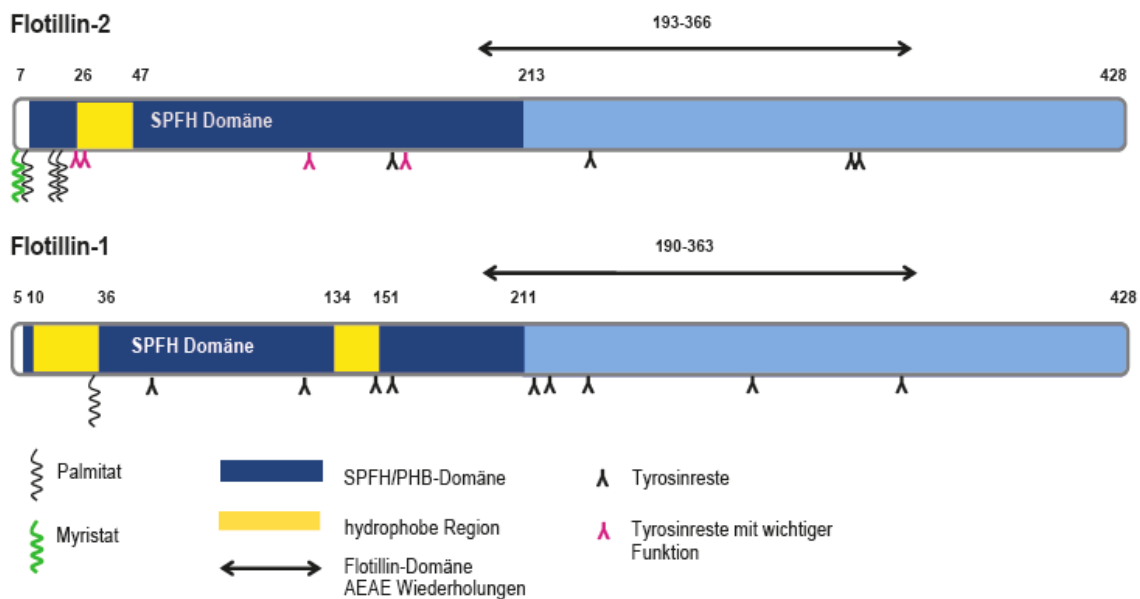
Durch ihre ubiquitäre Expression sind Flotilline in verschiedenen Zelltypen und Gewebearten verbreitet. Eine hohe Expression von Flotillinen wurde in neuronalem Gewebe und Lymphozyten beobachtet (Schulte *et al.*, 1997). Des Weiteren konnte Flotillin-1 in quergestreifter Muskulatur, Fettgewebe und im Lungenparenchym und Flotillin- 2/ESA in Geweben wie Leber, Gehirn, Herz und Haut nachgewiesen werden (Volonté *et al.*, 1999; Völlner *et al.*, 2016). Auch in Pflanzen, Bakterien und Pilzen wurden Flotillin- ähnliche Proteine mit einer niedrigen Homologie entdeckt (Borner *et al.*, 2005; E. Rivera- Milla, 2006; Bramkamp *et al.*, 2015).

Die zelluläre Lokalisation der Flotilline ist dynamisch und abhängig vom Zelltyp. In vielen Zellen sind sie hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert (Glebov *et al.*, 2006; Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Die Proteine konnten auch in Endosomen, Lysosomen

und Exosomen nachgewiesen werden (Stuermer *et al.*, 2001; De Gassart *et al.*, 2003). Ebenfalls konnten Flotilline im Golgi-Apparat und im Zusammenhang mit der *prostate tumor overexpressed-1* (PTOV-1) Phosphatase im Zellkern beobachtet werden (Gkantiragas *et al.*, 2001; Santamaria *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Struktur der Flotilline

Flotilline gehören zur hochkonservierten Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C (SPFH) Proteinfamilie (Rivera-Milla, 2006) und weisen ein Molekulargewicht von 48 kDa auf. Flotillin-1 und Flotillin-2 bestehen jeweils aus 428 Aminosäuren, aufgeteilt auf eine N- und C-terminalen Domäne. Der N-Terminus trägt die SPFH-Domäne, auch die Prohibitin Homologie-Domäne (PHB) bezeichnet, und eine bzw. zwei hydrophobe Regionen. Flotilline haben die Fähigkeit, über Fettsäuremodifikationen an die zytoplasmatische Seite der Zellmembran zu binden und so die Möglichkeit mit Cholesterol- und Sphingolipid-haltigen Membran-Mikrodomänen zu assoziieren. Dafür wird Flotillin-1 hauptsächlich an Cystein-Rest 34 reversibel palmyliert (Morrow *et al.*, 2002). Flotillin-2 hingegen wird an Glycin-Rest 2 irreversibel myristyliert und an Cys 4, 19 und 20 palmyliert, wobei die Myristylierung für die Palmylierung vorausgesetzt ist (Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Der Carboxylterminus (C-Terminus), auch Flotillin-Domäne genannt, weist mehrere Glutamat-Alanin Wiederholungen, sogenannte EA-Repeats, aus. Diese beinhalten auch die *coiled-coil*-Struktur, bestehend aus  $\alpha$ -Helices, die an der Homo- und Hetero- Oligomerisierung von Flotillinen beteiligt sind. Mittels Crosslinking konnte gezeigt werden, dass die erste und teilweise die zweite Region der coiled-coil-Struktur in der Bildung von Oligomeren involviert sind (Solis *et al.*, 2007). Neben der Assoziation mit Membran-Mikrodomänen ist die Oligomerisierung auch für die Endozytose und die Aktivierung des *epidermal growth factor* (EGF)-Signalwegs vorausgesetzt (Neumann-Giesen *et al.*, 2004; Babuke *et al.*, 2009; Riento *et al.*, 2009). Ursprünglich wurde vermutet, dass es sich bei den Flotillinen um Caveolae-assoziierte integrale Transmembranproteine handelt (Bickel *et al.*, 1997). In späteren Studien konnte diese Theorie jedoch widerlegt werden und es wurde herausgefunden, dass Flotilline sich in nicht-caveolären Membran-Mikrodomänen befinden und nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu durchspannen (Morrow *et al.*, 2002; Fernow *et al.*, 2007).



### Abbildung 1: Domänenstruktur der Flotillin-Proteine

Die Flotillin-Proteine bestehen aus 428 Aminosäuren. Der N-Terminus besteht aus der SPFH/PHB Domäne (grün) und der C-Terminus aus den sogenannten EA-Repeats. Flotillin-2 trägt nur eine hydrophobe Region, wohingegen Flotillin-1 zwei besitzt. Flotillin-1 ist an der Aminosäure Cystein 34 palmitoyliert, Flotillin-2 an Glycin 2 myristyliert und an Cystein 4, 19 und 20 palmitoyliert. Beide Flotilline tragen mehrere Tyrosinreste, wobei die von funktioneller Bedeutung lila gekennzeichnet sind.

Über beide Domänen sind wichtige Phosphorylierungsstellen verteilt, die unter anderem an der Signaltransduktion beteiligt sind. Dabei spielen Tyr-160 in Flotillin-1 und Tyr-163 in Flotillin-2 eine wichtige Rolle (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Riento *et al.*, 2009).

## 1.2 Funktionen der Flotilline

Flotilline sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem an endozytotischen Vorgängen, an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und an der Zell-Zell- und Zell-Matrix Adhäsion (Lang *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 2000; Dermine *et al.*, 2001; Hazarika *et al.*, 2004; Neumann-Giesen *et al.*, 2004; Glebov *et al.*, 2006; Babuke *et al.*, 2007; Völlner *et al.*, 2016; Meister *et al.*, 2017; Banning *et al.*, 2018; Gauthier-Rouvière *et al.*, 2020).

Des Weiteren konnte die Aktivität der Flotilline bei verschiedenen Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden, wie der *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Signalweg, der mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg und der Insulin-Signalweg (Baumann *et al.*, 2000; Amaddii *et al.*, 2012). Ebenfalls festgestellt

wurde der Zusammenhang zwischen Flotillinen und diversen pathologischen Vorgängen. Diese reichen von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, bis zur Karzinogenese (Kokubo *et al.*, 2000; Perou *et al.*, 2000; John *et al.*, 2014; Gauthier-Rouvière *et al.*, 2020). Im Rahmen der Krebsentstehung spielen Flotilline eine wichtige Rolle in der Zellproliferation. In diversen Karzinomzellen konnte eine erhöhte Expression von Flotillinen beobachtet werden. Dazu gehören unter anderem Melanomzellen, Brustkrebszellen und das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom. Andererseits führte die Abwesenheit von Flotillinen ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität spezifischer Signalwege (Banning *et al.*, 2013; Kurrle *et al.*, 2013).

### 1.2.1 Signaltransduktion

Aufgrund der Assoziation von Flotillinen mit den *Lipid rafts* gelten sie als *Raft*-Markerproteine und sind dementsprechend an mehrere Signalwege beteiligt (Bickel *et al.*, 1997; Salzer *et al.*, 2001; Morrow *et al.*, 2002; Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Flotillin-1 spielt eine wichtige Rolle in der IgE-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Mastzellen und in der Regulation der Lyn-Kinase Aktivität. Durch die Phosphorylierung des IgE-Rezeptors mittels der Lyn-Kinase kommt es unter anderem zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, zur MAPK-Aktivierung und Degranulation (Kato *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Flotillin-1 und Flotillin-2 mit verschiedenen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen, wie Thy-1, F3 und dem Prionprotein (PrPc), sowie mit Src-Kinasen kopräzipitieren (Deininger *et al.*, 2003; Stuermer *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Flotillinen und den Src-Kinasen beobachtet werden. Für die Internalisierung von Flotillinen von der Plasmamembran in die Zelle werden bestimmte Tyrosinreste des Flotillin-1 (Y160) und Flotillin-2 (Y163) von Src-Kinasen, darunter auch die Fyn-Kinase, phosphoryliert. Das bedeutet, dass die Src-Kinasen für die EGF-induzierte Endozytose vorausgesetzt sind. (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Riento *et al.*, 2009).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die Aufnahme von Glucose in die Zelle nur auf den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -abhängigen Insulin-Rezeptorweg basiert. In diesem Insulin-Signalweg läuft die Rekrutierung des Glucosetransporters Typ 4 (GLUT4) zur Plasmamembran hauptsächlich über die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Proteinkinase B (Akt/PKB) ab (siehe Abbildung 2) (Banning *et al.*, 2014). In der Studie von Baumann *et al.* konnte ein PI3K-unabhängiger Weg beschrieben werden, welcher von *Lipid rafts* und Flotillin-1 abhängig ist. Nach Aktivierung des Insulin-Rezeptors entsteht ein Komplex, bestehend aus dem multifunktionellen Adapterprotein, der E3 Ubiquitin-Protein Ligase Cbl (c-Cbl) und dem Cbl-assoziierten Protein (CAP).

Die Interaktion basiert auf der *sorbin homology* (SoHo) -Domäne des CAP und der ersten hydrophoben Region von Flotillin-1. Es wurde keine Verbindung zwischen Flotillin-2 und CAP beobachtet vermutlich aufgrund der fehlenden hydrophoben Region (Baumann *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005).

Des Weiteren spielen Flotilline eine wichtige Rolle im EGFR-Signalweg. Nach EGF-Stimulation werden bestimmte Tyrosingruppen von Flotillin-1 und Flotillin-2 phosphoryliert. Außerdem sind Flotilline am EGFR-Clustering beteiligt und die Tyr-Phosphorylierung ist für die Translokation der Flotilline in die späten Endosomen essenziell (Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass in Flotillin-1-Knockdown Zellen die EGFR-Aktivierung als auch die MAPK-Signaltransduktion beeinträchtigt werden (Amaddii *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Endozytose

Zu Beginn ist man davon ausgegangen, dass es einen Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytoseweg gibt, wo Flotilline direkt an der Endozytose beteiligt sind. (Glebov *et al.*, 2006; Frick *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2009). Anhand verschiedener Studien konnte diese Annahme jedoch widerlegt werden.

Die endozytotische Eigenschaft von Flotillinen wurde erstmals in Zusammenhang mit dem GM1-Rezeptor der Cholera toxin B-Untereinheit (CTxB) und dem GPI-verankerten Protein CD59 entdeckt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Internalisierung dieser Cargoproteine nicht nur über den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg erfolgt, sondern auch von Flotillin-1 und Flotillin-2 abhängig ist. (Glebov *et al.*, 2006; Frick *et al.*, 2007; Amaddii *et al.*, 2012). In der Arbeit von Saslowsky *et al.* konnte in COS-1 Zellen eine Kolokalisation von CTxB und Flotillinen an der Plasmamembran und in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Jedoch wurde weder die CTxB Bindung über den Monosialogangliosid- (GM1-) Rezeptor an die Plasmamembran, noch die Endozytose des Toxins durch das Fehlen von Flotillinen beeinträchtigt. Jedoch verhindert ein Knockdown von Flotillinen die Intoxikation, was bedeutet, dass Flotilline erforderlich für den retrograden Transport des Toxins von der Plasmamembran in das endoplasmatische Retikulum sind (Saslowsky *et al.*, 2010; Meister *et al.*, 2014). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls anhand von Shigatoxin und Ricin bestätigt werden. Die Internalisierung beider Toxine ist unabhängig von den Flotillinen. Andererseits ist bei Abwesenheit von Flotillinen die Translokation der Toxine zum Golgi-Komplex und endoplasmatischen Retikulum beeinflusst, wodurch eine Erhöhung der Toxizität verursacht wird (Pust *et al.*, 2010; Meister *et al.*, 2014).

Eine direkte Beteiligung der Flotilline an der Endozytose von Transmembranproteinen

ist jedoch nicht klar. Denn für das Alzheimer Amyloid Vorläufer-Protein wurde nachgewiesen, dass Flotilline in der Lage sind, Cargo-Proteine an der Plasmamembran zu clustern, als Voraussetzung für die darauffolgende Endozytose, ohne jedoch bei der Endozytose eine direkte Rolle zu spielen (Schneider *et al.*, 2008). Außerdem wurde erstmals in der Studie von John *et al.* entdeckt, dass Flotillin-1 an ein spezifisches Sortierungssignal (Dileucin-Motiv) der Protease, die  $\beta$ -Secretase 1 (BACE1) bindet und die endosomale Sortierung vermittelt und daraus schließend notwendig für das Recycling von BACE1 ist (John *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde eine Assoziation von Flotillinen mit dem *Niemann-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1) -Rezeptor, der für die Cholesterinaufnahme in die Leberzellen verantwortlich ist, festgesellt.

Flotilline tragen ein *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus* (CRAC)-Motiv, welches für die Bindung an Cholesterin zuständig ist (Strauss *et al.*, 2010). Die Aufnahme vom NPC1L1-Rezeptor in die Zelle erfolgt via Clathrin-abhängiger Endozytose (Ge *et al.*, 2008). Bei einem Knockdown der Flotilline kommt es zu einer verringerten Aufnahme von Cholesterin und Internalisierung des NPC1L1-Rezeptors. Außerdem nimmt die Interaktion des NPC1L1-Rezeptors mit dem Clathrin-Adapterprotein 2 (AP2) Komplex deutlich ab. Deshalb wird vermutet, dass Flotilline die Rekrutierung von Clathrin und AP2 an den NPC1L1-Rezeptor vermitteln und somit die Endozytose des Rezeptorproteins und Cholesterins vereinfachen (Ge *et al.*, 2008, 2011). Im Rahmen der EGF-induzierten Endozytose ist die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste der Flotilline, hauptsächlich Tyrosin 160 von Flotillin-1 und Tyrosin 163 von Flotillin-2, vorausgesetzt. Die Flotillin-Proteine sind wichtig für das Clustering des EGF-Rezeptors an der Plasmamembran und bilden einen konstitutiven Komplex nach EGF-Stimulation. Jedoch wird die Endozytose von EGFR in Flotillin-1-Knockdown HeLa-Zellen nicht direkt beeinflusst (Amaddii *et al.*, 2012).

### 1.3 Tyrosin-Phosphorylierung der Flotilline

Die vorliegende Arbeit befasst sich hauptsächlich mit der funktionellen Untersuchung der Tyrosinreste des Flotillin-1. Wie in Kapitel 1.1.3 bereits erwähnt, tragen beide Flotillin-Proteine bestimmte Phosphorylierungsstellen, bestehend aus Tyrosinresten. Während der EGF-Stimulation werden mehrere dieser Tyrosinreste durch die Src-Kinase phosphoryliert (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Amaddii, 2009; Riento *et al.*, 2009).

In der Studie von Neumann-Giesen *et al.* wurde die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung der Flotilline erstmals analysiert. Um die Phosphorylierung von Flotillin-2/Reggie-1 zu untersuchen, wurden acht Tyrosinreste (Y) zu Phenylalanin (F)

mutiert, entweder als Einzelmutanten (Y24F, Y27F, Y124F, Y241F) oder Doppelmutanten (Y158F+Y163F, Y348F+Y358F). Nach EGF-Stimulation und Immunpräzipitation war im Phosphorylierungsgrad kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Mutanten und dem Wildtyp R1- *enhanced green fluorescent protein* (R1-EGFP) zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass multiple Tyrosinreste des Flotillin-2 durch die Src-Kinase phosphoryliert werden können. Der Y27F-R1-EGFP-Mutante wies eine reduzierte Expression aufgrund eines beschleunigten Abbaus auf. Deshalb wurden nur sieben der acht Tyrosinreste, alle außer Tyr27, in einem weiteren einzelnen Konstrukt mutiert (7xYF-R1-EGFP). Das Resultat zeigte deutlich, dass nach EGF-Stimulation keine Phosphorylierung stattgefunden hat, welches ebenfalls die Phosphorylierung multipler Tyrosinreste in Flotillin-2 bestätigt.

Durch die Untersuchung der zellulären Lokalisation von Flotillin-2-Mutanten in HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass Tyr163 eine wichtige funktionelle Rolle spielt. Nach EGF-Stimulation blieb die Translokation des Y163F-R1-EGFP-Mutanten in die Endosomen aus, und das Protein war nur an der Plasmamembran lokalisiert. Gleiches galt für den 7xYF-R1-EGFP Mutanten, wo Tyr163 ebenfalls fehlt. Aufgrund dieser Feststellung stellte man einen weiteren Mutanten her, um die Phosphorylierung von Tyr163 zu analysieren. In diesem Konstrukt blieben nur die Tyrosinreste Tyr27 und Tyr163 unverändert, während die anderen 6 Tyrosinreste zu Phe mutiert wurden (6xYF-R1-EGFP). Dabei stellte sich heraus, dass es im Vergleich zum 7xYF-R1-EGFP Mutanten zu einer deutlichen Phosphorylierung kommt. Somit stellt Tyr163 eine wichtige Phosphorylierungsstelle dar (Neumann-Giesen *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Doktorarbeit von Monia Amaddii wurde anhand von Flotillin-1-Mutanten die Phosphorylierung untersucht. Mit Hilfe des NetPhos 2.0 Programms wurden drei von den zehn Tyrosinresten des Flotillin-1 (Tyr56, Tyr121 und Tyr160) als potenzielle Phosphorylierungsstellen ermittelt. Mittels Einzel- (Y56F, Y121F, Y160F) und Doppelmutanten (Y56F+Y121F, Y56F+Y160F, Y121F+Y160F) konnte nachgewiesen werden, dass alle Varianten phosphoryliert wurden. Dies deutet darauf hin, dass auch Flotillin-1 an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert wird, ähnlich wie bei Flotillin-2 (Amaddii, 2009).

## **1.4 Der EGF-Signalweg**

### **1.4.1 EGF-Rezeptor**

Die ErbB-Familie besteht aus vier verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren (ErbB1-4), darunter auch der *epidermal growth factor receptor* (EGFR/ErbB1/HER1). Die ErbB-

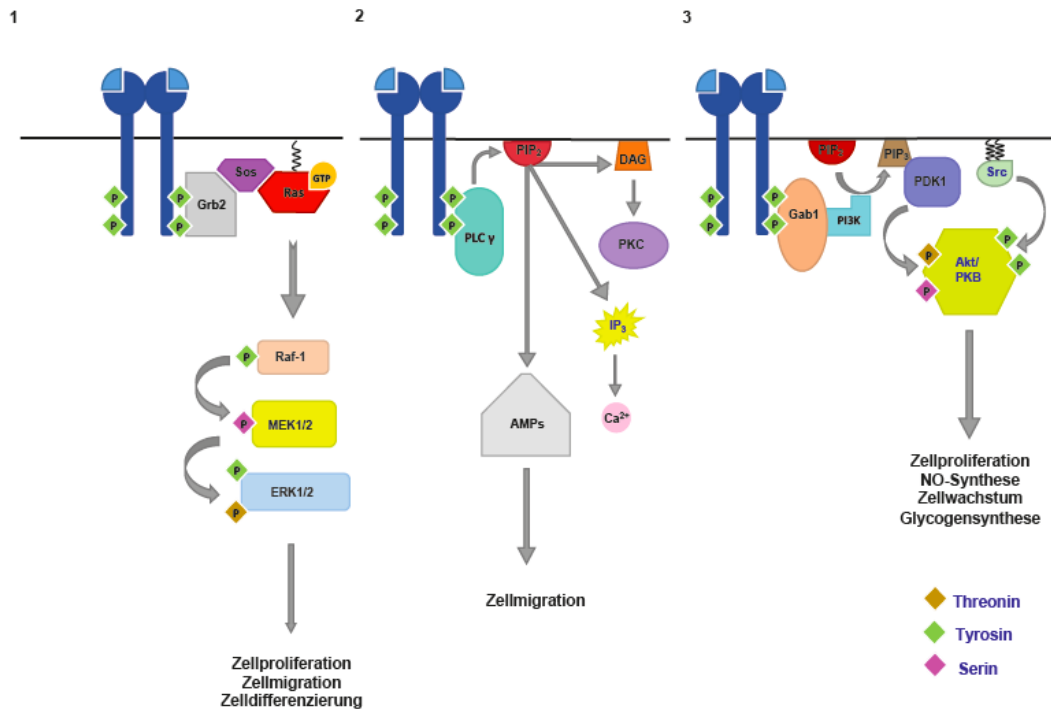
Rezeptoren sind an verschiedenen Signalwegen beteiligt und regulieren unter anderem die Zellproliferation, Zelldifferenzierung als auch die Zellmigration und Apoptose. Bei einer Fehlregulation der Proteinkinasen können verschiedene Krankheiten entstehen, wie Krebs, Diabetes, Autoimmunerkrankungen und Herz-Kreislaufstörungen (Roskoski, 2004). Der EGF-Rezeptor, mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne mit dem N-Terminus und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne, welches einen tyrosinreichen C- Terminus trägt. Beide Domänen sind über eine kurze hydrophobe Transmembran- Domäne und einem juxtamembranösen Teil verbunden. (Normanno *et al.*, 2006; Scaltriti *et al.*, 2006; Red Brewer *et al.*, 2009).

Die Liganden des EGF-Rezeptors bestehen, neben dem EGF (epidermal growth factor), zusätzlich aus den EGF-ähnlichen Liganden. Dazu gehören der *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), das Betacellulin, das heparinbindende EGF, das Amphiregulin, Epiregulin, Epigen und die Neuroreguline (Yarden *et al.*, 2001). EGF ist ein mitogenes Polypeptid, mit einem Molekulargewicht von ca. 6 kDa, und trägt drei intramolekulare Disulfid-Bindungen (Harris *et al.*, 2003).

Im inaktiven Zustand liegen die ErbB-Rezeptoren als Monomere vor. Nach Bindung des Liganden kommt es extrazellulär zu einer Hetero- und Homo-Dimerisierung der Untereinheiten über den sogenannten Dimerisierungsarm. Daraufhin löst eine Konformationsänderung am C-Terminus die Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste aus (Roskoski, 2004; Scaltriti *et al.*, 2006). Die phosphorylierten Tyrosingruppen können anschließend verschiedene Signalkaskaden, wie den Ras/Raf/MAP-Kinase-, den PI3K/Akt- und den Phospholipase C- $\gamma$  1 (PLC $\gamma$ 1) / Proteinkinase C (PKC) - Signalweg aktivieren (Scaltriti *et al.*, 2006).

#### 1.4.2 MAP-Kinase Signalkaskade

Der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) Weg ist eine evolutionär hochkonservierte Signalkaskade und für die Steuerung wichtiger zellulärer Prozesse verantwortlich, wie beispielsweise die Regulation der Genexpression (Meister *et al.*, 2013). Die MAPK-Wege werden bezüglich ihrer verschiedenen Liganden und Wirkungen in drei Proteinfamilien unterteilt. Dazu gehören die durch Wachstumsfaktoren aktivierte *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (Erk1/2) und die durch zellulären Stress und proinflammatorischen Zytokine aktivierte p38 Kinase und *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) (Raingeaud *et al.*, 1995; Meister *et al.*, 2013). Die kanonische MAP-Kinase Kaskade selbst besteht hauptsächlich aus drei Proteinkinasen, dem *rapidly accelerating fibrosarcoma protein* (Raf), MEK und Erk1/2 (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Signalkaskaden**

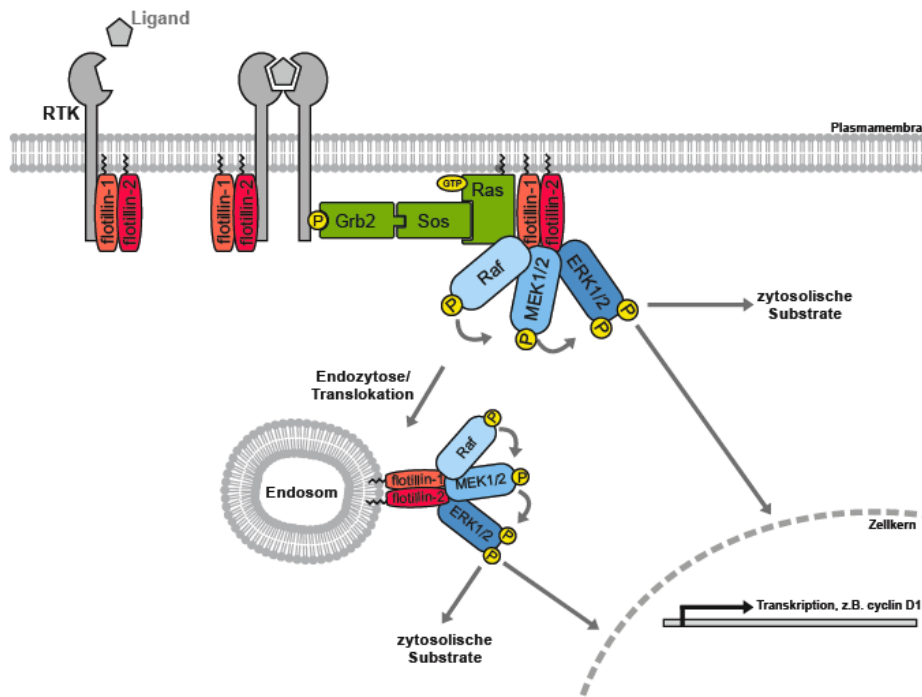
Nach EGF-Stimulation wird das kleine G-Protein Ras aktiviert, welches anschließend die Kinasen Raf1, MEK1/2 und Erk1/2 kaskadenartig aktiviert (1). Als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli hydrolysiert Phospholipase C (PLC) Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), woraus Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) entstehen, und gleichzeitig AMP freisetzt. IP<sub>3</sub> fördert Calcium-Freisetzung, und DAG aktiviert die Proteinkinase C (2). Im Rahmen des PI3K-abhängigen Signalwegs wird nach Aktivierung von PI3K PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub> umgewandelt, welches wiederum PDK1 phosphoryliert. PDK1 aktiviert zusammen mit der Src-Kinase Akt/PKB (3). (Amaddii et al. 2008).

Nach der Rezeptoraktivierung bindet die *Src-homology 2* (SH2) -Domäne des *growth factor receptor bound protein 2* (Grb-2) an den EGF-Rezeptor (Batzer et al., 1994). Die SH3-Domänen des Adapterproteins binden dann an das Polypeptid *son of sevenless* (Sos). Sos agiert als GTP-Austauschfaktor und wandelt das kleine G-Protein *rat sarcoma* (Ras) durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) in die aktive Form um (Chardin et al., 1993; Medema et al., 1993; Meister et al., 2013). Das aktive Ras-Protein bindet an die Ras-Bindungsdomäne der Serin/Threonin-Kinase Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) und rekrutiert sie an die Plasmamembran (Marais et al., 1995). Raf- Kinase, als erste Stufe in der MAPK-Kaskade, umfasst drei Isoformen, A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1). Nach seiner Aktivierung kommt es zur Raf-vermittelten Phosphorylierung von MEK1/2, einer dualspezifischen Kinase (Kyriakis

*et al.*, 1992). Sie ist in der Lage, Tyrosin- und auch Threonin/Serin-Reste zu phosphorylieren (Dhanasekaran *et al.*, 1998). Die letzte Stufe der Signalkaskade und das Hauptsubstrat von MEK stellt die Serin/Threonin Kinase Erk1/2 (*extracellular Signal-regulated kinases*) dar (Cobb *et al.*, 1995). Nachdem MEK das Erk über das Thr202-Xaa-Tyr204 Motiv aktiviert, kommt es zur Translokation von Erk in den Zellkern und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, c-Fos und die *dual specificity phosphatase 6* (DUSP-6) (Chen *et al.*, 1993; Khokhlatchev *et al.*, 1998; Soon *et al.*, 2006; Ekerot *et al.*, 2008; Meister *et al.*, 2013).

## 1.5 Die Rolle der Flotilline im EGF-Signalweg

Anhand mehrerer Studien konnte bestätigt werden, dass Flotilline eine wichtige Funktion im Rahmen der EGF-Signaltransduktion einnehmen. Unter anderem beeinflussen sie die EGFR-Aktivierung und MAP-Kinase Signalkaskade. Dennoch ist deren genaue regulatorische Funktion noch nicht vollständig charakterisiert (Kurrle *et al.*, 2012). Nach EGF-Stimulation werden multiple Tyrosinreste von Flotillin-1 und Flotillin-2 von der Src-Kinase phosphoryliert, woraufhin ein Komplex gebildet wird (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Amaddii *et al.*, 2012). Dabei ist die direkte Phosphorylierung von Y160 (Flotillin-1) und Y163 (Flotillin-2) durch die Src-Kinasen für die EGF-induzierte Endozytose vorausgesetzt (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Riento *et al.*, 2009). Des Weiteren nimmt die Größe der Oligomere zu, wobei die Stöchiometrie der Flotilline unverändert bleibt (Babuke *et al.*, 2009). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass die EGF-induzierte Endozytose von Flotillin-2 unabhängig von der Phosphorylierung durch die Src-Kinase, aber abhängig von der Hetero-Oligomerisierung von Flotillin-1 und Flotillin-2 ist (Babuke *et al.*, 2009; Banning *et al.*, 2014). Obwohl die Endozytose von EGFR in Flotillin-1-Knockdown Zellen nicht beeinflusst wird, sind die Flotilline am EGFR-Clustering beteiligt und bilden einen konstitutiven Komplex mit dem Rezeptor (Amaddii *et al.*, 2012). Es wurde festgestellt, dass bei Flotillin-1-Knockdown die Lokalisation von EGFR, Grb2 und C-Raf beeinträchtigt wird. Es kommt zur reduzierten Rekrutierung in die *Lipid Rafts* (Amaddii *et al.*, 2012).



**Abbildung 3: Die Flotillin-Proteine im EGF Signalweg modifiziert nach Meister et al. 2013**

Beide Flotilline (rot) sind für die Aktivierung des EGF-Rezeptors (grau) essenziell. Nach EGF-Stimulation kommt es zur Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs, wobei Flotillin-1 und Flotillin-2 als Scaffold-Proteine für die einzelnen MAPK-Komponenten (blau) agieren und zur Rekrutierung des Komplexes von der Plasmamembran in die Zelle führen können.

Im Zusammenhang mit der MAP-Kinase Signaltransduktion ist Flotillin-1 in der Lage, mit den Substraten C-Raf, der MAP-ERK-Kinase (MEK1/2) und Erk1/2 einen Komplex zu bilden und es konnte beobachtet werden, dass in Flotillin-1-Knockdown HeLa-Zellen es zu einer reduzierten Phosphorylierung von Erk1/2 kommt. Deshalb wird Flotillin-1 in der Regulation der MAP-Kinase Kaskade als Gerüstprotein bezeichnet (Amaddii *et al.*, 2012; Meister *et al.*, 2013). Für Flotillin-2-Knockdown konnte jedoch genau die gegensätzliche Wirkung nachgewiesen werden. Die basale Phosphorylierung von Erk, MEK und C-Raf nimmt in Flotillin-2-Knockdown HeLa-Zellen signifikant zu und es kommt zur gesteigerten Zellproliferation (Banning *et al.*, 2013). Die erhöhte MAPK-Aktivierung konnte auch *in vivo* anhand eines Flotillin-2-Knockout Mausmodells nachgewiesen werden, wobei nachgeschaltete Komponenten wie c-Fos, das *early growth response 1* (Egr-1) und DUSP-1 ebenfalls eine erhöhte Expression aufwiesen (Banning *et al.*, 2013). In einer weiteren Untersuchung konnte in Brustkrebszellen (MCF7) festgestellt werden, dass bei Abwesenheit von Flotillin-1 nicht nur die EGFR-Expression hochreguliert wird, sondern auch die Aktivität von Erk, MEK und C-Raf ansteigt, welches auf die konstitutiv aktive PI3-Kinase zurückzuführen ist (Kurrle *et al.*, 2013).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Flotillin-1 und Flotillin-2 werden an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert und bilden einen multimeren Komplex. Beide Flotilline tragen jeweils einen bestimmten Tyrosinrest (Y160 in Flotillin-1, Y163 in Flotillin-2), welchem eine bedeutende Funktion bei der Signaltransduktion zugeordnet wird (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Riento *et al.*, 2009; Amaddii *et al.*, 2012). Unter anderem ist die Hetero-Oligomerisierung der Flotilline vom Tyrosinrest 163 des Flotillin-2 abhängig und findet bei Austausch von Y163 nur reduziert statt (Babuke *et al.*, 2009). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass in Flotillin-1-Knockdown HeLa-Zellen die EGFR-Aktivierung abnimmt und die Phosphorylierung einzelner MAP-Kinase-Komponenten ebenfalls vermindert wird (Amaddii, 2009).

Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit der funktionellen Untersuchung der Flotillin-1-Tyrosin-Mutanten. Die Versuche konzentrieren sich auf die zelluläre Lokalisation und die Funktion von Flotillin-1 Tyrosin-Mutanten im EGF-Signalweg und die Interaktion mit endogenem Flotillin-2. In vorherigen Versuchen der AG Tikkanen wurde nur mit Flotillin-1-Knockdown Zellen experimentiert, da zu dem Zeitpunkt noch keine Knockout-Zellen zur Verfügung standen (Amaddii, 2009). Deshalb war es erst in dieser Arbeit möglich, die Versuche mit Flotillin-1-Knockout (F1KO) Zellen durchzuführen, um so einen Einfluss durch das endogene Flotillin-1 auszuschließen.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte und Materialien

Im Folgenden werden die verwendeten Geräte und Materialien für die vorliegende Arbeit mit den dazugehörigen Herstellern und dem Firmensitz aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

<b><u>Bezeichnung</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<b>Inkubator</b>	EWALD, Innovationstechnik GmbH, Sanyo, München (DE)
<b>Bakterien-Inkubator Incucell</b>	Sanyo, München (DE)
<b>Schwenktisch</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
<b>Schüttler</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
<b>TECAN infinite M200</b>	TECAN, Crailsheim (DE)
<b>Biophotometer plus</b>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
<b>Magnet-Eppendorf-Ständer (Dyna)</b>	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)
<b>Rotator</b>	neoLab, Heidelberg (DE)
<b>Bio Vortex V1</b>	PEQLAB, Erlangen (DE)
<b>Spektralphotometer, BioPhotometer Plus</b>	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf (DE)
<b>Heizblock</b>	HLC BioTech, Bovenden (DE)
<b>Mikrotestplatten 96 Well F</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
<b>Cellstar Plastikröhrchen, 15ml, 50ml</b>	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen (DE)
<b>Parafilm</b>	Bemis, Wisconsin, (USA)
<b>Pipettenspitzen</b>	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
<b>Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml</b>	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
<b>Polystyrolküvetten</b>	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
<b>Multipipette, elektr., HandyStep®</b>	Brand, Wertheim, (DE)
<b>Glaskolben</b>	Schott-AG, Mainz, (DE)
<b>Pasteurpipetten, Glas</b>	VWR International, Darmstadt, (DE)
<b>Waage Toledo, PB602-S</b>	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
<b>Wasserbad, LAUDA</b>	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen (DE)
<b>Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)

<b><i>Mikroskop</i></b>	
<b>Fluoreszenzmikroskop LSM 710</b>	Carl-Zeiss, Göttingen (DE)
<b>Lichtmikroskop (AE 31)</b>	Motic, Wetzlar, Deutschland
<b><i>Zellkultur</i></b>	
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Optik Labor, Bad Homburg (DE)
<b>Sterilbank (Herasafe KS)</b>	Thermo Scientific, St.Leon-Rot (DE)
<b>Zellkulturflaschen T-25</b>	Sarstedt, Nürnberg (DE)
<b>Zellkulturplatten 6 Well, 12 Well,</b>	Sarstedt, Nürnberg (DE)
<b>Zellkulturschalen 10 mm</b>	Sarstedt, Nürnberg (DE)
<b><i>Zentrifugen</i></b>	
<b>Tischzentrifuge</b>	Labnet, Langenfeld (DE)
<b>Zentrifuge Mikro 22 R</b>	Hettich, Kirchlengern (DE)
<b>Zentrifuge Universal 32 R</b>	Hettich, Kirchlengern (DE)
<b>Zentrifuge Mikro 200 R</b>	Hettich, Kirchlengern (DE)
<b>Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml</b>	Greinerbio one, Frickenhausen (DE)
<b><i>Gelelektrophorese und Western Blot</i></b>	
<b>Blot-Kammer (BioRad) Criterion Blotter</b>	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
<b>SDS-PAGE Kammer</b>	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
<b>Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply, EPS 301)</b>	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
<b>SDS Gel-Gießkammer</b>	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
<b>Entwickler Maschine (Curix 60)</b>	AGFA, Düsseldorf (DE)
<b>Nitrocellulose-Membran (Whatman® Protran)</b>	Whatman, Dassel (DE)
<b>Filterpapier Protran BA 83</b>	Whatman, Dassel (DE)
<b>Frischhaltefolie</b>	ParStar, Kall (DE)
<b>Röntgenfilm (Super RX Fuji medical X-ray Films)</b>	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
<b><i>Immunfluoreszenz</i></b>	
<b>Deckglässchen</b>	Menzel, Braunschweig (DE)
<b>Objektträger 76x26mm</b>	neoLab, Heidelberg

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden mit ihren jeweiligen Herstellernamen und deren Niederlassungsorten in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

<b><u>Bezeichnung</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<b>Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Agarose</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Ammoniumpersulfat (APS)</b>	Appllichem, Darmstadt (DE)
<b>Bradford Reagenz</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Bromphenolblau</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Biorad Protein Assay (Proteinmarker)</b>	BioRad, München (DE)
<b>Bovine Serum Albumine (BSA)</b>	Merck, Darmstadt (DE)
<b>Cumarinsäure</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>DABCO (1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan)</b>	Fluka, Neu-Ulm (DE)
<b>DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)</b>	Merck, Darmstadt (DE)
<b>Digitonin</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)</b>	Life Technologies, Darmstadt (DE)
<b>DMSO (Dimethylsulfoxid)</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Dynabeads Protein A</b>	Life Technologies, Darmstadt (DE)
<b>DTT (Dithiothreitol)</b>	Appllichem, Darmstadt (DE)
<b>ECL (enhanced chemiluminescence) Supersignal West pico /West femto</b>	Thermo Fisher Scientific, GmbH, Dreieich (DE)
<b>EGF epidermal growth factor</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>Ethanol</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>FCS (fötales Kälberserum)</b>	Life Technologies, Darmstadt (DE)
<b>Fluormount™ Aqueous Mountag</b>	Sigma- Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>Glycerin</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Isopropanol</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Kanamycin</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>LB-Medium</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Luminol</b>	AppliChem, Darmstadt (DE)
<b>MACSfectin</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach (DE)

<b>Methanol</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Milchpulver</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Natriumacetat</b>	Applichem, Darmstadt (DE)
<b>Natriumfluorid</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Natriumorthovanadat</b>	Sigma Aldrich, Steinheim (DE)
<b>Optimem, Gluta MAX</b>	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich (DE)
<b>Pansorbin</b>	Calbiochem, Nottingham (UK)
<b>PBS Phosphat gepufferte Salzlösung</b>	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich (DE)
<b>Poly-L-Lysin</b>	Merck, Darmstadt (DE)
<b>Ponceau S</b>	Applichem, Darmstadt (DE)
<b>Protease-Inhibitor-Cocktail</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>SDS (Natriumdodecylsulfat)</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>TEMED, Tetramethylethyldiamin</b>	Roth, Karlsruhe (DE)
<b>Tris-Salzsäure</b>	Applichem, Darmstadt (DE)
<b>Trypsin</b>	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (DE)

## 2.3 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind mit Angabe ihrer Zusammensetzung in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>Blockierungspuffer</b>	Milchpulver	5%
	TBST	
<b>Blottingpuffer</b>	Glycin	192 mM
	MeOH	10%
	Tris-Base	25 mM
<b>DMEM++</b>	DMEM	500 ml
	Fötale Kälberserum	10%
	Penicillin/Streptomycin	1%

<b>ECL Lösung</b>	Cumarinsäure	1%
	Luminol	1,25 mM, 1ml
	H <sub>2</sub> O	0,2 mM
	Tris-HCl, pH 8,5	100 mM
<b>Ladepuffer, 4x</b>	Bromphenolblau	0,1%
	DTT	100 mM
	Glycerin	10%
	SDS	2%
	Tris-HCl, pH 6,8	50 mM
	β--Mercaptoethanol	20%
<b>Lämmli Laufpuffer</b>	Glycin	192 mM
	SDS	0,1%
	Tris-Base	25 mM
<b>LB-Agar</b>	Agar-Pulver	15 g
	LB-Medium	1 l
<b>LB Medium</b>	LB Brühe	20 g
	Dest. Wasser	1 l
<b>PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4)</b>	Natriumchlorid	150 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	20 mM
<b>Ponceau Färbelösung</b>	Essigsäure	5%
	Ponceau S	1%
<b>SDS PAGE (Trenngel) 10% /1 mm</b>	Acrylamid (30%)	13,4 ml
	APS (10%)	0,4 ml
	dest. Wasser	21 ml
	SDS (20%)	0,2 ml
	TEMED	0,064 ml
	Tris, ph 8,8 (3 M)	5 ml
<b>SDS PAGE (Sammelgel) 4% /1 mm</b>	Acrylamid (30%)	2,55 ml
	APS (10%)	0,075 ml
	H <sub>2</sub> O	11,7 ml
	SDS (20%)	0,075 ml
	TEMED	0,0225 ml
	Tris, ph 6,8 (3 M)	0,624 ml
<b>Stripp. Lösung alkalisch</b>	Natriumhydroxid (pH 12,7)	0,1 M

<b>Stürmerpuffer (Lysepuffer)</b>	EDTA	2 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	NP-40	1%
	Tris, pH 7,4	50 mM
<b>TBST (Tris gepuffertes Kochsalz &amp; Tween 20)</b>	NaCl	150 mM
	Tris-HCl, pH 7,4	10 mM
	Tween 20	0,05%

## 2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper für Western Blots (WB), Immunofluoreszenz (IF) und Immunopräzipitation (IP) sind in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet.

### 2.4.1 Primärantikörper

Tabelle 4: Die Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und Hersteller

Antikörper	Wirt	Verdünnung			Hersteller
		WB	IF (Fixierung)	IP	
<b>Flotillin-1</b>	Maus	1:1000	-	-	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ (USA)
<b>Flotillin-2 /ESA</b>	Maus	-	1:100 MeOH	-	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ (USA)
<b>GAPDH</b>	Maus	1:10000	-	-	Abcam, Cambridge (UK)

<b>Phospho-EGFR (Tyr1173) (#4407)</b>	Kaninchen	1:1000	-	-	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)
<b>Phospho-Erk (E-4)</b>	Maus	1:1000	-	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
<b>EGFR (D38B1) (#4267)</b>	Kaninchen	1:1000	-	-	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)
<b>Erk 2 (C-14)</b>	Kaninchen	1:1000	-	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
<b>Erk 1 (G-12)</b>	Maus	1:1000	-	-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
<b><math>\alpha</math>-GFP (monoklonal)</b>	Maus	1:1000	-	-	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE)
<b><math>\alpha</math>-Flot 1</b>	Kaninchen	-	-	2ul pro Ansatz	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
<b>GFP (polyklonal)</b>	Kaninchen	-	-	2ul pro Ansatz	Clontech Laboratories, CA (USA)

## 2.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 5: Die Sekundärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung und dem Hersteller

Antikörper	Verdünnung		Hersteller
	WB	IF	
<b>Goat anti-mouse IgG/HRP</b>	1:5000		Dako, Hamburg (DE)
<b>Goat anti-rabbit IgG/HRP</b>	1:5000		Dako, Hamburg (DE)
<b>Alexa Fluor® 546 donkey anti-mouse IgG</b>		1:300	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe (DE)

## 2.5 Antibiotika

Im Folgenden werden die verwendeten Antibiotika im Rahmen dieser Arbeit mit Hersteller und der jeweiligen Arbeitskonzentrationen aufgelistet.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Kanamycin	50 µg/ml	Roth, Karlsruhe (DE)
Penicillin	250 µg/ml	Roth, Karlsruhe (DE)
PS (Penicillin/Streptomycin)	1%	Gibco Life Technologies, Kalifornien (USA)

## 2.6 Kit

Tabelle 7: Auflistung des verwendeten Kit

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond® Xtra plasmid purification (Midi) Set	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren (DE)

## 2.7 Bakterien-Stämme

Tabelle 8: Die verwendeten Bakterien-Stämme, deren Verwendung und Referenz.

Bezeichnung	Organismus	Verwendung	Quelle
-------------	------------	------------	--------

<b>XL1 Blue</b>	E.coli	Plasmid Amplifikation	Stratagene, Heidelberg (DE)
-----------------	--------	-----------------------	--------------------------------

## 2.8 Plasmide und Vektoren

Die eingesetzten Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Referenzen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Die verwendeten Plasmide und Vektoren mit der jeweiligen Referenz (Amaddii, 2009)

<b>Konstrukte</b>	<b>Vektor</b>	<b>Referenz</b>
<b>EGFP (Leervektor)</b>	pEGFP-N1	Clontech, Palo Alto, CA, US
<b>Flotillin-1-EGFP (Wildtyp)</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y56F-R2-EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y121F-R2-EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y160-R2-EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y56F, Y121F-R2EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y56F, Y160F-R2EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen
<b>Y121F, Y160F-R2EGFP</b>	pEGFP-N1	AG Tikkanen

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Standardmethoden

##### 3.1.1 Kultivierung von HeLa- und HEK-Zellen

Die Kultur der humanen Cervix-Adenokarzinom-Zellen (HeLa) und der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) erfolgte bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit und in 5 ml Zellkultur-Flaschen. Zur Kultivierung beider Zelllinien wurden DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) zusätzlich 10% Fötale Kälberserum sowie 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugegeben.

Tabelle 10: Die Liste der verwendeten humanen Zelllinien sowie zusätzliche Informationen

Bezeichnung	Information	Quelle
<b>HeLa Wildtyp</b>	Humane Cervix – Adenokarzinomzellen der afroamerikanischen Frau Henrietta Lacks	ATCC, Teddington (USA)
<b>HeLa Flotillin-1-Knockout</b>	HeLa-Wildtyp Zellen ohne Flotillin-1-Expression (mit CRISPR/Cas9 generiert)	(Kapahnke <i>et al.</i> , 2016)
<b>HEK293 Wildtyp</b>	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC, Teddington (USA)
<b>HEK293 Flotillin-1-Knockout</b>	HEK293- Wildtyp Zellen ohne Flotillin-1-Expression (mit CRISPR/Cas9 generiert)	(Kapahnke <i>et al.</i> , 2016)

##### 3.1.2 Splitten der HeLa- und HEK-Zellen

Nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen der Zellen mit ca. 2 ml 1x Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) wurde zu den Zellen 300 µl Trypsinlösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für ca. 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml DMEM++ und die Resuspension der Zellen. Ein Teil der trypsinisierten Zellen wurde bei Bedarf ausgesät und für weitere Experimente verwendet. Die übrigen Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit verdünnt und auf neue Zellkultur-Flaschen verteilt.

### 3.1.3 Transiente Transfektion der HeLa- und HEK-Zellen mit Plasmid-DNA

Um eine optimale Zelldichte für die Transfektion zu erreichen, wurden die zuvor trypsinisierten Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf 12 Wellplatten ausgesät. Anschließend erfolgte die transiente Transfektion mit MACSfectin. Zur Vorbereitung wurden von den Konstrukten (siehe Tabelle 9), jeweils 1 µg entnommen und in 100 µl DMEM -/- (serumfreies Medium) vermengt. Das MACSfectin wurde je nach Anzahl der zu transfizierenden Konstrukte 3 µl pro DNA-Plasmid mit 100 µl DMEM -/- in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß angesetzt. Anschließend wurden jeweils 100 µl von dem MACSfectin-Gemisch zum DNA-Gemisch hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde das DMEM ++ der Zellen gewechselt. Nach der Inkubation wurden pro Well 200 µl vom Transfektionsmix aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Stunden wurde das Medium erneut mit frischem DMEM ++ gewechselt und die Zellen bis zum nächsten Tag in den Brutschrank bei 37°C gestellt.

### 3.1.4 Stimulation der HeLa- und HEK-Zellen mit EGF

Nach Transfektion und Trypsinierung der Zellen in 6 Wellplatten wurden sie bei 37°C inkubiert bis zu einer Konfluenz von ca. 80%. Anschließend wurden die Zellen für eine Nacht unter serumfreien Bedingungen inkubiert, um unerwünschte Signale von Wachstumsfaktoren aus dem serumhaltigen Medium zu vermeiden. Die Stimulierung erfolgte mit 10 ng/µl des epidermalen Wachstumsfaktors für 10 Minuten bei 37°C. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen gestarvt, jedoch nicht mit dem epidermalen Wachstumsfaktor stimuliert.

### 3.1.5 Immunfluoreszenz

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung kann die Lokalisation der Proteine innerhalb der HeLa-Zellen untersucht werden. Dafür wurden die Zellen nach der Transfektion auf Deckgläschen in 12 Wellplatten (15 mm Ø) ausgesät. Für die HEK-Zellen wurden die Coverslips zusätzlich mit Poly-L-Lysin beschichtet, um so die Haftung zwischen den Zellen und dem Deckgläschen zu erhöhen. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Danach wurden die Zellen mit kaltem und 100%igem Methanol für 8 Minuten bei -20°C fixiert. Nach Entsorgung des Methanols wurden die Zellen 3x á 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen, direkt gefärbt oder in 1x PBS bei 4°C gelagert. Bei der Färbung wurden die Deckgläschen in Feuchtekammern transferiert und mit jeweils 30 µl 1% bovines

Serumalbumin (BSA) in 1x PBS für 20 Minuten geblockt. Nach der angegebenen Zeit wurden jeweils 30 µl in 1% BSA und 1x PBS verdünnter Primärantikörper hinzugegeben und bei Raumtemperatur für ca. 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen 3x á 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und mit fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für jeweils 5 Minuten wurden sie einmal kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit ca. 15 µl Fluormount und dem 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), 1:50 verdünnt, auf Objektträger eingebettet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss LSM710 konfokalem Laserscanning Mikroskop und die Analyse mit dem ZEN-Programm.

### 3.1.6 Auftauen von HeLa- und HEK-Zellen

Die in DMSO eingefrorenen Zellen wurden halbaufgetaut in 15 ml Röhrchen mit 5 ml serumhaltigem DMEM resuspendiert und anschließend bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für ca. 2 Minuten abzentrifugiert. Nach Abschütten des Überstands wurde der Vorgang wiederholt. Danach wurden ca. 1 ml DMEM ++ zu dem Zellpellet hinzugefügt, resuspendiert und je nach Bedarf auf Zellkulturflaschen verteilt.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### 3.2.1 Plasmid Amplifikation, Aufreinigung

Die schon zuvor transformierten XL1 Blue E. coli Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden, die in Tabelle 9 aufgelistet sind, wurden über Nacht bei 37°C auf LB Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin zur Selektion inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inokulation von 100 ml LB-Medium mit Einzelkolonien der LB Agarplatten in einem Erlenmeyerkolben und die erneute Inkubation über Nacht bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator. Mithilfe des NucleoBond Xtra plasmid purification (Midi) Sets von Macherey Nagel GmbH & Co, Düren (DE) wurde die Plasmid-DNA nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus HEK- und HeLa-Zellen

Zunächst wurden die Zellen, nachdem sie die gewünschte Dichte erreicht hatten, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt. Danach erfolgte durch Zugabe von Stürmerpuffer, versetzt mit einem Protease Inhibitor Cocktail, die Blockierung der proteolytischen Aktivität. Dazu wurden die Zellpellets mit dem Lysepuffer auf Eis für 30 Minuten lysiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 15.000 rpm und 4°C, wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Danach wurde der Überstand jeweils in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Mithilfe der Messung nach Bradford wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate photometrisch bestimmt und bei Bedarf mit der entsprechenden Menge destilliertes Wasser aneinander angeglichen. Für die Proteinanalyse mit dem Western Blot System wurde anschließend eine bestimmte Menge des Lysats in 4x Ladepuffer für 5 Minuten bei 94°C gekocht. Bei Stimulation der Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor, erfolgte zuerst der Lysevorgang, und anschließend wurden die Zellen auf Eis geerntet.

#### 3.3.2 Co-Immunopräzipitation

Für die Ermittlung von Proteinen und deren Interaktionspartner wurden zunächst Zellpellets hergestellt. Dazu wurden die ausgesäten und transfizierten HEK-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen übertragen und, nach Erreichen der gewünschten Zelldichte, geerntet. Die Lysatherstellung erfolgte mit 4 ml Stürmerpuffer und 5 µl Protease Inhibitor pro 10 cm Zellkulturschale. Der weitere Lysevorgang erfolgte wie im vorherigen Kapitel (3.3.1) beschrieben. Um unspezifisch bindendes Material aus dem Lysat zu entfernen, wurden diese insgesamt 3x mit 50 µl Pansorbin für 15 Minuten auf Eis vorgereinigt. Nach jedem Waschgang wurde mithilfe der Zentrifuge für 5 Minuten bei 15.000 rpm das Lysat vom Pansorbin getrennt und in neue Eppendorf Gefäße überführt. Zur Herstellung der Kontrollproben wurden jeweils 30 µl vom vorgereinigten Lysat in separate Gefäße pipettiert. Als nächstes erfolgte die Kopplung der magnetischen Beads (Dynabeads Protein A) mit dem polyklonalen rabbit anti-GFP Antikörper (2 µl pro Lysat) im Rotator für 3 Stunden. Anschließend wurden pro Lysat 30 µl vom Beads-Ansatz hinzugegeben und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Antikörpers, zusätzlich jeweils 100 µl 10%iges BSA hinzupipettiert. Nach Resuspension wurden die Ansätze bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Beads 4x mit 1 ml

Stürmerpuffer gewaschen, in 35 µl 2x Ladepuffer mit DTT auf- und abpipettiert und bei 94°C für 5 Minuten gekocht. Zu den 30 µl Lysat, die als Input dienten, wurden 10 µl 2x Ladepuffer mit DTT hinzugegeben und gekocht.

### 3.3.3 SDS PAGE und Western Blot

Mithilfe der Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) -Gelelektrophoresetechnik erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe. Dazu wurden ca. 35 µl von den zuvor abgekochten Gelproben in ein Sammelgel, bestehend aus Polyacrylamid pipettiert. Um die Proteingrößen bestimmen zu können, wurde 2,5 µl vom Biorad Proteinmarker verwendet. Im 1x Lämmli-Puffer bei 220 V und 15 mA pro Gel für ca. 1 Stunde, erfolgte anschließend die Auftrennung des Proteingemisches. Ab dem Trenngel wurde die Apparatur auf 20 mA hochgestellt und 1 cm vor Ende des Gels der Vorgang gestoppt. Nachfolgend fand der Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran statt. Für den Vorgang wurde die Membran zusammen mit dem Gel, eingebettet zwischen zwei Filterpapiere und zwei Schwämmen, in ein Gitter in die Blotkammer mit 1x Blotsalz eingehängt. Durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 400 mA und einer Spannung von 220 V, wanderten die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Nach ca. 1 Stunde erfolgte die reversible Färbung der membrangebundenen Proteine mit 5% Ponceau, um so die Qualität des Transfers zu beurteilen. Nach etwa 10 Sekunden waren die Proteinbanden sichtbar.

### 3.3.4 Immundetektion

Im Anschluss nach der Entfärbung mit 1x *Tris-Buffered-Saline & Tween* (TBST), wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5%iger Milch in 1x TBST für 30 Minuten geblockt. Danach erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C. Am Tag darauf folgten 3 Waschschriffe mit 1x TBST je 10 Minuten und die Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers für 1 Stunde. Vor der Immundetektion wurde die Membran erneut dreimal mit 1x TBST gewaschen. Die Membran wurde dann, nach vorsichtigem Abtrocknen mit 1 ml hausgemachter *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung pro Membran für 2 Minuten inkubiert und nach erneutem Trockentupfen in Frischhaltefolie eingepackt. Danach wurde die Membran in eine Röntgenkassette eingeklebt und je nach Signalstärke Röntgenfilme mit Belichtungszeiten von 1 Sekunde bis 20 Minuten entwickelt. Membranen, die sehr schwache Signale aufwiesen, wurden mit einer stärkeren ECL-Lösung (Supersignal West pico /West femto 1:3) entwickelt. Für die erneute Verwendung der Blots wurden sie gestrippt. Dafür wurden die Membranen

jeweils für 10 Minuten in 0,1 M Natronlauge, dann in Aquadest und anschließend in 1x TBST inkubiert. Nachfolgend wurden die unspezifischen Bindungsstellen erneut für 30 Minuten mit 5%ger Milch geblockt.

### **3.4 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung**

#### **3.4.1 Elektronische Manipulation der Abbildungen**

Die dargestellten Bilder wurden jeweils durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen angepasst. Es erfolgten keine weiteren Manipulationen der Abbildungen. Alle Aufnahmen, die mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen wurden, wurden mit der ZEN-Software exportiert und analysiert.

#### **3.4.2 Statistik**

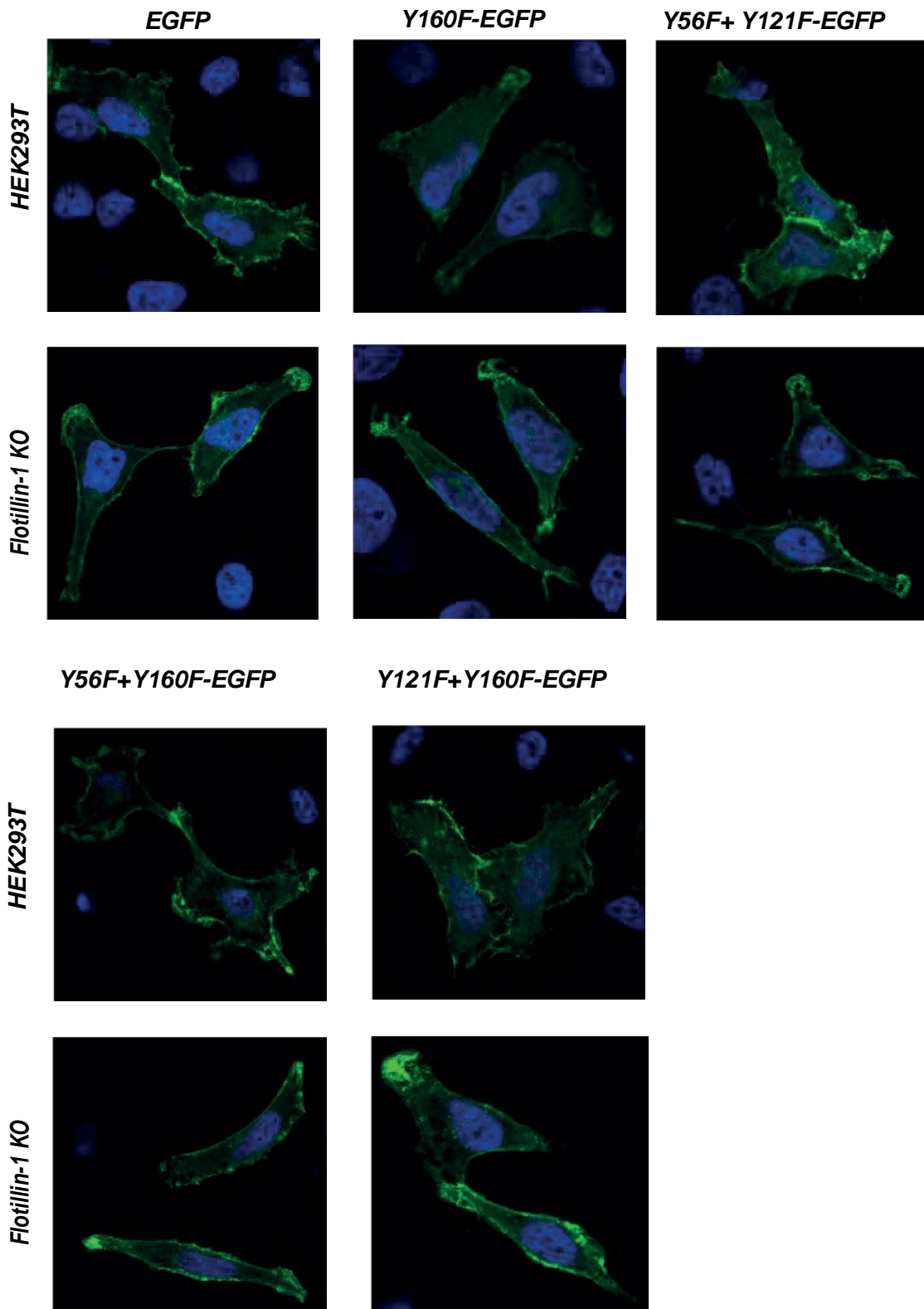
Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Mit Hilfe der Quantity One-Software (BioRad) wurden die Western Blot-Signale quantifiziert und entweder auf GAPDH (pEGFR) oder Gesamt-Erk Protein (pErk) normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit der GraphPad Prism Software (Version 5), wobei zur Auswertung eine zweifache Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test angewendet wurde. Die Ergebnisse sind in Form des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Werte von  $p < 0,001$  (\*\*\*) gelten als hoch signifikant, die Werte von  $p < 0,01$  als sehr signifikant (##) und die Werte von  $p < 0,05$  als signifikant (\*).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der zellulären Lokalisation von mutierten Flotillinen

In meinen Versuchen wurden sechs verschiedene Flotillin-1-Mutanten eingesetzt, zusammengesetzt aus drei Einzelmutanten (Y56F, Y121F, Y160F) und drei Doppelmutanten (Y56F+Y121F, Y56F+Y160F, Y121F+Y160F). Die Mutationen wurden im Rahmen von der Doktorarbeit von Monia Amaddii mittels *in vitro* Mutagenese hergestellt (Amaddii, 2009). Zusätzlich zu den oben genannten Mutanten wurden die Zellen mit einem GFP-exprimierenden Leervektor (EGFP) und Wildtyp Flotillin-1/Reggie-2, auch als R2-EGFP bezeichnet, transfiziert. Die Untersuchung der Lokalisation von Flotillin-Mutanten in HEK293T-Zellen erwies sich als ungeeignet aufgrund der schlechten Haftung zwischen den Zellen und dem Deckgläschen. Trotz der zusätzlichen Beschichtung der Coverslips mit Poly-L-Lysin, um die Haftung zu erhöhen, waren kaum bis keine Zellen zu sehen. Aufgrund dessen beschränken sich die vorliegenden Ergebnisse nur auf die HeLa-Zellen. Die Flotillin-1-Knockout-Zellen wurden mit Hilfe des *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9)* -Systems hergestellt, um so eine vollständige Abwesenheit von Flotillin-1 sicherzustellen (Kapahnke *et al.*, 2016).

Nach der transienten Transfektion der Wildtyp und Flotillin-1-Knockout HeLa-Zellen mit den oben genannten Konstrukten erfolgte die Kultivierung der transfizierten Zellen auf Deckgläschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Methanol fixiert. Durch das GFP-Fusionsprotein konnte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie die zelluläre Lokalisation analysiert werden. In früheren Versuchen wurde nachgewiesen, dass endogenes Flotillin-1 in vielen Zelltypen überwiegend an der Plasmamembran, aber auch intrazellulär unter anderem in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten vorkommt (Stuermer *et al.*, 2001; Babuke *et al.*, 2007; Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Die Ergebnisse von meinem Versuch zeigten ähnliche Resultate (siehe Abbildung 4). Die Flotillin-1-Mutanten als auch der Flotillin-1-Wildtyp, befanden sich vorwiegend an der Plasmamembran und teilweise intrazellulär. Es war kein deutlicher Unterschied bei der Lokalisation der jeweiligen Flotillin-1-Fusionsproteinen zwischen den Wildtyp und den Flotillin-1-Knockout HeLa-Zellen zu erkennen. Die mit den Mutanten Y56F und Y121F transfizierten HeLa-Zellen konnten nicht ausgewertet werden, weil die Transfektionsrate zu niedrig war.



**Abbildung 4: Zelluläre Lokalisation von Flotillin-1-Mutanten in HeLa-Zellen.**

Nach Kultivierung der HeLa-Zellen auf Deckgläschen, erfolgte die transiente Transfektion mit mutierten Flotillin-1 Konstrukten und dem Wildtyp Flotillin-1-EGFP und die Fixierung mit Methanol. Mittels GFP-Fluoreszenz (grün) wurden die Flotillin-Fusionsproteine dargestellt. Die Zellkerne wurden mittels des dsDNA spezifischen Farbstoffs DAPI markiert (blau). Die Abbildung zeigt repräsentative Zellen aus insgesamt drei separaten Experimenten.

## 4.2 Effekt der Flotillin-1-Mutanten auf den EGF-Rezeptor und MAPK-Signalweg in HEK- Zellen

In vorherigen Studien stellte sich heraus, dass Flotilline eine wichtige Rolle in der EGFR-Aktivierung und in der Signaltransduktion einnehmen (Neumann-Giesen et al., 2007; Amaddii et al., 2012; Kurrle et al., 2012).

Anhand von Monia Amaddiis Doktorarbeit wurde der EGF-induzierte Signalweg in Flotillin-1-Knockdown-Zellen untersucht. Es wurde beobachtet, dass bei reduzierter Expression des Flotillin-1 die Degradation von EGFR herunterreguliert wurde und die Anzahl an intrazellulären EGF-Rezeptoren demzufolge erhöht war. Nach Immundetektion von Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinresten (Y1173, Y1068) und der MAP-Kinase Erk 1/2 wurde jedoch beobachtet, dass die Tyrosin-Phosphorylierung vom EGF-Rezeptor und auch die ERK 1/2-Aktivierung abnahm (Amaddii *et al.*, 2012).

Für die weitere Analyse wurde in folgenden Versuchen die molekulare Funktion von Flotillin-1-Mutanten in der EGF- Signaltransduktion in vollständiger Abwesenheit von endogenem Flotillin-1 untersucht. Für diese Untersuchung wurden primär HEK293-Zellen statt HeLa-Zellen verwendet aufgrund der höheren Transfektionsrate. Des Weiteren konzentrierte sich der Versuch nur auf die Doppelmutanten. Die Wildtyp und Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen wurden mit den Doppelmutanten, dem Wildtyp Flotillin-1-EGFP (R2-EGFP) und dem Leervektor (EGFP) transient transfiziert. Nach Inkubation im serumfreien Medium erfolgte für 10 min die Stimulation mit EGF. Ein Teil der Zellen wurde zur Kontrolle nicht stimuliert. Anschließend wurde nach Lysatherstellung ein Western Blot durchgeführt. Zur Immundetektion wurden die Antikörper Phospho-anti-EGFR (pY1173), anti- EGFR und Antikörper gegen Erk 1/2, Flotillin-1 und Flotillin-2 eingesetzt (siehe Abbildung 5-9).

In den Western Blots ist zu beobachten, dass vor allem in den unstimulierten Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen, transfiziert mit den 5 Konstrukten, das Gesamt-EGFR verstärkt erscheint (siehe Abbildungen 5a, 6a, 7a, 8a, 9a). Die Doppelbanden beim pY1173-EGFR-Signal nach EGF-Stimulation sind auf die unterschiedlichen Phosphorylierungsformen des EGF-Rezeptors zurückzuführen. Das Phospho-Erk1/2 Signal weist ebenfalls Doppelbanden auf. Dabei handelt es sich um die Isoformen von Erk, wobei die obere Bande Erk1 (44kDa) und die untere Bande Erk2 (42kDa) darstellt. Durch die Detektion von dem GFP-gekoppelten Flotillin-1 konnte die gelungene Transfektion in die HEK-Zellen bestätigt werden. GAPDH dient als Ladekontrolle.

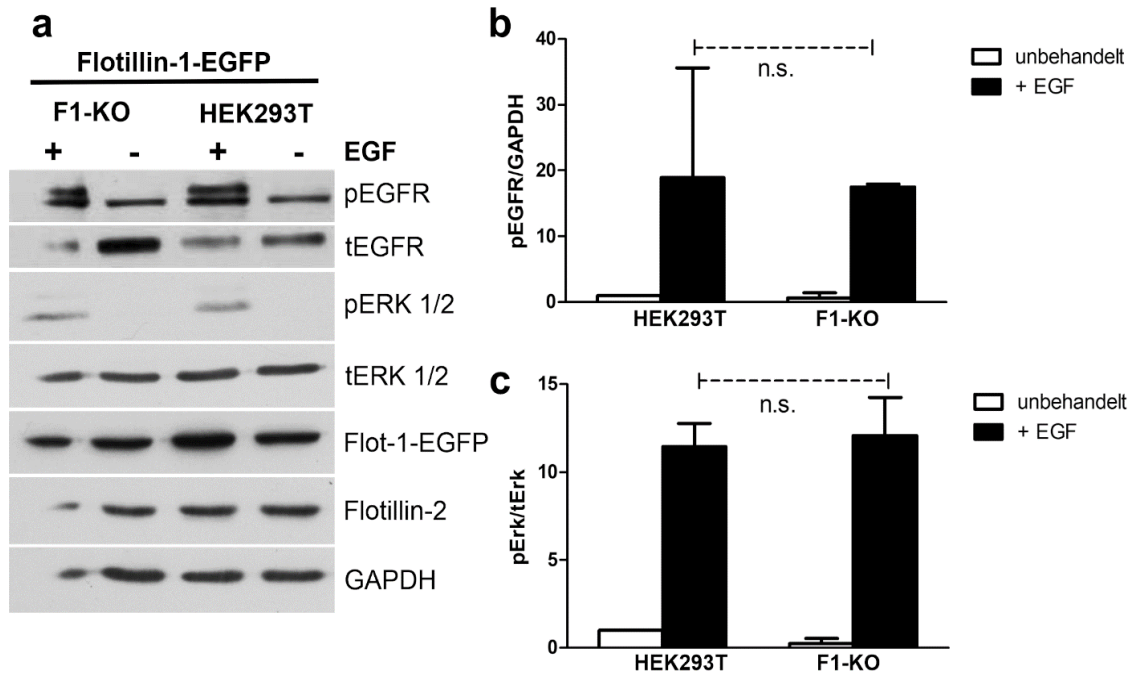
Es ist jedoch zu beachten, dass die tEGFR-Signale in den stimulierten HEK-Zellen nicht repräsentativ sind, weil durch die mehrfache Phosphorylierung nach EGF-Stimulierung die Gesamt-EGFR-Banden in den Zellen stark verwischt sind. Für die Quantifizierung

wurde Phospho-EGFR (pEGFR) deshalb auf Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Phospho-Erk (pErk) auf Gesamt-Erk (tErk) normalisiert. Die Normalisierung von pEGFR auf Gesamt-EGFR (tEGFR) wäre in diesem Fall nicht sinnvoll, weil das tEGFR-Signal aufgrund der mehrfachen Phosphorylierung in den Western Blots schwächer erscheint (siehe Abbildung 5a,6a,7a,8a,9a).

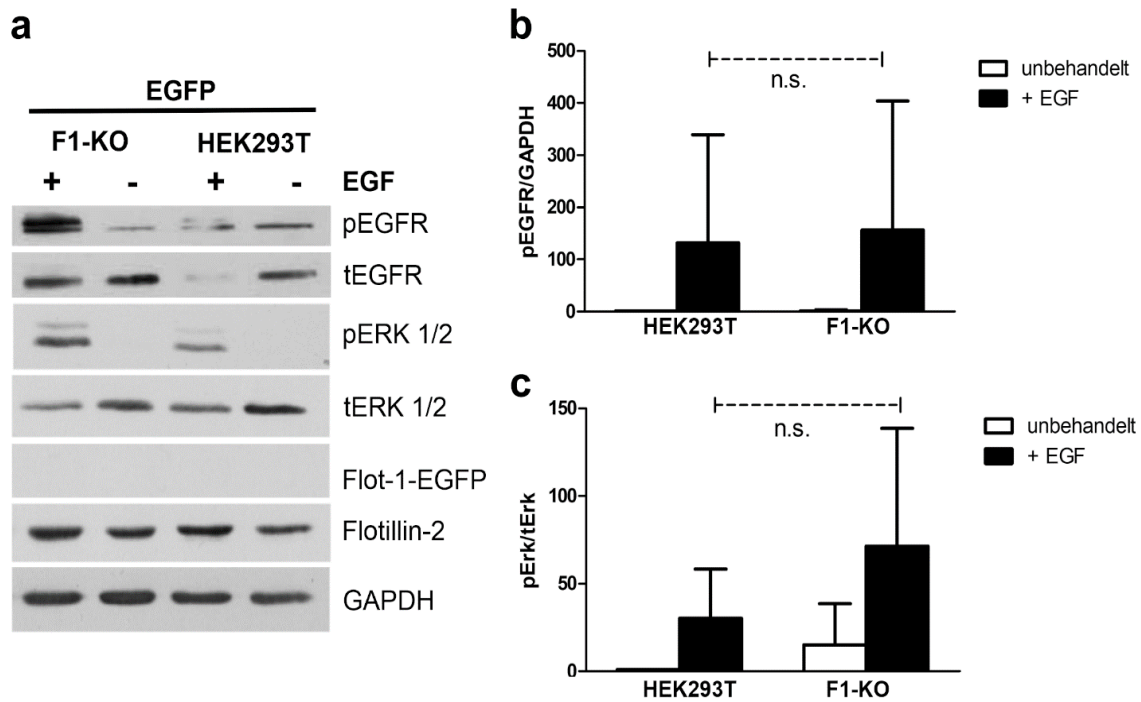
Die Abbildung 5b zeigt das Verhalten von pEGFR in HEK293T- und F1-KO Zellen, welche mit dem Flotillin-1-EGFP transfiziert wurden. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den HEK 293T-Zellen und F1-KO Zellen zu erkennen, weder in den unstimulierten noch in den mit EGF stimulierten Proben. Allerdings zeigt die Phosphorylierung von EGFR (siehe Abbildung 5b) eine sehr starke Variation zwischen den einzelnen Experimenten. pErk weist ebenfalls kaum einen Unterschied auf (siehe Abbildung 5c).

Bei den mit dem Leervektor (EGFP) transfizierten HEK293T Zellen sind pEGFR und pErk (siehe Abbildung 6b und 6c) nur tendenziell in den Flotillin-1-Knockout-Zellen erhöht. Aufgrund von experimenteller Variation ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Auch in den mit dem Y56F+Y121F-Mutanten transfizierten HEK 293T Zellen sind pEGFR und pErk in den EGF-stimulierten F1-KO Zellen tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht (siehe Abbildung 7). Gleiches gilt für die HEK-Zellen, transfiziert mit Y121F+Y160F (siehe Abbildung 8).

Die mit der Mutante Y56F+Y160F transfizierten HEK-Zellen zeigen als einzige Mutante signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 9). pEGFR weist einen signifikanten Unterschied zwischen den unstimulierten und mit EGF-stimulierten Flotillin-1-Knockout-Zellen auf (siehe Abbildung 9b). Es ist aber kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten HEK293T-Zellen und F1-KO Zellen zu erkennen. Bei pErk (siehe Abbildung 9c) wiederum liegt ein sehr signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten HEK293T-Zellen und F1-KO-Zellen vor. Zwischen den unbehandelten und mit EGF behandelten F1-KO Zellen besteht sogar ein hoch signifikanter Unterschied.

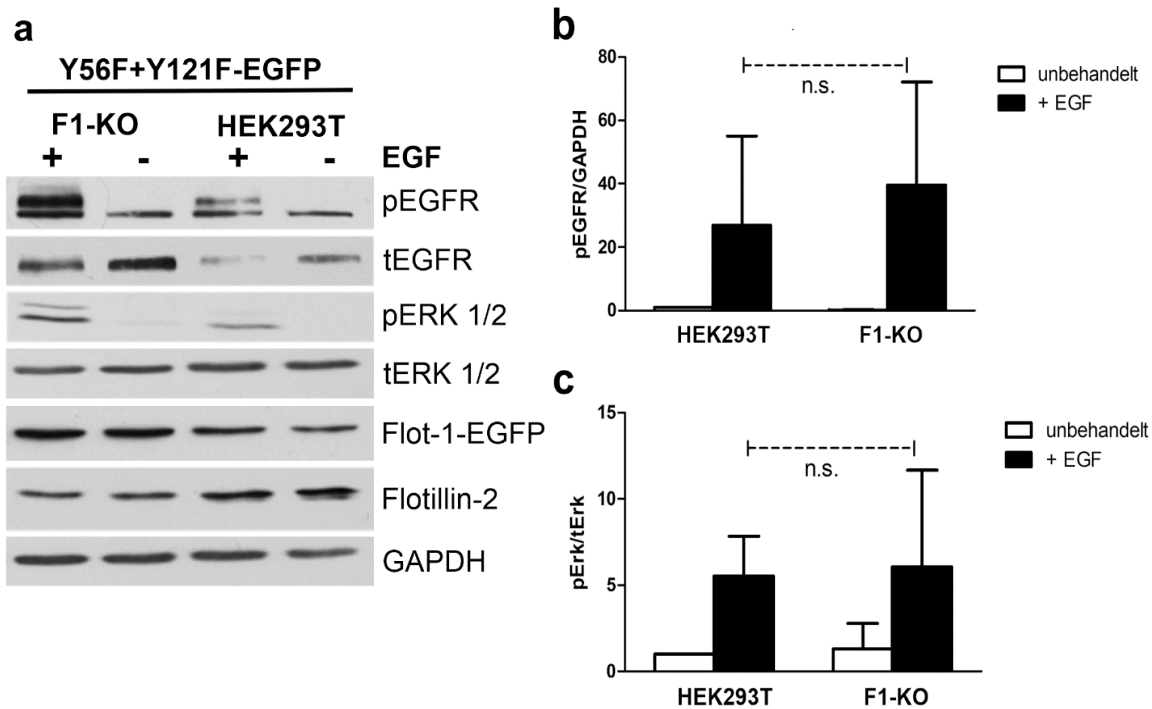


**Abbildung 5: Einfluss von Flotillin-1-EGFP auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen**  
**(a)** Die HEK293T-Zellen (Wildtyp und Flotillin-1-Knockout) wurden mit dem Mutanten Y56F+Y121F-EGFP transient transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Jeweils 30 µg der Proteinlysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit EGFR- Antikörpern (pY1173 oder Gesamt), mit Erk 1/2 Antikörpern (phospho oder Gesamt) und Flotillin-1 und Flotillin-2 Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von pEGFR **(b)** und pErk **(c)** dar. pEGFR wurde auf GAPDH normalisiert und pErk auf tErk. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test.



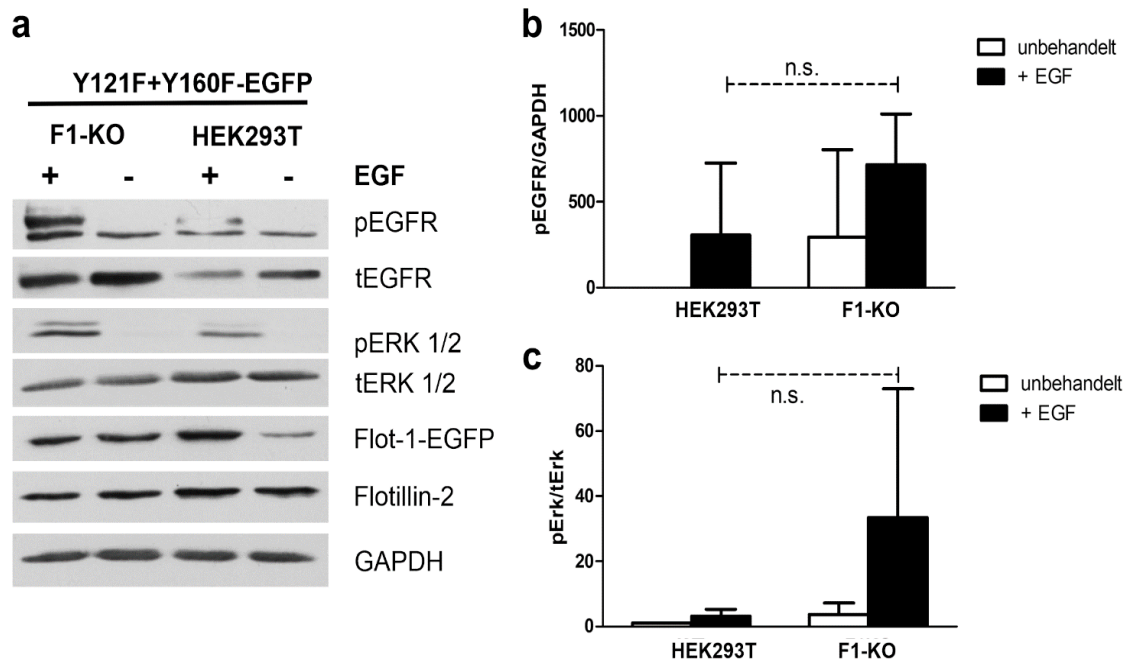
**Abbildung 6: Einfluss von EGFP auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen**

(a) Die HEK293T-Zellen (Wildtyp und Flotillin-1-Knockout) wurden mit dem Mutanten Y56F+Y121F-EGFP, transient transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Jeweils 30 µg der Proteinlysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit EGFR- Antikörpern (pY1173 oder Gesamt), mit Erk 1/2 Antikörpern (phospho oder Gesamt) und Flotillin-1 und Flotillin-2 Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von pEGFR (b) und pErk (c) dar. pEGFR wurde auf GAPDH normalisiert und pErk auf tErk. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test.



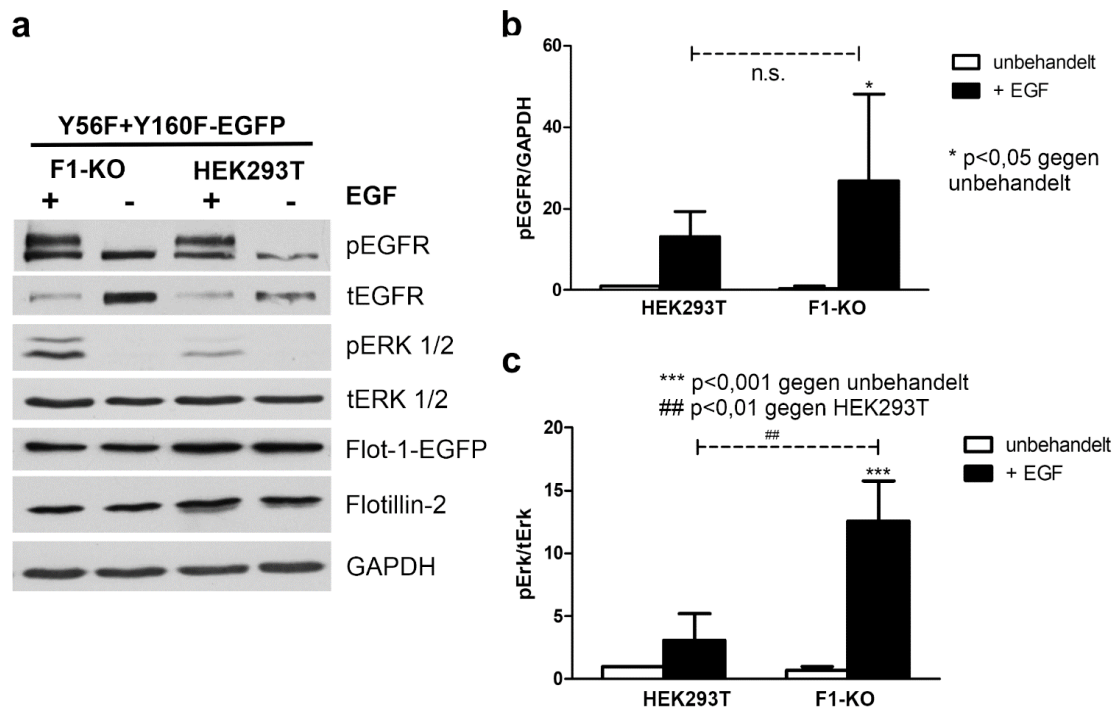
**Abbildung 7: Einfluss von Y56F+Y121F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen**

(a) Die HEK293T-Zellen (Wildtyp und Flotillin-1-Knockout) wurden mit dem Mutanten Y56F+Y121F-EGFP, transient transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Jeweils 30 µg der Proteinlysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit EGFR- Antikörpern (pY1173 oder Gesamt), mit Erk 1/2 Antikörpern (phospho oder Gesamt) und Flotillin-1 und Flotillin-2 Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von pEGFR (b) und pErk (c) dar. pEGFR wurde auf GAPDH normalisiert und pErk auf tErk. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test.



**Abbildung 8: Einfluss von Y121F+Y160F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen**

(a) Die HEK293T-Zellen (Wildtyp und Flotillin-1-Knockout) wurden mit dem Mutanten Y121F+Y160F-EGFP, transient transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Jeweils 30 µg der Proteinlysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit EGFR- Antikörpern (pY1173 oder Gesamt), mit Erk 1/2 Antikörpern (phospho oder Gesamt) und Flotillin-1 und Flotillin-2 Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von pEGFR (b) und pErk (c) dar. pEGFR wurde auf GAPDH normalisiert und pErk auf tErk. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test.



**Abbildung 9: Einfluss von Y56F+Y160F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen**

**(a)** Die HEK293T-Zellen (Wildtyp und Flotillin-1-Knockout) wurden mit dem Mutanten Y56F+Y160F-EGFP, transient transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Jeweils 30 µg der Proteinlysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit EGFR- Antikörpern (pY1173 oder Gesamt), mit Erk 1/2 Antikörpern (phospho oder Gesamt) und Flotillin-1 und Flotillin-2 Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten. Die Säulendiagramme stellen den Mittelwert ± Standardabweichung von pEGFR **(b)** und pErk **(c)** dar. pEGFR wurde auf GAPDH normalisiert und pErk auf tErk. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post-Test.

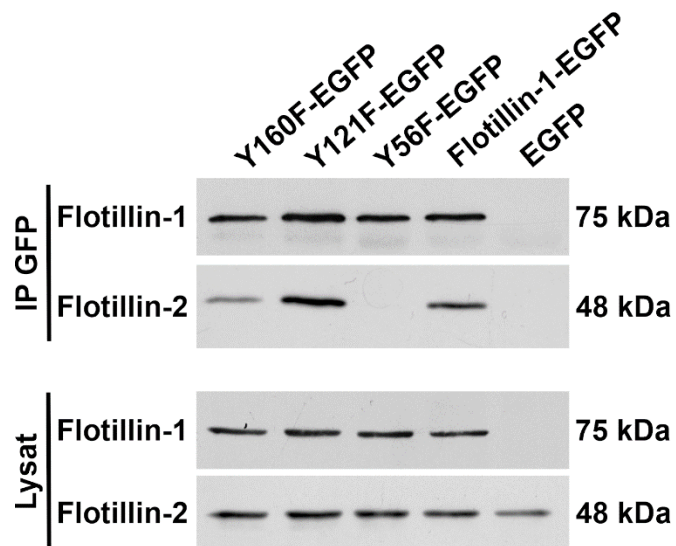
## 4.3 Interaktion von Flotillin-1 und endogenem Flotillin-2

### 4.3.1 Oligomerisierung von Flotillin-1-Einzelmutanten mit Flotillin-2

Anhand der Immunpräzipitation wurde analysiert, ob Flotillin-2 mit Flotillin-1-Mutanten eine Hetero-Oligomerisierung eingeht. Dafür wurden Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen mit denselben Konstrukten (siehe Tabelle 10), dem Wildtyp Flotillin-1 und einem Leervektor transfiziert. Nach Lysatherstellung und Vorreinigung wurden mittels Dynabeads Protein A und dem polyklonalen Rabbit anti-GFP Antikörper die mutierten Flotillin-1 Proteine mit ihren Interaktionspartnern präzipitiert. Um die Expression und erfolgreiche Präzipitation der Proteine zu bestätigen, wurde als Input ein Teil des vorgereinigten Lysats verwendet. Die Untersuchung der Präzipitate erfolgte anhand eines Western Blots und spezifischen Antikörper gegen GFP und Flotillin-2.

Flotillin-2 bildet in den mit Wildtyp Flotillin-1 (WT) -transfizierten Knockout-Zellen Hetero-Oligomere (siehe Abbildung 10). Anhand der Detektion mit anti-GFP in den Lysaten konnte die gleichmäßige Transfektion in den HEK-Zellen bestätigt werden. Mittels anti-Flotillin-2 konnte ebenfalls bestätigt werden, dass endogenes Flotillin-2 in allen HEK-Zellen gleichmäßig vorhanden ist.

Beim Betrachten der Einzelmutanten ist deutlich zu erkennen, dass der Y121F-Mutant in der Lage ist, mit dem endogenen Flotillin-2 einen Komplex zu bilden, denn beim Vergleich mit den Wildtyp-Zellen zeigen beide ein gleich starkes Signal. Der Y56F-Mutant weist keine Interaktion mit Flotillin-2 auf, was anhand drei voneinander unabhängiger Versuche bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen damit deutlich, dass Tyr56 eine entscheidende Funktion bei der Hetero-Oligomerisierung der Flotilline trägt. Y160F hingegen weist im Vergleich zum Wildtyp und Y121F ein etwas schwächeres Signal für Flotillin-2 auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Austausch von Tyr160 zu Phe zu einer reduzierten Hetero-Oligomerisierung mit dem endogenen Flotillin-2 führt. Diese *in vitro* Ergebnisse sollten jedoch mit Ko-Immunpräzipitation bestätigt und quantitativ erfasst werden. Dies konnte in einem früheren Versuch von Babuke et. al. anhand der Mutation von Y163F in Flotillin-2 ebenfalls beobachtet werden (Babuke *et al.*, 2009). Man geht davon aus, dass Tyr160 bzw. Tyr163 eine wichtige Rolle bei der Oligomerisierung der Flotilline einnehmen, da sie eine ähnliche Position im Flotillin-Protein tragen.

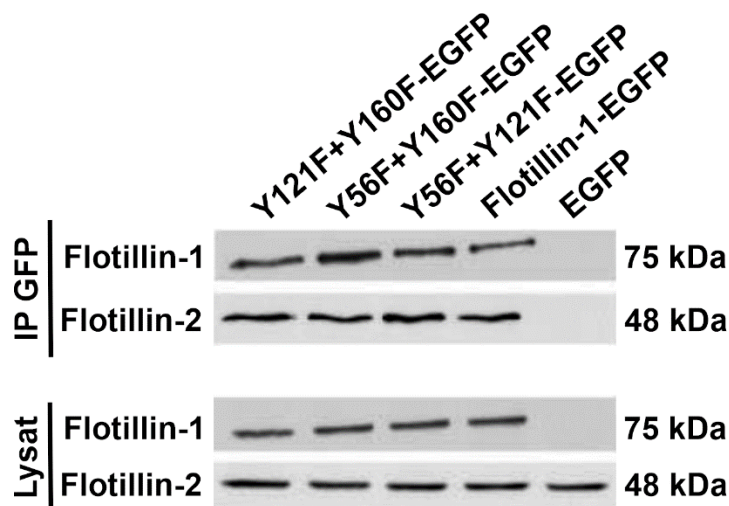


**Abbildung 9: Nachweis der Oligomerisierung von Flotillin-1-Einzelmutanten mit Flotillin-2**

Die Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen wurden mit den Flot1-EGFP Konstrukten transient transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels polyklonalen anti-GFP Antikörper. Das Input und das Präzipitat wurden anhand eines Western Blots analysiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen GFP und Flotillin-2 detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten.

### 4.3.2 Oligomerisierung von Flotillin-1-Doppelmutanten mit Flotillin-2

Der Versuch, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurde ebenfalls mit den Doppelmutanten Y56F+Y121F, Y56F+Y160F, Y121F+Y160F durchgeführt. Es ist zu beobachten, dass beim Vergleich mit den Wildtyp Flotillin-1-transfizierten Zellen alle Doppelmutanten ein ähnlich starkes Signal zeigen (siehe Abbildung 11). Daraus lässt sich schließen, dass alle drei Mutanten mit dem endogenen Flotillin-2 oligomerisieren. Interessanterweise sind auch die Mutanten, die Y56F enthalten (Y56F+Y121F und Y56F+Y160F), in der Lage, mit dem endogenen Flotillin-2 zu binden, wohingegen der Y56F-Mutant im vorherigen Versuch keine Interaktion mit Flotillin-2 aufweist.



**Abbildung 10: Nachweis der Oligomerisierung von Flotillin-1-Doppelmutanten mit Flotillin-2**

Die Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen wurden mit den Flotillin-1-EGFP-Konstrukten transient transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels polyklonalen anti-GFP Antikörper. Das Input und das Präzipitat wurden anhand eines Western Blots analysiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen EGFP und Flotillin-2 detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt drei separaten Experimenten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Lokalisation und zelluläre Verteilung von Flotillin-Mutanten

Flotilline sind in vielen verschiedenen intrazellulären Strukturen nachweisbar. Ihre Lokalisation ist nicht nur Zelltyp-spezifisch und dynamisch, sondern auch abhängig von bestimmten Tyrosinresten der Flotilline, worauf sich meine Untersuchungen stützen. Die Flotillin-Proteine befinden sich in vielen Zelltypen an der Plasmamembran. Dies konnte unter regulären Wachstumsbedingungen in *chinese hamster ovary* (CHO)-, *human hepatocellular carcinoma* (HepG 2) - und HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005; Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Amaddii, 2009). In Nierenzellen (MDCK-Zellen) wiederum ist Flotillin-1 überwiegend intrazellulär und weniger an der Plasmamembran zu beobachten (Liu *et al.*, 2005). Ähnliches konnte auch in Keratinozyten gezeigt werden, wo die Flotillin-Proteine nur endosomal lokalisiert sind (Beckert *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls mittels polyklonalem Antikörper und der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, dass in HeLa-Zellen Flotillin-1 überwiegend an der Plasmamembran auffindbar ist. Es war nun wichtig zu untersuchen, inwiefern sich die Lokalisation der Flotillin-1-Mutanten in Flotillin-1-Knockout-Zellen im Vergleich zum Wildtyp-Flotillin-1 verändert. Bezüglich der Flotillin-1-Mutanten konzentrierte ich mich auf die Mutationen der potenziellen Phosphorylierungsstellen. Die Tyrosinreste an den Positionen 56, 121 und 160 wurden durch Phenylalanin ersetzt (Amaddii, 2009). Die Transfektion erfolgte zusätzlich mit einem Leervektor und dem Wildtyp Flotillin-1-EGFP. Weder in den Wildtyp HeLa-Zellen noch in den Flotillin-1-Knockout-Zellen war eine deutliche Veränderung der Lokalisation zu sehen. Flotillin-1-EGFP befand sich größtenteils an der Plasmamembran und nur teilweise intrazellulär.

Bisher wurde die Lokalisation von drei verschiedenen Tyrosin-Mutanten des Flotillin-2 (Y163F, 7xYF, Y27F) in HeLa-Wildtyp Zellen analysiert. Anhand der Fluoreszenzmikroskopie und dem Live-Cell-Imaging wurde nachgewiesen, dass Y163F-R1-EGFP in 85% der transfizierten HeLa-Wildtyp Zellen so gut wie ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert war und kaum eine Translokation der Proteine in die Zelle zu beobachten war (Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Für dieses Experiment wurden ebenfalls Mutationen der funktionell wichtigen Tyrosinreste vorgenommen und in HeLa-Wildtyp Zellen, welche die endogenen Flotilline exprimierten, transfiziert. In den Y27F-Flot2-transfizierten Zellen war vermehrt lösliches Flotillin-2 zu erkennen, wohingegen in den Y163F-transfizierten Zellen die entsprechenden Flotillin-2-Mutanten ausschließlich an der Plasmamembran vorkamen. Ähnliches konnte auch in den 7xYF-Flot2-transfizierten Zellen beobachtet werden. Bei dem Konstrukt handelt es sich um die

Mutation von sieben der acht Tyrosinreste, wobei Tyr27 nicht mutiert vorliegt. Die Mutation des Tyrosinrestes Y163F, welche in beiden Konstrukten vorhanden ist, führte zur Annahme, dass die Phosphorylierung von Y163F die zelluläre Lokalisation von Flotillin-2 reguliert. Sogar nach zusätzlicher EGF-Stimulation blieb die Translokation von Flotillin-2-Mutanten in die Endosomen aus, wodurch die Vermutung einer Schlüsselrolle des Y163F in Flotillin-2 bestärkt werden konnte (Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Da die Tyrosinreste 160 von Flotillin-1 und 163 von Flotillin-2 eine vergleichbare Position tragen, wäre in den Y160F-transfizierten HeLa-Zellen eine ähnliche Reaktion zu erwarten, denn beide Tyrosinreste weisen ähnlich funktionell bedeutende Rollen auf. Im Jahre 2001 konnten Edgar und Pollack einen KxxxDxxxY Konsensus Motiv, welches 163 und 160 umgibt, entdecken. Das Motiv gilt als Tyrosinkinase-Erkennungssequenz und ist typisch für die Src-Familie (Edgar *et al.*, 2001). Zwar phosphorylieren die Src-Kinasen multiple Tyrosinreste der Flotilline, unter anderem auch Y163 und Y160, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die Fyn-Kinase, ebenfalls ein Mitglied der Src-Familie, beide Tyrosinreste direkt phosphorylieren kann (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Amaddii, 2009; Riento *et al.*, 2009).

Hinsichtlich der Hetero-Oligomerisierung sind die zwei Tyrosinreste von wichtiger Bedeutung, wie es sich auch im Rahmen meiner Untersuchungen und durch frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe herausstellte (Babuke *et al.*, 2009). Der hauptsächliche Teil dieses Experiments konzentrierte sich auf die Transfektion von Flotillin-1-Mutanten in Flotillin-1-Knockout-Zellen. In diesen Zellen konnte gewährleistet werden, dass kein endogenes Flotillin-1 vorhanden ist und somit eine Oligomerisierung mit dem endogenen Flotillin-1 nicht möglich war. Unter den Flotillin-1-Knockout mit den verschiedenen Flotillin-1-Mutanten und dem Wildtyp Flotillin-1-EGFP transfizierten HeLa-Zellen war kein Unterschied in der Lokalisation zu erkennen. Auch bei dem Vergleich der Flotillin-1-Knockout-Zellen mit den Wildtyp-HeLa-Zellen wurde eine ähnliche zelluläre Verteilung beobachtet. Dadurch, dass die Flotillin-1-Knockout HeLa-Zellen erstmalig in diesem Versuch zur Verfügung standen, liegen hierzu kaum weitere Studien vor. Bisher wurden nur Flotillin-Knockout-Mauszellen untersucht, wobei die zelluläre Lokalisation der Flotillin-Proteine nicht näher analysiert wurde. Die Versuche beschäftigten sich in den Knockout-Mauszellen hauptsächlich mit der Funktion der Flotillin-Mikrodomänen und deren Einfluss auf die neutrophile Migration als auch mit der Auswirkung auf den MAPK-Signalweg in nicht-stimulierten Zellen (Ludwig *et al.*, 2010; Banning *et al.*, 2013; Berger *et al.*, 2013). Zwar zeigen Flotillin-Knockout-Mauszellen keine phänotypischen Veränderungen oder Entwicklungsstörungen, aber man fand heraus, dass bei kompletter Abwesenheit eines Flotillin-Proteins das andere Flotillin erheblich reduziert und nicht mehr in den Membran-Mikrodomänen lokalisiert war (Ludwig

*et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2013). Demzufolge hängt die Formation von den sogenannten *membrane rafts* von Flotillin-1 und -2 ab (Banning *et al.*, 2014).

## 5.2 Die Rolle der Flotilline bei der EGFR-Aktivierung und in der MAPK-Signalkaskade

Die EGF-induzierte Signaltransduktion ist einer von vielen Signalwegen, in der Flotilline einen wichtigen Bestandteil darstellen. In meinen Versuchen konzentrierte ich mich auf den Einfluss der Flotilline auf den EGF-induzierten MAPK-Signalweg. Bekannt ist, dass nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF mehrere Tyrosinreste der Flotillin-Proteine von der Src-Kinase phosphoryliert werden (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Amaddii, 2009). Außerdem bilden der EGF-Rezeptor und Flotillin-1 und -2 einen konstitutiven Komplex, aber für die Endozytose vom EGF-Rezeptor in HeLa-Zellen sind Flotilline nicht vorausgesetzt (Amaddii *et al.*, 2012). In Flotillin-2-depletierten Zellen wiederum nimmt die Endozytose des EGF-Rezeptors ab, wobei die bei dieser Studie verwendeten Zellen eine sehr hohe Überexpression des EGF-Rezeptors aufwiesen (Solis *et al.*, 2012). Bei Abwesenheit von Flotillin-1 ist nicht nur das Clustering des EGF-Rezeptors beeinträchtigt, sondern auch die Phosphorylierung des Rezeptors und die nachgeschaltete MAPK-Aktivierung (Amaddii *et al.*, 2012; Kurrle *et al.*, 2013).

Im Rahmen meiner Arbeit war es wichtig herauszufinden, inwiefern die EGFR-Aktivierung und die MAP-Kinase Erk in Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen beeinträchtigt werden, da diese Untersuchungen in früheren Studien größtenteils in Flotillin-1-Knockdown-Zellen durchgeführt wurden. Das bedeutet, dass eine Interaktion von dem, nach dem Knockdown, noch vorhandenen endogenen Flotillin-1 mit dem Flotillin-2 in den Knockdown-Zellen nicht auszuschließen ist. Dies könnte einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

In Flotillin-1-Knockdown HeLa-Zellen beispielsweise führt die EGF-Stimulation zu einer Reduktion der EGF-Aktivierung und der Phosphorylierung der MAPK-Komponenten C-Raf und Erk1/2, welches wahrscheinlich auf die fehlende Gerüst-Funktion des Flotillin-1 zurückzuführen ist (Amaddii *et al.*, 2012; Banning *et al.*, 2014). Das Knockdown wirkt sich auch auf den *fibroblast growth factor* (FGF)-induzierten Signalweg aus, denn nach bFGF-Stimulation kommt es zu einer Abnahme der Erk- und Akt-Aktivierung. Sogar der Transkriptionsfaktor Cyclin-D1 ist von der Reduktion betroffen (Amaddii *et al.*, 2012).

In den Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen war ein gegenläufiger Effekt zu beobachten. Die totale Abwesenheit von Flotillin-1 in allen Konstrukten, bis auf die mit Flotillin-1-EGFP transfizierten HEK-Zellen, zeigt überwiegend eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierungsaktivität von EGFR und Erk. Aufgrund der experimentellen

Variationen war jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Ähnliche Resultate sind auch in Flotillin-2-depletierten Zellen zu beobachten. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe führte das Knockdown von Flotillin-2 in HeLa-Zellen zu einer verstärkten basalen Aktivierung der MAPK-Signalkaskade. Die Kinasen C-Raf, MEK1/2 und Erk-2 als auch die Zellproliferation waren signifikant erhöht. Auch in Flotillin-2-Knockout-Mauszellen konnte eine verstärkte Hochregulation festgestellt werden, welches bis zu den nachgeschalteten Substraten von Erk reichte. Erk ist in der Lage, zahlreiche Transkriptionsfaktoren und Substrate im Nukleus und im Zytosol zu regulieren. Dazu gehören unter anderem DUSP-1, c-Fos und Egr-1, welche eine erhöhte Aktivierung aufwiesen (Banning *et al.*, 2013; Wienen, 2019). Die Phosphatase DUSP-1 (*dual specificity phosphatase 1*) gehört zum negativen Feedback-Loop System und kann Erk dephosphorylieren (Brondello *et al.*, 1999). Die veränderte DUSP-1-Expression wirkt möglicherweise als ein Kompensationsmechanismus für die erhöhte Erk-Aktivität (Banning *et al.*, 2013).

Aufgrund dieses gegenteiligen Effekts bei Abwesenheit von Flotillin-2 ging man davon aus, dass Flotillin-1 einen positiven Regulator darstellt, wohingegen Flotillin-2 eine negativ regulierende Auswirkung auf den EGF/MAPK-Signalweg hat. Jedoch stimmt diese Aussage nicht mit den Ergebnissen meiner Arbeit überein, denn die tendenziell erhöhte EGFR-Rezeptor- und Erk-Aktivierung in den Flotillin-1-Knockout-Zellen deutet darauf hin, dass Flotillin-1 eher zu den negativen Regulatoren gehört. In unserer Arbeitsgruppe konnte Ähnliches in Flotillin-1-Knockout-Mauszellen festgestellt werden. Biologisch betrachtet sind Flotillin-Knockout-Mauszellen lebensfähig und phänotypisch unauffällig (Ludwig *et al.*, 2010). Auf zellulärer Ebene hingegen weisen sie einige Veränderungen auf. Bei absoluter Abwesenheit von Flotillin-1 in den KO-Mauszellen war eine verstärkte Expression bestimmter Substrate der MAP-Kinase zu erkennen. Vor allem der Transkriptionsfaktor Egr-1 war in diesen Zellen signifikant erhöht (Wienen, 2019). Ein vergleichbares Verhalten konnte auch in MC7F-Brustkrebszellen beobachtet werden. Das Knockdown von Flotillin-1 löste ebenfalls eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors aus, welches direkt zu einer verstärkten Phosphorylierung von MEK und Erk 1/2 führte. Die Korrelation zwischen Gesamt-EGFR und des pY1173-EGFR wies keine Signifikanz auf. Anhand einer quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte bestätigt werden, dass das mRNA-Level und weniger die Degradation einen Einfluss auf die Anzahl der EGF-Rezeptoren hat (Kurrle *et al.*, 2013). Ein ähnliches Verhalten konnte auch in den Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen dieser vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Anhand der Western Blots ist zu beobachten, dass das Gesamt-EGFR in den unbehandelten Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen tendenziell erhöht vorliegt (siehe Abbildungen 5a,6a,7a,8a,9a). Dies lässt vermuten, dass durch die Abwesenheit

von Flotillin-1 in HEK-Zellen die Anzahl der EGF-Rezeptoren beeinflusst werden könnte. Um herauszufinden, ob die erhöhte EGFR-Anzahl auf den verlangsamten Abbau oder auf die erhöhte Expressionsrate zurückzuführen ist, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Bezüglich des Gesamt-Erk und pErk Signals in den Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen konnte man beobachten, dass die Signalstärke des Gesamt-Erks in den Knockout-Zellen vergleichbar war mit der in den Wildtyp-Zellen. Das pErk in den HEK-Zellen, transfiziert mit den Mutanten und dem Leervektor, hingegen war verstärkt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Art der Regulation, ob negativ oder positiv, somit unabhängig davon ist, welches Flotillin fehlt. Es ist jedoch unklar, ob die ausgelösten Effekte ausschließlich auf das Fehlen des jeweiligen Flotillin-Proteins zurückzuführen sind.

Da die Hetero-Oligomerisierung nicht mehr möglich ist, könnte es sein, dass das jeweilige restliche endogene Flotillin in den Knockdown-Zellen nur noch Homo-Oligomere bildet, die letztendlich die beobachteten Reaktionen verursacht, d.h. dominant-negative Effekte aufweist. Des Weiteren wurde angenommen, dass die Art des Knockdowns eine Rolle spielen könnte. Man unterscheidet zwischen dem transienten und stabilen Knockdown, wofür RNA-Moleküle, wie die *small interfering RNA* (siRNA) oder *small hairpin RNA* (shRNA) eingesetzt werden. Während es in transienten MC7F-Flotillin-Knockdown Zellen zur Herunterregulierung von bestimmten Substraten kommt, löst das stabile Knockdown von Flotillinen das Gegenteil aus (Lin *et al.*, 2011; Kurrle *et al.*, 2013). Im Rahmen der Tumorgenese sind die stabilen Flotillin-Knockdown-Zellen repräsentativer und somit vergleichbar mit den Knockout-Zellen. EGFR passt sich dem Flotillin-Verlust an und reagiert wahrscheinlich deshalb mit einer kompensatorischen Hochregulierung (Kurrle *et al.*, 2012, 2013). Jedoch konnte keine verstärkte EGFR-Aktivierung in stabil mit shRNA-Plasmiden transfizierten HeLa-, MCF10A- und in Keratinozyten (HaCaT-Zellen) beobachtet werden, sondern nur in den MC7F-Knockdown-Zellen (Kurrle *et al.*, 2013). In diesen Knockdown-Zellen ist die PI3-Kinase durch eine Mutation konstitutiv aktiv. Durch die Inhibition der PI3-Kinase konnte eine signifikante Reduktion der EGFR-Expression festgestellt werden. Demnach ist bei Abwesenheit von Flotillin-1 die PI3-Kinase direkt für die erhöhte EGFR-Expression verantwortlich (Kurrle *et al.*, 2013). Für die weitere Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Flotillinen sollte man mit Flotillin-1 und -2 Doppel-Knockout-Zellen arbeiten (Banning *et al.*, 2014).

Im Rahmen meiner Arbeit stand die erstmalige Untersuchung von Flotillin- Mutanten in Flotillin-Knockout-Zellen im Fokus. Es stellte sich die Frage, inwiefern die EGF-induzierte Signaltransduktion durch die zusätzliche Transfektion mit verschiedenen Flotillin-1-Mutanten beeinträchtigt wird. Aufgrund der schwachen Transfektion der HeLa-Zellen mit

den Einzelmutanten und den ungenauen Ergebnissen der Western Blots wurden für den Versuch mit den HEK-Zellen nur die Doppelmutanten eingesetzt. Man kann vermuten, dass der Knockout von Flotillin-1 verantwortlich für die tendenzielle Erhöhung der EGFR-Anzahl ist, unabhängig vom transfizierten Konstrukt, da auch in den Flotillin-1-EGFP transfizierten Zellen das Gesamt-EGFR etwas erhöht vorliegt (siehe Abbildungen 5a, 6a, 7a, 8a, 9a). Das pEGFR-Signal in den Wildtyp Flotillin-1-EGFP-transfizierten Zellen hingegen hat sich scheinbar nach Stimulation normalisiert und ist identisch mit dem Signal der Wildtyp-Zellen. Da die Transfektion mit dem Flotillin-1-EGFP eine Re-Expression des Wildtyp Flotillin-1 darstellte, ist es vermutlich zur Normalisierung des EGFR-Expressionslevels und auch der Erk-Aktivierung gekommen (siehe Abbildung 5a). Demnach wird nicht nur die EGFR-Anzahl in den Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen beeinflusst, sondern vermutlich auch der Phosphorylierungsgrad in den Wildtyp-transfizierten Zellen, da das pEGFR trotz erhöhtem Gesamt-EGFR nicht verstärkt ist. Jedoch sind in dem Versuch die großen experimentellen Variationen zu berücksichtigen, vor allem bei pEGFR zwischen HEK293T und F1-KO in Abbildung 5b, welches vermutlich auf die transiente Transfektion zurückzuführen ist. Die transiente Transfektion an sich ist sehr variabel, weil nicht alle HEK-Zellen transfiziert sind, und deshalb nicht gleich viel von dem jeweiligen Flotillin-1-Fusionsprotein exprimieren. Es handelt sich hierbei um Mischpopulationen von Zellen. Es wird lediglich der Durchschnitt dieser Population gezeigt. Idealerweise müssten stabil exprimierende Zellen eingesetzt werden, die zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Auffällig ist, dass der Y56F+Y160F als einziger Mutant signifikante Unterschiede aufweist. Vor allem pErk zeigt zwischen den Wildtyp HEK293T- und Flotillin-1-Knockout-Zellen einen signifikanten Unterschied. Alle anderen Flotillin-1-Mutanten, Flotillin-1-EGFP ausgenommen, zeigen in den Flotillin-1-Knockout-Zellen nur eine tendenziell höhere Menge von pEGFR und pErk als in den Wildtyp HEK293T-Zellen. Es liegt die Vermutung nah, dass die Mutanten Y56F und Y160F als Kombination einen verstärkten Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität von EGFR und Erk haben. Denn auch in den anderen Konstrukten sind beide Mutanten vorhanden (Y56F+Y121 und Y121F+Y160F) und es sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

### 5.3 Transfektionseigenschaften von HeLa- und HEK-Zellen.

Ein allgemeines Problem in den vorliegenden Versuchen stellte die Transfektion von HeLa-Zellen dar. Aufgrund der schwachen Transfektionsrate im Rahmen unserer Immunfluoreszenz-Untersuchung war die Immunfluoreszenzfärbung der Y56F- und Y121F-transfizierten HeLa-Zellen erfolglos. Auch bei der Untersuchung der EGF-induzierten Endozytose war das Resultat ähnlich. Deshalb stieg man auf HEK-293 Zellen um, da sie einfacher zu transfizieren sind. Gemäß der Erfahrung unserer Arbeitsgruppen erwies sich die Transfektion der Flotillin-Knockout HeLa-Zellen oftmals als schwierig. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Zelldichte bzw. Proliferationsrate sein, die in HEK-Zellen höher ist als in HeLa-Zellen. Demzufolge könnte der Knockout von Flotillinen die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen.

Insgesamt betrachtet, gibt es kaum Literatur über den Vergleich der Transfektionseigenschaften verschiedener Zelltypen. Oftmals wurde die Transfektionseffizienz an nur einer Zelllinie untersucht, unter anderem HeLa-Zellen, Fibroblasten und CHO-Zellen (Hagstrom *et al.*, 1997; Escriou *et al.*, 1998; Belting *et al.*, 1999). Dies führte dementsprechend zu abweichenden und zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden verschiedene Transfektionsmethoden, unter anderem die Lipofektion, angewendet und diese in COS-7-, humanes Kolon Adenokarzinom (HT29) - und Jurkat-Zellen (Leukämie-Zelllinie) analysiert. Dabei wurde auf die Optimierung bestimmter Parameter, wie das DNA-Lipidverhältnis, das Medium und die Zelldichte geachtet, um so repräsentative Ergebnisse zu erhalten (Schurig, 2008).

### 5.4 Oligomerisierung von Flotillinen

In Bezug auf die Evolution der Proteine stellt die Oligomerisierung einen wichtigen Nutzen für die Funktionskontrolle dar, zum Beispiel für die allosterische Regulation (Ali *et al.*, 2005; Kurrle *et al.*, 2012). Für die Flotillin-Proteine ist die Bildung von Oligomeren nicht nur wichtig für die Membran-Assoziation, die Endozytose und den EGF-induzierten Signalweg, sondern auch für die allgemeine Stabilität der Flotilline selbst (Neumann-Giesen *et al.*, 2004, 2007; Frick *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2007; Babuke *et al.*, 2009). Die interaktiven Eigenschaften der Flotilline sind für meine Untersuchungen insofern relevant, weil die Abwesenheit als auch verschiedene Mutationen eines Flotillins die Oligomerisierung beeinträchtigen können.

In Flotillin-2-Knockdown Zellen der Neuroblastom Zelllinie (N2a) ist die Menge an Flotillin-1 stark reduziert. Umgekehrt jedoch ist das Proteinlevel von Flotillin-2 bei Abwesenheit von Flotillin-1 nur leicht verändert (Solis *et al.*, 2007). In Knockout-

Mauszellen hingegen sind jeweils beide Flotillin-Proteine reduziert, vor allem Flotillin-1 bei kompletter Abwesenheit von Flotillin-2 (Banning *et al.*, 2014; Wienen, 2019). Zusätzlich zum Verlust des jeweiligen anderen Proteins, kann die Abwesenheit eines Flotillins zu erheblichen zellulären Dysfunktionen führen. Für meine Untersuchung ist es insofern relevant, weil nicht nur das Fehlen eines Flotillins, sondern auch verschiedene Mutationen der Flotillin-Proteine die Oligomerisierung beeinträchtigen können.

Flotilline sind in der Lage, Homo- und Hetero-Oligomere zu formen, wobei sie in bestimmten Zellarten bevorzugt stabile Tetramere bilden (Salzer *et al.*, 2001; Neumann-Giesen *et al.*, 2004; Solis *et al.*, 2007). Bei der Interaktion von Flotillin-1 mit Flotillin-2 sind sie in einem Verhältnis von 1:1 zusammengesetzt und können so flotillinreiche Mikrodomäne bilden (Frick *et al.*, 2007; Babuke *et al.*, 2009). Die Wichtigkeit der Interaktion für die sogenannten *membrane rafts* ließ sich in Knockout-Mauszellen zeigen. Durch den Verlust eines Flotillins, kommt es zum Abbau der Mikrodomänen und das noch vorhandene Flotillin ist gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt oder befindet sich in sogenannte *high density membrane fractions* (Berger *et al.*, 2013; Banning *et al.*, 2014). Eine weitere Beobachtung ist, dass sich die Molekularmasse der Oligomere nach EGF-Stimulation verändert. Es konnte gezeigt werden, dass sie an Größe zu nehmen aber die Stöchiometrie gleich bleibt (Babuke *et al.*, 2009).

Mit verschiedenen Teilfragmenten des Flotillin-2 konnte herausgefunden werden, dass der C-Terminus wichtig für die Interaktion von den Flotillinen und für die Membran-Assoziation ist. Die sogenannte Flotillin-Domäne ist durch die Wiederholung eines kurzen Alanin- und Glutamat-Sequenzmotivs gekennzeichnet und in der Lage,  $\alpha$ -Helices in einer *coiled-coil* Struktur auszubilden (Bickel *et al.*, 1997; Rivera-Milla, 2006; Babuke *et al.*, 2009). Anfangs wurde vermutet, dass ausschließlich die *coiled coil* Strukturen CC2 und teilweise CC1 des C-Terminus für die Oligomerisierung vorausgesetzt sind, und die SPFH-Domäne bzw. der N- Terminus nicht zwingend von Bedeutung ist (Neumann-Giesen *et al.*, 2004; Langhorst *et al.*, 2006; Solis *et al.*, 2007). Die Mutation Y163F in Flotillin-2 führte jedoch ebenfalls zur reduzierten Hetero-Oligomerisierung, obwohl der Tyrosinrest nicht im C- Terminalen Bereich lokalisiert ist. Die Bildung von Homo-Oligomeren blieb durch die Y163F-Mutation dagegen unbeeinträchtigt (Babuke *et al.*, 2009). Auch im Zusammenhang mit der EGF-induzierten Endozytose wurde in Y163F-transfizierten HeLa-Zellen die ausgebliebene Translokation von Flotillin-2 in die späten Endosomen, vermutlich durch die fehlende Hetero-Oligomerisierung verursacht. Durch die Inhibition der Src-Kinase konnte gezeigt werden, dass die Endozytose trotzdem stattfindet, und sie somit unabhängig von der Src-vermittelten Phosphorylierung ist (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Babuke *et al.*, 2009). Bezüglich der Aufnahme des EGF-Rezeptors in die Zelle sind Flotilline nicht erforderlich. Denn in Flotillin-Knockdown-

Zellen, konnte nach EGF-Stimulation die Anwesenheit des EGF-Rezeptors in den späten Endosomen mittels spezifischer Antikörper detektiert werden (Babuke *et al.*, 2009; Amaddii *et al.*, 2012).

Im meinen Versuchen konnte die Abhängigkeit der Hetero-Oligomerisierung von bestimmten Tyrosinresten des Flotillin-1 beobachtet werden. Es war tendenziell zu erkennen, dass in den Y160F-transfizierten Knockout-Zellen, im Vergleich zu den Wildtyp Flotillin-1 (WT) -transfizierten Knockout-Zellen, weniger Flotillin-2 koimmunpräzipitiert wurde. Daraus ließ sich herleiten, dass die Substitution von Tyr160, welches homolog zur Position von Y163F des Flotillin-2 ist, ebenfalls eine Abnahme der Hetero-Oligomerisierung hervorruft. Demzufolge wird die funktionelle Bedeutung dieser beiden Tyrosinreste nochmals deutlich. Überraschenderweise war bei der Y56F-Mutante von Flotillin-1 kein mit-präzipitiertes Flotillin-2 zu erkennen, was bedeutet, dass die Interaktion zwischen der Flotillin-1-Mutante und dem endogenen Flotillin-2 durch die Mutation des Tyrosinrests 56 gehemmt wurde. In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden die potenziellen Phosphorylierungsstellen von Flotillin-1 mit Hilfe des NetPhos 2.0 Programms ermittelt, und anschließend wurde anhand der Immunopräzipitation ihr Phosphorylierungsstatus bestimmt. Trotz Mutation von Y56F konnte die Src-Kinase das veränderte Flotillin-1 phosphorylieren (Amaddii, 2009). Demzufolge werden mehrere Tyrosinreste zeitgleich aktiviert, und Y56F trägt in diesem Falle keine Schlüsselfunktion, wie vergleichsweise Y160F. Allerdings konnte in einer weiteren Studie den Tyrosinresten Tyr56 und Tyr149 eine wichtige Rolle in den Mitochondrien, isoliert aus T98G-Zellen, zugeschrieben werden. Es stellte sich heraus, dass ihre Phosphorylierung durch die mitochondriale c-Src-Kinase für die Regulation der ROS- Produktion vorausgesetzt ist, wobei die mögliche Translokation der Flotilline in die Mitochondrien noch unklar ist (Ogura *et al.*, 2014).

Dadurch dass die Src-vermittelte Phosphorylierung und die Hetero-Oligomerisierung vermutlich unabhängig voneinander sind, ist das Ergebnis durchaus nachvollziehbar. Denn auch Y163F-transfizierte Zellen weisen eine geschwächte Hetero-Oligomerisierung auf, obwohl die Phosphorylierung durch die Src-Kinase immer noch möglich zu sein scheint (Neumann-Giesen *et al.*, 2007). Um den genauen Einfluss von Y56F auf die EGF-induzierte Endozytose von Flotillinen zu verstehen, bedarf es noch weiteren Untersuchungen. Man könnte beispielsweise eine Immunfluoreszenzanalyse nach EGF-Stimulation durchführen, um zu schauen, ob die Translokation der Flotilline erfolgt oder ausbleibt.

Alle Doppelmutanten konnten, im Unterschied zu den Einzelmutanten, mit dem endogenen Flotillin-2 präzipitieren. Ihre Signalstärken und die der Wildtyp Flotillin-1-EGFP-transfizierten Zellen waren identisch, obwohl alle Mutanten mindestens einen

mutierten Tyrosinrest trugen, der die Hetero-Oligomerisierung beeinträchtigt. Ein Grund für die mögliche Interaktion der Flotilline in den Doppelmutanten könnte eine Konformationsänderung sein. Hinsichtlich der Src-Phosphorylierung der Flotillin-1 Mutanten, wiesen die Doppel- und Einzelmutanten ebenfalls zum Teil einen gegenläufigen Effekt auf. Während Y56F und Y121F einen normalen Phosphorylierungsgrad zeigten, nahm beim Y56F+Y121F Doppelmutanten die Aktivierung ab. Die Konformationsänderung könnte entweder eine strukturelle Auswirkung oder durch Freilegung von weiteren Tyrosinresten eine weitere Phosphorylierung durch die Src-Kinase hervorrufen (Amaddii, 2009).

## 5.5 Flotilline als MAPK-Gerüstprotein

Der MAPK-Signalweg ist in der Lage, zahlreiche zelluläre Prozesse zu kontrollieren. Die Fehlregulation einer Komponente der Signalkaskade kann zu erheblichen Dysfunktionen führen, die unter anderem diverse Krebserkrankungen hervorrufen können (Meister *et al.*, 2013). Deshalb ist eine strenge Regulation unabdingbar. Gleichzeitig ist die Kontrolle der Intensität und Dauer der Signaltransduktion ebenfalls wichtig. Die sogenannten Gerüstproteine spielen in diesem Fall eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um Proteine, die mehrere Komponenten einer Signalkaskade gleichzeitig binden können, sodass durch die räumliche Nähe die Interaktion zwischen den einzelnen Substraten vereinfacht wird. Der Komplex ist vor der Wirkung von Phosphatasen und anderen Signalwegen während dieser Bindung geschützt (Locasale *et al.*, 2007; Meister *et al.*, 2013). Durch verschiedene Verlinkungen von Kinasen sind sie in der Lage, eine Vielzahl von Variationen im Rahmen der Signalvermittlung zu schaffen.

Zu den bekannten Erk-Gerüstproteinen zählen der *kinase supressor of Ras* (KSR-1), der *MEK-binding partner 1* (MP1) und  $\beta$ -Arrestin. Flotillin-1 gehört neben dem *fibroblast growth factor receptor substrate 2* (FRS-2) und dem *MAP-Kinase organizer 1* (MORG-1) zu den erst kürzlich entdeckten Gerüstproteinen, wo noch weitere Untersuchungen nötig sind, um ihre genau Funktionsweise zu entschlüsseln (Meister *et al.*, 2013).

Der KSR-1 gehört zu den am besten charakterisierten Gerüstproteinen und trägt eine positiv regulatorische Funktion (Kornfeld *et al.*, 1995; Therrien *et al.*, 1995). Der Aufbau des Proteins ist vergleichbar mit dem Raf-Protein. Es besteht aus 5 Regionen (CA1-CA5), wobei CA3 wichtig für die Lokalisation ist, und CA5 verantwortlich für die konstitutive Interaktion mit MEK ist (Michaud *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998). KSR-1 bindet an alle drei MAP-Kinasen, wobei es mit C-Raf und Erk eine Bindung erst nach Stimulation eingeht (Morrison, 2001). Je nach dem Phosphorylierungszustand sind sie an der Plasmamembran und intrazellulär lokalisiert. Im Cytoplasma ist KSR-1 an dem

Protein 14-3-3 gebunden. Nach Stimulation durch einen Wachstumsfaktor kommt es mithilfe der *Cdc25C-associated Kinase 1* (C-TAK1), einer Serin/Threonin Protein- Kinase zur Translokation an die Plasmamembran (Müller *et al.*, 2001; Castillon *et al.*, 2003). Verschiedene Studien zeigten, dass KSR-1 an der Adipogenese und an der Regulation des insulin-abhängigen Glucose-Stoffwechsels in Mauszellen beteiligt ist (Kortum *et al.*, 2005; Klutho *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Abwesenheit von KSR-1 die Erk-Aktivierung durch Stress- und proinflammatorische Reize beeinträchtigt. Anhand von Mauszellen konnte so *in vivo* festgestellt werden, dass KSR-1 die Induktion von Arthritis beeinflusst (Fusello *et al.*, 2006). In KSR1-Knockout Mauszellen konnten die hochmolekularen Komplexe bestehend aus KSR-1, MEK und Erk nicht nachgewiesen werden. Die Erk-Aktivität war noch vorhanden, jedoch abgeschwächt. Demzufolge wurde vermutet, dass KSR-1 als ein Signalverstärker der MAPK-Signalkaskade dient (Nguyen *et al.*, 2002).

Genau wie das KSR-1 ist Flotillin-1 als Gerüstprotein ebenfalls in der Lage, mit den Substraten der MAP-Kinase einen Komplex zu bilden. Anhand eines GST-Pulldowns konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 die Fähigkeit besitzt an Raf, MEK und Erk zu binden, unabhängig von KSR-1 (Amaddii *et al.*, 2012).

Im Rahmen meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen bzw. die Mutation von Flotillin-1 nicht nur potenziell einen Einfluss auf die EGFR-Aktivierung hat, sondern weiter abwärts des Signalweges auch auf die Regulation von den MAP-Kinase-Komponenten. Der Knockout von Flotillin-1 führt zur tendenziell verstärkten Phosphorylierung von Erk. Somit liegt nahe, dass die Mutation von Flotillin-1 möglicherweise einen Defekt im MAP-Kinase-Gerüstprotein hervorruft. Um das mit Sicherheit sagen zu können, müssten in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Des Weiteren kann Flotillin-1 mit anderen Gerüstproteinen interagieren. Dazu gehören FRS-2 und MORG-1 (Kurrle *et al.*, 2012; Tomasovic *et al.*, 2012). Nach FGF-Stimulation kommt es zur Phosphorylierung des FRS-2, welches als Adapterprotein in der Lage ist, Bindungen mit weiteren Adapterproteinen einzugehen. Flotillin-1 hat die Fähigkeit, über die PTB (*phosphotyrosine binding*) –Domäne des FRS-2 direkt an FRS-2 zu binden. Zudem führt die Abwesenheit von Flotillin-1 zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung des FRS-2 (Kurrle *et al.*, 2012; Tomasovic *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Flotillin-1 die Rolle eines „*superscaffolds*“ zugeschrieben, da es die Lokalisation, während der EGF-induzierten Signalkaskade ändern kann und mit anderen Scaffold-Proteinen in Verbindung steht. Es könnte die Aufgabe als Vermittler tragen.

Die genaue Assoziation zwischen Flotillin-1 und den MAPK-Komponenten und die funktionelle Rolle der Oligomerisierung bezüglich der Scaffold-Funktion ist jedoch noch

unklar. Zwar trägt Flotillin-1 die Aufgabe als Gerüstprotein, jedoch kommt es bei Mutationen bestimmter Tyrosinreste des Flotillin-2 zu Störungen in der MAPK-Signalkaskade, wie in Kapitel 5.4. beschrieben. Dies bedeutet, dass Flotillin-1 allein nicht als Vermittler funktionieren kann und die Hetero-Oligomerisierung vorausgesetzt ist (siehe Abb.3).

## 5.6 Ausblick

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchung des EGF-induzierten Signalwegs in Flotillin-1-Knockout-Zellen, sowie die genaue Analyse der Oligomerisierungseigenschaften von Flotillin-1. Die Oligomerisierung der Flotilline, wie in mehreren Studien gezeigt wurde, ist für wichtige zelluläre Funktionen vorausgesetzt (Ali *et al.*, 2005; Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2007; Babuke *et al.*, 2009; Riento *et al.*, 2009). In vorliegenden Versuchen konnte erstmals beobachtet werden, dass nicht nur Y160F des Flotillin-1 von Bedeutung ist, sondern auch Y56F. Um das Phosphorylierungsmuster von Flotillin-1 besser zu verstehen, könnte man eine Massenspektrometrische Analyse durchführen (Amaddii, 2009). Des Weiteren sollte der endozytotische Weg der verschiedenen Flotillin-1-Mutanten mittels EGF-Stimulation und der Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen untersucht werden, da vermutlich die EGF-induzierte Endozytose von der Hetero-Oligomerisierung abhängt.

Es wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass der Knockout von Flotillin-1 zu einer verstärkten Aktivierung des EGF-Rezeptors und der MAPK-Signalkaskade führt. Demnach löst die Abwesenheit von Flotillin-1 in HEK-Zellen eine Hyperaktivierung aus. Aufgrund der vorherigen Beobachtung, dass Flotillin-1 einen positiv regulierenden Effekt zeigt, wäre die Depletion von Flotillin-1 im Rahmen der Tumorbehandlung ein möglicher Therapieansatz für die Reduktion der Metastasierung diverser Krebsarten (Amaddii *et al.*, 2012; Banning *et al.*, 2014). Doch die Beobachtung gegensätzlicher Effekte in MC7F-Brustkrebszellen, in Knockout-Mauszellen und in Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen, lässt daraus schließen, dass die Funktion der Flotilline komplexer ist als erwartet, und weitere Untersuchungen ihrer Mechanismen nötig sind (Banning *et al.*, 2013; Kurrle *et al.*, 2013; Wien, 2019). Die Entwicklung einer gezielten Therapie sollte demnach mit großem Bedacht erfolgen, da anscheinend der Knockout von Flotillinen auch eine kompensatorische Hochregulation zellulärer Signalwege auslöst und genau das Gegenteil bezweckt (Banning *et al.*, 2014).

## 6 Zusammenfassung

Flotilline gehören zu der hochkonservierten SPFH-Proteinfamilie und kommen ubiquitär vor. Erstmals wurden sie im Zusammenhang mit der Regeneration von retinalen Ganglionzellen des Goldfisches entdeckt. Sie sind in der Lage, mittels Fettsäuremodifikationen und Oligomerisierung mit der Membran zu assoziieren. Des Weiteren sind Flotilline an vielen Prozessen beteiligt. Darunter fallen die Zell-Zelladhäsion, diverse Membrantransportwege und Signaltransduktionskaskaden.

Der EGF-induzierte Signalkaskade ist einer davon. Sie ist an der Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und Zellmigration beteiligt. Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF führt zur Phosphorylierung multipler Tyrosinreste der Flotilline-1 und -2. Die Abwesenheit von Flotillinen führt nicht nur zur Beeinträchtigung der EGFR-Aktivierung, sondern auch der nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade. In Flotillin-1-Knockdown HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer reduzierten Phosphorylierung kommt, wohingegen in Knockdown MC7F-Zellen ein gegenläufiger Effekt ausgelöst wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit Flotillin-1 und deren Effekt auf den EGFR/MAPK-Signalweg in Flotillin-Knockout Zellen. Dafür setzte man mehrere Tyrosin-Mutanten von Flotillin-1 ein, um so herauszufinden, inwiefern die EGFR-Aktivierung und weiter abwärts der Signalkaskade die Phosphorylierung der MAPK-Komponente Erk beeinflusst wird. Anhand der Mutanten konnte auch die Hetero-Oligomerisierung untersucht werden und so festgestellt werden, inwieweit die Interaktion zwischen mutiertem Flotillin-1 und endogenem Flotillin-2 verändert wird.

Die Untersuchungen ergaben, dass es in Flotillin-1-Knockout HEK-Zellen zu einer tendenziellen Verstärkung der EGFR- und Erk-Aktivierung kam. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Tyrosin-Reste Y160F und Y56F des Flotillin-1 eine Schlüsselrolle im Zusammenhang mit der Hetero-Oligomerisierung einnimmt. Demzufolge lässt sich feststellen, dass multiple Tyrosinreste der Flotillin-Proteine eine bedeutende Funktion tragen und bei Veränderung einen erheblichen Einfluss auf regulierende Funktionen der Zelle haben. Die EGFR-Aktivierung und der MAPK-Signalweg werden jedoch nicht nur durch die Mutation des Flotillins beeinträchtigt, sondern auch durch weitere Faktoren, wie zum Beispiel der Zelltyp und die Art des Knockdowns beeinflusst.

## 7 Summary

Flotillins belong to the highly conserved SPFH domain family and are ubiquitously expressed. The proteins were first discovered in retinal ganglion cells of the goldfish during regeneration processes. They are able to associate with the membrane by means of lipid modifications and oligomerization. Flotillins are involved in various cellular processes, including cell adhesion, membrane trafficking and many signaling pathways. The EGF-induced signal transduction regulates cell proliferation, differentiation and migration. Growth factor stimulation with EGF leads to phosphorylation of multiple tyrosine residues of Flotillin-1 and -2. Depletion of Flotillin affects not only the EGFR-activation but also the MAPK downstream signaling. It was shown that knockdown of flotillin-1 in HeLa cells reduces the phosphorylation of Erk, whereas in MC7F cells, a contrary effect was observed.

The main aim of this study was to analyze the effect of flotillin-1 on EGFR/MAPK signaling in Flotillin-knockout cells. For this purpose, I used several tyrosine mutants of flotillin-1 to study how the EGFR-activation and the downstream signaling pathway is impaired. On the basis of these mutants, I also examined the hetero oligomerization. Thus, I could determine how the interaction between mutated flotillin-1 and endogenous flotillin-2 is influenced.

My results show that the knockout of Flotillin-1 in HEK cells enhances the activation of the EGF receptor and Erk. Furthermore, I could show that the tyrosine residue 160 and 56 of Flotillin-1 have a functional significance regarding the hetero-oligomerization.

In summary, my data suggest that multiple tyrosine residues of the flotillins exhibit important functions and their mutations lead to severe dysfunctions. Furthermore, the EGFR activation and the MAPK signaling cascade are impaired by specific mutations of the flotillins.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Akt/PKB	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
AP2	Adapterprotein 2
BACE1	Beta-secretase 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	<i>C-Cbl associated protein</i>
c-Cbl	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Cbl
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CD59	Protectin
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CRAC-Motiv	<i>cholesterol recognition amino acid consensus</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C-TAK1	<i>Cdc25C-associated kinase</i>
CTxB	Choleratoxin B
C-Terminus	Carboxyterminus
DABCO	1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dd H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DUSP	<i>dual specificity phosphatase</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Egr-1	<i>early growth response 1</i>
ERK	extracellular Signal-regulated kinases
ESA	<i>epidermal surface antigen</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
F1KO	Flotillin-1-Knockout Zellen

FRS-2	<i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT 4	Glukose Transporter Typ 4
GM1	Rezeptor-Monosialogangliosid
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb-2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HaCat	Keratinocyten
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HeLa	Henrietta Lacks, Zervixkarzinom-Zellen
HepG2	human hepatocellular carcinoma
HT29	humanes Kolon Adenokarzinom
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
KSR-1	<i>Kinase suppressor of RAS-1</i> , Enzym
LAMP3/CD63	<i>Lysosome associated membrane protein 3</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> , Brustkrebszelllinie
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEK	MAP Kinase-Kinase/ MAP-ERK-Kinase
MeOH	Methanol
MORG-1	<i>mitogen-activated protein kinase organizer 1</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NP-40	Nonidet P-40
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like protein 1
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHB	Prohibitin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\gamma$ 1	Phospholipase C- $\gamma$ 1
Prpc	Prionprotein
PTOV-1 phosphatase	prostate tumor overexpressed-1 phosphatase
Raf	<i>rapidly accelerating fibrosarcoma protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
R2-EGFP	Humanes reggie-2 mit EGFP-Fusion
rpm	<i>rounds per minutes</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SH2-Domäne	<i>Src-homology 2-Domäne</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOHO-Domäne	<i>sorbin homology</i> , Adapterprotein
Sos	<i>son of sevenless protein</i>
SPFH-Domäne	Stomatin, Prohibitin, Flotillin und HflK/C
TBST	Tris-Buffered-Saline & Tween
TEMED	N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur der Flotillin-Proteine.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Signalkaskaden.....	9
Abbildung 3: Die Flotillin-Proteine im EGF Signalweg modifiziert nach Meister et al. 2013 .....	11
Abbildung 4: Zelluläre Lokalisation von Flotillin-1-Mutanten in HeLa-Zellen.....	29
Abbildung 5: Einfluss von Flotillin-1-EGFP auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen .....	32
Abbildung 6: Einfluss von EGFP auf die EGFR-Aktivierung in HEK293T-Zellen.....	33
Abbildung 7: Einfluss von Y56F+Y121F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR- Aktivierung in HEK293T-Zellen .....	34
Abbildung 8: Einfluss von Y56F+Y160F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR- Aktivierung in HEK293T-Zellen .....	34
Abbildung 9: Einfluss von Y121F+Y160F-EGFP Flotillin-1- Mutanten auf die EGFR- Aktivierung in HEK293T-Zellen .....	35
Abbildung 10: Nachweis der Oligomerisierung von Flotillin-1-Einzelmutanten mit Flotillin- 2.....	38
Abbildung 11: Nachweis der Oligomerisierung von Flotillin-1-Doppelmutanten mit Flotillin-2 .....	39

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien.....	12
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....	14
Tabelle 3: Auflistung der Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung .....	15
Tabelle 4: Die Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und Hersteller .....	17
Tabelle 5: Die Sekundärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung und dem Hersteller .....	18
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika.....	19
Tabelle 7: Auflistung des verwendeten Kit.....	19
Tabelle 8: Die verwendeten Bakterien-Stämme, deren Verwendung und Referenz .....	19
Tabelle 9: Die verwendeten Plasmide und Vektoren mit der jeweiligen Referenz (Amaddii, 2009).....	20
Tabelle 10: Die Liste der verwendeten humanen Zelllinien sowie zusätzliche Informationen.....	21

## 11 Literaturverzeichnis

Ali, M. H. and Imperiali, B. (2005) 'Protein oligomerization: How and why', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(17), pp. 5013–5020. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.037.

Amaddii, M. (2009) 'Reggie/Flotillin Proteins in Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking and Signaling' (PhD Thesis). Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Amaddii, M. *et al.* (2012) 'Flotillin-1/Reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), pp. 7265–7278. doi: 10.1074/jbc.M111.287599.

Babuke, T. *et al.* (2009) 'Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis', *Cellular Signalling*, 21(8), pp. 1287–1297. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.

Babuke, T. and Tikkanen, R. (2007) 'Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins', *European Journal of Cell Biology*, 86(9), pp. 525–532. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.03.003.

Banning, A. *et al.* (2014) 'Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer', pp. 129–149. doi: 10.3390/cells3010129.

Banning, A. *et al.* (2018) 'Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with  $\alpha$ -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase', *Cells*. doi: 10.3390/cells7040028.

Banning, A. and Tikkanen, R. (2013) 'Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model', *Cellular Signalling*, 26(2), pp. 198–207. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.001.

Batzer, A. G. *et al.* (1994) 'Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.14.8.5192-5201.1994.

Baumann, C. A. *et al.* (2000) 'CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport', *Nature*, 407(6801), pp. 202–207. doi: 10.1038/35025089.

Beckert, B. *et al.* (2019) 'Immortalized human hTert/KER-CT Keratinocytes a model system for research on desmosomal adhesion and pathogenesis of pemphigus vulgaris', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms20133113.

Belting, M. and Petersson, P. (1999) 'Protective role for proteoglycans against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro', *Biochemical Journal*, 342(2), pp. 281–286. doi: 10.1042/0264-6021:3420281.

Berger, T. *et al.* (2013) 'Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(41), pp. 4989–4994. doi: 10.1038/onc.2012.499.

Bickel, P. E. *et al.* (1997) 'Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), pp. 13793–13802. doi: 10.1074/jbc.272.21.13793.

Borner, G. H. H. *et al.* (2005) 'Plant Physiol.-2005-Borner-104-16.pdf', 137(January), pp. 104–116. doi: 10.1104/pp.104.053041.surrounding.

Bramkamp, M. and Lopez, D. (2015) 'Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), pp. 81–100. doi: 10.1128/membr.00036-14.

Brondello, J.-M., Pouyssegur, J. and McKenzie, F. R. (1999) 'Reduced MAP Kinase Phosphatase-1 Degradation After p42/p44<sup>MAPK</sup>-Dependent Phosphorylation', *Science*, 286(5449), pp. 2514 LP – 2517. doi: 10.1126/science.286.5449.2514.

Castillon, G. A. *et al.* (2003) 'Septins Have a Dual Role in Controlling Mitotic Exit in Budding Yeast We assayed the spindle position checkpoint in these mutants with movies of living cells progressing through mitosis. The cells expressed GFP-Tub1p, allowing us to', *Current Biology*, 13, pp. 654–658. doi: 10.1016/S.

Chardin, P. *et al.* (1993) 'Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2', *Science*. doi: 10.1126/science.8493579.

Chen, R. H., Abate, C. and Blenis, J. (1993) 'Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America. doi: 10.1073/pnas.90.23.10952.

Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1995) 'How MAP kinases are regulated', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.25.14843.

Deininger, S. O. *et al.* (2003) 'Identification of teleost Thy-1 and association with the microdomain/lipid raft reggie proteins in regenerating CNS axons', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 22(4), pp. 544–554. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00028-9.

Dermine, J. F. *et al.* (2001) 'Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes', *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 18507–18512. doi: 10.1074/jbc.M101113200.

Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. (1998) 'Signaling by dual specificity kinases', *Oncogene*, 17(11 REV. ISS. 1), pp. 1447–1455.

E. Rivera-Milla, C. A. O. S. and E. M.-T. (2006) 'Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(3), pp. 343–357. doi: 10.1007/s00018-005-5434-3.

Edgar, A. J. and Polak, J. M. (2001) 'Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(1), pp. 53–64. doi: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(00\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(00)00069-8).

Ekerot, M. *et al.* (2008) 'Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter', *Biochemical Journal*, 412(2), pp. 287–298. doi: 10.1042/BJ20071512.

Escriou, V. *et al.* (1998) 'Cationic lipid-mediated gene transfer: Analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA', *Cell Biology and Toxicology*, 14(2), pp. 95–104. doi: 10.1023/A:1007425803756.

Fernow, I., Icking, A. and Tikkanen, R. (2007) 'Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: Cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins', *European Journal of Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ejcb.2007.03.004.

Frick, M., Bright, N. A. and Riento, K. (2007) 'Report Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding', pp. 1151–1156. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.078.

Fusello, A. M. *et al.* (2006) 'The MAPK Scaffold Kinase Suppressor of Ras Is Involved in ERK Activation by Stress and Proinflammatory Cytokines and Induction of Arthritis', *The Journal of Immunology*, 177(9), pp. 6152–6158. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.6152.

De Gassart, A. *et al.* (2003) 'Lipid raft-associated protein sorting in exosomes', *Blood*, 102(13), pp. 4336–4344. doi: 10.1182/blood-2003-03-0871.

Gauthier-Rouvière, C. *et al.* (2020) 'Flotillin membrane domains in cancer', *Cancer and Metastasis Reviews*. doi: 10.1007/s10555-020-09873-y.

Ge, L. *et al.* (2008) 'The Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe Acts by Blocking the Sterol-Induced Internalization of NPC1L1', *Cell Metabolism*, 7(6), pp. 508–519. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.001.

Ge, L. *et al.* (2011) 'Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), pp. 551–556. doi: 10.1073/pnas.1014434108.

Gkantiragas, I. *et al.* (2001) 'Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex', *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), pp. 1819–1833. doi: 10.1091/mbc.12.6.1819.

Glebov, O. O., Bright, N. A. and Nichols, B. J. (2006) 'Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells', *Nature Cell Biology*, 8(1), pp. 46–54. doi: 10.1038/ncb1342.

Hagstrom, J. E. *et al.* (1997) 'Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells', *Journal of Cell Science*, 110(18), pp. 2323–2331.

Hansen, C. G. and Nichols, B. J. (2009) 'Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis', *Journal of Cell Science*, 122(11), pp. 1713–1721. doi: 10.1242/jcs.033951.

Harris, R. C., Chung, E. and Coffey, R. J. (2003) 'EGF receptor ligands', *The EGF Receptor Family: Biologic Mechanisms and Role in Cancer*, 284, pp. 3–14. doi: 10.1016/B978-012160281-9/50002-5.

Hazarika, P. *et al.* (2004) 'Up-regulation of flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0823.

John, B. A. *et al.* (2014) 'Flotillins bind to the dileucine sorting motif of  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting', *FEBS Journal*, 281(8), pp. 2074–2087. doi: 10.1111/febs.12763.

Kapahnke, M., Banning, A. and Tikkanen, R. (2016) 'Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout', *Cells*, 5(4), p. 45. doi: 10.3390/cells5040045.

Kato, N., Nakanishi, M. and Hirashima, N. (2006) 'Flotillin-1 Regulates IgE Receptor-Mediated Signaling in Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cells', *The Journal of Immunology*, 177(1), pp. 147–154. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.147.

Khokhlatchev, A. V. *et al.* (1998) 'Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81189-7.

Klutho, P. J., Costanzo-Garvey, D. L. and Lewis, R. E. (2011) 'Regulation of glucose homeostasis by KSR1 and MARK2', *PLoS ONE*, 6(12), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0029304.

Kokubo, H., Lemere, C. A. and Yamaguchi, H. (2000) 'Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology', *Neuroscience Letters*. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01334-3.

Kornfeld, K., Hom, D. B. and Horvitz, H. R. (1995) 'The ksr-1 gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*', *Cell*, 83(6), pp. 903–913. doi: 10.1016/0092-8674(95)90206-6.

Kortum, R. L. *et al.* (2005) 'The Molecular Scaffold Kinase Suppressor of Ras 1 (KSR1) Regulates Adipogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), pp. 7592–7604. doi: 10.1128/mcb.25.17.7592-7604.2005.

Kurrle, N. *et al.* (2012) 'Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization', in *Protein Phosphorylation in Human Health*. doi: 10.5772/48598.

Kurrle, N. *et al.* (2013) 'Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells', *BMC Cancer*, 13. doi: 10.1186/1471-2407-13-575.

Kyriakis, J. M. *et al.* (1992) 'Raf-1 activates MAP kinase-kinase', *Nature*. doi: 10.1038/358417a0.

Lang, D. M. *et al.* (1998) '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', *Journal of Neurobiology*, 37(4), pp. 502–523. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<502::AID-NEU2>3.0.CO;2-S.

Langhorst, M. F. *et al.* (2006) 'Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells', *The FASEB Journal*, 20(6), pp. 711–713. doi: 10.1096/fj.05-4760fje.

Lin, C. *et al.* (2011) 'Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a', *Clinical Cancer Research*, 17(10), pp. 3089–3099. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3068.

Liu, J. *et al.* (2005) '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', *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp. 16125–16134. doi: 10.1074/jbc.M500940200.

Locasale, J. W., Shaw, A. S. and Chakraborty, A. K. (2007) 'Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), pp. 13307–13312. doi: 10.1073/pnas.0706311104.

Ludwig, A. *et al.* (2010) 'Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment', *Journal of Cell Biology*, 191(4), pp. 771–781. doi: 10.1083/jcb.201005140.

Marais, R. *et al.* (1995) 'Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation.', *The EMBO Journal*, 14(13), pp. 3136–3145. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07316.x.

Medema, R. H. *et al.* (1993) 'Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.13.1.155-162.1993.

Meister, M. *et al.* (2013) 'Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), pp. 4854–4884. doi:

10.3390/ijms14034854.

Meister, M. *et al.* (2017) 'Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo', *Oncogenesis*. doi: 10.1038/oncsis.2017.47.

Meister, M. and Tikkanen, R. (2014) 'Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view', *Membranes*, 4(3), pp. 356–371. doi: 10.3390/membranes4030356.

Michaud, N. R. *et al.* (1997) 'KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), pp. 12792–12796. doi: 10.1073/pnas.94.24.12792.

Morrison, D. K. (2001) 'KSR: A MAPK scaffold of the Ras pathway?', *Journal of Cell Science*, 114(9), pp. 1609–1612.

Morrow, I. C. *et al.* (2002) 'Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel Golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation', *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp. 48834–48841. doi: 10.1074/jbc.M209082200.

Müller, J. *et al.* (2001) 'C-TAK1 Regulates Ras Signaling by Phosphorylating the MAPK Scaffold, KSR1', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 983–993. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00383-5.

Neumann-Giesen, C. *et al.* (2004) 'Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: Role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression', *Biochemical Journal*, 378(3), pp. 509–518. doi: 10.1042/BJ20031100.

Neumann-Giesen, C. *et al.* (2007) 'Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton', *Journal of Cell Science*, 120(3), pp. 395–406. doi: 10.1242/jcs.03336.

Nguyen, A. *et al.* (2002) 'Kinase Suppressor of Ras (KSR) Is a Scaffold Which Facilitates Mitogen-Activated Protein Kinase Activation In Vivo', *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), pp. 3035–3045. doi: 10.1128/mcb.22.9.3035-3045.2002.

Normanno, N. *et al.* (2006) 'Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer', *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018.

Ogura, M. *et al.* (2014) 'Phosphorylation of flotillin-1 by mitochondrial c-Src is required to

prevent the production of reactive oxygen species', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588(17), pp. 2837–2843. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.044.

Perou, C. M. *et al.* (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', *Nature*. doi: 10.1038/35021093.

Pust, S. *et al.* (2010) 'Interplay between toxin transport and flotillin localization', *PLoS ONE*, 5(1), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0008844.

Raingeaud, J. *et al.* (1995) 'Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.13.7420.

Red Brewer, M. *et al.* (2009) 'The Juxtamembrane Region of the EGF Receptor Functions as an Activation Domain', *Molecular Cell*. Elsevier Ltd, 34(6), pp. 641–651. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.034.

Riento, K. *et al.* (2009) 'Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase', pp. 912–918. doi: 10.1242/jcs.039024.

Roskoski, R. (2004) 'The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.150.

Salzer, U. and Prohaska, R. (2001) 'Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts', *Blood*, 97(4), pp. 1141–1143. doi: 10.1182/blood.V97.4.1141.

Santamaria, A. *et al.* (2005) 'PTOV1 Enables the Nuclear Translocation and Mitogenic Activity of Flotillin-1, a Major Protein of Lipid Rafts', *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), pp. 1900–1911. doi: 10.1128/mcb.25.5.1900-1911.2005.

Saslowsky, D. E. *et al.* (2010) 'Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2', *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), pp. 4399–4409. doi: 10.1172/JCI42958.

Scaltriti, M. and Baselga, J. (2006) 'The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy', *Clinical Cancer Research*, 12(18), pp. 5268–5272. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1554.

Schneider, A. *et al.* (2008) 'Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons', *Journal of Neuroscience*, 28(11), pp. 2874–2882. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008.

Schroeder, W. T. *et al.* (1994) 'Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA)', *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), pp. 19983–19991.

Schulte, T. *et al.* (1997) 'Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration.', *Development (Cambridge, England)*, 124(2), pp. 577–87.

Schurig, M. (2008) 'Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere', *Dissertation*.

Solis, G. P. *et al.* (2007) 'Reggie / flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains', 322, pp. 313–322. doi: 10.1042/BJ20061686.

Solis, G. P. *et al.* (2012) 'Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking', *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), pp. 1812–1825. doi: 10.1091/mbc.E11-12-1006.

Soon, Y. S. *et al.* (2006) 'The translation inhibitor anisomycin induces Elk-1-mediated transcriptional activation of egr-1 through multiple mitogen-activated protein kinase pathways', *Experimental and Molecular Medicine*.

Strauss, K. *et al.* (2010) 'Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease', *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), pp. 26279–26288. doi: 10.1074/jbc.M110.134775.

Stuermer, C. A. O. *et al.* (2001) 'Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2', *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), pp. 3031–3045. doi: 10.1091/mbc.12.10.3031.

Stuermer, C. A. O. *et al.* (2004) 'PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction', *FASEB Journal*, 18(14), pp. 1731–1733. doi: 10.1096/fj.04-2150fje.

Therrien, M. *et al.* (1995) 'KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction', *Cell*, 83(6), pp. 879–888. doi: 10.1016/0092-8674(95)90204-X.

Tomasovic, A., Traub, S. and Tikkanen, R. (2012) 'Molecular networks in FGF signaling: Flotillin-1 and Cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2', *PLoS ONE*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0029739.

Völlner, F. *et al.* (2016) 'Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(June), pp. 1–14. doi: 10.1038/srep28820.

Volonté, D. *et al.* (1999) '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', *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), pp. 12702–12709. doi: 10.1074/jbc.274.18.12702.

Wienen, A. (2019) *Die Funktion von Flotillinen bei der Insulin-regulierten Genexpression* (medizinische Dissertation). Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) 'A layered signalling network', 2(February). Available at: [www.nature.com/reviews/molcellbio](http://www.nature.com/reviews/molcellbio).

Yu, W. *et al.* (1998) 'Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK', *Current Biology*, 8(1), pp. 56–64. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70020-X.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

An diesem Punkt möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben und stets an meiner Seite standen.

Ich danke Allah, dem Allmächtigen, dass Er mir die Kraft und das erforderliche Durchhaltevermögen gegeben hat, die Doktorarbeit fertigzustellen.

Mein größter Dank geht an Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Ermöglichung und für die durchgehend sehr gute Betreuung meiner Dissertation sowie für die Bereitstellung aller für die Arbeit benötigten Materialien und Informationen.

Des Weiteren geht ein herzliches Dankeschön an Dr. Antje Banning, Petra Janson und Ralf Füllkrug für die ständige Unterstützung, Geduld und Freundlichkeit. Ich konnte mich stets bei Fragen an euch wenden und auf eure Hilfe zählen.

Außerdem bedanke ich mich bei Bene, Francesca, Blendi, Leonie und Annika für das angenehme Arbeitsklima und eure Hilfsbereitschaft. Dank euch hatte ich immer eine lustige und unterhaltsame Zeit.

Ich bedanke mich vom ganzen Herzen bei meiner Mutter, die mir meinen akademischen Werdegang ermöglichte und in allen Lebenslagen stets unterstützend und liebevoll an meiner Seite stand.

Zu guter Letzt vielen Dank an meinen Bruder und an Déjà vu für eure motivierende und moralische Unterstützung in dieser Zeit.