

Interaktionsanalysen zwischen Flotillinen und Desmocollinen

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

vorgelegt von

Mäulen, Marit Elisabeth
aus Münster

Gießen 2020

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

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Jung

Tag der Disputation: 07.09.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Die Haut und ihre Haftkontakte.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Aufbau des Desmosoms</i>	<i>2</i>
1.2.1. <i>Struktur der Desmogleine und Desmocolline im Vergleich</i>	<i>4</i>
1.2.2. <i>Vorkommen innerhalb der Hautschichten.....</i>	<i>6</i>
1.2.3. <i>Regulation/ Auf- & Abbau an den Membranen</i>	<i>7</i>
1.2.4. <i>Erkrankungen im Bezug auf Desmosomen</i>	<i>8</i>
1.3. <i>Pemphigus.....</i>	<i>9</i>
1.4. <i>Lipid rafts & Zelladhäsion</i>	<i>11</i>
1.5. <i>Flotilline.....</i>	<i>12</i>
1.5.1. <i>Struktur & Aufbau der Flotilline</i>	<i>13</i>
1.5.2. <i>Flotilline & Zelladhäsion.....</i>	<i>16</i>
1.6. <i>„Epidermal Growth Factor“ Stimulierung.....</i>	<i>17</i>
1.7. <i>Tyrosin-Phosphorylierung bei Flotillinen.....</i>	<i>18</i>
1.8. <i>Ziele dieser Arbeit.....</i>	<i>20</i>
2. Materialien.....	21
2.1. <i>Geräte und Materialien</i>	<i>21</i>
2.2. <i>Chemikalien</i>	<i>22</i>
2.3. <i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>23</i>
2.4. <i>Zellkultur.....</i>	<i>25</i>
2.5. <i>Zelllinien</i>	<i>25</i>
2.6. <i>Bakterien-Stämme</i>	<i>26</i>
2.7. <i>Enzyme, Kits & Stimulationsfaktoren</i>	<i>26</i>
2.8. <i>Antikörper.....</i>	<i>27</i>
2.9. <i>Synthetische Oligonukleotide.....</i>	<i>28</i>
2.10. <i>Plasmide</i>	<i>28</i>
2.11. <i>Software</i>	<i>29</i>
3. Methoden.....	30
3.1. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	<i>30</i>
3.1.1. <i>Vervielfältigung der DNA-Abschnitte für die Fusionsproteine mittels PCR.....</i>	<i>30</i>
3.1.2. <i>Aufreinigung und Extraktion</i>	<i>31</i>
3.1.3. <i>Restriktionsverdau.....</i>	<i>31</i>
3.1.4. <i>Ligation</i>	<i>31</i>
3.1.5. <i>Transformation.....</i>	<i>31</i>
3.1.6. <i>Plasmidaufreinigung (Mini/Midi)</i>	<i>32</i>
3.2. <i>Biochemische Methoden</i>	<i>33</i>
3.2.1. <i>Proteinexpression und Aufreinigung der Fusionsproteine</i>	<i>33</i>
3.2.2. <i>Indirekter GST-Pulldown.....</i>	<i>34</i>
3.2.3. <i>Co-Immünpräzipitation.....</i>	<i>35</i>

3.2.4.	SDS-PAGE	36
3.2.5.	Western Blot	37
3.2.6.	Stripping.....	38
3.3.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	38
3.3.1.	Kultivierung humaner Zelllinien	38
3.3.2.	Transfektion der HEK-Zellen.....	39
3.3.3.	Stimulation der Flot2-KO-HEK-Zellen.....	39
4.	Ergebnisse	40
4.1.	<i>Erstellung der GST-Fusionsproteine</i>	40
4.1.1.	Klonierung der Fusionsprotein-Vektoren.....	40
4.1.2.	Proteinexpression in E. coli Rosetta	42
4.2.	<i>Bindung von Flotillinen an die ICS-Sequenz</i>	46
4.3.	<i>Bindung der Flotillin-Mutanten an Desmocollin-3a</i>	48
4.4.	<i>Einfluss der EGF-induzierten Flotillin-Phosphorylierung auf Bindung an Desmocollin-3</i>	51
4.5.	<i>Co-Immunpräzipitation von Desmocollin-1 und -2 mit Flotillin-2</i>	54
5.	Diskussion	57
5.1.	<i>Die „intracellular cadherin-like sequence“ (ICS) stellt nicht die gesamte Bindungsstelle für Flotilline dar</i>	57
5.2.	<i>Tyrosin-Mutationen können zu vermehrter Bindung von Flotillin-2 an Desmocollin-3a führen</i> 59	
5.3.	<i>Gesteigerte Phosphorylierung der Flotillin-Mutanten durch EGF-Stimulation führt zu geminderter Bindung an Desmocollin-3a</i>	61
5.4.	<i>Co-Immunpräzipitation zwischen Flotillinen und Desmocollinen</i>	63
5.5.	<i>Ausblick</i>	64
I.	Zusammenfassung	67
II.	Summary	68
III.	Abkürzungsverzeichnis	69
IV.	Abbildungsverzeichnis	71
V.	Tabellenverzeichnis	72
VI.	Literaturverzeichnis	73
VII.	Ehrenwörtliche Erklärung	85
VIII.	Danksagung	86

1. Einleitung

1.1. Die Haut und ihre Haftkontakte

Die Haut ist das Hüllorgan des Menschen, welches jeden Tag diversen Umwelteinflüssen ausgesetzt ist und großen mechanischen Beanspruchungen widersteht. Um diesen Ansprüchen genügen zu können, ist die Haut aus verschiedenen Schichten aufgebaut, welche sich aus zahlreichen Zellen zusammensetzen. Die Zellen liegen in einem festen Verbund, in welchem allerdings stets Flexibilität möglich sein muss, um Prozesse wie Wachstum oder Wundheilung zu ermöglichen. Dies gilt aber nicht nur für die Haut, sondern auch für innere Organe, wie Herz oder Blase. Sie werden funktionell stark beansprucht durch Pumpvorgänge oder Dehnung.

Der Zusammenhalt der Zellen wird durch verschiedene Arten von Haftkontakten ausgebildet. Generell existieren vier verschiedene Formen, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen und am Beispiel einer polarisierten Epithelzelle erläutert werden sollen (siehe Abbildung 1). Die Gruppe der Tight Junctions (Zonula occludens, auch als Verschlusskontakte bezeichnet) halten durch die enge Verbindung der Zellzwischenräume eine Diffusionsbarriere aufrecht, die den Fluss von Molekülen und Ionen kontrolliert und so die Polarität der Zellen sichert. Sie sind meist apikolateral zu finden. Unter die kommunizierenden Zellverbindungen fallen die sogenannten Gap Junctions (Nexus), sowie die Synapsen. Bei den Gap Junctions handelt es sich um eine chemische oder elektrische Kopplung, bei welcher benachbarte Zellen durch interzelluläre Kanäle in der Lage sind, kleine Moleküle oder Ionen auszutauschen. Als letzte Gruppe sind die Adhäsionskontakte zu erwähnen, deren Hauptaufgabe die mechanische Stabilisierung ist. Sie sind essentiell für den Haftverbund zwischen Zellen. Neben den Adhärenzverbindungen (Adherens junction), ist das Desmosom (Macula adhaerens) der wichtigste Vertreter dieser Gruppe. Die Adhärenzverbindung sind ebenfalls apikolateral zu finden und verbinden sich gürtelartig über die Aktinfilamente. Weiter basolateral unterhalb des Komplexes aus Tight junction und Adhärenzverbindung sind sowohl Desmosomen, als auch Gap junctions lateral verteilt. Im Gegensatz zu den Adhärenzverbindungen, schaffen die Desmosomen den Verbund der Plasmamembran zu den Intermediärfilamenten. Dabei vermittelt das Hemidesmosom die Anbindung zur Basallamina und ist somit am basalen Ende der Zellen zu finden (Alberts et al., 2017). Die Anordnung der Zellkontakte innerhalb der Epidermis ist, je nach Schicht, etwas abgewandelt.

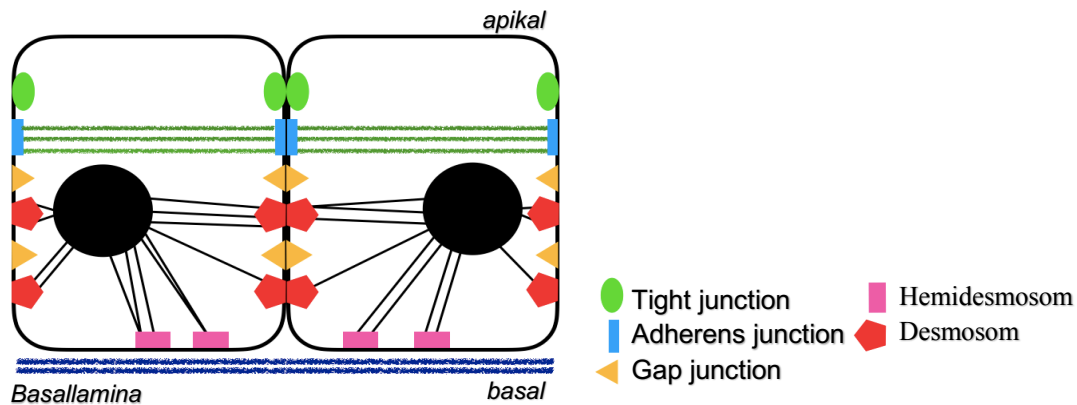


Abbildung 1: Epithelzellverband mit Zellkontakten (modifiziert nach Green et al., 2010)

Darstellung eines Epithelzellverbandes: Anordnung der unterschiedlichen Zellkontakte zwischen den Zellen und ihre Verbindung zum Zytoskelett. Unterhalb der „Tight junction Barriere“ bilden die Adhärenz junctions in der apikalen Region der Zelle eine gürtelartige Zone aus. Sie besteht aus parallel angeordneten Aktinfilamenten, welche sich zu Adhärenz junctions der gegenüberliegenden Zellwand ausrichten. Die Desmosomen, welche basolateral dazu angeordnet sind, erstrecken sich über die gesamte laterale Zellebene. Sie schaffen die Verbindung von Intermediärfilamenten und Plasmamembran.

1.2. Aufbau des Desmosoms

Die Analyse der ultrastrukturellen Organisation der Desmosomen war ein Prozess, welcher in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts mit den ersten Elektronenmikroskop-Aufnahmen begann. Die ersten Studien hierzu stammten von Porter, Odland und Kelly (Delva et al., 2009).

Generell lässt sich die Struktur eines Desmosoms in drei Zonen einteilen. Im Extrazellulärraum liegt die „Extracellular core domain“ (ECD), auch desmoglea genannt. In diesem Bereich entsteht die Bindung von zwei benachbarten Zellen. Innerhalb der Zelle folgt nun der „Outer dense plaque“ (ODP), woraufhin sich weiter innen der „Inner dense plaque“ (IDP) anschließt (siehe Abbildung 2) (Kowalczyk et al., 1994; Miller et al., 1987; North et al., 1999). Hier inserieren die Intermediärfilamente (IF).

In der ECD binden sich desmosomale Cadherine benachbarter Zellen aneinander, worüber die Adhäsion der Zellen geschaffen wird. Es handelt sich hierbei um transmembranäre Glykoproteine, welche einspannig die Plasmamembran der Zellen durchqueren (Buxton & Magee, 1992). Diese Bindung bildet sich regulär Ca^{2+} -abhängig aus, ist allerdings in der Lage, in einen „hyper-adhäsiven“ Zustand überzugehen und sich somit Ca^{2+} -unabhängig zu verhalten (Garrod & Chidgey, 2008). Im Gegensatz zu den desmosomalen Cadherinen scheinen klassische Cadherine der Adhärenz junctions zu einer Hyperadhäsion nicht fähig zu sein (Garrod & Chidgey, 2008).

Unter die desmosomalen Cadherine fallen die Desmogleine und -colline. Sie gehören zur Superfamilie der Cadherine, welche die Adhäsion zwischen Zellen in Abhängigkeit von Calcium generieren (Saito et al., 2012; Thomason et al., 2010). Zu den klassischen Cadherinen werden beispielsweise N- oder E-Cadherine gezählt, welche Bestandteile der Adherens junctions sind.

Im ODP bindet sich der zytoplasmatische Teil der desmosomalen Cadherine an die sogenannten Plaqueproteine: Plakophilin (Pkp) und Plakoglobin (PG, auch als γ -Catenin bezeichnet) (Getsios et al., 2004; Wahl et al., 1996; Witcher et al., 1996). Sie gehören zur Familie der Armadillo-Proteine, wozu man ebenfalls Proteine wie β -Catenin, p120-Catenin, δ -Catenin, p0071 und das *Armadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndrome* (ARVCF) zählt (Hatzfeld, 2005, 2007). Abgesehen von ihrer wichtigen Funktion bezüglich der Zelladhäsion, übernehmen manche der genannten Proteine auch weitere Funktionen in der Zelle. So sind unter anderem PG oder Pkp auch im Zellkern zu finden und dienen als Transkriptionsfaktoren (Getsios et al., 2004). All diese Proteine weisen ein gemeinsames Cluster von zentralen Armadillo-Domänen auf, in welchen eine Sequenz von 45 Aminosäuren unterschiedlich oft wiederholt wird (Hatzfeld, 2007; Peifer et al., 1992). PG weist zwölf dieser Arm-Domänen auf, die Pkp hingegen nur neun (Kowalczyk & Green, 2013). Anzumerken ist außerdem, dass PG als einziges desmosomales Protein auch in Adherens junctions vorkommt, wobei dessen Affinität zu desmosomalen Cadherinen wesentlich größer ist, als die zu E-Cadherin (Chitaev et al., 1996).

Ebenfalls noch im ODP entsteht die Bindung der Plaqueproteine mit Desmoplakin (DP). Die Bindung zu PG und Pkp wird über die Amino-terminale Struktur des DP aufgebaut. Hierbei bindet diese sich an die nicht-armadillo Kopfdomäne der Plaqueproteine (Bornslaeger et al., 2001; Bornslaeger et al., 1996; Kowalczyk et al., 1997, 1999). Über das DP wird anschließend im IDP die Bindung an die IF geschaffen (Bornslaeger et al., 1996; Kowalczyk et al., 1994). Fehlt das Desmoplakin, ist allerdings nicht nur die desmosomale Struktur gestört, auch die Haftung über die Adherens junction kann nicht mehr regulär gebildet werden (Vasioukhin et al., 2001).

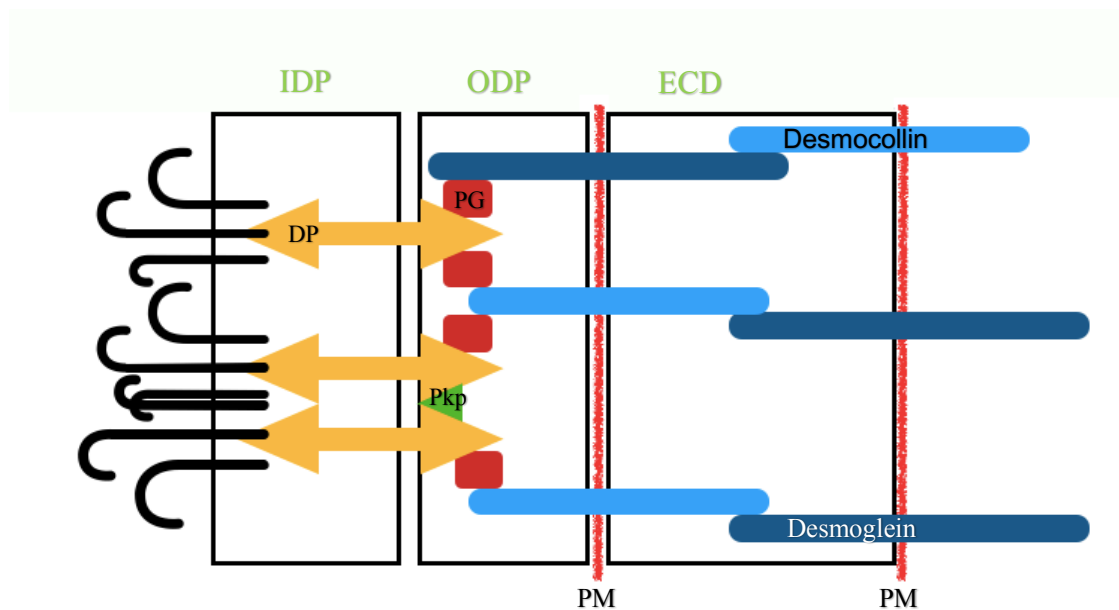


Abbildung 2: Aufbau des Desmosoms (modifiziert nach Delva et al., 2009)

Darstellung der Proteininteraktionen innerhalb eines Desmosoms: Innerhalb der ECD interagieren die desmosomalen Cadherine zweier benachbarter Zellen. Sie werden im ODP über Plakoglobin (PG) an Desmoplakin (DP) gebunden. Das DP geht im IDP die Verbindung zu den Intermediärfilamenten ein. *ECD* Extracellular Core Domain, *ODP* Outer dense plaque, *IDP* Inner dense plaque, *PG* Plakoglobin, *DP* Desmoplakin, *Pkp* Plakophilin, *PM* Plasmamembran

1.2.1. Struktur der Desmogleine und Desmocolline im Vergleich

Die zwei verschiedenen Typen der desmosomalen Cadherine, die Desmogleine (Dsg) und die Desmocolline (Dsc), kommen in verschiedenen Varianten vor. Beim Menschen existieren vier Gene für die Desmogleine (Dsg 1-4), sowie drei Gene für die Desmocolline (Dsc 1-3) (Delva et al., 2009; Koch & Franke, 1994). Jedoch können die Dscs durch alternatives Splicing in einer längeren a- und kürzeren b-Isoform vorliegen (Collins et al., 1991; Parker et al., 1991; Troyanovsky et al., 1993). Eine spezifische Funktion der kürzeren b-Isoform konnte bis heute nicht identifiziert werden, jedoch ist eine Interaktion von Pkp-3 mit Dsc-3b nachgewiesen (Bonné et al., 2003).

Generell finden sich extrazellulär sowohl in den Desmogleinen, als auch in den Desmocollinen vier hochkonservierte extrazelluläre Domänen (ECs). Mit Untersuchung dieser Strukturen in den klassischen Cadherinen gewann man viele Erkenntnisse im Bezug auf die ausgebildeten Bindungen zwischen Cadherinen benachbarter Zellen. In den ECs der Cadherine existieren hochkonservierte Tryptophan-Reste (Trp), beispielsweise Trp-2. Diese sind in der Lage, sich in hydrophile Taschen anderer Cadherine einzulagern. Diese hydrophilen Taschen sind ebenfalls hochkonservierte

strukturelle Bereiche der ECs. Es entsteht ein *trans*-Dimer aus zwei Cadherinen benachbarter Zellen, was als „Strand swap binding mechanism“ bezeichnet wird (Brasch et al., 2013). Es ist davon auszugehen, dass die Bildung von Dimeren bei desmosomalen Cadherinen nach einem ganz ähnlichen Schema funktioniert und sie so die Bindung zweier Zellen generieren (Getsios et al., 2004). So kam man in Experimenten von Nie et al. ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass Trp-2 an der *trans*-Interaktion von desmosomalen Cadherinen beteiligt sein könnte (Nie et al., 2011). Ob diese Bindungen lediglich homophil (zwischen desmosomalen Cadherinen einer Art) oder heterophil (zwischen Desmogleinen und Desmocollinen) entstehen, wurde lange diskutiert und ist nicht abschließend geklärt (Khan et al., 2017; Kowalczyk & Green, 2013; Vielmuth et al., 2018). Während Ergebnisse von Chitaev und Troyanovsky auf heterophile Interaktionen von Dsg-2 und Dsc-1a in humanen Fibrosarkom-Zellen hinwiesen, stellten Waschke et al. homophile Verbindungen zwischen Dsgs fest (Delva et al., 2009). Studien zeigten jedoch, dass für eine stabile Adhäsion sowohl Dsg, als auch Dsc vorhanden sein müssen (Getsios, Amargo, et al., 2004; Marcozzi et al., 1998). In neueren Studien kommen Vielmuth et al. zu dem Ergebnis, dass Dsg-3 hauptsächlich homophile Interaktionen eingeht und heterophil lediglich mit Dsg-2 zu einem wesentlich geringeren Anteil interagiert. Diese Erkenntnisse wurden sowohl in zell-basierten, als auch in zell-freien Experimenten nachgewiesen (Vielmuth et al., 2018). Im Gegensatz dazu kommen andere Studien zu dem Schluss, dass Dsg/Dsc *trans*-Heterodimere die fundamentale adhäsive Einheit der Desmosomen repräsentieren (Green et al., 2019; Harrison et al., 2016). Dabei verhindern konservierte geladene Aminosäuren homophile Interaktionen aufgrund Abstoßungen gleicher Ladungen und unterstützen heterophile Interaktionen durch Anziehung gegensätzlicher Ladungen (Harrison et al., 2016). Die Hypothese, desmosomale Cadherine formen *trans*- statt *cis*-Interaktionen, wird ebenfalls dadurch gestützt, dass die EC von Dsg-2 zu kurz ist, als dass *cis*-Interaktion ausgebildet werden können (Tariq et al., 2015).

Zwischen den einzelnen EC-Domänen liegen Bindestellen für Calcium. Diese sind für die Calcium-abhängige Bindung der desmosomalen Cadherine von großer Bedeutung (Pokutta & Weis, 2007). Den letzten extrazellulären Abschnitt stellt der extrazelluläre Anker (EA) dar. Er weist eine höhere Variabilität auf und ist nicht bei allen Proteinen identisch. Auf die einzelne Transmembrandomäne (TM) schließt sich der Intrazelluläre Anker (IA) an (Garrod & Chidgey, 2008). Weiter intrazellulär weisen nun lediglich die Dsgs und die längere Dsc-a-Isoform die „Intracellular Cadherin-like Sequence“ (ICS) auf, welche als Bindungsstelle für PG bekannt ist (Mathurs et al., 1994; Roh & Stanley, 1995; Troyanovsky et al., 1994). Diese Bindungsstelle fehlt in der b-Isoform, wobei die ICS-

Sequenz hier gekürzt erscheint und in Dsc-1 und -2 um elf zusätzliche und in Dsc-3 um acht zusätzliche Aminosäuren ergänzt wird (Kowalczyk & Green, 2013).

Die letzten Abschnitte der Dsgs sind in ihrer Funktion noch weitgehend unbekannt. An die ICS-Sequenz schließt sich der „Intracellular Proline Rich Linker“ (IPL) an, woraufhin eine „Repeat Unit Domain“ (RUD) in unterschiedlich häufiger Wiederholung folgt. Diese Abfolge von 29 Aminosäuren tritt bei Dsg-1 fünf Mal, bei Dsg-2 sechs Mal, bei Dsg-3 zwei Mal und bei Dsg-4 drei Mal auf. Am intrazellulären Ende befindet sich die „Desmoglein Terminal Domain“ (DTD) (Koch & Franke, 1994; Schäfer et al., 1994). Interessanterweise ist in Genen von Mäusen die genetische Verwandtschaft der Dsc zu den klassischen Cadherinen größer, als zu den Dsgs (Kljuic et al., 2004).

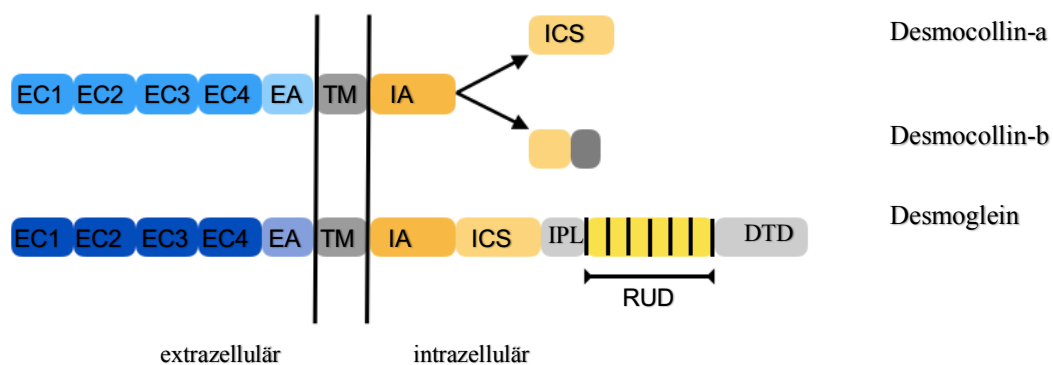


Abbildung 3: Struktur der desmosomalen Cadherine (modifiziert nach Garrod & Chidgey, 2008)

Darstellung der einspannigen Transmembranproteine mit ihrer Abfolge von Proteindomänen. Sowohl Desmogleine als auch die a-Isoform der Desmocolline, weisen in ihrem intrazellulären Abschnitt die vollständige ICS-Sequenz auf. Bei Desmocollin-b ist sie in ihrer Länge trunziert. Bei den Desmogleinen wird die Sequenz zusätzlich um den IPL, die variable Anzahl von RUD-Domänen, sowie die DTD ergänzt. Hier eine Anzahl von sechs RUD's, Desmoglein-2 entsprechend.

1.2.2. Vorkommen innerhalb der Hautschichten

Die Bestandteile eines Desmosoms unterscheiden sich je nach Gewebe und Zelle. Diese Unterschiede sind besonders für medizinische Fragestellungen relevant, da Krankheiten, die lediglich gegen eine bestimmte Komponente der Desmosomen gerichtet sind, nur spezifische Gewebe oder Schichten angreifen. So werden Dsg-2 und Dsc-2 in sämtlichen Geweben, welche Desmosomen enthalten, exprimiert. Dagegen sind Dsg-1/Dsc-1 und Dsg-3/Dsc-3 ausschließlich in bestimmten Plattenepithelien vorhanden (Dusek et al., 2007).

Die Expression der desmosomalen Komponenten innerhalb der Epidermis erfolgt nach einem bestimmten Schema, wobei die verschiedenen Schichten jeweils eine

unterschiedliche Menge der Proteine aufweisen (siehe Abbildung 4). Dsg-2 wird allein in der basalen Schicht exprimiert (Mahoney et al., 2006). Das Isoform-Paar Dsg-3/Dsc-3 liegt in größerer Menge in den tiefen Schichten der Epidermis vor und ist im Stratum granulosum nicht mehr zu finden. Auch Dsc-2 und Pkp2 weisen einen ähnlichen Verlauf auf. Sie werden allerdings auch im Stratum granulosum exprimiert. Dsg-1/Dsc-1, Dsg-4 und Pkp-1 befinden sich meist in den oberen Schichten und nehmen in ihrem Gradienten zu den tieferen Schichten ab (Waschke, 2008). Es kann allerdings gesagt werden, dass Dsg-1 und Dsg-3 sich zu einem großen Teil überschneiden (Spindler et al., 2007). Auch PG, DP und Pkp-3 sind in allen Schichten zu finden, nehmen in ihrem Vorkommen Richtung basal allerdings ab.

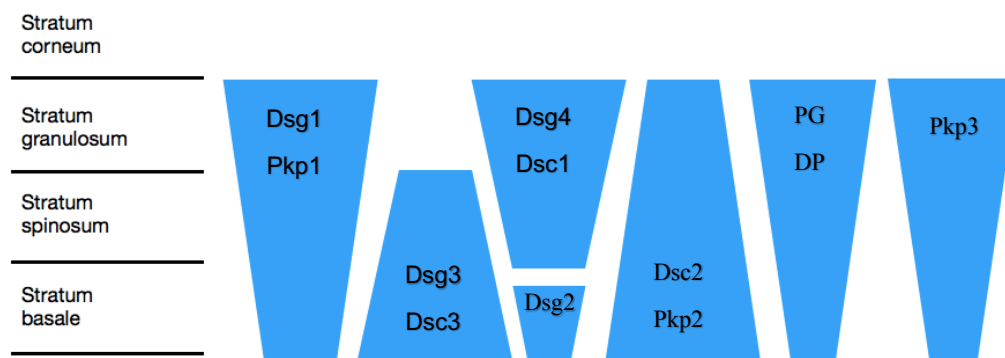


Abbildung 4: Expressionsmuster desmosomaler Komponenten (modifiziert nach Waschke, 2008)

Dargestellt sind die epidermalen Schichten (links) mit ihrer jeweiligen Expression der desmosomalen Proteine in ihrem Gradienten und Vorkommen.
Dsg Desmoglein, *Dsc* Desmocollin, *Pkp* Plakophilin, *PG* Plakoglobin, *DP* Desmoplakin

1.2.3. Regulation/ Auf- & Abbau an den Membranen

Die Bildung sowie der Umbau von Desmosomen sind Prozesse, die sich unterschiedlichen Gegebenheiten schnell anpassen können. So stabil die Haftkontakte sein müssen, so viel Flexibilität müssen sie auch aufweisen. Dies ist von zwingender Notwendigkeit, da ein Organismus nur dann existieren kann, wenn eine ausreichende Stabilität zwischen den Zellen vorliegt. Dennoch sind Vorgänge, wie die ständig ablaufende Zellproliferation von basal nach apikal und Wundheilungsmechanismen gleichzeitig lebensnotwendig.

Generell lässt sich sagen, dass die Ausbildung von Zellkontakten und Desmosomen eng mit der Kalziumkonzentration verknüpft ist. Eine Steigerung begünstigt die Ausbildung neuer Desmosomen (Angst et al., 2001; Burdett, 1998; Chitaeu & Troyanovsky, 1997). Die klassische Sekretionsroute der desmosomalen Cadherine beginnt im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Sie werden ständig synthetisiert und zur Plasmamembran transportiert. Die Synthese erfolgt zunächst als Vorläufer-Peptid, um eine verfrühte Adhäsion im Inneren der Zelle zu verhindern. Die anschließende Prozessierung findet im Golgi-Apparat in Form einer Glykosylierung statt. Durch diese liegen die desmosomalen Cadherine in ihrer unlöslichen Form vor (Green et al., 2010; Pasdar & Nelson, 1989). Daraufhin schließt sich der vesikuläre Transport über die Mikrotubuli an die Plasmamembran an, welcher Kinesin-abhängig verläuft (Green et al., 2010).

Zusätzlich zur Neubildung desmosomaler Cadherine liegt ein großer Teil dieser bereits permanent in der Plasmamembran vor. Dieser Teil existiert in zwei verschiedenen Pools, junktional und nicht-junktional, wobei ein stetiger Austausch zwischen den beiden Pools stattfindet (Roberts et al., 2011; Windoffer et al., 2002). Sie unterscheiden sich im Bezug auf ihre Löslichkeit in Detergenzien. So sind die mit den Intermediärfilamenten verbundenen desmosomalen Cadherine nicht löslich in Triton X-100, wohingegen sich die nicht-junktionalen als löslich erweisen (Stahley et al., 2014; Völlner et al., 2016). Des Weiteren liegt ganz allgemein eine Abhängigkeit von cholesterol-reichen Domänen, den sogenannten Membran-Rafts und der Zusammenkunft von Desmosomen vor. Das Cholesterol fördert die Bildung neuer Zellkontakte, sowie Desmosomen, und viele der bereits in der Plasmamembran vorhandenen Proteine bevorzugen die Stellung in Membran-Rafts (Resnik et al., 2011; Stahley et al., 2014). Über den physiologischen Abbau bzw. die Endozytose der desmosomalen Komponenten ist noch wenig bekannt. Allerdings beschäftigten sich in der Vergangenheit einige Studien mit den pathologischen Vorgängen. Die Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris zeigt eindrucksvoll, wie die gesteigerte Endozytose zu schweren Schleimhauterosionen und epidermalen Blasen führt (Calkins et al., 2006).

1.2.4. Erkrankungen im Bezug auf Desmosomen

In dem spezifischen Aufbau eines Desmosoms muss jedes Glied seine Funktion erfüllen, andernfalls kann der mechanische Zusammenhalt nicht aufrecht erhalten werden. Sowohl im IDP, im ODP als auch in der ECD sind Mutationen bekannt, welche in nicht funktionsfähigen Desmosomen resultieren. Dies führt allerdings nicht nur, wie schnell angenommen, zu Krankheitsbildern der Haut. Auch das Herz kann betroffen sein, da vor allem dieses permanent mechanischer Belastung ausgesetzt ist. Die „Arrhythmogene

rechtsventrikuläre Kardiomyopathie“ (ARVC) kann durch Veränderung von vielen Komponenten der Desmosomen durch Mutationen ausgelöst werden (Waschke, 2008): Dsg-2 (Pilichou et al., 2006), Dsc-2 (Syrris et al., 2006), PG (Mckoy et al., 2000), DP (Rampazzo et al., 2002) und Pkp-2 (Gerull et al., 2004). Im Zuge dieser Mutationen werden Myokardzellen, insbesondere im rechten Ventrikel, zunehmend in Fett- und Bindegewebe umgebaut. Dies kann zu Symptomen wie Arrhythmien, Ohnmachtsanfällen oder sogar dem plötzlichen Herztod führen (Amagai & Stanley, 2012; Li et al., 2017; Neto et al., 2019).

Intrazellulär kann es beispielsweise die IF, das DP oder die Plaque-Proteine betreffen. „Epidermolysis bullosa simplex“ beschreibt eine Mutation der Keratine, welche zur Folge hat, dass die IF den Belastungen nicht standhalten können. Die „Lethal acantholytic epidermolysis bullosa“ bezeichnet eine Mutation, welche die Struktur des DP verändert, was in der Epidermis zu suprabasalen Blasen führt, in einem generellen Haarausfall und Nagelverlust resultiert. Das Pkp-1 ist beim „Skin fragility syndrom“ und der „Ektodermalen Dysplasie“ von einer Mutation betroffen. Abschließend können interzellulär auch die Cadherine des Desmosoms betroffen sein, wie es im Fall der Autoimmunerkrankung Pemphigus der Fall ist (Amagai & Stanley, 2012; Garrod & Chidgey, 2008).

1.3. Pemphigus

Als Pemphigus wird eine chronische Autoimmunerkrankung bezeichnet, die zu Blasenbildung an der Haut und/oder Schleimhäuten führt. Ursache der Blasenbildung sind Antikörper, welche hauptsächlich gegen Dsg-1 oder Dsg-3 gerichtet sind. Die Ursache der Antikörperbildung ist bis heute nicht abschließend geklärt, allerdings können bestimmte Medikamente als Auslöser der Erkrankung fungieren. Die Inzidenz der Erkrankung liegt in Deutschland bei 0,1-0,5/100000, sie gehört somit zu den seltenen Erkrankungen. Dabei nimmt sie meist einen schweren Verlauf (Hofmann et al., 2018). Wie bereits oben beschrieben, sind die Dsg wichtige Bestandteile der Desmosomen, was zur Folge hat, dass die Erkrankung zu einer Störung des adhäsiven Verbunds der Zellen führt (Amagai et al., 1991). Generell kann man zwischen zwei Typen der Pemphigus-Gruppe unterscheiden. Beim „Pemphigus vulgaris“ (PV) richten sich die Antikörper lediglich gegen Dsg-3, oder sowohl gegen Dsg-1 als auch Dsg-3. Der „Pemphigus foliaceus“ (PF) wird durch Antikörper gegen Dsg-1 verursacht. Das klinische Bild der zwei Typen verdeutlicht das Expressionsmuster der Dsg. In den oberflächlichen Schichten der Epidermis, dem Stratum granulosum, wird deutlich mehr Dsg-1 als Dsg-3 exprimiert. Im Gegensatz dazu, ist in der basalen Schicht der Epidermis (Stratum basale)

fast ausschließlich Dsg-3 vorhanden. Auch die Schleimhäute sind fast ausschließlich durch die Expression von Dsg-3 gekennzeichnet (Mahoney et al., 1999).

So weisen Patienten mit PF keine Schleimhautläsionen auf. Stattdessen führt die Akantholyse zu feinen Blasen der obersten Hautschichten der Epidermis. Der PV kann im Gegensatz dazu die Schleimhäute und die Epidermis betreffen. Man unterscheidet hier zwischen dem mukösen und dem mukokutanösen Typ. Werden lediglich Antikörper gegen Dsg-3 gebildet, so sind tiefere Schichten der Epidermis und die Schleimhaut betroffen. Die Akantholyse der Zellen findet meist in der suprabasalen Zellschicht statt (Payne et al., 2004). Die entstehenden Blasen führen nach ihrem Aufplatzen zu tiefen Erosionen, welche anschließend verkrusten (Kitajima, 2013).

Es existieren verschiedene Hypothesen über den Ablauf der desmosomalen Störung. Zunächst einmal ging man davon aus, dass die Antikörper eine Bindung der Dsg als Folge sterischer Raumforderung verhinderten (Heupel et al., 2008). Hinzu kam mittlerweile die Erkenntnis, dass sich durch den Antikörper-Kontakt eine ganze Reihe zellulärer Signalkaskaden in Gang setzt, welche letztendlich eine gestörte desmosomale Bindung zur Folge hat (Spindler et al., 2018; Spindler & Waschke, 2018; Walter et al., 2019; Waschke, 2008). Beispiele für Signalkaskaden dieser Art sind PKC, Src, Erk und P38MAPK (Vielmuth et al., 2018). Den Vorgang der Apoptose mit anschließender Ablösung der Zelle bezeichnet man auch als Apoptolyse (Grando, 2012).

Darauf, dass auch die Rolle der übrigen desmosomalen Komponenten in dieser Hinsicht nicht zu vernachlässigen ist, ließen weitere Studien schließen. So zeigten Versuche, dass Mäuse mit einer Dsc-3-Null Mutation einen ähnlichen Phänotyp ausbilden, wie Individuen mit PV. Auch sie wiesen epidermale Blasenbildung auf. Die Vermutung liegt nahe, dass dies auch auf den Menschen übertragbar ist (Chen et al., 2008). Auch die bereits 2001 veröffentlichten Ergebnisse von Chidgey et al. zeigten, dass eine Dsc-1-Knockout Maus Hautläsionen aufweist, welche denen von PV ähneln (Chidgey et al., 2001).

Bindet der PV-IgG (Immunglobulin) im Extrazellulärraum an das Desmosom, beginnt der pathologische Mechanismus der Zerlegung, welcher in drei Phasen abläuft. Zunächst wird Dsg-3 internalisiert, welches vorwiegend aus dem nicht-junktionalen Pool stammt. Anschließend ordnen sich die desmosomalen Komponenten in zur Zellgrenze senkrecht verlaufenden Strukturen, welche „Linear arrays“ genannt werden. Entlang dieser wird nun das Dsg-3 der Desmosomen endozytiert. Dies führt letztendlich zum Verlust des adhäsiven Verbunds (Jennings et al., 2011). Die Endozytose von Dsg-3 erfolgt zusammen mit Plakoglobin, welches dabei eine Art Führungsfunktion übernimmt. So gelangt das Dsg-3 zu lysosomalen Kompartimenten und wird dort abgebaut. Der Kontakt von PV-IgG und Desmosom führt außerdem zur Retraktion der Keratinfilamente an den

lateralen Zellgrenzen (Calkins et al., 2006). Der Endozytoseweg verläuft Clathrin- und Dynamin-unabhängig. Vielmehr scheint er über die lipid rafts reguliert zu werden, da Filipin und Nystatin, welche Cholesterol binden, zu einer massiven Minderung der Dsg-3-Internalisierung führten. Wie die meisten Clathrin-unabhängigen Endozytosewege, scheint auch dieser Cholesterol-abhängig stattzufinden (Delva et al., 2008). Diese Abhängigkeit führt soweit, dass bei mit PV-IgG behandelten Zellen, die Zerstörung der Raft-Strukturen darin resultiert, dass der Entstehung von „Linear array“-Strukturen vorgebeugt wird und somit kein Desmosomen-Abbau und Verlust der Zelladhäsion entsteht (Stahley et al., 2014).

Während über die Endozytose der Desmogleine im Zuge pathologischen Erkrankungen mittlerweile viel bekannt ist, ist der physiologische Prozess noch zu weiten Teilen unbekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sie sich voneinander unterscheiden.

1.4. Lipid rafts & Zelladhäsion

Unter „Lipid rafts“ versteht man Mikrodomänen der Zellmembranen, welche mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind (Übersicht in Pike, 2006; Santos & Preta, 2018; Sezgin et al., 2017; Sviridov & Miller, 2020). Diese „Plattformen“ fungieren unter anderem als Bereiche innerhalb der Plasmamembran für Membrantransport, Signaltransduktion, Organisation des Zytoskeletts, aber auch zur Aufrechterhaltung des Calcium- und Cholesterol-Haushalts der Zelle (Browman et al., 2007; Zajchowski & Robbins, 2002). Eine spezielle Form sind die Caveolae (Simons & Toomre, 2000).

Die spezifische molekulare Zusammensetzung führt dazu, dass Lipid rafts charakteristischerweise unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 sind. Dagegen können sie sich innerhalb der Plasmamembran relativ frei bewegen und sogar miteinander fusionieren. Die Mehrheit der Rafts ist in der Plasmamembran vorhanden, allerdings können sie auch Bestandteil von anderen Membranen innerhalb der Zelle sein. Beispiele hierfür sind Endosomen, der Golgi-Apparat, aber auch das ER (Simons & Toomre, 2000). Einige der in diesen Mikrodomänen vorhandenen Proteine, weisen die Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C (SPFH) Domäne auf, welche die Fähigkeit besitzt, mit Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen zu interagieren. Dazu gehören Prohibitin-1 und -2, Flotillin-1 und -2, Stomatin und SLP-3, Podocin, sowie Erlin-1 und -2 (Browman et al., 2007). Im Hinblick auf die Lipid rafts wurden viele Erkenntnisse durch die Extrahierung sogenannter „Detergent-resistant membrane fractions“ (DRM) gesammelt. Allerdings steht mittlerweile fest, dass DRM's nicht gleichzusetzen sind mit den in lebenden Zellen vorkommenden Rafts (Brown, 2006; Munro, 2003).

Einige Studien zeigten, dass die Lipid rafts auch auf die Adhäsion zwischen Zellen Einfluss nehmen. Zum einen wurde nachgewiesen, dass in Enterozyten E-Cadherin und

p120ctn zunächst in Lipid rafts rekrutiert werden, wo sie sich aneinander binden und so die Reifung von Adherens junctions begünstigt wird (Chartier et al., 2011). Zum anderen ist auch die Assemblierung von Desmosomen ein Raft-abhängiger Prozess. Cholesterol scheint hier wie ein Regulator zu agieren, da intakte Membran-Rafts für ein funktionierendes Desmosom notwendig sind (Stahley et al., 2014). Nachgewiesen wurde, dass ein gewisser Pool von Dsc-2, Dsg-2, PG und DP konstant in den Rafts vorhanden ist. Wird das Cholesterol aus den Rafts gelöst und somit deren Struktur zerstört, sinkt gleichzeitig auch die Stärke der Adhäsion. Im Gegensatz dazu steht auch der Abbau des adhäsiven Verbunds über Desmosomen in Verbindung zu den Rafts. Die als Reaktion auf die Interaktion mit PV-IgG entstehenden „Linear array“-Strukturen, enthalten nicht nur das endozytierte Dsg-3. Sie sind bei Immunofluoreszenz Mikroskopie zusätzlich angereichert mit Raft Markern. Zerstört man die Raft-Strukturen werden auch bei PV-IgG Kontakt keine „Linear arrays“ ausgebildet (Resnik et al., 2011; Stahley et al., 2014).

1.5. Flotilline

1997 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen parallel die Entdeckung bisher unbekannter Proteine. Dabei beschrieben Schulte et al. diese bei der Regeneration von Axonen im Zuge von Nervläsionen bei Fischen und nannten sie Reggie-1 und -2 (Schulte et al., 1997). Dagegen bezeichneten Bickel et al. die Proteine als Flotillin-1 und -2, wobei Flotillin-1 dem Reggie-2 und Flotillin-2 dem Reggie-1 entspricht. Sie extrahierten DRM's aus Lungengewebe von Mäusen, worin die Flotilline nachgewiesen werden konnten (Bickel et al., 1997). Mit der Zeit setzte sich die Bezeichnung der Proteine als „Flotilline“ durch.

Es handelt sich bei den Flotillinen um evolutionär hoch konservierte Proteine, wobei die Aminosäuresequenz zwischen Flotillin-1 und -2 zu 44% identisch ist. Des Weiteren stimmt die Proteinsequenz von humanem Flotillin-1 zu 98% mit der von Mäusen überein (Edgar & Polak, 2001). Ihre Molekularmasse liegt bei ca. 47 kDa. Innerhalb der Zelle sind die Flotilline Membran-assoziiert, weisen allerdings keinerlei typische Transmembran-Sequenz auf (Lang et al., 1998; Schulte et al., 1997). Jedoch sind sie ein Bestandteil von Lipid rafts und gehören zur Gruppe der SPFH-Proteine (Rivera-milla et al., 2006). In den spezifischen Caveolae findet man sie nicht (Lang et al., 1998). Die ubiquitäre Expression, besonders von Flotillin-2, zeugt von ihrer wichtigen Funktion in Zellen, wenn auch ein Fehlen der Flotilline trotzdem mit dem Leben vereinbar scheint (Banning et al., 2012; Bitsikas et al., 2014). Nichtsdestotrotz konnten sie in allen bereits getesteten Vertebraten nachgewiesen werden. Die Flotilline werden mit Prozessen wie Signaltransduktion, Membrantransport, Endozytose oder Phagozytose, Axon

Regeneration, Zell-Zell-Adhäsion und Aktin-Dynamik in Verbindung gebracht (Bodin et al., 2014; Neumann-Giesen et al., 2004). Überdies kann eine gegenseitige Stabilisation der beiden Flotilline beobachtet werden. Liegt ein Knockout für eines vor, so ist auch die Expression des jeweils anderen vermindert. Dabei ist allerdings eine stärkere Abhängigkeit des Flotillin-1 von Flotillin-2 zu beobachten (Amaddii et al., 2012; Solis et al., 2007). Diese Tatsache könnte auch die Ursache dafür sein, dass innerhalb von Zellen die dominierendere Form die Oligomere darstellen.

Allgemein kolokalisieren die beiden Proteine in vielen Membrankompartimenten. An der Plasmamembran sammeln sie sich vor allem in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten (Guillaume et al., 2013). Jedoch können sie auch innerhalb der Zelle je nach Zelltyp in diversen Membranen vorkommen, wie beispielsweise im Golgi-Apparat (Langhorst et al., 2008), in Endosomen, Lipidtröpfchen oder dem Zellkern (Browman et al., 2007). Zusätzlichen Einfluss darauf nehmen extrazelluläre Stimulatoren (Neumann-Giesen et al., 2007; Riento et al., 2009). Die Endozytose der Flotilline von der Plasmamembran stellt einen Vorgang dar, welcher noch nicht abschließend identifiziert wurde. Die Internalisierung von Flotillin-1 wurde sowohl als Clathrin- als auch Caveolin-unabhängig beschrieben (Frick et al., 2007; Glebov et al., 2006). Somit auch unabhängig von Dynamin. Jedoch ist als Reaktion auf eine EGF-Stimulation hin eine Dynamin-abhängige Endozytose zu beobachten (Meister et al., 2014). Nichtsdestotrotz kann es sich bei den beiden Vorgängen um zwei unterschiedliche Prozesse handeln. Die Dynamin-unabhängige Route könnte dabei besser als „Flotillin-gestützt“ beschrieben werden, da hierbei noch keine wirkliche Abhängigkeit von Flotillinen nachgewiesen wurde (Meister & Tikkanen, 2014).

1.5.1. Struktur & Aufbau der Flotilline

Beide Flotilline lassen sich in zwei Bereiche einteilen. Dabei hat der N-terminale Bereich vorwiegend die Funktion der Membraninteraktion, der C-terminale Bereich bildet den Verbund als Oligomer mit anderen Flotillinen (Abbildung 5B) (Solis et al., 2007). Die SPFH-Domäne erstreckt sich im N-terminalen Bereich bei Flotillin-1 bis Aminosäure 185, bei Flotillin-2 bis 180 (Browman et al., 2007). Innerhalb dieser Domäne weisen beide Flotilline Fettsäuremodifikationen auf. Flotillin-1 ist an Cystein 5 (C5), C17 und C34 posttranslational palmitoyliert, wobei C34 für die Assoziation der Flotilline mit der Plasmamembran vorhanden sein muss (Abbildung 5A) (Morrow et al., 2002).

Bei Flotillin-2 ist die Myristylierung an Glycin 2 (G2) und die Palmitoylierung an C4 essentiell für die Lokalisierung in den Lipid rafts, es weist aber noch zusätzliche Palmitoylierungsstellen an C19 und C20 auf. Die kotranslationale Myristylierung an G2 ist dabei Voraussetzung für die spätere Palmitoylierung (Neumann-Giesen et al., 2004).

Innerhalb der SPFH-Domäne sind außerdem noch zwei „Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus“-Bereiche zu finden. Diese sogenannten „CRAC“-Bereiche vermitteln eine Cholesterolbindung und unterstützen dadurch die Cholesterolanreicherung in der Plasmamembran (Roitbak et al., 2005). Der zweite dieser CRAC-Bereiche in Flotillin-2 enthält den Tyrosinrest Y-163. Beide Flotilline enthalten verschiedene Tyrosinreste in diesem Bereich, welche durch eine Phosphorylierung durch Src-Kinasen beeinflusst werden können. Diese Tyrosinreste sind zu großen Teilen an der Heterooligomerisierung beteiligt. Wichtig scheinen vor allem Tyrosin 160 (Y-160) bei Flotillin-1 und Tyrosin 163 (Y-163) bei Flotillin-2 zu sein (Babuke et al., 2009; Neumann-Giesen et al., 2007; Riento et al., 2009). Ob dabei das bloße Vorhandensein des Tyrosin-Restes oder eine Phosphorylierung an dieser Stelle die Heterooligomerisierung beeinflusst, ist nicht vollständig geklärt. Des Weiteren befinden sich zwei hydrophobe Bereiche, sogenannte „Hydrophobic stretches“, im SPFH-Bereich (Abbildung 5A). Die hydrophobe Eigenschaft ist nicht ausreichend, um eine integrale Transmembrandomäne zu formen, allerdings können an diesen Stellen Interaktionen mit der Plasmamembran oder mit Plasmamembran-assoziierten Proteinen entstehen (Rivera-milla et al., 2006). Die sogenannte „Flotillin-Domäne“ charakterisiert diese beiden Proteine. Sie befindet sich am C-terminalen Ende und reicht bei Flotillin-1 von Aminosäure 180-353 und bei Flotillin-2 von 184-353 (Solis et al., 2007). Innerhalb dieser Sequenz sind sogenannte „Coiled-coil“ Strukturen enthalten. Durch wiederkehrende Glutamat-Alanin Sequenzen bilden sich hier α -Helices aus. Die Organisation von Flotillinen an der Plasmamembran benötigt eine Interaktion von mehreren Flotillin-Proteinen, welche sich als Homo- oder auch Hetero-Oligomere organisieren können (siehe Abbildung 5 B). Dabei sind diese C-terminalen „Coiled-coil“ Strukturen entscheidend. Flotillin-2 enthält drei dieser Coiled-coil (CC) Strukturen, wobei lediglich CC-1 und CC-2 für die Oligomerisierung mit Flotillin-1 relevant sind. Sie sind in der Aminosäuresequenz an den Stellen 239-321 und 184-238 zu finden (Solis et al., 2007).

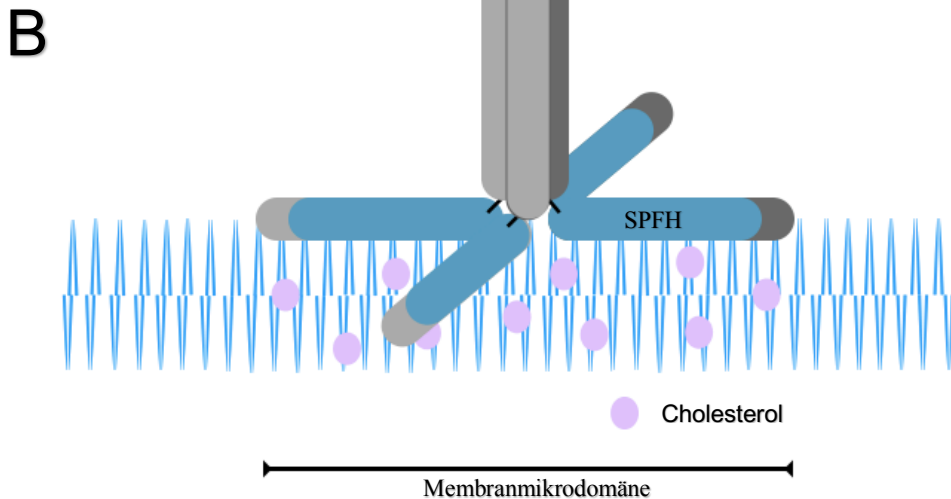
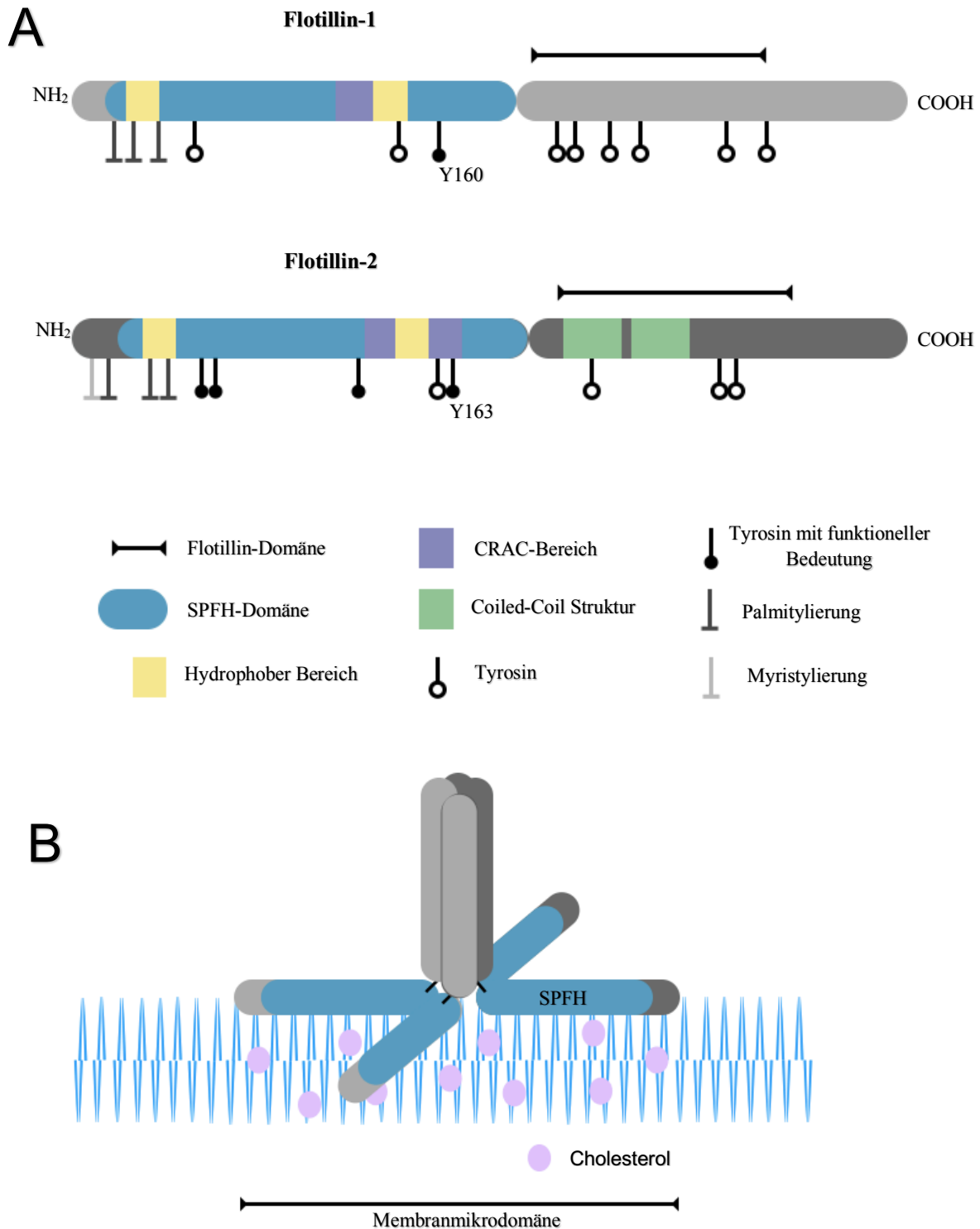


Abbildung 5: struktureller Aufbau der Flotilline (modifiziert nach Bodin et al., 2014; Völlner, 2016)

A Lineare Darstellung von Flotillin-1 und -2: N-Terminal ist die SPFH-Domäne zu finden, C-Terminal die Flotillin-Domäne. Eingezeichnet sind lediglich CC 1 und CC 2 bei Flotillin-2, welche bei Oligomeren die Interaktion zwischen den Flotillinen herstellen.

B Schematische Darstellung eines Flotillin-Tetramers: Assoziation mit der Plasmamembran über die SPFH-Domäne, in Membranmikrodomänen angereichert mit Cholesterol. Zusammenlagerung von vier Flotillin-Proteinen über die Flotillin-Domäne.

1.5.2. Flotilline & Zelladhäsion

Bereits initial bei der Entdeckung der Flotilline von Schulte et al. wurde eine Verbindung zum Epithelzellverband gezogen. Überraschenderweise stellte man eine 80%ige Übereinstimmung des Epidermal Surface Antigen Proteins (ESA) und Flotillin-1 fest (Schulte et al., 1997). Die cDNA von ESA wurde zuvor erst 1994 von Schröder et al. aus humanen Keratinozyten extrahiert.

Eine direkte Assoziation von Flotillinen zu Vorgängen der Zelladhäsion lässt sich unter anderem über ihre Fähigkeit der Modellierung des Aktin-Zytoskeletts herleiten. Eine induzierte Überexpression von Flotillin-2 führt in diversen Zelllinien zur Generierung von Filopodien (Neumann-Giesen et al., 2004). Durch diese Filopodien von Epithelzellen wird ein erster Kontakt zweier benachbarter Zellen hergestellt, welcher einen wichtigen Schritt in der Differenzierung und Veränderung des Epithelzellverbands darstellt (Vasioukhin & Fuchs, 2001). Durch eine Translokation der Flotilline in Form einer Endozytose, wird die Fähigkeit das Aktin-Zytoskelett zu modellieren hingegen negativ beeinflusst (Neumann-Giesen et al., 2007). Auch eine Funktion bezüglich Zell-Matrix-Kontakten ist bereits bekannt. Dabei beeinflussen die Flotilline die Morphologie und Dynamik von Fokalkontakten. Gleichzeitig konnte eine Interaktion mit α -Actinin nachgewiesen werden (Banning et al., 2018).

Des Weiteren wurden zahlreiche Assoziationen von Flotillinen mit Adhäsionsproteinen nachgewiesen. Beispielsweise kolokalisieren N- und E-Cadherine mit Flotillinen an der Plasmamembran und stabilisieren sie dort, wobei die Anreicherung zusätzlich durch Flotilline begünstigt wird (Guillaume et al., 2013). So ist in HT-29 Zellen mit verringertem Flotillin-1-Gehalt diese Anreicherung von E-Cadherin und p120 Catenin gestört (Chartier et al., 2011). Interaktionen von Flotillinen konnten nicht nur mit klassischen Cadherinen nachgewiesen werden. Der Bezug zu Desmosomen und einer möglichen Regulation dieser durch Flotilline, ließ sich über Interaktionen zwischen ihnen und PG (γ -Catenin) herstellen (Kurrle et al., 2013).

In späteren Studien untersuchte man die Beziehung zwischen Flotillinen und Desmosomen gezielter. Dabei konnte sowohl eine Kolokolisation zwischen Flotillinen und Dsg-3 in HaCaT Keratinozyten dargestellt werden, als auch deren direkte Bindung an die zytoplasmatische Domäne desmosomaler Cadherine. Es wurden zunächst indirekte GST-Pulldowns durchgeführt, in welchen eine Bindung der Flotilline an den zytoplasmatischen Domänen aller Desmogleine deutlich wurde. Interessanterweise konnten Flotilline bei diesen Versuchen nicht an die kürzeren b-Isoformen der Dsc binden (Völlner, 2016). Ihnen fehlt im Gegensatz zu den längeren a-Isoformen, die ICS-Sequenz, welche in den Dsg ebenfalls vorhanden ist (siehe oben). Darüber hinaus wies

man in Coimmunpräzipitationen nach, dass Flotillin-1 ebenfalls direkt an Dsg-3 und Dsc-1a bindet, allerdings nur sehr schwach an Dsc-1b. Die Bindung von Flotillin-2 und Dsc-1a wurde hier nur als indirekt nachgewiesen, wobei sie über γ -Catenin vermittelt sein könnte (Völlner, 2016). Da die ICS-Sequenz bereits als direkte Bindungsstelle für γ -Catenin bekannt war, kam man zu dem Schluss, dass sie ebenfalls als Bindungsstelle von Flotillinen und desmosomalen Cadherinen fungieren könnte (Völlner, 2016).

1.6. „Epidermal Growth Factor“ Stimulierung

Viele zelluläre Prozesse werden durch eine Signalkaskade gesteuert, die durch Stimulierung des EGFR in Gang gesetzt wird. Er gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinase. Wird der EGFR durch die Bindung eines Liganden (klassischerweise EGF) aktiviert, folgt eine Dimerisierung sowie Autophosphorylierung. Im Anschluss kann das Signal über den MAPK-Weg (mitogen aktivierte Protein Kinase) weitergeleitet werden (Banning et al., 2014).

Klassische Eigenschaften maligner Zellen sind häufig der Verlust von Adhäsion zwischen Zellen, als auch die Veränderung von Proteinen der Zellkontakte. So werden Voraussetzungen für aggressives Tumorwachstum geschaffen. Der EGFR ist auch hier ein wichtiger Mediator, da er nicht nur Einfluss auf eine gesteigerte Zellteilung nimmt. Beispielsweise resultiert bei Zellen eines Plattenepithelkarzinoms die Hemmung des EGFR darin, dass die Zellkontakte zwischen Tumorzellen gestärkt werden. Die Entstehung neuer Desmosomen wird durch eine gesteigerte Ansammlung desmosomaler Cadherine an Zellkontakten, sowie einer Inhibierung von Tyrosinphosphorylierung bei desmosomalen Proteinen, begünstigt (Lorch et al., 2004). Die Stimulation des EGFR resultiert bei Flotillinen zum einen in einer Größenzunahme der Oligomer-Strukturen, da sie sich zusammenlagern (Babuke et al., 2009). Zum anderen erfolgt eine Tyrosinphosphorylierung mit anschließender Endozytose (siehe unten). Im Gegenzug hat allerdings auch das Fehlen von Flotillin-1 Einfluss auf die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors. Liegt in HeLa-Zellen kein Flotillin-1 vor, läuft die Autophosphorylierung des EGFR nach EGF-Stimulation nur noch vermindert ab. Dies wiederum führt zu einer gestörten Weitergabe des Signals an die MAP-Kinase (Amaddii et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in anderen Studien (Solis et al., 2012). Darüber hinaus kann eine Flotillin-1-Depletion in Tumorzellen allerdings einer gesteigerten Synthese von EGFR und somit zu unkontrolliertem Wachstum in Tumorzellen führen (Kurrle et al., 2013).

Viele Studien brachten Flotilline bereits mit den zellulären Signalkaskaden in Verbindung. Um zu verstehen, inwieweit Flotilline auf molekularer Ebene in diese

Prozesse involviert sind, untersuchte man ihre Phosphorylierungen, welche als mutmaßliche Modifikationen zur Signalweitergabe durch eine EGFR-Aktivierung in Frage kamen (Neumann-Giesen et al., 2007).

1.7. Tyrosin-Phosphorylierung bei Flotillinen

Flotilline enthalten verschiedene Tyrosin-Reste, an welchen eine Phosphorylierung möglich ist. Bei Flotillin-2 sind es acht solcher Tyrosin-Reste. Sie sind an den Stellen Y-24, Y-27, Y-124, Y-158, Y-163, Y-241, Y-348 und Y-358 zu finden (siehe Abbildung 5 A). Flotillin-1 enthält neun Tyrosin-Reste. Diese Phosphorylierungen werden durch Kinasen der Src-Familie vermittelt. Während Riento et al. besonders die Rolle von Fyn hervorhoben (Riento et al., 2009), zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass auch Src in der Lage zur Phosphorylierung von Flotillin-2 ist (Neumann-Giesen et al., 2007). Dabei kann Flotillin-2 an verschiedenen dieser Reste modifiziert werden. Weiter fand man heraus, dass eine Stimulation von Zellen mit EGF und die anschließende Phosphorylierung zu einer Translokation der Flotilline führt. Sie werden von der Plasmamembran endozytiert und sind anschließend in LAMP-3/CD63-positiven Endosomen zu finden, in denen sie teilweise mit dem EGFR kolokalisieren. Bei diesem Vorgang scheint der Tyrosin-Rest Y-163 bei Flotillin-2 und Y-160 bei Flotillin-1 eine besondere Rolle zu spielen (Neumann-Giesen et al., 2007). Eine Mutation an dieser Stelle in Form eines Austausches von Tyrosin durch Phenylalanin, führt zu einer Hemmung der EGF-stimulierten Endozytose. Durch diese Mutation erlangt Flotillin-2 einen Status, der es stabil an der Plasmamembran verbleiben lässt (Neumann-Giesen et al., 2007).

Der Tyrosin-Rest Y-27 scheint entscheidend für die Prozessierung von Flotillin-2 zu sein. Ist dieser durch Phenylalanin ersetzt, so ist der Phosphorylierungsgehalt dem der anderen Mutanten sehr ähnlich, allerdings ist die molekulare Größe des Proteins geringfügig kleiner. Es ist die Folge einer proteolytischen Prozessierung des Proteins, welche dazu führt, dass Flotillin-2 sich von der Plasmamembran löst (Neumann-Giesen et al., 2004). Ein Austausch dieses Tyrosin-Restes ist somit nicht möglich ohne die physiologische Funktionsfähigkeit des Proteins zu verlieren. Jedoch ist fraglich, ob eine Phosphorylierung an dieser Stelle möglich ist.

Der Mutant R1-7xYF, bei welchem sieben der acht Tyrosin-Reste von Flotillin-2 durch Phenylalanin ersetzt wurden (lediglich Y-27 wurde belassen), zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Einzelmutation R1-Y163F. Auf eine EGFR-Stimulation erfolgte auch hier keine Phosphorylierung und der Großteil der Flotilline verblieb an der Plasmamembran (Neumann-Giesen et al., 2007). Diese Ergebnisse wurden durch die Erkenntnis ergänzt, dass die Mutation an Y-163 zu einer Hemmung der Bildung von Heterooligomeren zwischen Flotillin-1 und -2 führt. Da eine Ausbildung von

Homooligomeren trotzdem möglich scheint, könnte folglich auch die Zusammenlagerung von Heterooligomeren der limitierende Faktor der Endozytose sein (Babuke et al., 2009). Es bleibt zu klären, welcher der beiden Faktoren die Ursache der Blockade darstellt.

1.8. Ziele dieser Arbeit

Der bisherige Forschungsstand weist auf eine wichtige Funktion der Flotilline in der Regulation und Stabilisation von Desmosomen hin. Dabei ist die Interaktion von Flotillinen und desmosomalen Cadherinen bereits mehrfach nachgewiesen, jedoch die genaue Bindungsstelle auf molekularer Ebene nicht abschließend charakterisiert. In dieser Arbeit soll die Interaktionsstelle zwischen Flotillinen und Desmocollinen mittels *in vitro*-Interaktionsanalysen detaillierter eingegrenzt werden. Dazu werden GST-Proteine generiert, welche lediglich den zytoplasmatischen ICS-Abschnitt der Desmocolline aufweisen, um sie in ihrem Bindungsverhalten zu Flotillin-2 mit der gesamten intrazellulären Domäne der Desmocolline zu vergleichen. Darüber hinaus soll der Einfluss von Tyrosin-Mutanten auf die Interaktion zwischen Flotillin-2 und dem intrazellulären Bereich von Desmocollin-3 untersucht werden. Eine Stimulation der Mutanten mit EGF gibt dabei zusätzlich Aufschluss über die Auswirkungen induzierter Phosphorylierung auf die Bindung zwischen Flotillin-2 und Desmocollin-3.

2. Materialien

2.1. Geräte und Materialien

Alle bei den Versuchen verwendeten Materialien, Geräte und Chemikalien sind mit Bezeichnung und Hersteller aufgelistet.

Tabelle 1: verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Analytische Waage (SI-64)	Denver Instrument, Göttingen, DE
Waage (PB 602-S)	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, US
Benchtop Zentrifuge (Mikro 200R)	Hettich, Tuttlingen, DE
Zentrifuge (J2-21)	Beckman Coulter, Brea, CA, US
Spannungsquelle (Elektrophorese Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg, DE
Acrylamid Gelelektrophorese Kammer (Mighty-Small II)	Hoefer Inc., GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Blot-Kammer (Criterion blotter)	Bio-Rad, München, DE
Schwenk-Tisch	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Bakterien Schüttler (KS 15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Bakterien Inkubator (Incucell)	MMM, Darmstadt, DE
Heizblock	Laborgeräte München, München, DE
Inkubator für Zellkulturen (CO2 Inkubator)	Sanyo, München, DE
Sicherheitswerkbank (HeraSafe KS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
PCR Thermocycler (TPersonal)	Biometra, Göttingen, DE
Photometer (Bio Photometer Plus)	Eppendorf, Hamburg, DE
Luminometer (Infinite M200)	Tecan, Männedorf, CH
Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls)	Bandelin, Berlin, DE
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Xiamen, CN
Wasser-Aufbereitungssystem (Millipore)	Merck, Darmstadt, DE
Falkon-Röhrchen (15/50ml)	BD, Heidelberg, DE
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Röntgenfilme	FUJIFILM, Düsseldorf, DE
Parafilm	PechineyPlastic Packaging, IL, US
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Zellkultur-Flaschen	TPP, Trasadingen, CH
Zellkultur-Platten	TPP, Trasadingen, CH
Vortexer	Biovortex, Linköping, SE
Wasserbad	B.Braun Biotech, Meisungen, DE

2.2. Chemikalien

Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercapthoethanol	Roth, Karlsruhe, DE
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt, DE
2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)	AppliChem, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Agarose	Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, DE
Aprotinin	Roth, Karlsruhe, DE
Bio-Rad Protein Assay Reagenz	Bio-Rad, München, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, AU
BSA Standards für Gele	Bio-Rad, München, DE
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, DE
Coomassie brilliant blue G-250	AppliChem, Darmstadt, DE
CutSmart Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a.m., DE
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, DE
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DNA-Marker	NEB, Frankfurt a.M., DE
Dynabeads (Protein A und G)	Life Technologies, Darmstadt, DE
Dynasore	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
ECL Western Blot Detektions-Reagenz	Thermo Scientific, Waltham, MA, US
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, DE
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, DE
Glutathion Sepharose Beads	GE Healthcare, München, DE

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Roth, Karlsruhe, DE
Kanamycin	Roth, Karlsruhe, DE
LB-Broth (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe, DE
Leupeptin	Roth, Karlsruhe, DE
Luminol (3-Aminophthalhydrazide/ ECL)	AppliChem, Darmstadt, DE
Lysozym	Roth, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
N-Octyl- β -D-thioglucopyranoside (NOG)	AppliChem, Darmstadt, DE
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Pansorbin cells	Merck, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Thermo Scientific, Waltham, MA, US
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe, DE
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Roth, Karlsruhe, DE
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, DE
Precision Plus Protein Standard (Protein Marker)	Bio-Rad, München, DE
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Q5 <i>Reaction Puffer</i>	NEB, Frankfurt a.M., DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Super Script Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Tetramethylthylendiamin, '1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Wasserstoffperoxid 30% p.a.	Roth, Karlsruhe, DE

2.3. Puffer und Lösungen

Selbst hergestellte Lösungen/Puffer, die in den Versuchen verwendet wurden, sind mit ihrer Zusammensetzung hier aufgelistet.

Tabelle 3: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Co-IP Puffer	10 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton; pH 8,0
Blockende Lösung für WB	5% Milchpulver in TBS-T

Coomassie Färbelösung	0,1% Coomassie brilliant blue; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure
Coomassie Entfärbelösung	20% Methanol; 7,5% Essigsäure
DNA- Puffer	75% (v/v) Glycerol; 2 mg/ml Bromphenolblau; 4 mg/ml Xylencyanol; 50 mM EDTA
ECL-Lösung	1250 μ M 3-aminophtalhydrazide (Luminol); 200 μ M p-Coumarinsäure; 100 mM Tris-HCL pH 8,5; immer frisch zugegeben 1:1000 10% H ₂ O ₂
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes (pH 6,8); 2 mM MgCl ₂ ; 5 mM EDTA (pH 8,0); 4% PFA
GST Lysis Puffer	50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5% v/v Glycerol; 0,1% NP-40
LB Agar	15 g Agar-Pulver; 1 L LB-Medium
LB Medium	25 g LB-Broth auf 1 L Wasser
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	150 mM NaCl; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; durch hinzugeben von NaOH einen pH-Wert von 7,4 einstellen
Ponceau S Färbelösung	0,1% Ponceau; 5% Essigsäure
SDS Elektrophorese Puffer (Laemmlli)	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS
SDS Sample Puffer 4x (Loading Buffer)	250 mM Tris-HCL pH 6,8; 8% SDS; 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau; 100 mM DTT; 20% 2-Mercaptoethanol
SOC Medium	0,8 % Glukose in LB-Medium
Stripping Lösung für WB	0,1 M NaOH
Stürmer Lyse Puffer	50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% NP-40
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (1x) (0,5x für DNA Gele)	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (TBS-T)	10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20; HCl hinzugeben bis ein pH von 7,4 erreicht ist
Tris-EDTA-Puffer (TE)	10 mM Tris pH 8,0; 0,1 mM EDTA

Transfer-Puffer des WB's	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 10% v/v Methanol
--------------------------	--

2.4. Zellkultur

Zur Kultivierung der Zelllinien wurden folgende Antibiotika, Wachstumsmedien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 4: Kulturmedien und Antibiotika

Name	Beschreibung	Hersteller
Ampicillin	K029.1	Roth, Karlsruhe, DE
Kanamycin	T7831.2	Roth, Karlsruhe, DE
DMEM -/-	Dulbecco's modified Eagles Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, DE
DMEM +/-	DMEM mit 10% Fötalem Kälberserum, 1% Penicillin Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
FCS	Fötale Kälberserum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, DE
Macsfectin	Transfektions-Reagenz	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE
Trypsin	Protease	Roth, Karlsruhe, DE

2.5. Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden für die Versuche genutzt.

Tabelle 5: Zelllinien der Versuche

HeLa-Zellen	Humane Gebärmutterhalskarzinom-Zellen von Henrietta Laks	ATCC, Rockville, US
HEK-293T-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC, Rockville, US
HaCaT-Zellen	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten	Boukamp et al., 1988

2.6. Bakterien-Stämme

Die aufgelisteten Bakterienstämme kultivierte man in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C.

Tabelle 6: verwendete Bakterien-Stämme

E.coli Rosetta(DE3)pLysS	Bakterienstamm zur Proteinexpression	Merck, Darmstadt, DE
E.coli XL-1 blue	Bakterienstamm zur DNA/Plasmid-Vervielfältigung	Stratagene, La Jolla, CA, US

2.7. Enzyme, Kits & Stimulationsfaktoren

Die folgenden kommerziellen Kits und Säulen verwendete man zur Aufreinigung der hergestellten DNA-Replikat.

Tabelle 7: verwendete Aufreinigungskits, Enzyme & Stimulationsfaktoren

Kit		Hersteller	
Plasmid DNA purification Kit „NucleoBond Xtra Midi Kit“ → High-copy plasmid purification		Macherey-Nagel, Düren, DE	
Plasmid DNA purification Kit „NucleoSpin plasmid“ (NoLid) → Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli		Macherey-Nagel, Düren, DE	
High Pure PCR Product Purification Kit		Roche, Mannheim, DE	
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up		Macherey-Nagel, Düren, DE	
Stimulationsfaktor			
EGF	100 ng/μl	Epidermaler Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Vanadat (Na ₃ VO ₄) 1 mM		Tyrosin Phosphatasen Inhibitor	
NaF		Tyrosin Phosphatasen Inhibitor	

2.8. Antikörper

Tabelle 8: verwendete Antikörper

Antikörper	Spender	WB	IP	Hersteller
Primärantikörper				
Flotillin-2 (Katalog-Nr. 610384)	Maus	1:1000		BD, Heidelberg, DE
Flotillin-1 (Katalog-Nr. 610821)	Maus	1:1000		BD, Heidelberg, DE
GAPDH (Katalog-Nr. ab9484)	Maus	1:10000		Abcam, Cambridge, UK
Desmocollin-1 (Katalog-Nr. sc-398590)	Mensch		2 µg	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Desmocollin-2/3 (Katalog-Nr. sc-53485)	Mensch		2 µg	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Flotillin-2 (Katalog-Nr. F1680)	Kaninchen		2 µg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Flotillin-1 (Katalog-Nr. F1180)	Kaninchen		2 µg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Sekundärantikörper				
Goat Anti-Maus/ HRP (Katalog-Nr. P0447)		1:10000		Dako, Wiesentheid, DE

2.9. Synthetische Oligonukleotide

Zur Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen mittels PCR verwendete man DNA-Primer, welche man von der Firma Sigma Aldrich in Taufkirchen bezog.

Tabelle 9: verwendete Primer

Name	Sequenz 5' zu 3'	NCBI Ref Seq.
hDsc_1a	hDsc1a-ICS-BamHI-fwd: CTATA GGATCC TTCACCCAACCTCGGC hDsc1a_STOP_EcoR1_rev: CTATA GAATTC TTATTTCTTG ATGCATGTCTTTGC	NM_024421.2
hDsc_2a	hDsc2a-ICS-BamHI-fwd: CTATA GGATCC TTTACTCAGCCCCGTCTTGG hDsc2a_STOP_EcoR1_rev: CTATA GAATTC TCATCTCTTCATGCATGCTTC	NM_024422.3
hDsc_3a	hDsc3a-ICS-BamHI-fwd: CTATA GGATCC TTTACTCAACCCCGTCTCGG hDsc3a_STOP_EcoR1_rev: CTATA GAATTC TTATCTCTTT GTGCATGCTT C	NM_001941.3

2.10. Plasmide

Zur Synthese und Vervielfältigung der Proteine wurden folgende Plasmide/DNA-Konstrukte verwendet.

Tabelle 10: verwendete Plasmide

Name	Vektor	Insert/Tag	Quelle
GST	pGEX4T-1	GST	GE Healthcare, München, DE
GST Dsc 1a ICS	pGEX4T-1	GST	Marit Mäulen AG Tikkanen
GST Dsc 2a ICS	pGEX4T-1	GST	Marit Mäulen AG Tikkanen
GST Dsc 3a ICS	pGEX4T-1	GST	Marit Mäulen AG Tikkanen

GST Dsc 1a CPD (NM_024421.2)	pGEX4T-1	h-Dsc1a (2411-2947)/ GST	Völlner 2016
GST Dsc 2a CPD (NM_024422.3)	pGEX4T-1	h-Dsc2a (2606-3160)/ GST	Völlner 2016
GST Dsc 3a CPD (NM_001941.3)	pGEX4T-1	h-Dsc3a (2310-2846)/ GST	Völlner 2016
pEGFP-N1	pEGFP-N1	EGFP	Clontech, Mountain View (CA), US
R1-WT-pEGFP	pEGFP-N1	Ratten Reggie-1 EGFP- Fusionsprotein	Neumann-Giesen 2005
R1-Y158F-pEGFP	pEGFP-N1	Tyrosin 158 mutiert zu Phenylalanin	Neumann-Giesen 2005
R1-Y163F-pEGFP	pEGFP-N1	Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	Neumann-Giesen 2005
R1-7xYF-pEGFP	pEGFP-N1	Tyrosin 24, 124, 158, 163, 241, 348 und 351 mutiert zu Phenylalanin	Neumann-Giesen 2005

2.11. Software

2018 Microsoft Word für Mac

2008-2018 Mendeley Desktop, Version 1.19.3

2005-2018 Pages für Mac, Version 7.1

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Vervielfältigung der DNA-Abschnitte für die Fusionsproteine mittels PCR

Für die geplanten Versuche sollten neue GST-Fusionsproteine hergestellt werden, welche lediglich die zytoplasmatische ICS-Sequenz der Desmocolline aufweisen. Als Matrize verwendete man zunächst bereits existierende Plasmide, welche die gesamte Sequenz des zytoplasmatischen Teils der langen Desmocollin Isoformen enthielten (GST-hDsc-1a/2a/3a-CPD). Diese lagen in der AG Tikkanen bereits kloniert vor.

Um eine Vervielfältigung gezielt dieser Proteinsequenzen zu generieren, führte man eine „Polymerase-chain-reaction“ (PCR) durch. Diese ermöglicht es einem, DNA-Matrizen *in vitro* zu vermehren. Da der Prozess beliebig oft wiederholt werden kann, erhält man eine exponentielle Vermehrung der Gensequenzen. Dabei wird der Verlauf eines Durchgangs in drei Phasen eingeteilt. Zunächst erfolgt die initiale Denaturierungsphase bei welcher DNA-Polymerase, DNA-Matrize, zwei Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's) zusammengegeben und für 2 min bei 94°C einmalig erhitzt werden. Daraufhin beginnt ein Zyklus, welcher mit einem weiteren Denaturierungsschritt startet. Dieser erfolgt für 20 s bei 98°C. Die sogenannte Annealingphase schließt sich mit 30 s bei 69°C an, woraufhin die Synthese bei 72°C für 1 min folgt. Nach einer zyklischen Wiederholung dieser drei Schritte von 35 Mal, erfolgt die letzte Phase. In der Elongationsphase wird nochmals eine Temperatur von 72°C für 10 min erreicht.

Tabelle 11: Ansätze für PCR

Ansatz je PCR (100 µl)	73 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser 20 µl 5x Q5 reaction Puffer MgCl ₂ 2 µl dNTP's zu 0,2 mM (10 mM Stock wird 1/50 verdünnt) 2 µl Matrizen-DNA (10 ng) 1 µl Polymerase Q5 (2000 Units/ml) Beide Primer mit je 1 µl
-------------------------------	---

3.1.2. Aufreinigung und Extraktion

Um die hergestellten DNA-Segmente zu überprüfen, wurden Proben dieser mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei wurde ein 1%-iges Agarosegel und 0,5x TAE als Elektrophoresepuffer verwendet. Das durch eine angelegte Spannung entstehende elektrische Feld, führt zu unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten, je nach Größe der DNA-Fragmente. Es wurden je 5 µl jeder zuvor vervielfältigten DNA verwendet. Diese versetzte man mit Ethidiumbromid und Ladepuffer, um sie im Agarosegel aufzutrennen.

Nachdem mithilfe einer UV-Belichtung die gewünschten Banden anhand des aufgetragenen Größen-Standards identifiziert werden konnten, wurde der übrige Ansatz der DNA-Segmente mit Hilfe des Purification Kit von Roche nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.1.3. Restriktionsverdau

Um die nun extrahierten DNA-Segmente mit dem Vektor vereinen zu können, führte man einen Restriktionsverdau durch. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme werden die Plasmide versetzt geschnitten und es entstehen überhängende Enden, sogenannte *sticky ends*. Ein Ansatz von je 30 µl jeder hergestellten DNA wurde mit 20 µl Wasser, 6 µl CutSmart-Puffer als auch 2 µl (20 U) der Restriktionsenzyme angesetzt und über Nacht bei 37°C verwahrt. Als Restriktionsenzyme verwendete man in sämtlichen Ansätzen EcoRI und BamHI.

Anschließend erfolgte die Auftrennung aller Ansätze auf einem Agarosegel und man extrahierte die Fragmente mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits von Macherey-Nagel aus dem Gel. Dabei ging man nach Herstellerangaben vor.

3.1.4. Ligation

Die Ligation der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte mit 4 µl des geschnittenen, dephosphorylierten Vektors (pGEX-4T1). Hinzu gab man 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl der T4 DNA-Ligase (1000 Units/ml), sowie 4 µl der jeweiligen aufgereinigten Produkte des Restriktionsverdaues. Man wählte eine Inkubationszeit von 12 h bei 16°C.

3.1.5. Transformation

Zunächst sollte eine Transformation der Plasmide in den E. coli Stamm XL1-Blue erfolgen. Dieser Schritt erfolgte für die Überprüfung der Klonierung und Plasmidamplifikation.

Nachdem die Ligation abgeschlossen war, verwendete man 10 µl dieses Ansatzes und versetzte ihn mit 50 µl gekühlten E. coli XL1-Blue-Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde das Gemisch für 90 s auf 45°C erhitzt und anschließend wieder in Eis heruntergekühlt. Nachdem dieser Hitzeschock erfolgt war, gab man 1 ml LB-Medium mit 0,8% Glukose (SOC-) Medium hinzu und beließ die Suspension für 45 min bei 37°C auf 220 rpm im Bakterienschüttler. Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, sähte man diese auf LB-Agarplatten aus und ließ sie über Nacht bei 37°C wachsen. Zusätzlich versetzte man die Agarplatten mit einem Antibiotikum, um ungewünschte Bakterienvermehrung zu verhindern.

Auf dieselbe Weise erfolgte die spätere Transformation der Plasmide in den E. coli Stamm Rosetta, in welchem die Proteinexpression ablief (siehe 3.2.1).

3.1.6. Plasmidaufreinigung (Mini/Midi)

Um das Mini Plasmid DNA purification Kit von Macherey-Nagel nutzen zu können, musste man zunächst eine Einzelkolonie der ausgesähten Platten in 5 ml LB-Medium mit zugesetztem Antibiotikum über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubieren lassen. Von der so angewachsenen Bakterienkultur entnahm man 2 ml und zentrifugierte diese für 5 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm. In einem zweiten Zentrifugationsschritt verwarf man den Überstand, gab zum entstandenen Pellet erneut 2 ml der Bakterienkultur und zentrifugierte erneut für 5 min bei 13000 rpm. Die nun entstandenen Pellets konnten mit dem Mini Plasmid DNA purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt werden. Abschließend erfolgt eine photometrische Konzentrationsmessung, um den DNA-Gehalt der unterschiedlichen Proben zu bestimmen.

Um zu gewährleisten, dass die hergestellten Plasmide die erwünschte Dsc-Sequenz enthielten und keine Mutationen entstanden waren, führte man eine Sequenzierung durch. Die kontrollierten Klone konnten anschließend mit dem Midi Plasmid DNA purification Kit von Macherey-Nagel in größerem Umfang aufgereinigt werden.

Hierbei impfte man aus der zunächst hergestellten 5 ml Kultur eine größere Kultur von 125 ml LB-Medium an. Diese wuchs erneut über Nacht bei 37°C und 220 rpm, um am nächsten Tag die Plasmidaufreinigung im Midi-Volumen nach Herstellerangaben durchführen zu können.

3.2. Biochemische Methoden

3.2.1. Proteinexpression und Aufreinigung der Fusionsproteine

Die Expression der Fusionsproteine fand mithilfe von E. coli Stamm Rosetta statt. Dazu ließ man die bereits transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten wachsen und setzte aus einzelnen Kolonien 5 ml Kulturen an. Diese inkubierten über Nacht bei 220 rpm und 37°C in LB-Medium. Wiederum 2 ml der gewachsenen Kultur nutzte man um 200 ml LB-Medium + Ampicillin anzupflanzen.

Nach 1 h wurde die OD₆₀₀ (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm) regelmäßig gemessen, um den Zeitpunkt für eine optimale Induktionsdichte zu erreichen. Bei einem gemessenen Wert zwischen 0,4-0,6 induzierte man alle Kulturen mit IPTG (0,15 mM) für circa 5 h bei 37°C und 220 rpm.

Um eine Kontrolle der IPTG-Induktion an den Bakterien nachweisen zu können, entnahm man jeweils 1 ml jeder Kultur sowohl vor der Zugabe von IPTG, als auch nach der Inkubationszeit von 5 h. Diese Probe zentrifugierte man zunächst und löste das Pellet später in Loading Buffer. 10 µl jeder Probe wurden auf ein Gel aufgetragen und mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, um die Expression der gewünschten Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Färbung beurteilen zu können.

Im Folgenden zentrifugierte man die Kulturen bei 4°C und 5000 rpm für 10 min ab und wusch die Pellets einmal mit kaltem PBS. Zur Resuspension der Pellets wurden je Probe 4 ml GST-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitoren genutzt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des GST-Lysis-Buffer mit Proteaseinhibitoren

GST-Lysis-Buffer mit Proteaseinhibitoren
Frisch hinzugefügt:
1,5 µM Aprotinin
23 µM Leupeptin
1,5 µM Pepstatin A
1 mM DTT
1 mM PMSF

Um die Resuspension zu beschleunigen, verwendete man Ultraschall mit einer Amplitude von 95% für 2 x 30 s. Nachdem 120 µl Lysozym je Probe hinzugegeben wurden und diese für 15-30 min auf Eis inkubiert hatten, wiederholte sich dieser Vorgang ein zweites Mal. Das Abzentrifugieren der Suspension fand bei 16.000 rpm und 4°C für

30 min statt, anschließend wurde der Überstand je Probe gesammelt und gewaschene Glutathion-Sepharose-Beads hinzugegeben (ein Bett-Volumen von 200 µl/Probe).

Die geplanten Fusionsproteine konstruierte man mit einem Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag. Da dieser Tag eine hohe Affinität zu Glutathion besitzt, ermöglicht er eine Bindung der Glutathion-Sepharose-Beads und somit eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.

Nachdem die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsrad gebunden wurden, zentrifugierte man die Beads für 2 min bei 2000 rpm und 4°C ab. Im Anschluss wusch man diese drei Mal mit PBS + 0,1% Triton X100 und drei Mal mit reinem PBS. Zwischenzeitlich zentrifugierte man erneut für 2 min (2000 rpm/ 4°C). Zur Lagerung bei -20°C wurden die Beads mit zwei Bettvolumen PBS + 10% Glycerol resuspendiert und daraufhin aliquotiert.

Um den Gehalt der Fusionsproteine quantifizieren zu können, trug man von jeder Probe jeweils 5, 10 und 20 µl auf ein 10%iges Trenngel auf. Als Vergleich dienten BSA-Standards die mit einer Menge von 1, 2 und 5 µg aufgetragen wurden. Die damit durchgeführte SDS-PAGE wurde mittels einer Färbung mit Coomassie brilliant blue Färb- & Entfärbelösung beurteilt, womit die Menge des enthaltenen jeweiligen Fusionsproteins quantifiziert werden konnte.

Tabelle 13: Hergestellte GST-Fusionsproteine

Hergestellte GST-Fusionsproteine
GST
GST-hDsc-1a-CPD
GST-hDsc-1a-ICS
GST-hDsc-2a-CPD
GST-hDsc-2a-ICS
GST-hDsc-3a-CPD
GST-hDsc-3a-ICS

3.2.2. Indirekter GST-Pulldown

In ersten Versuchen sollten mit den hergestellten Fusionsproteinen Pulldown-Assays durchgeführt werden. Hierbei wurden die GST-getaggen Fusionsproteine mit einem Zelllysats zusammengebracht, um mögliche Interaktionen mit Bestandteilen des Lysats herbeizuführen. In diesem Fall bezog sich die Fragestellung auf die Flotilline. Da die Fusionsproteine über den GST-Tag an die Sepharose beads gebunden wurden, ist nach

ausreichender Inkubationszeit mit dem Lysat wiederum eine Trennung der Fusionsproteine und aller ungebundenen Lysatbestandteile möglich. Um nun detektieren zu können, welche Proteine des Lysats eine Bindung zu den Fusionsproteinen eingegangen sind, sollte im Anschluss ein Western Blot erfolgen.

Geerntete HeLa-Zellen wurden mit 4,5 ml CO-IP Puffer, 500 µl NOG und 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail für mindestens 30 min auf Eis lysiert, wobei zwischenzeitlich gevortext wurde. Im Anschluss zentrifugierte man das Lysat für 12 min bei 15000 rpm und behielt den Überstand, welcher nun das Lysat darstellt.

300 µl der Pansorbin Beads wurden drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen und daraufhin in 300 µl CO-IP Puffer resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden jetzt zum Lysat hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nachdem man wiederum für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert hatte, nahm man den Überstand ab und verwarf das Pellet. Der Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt, wobei beim letzten Mal bei 15000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde.

Je Pulldown wurde eine Fusionsprotein-Menge von 5 µg gebunden an GST-Beads verwendet, welche man nun mit 100 µl 10% BSA versetzte und 5-10 min auf Eis stehen ließ. Im Anschluss füllte man die vorbereiteten Fusionsproteine mit 900 µl des Lysats auf. Die Proben wurden nun über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsrad belassen.

Am nächsten Tag wusch man die GST-Beads fünf Mal mit jeweils 1 ml CO-IP Puffer ohne NOG, wobei die Proben dazwischen bei 12000 rpm für 3 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde dabei lediglich mit einer *Hamilton Syringe* abgenommen, um keine Beads zu verlieren. Zum Aufrag auf das Gel wurden die Proben zuvor in 20 µl 2 x LB + DTT bei 94°C für 4 min gekocht.

3.2.3. Co-Immunpräzipitation

Da mittels eines GST-Pulldowns lediglich eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob Interaktionen zwischen zwei Proteinen prinzipiell möglich sind, sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden. Eine Co-Immunpräzipitation (CO-IP) ermöglicht eine Aussage darüber, ob Bindungen von zwei Proteinen bereits innerhalb der Zelle vorlagen. Zur Erstellung der Lysate verwendete man bei diesem Versuch HaCaT-Zellen. Die Lyse des Zellpellets erfolgte ähnlich wie beim GST-Pulldown. Zunächst resuspendierte man das Pellet in 4,5 ml CO-IP Puffer mit zugesetzten 500 µl NOG sowie 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail und beließ die Lyse für 30 min auf Eis. Während dieser Inkubation wurden je Ansatz (6 Stück) 30 µl Protein A magnetische Beads zwei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Im Magneten wurde sämtliche Flüssigkeit abpipettiert und die magnetischen Beads je Ansatz in 90 µl CO-IP und 10 µl 10%-BSA resuspendiert.

Nun gab man in zwei Ansätze je 4 µl polyklonale anti Flotillin-1 Antikörper (AK), in zwei Ansätze je 4 µl polyklonale anti Flotillin-2 AK und als Kontrolle in zwei Ansätze je 4 µl eines polyklonalen Antikörpers, welcher nicht an Flotilline bindet. Die Antikörperkopplung an Protein A erfolgte für 2-3 h auf einem Drehrad.

Währenddessen wurde das Lysat bei 15000 rpm für 12 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen, welcher nun das Lysat darstellt. Je Lysat wurden 300 µl Pansorbin Beads benötigt, welche zunächst zwei Mal in je 1 ml PBS gewaschen und bei 5000 rpm für 90 s zentrifugiert wurden. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte eine Resuspension in 150 µl CO-IP Puffer.

Man gab nun zur Reinigung 50 µl der gewaschenen Pansorbin Beads zum Lysat und ließ dieses Gemisch 15 min auf Eis inkubieren, bevor man bei 15000 rpm für 2 min abzentrifugierte. Der Vorgang wiederholte sich noch zweites Mal, und abschließend zentrifugierte man für 10 min. Bevor das Lysat nun zu den Antikörper-gekoppelten Beads gegeben werden konnte, mussten diese noch zwei Mal mit je 1 ml CO-IP Puffer gewaschen werden. Abschließend entnahm man im Magneten sämtliche Flüssigkeit und gab pro Ansatz 50 µl Lysepuffer hinzu.

Im letzten Schritt wurden je IP 900 µl des Lysats und 100 µl 10% BSA hinzugegeben und die gekoppelten Beads darin über Nacht bei 4°C rotieren lassen. Ähnlich dem GST-Pulldown wurden die Proben am nächsten Tag vier Mal mit je 1 ml CO-IP Puffer gewaschen, allerdings können die Protein-A-Beads hier mit Hilfe eines Magneten an den Rand gezogen werden. Abschließend wurde sämtliche Flüssigkeit abpipettiert und jede Probe mit 35 µl 2xLB + DTT für 4 min bei 94°C gekocht.

Der Überstand wurde nun ohne die Beads in das Gel geladen und es folgte eine immunbiochemische Analyse mit SDS-PAGE und Western Blot.

3.2.4. SDS-PAGE

Um die Menge der an die Fusionsproteine gebundenen Proteine analysieren zu können, wurden die Proben mit Hilfe einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierbei verwendete man ein 10%-iges Trenngel, an welches eine Spannung von 25 mA angelegt wurde, sodass die Proteine sich entsprechend ihrer Ladung in dem elektrischen Feld fortbewegen. Je nach Ladung und Molekulargewicht legen die Proteine dabei unterschiedliche Strecken innerhalb des Gels zurück. Die Spannung wurde für circa 1,5 h angelegt, sodass eine maximale Trennung erfolgen konnte. Als Marker diente der BioRad Precision Plus Protein Standard.

Tabelle 14: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel

Sammelgel (4%)	4,2 mM Tris (pH 6,8) 0,1% SDS 4% Acrylamid 0,1% TEMED
Trenngel (10%)	0,5 % APS 12,5 mM Tris (pH 8,0) 0,1% SDS 10% Acrylamid 0,1% TEMED

3.2.5. Western Blot

Anschließend führte man per Nassblottverfahren den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran durch. Dabei wird die Membran auf dem Polyacrylamidgel platziert und dieses nun zwischen Filterpapier und Schaumstoff in die dafür vorgesehenen Schlitten geklemmt. Eingelegt in Transferpuffer wurde eine Stromstärke von 400 mA verwendet. Der Vorgang erfolgte circa 1 h bzw. 1,5 h in der BioRad Blotkammer. Die senkrecht zur Membran/ zum Gel gerichtete Spannung ermöglicht die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf die Membran. Die folgende Färbung der Membran mit Ponceau S wurde durchgeführt, um den Transfer zu kontrollieren. Die Membran wurde mit Wasser gewaschen und fotografiert. Die Entfärbung erfolgte wieder mit TBST. Die Detektion des Western Blots erfolgte durch Antikörperreaktionen. Hierbei bindet der erste aufgetragene Antikörper an das passende Antigen auf der Membran (beispielsweise Flotillin-1), woraufhin der zweite Antikörper an den ersten bindet und seinerseits durch Lumineszenz sichtbar gemacht werden kann. Dazu ist zunächst eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im Hintergrund notwendig, was mithilfe von 5% Milchpulver in TBST für 30 min durchgeführt wurde. Den Primärantikörper trug man nun über Nacht auf und verwahrte das Gefäß bei 4°C im Kühlschrank. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Waschvorgang von 3x5 min in TBST, woraufhin man die Membran 60 min mit dem Sekundärantikörper inkubierte.

Daraufhin wusch man die Membran 3x10 min sowie 2x15 min in TBST, bevor nun mit der ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence) der HRP-gekoppelte (Horseradish Peroxidase) Sekundärantikörper detektiert wurde. Hierzu verwendete man das

SuperSignal West als konzentriertes ECL in einem Verhältnis von zweifach Femto zu einfach Nano. Alternativ konnte das wesentlich schwächere hauseigene ECL (Tabelle 16) bei starken Signalen angewendet werden. Nach einer Inkubation von 3 min erfolgte die Detektion der Membran mit Hilfe eines Röntgenfilms.

Tabelle 15: Rezept ECL-Detektionslösung

ECL Detektionslösung	100 mM Tris (pH 8,5)
	1250 μ M Luminol
	200 μ M p-Coumarinsäure
	1% H ₂ O ₂ (frisch hinzugefügt)

3.2.6. Stripping

Sollte ein weiterer Primärantikörper auf der Membran aufgetragen werden, so musste zunächst ein Stripping mit 0,1 M NaOH für 15 min durchgeführt werden. Durch diesen Vorgang lösen sich die Bindungen des ersten Antikörpers, sodass eine erneute Detektion der weiteren Antigene möglich ist. Es folgte erneut ein Blocken des unspezifischen Hintergrunds mit 5% Milchpulver in TBST.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien

In den geplanten Versuchen entschied man sich für drei verschiedene Zelllinien. Aus den humanen Cervix-Adenokarzinom-Zellen (HeLa) stellte man Zelllysate für Reaktionen im Pulldown-Assay her. Die embryonalen Nieren-Zellen (HEK) verwendete man für die Transfektion der mutierten Flotillin-2 Plasmid-DNA. Die Lysate für die Co-Immunpräzipitation wurden mit HaCaT-Zellen erstellt.

Sowohl die HeLa, HaCaT, als auch die HEK-Zellen wurden in T25 Kulturflaschen kultiviert, wobei das Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem Glucose-Anteil von 4,5 g/l genutzt wurde. Diesem setzte man 10% Fötale Kälberserum und zur Vermeidung von Kontaminationen 100 μ g/ml Penicillin sowie Streptomycin hinzu. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 8% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit.

Bei knapp 100% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu saugte man zunächst das Medium ab und wusch die Zellen mit 1xPBS. Anschließend trypsinisierte man mit 500 μ l, wozu die Zellen 2-3 min bei 37°C im Brutschrank verblieben. Zur Resuspension

wurden wieder 2 ml DMEM verwendet und mittels einer Pasteur-Pipette auf- und abpipettiert. 200 µl der resuspendierten Zellen wurden nun in eine neue Kulturflasche mit 5 ml DMEM überführt. Die restliche Suspension teilte man auf zwei 10 cm-Schalen auf und erntete diese bei 100% Konfluenz, um Lysate herzustellen.

3.3.2. Transfektion der HEK-Zellen

Zur Transfektion sähte man die Zellen zunächst auf 12 wells aus und ließ diese über Nacht wachsen. Bevor die Transfektion der einzelnen Wells durchgeführt wurde, wechselte man am nächsten Tag das Medium. Man gab je Well 1 ml DMEM^{+/+} hinzu.

Je Well das transfiziert werden sollte, bereitete man zwei Eppendorf-Gefäße vor. Beide enthielten 100 µl DMEM^{-/-}, jeweils eins von beiden 3 µl MACSFectin oder 0,5 µg DNA. Die beiden Ansätze wurden zusammenpipettiert und mittels auf- und abpipettieren rasch durchmischt, um im Anschluss 20 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. 4-6 h nachdem die Ansätze auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wurden, beendete man die Inkubation durch Mediumwechsel und kultivierte die Zellen wieder über Nacht in serumhaltigem Medium bei 37°C. Die Wells wurden anschließend am folgenden Tag auf 6 cm-Schalen ausgesät.

Es wurden jeweils drei Mutanten von Flotillin-2 transfiziert, sowie der Wildtyp. Als Mutanten wählte man R1-Y158F, R1-Y163F als auch R1-7xYF.

3.3.3. Stimulation der Flot2-KO-HEK-Zellen

Zunächst wurden je Mutant zwei Wells transfiziert, wie oben beschrieben, um daraus zwei 6 cm-Schalen aussäen zu können. Nach einigen Tagen, in denen die Zellen lediglich wachsen konnten, tauschte man das Medium aus. Zur Stimulierung verwendete man zu 80-100% konfluente HEK-Zellen. Die Zellen wurden nun über Nacht (circa 16 h) in serumfreiem Medium gehalten, um eine Ausgangssituation zu schaffen, in der möglichst viele inaktive Wachstumsfaktorrezeptoren an der Membran vorhanden sind.

Am nächsten Tag fuhr man fort, indem man jeweils eine Schale des Mutanten/Wildtyps mit einem Medium (DMEM^{-/-}) stimulierte, dem EGF in einer Konzentration von 100 ng/µl zugesetzt war. Bevor man die Schalen zügig erntete, verblieben diese für 10 min im Wärmeschrank. Die Lyse wurde anschließend wie oben beschrieben vollzogen, allerdings verwendete man zusätzlich Vanadat und NaF als Phosphataseinhibitoren.

4. Ergebnisse

4.1. Erstellung der GST-Fusionsproteine

Die Intention dieser Arbeit war es, die Interaktionsstelle von Desmocollinen und Flotillinen näher zu charakterisieren. In den letzten Jahren konnten immer weitere Erkenntnisse im Bindungsverhalten zwischen Flotillinen und zellulären Adhäsionsproteinen gewonnen werden. Ursprung der Idee dieser Versuche waren Arbeiten der letzten Jahre, in denen man nachwies, dass Flotilline mit Proteinen der Adherens Junction, aber auch mit desmosomalen Proteinen in humanen epithelialen Zellen kolokalisieren. So zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass Plakoglobin (auch γ -Catenin), welches sowohl Bestandteil von Adherens junctions als auch Desmosomen ist, *in vitro* eine direkte Bindung zu Flotillin-2 eingeht (Kurrle et al., 2013). Anschließend beschäftigte sich Frauke Völlner in einem ihrer Versuche eingehender mit der Frage, in welcher Verbindung Flotilline zu den Desmocollinen stehen (Völlner, 2016). Sie verglich im indirekten GST-Pulldown das Bindungsverhalten der Desmogleine an Flotillinen mit den beiden Isoformen der Desmocolline an Flotillinen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass Flotillin *in vitro* keine Bindung mit der kürzeren Dsc-b-Isoform eingeht.

Die Desmocolline können durch alternatives Splicen in zwei verschiedenen Isoformen vorliegen. Der Unterschied zwischen längerer und kürzerer Isoform liegt darin, dass die kürzere Isoform die ICS-Sequenz lediglich in trunkierter Länge aufweist (siehe Abbildung 3). Diese Sequenz ist in voller Länge im intrazellulären Teil der Desmogleine und der längeren Dsc-a-Isoform zu finden und war bisher nur als Bindungsstelle für Plakoglobin bekannt. Nun ließen diese Ergebnisse auf die Hypothese schließen, dass die ICS-Sequenz möglicherweise eine spezifische Domäne darstellt, welche ebenfalls die Bindungssequenz für Flotilline aufweist.

Um gezielt diese Sequenz in ihrem Bindungsverhalten untersuchen zu können, schuf ich Fusionsproteine, in welchen lediglich die ICS-Sequenz der jeweiligen Desmocollin-a-Isoform mit GST gekoppelt wurde (siehe Abbildung 6).

4.1.1. Klonierung der Fusionsprotein-Vektoren

Um die verkürzten intrazellulären Sequenzen der Desmocolline herstellen zu können, nutzte ich in der AG bereits vorhandene Vektoren, welche die gesamte zytoplasmatische Domäne der Desmocolline enthielten. Ich entschied mich für ein GST-gekoppeltes Protein, welches lediglich die ICS-Sequenz der Desmocollin-a-Isoform enthält. Um hierbei tatsächlich eine verwendbare Aussage zu erhalten, ob diese Sequenz allein für eine Bindung der Flotilline genügt, wurde die Domäne des „intrazellulären Ankers“ (IA)

nicht miteinbezogen. So gelangte man letztendlich zu der Sequenz GST-hDsc-1/-2/-3-ICS, welche ich im ersten Schritt aus den bereits vorhandenen Vektoren pGEX-GST-hDsc-1/-2/-3-CPD mit Hilfe der PCR amplifizierte. Anschließend erfolgte eine Vorbehandlung in Form eines Restriktionsverdau, welcher mit den Enzymen BamHI und EcoRI vollzogen wurde. Dies erfolgte sowohl mit dem pGEX4T-1 Vektor, als auch mit den klonierten Sequenzen, um nun die Ligation in den Vektor vollziehen zu können. Im Anschluss erfolgte zur Überprüfung der Einzelklone und Plasmidamplifikation eine Transformation des Ligationsansatzes in den E. coli Stamm XL-1 Blue. Nach einem Hitzeschock erfolgte der Verdau mit SOC-Medium. Anschließend sähte ich einzelne Kolonien, um mit einer dieser Kolonien weiterarbeiten zu können.

Mit der Amplifikation wurden die Plasmide vermehrt und anschließend mittels DNA-Präparation aufgereinigt. Abschließend sequenzierte ich die hergestellten Plasmide, um die erfolgreiche Durchführung zu kontrollieren. Die korrekt hergestellten Plasmide (GST-hDsc-1-ICS, GST-hDsc-2-ICS und GST-hDsc-3-ICS) konnten nun für weitere Versuchsschritte verwendet werden.

NP_001933.2	683	ECREG	GLNMNFMESYFCQKAYAYADEDEGRPSNDCLLIYDIEGV---G	
DSG1				
NP_001934.2	756	DMAGA [5]	ALNEEF LRNYFTDKAASYTEEDENHTAKDCLLVYSQEETe---	
DSG2				
NP_001935.2	778	DYADG	AISMNFLDSYFSQKAFACAEEDDQGEANDCLLIYDNEGAdatG	
DSG3				
NP_077739.1	822	-----	-----FTQPRLGKQVYLCGQDEEHKHCEDYVCSYNYEGK---G	
DSC1a				
NP_077740.1	829	-----	-----FTQPRLGKQVYLCNQDENHKKHAQDYVLTNYEGR---G	
DSC2a				
NP_001932.2	824	-----	-----FTQPRLGKQLHRCNQEDRMPSQDYVLTNYEGR---G	
DSC3a				
NP_001933.2	727	---	GSPAGSVGCCSFIAGEDLDDSFLDTLGPKFKKLADISLG--KES	767
DSG1				
NP_001934.2	805	e---	SLNASIGCCSFIEGELDDRFLLDDLGLKFKTLAEVCLGQkIDI	847
DSG2				
NP_001935.2	822	dat	GSPVGSVGCSSFIADDLDDSFLDLGLPKFKKLAEISLG--VDG	865
DSG3				
NP_077739.1	856	---	GSLAGSVGCCSDRQEEGLEFLDHLEPKFRTLAKTCIKK----	894
DSC1a				
NP_077740.1	863	---	GSVAGSVGCCSERQEEDGLEFLDNLEPKFRTLAEACMKR----	901
DSC2a				
NP_001932.2	858	---	GSPAGSVGCCSEKQEEDGLDFLNNLEPKFITLAEACTKR----	896
DSC3a				

Abbildung 6: Abfolge der ICS-Sequenz von desmosomalen Cadherinen

Darstellung der für die ausgewählten Fusionsproteine verwendeten ICS-Sequenz der desmosomalen Cadherine; Erstellung der Gensequenzen mit Hilfe des COBALT Constraint-basend Multiple Alignment Tool von NCBI: Desmoglein-1, -2, -3 als auch Desmocollin-1a, -2a und -3a wurden miteinander abgeglichen. In rot wird die in allen enthaltene ICS-Sequenz dargestellt, der türkise Abschnitt markiert hierbei die Sequenzen, welche für die Fusionsproteine von Desmocollin-1a, -2a und 3a verwendet wurden. Blaue Buchstaben stellen weniger konservierte Bereiche dar.

4.1.2. Proteinexpression in E. coli Rosetta

Die Fusionsproteine sollten für *in vitro* Interaktionsanalysen verwendet werden. Geplant war die Durchführung in Form eines indirekten Pulldowns, um das Bindungsverhalten von Flotillin-1 und Flotillin-2 beurteilen zu können. Dabei sollte die ICS-Sequenz der Desmocolline mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne der Desmocolline verglichen werden. Für diesen Versuch benötigte man zusätzlich zu den zuvor hergestellten Expressionsplasmiden GST-hDsc-1/-2/-3-ICS auch Plasmide mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne (GST-hDsc-1/-2/-3-CPD). Diese lagen bereits vor, wurden allerdings nach dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben hergestellt. Für die Expression der klonierten Plasmide wurde der Bakterienstamm E. coli Rosetta gewählt. Dazu impfte ich LB-Medium, welches mit 250 µg/ml Ampicillin versetzt war, mit

zuvor gewachsenen Übernacht-Kulturen der transformierten Bakterien an. Eine geeignete Wachstumsdichte wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 erreicht, woraufhin die Bakterienkolonie mit 0,15 mM IPTG induziert wurde. Als Kontrolle entnahm man sowohl vor, als auch nach Induktion, Proben der Kolonie, um in diesen anschließend die Induzierung der Bakterien durch IPTG beurteilen zu können. Dazu trennte man die Proben mittels SDS-PAGE auf und stellte die benötigten Proteine mit einer Coomassie-Färbung dar (siehe Abbildung 7).

Wie hierauf gut zu erkennen ist, rief das Induzieren der Bakterien in allen drei Kulturen ein vermehrtes Vorkommen des jeweiligen Desmocollins hervor. Diese sind bei einem Molekulargewicht von 30 kDa zu finden.

Die Expression der gesamten zytoplasmatischen Domänen erfolgte nach demselben Schema. Auch hier nutzte ich den E. coli Stamm Rosetta und induzierte die Kultur mit 0,15 mM IPTG. Die erfolgreiche Induktion wurde ebenfalls mit Hilfe einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert.

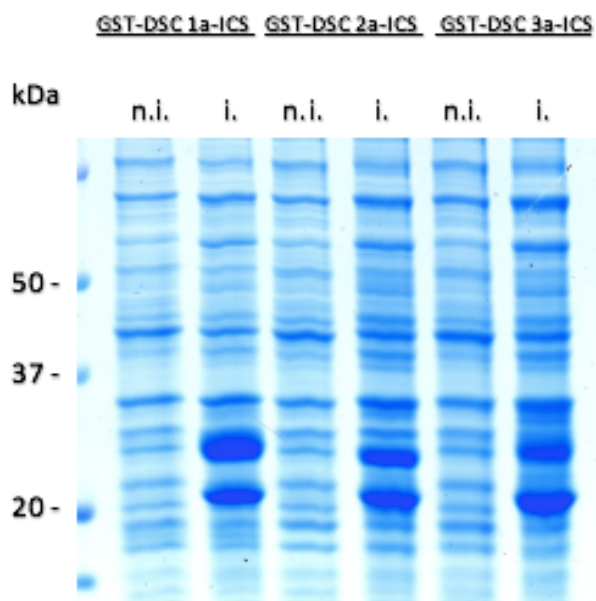


Abbildung 7: Coomassie-Färbung der Proteinexpression vor und nach Induzierung durch IPTG

Coomassie-Färbung der SDS-PAGE als Induktionskontrolle von IPTG: Die durch IPTG induzierte Proteinexpression der Fusionsproteine von E. coli Stamm Rosetta wird durch die verstärkten Banden deutlich. Es wurde je eine Probe vor Induktion (nicht induziert: n.i.) und eine Probe nach Induktion (induziert: i.) geladen. Das Molekulargewicht der Fusionsproteine liegt bei ca. 30 kDa. Gut zu erkennen sind die verstärkten Banden an diesen Stellen in den induzierten Proben.

Im Folgenden fuhr man mit der Fusionsprotein-Aufreinigung fort und koppelte den GST-Tag der Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-Beads, sodass im späteren Pulldown-Assay eine Trennung der an die Beads gekoppelten Fusionsproteine und des Lysats möglich war.

Die Quantifizierung der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von BSA-Standards durch Massenvergleich. Es wurden 5, 10, 15 oder 20 μl der jeweiligen Proben der Fusionsproteine aufgetragen, sodass die Intensität der Banden zur standardisierten BSA-Menge verglichen werden konnte. Letztendlich verwendete man in den folgenden Versuchen eine Menge von 5 μg der Fusionsproteine je Pulldown.

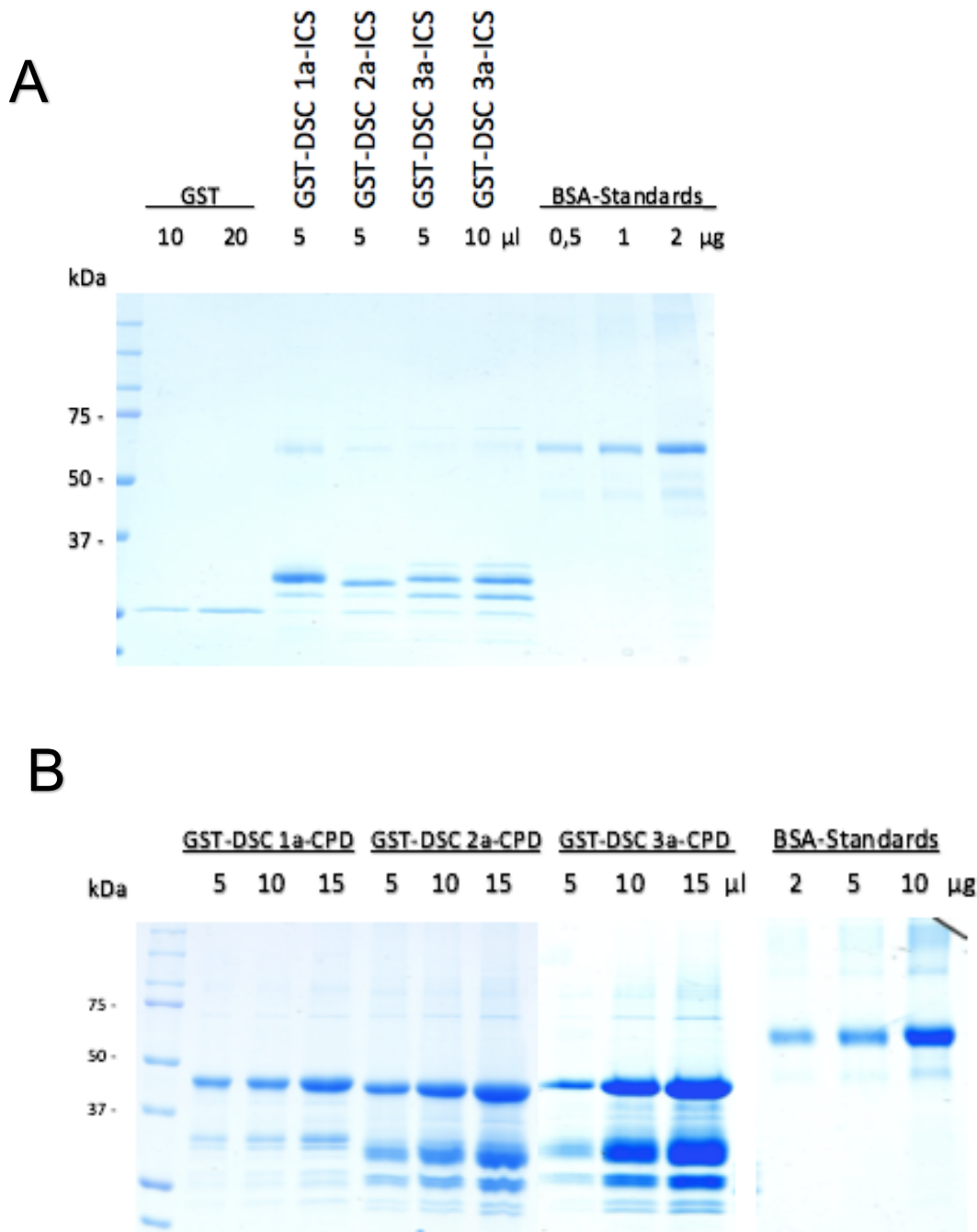


Abbildung 8: Quantifizierung der Fusionsproteine

Die Quantifizierung der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von BSA-Standards durch Intensitätsvergleich. Man trug 5, 10, 15 oder 20 μ l der aufgereinigten Fusionsproteine auf, sodass ein Vergleich zu den standardisierten BSA-Banden möglich war. Nach Rückschluss auf die vorhandene Proteinmenge, verdünnte man jede Fusionsprotein-Suspension auf eine definierte Konzentration, sodass je Pulldown letztendlich eine Menge von je 5 μ g verwendet wurde.

A aufgereinigtes GST zur späteren Negativkontrolle und an GST gekoppelte ICS-Fusionsproteine
B an GST gekoppelte Fusionsproteine der gesamten zytoplasmatischen Domäne (CPD) des entsprechenden Desmocollins

4.2. Bindung von Flotillinen an die ICS-Sequenz

Mit Hilfe eines indirekten GST-Pulldowns untersuchte ich die Bindung von Flotillinen an Fusionsproteinen, welche die gesamte zytoplasmatische Domäne der Desmocolline oder lediglich die ICS-Sequenz der Desmocolline beinhalteten. Hierzu stellte ich gezielt GST-gekoppelte Fusionsproteine her, welche auf mögliche Interaktionen mit Flotillinen in HeLa-Zelllysaten untersucht wurden. Die an Glutathion-Sepharose-Beads gebundenen Fusionsproteine inkubierte ich mit den Zelllysaten über Nacht. Dabei wurde je Probe eine Proteinmenge von 5 µg verwendet. Am nächsten Tag erfolgte die Trennung der Beads mit den entstandenen Proteinkomplexen vom Lysat, die Auftrennung der Proteine via SDS-PAGE, sowie ein Western Blot. Die Ponceau-Färbung gab Aufschluss über die auf der Membran vorhandenen Proteinmengen. Den Western Blot detektierte ich anschließend mit Flotillin-1- (Flot1) und Flotillin-2-(Flot2) Antikörpern. Eine Negativkontrolle erfolgte über das „reine“ GST, was Rückschlüsse darauf zuließ, ob Flotilline unspezifisch an GST binden.

Die Ponceau-Färbung der Fusionsproteine (siehe Abbildung 9 C) sieht gleichmäßig aus. Eine etwas stärkere Färbung ist bei der Probe DSC3a-ICS zu beobachten. Abbildung 9 zeigt deutlich, dass sowohl Flotillin-1 als auch Flotillin-2 an allen Proben mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne wesentlich stärker binden, während die Proben, welche die reine ICS-Sequenz der Desmocolline als Fusionsprotein enthalten, eine sehr schwache bis keine Bande aufweisen. Es ist jedoch anzumerken, dass bei DSC2a-ICS als auch DSC3a-ICS eine Bande zu sehen ist. Diese ist allerdings nur bei Flotillin-2 vorhanden. Somit scheint es Unterschiede zwischen den jeweiligen ICS-Domänen zu geben und es kann nicht pauschal gesagt werden, dass hier keine Bindung stattfinden kann.

Auch die Banden der gesamten zytoplasmatischen Domänen weisen Unterschiede untereinander auf. Flotillin-1 zeigt die stärkste Bindung an DSC2a-CPD, was bei Flotillin-2 ebenfalls der Fall ist. Allerdings ist bei Flotillin-1 und DSC3a-CPD nur eine sehr schwache Bande vorhanden. Diese ist bei Flotillin-2 sehr viel stärker zu sehen und nur geringfügig schwächer als bei DSC2a-CPD. Die Bande bei DSC1a-CPD weist für Flotillin-1 und -2 kaum Unterschiede auf. Die Negativkontrolle in Form von GST in der Spalte außen links, zeigt keine Bindung.

Um eine Bindung von Flotillinen und Desmocollinen zu generieren, scheint die ICS-Sequenz bei *in vitro* Versuchen allein nicht auszureichen. Dass der Bereich der ICS-Sequenz bei der Bindung des Flotillins eine Rolle spielt, wurde bestätigt, jedoch werden vermutlich zusätzlich noch weitere Bereiche der zytoplasmatischen Domäne benötigt.

Zusätzlich ist noch anzumerken, dass allgemein das Signal des Flotillin-2-Antikörpers wesentlich stärker ausgeprägt ist, als das des Flotillin-1-Antikörpers. Das ist hier bereits an der Reaktion des reinen Zell-Lysats in der Bande rechts auffällig.

Die bisherigen Ergebnisse innerhalb der AG Tikkanen deuten darauf hin, dass Flotillin-2 eine wichtigere Rolle bei der Interaktion mit den Desmogleinen spielt. Ein ähnliches Verhalten von Flotillin-2 im Bezug auf Desmocolline ist daher wahrscheinlich. Zusätzlich sprach die Existenz von funktionellen Flotillin-2-Mutanten für die Auswahl von Flotillin-2 für die weiteren Versuchsansätze.

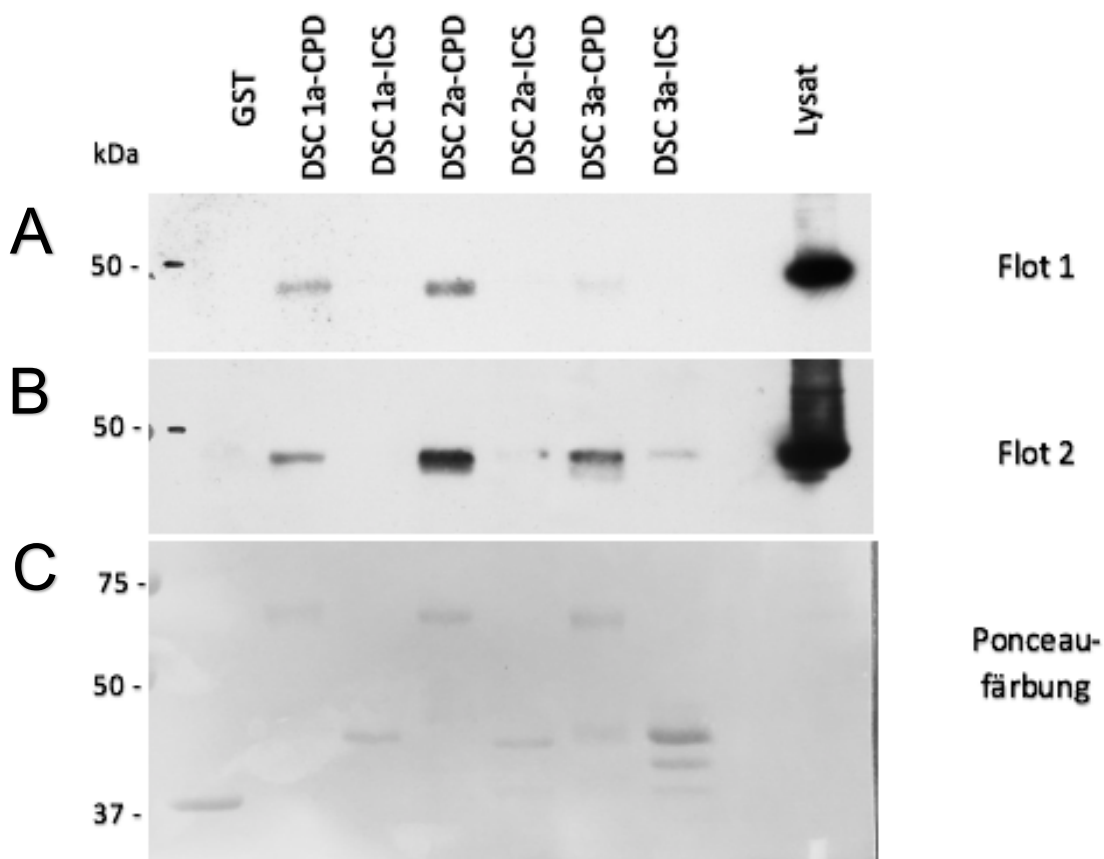


Abbildung 9: Bindung der Flotilline an ICS-Sequenz der Desmocolline

Indirekter GST-Pulldown mit GST-gekoppelten Fusionsproteinen, welche mit HeLa-Zelllysaten inkubiert wurden. Als Fusionsprotein verwendete man die zytoplasmatische Domäne (CPD) der Desmocolline 1a, 2a und 3a. Verglichen wurden diese mit den reinen ICS-Sequenzen der jeweiligen α -Isoform (ICS). Als Negativkontrolle lud man 5 μ g GST, für die Pulldown-Proben verwendete man ebenfalls je 5 μ g des Fusionsproteins. Ganz rechts wurden 30 μ l des Lysats aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte via SDS-PAGE und Western Blot. Anschließend erfolgte die Detektion des Blots (A) mit Flotillin-1-Antikörper (Flot 1) und (B) mit Flotillin-2-Antikörper (Flot 2).

C Im unteren Teil bestätigt die Ponceau-Färbung die Ladung des jeweiligen Fusionsproteins und GST.

4.3. Bindung der Flotillin-Mutanten an Desmocollin-3a

In der AG Tikkanen generierten Monia Amaddii und Carolin Neumann-Giesen in ihren Versuchen verschiedene Flotillin-1 und -2 Mutationen, in welchen diverse Tyrosine durch Phenylalanin ausgetauscht wurden (Amaddii, 2008; Neumann-Giesen et al., 2007). Diese Mutationen resultieren darin, dass Flotilline an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden können. Das Ergebnis dieser Versuche zeigte, dass der Austausch des Tyrosin-Restes 163 in Flotillin-2 einen besonders großen Einfluss hat und dieses nicht mehr von der Plasmamembran endozytiert wird (Neumann-Giesen et al., 2007). Dies gilt auch für die Mutante 7xYF, in der lediglich noch Tyrosin-27 vorhanden ist. Das Tyrosin-27 ist hierbei notwendig, da ein Austausch des Tyrosins an dieser Stelle zur Degradation des Flotillins führt.

Im folgenden Experiment verwendete ich zur Herstellung der Zelllysate nun Flotillin-2-Knockout-HEK-Zellen (Flot2-KO). Diese Zellen enthalten kein endogenes Flotillin-2, da dieses mit Hilfe der Genomeditierung funktionsunfähig gemacht wurde. In dem ich die Flot2-KO-HEK-Zellen mit unterschiedlicher DNA transfizierte, ließen sich Lysate erstellen, in welchen Flotillin-2 mit entsprechenden Mutationen zu finden war.

Tabelle 16: Verwendete Mutationen zur Transfektion

Mutationen	Eigenschaften
R1-WT	Wildtyp von Flotillin-2
R1-Y158F	Tyrosin an Stelle 158 der Aminosäuresequenz wird durch Phenylalanin ausgetauscht
R1-Y163F	Tyrosin an Stelle 163 der Aminosäuresequenz wird durch Phenylalanin ausgetauscht
R1-7xYf	Tyrosine an den Stellen 24, 124, 158, 163, 241, 348 und 351 sind durch Phenylalanin ausgetauscht, lediglich Tyr27 bleibt erhalten (verhindert proteolytischen Abbau von Flotillin-2)

Bezüglich der Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris ist besonders die desmosomale Adhäsion der Keratinozyten hervorzuheben. In Keratinozyten ist Desmocollin-3 am besten exprimiert. Daher entschied ich mich für die zytoplasmatische Domäne des Desmocollin-3a, welches auf seine Bindung untersucht wird.

Die Transfektion der Flot2-KO-HEK-Zellen erfolgte mit den vorhandenen Plasmiden der Flotillin-2 Tyrosin-Mutanten. Dazu nutzte man 3 µl MacsFectin sowie 0,5 µg der Plasmid-DNA. Die Zellen wurden 4-6 h nach Inkubation der Transfektion wieder über Nacht in serumhaltigem Medium kultiviert. Es folgte eine Aussaat auf 6 cm Schalen und die Ernte der Zellen bei 80-100% Konfluenz. Die Pellets konnten nun als Lysate für den Pulldown mit anschließendem Western Blot genutzt werden.

Für diesen indirekten GST-Pulldown verwendete ich lediglich Desmocollin-3a als Fusionsprotein, um die unterschiedlich mutierten Flotilline in ihrer Bindung miteinander vergleichen zu können. Als Negativkontrolle wurde das Wildtyp-Lysat (WT) verwendet, welches mit GST inkubiert wurde. Wie in der obersten Panele von Abbildung 10 zu sehen ist, fand hier keine unspezifische Bindung von Flotillin-2 an GST statt. Auch im Lysat der nicht transfizierten Zellen (NT) war kein Flotillin-2 vorhanden, was die fehlende Bande dementsprechend bestätigt.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, ist bei den Pulldowns mit allen vier Mutanten eine Bande zu sehen, und somit war das DSC3a-CPD in der Lage, in Bindung zu Flotillin-2 zu treten. Jedoch sind zwischen den verschiedenen Mutanten Unterschiede zu beobachten. Die stärksten Banden sind bei den Mutanten Y163F und 7xYF zu sehen, wobei sich die Bande bei der Mutante Y163F als noch prägnanter darstellt.

Die Banden der Mutante Y158F und des transfizierten Wildtyps weisen eine ähnliche Intensität auf. Ihre Bindung ist weitaus schwächer, als die von Y163F und 7xYF.

Wie in der Ponceau-Färbung allerdings auch zu sehen ist, betrug die Menge an Fusionsprotein bei Y158F weniger, als in den übrigen Proben. Dies könnte ein Grund für eine schwächer ausgeprägte Bande sein.

Betrachtet man die Lysate in der untersten Panele von Abbildung 10 und das Signal mit dem Flotillin-2-Antikörper, so lässt sich insgesamt ein gleichmäßiges Bild erkennen. Eine geringfügig schwächeres Signal mit dem Lysat der Y158F Mutante, sowie eine stärkere Bande bei Y163F ist zu bemerken. Dies deutet auf eine stärkere Expression von Y163F hin. Schaut man sich allerdings das Verhältnis der Banden im Pulldown im Vergleich zu den Banden in den Lysaten an, so ist der Unterschied im Pulldown um einiges größer. Dies deutet also auf eine stärkere Bindung der Y163F-Mutante an DSC3a-CPD hin.

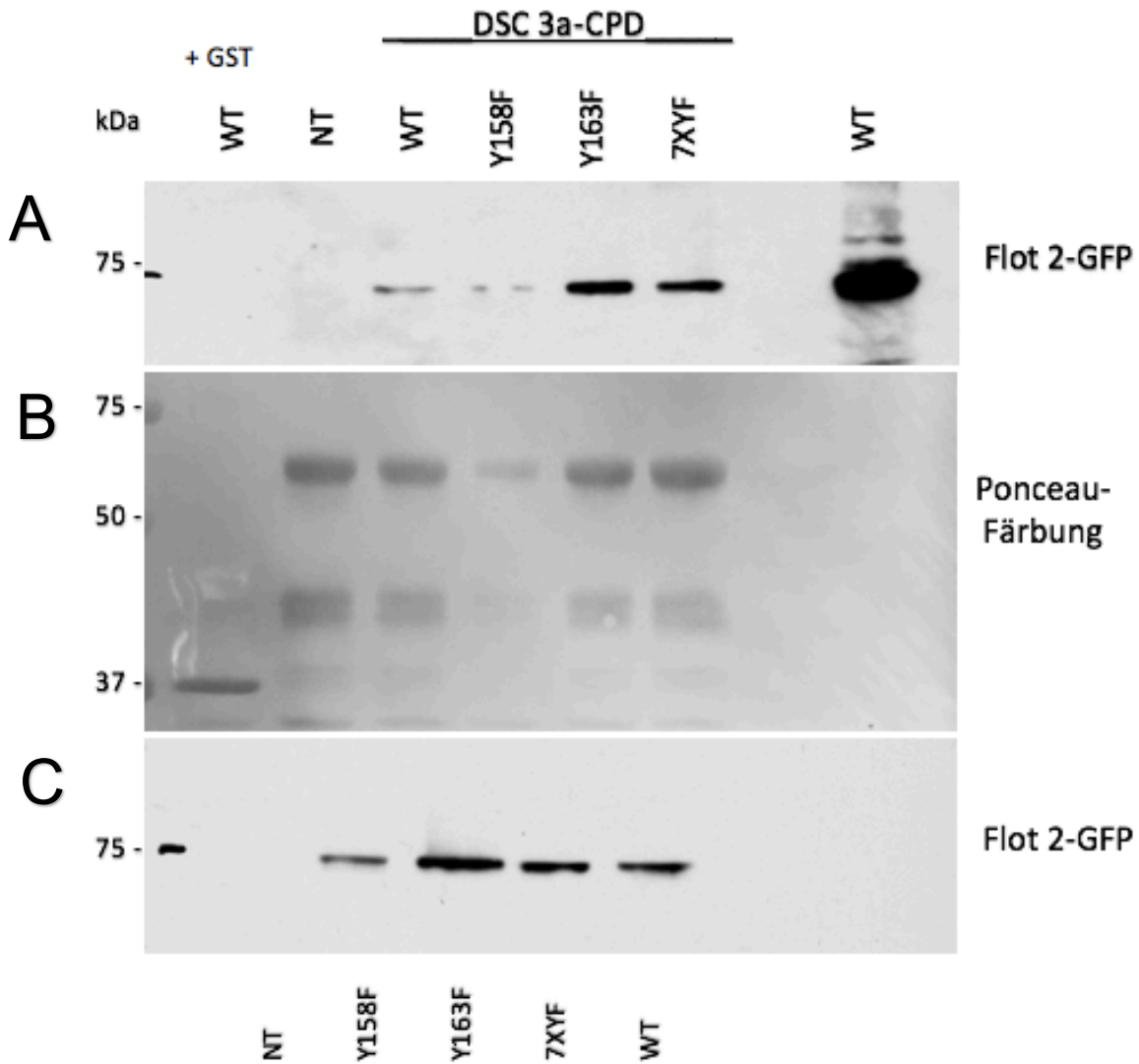


Abbildung 10: Bindung der Flotillin-2-Mutanten an Dsc-3a

Indirekter GST-Pulldown mit GST-Dsc3a-CPD als Fusionsprotein und (A) Lysaten der verschiedenen Flotillin-2-Mutanten. Als Negativkontrolle ganz links verwendete man 5 μ g GST mit 900 μ l transfiziertem Wildtyp-Lysat (WT). Beim Pulldown wurden jeweils 5 μ g des Fusionsproteins verwendet; man trug das Lysat der nicht-transfizierten Zellen (NT) gegen die jeweiligen transfizierten Lysate auf, detektiert mit Anti-Flot2-Antikörper. Ganz rechts 10 μ l des reinen WT-Lysats. B Ponceau-Färbung des Pulldowns C 30 μ l der transfizierten Lysate aufgetragen und mit Flot2-GFP detektiert.

4.4. Einfluss der EGF-induzierten Flotillin-Phosphorylierung auf Bindung an Desmocollin-3

Die Mutation des Flotillins in den Flot2-KO-HEK-Zellen führt, wie oben beschrieben, zum Austausch des jeweiligen Tyrosin-Restes durch Phenylalanin (Neumann-Giesen et al., 2007). Diese Veränderung resultiert in einer Stelle, welche nicht mehr phosphoryliert werden kann. Wie im vorherigen Experiment gezeigt, wird durch die Mutation Y163F ein gesteigertes Bindungsverhalten von Flotillin-2 und der zytoplasmatischen Domäne des Desmocollin-3a verursacht. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine veränderte Bindung durch den fehlenden Tyrosin-Rest an sich oder die daran stattfindende Phosphorylierung verursacht wird. Die EGF-Stimulation dient einer gesteigerten EGF-Rezeptor Signaltransduktion, welche den Anteil an phosphoryliertem Flotillin-2 in den Zellen erhöht (Neumann-Giesen et al., 2007). Im Gegensatz dazu kann man mit gezieltem „Starven“ von Zellen erreichen, dass nur ein Minimum von Flotillin-2 in phosphoryliertem Zustand vorliegt. So kann letztendlich eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit eine geänderte Phosphorylierung Einfluss auf die Bindung zwischen Flotillin-2 und dem Fusionsprotein nimmt.

Die Zellen wurden zunächst wie auch beim vorherigen Pulldown mit den Mutanten transfiziert. Verwendet hatte ich auch hier die Flot2-KO-HEK-Zellen, so bildeten lediglich die mit dem Wildtyp transfizierten Zellen das reguläre Flotillin-2. Es wurden jeweils zwei Ansätze jeder Mutante mit Macsfectin transfiziert und auf 6-cm-Schalen ausgesät. Bei 80-100% Konfluenz erfolgte die Kultivierung in serumfreien Medium, das sogenannte „starven“. Damit wurden die Zellen in einen Zustand mit möglichst wenig aktiven EGF-Rezeptoren versetzt. Nun behandelte ich jeweils eine Schale der doppelt verwendeten Mutante/Wildtyps mit 100 ng/μl EGF in DMEM⁻. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 10 min im Brutschrank, und es folgte die rasche Ernte der Zellen. Die Stimulation der Zellen aktivierte die EGF-Rezeptor Signalkaskade, was zu gesteigerter Phosphorylierung von Flotillin-2 führt. Da mit jedem weiteren Schritt des Versuchs die bereits phosphorylierten Tyrosine wieder dephosphoryliert werden würden, blockierte man diese Vorgänge mit den Phosphatase-Inhibitoren NaF und Vanadat.

Aus stimulierten (+) und gestarvten (-) Zellen stellte ich wie im vorangegangenen Pulldown Lysate her. Diese wurden für einen GST-Pulldown mit Desmocollin-3a-ICS, SDS-PAGE und anschließendem Western Blot genutzt. Als Negativkontrolle verwendete ich das gestarvte Wildtyp-Lysat (WT) mit GST versetzt.

Wie Abbildung 11 zeigt, war nicht jede Mutante nach EGF-Stimulierung in der Lage eine Bindung mit zytoplasmatischem Desmocollin-3a einzugehen. Insbesondere Y158F und 7xYF weisen nach EGF-Stimulierung (mit + gekennzeichnet) kaum eine Bande auf.

Betrachtet man die jeweiligen „Mutations-Paare“ der Lysate und vergleicht jeweils stimuliert mit unstimuliert, so lässt sich feststellen, dass bei allen Mutanten jeweils das stimulierte Lysat die schwächere Bande aufweist. Allgemein lässt sich sagen, dass sich in den unstimulierten Lysaten mehr Flotillin-2 an das Desmocollin-3a binden konnte. Dabei gibt es zwischen den Mutanten große Unterschiede. Wie auch im vorangegangenen Pulldown, zeigt Y163F die stärkste Bande. Dies gilt sowohl für den Vergleich aller stimulierten Proben untereinander, als auch für alle gestarvten. Der unstimulierte Wildtyp und 7xYF- zeigen eine ähnliche Intensität. Die Y158F Mutante zeigt auch im gestarvten Lysat nur eine schwache Bindung zu Flotillin-2.

Die Lysatkontrolle in der mittleren Panele von Abbildung 11 zeigt, dass bereits bei der Herstellung der Lysate Konzentrationsunterschiede zwischen ihnen vorhanden waren. So zeigt sowohl der Wildtyp (WT), als auch Y158F und 7xYF eine stärkere Bande beim nicht stimulierten Lysat (-). Dies deutet zum einen auf eine variable Expression von Flotillin-2 hin, ist auf der anderen Seite aber auch von der geernteten Zellmenge abhängig. Der deutlichste Unterschied ist zwischen Y158F + und Y158F - zu sehen, allerdings ist selbst dieser nicht von so großer Intensität, als dass er die Unterschiede im Pulldown erklären könnte.

Die Ponceau-Färbung verdeutlicht, dass die Fusionsproteinmenge relativ homogen war. Hier sind keine gravierenden Abweichungen zu beobachten.

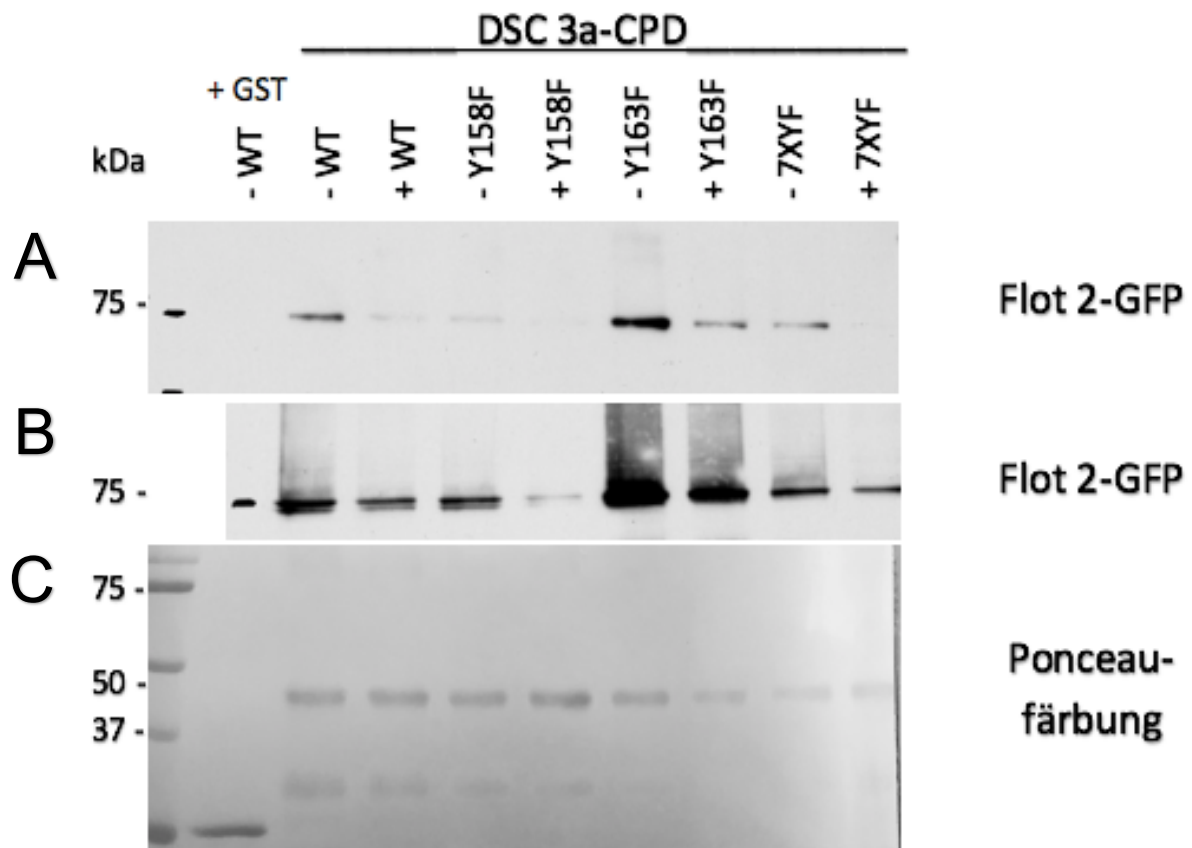


Abbildung 11: Einfluss der EGF-Stimulation auf Flotillin-2-Bindungsverhalten

Indirekter GST-Pulldown von Desmocollin-3a-CPD-Fusionsprotein (A) inkubiert mit transfizierten Lysaten. Die Zellen der Lysate transfizierte man zunächst mit Flotillin-2-Mutanten, anschließend wurden alle Zellen gestarvt. Man stimulierte jeweils ein Well der gestarvten Zellen mit EGF (+), das andere beließ man nicht stimuliert (-). Als Negativkontrolle ganz links verwendete man 5 µg GST versetzt mit 900 µl transfiziertem Wildtyp-Lysat. Je Pulldown-Probe wurde 5 µg des Fusionsproteins verwendet + 900 µl Lysat. B 30 µl Lysat der transfizierten Zellen im Wechsel mit EGF stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). C Ponceau-Färbung des Pulldowns

4.5. Co-Immunpräzipitation von Desmocollin-1 und -2 mit Flotillin-2

In den bisherigen Versuchen wurden wiederholt indirekte GST-Pulldowns durchgeführt. Bei diesen Versuchsbedingungen werden die zwei zu untersuchenden Komponenten stetig künstlich im Versuchsvorgang zusammengeführt. Somit deuten Bindungen, welche hier entstehen, zwar darauf hin, dass eine solche Bindung eingegangen werden kann, allerdings nicht zwangsweise auch unter zellulären Bedingungen entstehen oder vorlagen. Daher sollte abschließend auch eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden, um zu untersuchen, welche Verbindungen im zellulären Lysat tatsächlich bereits vorlagen. Zur Herstellung des Lysats verwendete ich HaCaT-Zellen. Das endogene Flotillin dieser Zellen wurde mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen Flotillin-1 und Flotillin-2 präzipitiert. Je Probe verwendete ich dazu 30 µl magnetische Protein-A-Beads, welche mit 4 µl polyklonalen Antikörpern gekoppelt wurden. Als Negativkontrolle diente dabei ein polyklonaler Antikörper, welcher nicht an Flotilline bindet (X). 900 µl des Lysats inkubierten je Probe über Nacht mit den gekoppelten Beads und wurden anschließend mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern für Desmocollin-1 und Flotillin-1, sowie Desmocollin-2/3 und Flotillin-2.

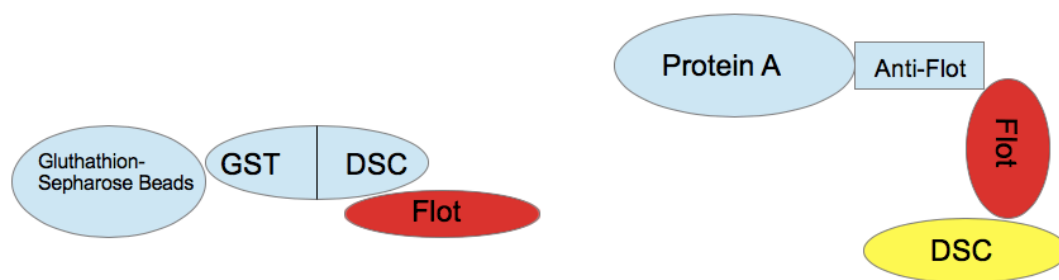


Abbildung 12: Vergleich GST-Pulldown und Co-Immunpräzipitation

A Das mittige Fusionsprotein vereint GST, welches die Bindung an die Gluthathion-Sepharose-Beads generiert, und das Desmocollin (DSC). Es wird untersucht, ob sich Flotillin aus dem Lysat an dieses Fusionsprotein gebunden hat. **B** Der polyklonale Flotillin-Antikörper (Anti-Flot) wird an die magnetischen Protein-A-Beads gekoppelt. Es wird untersucht, ob bei einer Bindung von Flotillin (Flot) aus dem Lysat auch Desmocollin (DSC) vorhanden ist, was auf eine bereits vorhandene Bindung zwischen Flotillin und Desmocollin in den Zellen schließen lässt.

In Abbildung 13 A ist im Lysat auf der Höhe von ca. 75 kDa deutlich eine Bande zu erkennen. Auch in der Probe mit dem polyklonalen Flotillin-2 Antikörper ist eine Bande zu sehen. Diese erscheint allerdings auf einer anderen Höhe bei ca. 95 kDa. Diese würde man als Desmocollin-1 deuten. Man muss hier anmerken, dass nicht klar gesagt werden kann, bei welcher der beiden Banden es sich um Desmocollin-1 handelt. Eine Aussage über die Co-Immunpräzipitation von Desmocollin-1 und Flotillin-2 kann nicht klar getroffen werden. Die Probe des polyklonalen Flotillin-1-Antikörper enthält keinerlei Bande, somit ist hier von keiner Bindung auszugehen. Die Detektion mittels Flotillin-Antikörpern weist in der unteren Panele von Abbildung 13 A&B Banden bei anti-Flotillin-1 und anti-Flotillin-2 auf. Da Flotillin-1 und -2 Heterooligomere bilden, sind sie eine gute Positivkontrolle füreinander. Die aufgetragene Negativkontrolle enthält keine Bande, was für keine unspezifische Bindung an die Protein-A-Beads spricht.

In Abbildung 13 B wurde der Blot in der oberen Panele mit einem Desmocollin-2/3-Antikörper detektiert. Dieser bindet an beide Desmocolline. Hier sind Banden derselben Höhe im Lysat und der anti-Flotillin-2 Immunpräzipitation zu sehen. Die Negativkontrolle, sowie die Flotillin-1 Immunpräzipitation, weisen keine Banden auf. Die Detektion mittels Flotillin-2 Antikörper erzeugt Banden in den beiden Proben der polyklonalen Flotillin-Antikörper, nicht jedoch in der Negativkontrolle. Folglich ist davon auszugehen, dass eine Bindung zwischen Flotillin-2 und Desmocollin-2 oder Desmocollin-3 vorliegt, während Flotillin-1 keine Bindung zu Desmocollin-2/3 eingeht.

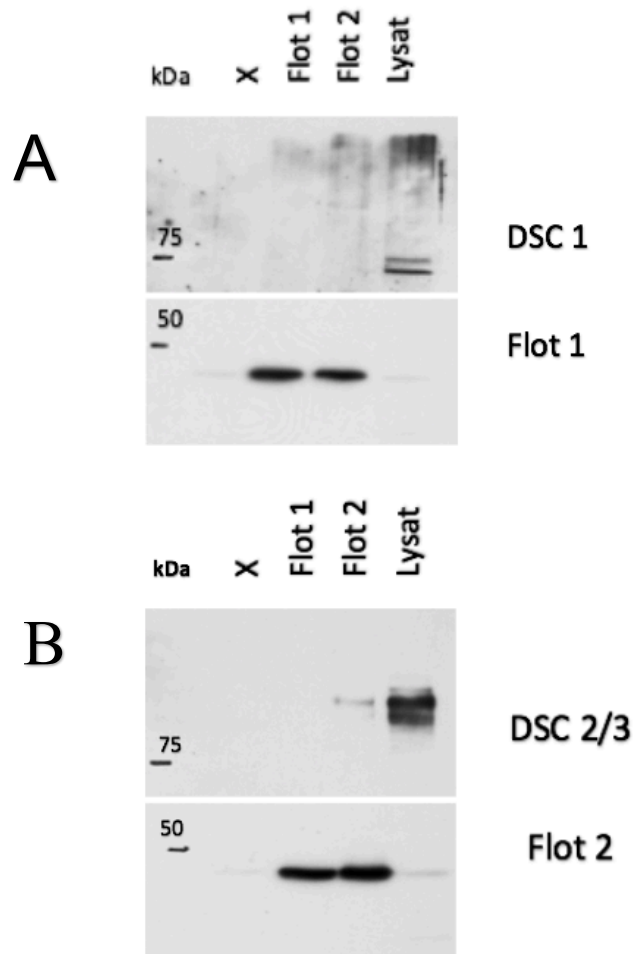


Abbildung 13: Co-Immunpräzipitation von Desmocollinen und Flotillinen

Co-Immunpräzipitation mit polyklonalen Flotillin-1- und Flotillin-2-Antikörpern (Flot 1 & Flot 2) detektiert mit **(A)** Desmocollin-1- und Flotillin-1-Antikörper **(B)** mit Flotillin-2- und Desmocollin-2/3-Antikörper. Für jede Probe verwendete man 4 μ l polyklonalen Antikörper gekoppelt an 30 μ l magnetische Protein-A-Beads. Als Negativkontrolle (X) wurde ein polyklonaler Antikörper, der an keine Flotilline bindet, genutzt. Ganz rechts trug man 30 μ l des verwendeten Lysats auf, welches man aus HaCaT-Zellen hergestellt hatte. Die Inkubation von Lysat und gekoppelten Beads erfolgte über Nacht, anschließend folgte eine Auftrennung via SDS-PAGE und Western Blot.

5. Diskussion

5.1. Die „intracellular cadherin-like sequence“ (ICS) stellt nicht die gesamte Bindungsstelle für Flotilline dar

In Studien der Arbeitsgruppe von Philipsborn et al. konnte bereits vor fünfzehn Jahren nachgewiesen werden, dass Flotilline *in vivo* in Zell-Zell-Kontakten vorhanden sind (von Philipsborn et al., 2005). Gleichzeitig wurde deutlich, dass ihre Expression auch auf einige Adhäsionsproteine einen Einfluss nehmen kann (Hoehne et al., 2005). In diesem Zusammenhang wurden immer mehr Erkenntnisse über die Verbindung zwischen Flotillinen und Adherens Junctions gesammelt. Dabei gelten die Flotilline mittlerweile als stabilisierende „Cadherin Partner“ in epithelialen Zellen (Guillaume et al., 2013). Jedoch blieb die Frage nach ihrem Einfluss auf andere Zellkontakte lange unbeachtet.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte das Bindungsverhalten von Flotillinen und desmosomalen Adhäsionsproteinen. Hier konnte eine Kollokalisierung zwischen Flotillin-2 und Desmoglein-3 innerhalb humaner Keratinozyten und in der Epidermis aufgezeigt werden, als auch die Bindung von Flotillinen und Desmogleinen mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen (Völlner et al., 2016). Darüber hinaus zeigten direkte Pulldown-Assays, dass zumindest die Bindung von Flotillin-1 an Desmocollin-1a eine Direkte ist, welche nicht über γ -Catenin vermittelt wird.

Abschließend wurde in indirekten Pulldown-Assays ein Vergleich zwischen Desmogleinen und den zwei Isoformen der Desmocolline gezogen. Während die Flotilline hier mit allen drei Desmogleinen in Bindung traten, zeigten sie bezüglich der Desmocolline ein anderes Verhalten. Die Desmocolline existieren in drei Unterformen (1-3), welche allerdings jeweils in einer langen (a) und kurzen (b) Isoform exprimiert werden (Collins et al., 1991). Beide Flotilline wiesen eine Bindung zu allen drei langen a-Isoformen auf, allerdings keine zu den kürzeren b-Isoformen. Da die lange a-Isoform der Desmocolline die ICS-Sequenz gemeinsam mit den Desmogleinen aufweist und diese in den kurzen b-Isoformen lediglich in trunkierter Länge vorhanden ist, lag die Vermutung nahe, dass diese als Flotillin-Bindungssequenz fungiert (Völlner, 2016). Ziel meiner Arbeit war es, die genaue Bindungssequenz für Flotilline in den Desmocollinen näher zu charakterisieren.

Zunächst sollte die Hypothese untersucht werden, dass die ICS-Sequenz der langen Desmocollin-a-Isoformen als Bindungssequenz für Flotilline fungiert. Dazu wurden in diesen Versuchen Interaktionsanalysen zwischen Flotillinen und der gesamten zytoplasmatischen Domäne der Desmocollin-a-Isoformen, als auch auf die ICS-Sequenz beschränkte Fusionsproteine durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe eines indirekten GST-Pulldowns getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die gesamte

zytoplasmatische Domäne der Desmocollin-a-Isoformen eine deutlich stärkere Bindung zu beiden Flotillinen aufweist, als die generierten Fusionsproteine, welche auf die ICS-Sequenz der Desmocollin-a-Isoformen beschränkt sind (siehe Abbildung 9 A). Während Flotillin-1 mit keiner der ICS-Sequenzen eine Bindung aufweist, zeigt Flotillin-2 zumindest eine sehr schwache Bindung zu Dsc-2a-ICS und Dsc-3a-ICS. Somit scheint es Unterschiede zwischen den jeweiligen ICS-Domänen zu geben, und es kann nicht pauschal gesagt werden, dass hier keine Bindung stattfinden kann. Ähnliche Beobachtungen waren zuvor bereits bei den Desmogleinen, insbesondere bei Desmoglein-3, gemacht worden (Völlner, 2016).

Es kann trotzdem darauf geschlossen werden, dass die reine ICS-Sequenz nicht die gesamte Bindungssequenz zwischen Flotillinen und Desmocollinen darstellt, auch wenn es Unterschiede zwischen den beiden Flotillinen und auch zwischen den Desmocollin-Unterarten gibt.

Unveröffentlichte Ergebnisse der AG Tikkanen weisen darauf hin, dass Desmoglein-Fusionsproteine, welche zusätzlich zur ICS-Sequenz auch den intrazellulären Anker (IA) enthalten, dasselbe Bindungsverhalten zeigen, welches die gesamten zytoplasmatischen Domänen der Desmogleine aufweisen (Panico, 2019). Da die ICS-Sequenz als alleinige Domäne nicht ausreicht, könnte daraus gefolgert werden, dass ein zusätzlicher Teil der Bindungssequenz im IA liegt und die Bindung mitgeneriert. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass die gesuchte Sequenz im Wesentlichen aus dem IA besteht und die ICS-Sequenz nur in Abschnitten daran beteiligt ist. Darauf hinweisen könnte, dass in Desmocollin-1a der Intrazelluläre Anker bereits als Bindungselement für Desmoplakin identifiziert worden ist (Troyanovsky et al., 1994). Darüber hinaus entspricht die „Juxtamembranäre Domäne“ der klassischen Cadherine dem IA in desmosomalen Cadherinen, als erste, der Transmembrandomäne angrenzenden Zone. Auch sie weist die Bindungen für wichtige regulatorische Proteine wie p120 Catenin (p120ctn) auf (Miranda et al., 2003; Thoreson et al., 2000). p120ctn wurde wiederum bereits mit Flotillinen in Verbindung gebracht, da ein verringerter Flotillin-1-Gehalt zu einer geringeren p120ctn-Rekrutierung in die Lipid Rafts führt (Chartier et al., 2011). Auf die Juxtamembranäre Domäne schließt sich in den 100 weiter C-terminal gelegenen Aminosäuren der klassischen Cadherine die Bindung von β -Catenin und Plakoglobin an (Shapiro & Weis, 2009). Homologe Sequenzen dazu sind auch in den desmosomalen Cadherinen vorhanden. Sie werden hier als „Catenin-binding Sequence“ (CBS) bezeichnet (Nollet et al., 2000). Diese konservierte Sequenz führt wiederum eher zu der Annahme, dass die ICS-Sequenz als Bindestelle dient. Nicht auszuschließen ist aber, dass sich das Bindungsschema der Flotilline zu Desmogleinen von dem zu Desmocollinen unterscheidet.

Zudem ist bekannt, dass die ICS-Sequenz in den Desmocollinen als Bindungselement für Plakoglobin fungiert (Mathurs et al., 1994; Troyanovsky et al., 1994). Dieses wiederum interagiert über seine ARM-Domänen sechs bis acht direkt mit den Flotillinen (Kurrle et al., 2013).

Um diese Hypothesen zu untersuchen, könnten Fusionsproteine geschaffen werden, welche auf die intrazelluläre Sequenz des IA's und unterschiedliche Abschnitte der ICS-Sequenz der jeweiligen Desmocollin-a-Isoformen verkürzt sind. Hier könnte wiederum ein Vergleich zu der gesamten zytoplasmatischen Domäne gezogen werden.

Des Weiteren wären auch hier direkte Pulldown-Assays interessant, um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die Bindung direkt oder durch ein weiteres Protein vermittelt wird. Die Untersuchungen von Völlner konnten bis jetzt lediglich bei Desmocollin-1a und Flotillin-1 eine direkte Bindung verifizieren, was zu der Annahme führen könnte, dass die Bindung der übrigen Isoformen, die bisher nicht getestet wurden, ebenfalls direkt vermittelt ist.

Da Pulldown-Assays lediglich Aussagen über *in vitro*-Bindungen bestätigen können, wären auch Co-Immunpräzipitationen sinnvoll, durch die eine Bindungsfähigkeit *in vivo* nachgewiesen werden könnte. Diese Versuchsansätze gestalten sich jedoch zur Zeit noch schwierig, da die verfügbaren Antikörper zur Co-Immunpräzipitation nicht spezifisch sind und häufig mindestens zwei Desmocollin-Isoformen erkennen.

5.2. Tyrosin-Mutationen können zu vermehrter Bindung von Flotillin-2 an Desmocollin-3a führen

Im folgenden Versuch untersuchte ich die Auswirkungen von Tyrosin-Mutationen auf das Bindungsverhalten von Flotillin-2 und Desmocollin-3a. Flotillin-2 ist in epithelialen Zellen häufig an der Plasmamembran und in Arealen von induzierten Kontaktbereichen zu finden (Neumann-Giesen et al., 2004). Die Lokalisation von Flotillin-1 ist sehr Zelltyp-abhängig, wobei es häufig innerhalb der Zellen zu finden ist (Liu et al., 2005). Mittlerweile konnte allerdings auch dieses an der Plasmamembran von Keratinozyten beobachtet werden (Völlner, 2016).

Da in vorangegangenen Untersuchungen ein starker Einfluss bestimmter Tyrosin-Reste an Flotillin-2 auf dessen Lokalisation in der Zelle deutlich wurde (Neumann-Giesen et al., 2004), kam man zu der Annahme, dass auch die Bindungsfähigkeit zu desmosomalen Cadherinen davon beeinflusst werden könnte. Flotilline werden an verschiedenen Tyrosin-Resten phosphoryliert. Eine große Relevanz wies dabei das Tyrosin-163 auf. Wie bereits beschrieben, führt die Mutation von Tyrosin-163 dazu, dass das Flotillin-2 stabil an der Plasmamembran verbleibt und nicht endozytiert wird. Grund

dafür kann zum einen die fehlende Fähigkeit dieses Mutanten zur Heterooligomerisation mit Flotillin-1 sein. Nur die Zusammenlagerung der Heterooligomere immobilisiert diese innerhalb der Plasmamembran, wodurch eine Internalisierung ermöglicht wird (Babuke et al., 2009). Zum anderen könnte die Blockade auch durch die Mutation an sich verursacht sein (Riento et al., 2009).

Als Mutante wählte ich daher gezielt R1-Y163F aus, in welcher Tyrosin-163 durch Phenylalanin ausgetauscht wurde. Des Weiteren stellt die Mutante R1-7xYF eine gute Vergleichsoption dar. Hier sind alle Tyrosine durch Phenylalanin ausgetauscht, außer Y-27, welches einen proteolytischen Abbau des Proteins verhindert. Da der Austausch durch Phenylalanin eine Phosphorylierung verhindert, kann es in der Mutante 7xYF folglich zu keiner solchen Modifikation mehr kommen. Sie stellt somit die äußerste Steigerung des mutierten Zustandes dar und ist eine gute Vergleichsgröße. Auch eine weitere Punktmutation schafft einen Vergleichswert zu Y163F. Hierfür wurde Y158F gewählt. Diese Mutante fiel bisher durch keine große Veränderung der Lokalisation oder Funktion auf (Neumann-Giesen et al., 2007). Als letzte Vergleichsgröße ist der transfizierte Wildtyp von Flotillin-2 die beste Möglichkeit, die reguläre Bindungsfähigkeit darzustellen. Alle transfizierten Mutanten wurden auf ihre Bindung zu dem zytoplasmatischen Desmocollin-3a (DSC3a-CPD) getestet.

Auch in diesem Versuch kann dem Tyrosin-163 eine besondere Funktion zugeschrieben werden. Die Mutation zu Phenylalanin an dieser Stelle führt zu einer starken Bindung an Desmocollin-3a. Im Vergleich zu den übrigen verwendeten Mutanten, übt diese Mutation den stärksten Einfluss auf die Interaktion von Flotillin-2 mit Desmocollin-3a aus (siehe Abbildung 10 A). Auffallend ist auch die ebenfalls starke Bindung der Mutante 7xYF. Der Effekt auf die Interaktion zwischen DSC3a-CPD und Flotillin-2 scheint ähnlich dem von Y163F zu sein. Das lässt einen wiederum vermuten, dass keine andere Phosphorylierungsstelle derart großen Einfluss auf die Fähigkeit zur Bindung nimmt, wie die von Tyrosin-163. Da die Mutation zu einer stärkeren Bindung führt, muss das Tyrosin in seiner physiologischen bzw. phosphorylierten Form eine Hemmung der Bindung zu DSC3a-CPD darstellen. Dabei war allerdings nicht klar, ob das vorhandene Tyrosin oder dessen Phosphorylierung die Hemmung verursachen. In mit FCS-kultivierten Zellen, wie in diesen Versuchen verwendet, kann Flotillin-2 auf Grund der Aktivierung von Signalkaskaden teils phosphoryliert vorliegen. Grund für die stärkere Interaktion könnte somit zum einen die Mutation und derart andere Struktur des Flotillins oder die an der Stelle von Tyrosin-163 nicht mehr mögliche Phosphorylierung sein.

Aufgrund dessen, dass in der Mutante 7xYF zusätzlich zu Tyrosin-163 auch andere Tyrosine mutiert sind, lässt sich darauf schließen, dass andere Einzelmutationen zumindest keinen negativen Einfluss auf die Bindung ausüben. Die schwache Bande

von Y158F könnte dies unterstützen. Vergleicht man die beiden Einzelmutationen Y158F und Y163F miteinander, so ist der Unterschied sehr groß. Um eine allgemeine Aussage treffen zu können, müsste die Bindung von weiteren Einzelmutationen untersucht werden. Allerdings wird bereits hier deutlich, dass der Einfluss der jeweiligen Tyrosine auf das Bindungsverhalten stark variieren kann. Zwischen dem Wildtyp von Flotillin-2 und Y158F ist dagegen kaum ein Unterschied zu bemerken. Die Einzelmutation Y158F hat somit keinen darstellbaren Einfluss auf die Bindung zwischen DSC3a-CPD und Flotillin-2. Es ist wahrscheinlich, dass das beobachtete Verhalten in ähnlicher Form für die anderen Desmocollin-Isoformen gilt. Für weitere Versuche wären auch Transfektionen von Zellen mit den bereits in unserer Arbeitsgruppe generierten Flotillin-1-Mutanten interessant (Amaddii, 2008). Einen ähnlichen Effekt wie die Y163F-Mutante, könnte Y160F bei Flotillin-1 haben.

Aufschlussreich wäre auch die Bindung der Mutanten an Desmocolline bei einer Co-Immunpräzipitation. Durch den indirekten GST-Pulldown kann hier lediglich eine Aussage über das Vermögen eine Bindung einzugehen, getroffen werden. Da man aber davon ausgehen kann, dass auch die veränderte Lokalisation innerhalb der Zelle einen Einfluss auf die Bindungen *in vivo* hat, könnten so weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

5.3. Gesteigerte Phosphorylierung der Flotillin-Mutanten durch EGF-Stimulation führt zu geminderter Bindung an Desmocollin-3a

Durch den vorangegangenen Versuch ergab sich die Fragestellung, ob lediglich die Tyrosin-Reste und die folglich andere Proteinstruktur der Mutanten zu einer Veränderung der Bindung an Desmocollin-3a führen. Alternativ wäre auch die Hemmung durch die an dieser Stelle normalerweise stattfindende Phosphorylierung möglich. Um dieser Frage nachzugehen, nutzte man den Effekt der EGF-Stimulation von Zellen. EGF führt zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors, welcher eine Signalkaskade in Gang setzt, die letztendlich zur Phosphorylierung der Flotilline durch Src-Kinasen führt (Neumann-Giesen et al., 2007).

Posttranslationale Veränderungen können vielfältigen Einfluss auf die modifizierten Proteine nehmen. Die Affinität zweier Proteine kann gesteigert, die Bindung gehemmt oder aber auch eine Enzymaktivität eingeschaltet werden. All diese Beispiele wurden bereits in Adherens Junctions beobachtet (Bertocchi et al., 2012). So können Tyrosin-Phosphorylierungen von VE-Cadherin zu einer Hemmung der Bindung von p120ctn oder β -Catenin führen, was in einer geringeren Affinität zu Zellkontakten resultiert (Hatanaka et al., 2011; Potter et al., 2005). Andererseits kann auch p120ctn phosphoryliert werden.

Es besitzt acht Tyrosin-Reste, welche von Src modifiziert werden können. Die Effekte sind ebenfalls vielfältig, da sowohl gesteigerte Bindung an Cadherinen beobachtet wurde, als auch keinerlei Effekt (Alemà & Salvatore, 2007). Dabei wird p120^{ctn} eine stabilisierende Funktion für Cadherine zugeschrieben. Ganz ähnlich ist der Gedanke bezüglich der Flotilline. Auch sie könnten als stabilisierende Partner für desmosomale Cadherine fungieren (Völlner, 2016). Die Annahme liegt nahe, dass auch Flotilline durch Tyrosin-Phosphorylierungen in ihrem Bindungsvermögen beeinflusst werden können. Bei meinen Versuchen wurde jeweils die Hälfte der Zellen mit EGF stimuliert und diese den nicht-stimulierten Proben gegenübergestellt, in denen Flotillin-2 nicht phosphoryliert ist. Die jeweils exprimierten Flotilline aus den Lysaten wurden abermals in ihrer Bindung zu Desmocollin-3a-CPD verglichen. Vergleicht man jeweils die Paare von stimuliert (+) und unstimuliert (-), so kann allgemein gesagt werden, dass in allen stimulierten Lysaten das Flotillin-2 eine geringere Bindung zu Desmocollin-3a aufweist (siehe Abbildung 11 A). Dabei gibt es erneut Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten. Die Mutante Y163F zeigt wiederholt die stärksten Bindungen, sowohl in der stimulierten als auch unstimulierten Probe. Während der Wildtyp in den vorangegangenen Versuchen nur eine schwache Reaktion zeigte, weisen in diesem Versuch die Mutante Y158F und 7xYF die schwächsten Bindungen auf. Hier bindet sich das Flotillin-2 aus den stimulierten Lysaten kaum an Desmocollin-3a, was allerdings auch durch die sehr geringe Expression verursacht sein kann, die in den reinen Lysat-Proben verdeutlicht wird (siehe Abbildung 11 B). Bereits in den stimulierten Lysaten ist die Menge an Flotillin-2 geringer, als in den gestarvten. Man könnte die Vermutung aufstellen, dass durch die Phosphorylierung nach EGF-Stimulierung die Bande von Flotillin-2 verwischt wird, weil das Laufverhalten im Gel durch die Modifikation verändert wurde, sodass mehrere Banden, statt einer scharfen Bande, entstehen. So ließe sich erklären, dass der Unterschied zwischen der gestarvten und stimulierten 7xYF-Mutante am geringsten ist, da hier keine Phosphorylierung stattfindet.

In diesem Versuch sollten Erkenntnisse über den Einfluss der Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten gesammelt werden, was einen folglich bei Y163F, Y158F und dem Wildtypen zu dem Schluss kommen lässt, dass die Bindung von Flotillin-2 an Desmocollin-3a durch induzierte Phosphorylierungen gehemmt wird. Dabei ist die Position dieser Modifikation scheinbar nicht entscheidend, denn alle stimulierten Lysate weisen einen ähnlichen Grad an Hemmung nach EGF-Stimulierung auf. Auch die Mutante 7xYF zeigt eine geringere Bindung in der stimulierten Probe. Diese Mutante enthält lediglich das Tyrosin-27. Sie müsste folglich in diesem Experiment nicht mehr phosphoryliert werden können, es sei denn Tyrosin-27 wäre doch in der Lage, diesbezüglich Einfluss zu nehmen. Jedoch konnte in Versuchen von Neumann-Giesen

bestätigt werden, dass die generierte Mutante trotz Stimulation mit EGF unphosphoryliert blieb (Neumann-Giesen et al., 2007).

Würde lediglich das Phosphorylierungslevel von Flotillin-2 die Bindung an Desmocollin-3a beeinflussen, müsste die 7xYF-Mutante aus stimuliertem und unstimuliertem Lysat die gleiche Bindungsqualität aufweisen. So ist anzunehmen, dass die EGF-Stimulation die Bindung von Flotillin-2 und Desmocollin-3a, abgesehen von der Tyrosin-Phosphorylierung des Flotillins, durch einen zusätzlichen Faktor beeinflusst. Möglich wäre, dass durch die EGF-Stimulation die Phosphorylierung eines weiteren Proteins induziert wurde, welches einen Einfluss auf die Bindung nimmt. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion doch nicht direkt vermittelt ist, und ein phosphorylierter Faktor sich dazwischen drängt.

Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass die EGF-Stimulation bei allen Einzelmutationen in dem gleichen Phosphorylierungsgehalt resultiert (Neumann-Giesen et al., 2007). Wäre die Phosphorylierung von Flotillin-2 an Y163F die einzige Ursache der gehemmten Bindung an Desmocollin-3a, so müsste die Mutante Y158F eine ähnliche Bindung wie der Wildtyp aufweisen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Folglich wäre anzunehmen, dass es noch andere Gründe für die reduzierte Bindung gibt. Interessant wäre ein Vergleich eines weiteren Mutanten, R1-6xYF, in welchem lediglich noch Tyrosin-163 und -27 enthalten sind, mit dem Wildtypen. Hier könnte man tatsächlich die lokale Phosphorylierung an Tyrosin-163 beurteilen.

Innerhalb der Zellen führt die Phosphorylierung der Flotilline, insbesondere am Tyrosin-163, dazu, dass diese vermehrt von der Plasmamembran endozytiert werden und somit in verminderter Anzahl dort zu finden sind. Diese Internalisierung könnte somit *in vivo* auch darin resultieren, dass weniger Flotilline an desmosomale Proteine gebunden sind. Daher wäre eine Co-Immunpräzipitation mit EGF-stimulierten Zellen interessant, um beurteilen zu können, wie sich die Phosphorylierungen hier auswirken. Inwieweit die Bindung von Flotillinen und Desmocollinen tatsächlich zu deren Stabilisation an der Plasmamembran führt, könnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie in Flotillin-Knockout Zellen verdeutlicht werden, ähnlich den Versuchen die Frauke Völlner 2016 mit Desmogleinen durchgeführt hatte. Da die Antikörper für Desmocolline allerdings bisher nicht besonders spezifisch waren, wurden Versuche dieser Art hier nicht durchgeführt.

5.4. Co-Immunpräzipitation zwischen Flotillinen und Desmocollinen

Abschließend sollten Co-Immunpräzipitationen mit Flotillin-1 und -2 durchgeführt werden, welche mit Antikörpern für Desmocollin-1 und -2/3 detektiert wurden. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten allerdings, dass der verwendete Antikörper für

Desmocollin-1 Banden in unterschiedlichen Höhen des Western Blots erzeugt. Dass eine Bande auf derselben Höhe im Lysat nicht vorhanden ist, spricht nicht unbedingt direkt für eine unspezifische Detektion. Die Bande des Desmocollins ist generell recht schwach und mit Hilfe der Immunpräzipitation wird der Anteil in dieser Probe um ein Vielfaches konzentriert. Somit ist diese Bande im Lysat nicht unbedingt zu sehen. Jedoch ist anzumerken, dass nicht klar differenziert werden kann, bei welcher der beiden Banden es sich nun tatsächlich um Desmocollin-1 handelt oder ob der Desmocollin-Antikörper nicht spezifisch bindet. In Folge dessen kann das Ergebnis des ersten Versuchsteils der Co-Immunpräzipitation (siehe Abbildung 13A) nicht mit Sicherheit gewertet werden und es kann keine Aussage über die Interaktion von Flotillin-2 und Desmocollin-1 getroffen werden. Dies gilt sowohl für die mögliche Bindung von Desmocollin-1 an Flotillin-2, als auch für die hier nicht vorhandene Bindung von Desmocollin-1 an Flotillin-1.

Der zweite Versuchsteil (siehe Abbildung 13B) zeigt im Gegensatz zum Ersten ein Ergebnis, welches klarer gedeutet werden kann. Hier wurde jedoch ein Antikörper verwendet, welcher sowohl an Desmocollin-2 als auch an Desmocollin-3 bindet. Folglich kann hier von einer Interaktion zwischen Desmocollin-2 oder -3 und Flotillin-2 ausgegangen werden. Eine solche Bindung konnte für Flotillin-1 nicht detektiert werden. Jedoch sollte angemerkt werden, dass lediglich eine Bande vorhanden ist und somit nicht differenziert werden kann, ob es sich dabei um Desmocollin-2 oder Desmocollin-3 handelt. Da auch der im ersten Versuchsteil (Abbildung 13A) verwendete Antikörper keine zweifellose Detektion aufwies, können auch die Ergebnisse nicht als sicher angesehen werden. Um eine direkte Bindung von Flotillin-2 und Desmocollin-2 und -3 sicher verifizieren zu können, müsste der Versuch mit einem anderen Antikörper wiederholt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gestaltete sich die Auswahl eines passenden Antikörpers als schwierig, da diese für mehrere Desmocolline häufig kreuzreaktiv sind. Mit den Ergebnissen der Co-Immunpräzipitation können Aussagen darüber getroffen werden, ob Flotilline mit Desmocollinen innerhalb von Zellen bereits in einer Bindung vorliegen. Flotillin-2 ist somit innerhalb der verwendeten Zellen an Desmocollin-2 oder Desmocollin-3 gebunden und könnte die oben erläuterte stabilisierende Funktion übernehmen.

5.5. Ausblick

In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Desmocollinen und Flotillinen näher beleuchtet. Darüber hinaus konnten Erkenntnisse über die Rolle von Tyrosin-Mutationen und Phosphorylierungen im Bindungsverhalten von Flotillin-2 gewonnen werden. Die generelle Funktion von Desmosomen trägt zu einer adäquaten

Zelladhäsion bei, besonders in Geweben, die starken Belastungen ausgesetzt sind. Auch für das Wachstum einiger Karzinom-Arten können desmosomale Proteine regulierend sein. So werden sie beispielsweise im oralen Plattenepithelkarzinom nur reduziert exprimiert (Hiraki et al., 1996). Im Gegensatz dazu sind Flotilline in unterschiedlichen Krebsarten, darunter auch der Kopf-Hals-Bereich, häufig überexprimiert (Banning et al., 2014; Ou et al., 2017). Die Flotillin-Expression könnte als prognostischer Wert für Tumore genutzt werden. Interessant wäre es, den möglichen Einfluss der Überexpression von Flotillinen auf Desmosomen und Zelladhäsion in Krebszellen zu untersuchen.

Daneben ist durch eine stabile desmosomale Adhäsion aber auch das Unterdrücken von invasivem Tumorwachstum möglich (Tselepis et al., 1998). Bisher konnte lediglich eine menschliche Desmocollin-Mutation entdeckt werden (Simpson et al., 2009; Syrris et al., 2006). Jedoch könnte über Desmocolline ebenfalls Einfluss auf andere Proteine genommen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Veränderung des Desmocollin-3-Expressionsmusters zu erhöhter Stabilität von β -Catenin führen kann (Hardman et al., 2005).

Auch in der Gruppe der Pemphigus-Autoimmunerkrankungen spielen Desmocolline eine Rolle. Abgesehen von Desmoglein-3 und -1 können die Pemphigus-Antikörper auch gegen Desmocolline gerichtet sein (Iranzo et al., 2019; Kalantari-dehaghi et al., 2013; Mao et al., 2010). Es wird deutlich, dass der Einfluss von Desmocollinen sehr vielfältig ist. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, dass bei Patienten mit Pemphigus-Autoimmunerkrankungen alternativ auch Auto-Antikörper gegen Flotilline gebildet werden. Antikörper dieser Art konnten bei anderen Autoimmunerkrankungen bereits nachgewiesen werden. So konnten bei 1-2% der Patienten mit Multipler Sklerose Auto-Antikörper gegen den Flotillin-1/-2 Heterokomplex nachgewiesen werden (Hahn et al., 2017).

Der Zusammenhang von Flotillinen und Zelladhäsion entstand zunächst über die Lipid Rafts. Der desmosomale Auf- und Abbau ist mit Lipid Rafts assoziiert und so durch diese regulierbar. Dabei traten auch Flotilline als etablierte Raft-Marker in den Vordergrund. Schon hier wurde besonders Desmocollin-2 Aufmerksamkeit zu Teil, da dieses innerhalb der Plasmamembran zu 60% mit Rafts assoziiert ist (Resnik et al., 2011). Bereits zu diesem Zeitpunkt war abzusehen, dass diese Verknüpfungen zu neuen Therapieansätzen für Pemphigus vulgaris führen könnten, da eine veränderte Raft-Struktur via Cholesterol-Entzug zur Hemmung des pathologischen Mechanismus dieser Autoimmunerkrankung führt (Stahley et al., 2014).

Guillaume et al. bezeichneten die Flotilline als „neuartige Cadherin Partner“, als deutlich wurde, dass Flotilline mit N- und E-Cadherinen in Zell-Zell-Kontakten kolokalisieren und

diese dort stabilisieren (Guillaume et al., 2013). Diesbezüglich wurden anschließend auch Untersuchungen mit desmosomalen Cadherinen durchgeführt. Die Beziehung zwischen Desmogleinen und Flotillinen wurde schon sehr viel detaillierter untersucht und weist darauf hin, dass Flotilline hier eine stabilisierende Funktion einnehmen und die dynamische Assoziation beeinflussen. Ein ähnliches Verhältnis wäre auch zwischen Desmocollinen und Flotillinen denkbar. Für einen solchen Einfluss wäre die genaue Charakterisierung der Interaktionsstelle von Desmocollinen und Flotillinen hilfreich. Auch die Bindungssequenz auf Seiten der Flotilline ist ein Bereich der noch weitgehend unerforscht ist. Der Effekt der Tyrosin-Mutanten könnte ebenfalls regulierend genutzt werden, wobei dem Tyrosin-163 bei Flotillin-2 eine große Rolle zugesprochen werden kann. Abzuwarten bleibt, ob Tyrosin-160 in ähnlichem Ausmaß das Bindungsverhalten von Flotillin-1 und Desmocollinen hemmen kann.

Neue Versuchsoptionen mit bislang nicht verwendeten Zelllinien wie hTert/KER-CT, könnten weitere Erkenntnisse für desmosomale Adhäsion erbringen, auch im Bezug auf Desmocolline (Beckert et al., 2019). Die hier verwendeten Keratinozyten könnten insbesondere als Modell für Pemphigus vulgaris interessant sein. Außerdem ist diese Zelllinie gut geeignet, um das Verhältnis von Flotillinen und Desmocollinen detaillierter zu untersuchen.

I. Zusammenfassung

Der Zusammenhalt von Geweben, welche starken mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, wird maßgeblich über die Zell-Zell-Kontakte der Desmosomen generiert. Sie werden aus verschiedenen Adhäsionsproteinen zusammengesetzt, was nur unter der Voraussetzung einer geregelten Assemblierung der einzelnen Komponenten funktioniert. Die Gruppe der desmosomalen Cadherine schafft dabei den Verbund im Extrazellulärraum zwischen zwei Zellen. Sie werden vertreten durch die Desmogleine und Desmocolline. Der Auf- und Abbau von Desmosomen innerhalb der Plasmamembran konnte in speziellen Membrankomponenten lokalisiert werden, welche mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind, die sogenannten Membran Rafts. Flotillin-1 und -2 sind Proteine, deren Affinität für Membran Rafts besonders hoch ist. Sie sind an Prozessen wie Signaltransduktion, Axon Regeneration und Aktin-Dynamik beteiligt. Darüber hinaus wurden sie gehäuft mit Zelladhäsion in Verbindung gebracht. Es ist bereits bekannt, dass sie in Desmosomen an einer Stabilisation von Desmogleinen an der Plasmamembran und in Zellkontakten beteiligt sind, wodurch die pathologische Internalisierung verhindert wird.

Der Einfluss von Flotillinen auf Desmocolline ist noch weitgehend unerforscht, jedoch wurde bereits deutlich, dass sie eine Bindung miteinander eingehen. Ziel meiner Versuche war es, mit Hilfe neu generierter GST-Fusionsproteine die Interaktionsstelle von Desmocollinen und Flotillinen genauer zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Intrazelluläre Cadherin-like Sequenz (ICS) nicht der gesamten Bindungssequenz der Flotilline entspricht. Sie allein ist nicht in der Lage, die gleiche Bindung wie die gesamte zytoplasmatische Domäne zu generieren. Folglich muss die gesuchte Sequenz auch den intrazellulären Anker (IA) oder Teile dessen beinhalten, um die vollständige Bindung zu erzeugen. Des Weiteren wurde das Bindungsverhalten von Flotillin-2 Tyrosin-Mutanten und Desmocollin-3a untersucht. Darüber hinaus wurden Interaktionsanalysen mit Zellen durchgeführt, in welchen durch EGF-Stimulation induzierte Phosphorylierungen der Flotillin-Mutanten erfolgten. Dabei wurde deutlich, dass Tyrosin-163 von Flotillin-2 die Bindung an Desmocollinen am stärksten beeinflusst. Es verursacht in seiner physiologischen Form eine Hemmung dieser Bindung. Somit war auch die Mutante 7xYF in der Lage die Bindung zu steigern, da sie lediglich Tyrosin-27 aufweist. Man gewann zusätzlich Aufschluss über den Einfluss der Phosphorylierungen. Auch sie führen zu geminderter Bindung zwischen Flotillin-2 und Desmocollin-3a, wenn auch dies nicht durch die Phosphorylierung des Flotillins an sich verursacht ist.

Diese neuen Erkenntnisse können eine weitere Einflussnahme auf die Bindungen zwischen Flotillinen und Desmocollinen ermöglichen und so möglicherweise zu Therapieansätzen für Autoimmundermatosen oder Krebs führen.

II. Summary

Many human tissues have to resist continuous physical stress. In particular, epidermal cells have to establish strong intercellular adhesions because they are constantly subjected to external factors. One class of important adhesive connections that mediate such cellular cohesion are the desmosomes. Their desmosomal cadherins, the desmogleins and desmocollins, connect two adjacent cells in the extracellular space. The assembly of desmosomes was found to take place in cholesterol- and sphingolipid-enriched membrane microdomains or rafts. Flotillin-1 and -2 are ubiquitously expressed and exhibit a high affinity to membrane rafts. Due to their functions in membrane trafficking and cellular signaling, flotillins were also thought to play a role in cellular adhesion. In adherens junctions, flotillins assume the regulation of dynamic association and stabilization at the plasma membrane. For instance, they take part in recruiting diverse cadherins to membrane rafts. Immunoprecipitation experiments showed the interaction between Flotillin and γ -catenin, which indicated a link to desmosomes. Indeed, Flotillins also bind to desmogleins and are meanwhile suggested to also regulate desmosome assembly and function. At the same time, the interaction mechanism between desmosomal cadherins and flotillins remains to be identified. The present study aimed at a more detailed characterisation of the binding sequence of desmocollins on flotillins. The assumption that the intracellular cadherin-like sequence (ICS) of desmocollins forms the binding sequence could not be verified. GST-fusion proteins that contained only the ICS of the particular desmocollin could not facilitate the same amount of flotillin binding as the whole intracellular domains of the desmocollins. Consequently, there have to be further amino acids that participate in the binding of both proteins. It is very likely that the intracellular anchor (IA) is part of the binding sequence, but it remains to be clarified if the IA as a whole is involved, or only parts of it.

Moreover, I tested the influence of EGF-induced phosphorylation on the binding pattern of flotillin-2 and desmocollin-3a. Flotillin-2 physiologically has eight tyrosine residues, some of which can be phosphorylated by Src-Kinases. Thereby, Tyrosin-163 has an important function because its mutation to Phenylalanin results in a permanent localization at the plasma membrane. In my experiments, this mutation leads to an enhanced binding of flotillin-2 and desmocollin-3a. Thus, either the presence of Tyrosin-163 or the phosphorylation at this position hampers the interaction. Furthermore, the EGF-stimulation also disrupted the binding of all tested flotillin-2-mutants to Dsc-3. The mutant 7xYF, which contains only Tyrosin-27, also shows a reduced binding after stimulation. This leads to the assumption that there may be another factor, in addition to flotillin phosphorylation, that induces the disruption of flotillin/desmocollin interaction upon EGF-stimulation.

III. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Armadillo
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BSA	Bovines Serum Albumin
C5	Cystein 5
CBS	Catenin-binding Sequenz
CC	Coiled-Coil Strukturen
CO-IP	Co-Immunpräzipitation
CPD	Zytoplasmatische Domäne
CRAC	Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Desmoplakin
DRM	Detergent-resistant membrane fractions
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DTD	Desmoglein Terminal Domain
DTT	Dithiothreitol
EA	extrazellulärer Anker
EC	extrazelluläre Domäne
ECD	Extracellular Core Domain
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESA	Epidermal Surface Antigen
FCS	Fötales Kälber Serum
Flot1	Flotillin-1
Flot2	Flotillin-2
Flot2-KO	Flotillin-2 Knockout
G2	Glycin 2
GST	Glutathion-S-Transferase
HaCaT-Zellen	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	Humane Gebärmutterhalskarzinom-Zellen von Henrietta Laks
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish Peroxidase
IA	intrazellulärer Anker
ICS	intrazelluläre Cadherin-like Sequenz
IDP	Inner Dense Plaque
IF	Intermediärfilamente
IPL	intrazellulärer Proline-rich Linker
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
LB	Luria/Miller
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
NOG	N-Octyl-β-D-thioglucopyranoside

NT	nicht transfiziert
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
ODP	Outer Dense Plaques
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-chain-reaction
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PG	Plakoglobin
PI	Proteinase Inhibitor Cocktail
Pkp	Plakophilin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>
PV-IgG	<i>Pemphigus vulgaris</i> Immunglobulin/ Autoantikörper
RUD	Repeat Unit Domain
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	LB-Medium mit 0,8% Glukose
SPFH	Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HFIK/C-Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylthylendiamin, '1,2-bis(dimethylamino)-ethan
TM	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Trp	Tryptophan-Rest
WT	Wildtyp
Y-163	Tyrosin-Rest 163

IV. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Epithelzellverband mit Zellkontakten (modifiziert nach Green et al., 2010)</i>	2
<i>Abbildung 2: Aufbau des Desmosoms (modifiziert nach Delva et al., 2009)</i>	4
<i>Abbildung 3: Struktur der desmosomalen Cadherine (modifiziert nach Garrod & Chidgey, 2008)</i>	6
<i>Abbildung 4: Expressionsmuster desmosomaler Komponenten (modifiziert nach Waschke, 2008)</i>	7
<i>Abbildung 5: struktureller Aufbau der Flotilline (modifiziert nach Bodin et al., 2014; Völlner, 2016)</i>	15
<i>Abbildung 6: Abfolge der ICS-Sequenz von desmosomalen Cadherinen</i>	42
<i>Abbildung 7: Coomassie-Färbung der Proteinexpression vor und nach Induzierung durch IPTG</i>	43
<i>Abbildung 8: Quantifizierung der Fusionsproteine</i>	45
<i>Abbildung 9: Bindung der Flotilline an ICS-Sequenz der Desmocolline</i>	47
<i>Abbildung 10: Bindung der Flotillin-2-Mutanten an Dsc-3a</i>	50
<i>Abbildung 11: Einfluss der EGF-Stimulation auf Flotillin-2-Bindungsverhalten</i>	53
<i>Abbildung 12: Vergleich GST-Pulldown und Co-Immunpräzipitation</i>	54
<i>Abbildung 13: Co-Immunpräzipitation von Desmocollinen und Flotillinen</i>	56

V. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: verwendete Geräte und Materialien</i>	21
<i>Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Reagenzien</i>	22
<i>Tabelle 3: verwendete Puffer und Lösungen</i>	23
<i>Tabelle 4: Kulturmedien und Antibiotika</i>	25
<i>Tabelle 5: Zelllinien der Versuche</i>	25
<i>Tabelle 6: verwendete Bakterien-Stämme</i>	26
<i>Tabelle 7: verwendete Aufreinigungskits, Enzyme & Stimulationsfaktoren</i>	26
<i>Tabelle 8: verwendete Antikörper</i>	27
<i>Tabelle 9: verwendete Primer</i>	28
<i>Tabelle 10: verwendete Plasmide</i>	28
<i>Tabelle 11: Ansätze für PCR</i>	30
<i>Tabelle 13: Zusammensetzung des GST-Lysis-Buffer mit Proteaseinhibitoren</i>	33
<i>Tabelle 14: Hergestellte GST-Fusionsproteine</i>	34
<i>Tabelle 15: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel</i>	37
<i>Tabelle 16: Rezept ECL-Detektionslösung</i>	38
<i>Tabelle 17: Verwendete Mutationen zur Transfektion</i>	48

VI. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molekularbiologie der Zelle* (6. Auflage). (S. 1171-1195). Weinheim: Wiley-VCH
- Alemà, S., & Salvatore, A. M. (2007). p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 47–58.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.06.001>
- Amaddii, M. (2008). *Reggie / Flotillin Proteins in Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking and Signaling*. Goethe Universität Frankfurt am Main
- Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., & Tikkanen, R. (2012). Flotillin-1 / Reggie-2 Protein Plays Dual Role in Activation of Receptor-tyrosine Kinase / Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7265–7278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
- Amagai, M., Klaus-kovtun, V., & Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a Novel Epithelial Cadherin in Pemphigus Vulgaris , a Disease of Cell Adhesion. *Cell*, 67, 869–877.
- Amagai, M., & Stanley, J. R. (2012). Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol.*, 132(302), 776–784. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.390.Desmoglein>
- Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily : diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(4), 629–641.
- Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., & Tikkanen, R. (2009). Hetero-oligomerization of reggie-1 / flotillin-2 and reggie-2 / flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling*, 21, 1287–1297.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.012>
- Banning, A., Babuke, T., Kurrle, N., Meister, M., Ruonala, M. O., & Tikkanen, R. (2018). Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with α -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase. *Cells*, 7(28), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/cells7040028>
- Banning, A., Kurrle, N., Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer. *Cells*, 3, 129–149. <https://doi.org/10.3390/cells3010129>
- Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P., & Tikkanen, R. (2012). Transcriptional Regulation of Flotillins by the Extracellularly Regulated Kinases and Retinoid X Receptor Complexes. *PLoS ONE*, 7(9), e45514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045514>
- Beckert, B., Panico, F., Pollmann, R., Eming, R., Banning, A., & Tikkanen, R. (2019). Immortalized Human hTert / KER-CT Keratinocytes a Model System for Research on Desmosomal Adhesion and Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(3113), 1–16.
- Bertocchi, C., Rao, M. V., & Zaidel-Bar, R. (2012). Regulation of Adherens Junction Dynamics by Phosphorylation Switches. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1–14.
<https://doi.org/10.1155/2012/125295>
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997).

- Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–13802.
- Bitsikas, V., Riento, K., Howe, J. D., Barry, N. P., & Nichols, B. J. (2014). The Role of Flotillins in Regulating A b Production , Investigated Using Flotillin 1- / - , Flotillin 2- / - Double Knockout Mice. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085217>
- Bodin, S., Planchon, D., Morris, E. R., Comunale, F., & Gauthier-Rouvière, C. (2014). Flotillins in intercellular adhesion – from cellular physiology to human diseases. *Journal of Cell Science*, 127, 5139–5147. <https://doi.org/10.1242/jcs.159764>
- Bonné, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K. J., & Roy, F. Van. (2003). Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *The Journal of Cell Biology*, 161(2), 403–416. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303036>
- Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S., & Green, K. J. (1996). Breaking the Connection: Displacement of the Desmosomal Plaque Protein Desmoplakin from Cell-Cell Interfaces Disrupts Anchorage of Intermediate Filament Bundles and Alters Intercellular Junction Assembly. *Journal of Cell Biology*, 134(4), 985–1001.
- Bornslaeger, E. A., Godsel, L. M., Corcoran, C. M., Park, J. K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2001). Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *Journal of Cell Science*, 114, 727–738.
- Brasch, J., Harrison, O. J., Honig, B., & Shapiro, L. (2013). Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, 22(6), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.03.004.Thinking>
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., & Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins : more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology*, 17(8), 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.005>
- Brown, D. A. (2006). Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology*, 21, 430–439.
- Burdett, I. D. J. (1998). Aspects of the Structure and Assembly of Desmosomes. *Micron*, 29(4), 309–328.
- Buxton, R. S., & Magee, A. I. (1992). Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Cell Biology*, 3, 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1043-4682\(10\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4682(10)80012-1)
- Calkins, C. C., Setzer, S. V, Jennings, J. M., Summers, S., Tsunoda, K., Masayuki, A., & Kowalczyk, A. P. (2006). Desmoglein Endocytosis and Desmosome Disassembly Are Coordinated Responses to Pemphigus Autoantibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7623–7634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512447200>
- Chartier, N. T., Lainé, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-rizo, C., & Jacquier-sarlin, M. R. (2011). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Experimental Cell Research*, 317, 1422–1436. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.009>
- Chen, J., Den, Z., & Koch, P. J. (2008). Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal

- blistering. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 17), 2844–2849.
<https://doi.org/10.1242/jcs.031518>.Loss
- Chidgey, M., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Cruchley, A., Hail, C., Kirk, S., ... Garrod, D. (2001). Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *Journal of Cell Biology*, 155(5), 821–832.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200105009>
- Chitaev, N. A., Leube, R. E., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Franke, W. W., & Troyanovsky, S. M. (1996). The Binding of Plakoglobin to Desmosomal Cadherins: Patterns of Binding Sites and Topogenic Potential. *Journal of Cell Biology*, 133(2), 359–369.
- Chitaev, N. A., & Troyanovsky, S. M. (1997). Direct Ca²⁺-dependent Heterophilic Interaction between Desmosomal Cadherins, Desmoglein and Desmocollin, Contributes to Cell-Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 138(1), 193–201.
- Collins, J. E., Legan, K. P., Kenny, T. P., Macgarvie, J., Holton, J. L., & Garrod, D. R. (1991). Cloning and Sequence Analysis of Desmosomal Glycoproteins 2 and 3 (Desmocollins): Cadherin-like Desmosomal Adhesion Molecules with Heterogeneous Cytoplasmic Domains. *Journal of Cell Biology*, 113(2), 381–391.
- Delva, E., Jennings, J. M., Calkins, C. C., Kottke, M. D., Faundez, V., & Kowalczyk, A. P. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG-induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-independent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18303–18313.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M710046200>
- Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (2009). The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002543.
- Dusek, R. L., Godsel, L. M., & Green, K. J. (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins : Beyond desmosomal adhesion. *Journal of Dermatological Science*, 45, 7–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.10.006>
- Edgar, A. J., & 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, 53–64.
- Frick, M., Bright, N. A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., & Nichols, B. J. (2007). Report Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding. *Current Biology*, 17, 1151–1156.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.078>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure , composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 572–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C. T., Mcdermott, D. A., ... Thierfelder, L. (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 36(11), 1162–1164.
<https://doi.org/10.1038/ng1461>

- Getsios, S., Amargo, E. V., Dusek, R. L., Ishii, K., Sheu, L., Godsel, L. M., & Green, K. J. (2004). Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation*, *72*, 419–433. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07208008.x>
- Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*, 271–281. <https://doi.org/10.1038/nrm1356>
- Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/ncb1342>
- Grando, S. A. (2012). Pemphigus autoimmunity : Hypotheses and realities. *Autoimmunity*, *45*(1), 7–35. <https://doi.org/10.3109/08916934.2011.606444>
- Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S., & Godsel, L. M. (2010). Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*, a000125.
- Green, K. J., Jaiganesh, A., & Broussard, J. A. (2019). Desmosomes : Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000 Research*, *8*, 2150.
- Guillaume, E., Comunale, F., Khoa, N. Do, & Planchon, D. (2013). Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell – cell junctions. *Journal of Cell Science*, *126*, 5293–5304. <https://doi.org/10.1242/jcs.133975>
- Hahn, S., Trendelenburg, G., Scharf, M., Denno, Y., Brakopp, S., Teegen, B., ... Komorowski, L. (2017). Identification of the flotillin-1 / 2 heterocomplex as a target of autoantibodies in bona fide multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(123), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0900-z>
- Hardman, M. J., Liu, K., Avilion, A. A., Merritt, A., Brennan, K., Garrod, D. R., & Byrne, C. (2005). Desmosomal Cadherin Misexpression Alters B-Catenin Stability and Epidermal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(3), 969–978. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.969>
- Harrison, O. J., Brasch, J., Lasso, G., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Honig, B., & Shapiro, L. (2016). Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *PNAS*, *113*(26), 7160–7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606272113/-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1606272113>
- Hatanaka, K., Simons, M., & Murakami, M. (2011). Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *300*, 162–172. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00650.2010>
- Hatzfeld, M. (2005). The p120 family of cell adhesion molecules. *European Journal of Cell Biology*, *84*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.016>
- Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins : Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion ? *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.009>
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., & Waschke, J. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG

- Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. *Journal of Immunology*, 181, 1825–1834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1825>
- Hiraki, A., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Kurahara, S., & Garrod, D. R. (1996). Immunohistochemical staining of desmosomal components in oral squamous cell carcinomas and its association with tumour behaviour. *British Journal of Cancer*, 73, 1491–1497.
- Hoehne, M., de Couet, H. G., Stuermer, C. A. O., & Fischbach, K.-F. (2005). Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in Drosophila: They are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 30(3), 326–338.
- Hofmann, S. C., Juratli, H. A., & Eming, R. (2018). Bullöse Autoimmundermatosen. *Journal of the German Society of Dermatology*, 16(11), 1339–1360. <https://doi.org/10.1111/ddg.13688>
- Iranzo, P., Ishii, N., Hashimoto, T., & Alsina-Gilbert, M. (2019). Nonclassical pemphigus with exclusively IgG anti-desmoglein 3-specific antibodies. *Australasian Journal of Dermatology*, 60, e217–e219. <https://doi.org/10.1111/ajd.12991>
- Jennings, J. M., Tucker, D. K., Kottke, M. D., Saito, M., Delva, E., Hanakawa, Y., ... Kowalczyk, A. P. (2011). Desmosome Disassembly in Response to Pemphigus Vulgaris IgG Occurs in Distinct Phases and can be Reversed by Expression of Exogenous Dsg3. *J Invest Dermatol.*, 131(3), 706–718. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.389>
- Kalantari-dehaghi, M., Anhalt, G. J., Camilleri, M. J., Chernyavsky, A. I., Chun, S., Felgner, P. L., ... Grando, S. A. (2013). Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. *PLoS ONE*, 8(3), e57587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057587>
- Khan, M. J., Khan, I., Ali, I., Ahmed, S., & Khan, G. M. (2017). A review oh desmogleins, desmogleins and associated diseases. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(11), 4053–4061.
- Kitajima, Y. (2013). New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.08.001>
- Kljuic, A. N. A., Bauer, R. C., & Christiano, A. M. (2004). Genomic Organization of Mouse Desmoglein Genes Reveals Evolutionary Conservation. *DNA Sequence*, 15(2), 148–152. <https://doi.org/10.1080/10425170410001679156>
- Koch, P. J., & Franke, W. W. (1994). Desmosomal cadherins : another growing adhesion molecules multigene family of adhesion molecules. *Cell Biology*, 6, 682–687.
- Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Borgwardt, J. E., Palka, H. L., Dhaliwal, A. S., Corcoran, C. M., ... Green, K. J. (1997). The Amino-terminal Domain of Desmoplakin Binds to Plakoglobin and Clusters Desmosomal Cadherin–Plakoglobin Complexes. *The Journal of Cell Biology*, 139(3), 773–784.
- Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, Function and Regulation of Desmosomes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science (Elsevier)*, 116, 95–118.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4>.Structure

- Kowalczyk, A. P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E. A., Kopp, D. S., Borgwardt, J. E., Corcoran, C. M., ... Green, K. J. (1999). The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18145–18149.
- Kowalczyk, A. P., Stappenbeck, T. S., Parry, D. A. D., Palka, H. L., Virata, M. L. A., Bornslaeger, E. A., ... Green, K. J. (1994). Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophysical Chemistry*, 50, 97–112.
- Kurrle, N., Ockenga, W., Meister, M., Völlner, F., Kühne, S., John, B. A., ... Tikkanen, R. (2013). Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 13(575).
- Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013). Flotillins Directly Interact with c -Catenin and Regulate Epithelial Cell-Cell Adhesion. *PLoS ONE*, 8(12), e84393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084393>
- Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., ... Stuermer, C. A. O. (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. *Inc. J Neurobiol*, 37, 502–523.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., Jaeger, F. A., Wippich, F. M., Luxenhofer, G., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2008). Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1 / flotillin-2. *European Journal of Cell Biology*, 87, 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.12.001>
- Li, K. H. C., Bazoukis, G., Liu, T., Li, G., Wu, W. K. K., Wong, S. H., ... Tse, G. (2017). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / dysplasia (ARVC/D) in clinical practice. *Journal of Arrhythmia*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/joa3.12021>
- Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H., & Saltiel, A. R. (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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16125–16134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500940200>
- Lorch, J. H., Klessner, J., Park, J. K., Getsios, S., Wu, Y. L., Stack, M. S., & Green, K. J. (2004). Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Promotes Desmosome Assembly and Strengthens Intercellular Adhesion in Squamous Cell Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 37191–37200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405123200>
- Mahoney, M., Hu, Y., Brennan, D., Bazzi, H., Christiano, A. M., & Wahl, J. K. (2006). Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia : implications in diseases. *Experimental Dermatology*, 15, 101–109.
- Mahoney, M., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M., & Stanley, J. R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(4), 461–468.
- Mao, X., Nagler, A. R., Farber, S. A., Choi, E. J., Jackson, L. H., Leiferman, K. M., ... Amagai,

- M. (2010). Autoimmunity to Desmocollin 3 in Pemphigus Vulgaris. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 2724–2730. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100483>
- Marcozzi, C., Burdett, I. D. J., Buxton, R. S., & Magee, A. I. (1998). Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *Journal of Cell Science*, 111, 495–509.
- Mathurs, M., Goodwin, L., & Cowins, P. (1994). Interactions of the Cytoplasmic Domain of the Desmosomal Cadherin Dsg1 with Plakoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 14075–14080.
- Mckoy, G., Protonotarios, N., Crosby, A., Tsatsopoulou, A., Anastasakis, A., Coonar, A., ... Mckenna, W. J. (2000). Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *The Lancet*, 355, 2119–2124.
- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View. *Membranes*, 4, 356–371. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>
- Meister, M., Zuk, A., & Tikkanen, R. (2014). Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *FEBS Journal*, 281, 2956–2976. <https://doi.org/10.1111/febs.12834>
- Miller, K., Matteyl, D., Measures, H., & Garrod, D. (1987). Localisation of the protein and glycoprotein components of bovine nasal epithelial desmosomes by immunoelectron microscopy. *The EMBO Journal*, 6(4), 885–889.
- Miranda, K. C., Joseph, S. R., Yap, A. S., Teasdale, R. D., & Stow, J. L. (2003). Contextual Binding of p120ctn to E-cadherin at the Basolateral Plasma Membrane in Polarized Epithelia. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43480–43488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305525200>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., ... Parton, R. G. (2002). Flotillin-1 / Reggie-2 Traffics to Surface Raft Domains via a Novel Golgi-independent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48834–48841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209082200>
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts : Elusive or Illusive? *Cell*, 115, 377–388.
- Neto, J. E., Tonet, J., Frank, R., & Fontaine, G. (2019). Review Article Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Dysplasia (ARVC/D) - What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. *Arq Bras Cardiol.*, 112(1), 91–103. <https://doi.org/10.5935/abc.20180266>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C. A. O., ... Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1 / flotillin-2 : role of myristoylation , palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*, 378, 509–518.
- Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M., & Tikkanen, R. (2007). Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1 / flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 120, 395–406. <https://doi.org/10.1242/jcs.03336>
- Nie, Z., Merritt, A., Rouhi-parkouhi, M., Taberner, L., & Garrod, D. (2011). Membrane-

- impermeable Cross-linking Provides Evidence for Homophilic , Isoform-specific Binding of Desmosomal Cadherins in Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2143–2154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192245>
- Nollet, F., Kools, P., & Van Roy, F. (2000). Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily allows Identification of Six Major Subfamilies Besides Several Solitary Members. *J. Mol. Biol.*, 299, 551–572. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777>
- North, A. J., Bardsley, W. G., Hyam, J., Bornslaeger, E. A., Cordingley, H. C., Trinnaman, B., ... Garrod, D. R. (1999). Molecular map of the desmosomal plaque. *Journal of Cell Biology*, 112, 4325–4336.
- Ou, Y., Liu, F., Chen, F., & Zhu, Z. (2017). Prognostic value of Flotillin-1 expression in patients with solid tumors. *Oncotarget*, 8(32), 52665–52677.
- Panico, F. V. (2019). *Interaktionsanalysen zwischen Flotillinen und Desmogleinen*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Parker, A. E., Wheeler, G. N., Arnemann, J., Pidsley, S. C., Ataliotiss, P., Thomas, C. L., ... Buxton, R. S. (1991). Desmosomal Glycoproteins II and III. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10438–10445.
- Pasdar, M., & Nelson, W. J. (1989). Regulation of Desmosome Assembly in Epithelial Cells: Kinetics of Synthesis, Transport, and Stabilization of Desmoglein I, a Major Protein of the Membrane Core Domain. *Journal of Cell Biology*, 109, 163–177.
- Payne, A. S., Hanakawa, Y., Amagai, M., & Stanley, J. R. (2004). Desmosomes and disease : pemphigus and bullous impetigo. *Cell Biology*, 16, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.006>
- Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., & Gumbiner, B. M. (1992). The Vertebrate Adhesive Junction Proteins β -catenin and Plakoglobin and the Drosophila Segment Polarity Gene armadillo Form a Multigene Family with Similar Properties. *Journal of Cell Biology*, 118(3), 681–691.
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47, 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., ... Rampazzo, A. (2006). Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation*, 113, 1171–1179. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674>
- Pokutta, S., & Weis, W. I. (2007). Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts. *The Annual Review of Cell and Development Biology*, 23, 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104241>
- Potter, M. D., Barbero, S., & Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Prevents Binding of p120- and beta-Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31906–31912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505568200>

- Rampazzo, A., Nava, A., Malacrida, S., Beffagna, G., Bauce, B., Rossi, V., ... Danieli, G. A. (2002). Mutation in Human Desmoplakin Domain Binding to Plakoglobin Causes a Dominant Form of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *The American Society of Human Genetics*, *71*, 1200–1206.
- Resnik, N., Sepcic, K., Plemenitas, A., Windoffer, R., Leube, R., & Veranic, P. (2011). Desmosome Assembly and Cell-Cell Adhesion Are Membrane Raft-dependent Processes. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 1499–1507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189464>
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*, *122*(7), 912–918. <https://doi.org/10.1242/jcs.039024>
- Rivera-milla, E., Stuermer, C. A. O., & Malaga-trillo, E. (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), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5434-3>
- Roberts, B. J., Pashaj, A., Johnson, K. R., & Wahl, J. K. (2011). Desmosome dynamics in migrating epithelial cells requires the actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research*, *317*(20), 2814–2822. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.003>
- Roh, J.-Y., & Stanley, J. R. (1995). Plakoglobin Binding by Human Dsg3 (Pemphigus Vulgaris Antigen) in Keratinocytes Requires the Cadherin-Like Intracytoplasmic Segment. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*(5), 720–724. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606963>
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R., & Wandinger-Ness, A. (2005). A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochemical Journal*, *392*, 29–38. <https://doi.org/10.1042/BJ20050645>
- Saito, M., Tucker, D. K., Kohlhorst, D., Niessen, C. M., & Kowalczyk, A. P. (2012). Classical and desmosomal cadherins at a glance. *Journal of Cell Science*, *125*(11), 2547–2552. <https://doi.org/10.1242/jcs.066654>
- Santos, A. L., & Preta, G. (2018). Lipids in the cell : organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*, 1909–1927. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2765-4>
- Schäfer, S., Koch, P. J., & Franke, W. W. (1994). Identification of the Ubiquitous Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalogue of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Experimental Cell Research*, *211*, 391–399.
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. O. (1997). Reggie-1 and reggie-2 , two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, *124*, 577–587.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *18*(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Shapiro, L., & Weis, W. I. (2009). Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold*

- Spring Harb Perspect Biol*, 1, 1–21.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid Rafts and Signal Transduction. *Molecular Cell Biology*, 1, 31–41.
- Simpson, M. A., Mansour, S., Ahnood, D., Kalidas, K., Patton, M. A., McKenna, W. J., ... Crosby, A. H. (2009). Homozygous Mutation of Desmocollin-2 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Mild Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair. *Cardiology*, 113, 28–34. <https://doi.org/10.1159/000165696>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-trillo, E., Rivera-milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie / flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal*, 403, 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Solis, G. P., Schrock, Y., Hülsbusch, N., Wiechers, M., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2012). Reggies / flotillins regulate E-cadherin – mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *MBoC*, 23, 1812–1825. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1006>
- Spindler, V., Drenckhahn, D., Zillikens, D., & Waschke, J. (2007). Pemphigus IgG Causes Skin Splitting in the Presence of Both Desmoglein 1 and Desmoglein 3. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 906–916. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070028>
- Spindler, V., Eming, R., Schmidt, E., Amagai, M., Grando, S., Jonkman, M. F., ... Waschke, J. (2018). Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*, 138, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.022>
- Spindler, V., & Waschke, J. (2018). Pemphigus — A Disease of Desmosome Dysfunction caused by Multiple Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00136>
- Stahley, S. N., Saito, M., Faundez, V., Koval, M., Mattheyses, A. L., & Kowalczyk, A. P. (2014). Desmosome Assembly and Disassembly Are Membrane Raft-Dependent. *PLoS ONE*, 9(1), e87809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087809>
- Sviridov, D., & Miller, Y. I. (2020). Biology of Lipid Rafts : Introduction to the Thematic Review Series. *Journal of Lipid Research*, 61, 598–600. <https://doi.org/10.1194/jlr.IN119000330>
- Syrris, P., Ward, D., Evans, A., Asimaki, A., Gandjbakhch, E., Sen-Chowdhry, S., & McKenna, W. J. (2006). Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia / Cardiomyopathy Associated with Mutations in the Desmosomal Gene Desmocollin-2. *The American Journal of Human Genetics*, 79, 978–984.
- Tariq, H., Bella, J., Jowitt, T. A., Holmes, D. F., Rouhi, M., Nie, Z., ... Tabernero, L. (2015). Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *PNAS*, 112(17), 5395–5400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420508112/-/DCSupplemental>. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1420508112
- Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S., & Garrod, D. R. (2010). Desmosomes : adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 429, 419–433. <https://doi.org/10.1042/BJ20100567>

- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., ... Reynolds, A. B. (2000). Selective Uncoupling of p120^{ctn} from E-cadherin Disrupts Strong Adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 148(1), 189–201.
- Troyanovsky, S. M., Eshkind, L. G., Troyanovsky, R., Leube, R. E., & Franke, W. W. (1993). Contributions of Cytoplasmic Domains of Desmosomal Cadherins to Desmosome Assembly and Intermediate Filament Anchorage. *Cell*, 72, 561–574.
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Krutovskikh, V. A., Leube, R. E., & Franke, W. W. (1994). Identification of the Plakoglobin-binding Domain in Desmoglein and Its Role in Plaque Assembly and Intermediate Filament Anchorage. *The Journal of Cell Biology*, 127(1), 151–160.
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Leube, R. E., & Franke, W. W. (1994). Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 10790–10794.
- Tselepis, C., Chidgey, M., North, A., & Garrod, D. (1998). Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 8064–8069.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., & Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nature Cell Biology*, 3, 1076–1085.
- Vasioukhin, V., & Fuchs, E. (2001). Actin dynamics and cell – cell adhesion in epithelia. *Cell Biology*, 13, 76–84.
- Vielmuth, F., Spindler, V., Waschke, J., & Ludwig, R. J. (2018). Atomic Force Microscopy Provides new Mechanistic insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00485>
- Vielmuth, F., Walter, E., Fuchs, M., Radeva, M. Y., Buechau, F., Magin, T. M., ... Waschke, J. (2018). Keratins regulate p38MaPK- Dependent Desmoglein Binding Properties in Pemphigus. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00528>
- Vielmuth, F., Wanuske, M.-T., Radeva, M. Y., Hiermaier, M., Kugelmann, D., Walter, E., ... Spindler, V. (2018). Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 138, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.08.033>
- Völlner, F. (2016). *Flotillins as novel regulators of desmosome dynamics*. Goethe Universität Frankfurt am Main
- Völlner, F., Jawahir, A., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., ... Tikkanen, R. (2016). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris - like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6, 28820. <https://doi.org/10.1038/srep28820>
- von Philipsborn, A. C., Ferrer-Vaquero, A., Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., & Malaga-Trillo, E. (2005). Restricted Expression of Reggie Genes and Proteins during Early Zebrafish Development. *The Journal of Comparative Neurology*, 482, 257–272. <https://doi.org/10.1002/cne.20423>

- Wahl, J. K., Sacco, P. A., Mcgranahan-sadler, T. M., Sauppé, L. M., Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (1996). Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins : identification of unique and shared domains. *Journal of Cell Science*, *109*, 1143–1154.
- Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M.-T., Seifert, M., Pollmann, R., Eming, R., & Waschke, J. (2019). Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01128>
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, *130*, 21–54.
<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0420-0>
- Windoffer, R., Borchert-Stuhlträger, M., & Leube, R. E. (2002). Desmosomes : interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *Journal of Cell Science*, *115*, 1717–1732.
- Witcher, L. L., Collins, R., Puttagunta, S., Mechanic, S. E., Munson, M., Gumbiner, B., & Cowin, P. (1996). Desmosomal Cadherin Binding Domains of Plakoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(18), 10904–10909.
- Zajchowski, L. D., & Robbins, S. M. (2002). Lipid rafts and little caves: Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.*, *269*, 737–752.

VII. 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 nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen einen besonderen Dank aussprechen. Ohne sie hätte diese Arbeit niemals erst begonnen oder gar vollendet werden können.

Zunächst bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ritva Tikkanen, welche mir eine experimentelle Arbeit am Biochemischen Institut ermöglicht hat. Eine so engagierte Betreuung ist nicht selbstverständlich. Sie hatte stets ein offenes Ohr für viele Fragen und hat mich bei dem Prozess des Schreibens immer wieder motiviert.

Die Zeit im Labor hat mir sehr viel Spaß gemacht, was zum Großteil den tollen Mitarbeitern der AG Tikkanen zu verdanken ist. Dabei sind nicht nur die geduldigen Einführungen und Erläuterungen zu den Experimenten hängen geblieben, sondern auch die gemeinsamen Kaffeepausen und guten Gespräche. Besonders möchte ich Ralf Füllkrug danken, der mir mit seiner riesigen Hilfsbereitschaft eine große Stütze war.

Ein großer Dank geht ebenfalls an das gesamte Team der Zahnarzt-Praxis von Dr. Marcel Gutsuz. Mit eurer Hilfe konnte ich den beruflichen Einstieg parallel zur Fertigstellung der Dissertation meistern. Geduldig habt ihr euch immer wieder die Geschichten über meine Dissertation angehört. Ich bin sehr glücklich, Teil einer so großartigen Praxis zu sein.

Mein letzter und größter Dank gilt meinen Eltern. Angefangen bei den schulischen Hürden, gefolgt von der Wahl des Studiums und dem Examen, bis hin zur anschließenden Dissertation parallel zum Arbeitsalltag; ihr habt alles mit mir durchgestanden und mich dabei immer unterstützt. Ohne euch wäre mir das Studium nicht möglich gewesen. Dazu habt ihr mir stets vermittelt, dass ich alles schaffen kann. Innerhalb der Arbeit an der Dissertation wart ihr mir immer wieder eine Motivation und habt an mich geglaubt, auch wenn ihr nicht wusstet, wovon ich spreche.

Ohne euch wäre diese Arbeit nie fertig geworden. Ihr seid meine größten Vorbilder.