

**Interaktion von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen
und Proteinen des EGFR-Signalweges:
Etablierung der BioID-Methode**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sonja von Hayn

aus Frankfurt am Main

Gießen 2024

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

Gutachterin und Betreuerin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
Gutachter: PD Dr. Deckmann, Klaus

Tag der Disputation: 15.10.2024

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Pemphigus Vulgaris</i>	1
1.2	<i>Flotilline</i>	3
1.2.1	Aufbau der Flotilline	3
1.2.2	Vorkommen/ Lokalisation der Flotilline	5
1.2.3	Funktion der Flotilline	7
1.3	<i>MAPK-Signalweg</i>	10
1.3.1	Rolle von Flotillinen im MAPK-Signalweg	12
1.4	<i>BioID</i>	13
1.5	<i>Ziele der Arbeit</i>	16
2	Material	17
2.1	<i>Technische Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	17
2.2	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	20
2.3	<i>Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen</i>	23
2.4	<i>Kits zur DNA-Aufreinigung</i>	25
2.5	<i>Enzyme</i>	25
2.6	<i>Antikörper</i>	26
2.7	<i>Plasmide</i>	28
2.8	<i>Primer</i>	29
2.9	<i>Bakterienstämme</i>	29
2.10	<i>Zelllinien und Nährmedien</i>	29
2.11	<i>Software</i>	30
2.12	<i>Bildbearbeitung und Auswertung der Daten</i>	31
3	Methoden	32
3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	32
3.1.1	Mutagenese	32
3.1.1.1	PCR-Mutagenese	32
3.1.1.2	DNA-Aufreinigung und DpnI-Verdau	34

3.1.2	Transformation.....	34
3.1.3	Plasmid-Präparation	34
3.1.4	Sequenzierung	35
3.1.5	Glycerol-Stock	35
3.1.6	Klonierung	36
3.1.6.1	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	36
3.1.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.1.6.3	Restriktionsverdau (Inserts und Vektor)	38
3.1.6.4	Ligation.....	39
3.2	<i>Zellbiologische Methoden</i>	40
3.2.1	Zellkultivierung (HEK293T- und HaCaT-Zellen)	40
3.2.2	Subkultivierung/ Passagierung der Zelllinien (HEK293T und HaCaT)	41
3.2.3	Kryokonservierung.....	41
3.2.4	Transiente Transfektion (HEK-Zellen)	41
3.2.5	Zelllyse und Proteinextraktion	42
3.2.6	BioID mit Pulldown.....	42
3.2.7	Stabile Integration der Konstrukte in den <i>AAV safe harbor locus</i> (CRISPR/Cas9).....	44
3.2.8	Generieren von Zellklonen.....	44
3.2.9	Immunfluoreszenzfärbung	45
3.3	<i>Biochemische Methoden</i>	46
3.3.1	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	46
3.3.2	SDS-PAGE und Western-Blot	46
4	Ergebnisse	48
4.1	<i>Generieren von stabilen HaCaT-Zelllinien mit Flotillin-2-BirA*- Fusionsproteinen unter Anwendung der CRISPR/Cas9-Methode mit Integration in den AAV safe harbor locus</i>	48
4.1.1	Mutagenese der pcDNA3-Konstrukte für die Klonierung in pSH-EFIREs .	49
4.1.2	Klonierung von Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH- EFIREs	50
4.1.3	Überprüfung der Expression von Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs	51
4.1.4	Stabile Integration in HaCaT-Zellen und Expression von Flotillin2-BirA*- Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs.....	52

4.2	<i>Nachweis von BirA*, Flotillin-1 und Flotillin-2 in den Ausgangskonstrukten der pcDNA3-Plasmide mit der Immunfluoreszenz in F2-KO-HEK293T-Zellen</i>	54
4.3	<i>Etablierung der BioID zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in HEK-F2-Knockout Zellen</i>	56
4.3.1	Nachweis von Interaktion zwischen Flotillin-1 und Flotillin-2 zur Etablierung und Überprüfung der BioID	57
4.3.2	Nachweis von Flotillin-1 mit der BioID nach Denaturierung mit Harnstoff	59
4.3.3	Nachweis von EGFR und ERK als Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg	60
4.3.4	Interaktionsnachweis von total EGFR und Flotillin-1 als Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in Abhängigkeit von EGF	62
4.3.5	Nachweis von phosphoryliertem EGFR	64
4.3.6	Interaktionsnachweise von Flotillin-2 mit weiteren Proteinen des MAPK-Signalweges	65
5	Diskussion	67
5.1	<i>Etablierung eines Zellmodels zur Analyse des Interaktoms von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen</i>	67
5.2	<i>Analyse des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg mittels der BioID-Methode</i>	69
5.2.1	Lokalisation von BirA* und den Fusionskonstrukten in Flotillin-2 Knockout-HEK293T-Zellen	69
5.2.2	Die BioID konnte zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in HEK-F2-Knockout Zellen etabliert werden	70
5.3	<i>Ausblick</i>	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	79
8	Abkürzungsverzeichnis	80
9	Abbildungsverzeichnis	83
10	Tabellenverzeichnis	85
11	Literaturverzeichnis	86

12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	100
13 Danksagung.....	101

1 Einleitung

1.1 Pemphigus Vulgaris

Bei Pemphigus Vulgaris (PV) handelt es sich um eine bullöse Autoimmunerkrankung mit Blasen der Haut und Schleimhaut, welche durch die Produktion und Reaktion von Autoantikörpern hervorgerufen wird (Stanley & Amagai, 2006). Die Autoantikörper richten sich gegen desmosomale Strukturproteine und führen zu einem Verlust von intraepidermaler Adhäsion von Keratinozyten. Der Begriff „Pemphigus“ ist griechischen Ursprungs und leitet sich aus dem Wort pemphix für „Blase“ ab (Kneisel & Hertl, 2011a). Pemphigus Vulgaris weist eine sehr ungleichmäßige geografische, sowie ethnische Verteilung auf. Dabei wurde eine ausgeprägte Prädisposition insbesondere bei Ashkenazi-Juden im Mittelmeerraum beobachtet. Somit variieren die jährlichen Inzidenzraten für diese seltene Erkrankung zwischen 0,76 Fällen pro eine Millionen in Finnland (Kridin & Schmidt, 2021; Porro et al., 2019) und 32,0 Fällen pro gleicher Bevölkerungsanzahl bei jüdischen Personen in den Vereinigten Staaten (Kridin & Schmidt, 2021). Pemphigus kann in jeder Altersgruppe diagnostiziert werden, wobei die meisten Patienten zwischen 45 und 65 Jahren alt sind. Es wurde in bestimmten Regionen jedoch auch ein Beginn im jüngeren und im höheren Alter festgestellt (Porro et al., 2019). Insgesamt sind etwas mehr Frauen als Männer betroffen (Kridin & Schmidt, 2021).

Es gibt verschiedene Arten des Pemphigus, wobei PV, mit 70% aller Fälle, und Pemphigus Foliaceus (PF), mit 20-30%, die häufigsten Formen darstellen. Daneben gibt es noch seltenere Sonderformen wie den Paraneoplastischen Pemphigus (PNP), der lymphoproliferative Störungen hervorruft, den Pemphigus herpetiformis und den IgA Pemphigus (Joly & Litrowski, 2011; J. H. Kim & Kim, 2019). Die verschiedenen Krankheitsgruppierungen unterscheiden sich hinsichtlich der klinischen und histologischen Merkmale der Patienten, sowie der unterschiedlichen Proteine, die von den jeweiligen Antikörpern erkannt werden. So richten sich Antikörper bei PV gegen Strukturproteine der Desmosomen, hauptsächlich gegen Desmoglein 1 und 3 (Amagai et al., 1991; Eyre & Stanley, 1988; Porro et al., 2019; Stanley et al., 1984), und verursachen eine Akantholyse der suprabasalen Hautschicht der Epidermis (Kneisel & Hertl, 2011b). Weiter wird diese Art der Krankheitsform noch in einen mukosal-dominanten Typ und in einen mukokutanen Typ unterteilt. Bei ersterem richten sich die Antikörper nur gegen das Desmoglein-3 Protein, welches die basale Hautschicht betrifft, und folglich eine Blasenbildung in der Schleimhaut hervorruft. Bei der mukokutanen Form ist sowohl die Schleimhaut, als auch die Haut betroffen, da die Bildung von

Autoantikörpern gegen Desmoglein-1 und -3 stattfindet (Amagai et al., 1999; Harman et al., 2001; Porro et al., 2019). Dazu ist beim PF ein deutlicher Unterschied zu verzeichnen. Hier richten sich die Antikörper nur gegen das Desmoglein-1 (Mahoney et al., 1999), welches die Akantholyse und Blasenbildung in der obersten Hautschicht der Epidermis zur Folge hat und nur rein epidermal, nicht mukosal auftritt (Amagai et al., 1999; Hashimoto et al., 1990; A. S. Payne et al., 2004).

Der Verlauf der chronischen Erkrankung PV zeigt sich in Schüben, mit Abschnitten der Besserung und Verschlechterung der Symptomatik. Durch eine Ruptur der Blasen entstehen schmerzhafte Erosionen, welche verkrusten und auch durch die Lokalisation im Mund- und Rachenbereich die Nahrungsaufnahme erschweren. Gleichzeitig führen diese Hautläsionen zu einer verminderten Schutz- und Barrierefunktion der Haut. Neben einem bedingten Flüssigkeitsverlust mit Folge einer Dehydration kann auch eine Superinfektion durch eindringende Bakterien verursacht werden, welche zu einem septischen Schock führen kann (Porro et al., 2019; Sharma et al., 2007). Diese Faktoren können einen tödlichen Verlauf der Erkrankung bedingen (Pollmann et al., 2018), und PV war vor Einführung einer steroidalen Therapie mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden (Cholera & Chainani-Wu, 2016). Heute ist die Letalität zum größten Teil auf die Nebenwirkungen von Kortikosteroiden und Immunsuppressiva zurückzuführen und wird auf eine Rate von 5 bis 10% geschätzt (Joly & Litrowski, 2011).

Momentan wird als Therapieform zur Verminderung der Symptomatik des Pemphigus eine systematische Immunsuppression veranlasst, welche jedoch mit Nebenwirkungen bei Langzeittherapie verbunden ist. Für die Zukunft sind daher Alternativen zu entwickeln, welche Komplikationen vermeiden und eine langfristige Remission des Krankheitsbildes erreichen (Pollmann et al., 2018). Zur Suppression des Immunsystems werden Kortikosteroide, wie Glucokortikoide (z.B. Prednisolon), verabreicht, aber auch adjuvante Immunsuppressiva wie Azathioprin (AZA) und Mycophenolatmofetil (MMF). AZA und MMF werden häufig als kortikosteroidsparende Medikamente eingesetzt und reduzieren die durch Steroide verursachten Nebenwirkungen (Meurer, 2012; Zhao et al., 2021). Eine weitere Therapieform stellt unter anderem Rituximab dar, welches als monoklonaler Anti-CD-20-Antikörper gegen B-Lymphozyten gerichtet ist und somit die pathogenen Autoantikörper im Serum verringert (Ahmed et al., 2006; Joly et al., 2007). Die Gabe von hochdosierten, nicht pathogenen Immunglobulinen, welche die Wirksamkeit von systemischen Immunsuppressiva erhöhen (Enk et al., 2009), sowie eine Immunadsorption, bei der pathogene Antikörper aus dem Blut entfernt werden (Porro et al., 2019; van Beek et al., 2019), stellen weitere Therapieoptionen dar. Eine neue Therapieform wird durch die Blockierung des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) mit Efgartigimod erzielt, wodurch eine schnelle und spezifische Senkung der

IgG-Serumspiegel ohne bisher beobachtete Nebenwirkungen erreicht wird (Ulrichs et al., 2018).

1.2 Flotilline

1.2.1 Aufbau der Flotilline

Die Flotillin-Familie besteht aus Flotillin-1 und Flotillin-2 bzw. Reggie-2 und Reggie-1. Diese unterschiedliche Nomenklatur ist darauf zurückzuführen, dass diese Proteine zur gleichen Zeit von zwei unterschiedlichen Forschungsgruppen unabhängig voneinander entdeckt wurden (Bickel et al., 1997; Schulte et al., 1997). Die Arbeitsgruppe von Bickel et al. identifizierten die „Flotilline“ als Bestandteile von Caveolae und fanden heraus, dass sie ein spezifischer Marker für Triton-unlösliche Membranfraktionen sind. Die Eigenschaft dieser Proteine war namensgebend: sie schwimmen wie eine „Flottille von Schiffen“ (Flottille: spanisch für Flotte) (Bickel et al., 1997). Schulte et al. entdeckte eine Proteinfamilie in den retinalen Ganglienzellen des Goldfisches. Nach einer Läsion des Sehnervs sind die Proteine mit einer Hochregulierung beim Regenerationsprozess involviert. Aufgrund dieser Beteiligung erhielten sie den Namen „Reggies“ (abgeleitet von Regeneration) (Schulte et al., 1997).

Die gesamte Aminosäuresequenz von beiden Proteinen ist innerhalb einer Spezies im Schnitt zu 52,5% identisch (Málaga-Trillo et al., 2002). Außerdem sind Flotilline über viele Spezies hinweg ubiquitär exprimiert und hochkonserviert (Babuke & Tikkanen, 2007). Im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass Flotilline aufgrund ihrer gerüstbildenden Funktion in Caveolae Transmembranproteine darstellen (Bickel et al., 1997; Volonté et al., 1999), wurde in neueren Forschungsarbeiten kaum bis keine derartige Lokalisation nachgewiesen. Vielmehr sind die Proteine über die zytosolische Seite mit Membranmikrodomänen (Rafts) verbunden (Abbildung 1 A), welche mit Cholesterin und Glykosphingolipiden assoziiert- und in Detergenzien unlöslich sind (Banning et al., 2011; Kurrle et al., 2012; Morrow et al., 2002).

Flotilline besitzen im C-terminalen und im N-terminalen Bereich jeweils zwei unterschiedliche Domänen (Abbildung 1 B). Der C-Terminus enthält eine konservierte Flotillin-Domäne mit vielen Alanin- und Glutamat (AEAE)- Wiederholungen. Diese Domäne setzt sich strukturell aus drei sogenannten „Coiled-Coil“-Abschnitten zusammen, welche vermutlich durch das Vorhandensein von Alpha-Helices miteinander assoziiert sind und dadurch eine Oligomerisierung als wichtige Rolle in der Funktion der Flotilline ermöglichen (Bickel et al., 1997; Neumann-Giesen et al., 2004; Solis et al., 2007a; Volonté et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bildung von

Flotillin-Oligomeren jeweils von der zweiten und teilweise von der ersten Coiled-Coil-Struktur abhängig ist (Solis et al., 2007).

Flotilline können sowohl Homo- als auch Hetero-Oligomere bilden. Für eine Endozytose des Komplexes aus der Plasmamembran erfolgt nach EGF (*Epidermal Growth Factor*) -Stimulation die Bildung von Heterooligomeren. Die Heterooligomerisierung von Flotillinen ist essenziell für die endozytotische Relokalisierung dieser Proteine. Durch die Stimulation mit EGF ändert sich die Größe der Heterooligome, die Gesamtzahl von Flotillin-1 und Flotillin-2 sowie deren Verhältnis zueinander bleibt dabei unverändert. Es wird davon ausgegangen, dass die Größenveränderung durch die Phosphorylierung zur Endozytose des Komplexes aus der Plasmamembran heraus führt (Babuke et al., 2009). Eine Verankerung der Flotilline mit der Plasmamembran wird sowohl über Oligomerisierung, als auch über Myristylierung, Palmitoylierung und Cholesterinverbindungen vermittelt. Während Flotillin-1 nur über einen einzigen Palmitoylrest an Cys34 mit der Membranmikrodomäne verbunden ist (Morrow et al., 2002), ist Flotillin-2 mit drei Palmitatresten an Cys4, -19 und -20 verknüpft, sowie über einen Myristylrest an Gly2 (Neumann-Giesen et al., 2004).

Der N-Terminus ist charakteristisch für die Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C (SPFH) Proteinsuperfamilie und wird auch als Prohibitin-Homologie-Domäne (PHB) bezeichnet (Browman et al., 2007; Tavernarakis et al., 1999). Dieser Abschnitt dient vor allem der Funktionsgebung der Flotilline, welche über eine Phosphorylierung der integrierten Tyrosinreste gesteuert werden kann (Kurrle et al., 2012a). Für den Endozytosevorgang spielt die Phosphorylierung von Y160 bei Flotillin-1 und Y163 bei Flotillin-2 eine entscheidende Rolle (Riento et al., 2009a). So ist beispielsweise die Mutante Y163F von Flotillin-2 durch Austausch eines Tyrosins (Y) gegen ein Phenylalanin (F) nicht mehr an dieser Stelle phosphorylierbar und daher zur Endozytose unfähig (Neumann-Giesen et al., 2007). Außerdem ist eine Oligomerisierung mit Flotillin-1 nur noch schlecht gegeben (Babuke et al., 2009a). Für diese Funktion spielt neben den Coiled-Coil-Strukturen im C-Terminus auch der Tyrosinrest 163 in Flotillin-2 eine entscheidende Rolle (Kurrle et al., 2012).

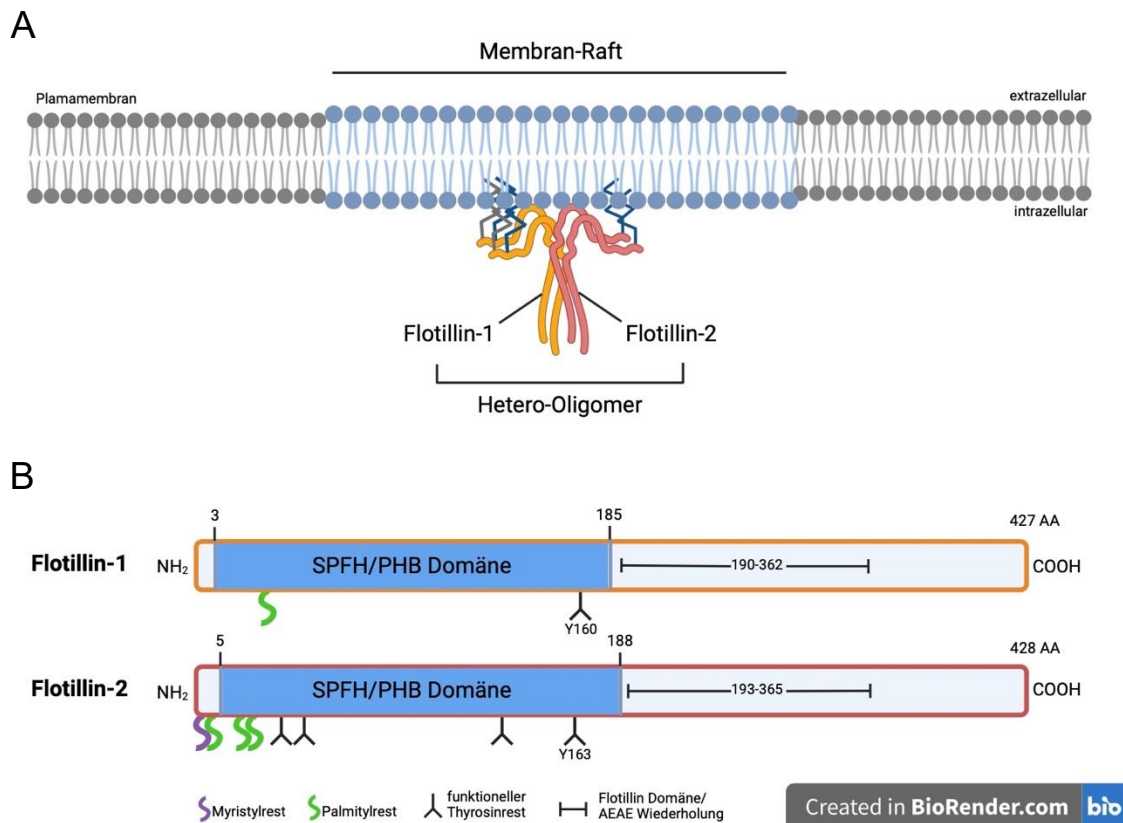


Abbildung 1: Aufbau von Flotillin-1 und Flotillin-2, modifiziert nach (Kurrle et al., 2012b).

(A) Assoziation von Flotillin-Heterooligomeren in einer Membranmikrodomäne (Membran-Raft). In der Plasmamembran (grau) ist ein Membranraft (blau) integriert. Flotillin-1 (gelb) und Flotillin-2 (rot) sind über Palmityl- bzw. Myristylreste intrazellulär in der Raftmembran verankert. (B) Der detaillierte Aufbau von Flotillin-1 und Flotillin-2. In Blau ist jeweils der N-Terminus mit der SPFH bzw. PHB-Domäne dargestellt, welcher die funktionellen Tyrosinreste enthält und für die Phosphorylierung bei gleichzeitiger Funktionsmodulierung der beiden Proteine verantwortlich ist. Der C-Terminus wird durch die konservierte „Flotillin-Domäne“ mit vielen (AEAE)-Wiederholungen assoziiert und enthält Coiled-Coil-Strukturen, welche für die Oligomerisierung wichtig sind. Die Verankerungselemente für die Membran sind in grün (Palmitylrest) und in lila (Myristylrest) dargestellt.

1.2.2 Vorkommen/ Lokalisation der Flotilline

Flotilline kommen in unterschiedlichen Mengen in allen Gewebearten vor (Bickel et al., 1997; Volonté et al., 1999). So werden sie beispielsweise in Hirn-, Herz-, Lunge- und Plazentagewebe besonders hoch, und in der Bauchspeicheldrüse sowie in der Leber nur niedrig exprimiert (Edgar & Polak, 2001). Generell ist die Lokalisation der Flotilline von einer großen zellspezifischen Variation geprägt, was darauf hindeutet, dass sich die subzelluläre Verteilung der kleinen Proteinfamilie sehr dynamisch präsentiert (Santamaría et al., 2003). So kommen Flotilline zum Beispiel in HaCaT-Zellen (humane spontan immortalisierte Keratinozyten), Astrozyten und embryonalen Fibroblasten (MEF) zum Großteil in vesikulären Strukturen vor. Auch wenn Flotilline in Endosomen

häufig vorkommen, eignen sie sich trotzdem als Marker von Membran-Rafts in der Plasmamembran. In HeLa-Zellen sowie menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7) befinden sich Flotilline hauptsächlich auf der Innenseite der Zellmembran und nur zu einem geringen Teil in vesikulären Elementen (Glebov et al., 2006; Kokubo et al., 2003). Im Allgemeinen gestaltet sich die Lokalisation sowie der Transport von Flotillin-Proteinen sehr variabel und kann von Chemokinen, bestimmten Proteinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Auch ist die subzelluläre Lokalisation dynamisch, wie am Beispiel des Wachstumsfaktors EGF deutlich wird, welcher sich auf den Flotillin-Transport auswirkt. Dabei wird Flotillin-2 bzw. Flotillin-1 nach EGF-Stimulation Tyr163/Tyr160-abhängig in das späte Endosom transportiert (Kurrle et al., 2012; Neumann-Giesen et al., 2007; Riento et al., 2009). Die Lokalisation wird aber auch von anderen Faktoren wie den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) oder Insulin beeinflusst (Kurrle et al., 2012). Im Rahmen des Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwegs (MAPK-Signalwegs) werden sowohl Flotillin-1 als auch Flotillin-2 verstärkt exprimiert (Banning et al., 2012a). Dieser Vorgang verläuft asymmetrisch, da die Abhängigkeit von Flotillin-1 zu Flotillin-2 signifikant größer ist als umgekehrt und ein Anstieg des Flotillin-2 Proteins in der Regel auch einen Anstieg des Flotillin-1 Proteins induziert (Solis et al., 2007).

Weitere wichtige Faktoren für die variable Lokalisation stellen posttranslationale Modifikationen wie die Palmylierung und die Myristylierung dar, wodurch unter anderem die Affinität der jeweiligen Proteine zur Plasmamembran reguliert werden kann (Bijlmakers & Marsh, 2003). Aber auch die Fähigkeit zur Oligomerisierung (Homo- und Heterooligomerisierung) ist eine wesentliche Voraussetzung für eine Assoziation mit Membran-Rafts, für die Beteiligung an die EGF-Signalübertragung und die Endozytose. So befindet sich ein großer Teil der Flotilline nach einer Oligomerisierung häufig an der Plasmamembran (Babuke et al., 2009; Neumann-Giesen et al., 2004; Neumann-Giesen et al., 2007).

Des Weiteren erstreckt sich ihr Vorkommen neben vesikulären Strukturen, wie frühe und späte Endosomen, Phagosomen, Exosomen und Lysosomen (Babuke et al., 2009a; Dermine et al., 2001a; Glebov et al., 2006; Staubach et al., 2009; Stuermer et al., 2004) sogar auch auf eine Translokation in den Zellkern. Dies konnte jedoch im Gegensatz zu Flotillin-2 nur bei Flotillin-1 festgestellt werden (Santamaría et al., 2003), da Flotillin-2 durch die Myristylierung und Palmylierung fester an die Membran integriert ist (Bijlmakers & Marsh, 2003).

Auch wenn der Transport und die Lokalisation der Flotilline im Golgi-Apparat nach wie vor diskutiert wird, gibt es Hinweise darauf, dass die Beteiligung dieser Struktur am Flotillin-Verkehr abhängig von zelltypspezifischen Prozessen ist (Gkantiragas et al.,

2001; Pust et al., 2010). Da Flotilline zytoplasmatische Proteine sind, welche wie oben beschrieben durch Fettsäuremodifikationen an Membranen assoziiert sein können und ihre Synthese in freien Ribosomen stattfindet, müssen sie für ihre Herstellung nicht durch das ER bzw. den Golgi geleitet werden. Außerdem wurden bisher die Sortiermotive noch nicht eindeutig charakterisiert, welche für die subzelluläre, zielgerichtete Verteilung von Flotillinen an den jeweiligen Bestimmungsort zuständig sind (Banning et al., 2011). Zudem können auch pathologische Prozesse, wie beim Pemphigus (siehe dazu 1.1), die räumliche Anordnung von Flotillinen verändern (Völlner et al., 2016).

1.2.3 Funktion der Flotilline

Flotilline weisen sehr vielfältige, teils zelltypisch unterschiedliche Funktionen auf und sind an diversen Prozessen meist unterstützend beteiligt. Dabei sind die beiden Familienmitglieder Flotillin-1 und Flotillin-2 funktionell meist eng miteinander verknüpft, können jedoch in verschiedenen Prozessen auch untereinander einzeln differenzierte Aufgaben erfüllen.

Die Flotillin-Proteinfamilie nimmt eine essenzielle Rolle für die Integrität und Stabilität von Strukturproteinen der Zell-Zell-Kontakte ein (Guillaume et al., 2013a). Neben der Funktion sowohl als Signalvermittler als auch als gerüstbauendes Element, unterstützen Flotilline den Aufbau und die Organisation interzellulärer Haftkontakte (Kurrle et al., 2013a; Resnik et al., 2011). Des Weiteren konnte eine Interaktion von Flotillinen mit desmosomalen Strukturproteinen (Desmogleinen und Plakoglobin/ γ -Catenin) festgestellt werden, sowie eine verminderte Adhäsion der Desmosomen beim Fehlen von Flotillinen (Kurrle et al., 2013; Völlner et al., 2016). Flotilline zeigen auch ihre wichtige Funktion für die Integrität der Desmosomen in Keratinozyten unter pathogenen Bedingungen. Nach PV-IgG (Pemphigus vulgaris Autoantikörper vom Typ IgG) Behandlung konnte beobachtet werden, dass sich sowohl die Lokalisation des Desmoglein-3, als auch die des Flotillin-2 änderte. Die Proteine befanden sich größtenteils ungeordnet in zytoplasmatischen Vesikeln der Zelle und lagen nur noch im geringen Maße in der Plasmamembran vor, welches die desmosomale Integrität beeinträchtigen kann und folglich die Zelladhäsion negativ beeinflusst (Völlner et al., 2016).

An der Zellmembran unterstützen Flotilline die Clusterbildung der transmembranen Frachtproteine vor der Endozytose. Dazu bilden sie nach Stimulation und Oligomerisierung spezifische präendozytäre Cluster mit transmembranären Frachtmolekülen wie APP (Amyloid-Precursor-Protein), DAT (Dopamintransporter) oder dem EGFR (Epidermal growth factor receptor) (Amaddii et al., 2012a; Koo et al., 1996;

Schneider et al., 2008). Da beispielsweise Flotillin-1 die Clusterbildung von EGFR an der Plasmamembran nach EGF-Stimulation, jedoch nicht die EGFR-Endozytose, beeinflusst, geht man davon aus, dass Flotilline keine direkte Rolle bei der endozytotischen Aufnahme von Frachtmolekülen übernehmen. Die Internalisierung von APP, DAT und EGFR erfolgt durch CME („clathrin-mediated-endocytosis“), jedoch ist der Vorgang auf Flotillin-1 angewiesen, welches die Proteine für die Endozytose vorbereitet und organisiert (Meister et al., 2014). Des Weiteren wird vermutet, dass Flotilline in der Lage sind, Cholesterin zu erkennen und mit diesem eine Bindung einzugehen (Strauss et al., 2010). Außerdem ist die Aufnahme der Flotilline, ob als Frachtmolekül oder als struktureller, endozytotischer Bestandteil, von Cholesterin abhängig (Ge et al., 2011; Schneider et al., 2008).

Für die Funktion von zellulären Ladungs- und Sortiervorgängen sind Flotillin-Domänen an der Plasmamembran, in frühen, späten und Recycling-Endosomen sowie in Exosomen lokalisiert. In Endosomen sind sie an Sortiervorgängen der Frachtproteine beteiligt. Dies gilt zum einen für Recycling-Endosomen, bei denen überexprimierte Flotilline mit tubulovesikulären Recyclingkompartimenten assoziiert sind und eine verminderte Expression von Flotillinen das Recycling des Transferrinrezeptors und des E-Cadherins beeinträchtigt (Meister & Tikkanen, 2014; Solis et al., 2012, 2013) und zum anderen für den retrograden Transport zum Golgi-Apparat sowie zum Endoplasmatischen Retikulum. Flotillin-1 ist aber auch verantwortlich für die Sortierung zu den intraluminalen Vesikeln (ILV) multivesikulärer Körper (MVBs), welche als Exosomen nach Verschmelzung der MVBs mit der Plasmamembran in den extrazellulärraum freigesetzt werden (Meister et al., 2017). Die Beteiligung von Flotillinen bei Sortierprozessen sowie bei der Bildung exosomaler Vesikel in Endosomen wurde bisher vielseitig untersucht und bestätigt. (Meister & Tikkanen, 2014; Raposo & Stoorvogel, 2013). So wurde in Studien durch Herunterregulierung von Flotillin-1 und Flotillin-2 unter anderem beobachtet, dass diese keine signifikante Wirkung auf die Gesamtfreisetzung von Exosomen haben, jedoch die Sortierung spezifischer Proteine (wie Caveolin-1 und Annexin-A2) in Exosomen beeinflussen (Phuyal et al., 2014). Allerdings sind noch detaillierte mechanistische Erkenntnisse zur Rolle der Flotilline bei der Ladungssortierung für die Exosomensekretion notwendig.

Speziell Flotillin-1 spielt beim endosomalen Transport eine wichtige Rolle und interagiert dabei mit ESCRT („*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*-Proteinen“). Unter anderem ist Flotillin-1 für den Abbau des EGFR verantwortlich und zeigt Wechselwirkungen mit Untereinheiten der ESCRT-Komplexe und ist an der Erkennung und Sortierung von Ubiquitin-modifizierten Frachtproteinen in Richtung Lysosomen mit beteiligt (Meister et al., 2017).

Flotilline sind auch an bestimmten Signalwegen wie dem MAPK beteiligt (siehe Kapitel 4.3), welcher durch den EGF stimuliert wird. Sie unterstützen dabei nicht nur die Endozytose und den Abbau von EGFR, sondern nehmen auch eine wichtige funktionelle Rolle im Signalweg ein. Dabei kann Flotillin-1 regulativ als strukturelles Gerüst und Verstärker des MAPK-Signalwegs wirken (Amaddii et al., 2012a) und Flotillin-2 Einfluss auf das Zytoskelett erzielen. Dabei findet eine strukturelle Umorganisation der Aktinfilamente mit Anpassung auf die bevorstehenden Wachstums- und Differenzierungsprozesse statt. Beide Flotilline werden im MAPK-Signalweg nach Aktivierung des EGFR durch Src-Kinasen phosphoryliert und nach anschließender Oligomerisierung zu späten Endosomen transloziert (Neumann-Giesen et al., 2004, 2007).

Wie zuvor im Rahmen des MAPK-Signalwegs schon erwähnt, spielt die Proteinfamilie auch eine Rolle bei der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts in Zellen. Um die Dynamik des Zytoskeletts zu steuern, können sie Multiprotein-Signalkomplexe in Rafts rekrutieren, welches durch Interaktion mit Mitgliedern der Vinexin-Familie ermöglicht wird (Langhorst et al., 2005). Flotillin-2 ist an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und in der Lage, bei Überexpression die Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Vorsprüngen zu erzeugen (Neumann-Giesen et al., 2007), welche das invasive Wachstum von Melanomzellen fördern können (Hazarika et al., 2004).

Eine weitere Funktion der Flotilline ist die der Zelladhäsion, bei der sie abhängig vom Zelltyp mit bestimmten Adhäsionsproteinen, wie die von Adhärenzkontakten, interagieren (Chartier et al., 2011; Kurrle et al., 2013b; Roitbak et al., 2005; Solis et al., 2012). Weiterhin sorgen sie durch die Bildung von Mikrodomänen mit Adhärenzproteinen für die erforderliche Integrität und Stabilität von Zell-Zell-Kontakten. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass eine verminderte Expression von Flotillin mit einem Adhäsionsverlust einhergeht (Guillaume et al., 2013b). Desmosomen stellen interzelluläre Haftkontakte dar, deren Adhäsions- bzw. Adapterproteine (Plakoglobin bzw. γ -Catenin und Desmoglein-3) mit Flotillinen assoziiert sind. Es wird angenommen, dass diese Interaktion zu einer Organisation von Membran-Rafts führt, welche eine Anlagerung von Adhäsionsmolekülen bedingt und dadurch den Aufbau interzellulärer Haftkontakte induziert. Dabei fungieren Flotilline nicht nur als Gerüstbildner für die Haftproteine, sondern sind hierbei auch als Signalvermittler tätig. In HaCaT-Zellen konnte eine Kolokalisation von Flotillin und Desmogleinen festgestellt werden. Eine Abwesenheit von Flotillin in Keratinozyten führte zu einer verringerten Expression von Desmoglein-3, was mit einem Adhäsionsverlust einherging (Kurrle et al., 2013b; Resnik et al., 2011; Völlner et al., 2016c).

Auch scheinen die in B- und T-Lymphozyten exprimierten Flotilline durch Steuerung des Aufbaus von Signalkomplexen und Zytoskelett-Neuanordnungen, welche für eine verlängerte Signalübertragung nach T-Zell-Rezeptorstimulation erforderlich sind, eine wesentliche Rolle bei der T-Zell Aktivierung zu spielen (Langhorst et al., 2005; Solomon et al., 2002). Beim Vorgang des Neuriten- bzw. Axonwachstums sowie deren Regeneration sind Flotillin-1 und Flotillin-2 ebenso beteiligt (Schulte et al., 1997) und werden während der Axonregeneration hochreguliert (Bickel et al., 1997). Des Weiteren sind Flotilline bei der Phagozytose involviert. Studien zeigen, dass mit Flotillin-1 angereicherte Rafts auf bestimmten Phagosomen vorkommen und diese keine für Phagosomen typischen Membranproteine (sog. Lysosomal-assoziierte Membranproteine wie LAMP1) enthalten. Das auf reifen Phagosomen existierende Flotillin-1 wird stückweise akkumuliert und stammt nicht aus der Plasmamembran beim Vorgang der Phagozytose (Dermine et al., 2001b).

1.3 MAPK-Signalweg

Der MAPK-Signalweg ist ein zentraler Mechanismus in der zellulären Signaltransduktion, der eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Antworten spielt. Dieser evolutionär hochkonservierte Weg reguliert vielfältige biologische Prozesse, darunter Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Stressreaktionen und zelluläres Überleben (Meister et al., 2013; Von Kriegsheim et al., 2008; Yoon & Seger, 2006). Der MAPK-Signalweg stellt einen wichtigen Weg für viele Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), wie den EGFR dar. Dabei besteht er aus einer Kaskade von hochkonservierten Kinasen, die in einer genau abgestimmten Reihenfolge aktiviert werden (Abbildung 2). Diese MAPK-Kaskade gliedert sich dabei in drei Hauptbestandteile: MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), MAPK-Kinase (MAP2K) und MAPK (Will, 2014).

Der Hauptzweck dieses Signalwegs besteht darin, extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren oder Stressreize, in zelluläre Antworten zu übersetzen. Dies geschieht durch Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERK), der c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und der p38-Kinasen. Die drei aufgeführten MAP-Kinase-Familien unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer aktivierenden Liganden sowie ihrer Wirkung. Alle MAPKs werden aktiviert, indem sie durch phosphorylierende Kinasen phosphoryliert werden (Meister et al., 2013).

Der in Abbildung 2 dargestellte MAPK-Signalweg wird durch extrazelluläre Ligandenbindung des EGF an den monomeren, transmembranären EGFR aktiviert. Diese Bindung induziert eine Dimerisierung dieser RTK (Zhou et al., 1993), gefolgt von

einer Aktivierung des EGFR durch die Autophosphorylierung von Tyrosinresten in seiner intrazellulären Domäne (Lemmon & Schlessinger, 2010; Yarden & Schlessinger, 1987). Die phosphorylierten Tyrosinreste des EGFR stellen dabei Bindungsstellen für Proteine wie das Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) dar, die mit ihren Src-Homologie-2-Domänen (SH2-Domänen) an den aktivierten Rezeptor binden. Grb2 rekrutiert dann das Protein SOS (*Son of Sevenless*). Dabei ist Grb2 über dessen SH3-Domäne mit der Polyprolinregion des SOS assoziiert (Batzer et al., 1994; Buday & Downward, 1993; Li et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993). Folglich aktiviert Sos wiederum Ras (ein kleines G-Protein). Sos stellt dabei eine wichtige Funktion dar, indem es als Guanin-Austauschfaktor (GEF) für Ras dient (Chardin et al., 1993). Durch die GTP-Bindung wird Ras aktiviert und an die Ras-bindende Domäne (RBD) des Raf-Proteins (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) gebunden (Moodie et al., 1993). Mit anschließender Aktivierung der MAP3K Raf wird die nächste Stufe der Kaskade induziert. Das sonst im Zytosol vorkommende, inaktive Raf wird an die Plasmamembran rekrutiert (Marais et al., 1995) und phosphoryliert an Ser218 und Ser222 die MAP2K MEK (MAPKK/ Erk Kinase), eine weitere Kinase dieses Signalwegs (Alessi et al., 1994; Kyriakis et al., 1992). MEK wiederum aktiviert durch Phosphorylierung im Bereich des Thr202-Xaa-Tyr204-Motivs die MAPK Erk (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) (Crews et al., 1992; D. M. Payne et al., 1991). Erk ist das Zielprotein dieser Signalkaskade und kann entweder Substrate im Zytosol oder nach Translokation in den Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren und andere nukleäre Zielproteine phosphorylieren (Chen et al., 1992). Dies führt zu einer Vielzahl von zellulären Reaktionen, darunter Zellproliferation, Differenzierung und zelluläres Überleben. Somit spielt dieser MAPK-Signalweg eine grundlegende Rolle in der Vermittlung von Wachstums- und Überlebenssignalen in verschiedenen Zelltypen. (Von Kriegsheim et al., 2008; Yoon & Seger, 2006). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Signalübertragung, die durch den EGFR und die MAPK-Kaskade vermittelt wird, nicht ausschließlich an der Plasmamembran erfolgt, sondern teils in Endosomen stattfindet (Fehrenbacher et al., 2009). Dysregulationen dieses Signalwegs sind mit verschiedenen Krankheiten verbunden, darunter Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und entzündliche Zustände. Daher ist auch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für das Verständnis der molekularen Mechanismen dieses Signalwegs von großer Bedeutung (Meister et al., 2013; Tidyman & Rauen, 2009).

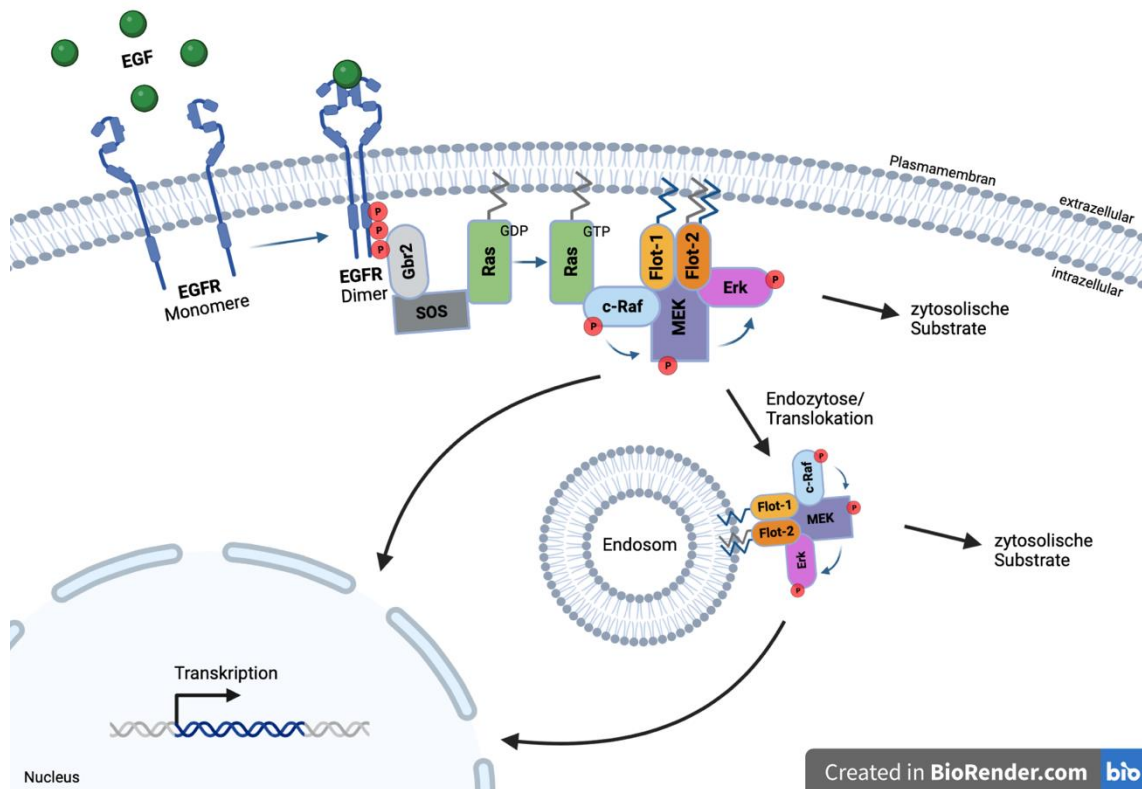


Abbildung 2: Darstellung des MAPK-Signalwegs, modifiziert nach (Meister et al., 2013).

Die Ligandenbindung mittels EGF führt zur Dimerisierung und somit zur Aktivierung des EGF-Rezeptors an der Plasmamembran. Nach dessen Phosphorylierung werden weitere Signalkomponenten des MAPK-Signalwegs in einer Kaskade rekrutiert, welche zytosolische oder nukleäre Zielsubstrate phosphorylieren und folglich eine Vielzahl zellulärer Reaktionen induzieren. Dabei kann die Signalübertragung nicht nur an der Plasmamembran erfolgen, sondern auch an Endosomen. Flotilline spielen sowohl für die Aktivierung des EGFR, als auch für die Funktion als Gerüstproteine für den MAPK-Signalweg eine essenzielle Rolle.

1.3.1 Rolle von Flotillinen im MAPK-Signalweg

Flotilline sind nicht nur entscheidend für eine adäquate Aktivierung des EGFR und somit des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs, sondern übernehmen auch als Gerüstbildner eine essenzielle Funktion dieses Wegs. Beide Flotilline (Flotillin-1 und Flotillin-2) assoziieren mit EGFR und bilden einen stabilen Komplex (Amaddii et al., 2012). Nach EGF-Stimulation werden die Flotilline durch Src-Tyrosinkinasen (*sarcoma-Tyrosinkinasen*) an Tyrosinresten phosphoryliert (Neumann-Glesen et al., 2007; Riento et al., 2009) und in späte Endosomen transloziert (Babuke et al., 2009). Die Bindung von Flotillinen an EGFR kann dabei auch unabhängig von der Aktivität der EGFR-Kinase erfolgen, da Flotilline auch bei gehemmter Kinaseaktivität an den Rezeptor binden. Ihre Interaktion mit EGFR ist somit auch ohne EGF-Stimulation nachweisbar (Huanget al., 2003; Wang et al., 2007).

Die Stimulation mit EGF führt neben einer Tyrosinphosphorylierung von Flotillinen auch zu einer Zunahme der Größe von Flotillin-Oligomeren (Babuke et al., 2009), sowie zu deren Endozytose. Diese Erkenntnisse signalisieren den Zusammenhang zwischen Flotillinen und EGFR-Signalen (Amaddii et al., 2012; Hofman et al., 2008). Entsprechend führt das Fehlen von Flotillin-1 zu einer beeinträchtigten EGFR-Aktivierung und zu einer reduzierten Rezeptorphosphorylierung. Außerdem konnte auch eine veränderte Aktivierung der MAPK Erk beobachtet werden, die nach EGF-Stimulation deutlich reduziert war (Meister, 2014).

Die Signalübertragung des MAPK-Signalwegs erfolgt sowohl an der Plasmamembran als auch an den Membranen von signalgebenden Endosomen (Fehrenbacher et al., 2009; Howe et al., 2001). In diesem Zusammenhang spielen MAPK-Gerüstproteine eine entscheidende Rolle. Im Allgemeinen erhöhen Gerüstproteine wie Flotilline nicht nur die Effizienz der Signalübertragung, sondern auch die Spezifität (Heinrich et al., 2002; Locasale et al., 2007; Meister et al., 2013). Da die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen von zwei aufeinanderfolgenden Kinasen im Zytosol sehr gering ist, würde eine diffusionsabhängige Signalübertragung ineffizient sein. Daher spielt die Gerüstfunktion von den Proteinen für die Weiterleitung von Signalen in subzelluläre Regionen eine entscheidende Rolle. Sie verknüpfen verschiedene Komponenten eines Signalwegs zu Multienzymkomplexen und fördern ihre räumliche Nähe zueinander. Dies ermöglicht es, dass Signalpartner effizient miteinander interagieren und ihre Funktionen koordinieren können. Außerdem sind die Kinasen innerhalb dieses Komplexes von deaktivierenden Phosphatasen abgeschirmt, und eine mögliche Interferenz mit anderen Signalkaskaden wird minimiert (Heinrich et al., 2002; Locasale et al., 2007; Meister et al., 2013). Flotillin-1 geht eine Assoziation mit spezifischen Komponenten wie Raf, MEK und Erk ein und fungiert daher als Gerüstprotein. Beispielsweise konnte in Interaktionsstudien mit MAPK-Komponenten gezeigt werden, dass Flotillin-1 mit der Linker-Region und/oder der Kinase-Domäne von Raf verknüpft ist. Darüber hinaus trägt es zur Stabilisierung der Signalübertragung in diesem Pfad bei. Flotillin-1 besitzt die Fähigkeit Kinasen des MAPK-Signalwegs zu binden, sowie die Erk-Aktivierung zu modulieren (Amaddii et al., 2012; Banning et al., 2012).

1.4 Bioid

Bei der Bioid („*proximity-dependent biotin identification*“) handelt es sich um eine Methode zur Markierung der Interaktionspartner eines bestimmten Proteins, um diese später zu identifizieren. Dabei wird das zu untersuchende Protein mit einer Biotinligase

(BirA) fusioniert, welche in der Lage ist, andere Proteine in Anwesenheit von Biotin enzymatisch zu biotinylieren und entsprechend zu markieren (*Enzym-Labeling*) (Chapman-Smith & Cronan, 1999; Roux, 2013). Voraussetzung ist dabei die Bereitstellung von ausreichend Biotin im Medium. Aufgrund des Wirkmechanismus bietet sich die BioID-Methode vor allem bei unlöslichen und membranassoziierten Proteinen an, die sich mit herkömmlichen Methoden nur schwer überprüfen lassen. So können auch schwache oder kurzzeitige Wechselwirkungen identifiziert werden (Roux et al., 2018).

Die ursprüngliche Biotinligase (BirA) stammt aus dem Bakterienstamm *Escherichia coli*. Um von dieser Wildtyp-Variante erkannt und entsprechend markiert zu werden, müssen die jeweiligen Interaktionspartner jedoch Biotinylierungs-Zielsequenzen tragen, (Roux et al., 2012). Anders verhält es sich bei der BirA-Variante (R118G), die als BirA* bezeichnet wird. Diese benötigt im Gegensatz zur ursprünglichen Variante keine Zielsequenz, sondern ermöglicht eine Biotinylierung von allen Interaktionspartnern in einem bestimmten Aktionsradius (Choi-Rhee et al., 2004). Hingegen früheren Annahmen, bei denen der Radius, in dem sich der Großteil der biotinylierten Proteine befand, auf 20-30 nm geschätzt wurde (Roux et al., 2012), ist er von einer anderen Forschungsgruppe genauer untersucht worden. Dabei wurde ein Aktionsradius von etwa 10 nm gemessen (D. I. Kim et al., 2014). Abbildung 3 zeigt das Prinzip der BioID mit anschließendem Pulldown mit magnetischen Streptavidinkügelchen, mit dem Beispiel des Flotillin-2.

Neben der BirA* existiert eine weitere Biotinligase der zweiten Generation (BioID2), welche von der Biotinligase des Gram-negativen Bakteriums *Aquifex aeolicus* abgeleitet ist. Diese ist ein Drittel kleiner als die BirA*, da ihr von Natur aus eine DNA-bindende Domäne fehlt. Diese Eigenschaft ermöglicht eine bessere Ausrichtung und Lokalisation des Fusionsproteins. Des Weiteren benötigt sie weniger Biotin, um eine ähnliche Biotinylierung zu erreichen, was in Systemen mit erschwerter Biotingabe von Vorteil ist. Zusätzlich kann der Biotinylierungsbereich unter Verwendung eines erweiterten flexiblen Linkers moduliert werden. Dies kann bei der Untersuchung von Proteinen, die deutlich größer sind als der Aktionsradius des Fusionsproteins, oder auch bei Bestandteilen eines größeren Proteinkomplexes von Interesse sein (D. I. Kim et al., 2016a, 2016b; D. I. Kim & Roux, 2016).

Da die herkömmliche Biotinylierung eine Zeit von 15-18 h erfordert, welches nicht für alle Anwendungen ideal ist, wurden zwei neue Ligasen (TurboID und MiniTurbo) durch eine Weiterentwicklung der BioID-Ligase hergestellt. Die MiniTurbo-Ligase ist als eine kleinere Version der TurboID entwickelt worden, indem der N-Terminus der TurboID-Ligase entfernt wurde. Beide Ligasen sind wesentlich schneller und können mit

einer ausreichenden Menge an Biotin nach nur 10 min Inkubation eine Biotinylierung der Proteine bewirken. Außerdem sind sie in der Lage, auch bei niedrigen Temperaturen effektiv zu arbeiten. Allerdings ist die Biotinylierungsaktivierung, die zelluläre Toxizität und die Ligasestabilität noch nicht vollständig geklärt. Bei der TurboID wurden sowohl Anzeichen von Proteininstabilität, als auch eine anhaltende Biotinylierung in Abwesenheit von exogenem Biotin, sowie ein Anstieg des Markierungsradius beobachtet (Branon et al., 2018; May et al., 2020a).

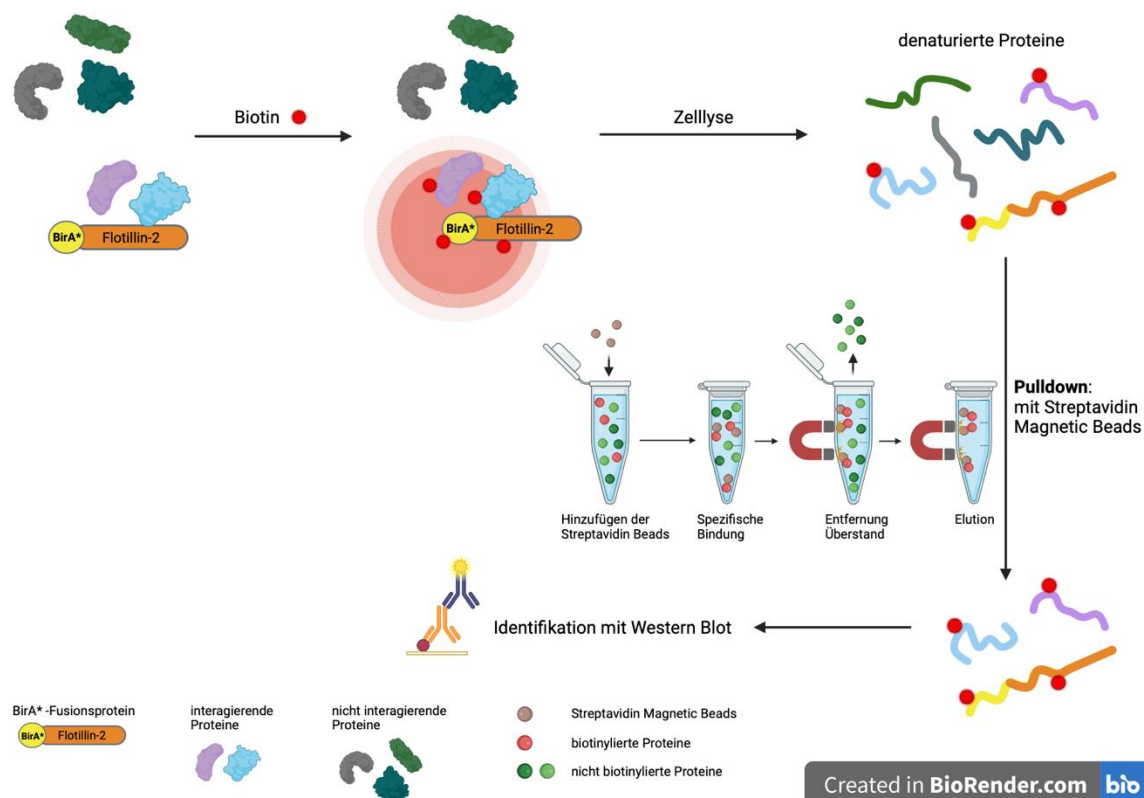


Abbildung 3: Schematische Darstellung der BiID mit Pulldown, modifiziert nach (Roux et al., 2012) und <https://www.abcam.com>.

Biotinylierung von Proteinen durch das Fusionsprotein mit BirA* im Aktionsradius von etwa 10 nm (D. I. Kim et al., 2014) nach Zugabe von Biotin. Nach anschließender Zellyse und Denaturierung der Proteine erfolgt ein Pulldown. Die Lysate werden über Nacht bei 4°C mit den hinzugefügten Streptavidin Magnetic Beads inkubiert. Die Streptavidinkügelchen gehen eine feste Bindung mit dem Biotin der zuvor markierten Proteine ein. Diese werden von den nicht-interagierenden Proteinen isoliert, indem in einem Magnetstand in mehreren Waschrunden alle ungebundenen, nicht-biotinylierten Proteine entfernt werden. Biotinylierte Proteine, welche fest an die Streptavidinkügelchen gebunden sind, werden durch den Magneten im Reaktionsgefäß fixiert. Diese können anschließend eluiert und gegebenenfalls bei 94°C von den Beads getrennt werden. Nach diesem Verfahren können die gewonnenen Proteine mit einem Western Blot identifiziert werden. Zur Untersuchung unbekannter Interaktionspartner kann eine Verifizierung mittels Massenspektrometrie erfolgen.

1.5 Ziele der Arbeit

Bei Pemphigus Vulgaris richten sich Autoantikörper gegen desmosomale Strukturproteine und führen zur Ablösung von Keratinozyten in der Epidermis. Flotilline spielen eine vielseitige Rolle in der Zelladhäsion, indem sie mit Adhäsionsproteinen interagieren, Mikrodomänen zur Erhaltung von Zell-Zell-Kontakten bilden, sowie die Signalübertragung unterstützen.

Daher ist es von Interesse, desmosomale Interaktionspartner von Flotillin-2 mit der Methode der BioID genauer zu untersuchen, um in diesem Rahmen auf mögliche physiologische als auch pathologische Zusammenhänge schließen zu können. Zunächst sollte in dieser Arbeit die Methode der BioID unter Verwendung von Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukten etabliert werden. Da für die Untersuchung des desmosomalen Flotillin-2-Interaktoms Keratinozyten verwendet werden müssen, sollten Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukte, nach vorangehender Mutagenese und Umklonierung in einen geeigneten Vektor, zielgerichtet mit einem CRISPR/Cas9 Knock-In in das Genom von HaCaT-Zellen integriert werden.

Auch spielen Flotilline eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Signalen. Neben der Aktivierung des EGFR haben sie auch als Gerüstbildner eine essenzielle Funktion im MAPK-Signalweg. Daher ist ein weiteres Ziel die Etablierung der BioID zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg. Mit Hilfe des Bio-ID-Enzym-Labelings sollen so Interaktionspartner identifiziert und im Western Blot nach Durchführung eines Pulldowns dargestellt werden.

2 Material

2.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterial

Nachfolgend sind Tabellen mit den jeweils verwendeten technischen Geräten, Materialien und Kleinmaterialien zusammen mit den Herstellern und deren Firmensitz aufgelistet, die dieser Arbeit zu Grunde liegen.

Tabelle 1: Technische Geräte und Materialien

Geräte-/ Materialbezeichnung	Modell	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Typ Midi-large	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Bakterien-Inkubator	Incucell	MMM, Darmstadt (DE)
Bakterien-Schüttler	KS-15	Edmund-Bühler, Bodelshausen (DE)
CO ₂ -Inkubator für Zellkulturen	MCO-18AIC CO ₂ Incubator	Sanyo, Osaka (JP)
Elektrophorese-Netzgerät		Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Entwickler Maschine	Curix 60	AGFA, Düsseldorf (DE)
Flockeneisbereiter	Scotsman Flockeneisbereiter AF 80	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Gelelektrophorese-Kammersystem		Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
Heizblock	HCL	Labomedic, Bonn (DE)
Inkubationsschüttler	New Brunswick™ Innova® 42/42R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Konfokales Laserscan Mikroskop	Zeiss LSM710	Carl-Zeiss, Jena (DE)
Lichtmikroskop	AE 31	Motic, Wetzlar (DE)
Magnetstand	Dynal MPC-S	ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
Fluoreszenz-Imaging-System	ODYSSEY® ^{XF} (2802) S/N OXF-2093	LICOR® Biosciences GmbH, Bad Homburg (DE)
Mikroplattenleser	Infinite M200	Tecan, Männedorf (CH)
Pipettierhilfe	accu jet®	Brand, Wertheim (DE)

Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Research Plus™ Pipetman L	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf (DE) Gilson, Internatinal B.V., Limburg a.d. Lahn (DE)
Rollrad	L28 Test-Tube Rotator	Labinco (NL)
Röntgenfilm	Super RX-N	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Röntgenfilm-Kassette		Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
Scanner	Epson Perfection 3200 Photo Scanner	Herzog Computer Systeme, Frankfurt a.M. (DE)
SDS-Gel-Gießkammer		Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)
SDS-PAGE-Transferkammer	Criterion™ Blotter	BioRad, München (DE)
Sonifikator	Sonoplus	Bandelin electronics, Berlin (DE)
Sterilbank	HeraSafe KS	ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
Tecan	Infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Thermocycler	(T-Personal Combi)	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
Transfertank für WB	Criterion blotter	BioRad, München (DE)
Ultraviolett-Flächenstrahler	Nu-72 ML	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch (DE)
Vortex	V-1 Plus	A. Hartenstein, Würzburg (DE)
Waagen	Toledo PB602-S Denver Instrument SI-64	Mettler-Toledo, Gießen (DE) Denver Instrument GmbH, Göttingen (DE)
Wasserbad		LAUDA Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen (DE)

Zentrifugen	Mikro 200 R	Hettich, Tuttlingen (DE)
	Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen (DE)
	Universal 320	Hettich, Tuttlingen (DE)
	J2-21	Beckmann Coulter, Sinsheim (DE)
	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (DE)
	Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham (US)
	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen (DE)

Tabelle 2: Kleinmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar® Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
FALCON™ Rundboden-Polystyrolröhrchen (14 ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Frischhaltefolie	Papstar, Kall (DE)
Glaskolben	Schott-AG, Mainz (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Impfnadeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Mikrotiterplatte 96-Well F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen (DE)
Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman, Buckinghamshire (UK)
Objektträger, 76 x 26 mm	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Parafilm	Bemis, Wisconsin (USA)
Petrischale, Ø 10 cm, Glas	Roth, Karlsruhe (DE)
Pinzette aus Edelstahl, 120 mm lang	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Pipettenspitzen	nerbe plus, Winsen (DE)
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Rotilabo®-Blottingpapiere, 0,35 mm	Roth, Karlsruhe (DE)
Skalpell	Schreiber GmbH, Fridingen (DE)
Zellkulturflasche T25, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)

Zellkulturplatte 6; 12 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellkulturschale (60 mm, 100 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die jeweils verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 3 nach Hersteller und deren Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Agar-Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat (<i>APS</i>)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Biotin	AppliChem, Darmstadt (DE)
Bovine Serum Albumin (<i>BSA</i>)	PAA, Cölbe (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Cumarinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
CutSmart-Puffer (10x)	NEB, Frankfurt (DE)
Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Dimethylsulfoxid (<i>DMSO</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dithiotreitol (<i>DTT</i>)	AppliChem, Darmstadt (DE)
DMEM high glucose (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco® ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
DNA-Größenmarker (<i>DRAMA</i>)	eigene Herstellung
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Marker (1 kB Ladder)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

hEGF (human <i>Epidermal Growth Factor</i>) E9644-2MG, (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (<i>EDTA</i>)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Fötale Kälberserum (<i>FCS</i>)	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Paisley (UK)
Amphotericin B	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Paisley (UK)
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (DE)
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Luria/Miller Broth-Medium (LB-Medium)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Luminol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
MACSfectin™ Transfektionsreagenz	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach (DE)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
NEB Buffer 3.1	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumfluorid (NaF) 0,5 M – Phosphataseinhibitor, 1:500 (für 1 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)

Natriumpyruvat (100x)	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Nonidet P40 (NP-40)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Opti-MEM™ (Serumreduziertes Medium)	Gibco® ThermoFisher Scientific, Dreieich (DE)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
10x cloned Pfu DNA-Polymerasepuffer	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (DE)
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PI), 1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker Dual Color	BioRad, München (DE)
Puromycin	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
10x Q5 Reaktionspuffer	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
Röntgenentwickler	Calbe Chemie GmbH, Calbe (DE)
Röntgenfixierer	Calbe Chemie GmbH, Calbe (DE)
Random Hexamer-Oligonukleotide (d’NTP)	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn (DE)
ROTI® Mount FluorCare 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
SuperSignal™ West Femto/Pico Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
T4 DNA-Ligasepuffer (10x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
Tetramethylethylendiamin, '1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Trishydroxymethylaminomethan-HCl sowie -Base (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
2,5% Trypsin (10x)	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Urea (Harnstoff)	Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Vanadat (Natrium-Orthovanadat), Phosphataseinhibitor S6508-10G, 1 mM	Sigma, Steinheim (DE)
Wasserstoffperoxid 10% (H ₂ O ₂)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt (DE)

2.3 Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Biotin-Lösung	DMEM- 1 mM Biotin
Blockierungspuffer 1	TBS-T 5% Milchpulver
Blockierungspuffer 2	TBS-T 3% BSA
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% Methanol
ECL-Lösung	200 µM p-Cumarinsäure 100 mM Tris pH 8,5 1,25 mM Luminol 0,01% H ₂ O ₂
Einfriermedium für Zellkulturen	10% DMSO in FCS
Einfriermedium für E.coli	65% Glycerol 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris pH 8
Immunomix (IMM)	PBS 1% Triton X-100 0,5% Desoxycholsäure
Immunomix (IMM) + KCl	PBS 2 M KCl 1% Triton X-100 0,5% Desoxycholsäure
Lämmli-Gelelektrophorese-Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
LB-Agar	25 g LB-Broth Medium 20 g Agar-Agar-Pulver 1 L ddH ₂ O
LB-Medium	25 g LB-Broth Medium 1 L ddH ₂ O
Marker für DNA Gele „BX“	2 mg/ml Bromphenolblau 50 mM EDTA 75% Glycerol 4 mg/ml Xylencyanol

Neufeld-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,5) 0,6 M NaCl 0,1% SDS 0,05% NP-40
Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau Färbelösung	0,1% Ponceau-red 5% Essigsäure
SDS-Polyacrylamidgel: Trenngel (10%)	12,5 mM Tris pH 8,8 0,1% SDS 10% Acrylamid 0,1% TEMED 0,5% APS
SDS-Polyacrylamidgel: Sammelgel (4%)	4,2 mM Tris pH 6,8 0,1% SDS 4% Acrylamid 0,1% TEMED 0,5% APS
SDS-Proteinladepuffer (4x)	100 mM Dithiotreitol (DTT) 250 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8% SDS 40% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 20% 2-Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	0,1 M NaOH
Stürmer-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris pH 7,4 2 mM EDTA 1% Nonoxinol 40 (NP-40)
TBST (<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>)	150 mM NaCl 0,05% Tween-20 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 0,1 mM EDTA
Transferpuffer für WB	192 mM Glycin 25 mM Tris 10% Methanol
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA (pH 8)
Urea-Lysepuffer	8 M Urea 50 mM Tris-HCl pH 7,4

2.4 Kits zur DNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der DNA-Plasmide wurden die nachfolgend aufgelisteten kommerziellen Kits verwendet.

Tabelle 5: DNA-Aufreinigungskits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren (DE)
NucleoSpin® Plasmid DNA purification KIT	Macherey-Nagel, Düren (DE)
Nucleo Bond Xtra Midi EF® Plasmid DNA purification KIT	Macherey-Nagel, Düren (DE)

2.5 Enzyme

Die unten aufgeführten Enzyme wurden für DNA-Modifikationen verwendet.

Tabelle 6: Enzyme

Bezeichnung	U/ml	Hersteller
BamHI	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
BamHI-HF	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
BglII	10.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
DpnI	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
EcoRI	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
NotI	10.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
NotI-HF	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
PfuTurbo DNA-Polymerase	2.500	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Q5 DNA-Polymerase	2.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
rSAP (rekombinante Shrimp alkalische Phosphatase)	1.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
T4-DNA-Ligase	400.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)

Xhol	20.000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
------	--------	---

2.6 Antikörper

Nachfolgend sind die jeweiligen primären und sekundären Antikörper mit den verwendeten Verdünnungen aufgeführt. Diese wurden für den Western Blot (WB), als auch für die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) verwendet.

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	WB	IF	Hersteller
Flotillin-1 (610821)	Maus	1:1000	1:50	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Flotillin- 2/ESA (610384)	Maus	1:1000	/	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Flotillin-2 (F2C) (F1680)	Kaninchen	1:1000	1:150	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
BirA* (6C4c7) (ab232732)	Maus	1:1000	1:200	Abcam, Cambridge (UK)
GAPDH (C6C5) (ab8245)	Maus	1:10.000	/	Abcam, Cambridge (UK)
EGF-Rezeptor (D38B1) (4267S)	Kaninchen	1:1000	/	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)
ERK 2 (C-14)	Kaninchen	1:1000	/	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
HER 2/Erb B2 (2242)	Kaninchen	1:1000	/	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)
MEK 1/2 (9122)	Kaninchen	1:1000	/	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)

Phospho-EGF-Rezeptor (Try1173) (53A5) (4407)	Kaninchen	1:1000	/	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)
Phospho-ERK (E-4)	Maus	1:1000	/	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)
Phospho-c-Raf (Ser 338) (56A6)	Kaninchen	1:1000	/	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)
Raf-1 (C12)	Kaninchen	1:1000	/	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg (DE)

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt	WB	IF	Hersteller
Anti- mouse-HRP	Ziege	1:10.000	/	Dako Denmark A/S, Glostrup (DK)
Anti- rabbit-HRP	Ziege	1:10.000	/	Dako Denmark A/S, Glostrup (DK)
IRDye® 680RD donkey anti- mouse	Ziege	1:15.000	/	LICOR® Biosciences GmbH, Bad Homburg (DE)
IRDye® 680RD donkey anti- rabbit	Ziege	1:15.000	/	LICOR® Biosciences GmbH, Bad Homburg (DE)
IRDye® 800RD donkey anti- mouse	Ziege	1:15.000	/	LICOR® Biosciences GmbH, Bad Homburg (DE)
IRDye® 800RD donkey anti- rabbit	Ziege	1:15.000	/	LICOR® Biosciences GmbH, Bad Homburg (DE)
Alexa Fluor® 488 donkey anti- mouse	Esel	/	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

Alexa Fluor® 488 donkey anti- rabbit	Esel	/	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Alexa Fluor® 546 donkey anti- mouse	Esel	/	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Alexa Fluor® 546 donkey anti- rabbit	Esel	/	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

2.7 Plasmide

In Tabelle 9 sind die Plasmide aufgeführt, welche für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 9: Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Insert	Referenz
BirA*	pcDNA3	Biotinligase (<i>E. coli</i>)	AG Tikkanen (bereits vorhanden)
Flotillin-2-BirA*	pcDNA3	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>)	AG Tikkanen (Orczyk, 2022), (bereits vorhanden)
Y163F-Flotillin-2- BirA*	pcDNA3	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>), Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	AG Tikkanen (Orczyk, 2022), (bereits vorhanden)
BirA*-noNotI	pcDNA3	Biotinligase (<i>E. coli</i>)	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
Flotillin-2-BirA*- noNotI	pcDNA3	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>)	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
Y163F-Flotillin-2- BirA*-noNotI	pcDNA3	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>), Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
BirA*	pSH-EFIRE5-P	Biotinligase (<i>E. coli</i>)	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
Flotillin-2-BirA*	pSH-EFIRE5-P	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>)	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert

Y163F-Flotillin-2-BirA*	pSH-EFIREs-P	Flotillin-2 (Ratte) mit Biotinligase (<i>E. coli</i>), Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
-------------------------	--------------	--	----------------------------------

2.8 Primer

Tabelle 10: Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
BirA-rev-Seq.	GTCACGCAGTGTCTGAATGTG
BirA-STOP-NotI	CTATAGCGGCCGCTTATTTTTCTGCACTACGCAGG
EF1-alpha-fwd	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
IRES-rev	TATAGACAAACGCACACCG
pcDNA3-fwd	GGCTAACTAGAGAACCCACTG
Reg-1-BamHI-Start	CTATAGGATCCATGGGCAATTGCCACACGG
Rmv-NotI-BirA-fwd	ATCCATCACACTGGAGGCCGCATGGGTTC
Rmv-NotI-BirA-rev	GAACCCATGCGGCCTCCAGTGTGATGGAT

2.9 Bakterienstämme

Für die Plasmidamplifikation wurde für diese Arbeit nachfolgender Bakterienstamm verwendet. Die Kulturen wurden bei 37°C in LB-Medium und auf LB-Agarplatten kultiviert.

Tabelle 11: Bakterienstämme

Bezeichnung	Organismus	Verwendung	Hersteller
XL-1-Blue	<i>E. coli</i>	Plasmidamplifikation	Stratagene, San Diego (US)

2.10 Zelllinien und Nährmedien

Nachfolgend sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 die jeweiligen humanen Zelllinien, sowie deren Nährmedien und Kultivierungsbedingungen aufgeführt.

Tabelle 12: Zelllinien

Bezeichnung	Erklärung	Kulturbedingungen
HaCaT F2-KO	humane immortalisierte Keratinozyten Flotillin-2 Knockout (Boukamp et al., 1988)	DMEM +++++ 5% CO ₂ 37°C
HEK293T F2-KO	humane embryonale Nierenzellen Flotillin-2 Knockout (Graham et al., 1977)	DMEM ++ 5% CO ₂ 37°C

Tabelle 13: Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM ++ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
DMEM +++++ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin 1% Nicht-essentielle-Aminosäuren (NEAA) 1 mM Natrium-Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

2.11 Software

- Visionary (AUROX) (zur Erstellung von Fluoreszenzbildern)
- Fiji bzw. ImageJ2 (NIH) (zur Bearbeitung von Fluoreszenzbildern)
- Microsoft Office System 2023
- Mendeley Cite
- BioRender (zur Erstellung von Abbildungen)
- Licor
- Tecan

2.12 Bildbearbeitung und Auswertung der Daten

Alle dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Es erfolgte keine statistische Auswertung.

Die abgebildeten Fluoreszenzmikroskopbilder wurden durch Kontrast- und Helligkeitseinstellungen nur im Gesamten angepasst. Andere Manipulationen des Bildes wurden nicht durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Mutagenese

Für die Klonierung von Flotillin-BirA*-Fusionskonstrukten in pSH-EFIREs wurden die bereits vorhandenen Plasmide BirA*, Flotillin-2-BirA* und Y163F-Flotillin-2-BirA*- pcDNA3 verwendet.

Um die jeweiligen Inserts in die erforderliche Stelle klonieren zu können und folglich in den Vektor pSH-EFIREs zu integrieren, musste zunächst die störende NotI-Schnittstelle 5' im Linker der Konstrukte zerstört werden (siehe Abbildung 5). Dazu wurde mit einer PCR-Mutagenese mit einer Pfu-Polymerase eine Punktmutation induziert. Die Sequenz der zu mutagenisierenden Region ist Abbildung 4 zu entnehmen.

```
TGGTTCTCAGTGGGGACAACAGCAAGGTGACATCAGAAGTGAACCGGCTGCTAGCAGAACTGCCTGCTTCTGTTTCAT
GCCCTCACTGGTGTGGACCTCTCAAAGATACCCTGATCAAGAATGCCACTGGTGCGCAGGTGGGGAATTCTGCAGAT
ATCCATCACACTGGCGGCCGCATGGGTTTCAGTTCTACTTCTGTTCTGGTAAAATGAAGGATAACACCGTGCCACTG
```

Abbildung 4: Sequenz der zu mutagenisierenden Region.

Aminosäuren:

```
at gcc act ggt gcg cag gtg ggg aat tct gca gat atc cat cac act ggc ggc cgg atg
  A T G A Q V G N S A D I H H T G G R M
```

Mutagenese der NotI Restriktionsstelle:

Punktmutagenese GGC zu GGA (Gly-Codon bleibt): **GAGGCCGC**

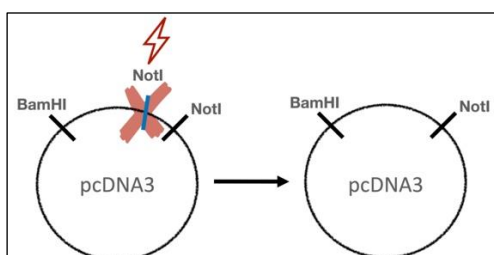


Abbildung 5: Prinzip der Mutagenese.

3.1.1.1 PCR-Mutagenese

Für die PCR-Mutagenese wurden insgesamt 50 µl der in Tabelle 14 aufgelisteten Reagenzien in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und eine PCR-Mutagenese im Thermocycler nach Schema der Tabelle 15 durchgeführt. Die verwendeten Primer sind

3.1.1.2 DNA-Aufreinigung und DpnI-Verdau

Im Anschluss an die PCR-Mutagenese folgte die DNA-Aufreinigung nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel.

Um die mutierte DNA zu selektieren, wurde mit einer DpnI-Endonuklease ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu zerschnitt das Enzym das für die Mutagenese eingesetzte, noch methylierte Ausgangs-Plasmid ohne Mutation. Der Ansatz des DpnI-Verdaus (Tabelle 16) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zum Schluss folgte eine zweite Aufreinigung nach DpnI-Verdau der DNA, welche ebenfalls mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel durchgeführt wurde.

Tabelle 16: Protokoll des DpnI-Verdaus

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	44 µl
10x CutSmart-Puffer	5 µl
DpnI	1 µl

3.1.2 Transformation

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA (sowohl für die Plasmide der Mutagenese, als auch die der Ligationsprodukte im Rahmen der Klonierung) wurde diese in kompetente XL1-Blue Bakterien des Stammes *E. coli* transformiert. Dazu wurden jeweils 7,5 µl Plasmid DNA mit 100 µl kompetenten XL-1-Blue Bakterien für 15 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 45°C mit nachfolgender einminütiger Abkühlung auf Eis. Das Bakterienwachstum ohne Selektionsdruck fand unter Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) statt. Der Ansatz wurde dafür eine Stunde bei 37°C und 220 rpm im Bakterien-Schüttler platziert. Anschließend wurde nach einer Zentrifugation (1 min, 3.421 g) ca. 800 µl Überstand verworfen und die übrigen 200 µl konzentrierte Bakterienkultur für das Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) verwendet. Das Wachstum der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C im Bakterien-Inkubator.

3.1.3 Plasmid-Präparation

Um den Erfolg der Mutagenese und Klonierungen zu überprüfen, wurde eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Dazu wurden je 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml)

mit gepickten Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Schüttler inkubiert. Es wurden je 2 ml der Suspension in ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 16.060 g). Der Überstand wurde verworfen, und es wurden nochmals 2 ml der Bakteriensuspension hinzugefügt. Nach anschließender Zentrifugation konnte ein Pellet isoliert werden. Zur weiteren Aufreinigung der darin enthaltenen DNA, wurde das NucleoSpin® Plasmid DNA purification-Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für eine Midipräparation zur Herstellung einer größeren Plasmid-DNA Menge für weitere Experimente, wurden 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft (mit gepickten Bakterienkulturen oder mit 1-2 ml einer Bakteriensuspension aus vorheriger Kultivierung). Nach Inkubation im Schüttler (37°C) über Nacht erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 9.632 g) und anschließend die Aufreinigung der DNA aus dem entstandenen Pellet nach Herstellerangaben mit dem Nucleo Bond Xtra Midi EF® Plasmid DNA purification-Kit von Macherey-Nagel.

Im Anschluss der Plasmidisolierungen wurde mit Hilfe des Photometers „Tecan Infinite M 200“ die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

3.1.4 Sequenzierung

Zur Bestimmung und Überprüfung der Nukleotid-Abfolge in der DNA wurden Proben zum Sequenzieren geschickt. Dafür wurde in einem Reaktionsgefäß mit ddH₂O eine DNA-Lösung mit einer Endkonzentration von 80 ng/µl angesetzt und 3 µl Primer hinzugefügt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Sequenzierung

Sequenzierte Konstrukte	Primer (3 µl)
BirA [*] -, Flotillin-2-BirA [*] -, Y163F-Flotillin-2-BirA [*] -noNotI pcDNA3	BirA-rev.-seq. (10 µM)
BirA [*] -, Flotillin-2-BirA [*] -, Y163F-Flotillin-2-BirA [*] -pSH-EFIREP	EF1-alpha-fwd. (10 µM), IRES-rev. (10 µM)

3.1.5 Glycerol-Stock

Um Klone bzw. Bakterienkulturen von den positiv sequenzierten DNA-Konstrukten über lange Zeit zu konservieren, wurden diese als Glycerol-Stocks bei -80°C eingefroren. Dazu wurden in ein Cryo-Röhrchen je 800 µl einer Bakteriensuspension mit 800 µl Glycerol-Lösung versetzt.

3.1.6 Klonierung

Im Rahmen meiner Arbeit wurde eine Klonierung durchgeführt, um die zuvor in der Mutagenese angepassten und aufbereiteten DNA-Fragmente (Inserts) von dem bisherigen Vektor (pcDNA3) in einen neuen Vektor (pSH-EFIREs) zu integrieren (Abbildung 7). Dieser enthält im Gegensatz zu dem früheren Vektor (pcDNA3) einen schwächeren Promotor, der die Expression der jeweiligen Proteine auf Dauer erlaubt.

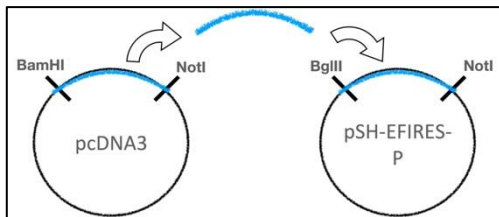


Abbildung 7: Prinzip der Klonierung mit den jeweiligen Schnittstellen der Plasmide.

3.1.6.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde angewandt, um eine exponentielle Amplifikation der Inserts zu erzeugen. Die Reagenzien (Tabelle 19) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Probe angesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 18 aufgelistet. Anschließend wurde der Ansatz für die PCR im Thermocycler zu je 2x 50 µl in zwei 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt (Tabelle 20). Nachdem der Erfolg der PCR mit Hilfe einer Agarose-Elektrophorese (siehe dazu 3.1.6.2) überprüft wurde, sind die PCR-Produkte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aufgereinigt worden.

Tabelle 18: PCR-Primer

Primer	Primer-Sequenz	Insert
Reg-1-BamHI-Start	CTATA GGATCC ATGGGCAATTGCCACACGG	F2-WT-BirA*, F2-Y163F-BirA*
pcDNA3-fwd.	GGCTAACTAGAGAACCCACTG	BirA*
BirA-STOP-NotI	CTATAGCGGCCGCTTATTTTTCTGCACTACGCAGG	F2-WT-BirA*, F2-Y163F-BirA*, BirA*

Tabelle 19: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	1 μ l (\cong 4,5 ng)
5x Q5-Reaktionspuffer	20 μ l
Primer Reg-1-BamHI-Start (10 μ M) bzw. Primer pcDNA3-fwd. (10 μ M)	5 μ l
Primer BirA-STOP-NotI (10 μ M)	5 μ l
dNTP's (10 mM)	2 μ l
Q5 DNA-Polymerase	2 μ l
Milli-Q H ₂ O	65 μ l

Tabelle 20: Protokoll der PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
80°C	Pause	/
98°C	30 sek	x 1
98°C	30 sek	x 35
64°C	30 sek	
72°C	2 min	
98°C	30 sek	x 1
64°C	1 min	x 1
72°C	30 sek	x 1
72°C	10 min	x 1
10°C	Pause	/

Der erste und letzte Schritt stellt die jeweilige Temperatur bis zum Einsetzen bzw. bis zur Entnahme der Proben dar.

3.1.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der molekularbiologischen Methode der Agarose-Gelelektrophorese werden die aufgetragenen DNA-Proben bzw. die PCR-Produkte durch ein elektrisches Feld der entsprechenden Größe nach aufgetrennt und können anhand eines mitlaufenden Größenmarkers bestimmt werden. Das 1%ige Agarosegel wird erhitzt und anschließend Ethidiumbromid in einem Verhältnis von 1:10.000 hinzugefügt, welches sich als interkalierender Farbstoff an die Nukleinsäuren lagert und die aufgetrennten Banden

unter Einwirkung von UV-Licht sichtbar macht. Die Proben wurden zu je 5 µl/ 10 µl* DNA mit 1 µl/ 2 µl* Ladebuffer BX für DNA-Gele angesetzt und zusammen mit einem geeigneten DNA-Größenmarker auf das hergestellte Gel aufgetragen. Nach der ca. 20-minütigen Laufzeit konnten die einzelnen Banden unter einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht und die jeweiligen DNA-Größen ermittelt und abgeglichen werden. (*diese Mengenangaben wurden für die Agarose-Gelelektrophorese der ligierten Konstrukte im Rahmen der Klonierung verwendet).

3.1.6.3 Restriktionsverdau (Inserts und Vektor)

Zur Vorbereitung der jeweiligen Inserts und des Vektors auf die Ligation wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden die Inserts (PCR-Produkte) jeweils über Nacht bei 37°C mit den Restriktionsenzymen BamHI-HF und NotI-HF in einem Ansatz wie in Tabelle 21 dargestellt inkubiert und anschließend mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

Der Verdau des Vektors pSH-EFIREs-P-AtAFB2, welcher Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen ist, wurde separat zu je zwei Schritten durchgeführt, da die Enzyme für ihre Funktion jeweils unterschiedliche Puffer benötigen. Nach dem ersten zweistündigen Verdau bei 37°C mit dem Enzym BglII, welches mit dem schneidenden Enzym BamHI-HF des Inserts durch kompatible kohäsive Enden eine Ligation ermöglicht, wurden die Restriktionsprodukte mit der Methode der Agarose-Elektrophorese überprüft (siehe dazu 3.1.6.2) und anschließend nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel gereinigt. Es folgte der zweite Verdau mit dem Enzym NotI-HF bei 37°C über Nacht. Die Dephosphorylierung der 5'-Phosphate an der DNA wurden mit der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (rSAP) am darauffolgenden Tag veranlasst. Dazu wurde zu den 70 µl des Restriktionsproduktes 3 µl rSAP hinzugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 15 µl BX als Ladebuffer zu insgesamt 88 µl ergänzt, um die Restriktion mittels einer Agarose-Elektrophorese (3.1.6.2) zu überprüfen. Anschließend konnte das Vektor-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten- und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt werden.

Tabelle 21: Protokoll des Insert-Verdau

Reagenz	Menge
Insert PCR-Produkte (DNA)	49 μ l
BamHI-HF	2 μ l
NotI-HF	2 μ l
10x CutSmart-Puffer	7 μ l
Milli-Q H ₂ O	10 μ l

Tabelle 22: Protokoll des 1. Vektor-Verdau

Reagenz	Menge
Vektor (DNA)	5 μ l (\cong 10 μ g)
NEBuffer 3.1	5 μ l
BglII	2 μ l
Milli-Q H ₂ O	38 μ l

Tabelle 23: Protokoll des 2. Vektor-Verdau

Reagenz	Menge
Vektor Verdau(1)-Produkt (DNA)	50 μ l
10x CutSmart-Puffer	7 μ l
NotI-HF	2 μ l
Milli-Q H ₂ O	11 μ l

3.1.6.4 Ligation

Um die jeweils vorbereiteten Inserts (BirA⁻, F2-WT-BirA⁻ und F2-Y163F-BirA⁻-noNotI) mit dem neuen Vektor (pSH-EFIRE5) zu verknüpfen, wurde eine Ligation (wie in Tabelle 24 dargestellt) mit einer T4-DNA-Ligase angesetzt, und der Ansatz zu je 10 μ l bei 16°C über Nacht inkubiert. Anschließend konnten die generierten Konstrukte mit Hilfe der Transformation in kompetente XL-1-Blue *E. coli* Bakterien eingebracht- (siehe hierzu 3.1.2) und mit einer Plasmidpräparation (Minipräparation) DNA isoliert werden (siehe hierzu 3.1.3). Es folgte ein Kontroll-Restriktionsverdau, welcher Tabelle 25 zu entnehmen ist und die Überprüfung der fertiggestellten Konstrukte per Agarose-Elektrophorese (3.1.6.2). Zum Schluss wurden die korrekten Klone nach Protokoll der Tabelle 17 sequenziert (3.1.4) und sowohl eine Midipräparation durchgeführt als auch

Glycerol-Stocks (3.1.5) von den klonierten Konstrukten (BirA*-pSH-EFIREs-P, Flotillin-2-BirA*-EFIREs-P, Y163F-Flotillin-2-BirA*-pSH-EFIREs-P) eingefroren.

Tabelle 24: Protokoll der Ligation

Reagenz	Menge
Vektor	1 μ l (\cong 40 ng)
Insert	7 μ l (\cong 280 - 700 ng)
10x T4 Ligase Puffer	1 μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l
ddH ₂ O	ergänzend auf 10 μ l Gesamtvolumen

Tabelle 25: Protokoll des Kontroll- Restiktionsverdaus

Reagenz	Menge
DNA (Konstrukte)	1 μ l/ 2 μ l* (\cong 1 μ g/ 0,5 μ g*)
10X CutSmart-Puffer	1 μ l
XhoI	0,25 μ l
EcoRI	0,25 μ l
Milli-Q H ₂ O	7,5 μ l/ 6,5 μ l*

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung (HEK293T- und HaCaT-Zellen)

Für die Biotinylierungsversuche wurden Flotillin-2-KO-HEK293T (humane embryonale Nierenzellen ohne Flotillin-2-Expression) bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Dem DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) wurde für die Kultivierung der Zellen 10% fetales Kälberserum, sowie 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt (Tabelle 13). Für manche Experimente wurde dem Medium eine bestimmte Zeit vor der Zellernte 1 mM Biotin hinzugefügt und/oder eine EGF-Gabe (100 ng/ml) durchgeführt, nachdem für einen Nährstoffentzug („starving“) das Medium (DMEM++) durch eines ohne Zusätze (DMEM-) ausgetauscht wurde.

Die für die Klonierung verwendeten HaCaT-Zellen (Boukamp et al., 1988) wurden ebenfalls bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in Kultur gehalten. Ihrem Zellmedium (DMEM) wurde für ein optimales Wachstum, neben dem fetalen Kälberserum (10%) und

Penicillin/Streptomycin (1%), zusätzlich 1% Nicht-essentielle-Aminosäuren (NEAA) und 1 mM Natrium-Pyruvat hinzugegeben. Die Zellen wurden je nach Experiment in Zellkulturflaschen (T25), Zellkulturplatten (6- und 12-Wellplatten) oder Zellkulturschalen (6- und 10 cm) kultiviert.

3.2.2 Subkultivierung/ Passagierung der Zelllinien (HEK293T und HaCaT)

Das Subkultivieren bzw. Passagieren von Zellen wurde bei Erreichen von etwa 70-90% Konfluenz der Zellkulturen veranlasst. Mit dieser Methode konnte ein Erhalt der jeweiligen Kultur sichergestellt und durch frische, dem Medium zugesetzte Nährstoffe, ein fortschreitendes Wachstum erreicht werden. Zu Beginn wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1-2 ml PBS gewaschen. Bei den HaCaT-Keratinocyten wurde PBS zusätzlich mit EDTA über einen Zeitraum von 10-15 min bei 37°C verwendet, um das Auflösen interzellulärer Kontakte zu bewirken. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin für 2-3 min bei 37°C inkubiert, welches das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden zur Folge hatte. Durch Zugabe von frischem Medium mit FCS und anschließender Resuspension, konnte die Trypsineinwirkung gestoppt- und die jeweilige Zellsuspension zur Aussaat weiterverwendet werden. Sollte eine bestimmte Menge an Zellen ausgesät werden, wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt.

3.2.3 Kryokonservierung

Um die Zellen für längere Zeit zu konservieren, wurden diese bei -150°C eingefroren. Dazu wurde eine Zellsuspension (siehe dazu 3.2.2) zunächst 5 min bei 150 g zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes das entstandene Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium (FBS mit 10% DMSO) resuspendiert. Nun wurde die Lösung in Kryoröhrchen pipettiert, und diese über Nacht zum schonenden Einfrieren zunächst bei -80°C verwahrt, um sie dann am nächsten Tag bei -150°C zu lagern.

3.2.4 Transiente Transfektion (HEK-Zellen)

Bei der transienten Transfektion wird Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle aufgenommen, welche jedoch nicht im Genom integriert wird, sondern nur temporär im Zellkern verbleibt. Für meine Arbeit habe ich eine Lipofektion mit MACSfectin™ Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden Zellen zunächst für die Aussaat zu je 500.000 Zellen pro Well auf einer 6-Wellplatte vorbereitet

(siehe dazu 3.2.2) und über Nacht inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 60% wurde die Transfektion durchgeführt. In je einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde zu 100 µl Opti-MEM™ (ein Serumreduziertes Medium) 1 µg DNA hinzugegeben und ebenfalls in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß ein Mastermix mit je 100 µl Opti-MEM™ und 4 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz pro Probe angesetzt. Dann wurden je 100 µl des Mastermixes in die Reaktionsgefäße der Opti-MEM-DNA Gemische gegeben und für 20 min inkubiert. In diesem Zeitraum wurde das Zellmedium erneuert. Es folgte eine tröpfchenweise Zugabe des Inkubats auf das Zellmedium. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf 10 cm Schalen umgesetzt. Bis zur Zellernte (siehe dazu 3.2.5) betrug die Inkubation etwa 48 Stunden.

3.2.5 Zellyse und Proteinextraktion

Um die von den Zellen exprimierte Proteine von Interesse mit bestimmten Methoden analysieren zu können, müssen diese zunächst extrahiert werden. Dazu wurde das Zellmedium entfernt, der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen und die mit PBS versetzten Zellen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Je nach Menge der Zellsuspension wurde diese in Falcon-Röhrchen oder in Reaktionsgefäße überführt und anschließend 5 min bei 4°C zentrifugiert (150 x g). Der Überstand wurde entfernt und zu dem Zellpellet 1 ml PBS hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 2x durchgeführt. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und am darauffolgenden Tag eine Zellyse durchgeführt (30 min auf Eis). Diese erfolgte mit einem Lysepuffer, welche einen Proteaseinhibitor enthielt (PI, 1:100). In Experimenten, wo phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden sollten, wurde noch zusätzlich 1 mM Natriumfluorid (NaF) und 1 mM Natrium Othovanadat als Phosphataseinhibitoren verwendet. Als weiterer Lysepuffer, versetzt mit den oben bereits erwähnten Inhibitoren, wurde für manche Versuche ein 8 M Harnstoffpuffer verwendet, welcher ein noch stärkeres Lösen von Proteinstrukturen induziert. Anschließend wurden die Proben zusätzlich mit einem Sonifikator (Sonoplus) per Ultraschall behandelt. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proben anschließend unter Kühlung 12 min zentrifugiert (25.150 g). Die Proteinmenge des gewonnenen Überstandes (Lysat) konnte mit der Bradford-Methode bestimmt werden (siehe dazu 3.3.2).

3.2.6 BioID mit Pulldown

Nach der Transfektion (3.2.4) wurden die Zellen am nächsten Tag auf eine 10 cm Schale umgesetzt, um die Gesamtzellzahl zu erhöhen. Einen Tag später erfolgte bei einer

Konfluenz von etwa 60% ein Mediumwechsel mit anschließender Biotingabe. Für manche Experimente wurde das Medium mit DMEM++ erneuert oder ein Serumentzug der Zellen mit FCS-freiem Medium (DMEM-) erzeugt, um den Biotingehalt im Medium vor der eigentlichen Biotingabe möglichst gering zu halten. Dann wurde bei der Hälfte der Schalen je Probe Biotin (50 μM) hinzugefügt, welche je nach Experiment direkt im Anschluss des Mediumwechsels oder einen Tag später (5 oder 30 min) vor der Zellernte zusammen mit oder ohne EGF-Gabe (100 ng/ml) erfolgte. Bei der anderen Hälfte der Schalen, welche als Negativkontrollen fungierten, wurde kein Biotin appliziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen (siehe Kapitel 3.2.5) am darauffolgenden Tag, konnten die Lysate für die BiID und den Pulldown verwendet werden. Die eingesetzte Lysatmenge variierte je nach Experiment zwischen 1 und 2,6 mg und sollte mindestens 1 mg betragen. Zunächst wurden die Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 für den Pulldown präpariert, indem die Aufbewahrungslösung der Beads ausgetauscht wurde. Dafür wurden diese im Behältnis gut resuspendiert und in einem Volumen zu je 20 μl pro Probe in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es folgten je 3 Waschschrte mit PBS, wobei die magnetischen Dynabeads durch einen Magnetstand, worin die Reaktionsgefäße platziert wurden, während dem PBS-Tausch fixiert werden konnten und nicht entfernt wurden. Dann wurden die Streptavidin Beads mit 500 μl einer BSA Lösung (1% BSA in PBS) resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerollt. Nachdem die Beads einmal mit je 500 μl Lysepuffer gewaschen wurden, folgte eine Resuspension mit der gleichen Lösung im Volumen der Ausgangsmenge von 20 μl pro Probe. Nach Zugabe der Streptavidin-Beads zu den einzelnen Proben wurden diese bei 4°C über Nacht in einem Rollrad inkubiert. Um alle nicht biotinylierten Proteine, also jene, die keine Bindung mit dem Streptavidin eingegangen sind, zu entfernen, wurden folgende Waschschrte mit je 1 ml der Lösung pro Probe durchgeführt: 1x mit IMM, 1x mit IMM + 2 M KCl, 3x mit dem Neufeld-Puffer und 1x mit PBS (die genaue Bezeichnung und Zusammensetzung der einzelnen Puffer und Lösungen sind Tabelle 4 zu entnehmen). Die Proben wurden anschließend für eine Analyse der Proteine mittels Western Blot vorbereitet. Dazu wurden die Beads in je 30 μl 2x LB mit DTT resuspendiert und zum Lösen der Streptavidinbeads von den jeweiligen Proteinen, sowie zur Denaturierung für 5-10 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden für einen Western Blot (siehe dazu 3.3.1) aufgetragen und 2 h geblottet, bevor die jeweiligen Proteine mit bestimmten Antikörpern detektiert werden konnten.

3.2.7 Stabile Integration der Konstrukte in den *AAV safe harbor locus* (CRISPR/Cas9)

Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode sollten die zuvor klonierten Konstrukte (BirA*-pSH-EFIRE5-P, Flotillin-2-BirA*-EFIRE5-P, Y163F-Flotillin-2-BirA*-pSH-EFIRE5-P) permanent in den *AAV safe harbor locus* der HaCaT-F2-KO-Zellen integriert werden, sodass die jeweiligen Klone eine konstante Expression der Proteine gewährleisten. Für die Transfektion wurden HaCaT-F2-KO-Zellen in 6-Wellplatten ausgesät (300.000 Zellen/Well), welche am nächsten Tag eine Konfluenz zwischen 60-70% erreichten. Für die anschließende Co-Transfektion wurden je 1/3 Konstrukt-Plasmide und 2/3 Cas-Plasmide eingesetzt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine gleichzeitige Transfektion zweier Nukleinsäuremoleküle (der jeweiligen klonierten Plasmide und des pCas9-sgAAVS1) in eine Zelle. Dazu wurde pro Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß je 0,25 µg der Konstrukt-DNA und 0,5 µg des Cas-Plasmids in 100 µl Opti-MEM™ angesetzt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde eine Suspension als Mastermix vorbereitet, welcher je 3 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz in je 100 µl Opti-MEM™ pro Probe enthielt. Die weiteren Transfektionsschritte sind dem Abschnitt 3.2.4 zu entnehmen.

3.2.8 Generieren von Zellklonen

Nach der Co-Transfektion (3.2.7) wurden die Zellen am darauffolgenden Tag für das weitere Wachstum auf je eine 10 cm Schale ausgesät (siehe dazu auch 3.2.2). Nach einem weiteren Tag erfolgte eine Zellselektion mit dem Zellgift und Antibiotikum Puromycin (1-2 µg/µl). Alle erfolgreich transfizierten Zellen, welche durch das aufgenommene Plasmid eine Resistenz gegen Puromycin erhielten, blieben dadurch unbeeinflusst und konnten weiter kultiviert werden. Zellen, welche keine stabile Integration der Plasmide erreichen konnten wurden eliminiert. Mit einer Kontrollgruppe mit nicht-transfizierten Zellen konnte die Puromycin-Wirkung beobachtet werden. Das Medium mit dem Antibiotikum wurde in der ersten Woche, je nach Anzahl der toten Zellen, alle 1-3 Tage erneuert. Nach ca. 2-3 Wochen Zellkultivierung und Inkubation mit Puromycin bildeten sich aus Einzelzellklonen Kolonien. Hatten diese eine gewisse Größe erreicht, konnten sie gepickt und separat zunächst in 12-Wellplatten kultiviert werden. Für das Picken der Klone wurden die 10 cm Schalen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 8 ml PBS befüllt. Mit einer 200 µl Pipette wurde unter kontrolliertem Druck und gleichzeitigem Schaben auf der jeweiligen Kolonie 150 µl Zellsuspension aufgenommen und in das zuvor mit 2x Trypsin vorgelegte Well der 12-Wellplatte resuspendiert. Die Zellen wurden bei 37°C für 5 min inkubiert und die

Trypsinwirkung, welche zusammen mit vorsichtigem Klopfen die Zellen vereinzelt, mit je 1 ml DMEM++++ pro Well gestoppt. Durch ein Auf- und Abpipettieren wurde das Vereinzeln der Zellen in der Suspension zusätzlich gefördert. Ein Mediumwechsel wurde nach Erreichen der Adhäsion durchgeführt. Die Kultivierung der Klonkulturen erfolgte bis zu einer Konfluenz von 60-70%. Entweder wurden sie zuerst in einer 6-Wellplatte kultiviert und dann in einer T25-Kulturflasche weiter expandiert, um die Proteinexpression später mit der Western-Blot-Methode (3.3.1) zu überprüfen. Alternativ wurde die Expression zuerst überprüft, bevor die Zellen aus den 12-Wellplatten in größere Kulturbedingungen umgesetzt wurden. Positive Klone sind in Kryoröhrchen bei -150°C verwahrt worden (siehe dazu 3.2.3).

3.2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Methode der Immunfluoreszenz können bestimmte Proteine von Interesse unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu binden an die jeweiligen zuvor auf den Zellen applizierten, spezifischen Primärantikörper die Sekundärantikörper, die mit einem Fluorophor konjugiert sind, welche die Visualisierung der Zielproteine unter einem Fluoreszenzmikroskop ermöglichen. Dazu wurden Zellen gleichmäßig auf 2-3 Wells einer 12-Wellplatte mit vorher platzierten und für eine Zellhaftung mit Poly-L-Lysine getränkten Deckgläschen (15 mm) pipettiert. Hatten die Zellen eine Konfluenz zwischen 50-70% erreicht, konnten sie mit Methanol auf den Deckgläschen fixiert werden. Dazu wurde das alte Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und pro Well 1 ml eiskaltes (-20°C) Methanol hinzugegeben und für 8 min bei -20°C inkubiert. Nach zügigem Entfernen des Alkohols folgten drei Waschschrte mit PBS zu je einer Minute. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden, wurden die fixierten Zellen zunächst mit einer Block-Lösung (1% BSA in PBS) für 1 h inkubiert. Danach folgte eine Inkubation für 1-2 h mit einem primären Antikörper, welcher zuvor in einem bestimmten Verhältnis (Tabelle 7) mit 1% BSA in PBS angesetzt wurde. Bevor die Zellen mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 8) behandelt und für 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert wurden, gingen dem Verfahren drei Waschschrte von je 5 min mit PBS voraus. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in ddH₂O gespült und blasenfrei auf die Objektträger platziert. Für das Eindeckeln war zuvor auf die beschrifteten Objektträger je 10 μl ROTI® Mount FluorCare mit DAPI (für das Anfärben der Zellkerne) pipettiert worden. Die Lagerung erfolgte bei 4°C , und es konnte eine Fluoreszenz-Mikroskopie mit einem konfokalem, Laser-freiem Spinning-Disc-Mikroskop (Aurox Clarity) durchgeführt werden. Das anschließende

Aufnahmen und Generieren von Bildern bzw. Abbildungen erfolgte mit den Programmen „Visionary“ (AUROX) und „Fiji“ bzw. ImageJ2 (NIH).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Ermittlung der Proteinmenge. Die Proben, welche zuvor entsprechend des Messspektrums verdünnt wurden (meist 1:20), sind je als Triplets auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells zu je 10 µl aufgetragen worden. Gleiches Verfahren galt für eine vorher zusammengestellte Standardkonzentrationsreihe mit bekannten Referenzwerten. Nach Zugabe von je 200 µl Bradford-Reaktionsreagenz konnte die Platte in einem Mikroplattenleser (Tecan) bei einer Wellenlänge von 595 nm ausgelesen und die jeweilige Proteinkonzentration mittels photometrischer Absorptionsmessung der gefärbten Proben ermittelt werden.

3.3.2 SDS-PAGE und Western-Blot

Die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) ist eine analytische Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. Nach dessen Abschluss wird das Gel im Western Blot weiterverwendet. Mit der Methode eines Western Blots werden die Proteine auf eine Membran transferiert, um sie anschließend mit einer Immundetektion bestimmen zu können. Zur Vorbereitung der Lysatproben wurden diese zunächst mit denaturierendem Ladepuffer (2xLB oder 4xLB jeweils mit 10 mM DTT) versetzt und anschließend für 5-10 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden zusammen mit einem in einer separaten Tasche mitlaufenden Proteinmarker aufgetragen. Das SDS-Polyacrylamidgel, welches im Vorfeld wie in Tabelle 4 gegossen wurde, lief ca. 1,5 h in einer Lämmli-Gelelektrophorese-Pufferlösung bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel.

Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Transfermembran folgte ein Western Blot in Blottingpuffer bei 400 mA. Dabei betrug die Dauer, abhängig von der jeweiligen Größe der zu übertragenden Proteine, entweder 1,5 oder 2 h. Anschließend konnte der Erfolg der Übertragung mittels einer Ponceau-Färbelösung bestätigt werden. Die Membran wurde kurz mit TBS-T gewaschen und für 1 h je nach Experiment entweder mit einer 5%igen Milchlösung in TBS-T oder in einer 3%igen BSA-Lösung in TBS-T geblockt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Über Nacht wurde zum Detektieren eines bestimmten Proteins der jeweilige primäre Antikörper (Tabelle 7) bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dieser entfernt, und die Membran für jeweils 10 min dreimal mit TBS-T gewaschen. Dann wurden Sekundäntikörper (siehe

dazu Tabelle 8) entweder für eine Chemilumineszenz oder für eine Fluoreszenz für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Bei einer Chemilumineszenz ist der Antikörper mit einem HRP-Metalloenzym (Horseradish Peroxidase bzw. Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Dieses Enzym ermöglicht die Visualisierung von Antigenen bzw. Analyten, indem es lumineszierende Reaktionsprodukte erzeugt. Diese werden dann mithilfe eines Entwicklungsgeräts auf einem Röntgenfilm analog dargestellt. Bei der Methode der Fluoreszenz ist der Antikörper bereits mit einem Fluorophor konjugiert. Die Membran wird daher in Dunkelheit inkubiert, und die Entwicklung erfolgt digital mit einem Fluoreszenz-Imaging-System (LI-COR: Odyssey® Imagers).

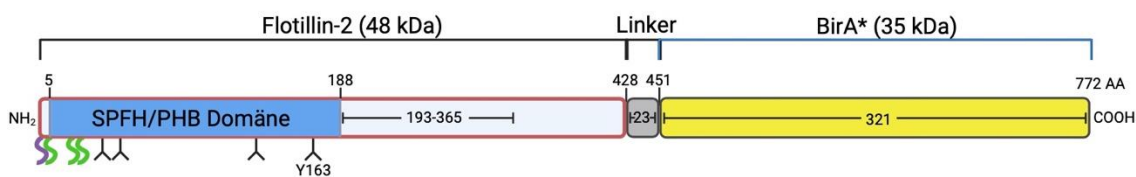
Nach Entfernung des sekundären Antikörpers folgten wieder drei Waschschrte à 10 min mit TBS-T, bevor die Membran getrocknet und im Falle einer Chemilumineszenz 5 min mit einer ECL-Lösung behandelt und in einer Röntgenkassette zur nachfolgenden Entwicklung in der Entwickler Maschine (Curix 60) befestigt wurde. Beim fluoreszenzbasierten Western Blot erfolgte die Auswertung der emittierten Signale digital am LI-COR Odyssey® Imager. Wenn die Membran zum Nachweis von weiteren Proteinen nochmals Verwendung fand, wurde sie für 10 min mit 0,1 M NaOH „gestrippt“, kurz mit ddH₂O neutralisiert, mit TBS-T gewaschen und vor einer Antikörperinkubation erneut mit einer Block-Lösung behandelt.

4 Ergebnisse

4.1 Generieren von stabilen HaCaT-Zelllinien mit Flotillin-2-BirA*-Fusionsproteinen unter Anwendung der CRISPR/Cas9-Methode mit Integration in den AAV safe harbor locus

Ziel der nachfolgenden Versuche war die stabile Integration von Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukten sowie der Biotinligase BirA* (als Negativkontrolle) (Abbildung 8), mittels der CRISPR/Cas9 Methode in den *AAV safe harbor locus* von HaCaT- Keratinozyten. Bei einer stabilen und homogenen Expression von BirA* und den Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* (Wildtyp und Y163F-Mutante), könnten weitere funktionelle Experimente, wie die Detektion von Interaktionspartnern von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen, mittels der BioID-Methode durchgeführt werden.

Flotillin-2-BirA*



Y163F-Flotillin-2-BirA*



Biotinligase BirA*



Created in BioRender.com

Abbildung 8: Aufbau der Flotillin-2 Fusionskonstrukte und der Biotinligase BirA*.

Das Flotillin-2 Protein ist jeweils über einen Linker mit der Biotinligase BirA* verknüpft. Dabei ist die Ligase mit dem C-Terminus der Flotillin-2-Proteine assoziiert. Die Fusionsproteine unterscheiden sich an der Aminosäureposition 163. In der Wildtyp-Variante ist ein funktioneller Tyrosinrest vorhanden, während bei der Mutante (Y163F) das Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt wurde. Die Flotilline setzen sich aus 428, der Linker aus 23 und die Biotinligase aus 321 Aminosäuren zusammen.

4.1.1 Mutagenese der pcDNA3-Konstrukte für die Klonierung in pSH-EFIREs

Um im Rahmen meiner Arbeit die bereits vorhandenen Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukte Flotillin-2-BirA*- und Y163F-Flotillin-2-BirA* sowie die reine Biotinligase BirA* in pcDNA3 Plasmiden in den neuen Vektor pSH-EFIREs-P-AtAFB2 mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode in den *AAV safe harbor locus* zu integrieren, wurde zunächst eine Mutagenese (Entfernung einer NotI-Schnittstelle) der pcDNA3-Konstrukte durchgeführt. Die störende NotI-Schnittstelle im Linker zwischen Flotillin-2 und BirA* wurde per Punktmutagenese (GCC zu TCC) zerstört, sodass die Inserts korrekt herausgeschnitten werden konnten und eine erfolgreiche Ligation mit dem neuen Vektor durchgeführt werden konnte. Nach Selektion der mutierten DNA mittels Restriktionsverdau und DNA-Aufreinigung, wurden die Plasmide zur Amplifikation in kompetente XL1-Blue Bakterien transformiert und nach einer Mini-Plasmid-Präparation sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen (Abbildung 9).

- A BirA*-pcDNA3-noNotI**
 CCCAGCGTTTACCACACTGCTCGCCAGAGTGAATTCACCGTTTCGCTAACAGGGCAATCAATTTTCAGTGGCAGCGTGTATCCTTCATTTTACAGAACCCAGAAGTAGAACCTGAACCCAT**GCGGCC**TCCAGTGTGATGGAT
 ATCTGCAGAAATCCAGCACACTGGCGGCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGGCTCCCTATAGTGAAGTCTGATTAATTTGCATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTA
 TATAGACCTCCACCGTACAGCCCTACCGCCATTTGGCTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTCCAAACAACTCCCATTTGACGCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCCCGT
 GAGTCAAAACCGTATCCACGCCATTTGATGATGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGACTGCCAAGTAGAAAGTCCCATAGGTCATGACTGGGCATATGCCAGGGCGGCGCATTT
 ACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGTATGACTGCGCAAGTGGGCGATTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCATGGAAAGTCCCATTTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTA
 TTGACGTCAATGGGGGGGGTCTGTTGGCGGTCAGCCAGGGCGGCGCATTTACCGTAAAGTATGTTAACCGGAACTCCATATATGGGCTAGAACTAATGACCCCGTAAATGATTAATTAATACGTAATAATCAATG
 CAACGGTATATCTGGCCGTCATCTGCGGAAGCAGCGCAAAACGCCCTAACCTAAGCAGATCTTTCATGCAATTTGCGGTCAAGCCTTGCCTTGTGTAGCTTAAATTTTGTCTGCGCACACTCAGCGACCTCCAAACACA
 AGCAGGAGCAGATAGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATGTACTGAGAGTGCCACATAGGGGATCGGGAGATCTCCCGATCGCTGCAGCTCAGGTGGACATTTTCGGGAAATGTGCGCGAAACCCCTATTTGTTT
 ATTTTTCTAAATACATTCAA
- B Flotillin-2-WT-BirA*-pcDNA3-noNotI**
 NNCGGTTTACCACACTGCTCGCCAGAGTGAATTCACCGTTTCGCTAACAGGGCAATCAATTTTCAGTGGCAGCGTGTATCCTTCATTTTACAGAACCCAGAAGTAGAACCTGAACCCAT**GCGGCC**TCCAGTGTGATGGAT
 CTGCAGAAATCCACACTGGCGACCCAGTGGCATTTCTGATCAGTGGTATCTTTGAGAGTCCACACCAGTGAAGGATGAACAGAACAGGCAAGTCTGCTAGCAGCCGGTTCACCTTCTGATGTCACCTTGTCTGTGCCCCA
 CTGAGAACCAACTCTCATCTCACTTAAAGTCAAGGGTGGGAGATCTTGGCAGCAATCTGGGGCAGGGCTCCAGCACAGGCCATCTTGGCCGATCCCTACTCTGTTAGGCTCAGCTTTAACTCATCCGCTGGC
 CTGGCCCTGGCCATGGCTCAATGACTGCTGCTCTGCTCCCGATTTTGGCAATCTCTCAGCTTCTGCTTGTGCGCAAGAGGACTGTTTACCTTTTCCCTTCCAGCAATCTGCTGATGCGGGCTCTGCTCTG
 CAGGGCGGGCACTGTGGCGATGAGCTCTTGTCTGTCGGCAGGATCTCTGCGCTCCACGGCGATCTGCTTCTGCGCTGTACTACTCAATCTCAATCTCTTCTCCCGATCTCTGTTGCTCTTGGCCCTGTAGC
 TCATAGCCAACTGGGCGTCACTGCTCTGATGTTGACTCTCTCACTGAAGGCTGACTTTTGCAGCTCAAAGGCTCTCTGGAGTCAGCAATCTGGTGTCTGCGATGAATCTCACATGATGATTTCTTCTGACCTGGC
 TTCCCGATGCTGGCTCCGCTCTGCTCTGCCACACCATGCTGCTGCTCTGTACAGCGGAGCTGTGCTTGTGCCAGGGAGCTCAGATAGTCTACTTTGTCTAGACATCTTGTATGAGTGAAGTGAAGTCTCGA
 TGCCCATACGGCAACTCAGGGGCTGCCACTTCCCGCACCAGTGTGGCAAACTGGTCTCGGCTCTGTAATAATCTGCTCCACAGTCAGAGTCCCAAGGATGGAGGCTAGATGCCCTCCAGGGTCTGACAGTACGAGTCTTA
 ATGTCCTGCAGTCTTGGCCAGGAAGTGTMMAGGCTACAGCTAGGA
- C Flotillin-2-Y163F-BirA*-pcDNA3-noNotI**
 NNAGCGTTTACCACACTGCTCGCCAGAGTGAATTCACCGTTTCGCTAACAGGGCAATCAATTTTCAGTGGCAGCGTGTATCCTTCATTTTACAGAACCCAGAAGTAGAACCTGAACCCAT**GCGGCC**TCCAGTGTGATGGATA
 TCTGCAGAAATCCACACTGGCGACCCAGTGGCATTTCTGATCAGTGGTATCTTTGAGAGTCCACACCAGTGAAGGATGAACAGAACAGGCAAGTCTGCTAGCAGCCGGTTCACCTCTGATGTCACCTTGTCTGTGCC
 ACTGAGAACCAACTCTCATCTCACTTAAAGTCAAGGGTGGGAGATCTTGGCAGCAATCTGGGGCAGGGCTCCAGCACAGGGCCATCTTGGCCGATCCCGCTACTCTGTTAGGCTCAGCTTTAACTCATCCGCTCGG
 CCTGGCCCTTGGCCATGGCTCAATGACTGCTGCTGCTCTCCCGATTTTGGCAATCTCTCAGCTTCTGCTTGTGCGCAAGAGGACTGTTTACCTTTTCCGCTTCCAGCAATCTGCTGGATGCGTGGGCTCTGCTCT
 GCAGGGCGGGCACTGTGGCGATGAGCTCTTGTCTGTCGGCAGGATCTCTGCGCTCCACGGCGATCTGCTTCTGCGCTGTACTACTCAATCTCAATCTCTTCTCCCGATCTCTTGTGCTCTGGCCCTTGTAG
 CTCATAGGCCAACTGGGCGTCACTGCTCTGATGTTGACTCTCTCACTGAAGGCTGACTTTTGCAGCTCAAAGGCTCTCTGGAGTCAGCAATCTGGTGTCTGCCATGAATCTCACATCTAGCATTTCTTCTTGGACTCGG
 CTCTCCCGATGCTGGCTCCGCTCTGCTCTGCCACACCATGCTGCTGATCTCTGTACAGCGGAGCTGTGCTTGTGCCAGGGAGCTCAGAAAGTCTACTTTGTCTAGACATCTTGTATGTTGAAGTGAAGTGAAGTCTCGA
 ATGCCCATACGGCCAACTCAGGGGCTGCCACTTCCCGCACCAGTGTGGCAAACTGGTCTCGGCTCTGTAATAATCTGCTCCACAGTCAGAGTCCCAAGGATGGAGGCTAGATGCCCTCCAGGGTCTGACAGTACGAGTCTTA
 ATGTCCTGCAGTCTTGGCCAGGAAGTGTMMAGGCTACAGCTAGGA

Abbildung 9: Sequenzierung der mutagenisierten Plasmide.

Sequenzierung der erfolgreich eingebauten Punktmutation der Plasmide (A) BirA*-pcDNA3-noNotI, (B) Flotillin-2-WT-BirA*-noNotI und (C) Flotillin-2-Y163F-BirA*-noNotI. Die Sequenzierung wurde mit dem Primer BirA-rev-seq durchgeführt. Der blau markierte Sequenzabschnitt des abgebildeten Komplementärstranges stellt die NotI-Stelle mit der jeweils rot hinterlegten Punktmutation (GCC zu TCC) dar. Die Mutagenese der bereits vorhandenen Ausgangsplasmide wurde mit den Primern Rmv-NotI-BirA-fwd und Rmv-NotI-BirA-rev im PCR-basierten Verfahren durchgeführt.

4.1.2 Klonierung von Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs

Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Integration jener Konstrukte und das Generieren stabiler Zelllinien musste zunächst eine Umklonierung der Flotillin-BirA*-Fusionskonstrukte vom Vektor pcDNA3 in einen anderen Vektor (pSH-EFIREs) erfolgen. Nach Vorbereitung mittels eines Restriktionsverdau sowie DNA-Reinigungsschritten der jeweiligen Inserts (BirA^{*}-, Flotillin-2-BirA^{*}- und Y163F-Flotillin-2-BirA^{*} -noNotI pcDNA3) und des Vektors (pSH-EFIREs-P), konnten Ligationen durchgeführt werden. Die generierten Plasmid-Konstrukte wurden durch eine Transformation in XL1-Blue-*E. coli* Bakterien amplifiziert, und die DNA anschließend mit einer Mini-Präparation isoliert. Mit einer Agarose-Elektrophorese nach vorangegangenem Restriktionsverdau, sowie einer anschließenden positiven Sequenzierung, konnte der Erfolg der Klonierung der Konstrukte (BirA^{*}-, Flotillin2-BirA^{*}- und Y163F-Flotillin2-BirA^{*} -pSH-EFIREs-P) verifiziert werden (Abbildung 10).

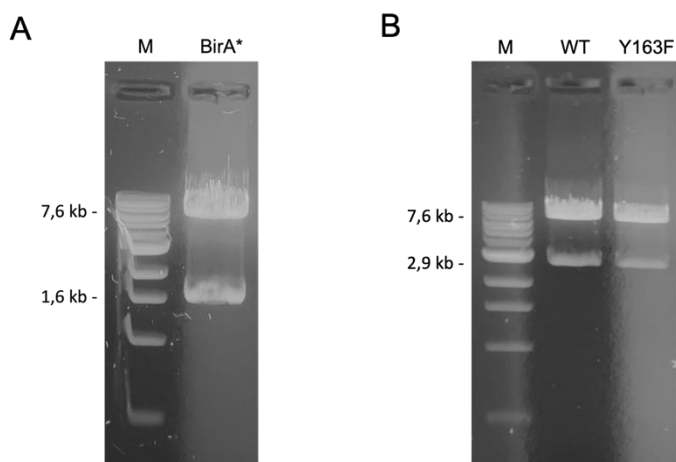


Abbildung 10: Agarose-Elektrophorese Verifizierung der Ligation.

Vor Überprüfung der Konstrukte durch eine Sequenzierung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Verifizierung vorangestellt. Das in (A) dargestellte Gel zeigt das jeweilige mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnittene BirA^{*} Konstrukt, welches eine Größe von 7,6 und 1,6 kb vorweisen musste. Die in (B) gezeigten Flotillin-2-Konstrukte (WT und Y163F), welche mit denselben Enzymen verdaut wurden, weisen eine zu erwartende Größe von je 7,6 und 2,9 Kilobasenpaaren auf. Bei einer gescheiterten Ligation wäre nur ein leeres Vektorplasmid der Größe von 9,2 kb sichtbar gewesen.

4.1.3 Überprüfung der Expression von Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs

Bevor die klonierten Konstrukte stabil in das Genom der HaCaT-Zellen mittels CRISPR/Cas9 in den *AAV safe harbor locus* integriert werden sollten, wurde zunächst eine transiente Transfektion in HEK-Zellen (*human embryonic kidney*) durchgeführt, um die Expression von Flotillin-2 und BirA* aus dem neuen Vektor pSH-EFIREs im Western Blot zu überprüfen. Dazu wurden HEK-Flotillin-2-KO Zellen mit den Flotillin-2-Fusionskonstrukten des Wildtyps und der Y163F-Mutante sowie BirA* als Negativkontrolle sowohl im pcDNA3-, als auch im pSH-EFIREs-Vektor transfiziert, in DMEM++ Medium kultiviert und nach der Zellernte lysiert. Im anschließenden Western Blot konnte erfolgreich die Expression der Fusionsproteine und BirA* auch im neuen Vektor (pSH-EFIREs) gezeigt werden (Abbildung 11).

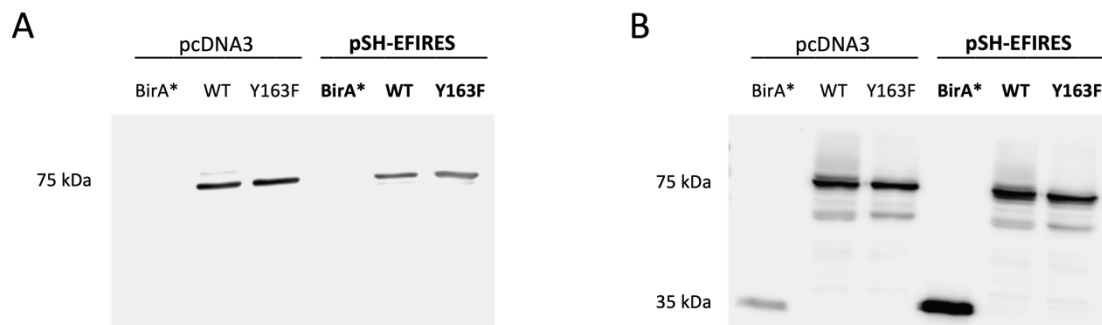


Abbildung 11: Überprüfung der Expression von Flotillin2-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs.

Die zuvor mit MACSfectin transfizierten HEK-F2-KO Zellen mit den Plasmiden BirA*-, Flot2-WT-BirA*- und Flot2-Y163F-BirA*-pcDNA3 sowie -pSH-EFIREs wurden in DEMEM++ kultiviert, nach der Zellernte lysiert und für den Western Blot vorbereitet. Es wurden von allen Proben jeweils 30 µg Protein auf einem 10%igen Gel (A) und auf einem 15%igen Gel (B) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit (A) Flotillin2/ESA - Antikörpern und (B) BirA* - Antikörpern. In (A) konnte das Fusionsprotein Flot2-BirA* bei 75 kDa nachgewiesen werden. Bei der Negativkontrolle BirA* waren keine Signale sichtbar. (B) zeigt die Expression von BirA* sowohl als Teil des Fusionsproteins bei 75 kDa, als auch ohne Flotillin-Fusion in der Kontrolle (35 kDa).

4.1.4 Stabile Integration in HaCaT-Zellen und Expression von Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs

Um die klonierten Konstrukte mit der Methode CRISPR/Cas9 in den *AAV safe harbor locus* stabil zu integrieren, wurden zunächst HaCaT-Zellen (Boukamp et al., 1988) transfiziert und anschließend mit einer Puromycinbehandlung positive Zellklone selektiert und kultiviert. Die Expression der jeweils synthetisierten Proteine wurde mit der Western-Blot Methode überprüft und anschließend mit einer Immunfluoreszenzfärbung optisch verifiziert. Ziel der Integration der Flotillin2-BirA*-Fusionskonstrukte, sowie der Biotinligase BirA* in humane immortalisierte Keratinozyten war die Etablierung stabiler Zelllinien. Die angewandte Methodik ließ jedoch nur die stabile Integration und Expression von der reinen Biotinligase BirA* zu. Die transfizierten und mit Puromycin selektierten Klonkolonien der Fusionskonstrukte des Wildtyp-Flotillin-2-BirA* sowie der Mutante (Y163F) konnten zwar kultiviert werden, jedoch zeigten diese keine erfolgreiche Expression im Western Blot, sodass das Experiment an dieser Stelle beendet wurde. Es haben sich nach der Puromycinbehandlung etwa 20 Kolonien in der 10 cm Schale gebildet, wobei bei der Mutante immer etwas weniger Kolonien vorlagen als bei dem Wildtyp. Von den gepickten Klonen konnten 14 des WT, sowie 11 der Mutante kultiviert, geerntet und lysiert werden. Anschließend wurden 9 Klone des WT, sowie 5 Klone der Mutante überprüft (Abbildung 12 B). Die Klonkolonien der kultivierten BirA*-HaCaT-Zellen zeigten sowohl im Western Blot (Abbildung 12 A) als auch in der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung eine erfolgreiche Expression der BirA*-Proteine (Abbildung 13). Im Vergleich zum WT zeigte BirA* nach der Puromycinbehandlung durch eine etwa doppelte Anzahl an gewachsenen Klonen eine größere Ausbeute. Von den etwa 20 gepickten und kultivierten Klonen wurden 8 nach Zellernte und Lyse im Western Blot verifiziert.

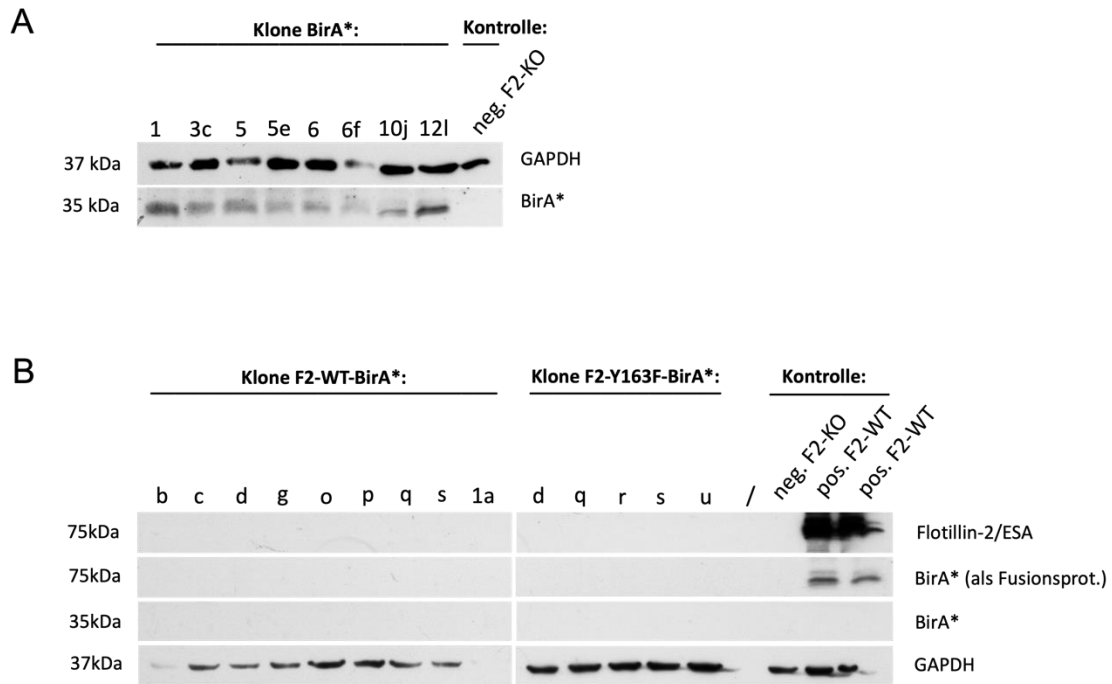


Abbildung 12: Western-Blot der Klone.

Die verifizierten Konstrukte wurden zusammen mit CRISPR/Cas9 in HaCaT-Zellen transfiziert und Zellklone mit Puromycin selektiert und generiert. Die aufgeführten Western-Blots zeigen (A) die erfolgreiche Expression von BirA* durch alle Klone, sowie eine Negativkontrolle mit Flotillin-2-KO-Zellen, welche nicht transfiziert wurden und folglich kein BirA* synthetisierten. Als Ladekontrolle wurde für die dargestellten Blots das in allen Zellen vorkommende Glykolyse-Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der in (B) dargestellte Blot zeigt, dass es keine positiven Klone der transfizierten Zellen mit Flotillin-2-WT-BirA* und Flotillin-2-Y163F-BirA* gab. Neben der Negativkontrolle, welche hier ebenfalls durch Flotillin-2-KO-Zellen erfolgte, wurde auch eine Positivkontrolle aus einer transienten Transfektion (4.1.3) mit dem Fusionsprotein der Flotillin-2-WT-Zellen mit BirA* aufgetragen. Dieses zeigte als Fusionsprotein auf Höhe von 75 kDa sowohl Signale für Flotillin-2/ESA, als auch für BirA*. BirA* (35 kDa) allein wurde nicht detektiert. Somit konnte überprüft werden, dass BirA* während des Verfahrens nicht vom Flotillin abgeschnitten wurde.

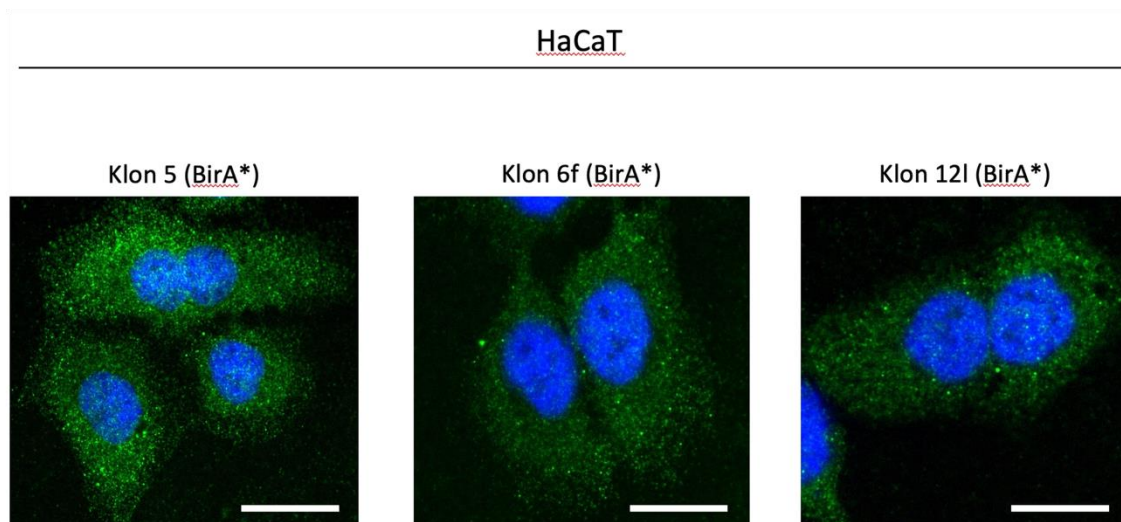


Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BirA*.

Ausgewählte BirA*-Klone wurden auf Deckgläschen kultiviert, anschließend fixiert und nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopiert. Die im Western-Blot positiven BirA*-Klone konnten so anhand von drei ausgewählten Klonen (5, 6f und 12l) mit der Methode der Immunfluoreszenz optisch homogen nachgewiesen werden. Die blaue DAPI-Färbung markiert die im Zellkern befindliche DNA, die grüne Färbung (Alexa Fluor 488) repräsentiert das synthetisierte Protein BirA*, welches homogen überall im Zytoplasma vorzufinden war. Der Maßstab beträgt 20 µm.

4.2 Nachweis von BirA*, Flotillin-1 und Flotillin-2 in den Ausgangskonstrukten der pcDNA3-Plasmide mit der Immunfluoreszenz in Flotillin-2 Knockout-HEK293T-Zellen

Da es nicht gelungen ist, HaCaT-Zellen mit stabiler Expression der Flotillin-BirA*-Fusionsproteine herzustellen, wurden die folgenden Versuche mit HEK293T-Flotillin-2-Knockout-Zellen durchgeführt und mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg mittels der BioID-Methode untersucht.

Zunächst wurde die Expression und Lokalisation der alleinigen Biotinligase und der Flotillin-2-Fusionsproteine des Wildtyps und der Mutante, sowie Flotillin-1 mit der Immunfluoreszenz in Flotillin-2-Knockout-HEK293T-Zellen überprüft (Abbildung 14). Hierzu wurde diese Zelllinie zunächst mittels einer Lipofektion transient transfiziert, anschließend zwei Tage kultiviert und für eine Immunfluoreszenzfärbung mit Methanol fixiert. Nach Durchführung einer Färbung konnte die jeweilige Lokalisation mittels eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden.

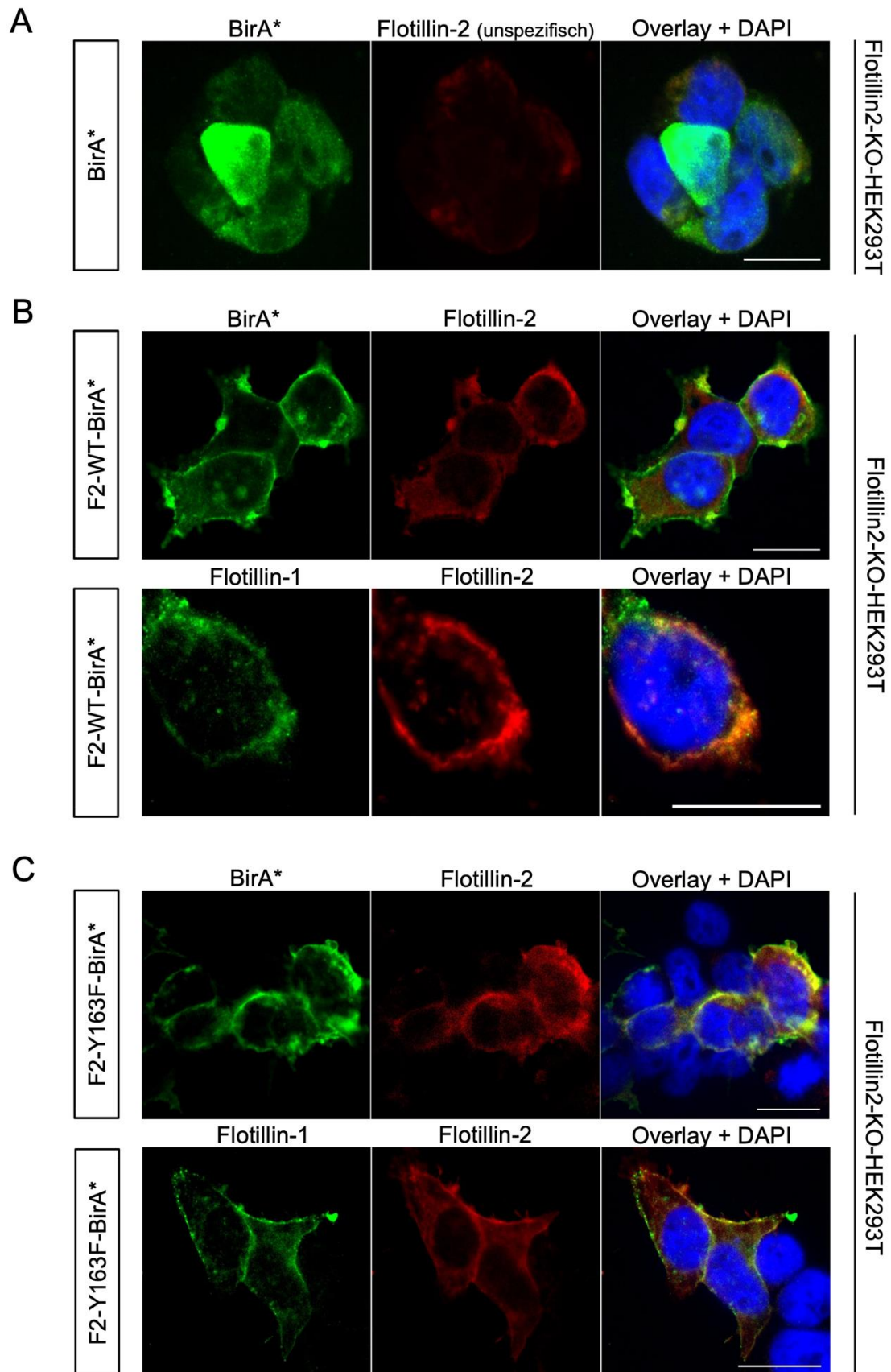


Abbildung 14: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BirA*, Flotillin-1 und Flotillin-2 HEK-F2-Knockout-Zellen.

HEK-F2-KO-Zellen wurden zunächst transfiziert, auf Deckgläschen kultiviert, mit Methanol fixiert und anschließend eine Färbung für eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Zellen mit der transfizierten reinen Biotinligase (A) wurden mit BirA* und Flotillin-2-Antikörpern behandelt, und solche mit dem Fusionsprotein des Wildtyps (B) und der Y163F-Mutante (C) jeweils mit BirA- und Flotillin-2-Antikörpern, sowie mit Flotillin-1- und Flotillin-2-Antikörpern. Die Proteine wurden jeweils mit Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 488 - grün) für BirA* und Flotillin-1, sowie für Flotillin-2 (Alexa Fluor 564 - rot) gefärbt. Die Zellkerne der jeweiligen Proben erhielten durch das Eindeckeln der Deckgläschen auf einen Objektträger mit DAPI eine Blaufärbung. In (A) ist die reine Biotinligase überall homogen im Zytosol verteilt vorzufinden. Das Flotillin-2 ist in den Flotillin-2-KO Zellen nicht vorhanden und hier nur als unspezifischer Hintergrund zu detektieren. (B & C) zeigen die Lokalisation von BirA* zusammen mit Flotillin-2, sowie Flotillin-1 mit Flotillin-2. Alle Proteine sind hier zellmembranständig lokalisiert. Der Maßstab beträgt 20 µm.

In diesem Versuch konnte die Lokalisation von BirA* allein und als Fusionsprotein an Flotillin-2 gekoppelt dargestellt werden. Im Gegensatz zur reinen Biotinligase, welche homogen im Zytosol verteilt vorkommt, ist das Flotillin-2-BirA*-Fusionsprotein sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante (Y163F) an der Zellmembran vorzufinden. Auch Flotillin-1, welches in seiner Funktion eng an Flotillin-2 gekoppelt ist, weist neben einer intrazellulären Markierung ebenso eine membranständige Position auf.

4.3 Etablierung der BioID zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in HEK-F2-Knockout Zellen

Um mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 innerhalb der MAP-Kinase-Signalkaskade zu ermitteln bzw. zu identifizieren, wurde die Methode der BioID angewandt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, welches mittels einer mit Flotillin-2 als Fusionsprotein integrierten modifizierten Biotinligase (BirA*) alle in unmittelbarer Nähe befindlichen Proteine mit Biotin markiert. Die Biotinligase (BirA*) trägt eine Mutation (R118G) im Vergleich zu der ursprünglichen Version des BirA. Die mutierte und somit weniger selektive Variante als Teil des Fusionsproteins ist in der Lage, alle in unmittelbarer Umgebung befindlichen Proteine in einem bestimmten Aktionsradius mit Biotin zu markieren (sog. „Enzym-Labeling“). Dies steht im Gegensatz zum Wildtyp-BirA, welcher nur spezifische, vorher mit einer Biotinylierungs-Zielsequenz markierte Proteine biotinylieren kann (Choi-Rhee et al., 2004). Als Voraussetzung muss dabei die Anwesenheit von Biotin im Medium gewährleistet sein. Dieses ist zu einem gewissen Teil schon im DMEM++ -Medium durch das FCS vorhanden und wurde auch zu dem Zweck nach einer Kultivierung mit Medium ohne FCS (DMEM-) je nach Experiment 24 h, 30 min oder 5 min vor der Zellernte zusätzlich appliziert.

Die Fusionskonstrukte Flotillin-2-WT-BirA* sowie die Y163F-Mutante des Flotillin-2-BirA*, welche an der 163. Aminosäure ein Phenylalanin an Position des Tyrosins besitzt und folglich keine Phosphorylierung an dieser Stelle mehr möglich ist, standen bereits kloniert in Vektor pcDNA3 zur Verfügung. Das Protein Flotillin-2 allein besitzt dabei eine Molekülmasse von 48 kDa und die Biotinligase eine von 35 kDa, wobei sie als fusionierte Variante 80 kDa erreichen. Nach dem Enzym-Labeling können mit einem Pulldown und dort verwendeten magnetischen Streptavidin-Kügelchen (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1), welche eine starke Bindung mit dem Biotin eingehen, die markierten Proteine isoliert werden. Im Western Blot wurden vorher aus dem MAPK-Signalweg ausgewählte, mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 mit Antikörpern getestet.

4.3.1 Nachweis von Interaktion zwischen Flotillin-1 und Flotillin-2 zur Etablierung und Überprüfung der BioID

Bevor mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg untersucht wurden, erfolgte zunächst die Etablierung und Überprüfung der BioID-Methode mit anschließendem Pulldown mittels der Streptavidin Beads. Es ist bekannt, dass Flotillin-2 Heterooligomere mit Flotillin-1 bildet (Babuke et al., 2009a). Deshalb sollte zunächst die Biotinylierung von Flotillin-1 durch Flotillin-2-BirA* nachgewiesen werden. Dazu wurden HEK-Flotillin-2-KO Zellen mit den Flotillin-2-Fusionskonstrukten (Wildtyp und Y163F-Flotillin-2) sowie der alleinigen Biotinligase BirA* als Negativkontrolle transfiziert, in DMEM++ Medium kultiviert und zusätzlich 24 h vor der Zellernte mit Biotin (50 µM) behandelt. In diesem ersten Biotinylierungsversuch konnte erfolgreich die erwartete Interaktion von Flotillin-1 mit Flotillin-2 nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die Methode könnte somit für weitere Versuche und zur Identifizierung von Interaktomen von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg Anwendung finden.

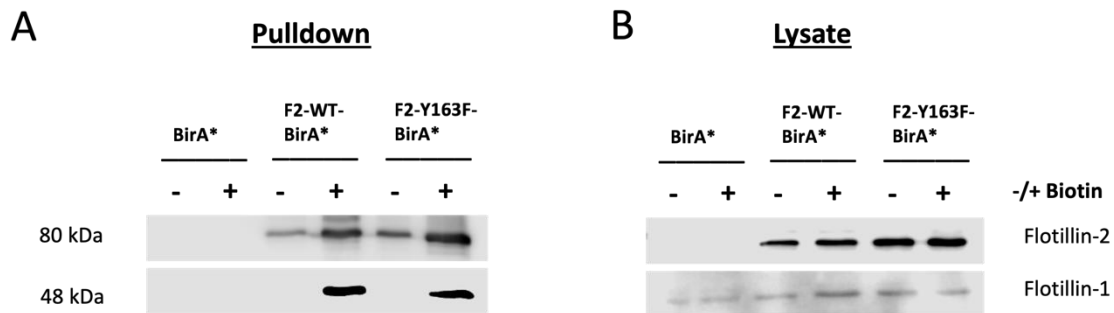


Abbildung 15: Western-Blots des Pulldowns (A) und der Lysate (B) nach BioID: Interaktion von Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* mit Flotillin-1 in HEK293T-Flotillin-2-KO Zellen.

Die mit den Plasmiden BirA^{*}-, Flotillin-2-WT-BirA^{*}- und Flotillin-2-Y163F-BirA^{*}-pcDNA3 transfizierten HEK-F2-KO Zellen wurden am folgenden Tag umgesetzt. 24 h vor der Zellernte mit anschließender Zellyse erfolgte bei der Hälfte der Schalen eine Behandlung mit 50 µM Biotin. Nach einem Pulldown mit 1 mg Lysat mit Streptavidin-Beads wurden die Proben mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Immunedektion erfolgte mit Antikörpern gegen Flotillin-1 und -2. In den Lysaten ist die Expression von der Flotillin-2 - Fusionsproteine, sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Y163F-Mutante bei 80 kDa nachweisbar. BirA^{*} allein als Negativkontrolle wurde hingegen mit den Flotillin-Antikörpern nicht detektiert. Während endogenes Flotillin-1 sich auf Höhe von 48 kDa in allen Lysatproben darstellte, konnte es im Pulldown im biotinylierten Zustand nur in den mit Biotin-behandelten Proben der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Flotillin-2-BirA^{*} bei 80 kDa lag bei F2-WT-BirA^{*} und F2-Y163F-BirA^{*} jeweils mit und ohne Biotin vor, wobei sich schwächere Banden bei den Proben ohne Biotingabe zeigten.

Mit dem Versuch konnte die Interaktion von Flotillin-1 mit den Flotillin-2-Fusionsproteinen im Pulldown in Anwesenheit von Biotin nachgewiesen werden. Ohne den Zusatz von Biotin war folglich eine Biotinylierung nicht möglich, welches sich im Ausbleiben von Signalen im WB zeigte. Sowohl für die Lysate als auch Pulldowns wurde BirA^{*} als Negativkontrolle verwendet und ergab kein Signal für Flotillin-1 oder Flotillin-2 im Pulldown. Die Flotillin-2-Fusionsproteine bei 80 kDa wurden nicht nur in den Biotinproben, sondern auch in Proben ohne zusätzliche Biotingabe detektiert. Dies bestätigt die Annahme, dass im Medium (DMEM++) bzw. FCS etwas Biotin anwesend ist, wodurch die Flotillin-2-BirA^{*}-Fusionsproteine in der Lage sind, sich selbst zu biotinylieren. Dies könnte der Fähigkeit zu Grunde liegen, dass Flotillin-2 Homooligomere bilden kann (Kokubo et al., 2003; Stuermer et al., 2001). In den Lysaten konnte in allen Proben endogenes Flotillin-1 nachgewiesen werden, und das Flotillin-2-BirA^{*}-Fusionsprotein wurde entsprechend bei 80 kDa detektiert. Somit wurde die Methode der BioID mit anschließendem Pulldown erfolgreich etabliert und wurde für weitere Experimente bzw. Untersuchungen anderer möglicher Interaktionspartner für Flotillin-2 angewandt.

4.3.2 Nachweis von Flotillin-1 mit der BioID nach Denaturierung mit Harnstoff

Da Flotillin-2 und Flotillin-1 hauptsächlich als Heterooligomere in Zellen vorliegen, sollte mit Hilfe einer Denaturierung vor dem Pulldown überprüft werden, dass Flotillin-1 nur mitpräzipitiert wird, wenn es tatsächlich biotinyliert ist. Durch die Denaturierung wurde gewährleistet, dass Flotilline für den Biotinylierungsversuch getrennt voneinander vorlagen. Sonst könnte Flotillin-1 durch die Bindung an Flotillin-2 im Pulldown auch im nicht-biotinylierten Zustand mit-präzipitiert werden. Der Versuchsaufbau gleicht, bis auf den verwendeten Lysepuffer, dem vorherigen Experiment in 4.3.1. Außerdem wurde nur das Flotillin-2-Wildtyp-BirA*-Fusionsprotein für diesen Zweck verwendet. Nach Transfektion, Kultivierung in DMEM++ und Biotingabe über Nacht erfolgte die Zellernte mit anschließender Lyse mit 8 M Harnstoff und zugesetztem Proteaseinhibitor (PI). Somit konnte sichergestellt werden, dass Flotillin-2 und Flotillin-1 nun für den Pulldown getrennt voneinander vorlagen. Im Western Blot konnte sowohl in den Lysaten als auch im Pulldown Flotillin-1 nachgewiesen werden (Abbildung 16).

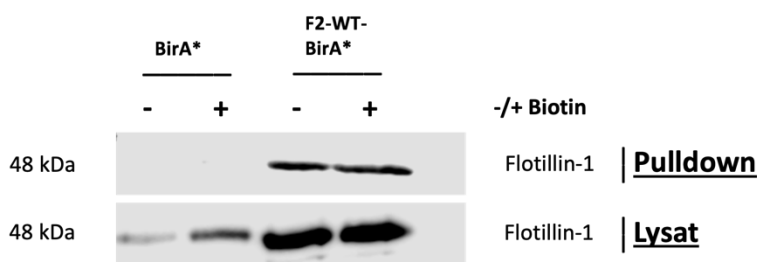


Abbildung 16: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID und Harnstoff-Denaturierung: Interaktion von Fusionsprotein Flotillin-2-BirA* mit Flotillin-1 in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.

Der Versuch wurde wie in Abbildung 15 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden die Zellen in 8 M Harnstoffpuffer mit PI lysiert. Dabei wurden 1,9 mg Protein für den Pulldown mit Streptavidin Beads verwendet. Im Lysat konnte endogenes Flotillin-1 auf Höhe von 48 kDa überall nachgewiesen werden. Im Pulldown mit und ohne Biotin zeigt sich die Interaktion von Flotillin-2 mit Flotillin-1. Bei BirA* als Negativkontrolle liegen hingegen keine Banden vor.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 tatsächlich von Flotillin-2-BirA* biotinyliert wird und nicht aufgrund der Interaktion mit Flotillin-2 co-präzipitiert wurde, da der Einsatz des starken Harnstoff-Lysepuffers zur Denaturierung von Protein-Oligomeren führt. Flotillin-1 (48 kDa) konnte so im Pulldown nachgewiesen werden. Da es auch in der Probe ohne Biotin vorhanden war, ist wie im vorherigen Versuch auf eine gewisse Biotinmenge im Medium bzw. FCS zu schließen. BirA* als Negativkontrolle zeigte keinerlei Interaktion mit Flotillin-1. Das endogene Flotillin-1 konnte überall im Lysat detektiert werden.

4.3.3 Nachweis von EGFR und ERK als Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg

Nach Etablierung und Prüfung der BioID-Methode mit Pulldown konnte diese für nachfolgende Experimente zur Untersuchung möglicher Interaktionen von Flotillin-2 mit Komponenten des EGFR/ MAPK-Signalweges durchgeführt werden. Zunächst wurde in diesem Versuch die Wechselwirkung mit dem EGF-Rezeptor und ERK geprüft.

Um die Interaktion von Flotillin-2 mit Komponenten des EGFR/MAPK-Signalweges zu untersuchen, wurden zunächst die HEK-F2-KO-Zellen wie zuvor transfiziert, in DMEM++ kultiviert, und jeweils die Hälfte der Schalen über Nacht mit 50 μ M Biotin inkubiert. Nach Zellernte und Lyse wurde eine größtmögliche Ausgangsproteinmenge von 2,6 mg für den Pulldown eingesetzt, da meine Vorversuche zum Nachweis von EGFR und ERK mit einer geringeren Menge unzureichende Signale zeigten. Nach SDS-PAGE mit abwechselndem Auftragen der Proben (-/+ Biotin) und WB konnte eine Immundetektion mit primären (gegen Flotillin-2, total-EGFR und total-ERK) und sekundären Antikörpern erfolgen. Es konnte sowohl EGFR als auch ERK in den Lysaten und im Pulldown als Interaktionspartner mit Flotillin-2 nach Anwendung der BioID nachgewiesen werden. Die gleichmäßige Expression der Fusionsproteine wurde mit Hilfe von Anti-Flotillin-2-Antikörpern im Western Blot bestätigt (Abbildung 17).

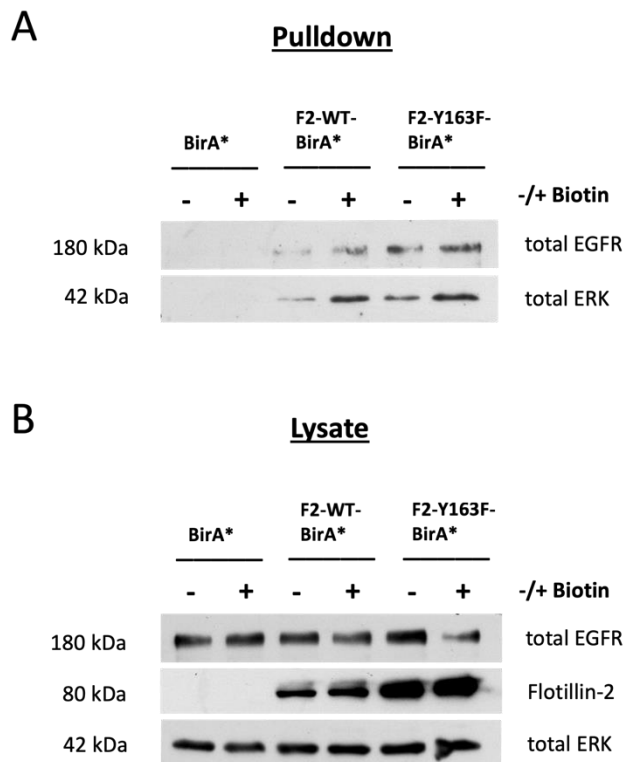


Abbildung 17: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit EGFR und ERK in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.

Die HEK-F2-KO-Zellen wurden mit BirA*, F2-WT-BirA* sowie F2-Y163F-BirA*- pcDNA3 Plasmiden mittels Lipofektion transfiziert, in DMEM++ kultiviert und nach Biotingabe (50 μ M) 24 h vor der Zellernte mit Lysepuffer lysiert. Nach Präzipitation mit je 2,6 μ g Protein pro ml wurden die Proben des Pulldowns und der Lysate für die SDS-PAGE im Wechsel mit und ohne Biotinbehandlung aufgetragen und nach anschließendem WB eine Immundetektion mit Antikörpern durchgeführt. Es konnte in allen Blots (A & B) erfolgreich der Nachweis für total EGFR und total ERK erbracht werden. Zusätzlich wurde in den Lysaten (B) noch erfolgreich ein Immunnachweis mit Flotillin-2 durchgeführt.

Der Versuch zeigt, dass Flotillin-2 im EGFR-Signalweg mit den Komponenten ERK und dem EGF-Rezeptor interagiert. Beide konnten jeweils im Pulldown und in den Lysaten nachgewiesen werden. Wie zuvor schon für Flotillin-1 beobachtet (Abbildung 15), scheint auch hier die Interaktion in den mit Biotin supplementierten Proben stärker zu sein.

4.3.4 Interaktionsnachweis von total EGFR und Flotillin-1 als Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in Abhängigkeit von EGF

Um die EGFR-Signalkaskade zu aktivieren und in diesem Versuch die Interaktionspartner in Abhängigkeit von EGF-Stimulierung zu untersuchen, wurde EGF in einem Versuchsteil hinzugefügt. Bis auf ein paar Modifikationen gleicht der Ablauf dieses Experimentes dem zuvor beschriebenen. Da das in der Zellkultur verwendete FCS verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, die eine Aktivierung des MAPK-Weges auslösen könnten, sollte der Versuch unter serumfreien Bedingungen in Gegenwart von EGF durchgeführt werden. Um einen Serumentzug (Verhungern), der Zellen zu erzeugen bzw. das FCS mit dem darin enthaltenen Biotinanteil zu entfernen, wurde 24 h vor der Zellernte in allen Schalen das Medium DMEM++ durch das FCS-freie DMEM ersetzt. Bei einem Vorversuch, wo der Rezeptor bzw. die Signalkaskade nur 5 min vor der Zellernte mit EGF- unter Biotingabe aktiviert wurde, konnten kaum bis gar keine Signale bei der Immundetektion dargestellt werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde die Behandlungszeit auf 30 min verlängert, um eine ausreichend hohe Biotinaufnahme der Zellen zu gewährleisten, sodass die Biotingabe hier zusammen mit dem auf die Hälfte der Schalen hinzugefügtem EGF 30 min vor der Zellernte erfolgte. Für den Pulldown wurde je 1 mg Lysatmenge verwendet. Total EGFR, Flotillin-2 und Flotillin-1 konnte in den Lysaten und im Pulldown nach Biotingabe nachgewiesen werden (Abbildung 18).

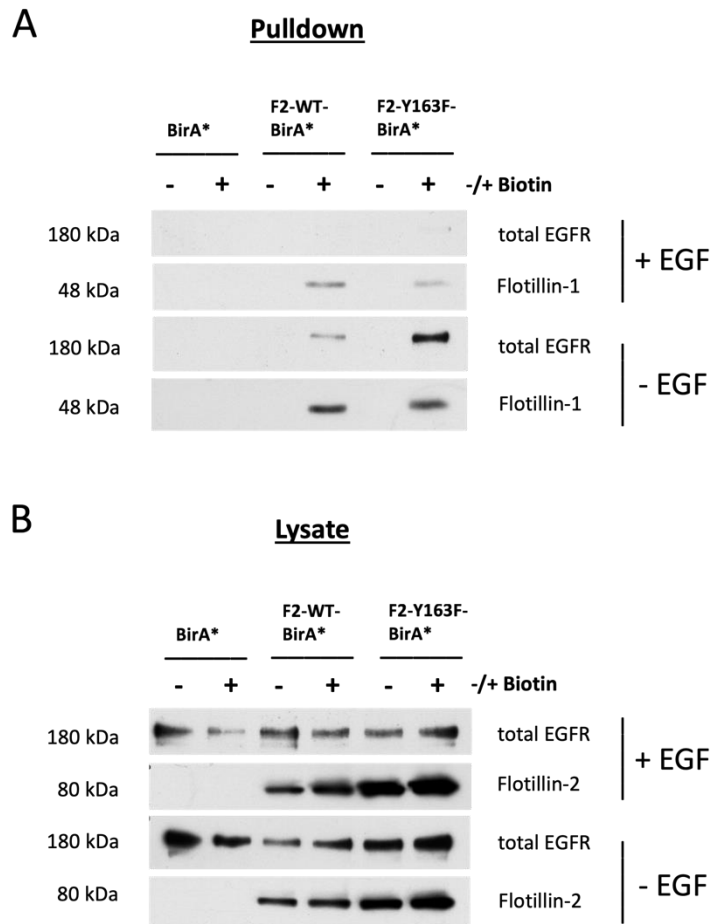


Abbildung 18: Western-Blot des Pulldowns (A) und der Lysate (B) nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit EGFR, Flotillin-1 und Flotillin-2 in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen, abhängig von EGF.

Der Pulldown wurde mit 1 mg Lysatmenge durchgeführt. Die Proben wurden jeweils abwechselnd (-/+ Biotin) aufgetragen und eine Immundetektion aller Blots (mit oder ohne EGF Stimulation) durchgeführt. Dabei konnte sowohl im Pulldown, als auch in den Lysaten total EGFR (180 kDa) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde im Pulldown (A) endogenes Flotillin-1 (48 kDa) und im Lysat (B) Flotillin-2 (80 kDa) und detektiert.

In diesem Versuch konnte der Nachweis für die Interaktion von Flotillin-2 mit dem EGF-Rezeptor in Abhängigkeit von dessen Aktivierung mit dem Ligand EGF erbracht werden. Im Pulldown (A) und in den Lysaten (B) sind die Signale ohne EGF-Gabe stärker ausgeprägt. Im Pulldown mit EGF sind nur sehr schwache Signale erkennbar, was vermuten lässt, dass Flotillin-2 vor allem im Ruhezustand bzw. ohne EGF-Gabe mit dem EGFR interagiert. Nach Aktivierung des Rezeptors durch EGF scheint die Interaktion stark vermindert. In den Lysaten konnte das Flotillin-2-Fusionsprotein und im Pulldown das endogene und mit Flotillin-2 interagierende Flotillin-1 erfolgreich nachgewiesen

werden. Auch hier wurde die Biotinligase BirA* als Negativkontrolle verwendet und zeigte keine Signale im Pulldown.

4.3.5 Nachweis von phosphoryliertem EGFR

Im nächsten Versuch wurde die Interaktion von Flotillin-2 mit dem phosphoryliertem EGFR (Y1173) nach Aktivierung mit EGF untersucht. Der Versuchsaufbau ist ähnlich mit dem im Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Experiment. Als Lysepuffer wurde hier jedoch Harnstoff (8 M) unter Zugabe von Protease-Inhibitoren (PI) und Phosphatase-Inhibitoren (NaF, Vanadat) verwendet. Die EGF- und Biotingabe erfolgte 30 min vor der Zellernte. Für die Präzipitation im Pulldown wurde eine Menge von 1,3 mg Lysat eingesetzt. Nach anschließender Detektion mit primären und sekundären Antikörpern konnte im Lysat der phosphorylierte EGFR in allen Proben nachgewiesen werden. Im Pulldown zeichnen sich nur leichte und inhomogene Signale ab, welche sowohl bei Proben mit Biotin, als auch in jenen ohne Biotin zu verzeichnen sind. Bei der Negativkontrolle BirA* sind keine Signale sichtbar (Abbildung 19).

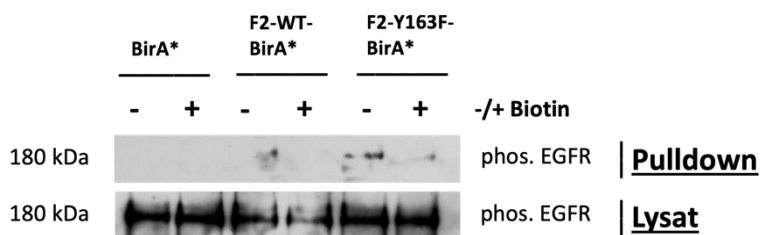


Abbildung 19: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit phosphoryliertem EGFR in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.

Der Pulldown wurde mit 1,3 mg Proteinmenge durchgeführt. Die Proben wurden jeweils abwechselnd (-/+ Biotin) aufgetragen und eine Immundetektion mit phospho-EGFR-Antikörpern (Y1173) durchgeführt. Dabei konnte phosphorylierter EGFR in allen Lysatproben nachgewiesen werden. Im Pulldown zeichnen sich bei der Wildtyp-Variante keine signifikanten Signale ab. Die Mutante Y163F weist hingegen Interaktionen auf, während in der Negativkontrolle BirA* keine Signale vorhanden sind.

Zur Darstellung des Interaktoms des phosphorylierten EGFR (Y1173) mit dem Fusionsprotein wurde der Rezeptor mit seinem Ligand EGF zunächst aktiviert. Während die Negativkontrolle der Biotinligase im Pulldown keine Signale zeigt, sind andeutungsweise Interaktionen von Flotillin-2 der Mutante Y163F mit dem phosphoryliertem EGFR durch schwache Signale mit und ohne Biotin erkennbar. Beim

Wildtyp sind keine signifikanten Signale zu verzeichnen. In den Lysatproben, welche nach der Zellernte sofort eingefroren wurden, ist der Rezeptor deutlich nachweisbar.

4.3.6 Interaktionsnachweise von Flotillin-2 mit weiteren Proteinen des MAPK-Signalweges

Unter Verwendung der BioID-Methode mit anschließendem Pulldown, wurden wie in den zuvor beschriebenen Versuchen weitere mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 mit Komponenten des MAPK- bzw. EGFR-Signalweges, wie phosphorylierte ERK, total MEK, total RAF, phosphoryliertes RAF, untersucht. Auch wurde ein mögliches Zusammenspiel eines weiteren Rezeptors, HER2/ErbB2, aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren, welcher ebenfalls an den Ras-Raf-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg gekoppelt ist, überprüft. Mit den Antikörpern für ErbB2, sowie für total RAF als auch für phospho-RAF konnten weder in den Lysaten noch im Pulldown signifikante Interaktionen ermittelt bzw. keine Signale nach Immundetektion abgebildet werden (nicht gezeigt). Somit war die Überprüfung einer Interaktion nicht möglich. Total MEK und phospho-ERK wurden in allen Proben der Lysate, nicht aber im Pulldown nachgewiesen (Abbildung 20). Phosphorylierte ERK wurden in den nicht-stimulierten Lysaten nicht untersucht, da ohne EGF keine Phosphorylierung zu erwarten ist.

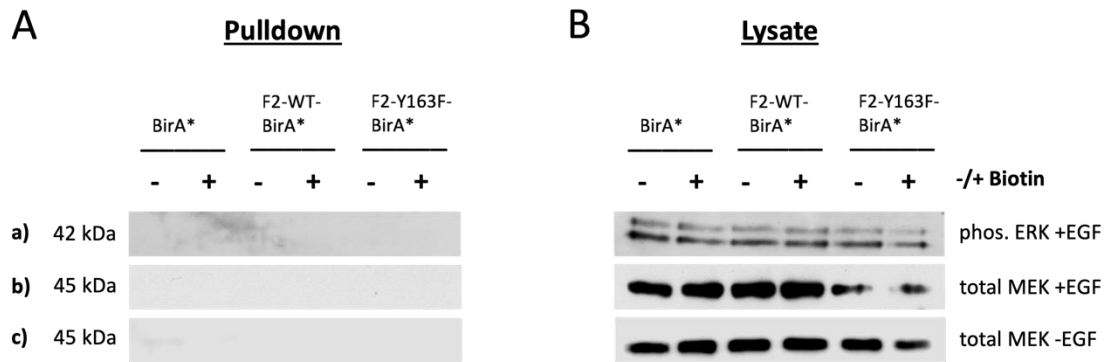


Abbildung 20: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* mit phosphorylierter ERK und total MEK in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.

Die hier aufgeführten Western Blots stammen aus unterschiedlichen Experimenten (a-c). Der Pulldown wurde mit einer Lysatmenge von a) 1,3 mg, sowie mit je 1 mg bei b) und c) durchgeführt. Die Proben wurden jeweils abwechselnd (-/+ Biotin) aufgetragen und eine Immundetektion aller Blots (mit oder ohne EGF Stimulation) durchgeführt. Dabei konnten Interaktionen mit den Flotillin-2-BirA* Fusionsproteinen in den Lysaten (B) mit phosphorylierter ERK (42 kDa) mit EGF-Gabe und total-MEK (45 kDa) jeweils mit und ohne EGF-Gabe nachgewiesen werden. Im Pulldown (A) zeigten sich in allen Experimenten keine Banden.

5 Diskussion

5.1 Etablierung eines Zellmodells zur Analyse des Interaktoms von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen

Pemphigus Vulgaris (PV) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen Strukturproteine der Desmosomen gerichtet sind, insbesondere gegen Desmoglein 1 und 3 (Amagai et al., 1991; Eyre & Stanley, 1988; Porro et al., 2019; Stanley et al., 1984). Dies führt zu einer Akantholyse der suprabasalen Hautschicht der Epidermis (Kneisel & Hertl, 2011b). Im Kontext meiner Arbeit ist die Flotillin-Proteinfamilie (Flotillin-1 und Flotillin-2) von Interesse. Diese Proteine spielen eine essenzielle Rolle bei der Integrität und Stabilität von Strukturproteinen in Zell-Zell-Kontakten (Guillaume et al., 2013a). Sie fungieren nicht nur als Signalvermittler, sondern unterstützen auch den Aufbau und die Organisation interzellulärer Haftkontakte (Kurrle et al., 2013a; Resnik et al., 2011; Völlner et al., 2016a). Es wurde festgestellt, dass Flotilline mit desmosomalen Strukturproteinen wie Desmoglein-3 und Plakoglobin interagieren. Ein Fehlen von Flotillinen führt zu einer verminderten Expression von Desmoglein-3 und beeinträchtigt die Desmosomen-Integrität, was die Zelladhäsion negativ beeinflusst (Kurrle et al., 2013a; Völlner et al., 2016b). Unter pathogenen Bedingungen, insbesondere nach der Behandlung mit PV-IgG, wurde beobachtet, dass sich die Lokalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 änderte. Die Proteine waren größtenteils in intrazellulären vesikulären Strukturen ungeordnet und nur noch geringfügig in der Plasmamembran vorhanden, was die Desmosomen-Integrität und folglich die Zelladhäsion negativ beeinflussen kann (Völlner et al., 2016b).

Mit einer konstanten Expression der Flotillin-2-BirA*-Fusionsproteine (Wildtyp und Tyrosin-Mutante) in Keratinozyten (HaCaT-Zellen) sollten Zellmodelle geschaffen werden, mit deren Hilfe zukünftig, mittels der BioID-Methode, funktionelle Untersuchungen des Interaktoms von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen wie dem Desmoglein möglich wären. Die Identifizierung unbekannter Flotillin-2-Interaktionspartner könnte beispielsweise in Gegenwart unterschiedlicher Calciumkonzentrationen sowie autoreaktiver Antikörper stattfinden. In diesem Zusammenhang wären auch weitere Untersuchungen zur desmosomalen Adhäsion von Interesse. Durch diese Analysen ließen sich eventuell weitere spezifische Funktionen der jeweiligen Flotillin-Proteine genauer erläutern. Außerdem könnte geprüft werden, ob sich Flotilline möglicherweise als effektiver Angriffspunkt für therapeutische Ansätze eignen würden, und mit weiteren Experimenten, welches der beiden Flotilline (Flotillin-1 oder Flotillin-2) dazu eher in der Lage ist. Zusätzlich könnte die Lokalisation der

Interaktion zwischen Flotillinen und desmosomalen Proteinen näher erforscht werden, um die Dynamik dieser Wechselwirkungen besser zu verstehen. Diesbezüglich wäre es auch interessant, die Funktion der regulativen Tyrosinreste in Flotillin-2 näher zu betrachten.

Um jene Art von Untersuchungen durchführen zu können, mussten die jeweiligen Konstrukte für eine konstante Expression der zu untersuchenden Proteine mit einem Knock-In stabil in Keratinozyten integriert werden. Als Voraussetzung dafür sollte die Biotinligase BirA* allein, sowie Flotillin-2 (Wildtyp und Tyrosin-Mutante) mit BirA* zunächst in einen geeigneten Vektor umkloniert werden, welches ich im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchführen konnte (Abbildung 11). Der anschließende Knock-In von BirA* mittels CRISPR/Cas9 in den „AVV *safe harbor*“ brachte stabile humane Keratinozyten hervor (Abbildung 12 A) und konnte mit einer Immunfluoreszenzfärbung verifiziert werden (Abbildung 13). Es konnte jedoch, trotz identischer Vorgehensweise, keine Integration der Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukte nachgewiesen werden (Abbildung 12 B). Der "AAVS1 (Adeno-assoziiierter Virus Integrationsstelle 1) *safe harbor locus*" (auch als sicherer Hafen-*locus* oder sichere Integrationsstelle bezeichnet) ist ein Bereich im Genom (Chromosom 19; 19q13.42) (*Gene Symbol Report* | *HUGO Gene Nomenclature Committee*, n.d.), der als sicherer Ort für die Integration von Fremd-DNA in das menschliche Genom betrachtet wird. Er hat keine bekannten schädlichen Auswirkungen auf die Zellfunktion oder die Expression benachbarter Gene. AAV-Vektoren werden oft verwendet, um Zielgene mit Hilfe von Genomeditierungs-Tools wie CRISPR/Cas9 in diesen sicheren Hafen-*locus* zu integrieren. So können gezielte Genveränderungen vorgenommen werden (Kotterman & Schaffer, 2014; Papapetrou & Schambach, 2016). Durch die in meiner Arbeit nachweislich erfolgreiche Integration von BirA* in das Genom der Keratinozyten konnte grundsätzlich der Erfolg bzw. die Funktionalität der angewandten Methode gezeigt werden. Da BirA* kleiner ist als die Fusionskonstrukte und in das Genom der HaCaT-Zellen integriert werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Größe von Flotillin-2 mit BirA* zusammen mit dem Resistenzgen (etwa 2,5 Kilobasenpaare) ein Problem darstellte. Jedoch konnten in vergangenen Studien auch größere Konstrukte problemlos integriert werden. Die Arbeitsgruppe von Dubois et al. haben Zellen am sicheren Hafen des Adeno-assoziierten Virus mit einem großen Spenderkonstrukt (etwa 6,3 Kilobasenpaare) editiert. Dieses kodierte neben eines Antibiotikaresistenzgens für Reportergene der Biolumineszenz und Fluoreszenzbildgebung. Anschließend konnten Puromycin-resistente klonale Zellen isoliert und die AAVS1-Integration durch PCR und Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt werden (Dubois et al., 2018).

Des Weiteren konnte ein unvollständiger Einbau der Fusionskonstrukte, ohne Integration der Flotillin-2-Sequenz, mit dem Experiment aus Abbildung 12 B ausgeschlossen werden. Entsprechend ist BirA* im dargestellten Western Blot bei 35 kDa nicht detektiert worden. Das Fusionsprotein Flotillin-2 mit BirA* besitzt eine Größe von 75 kDa.

Eine weitere Überlegung wäre, ob die Überexpression von Flotillin-2 womöglich den HaCaT-Zellen geschadet haben könnte. Infolge der eventuellen Überforderung der Zelle mit der ungewöhnlich hohen Proteinmenge, induzierte möglicherweise diese Überexpression Stressreaktionen, die bis zum Zelltod geführt haben könnten. Auch wäre es möglich, dass eine zu hohe Konzentration des Proteins die normale Funktion anderer Proteine gestört hat und zu Funktionsverlusten führte. Diese Umstände würden eventuell nach Puromycinselektion den Untergang von einigen zunächst entstandenen Klonkolonien erklären. Die Kolonien der transfizierten Fusionskonstrukte des Wildtyp-Flotillin-2-BirA* und der Mutante (Y163F) konnten zwar teilweise kultiviert werden, jedoch wies keine von ihnen eine erfolgreiche Expression im Western Blot auf (Abbildung 12 B). Zudem besteht die Annahme, dass die Zellen noch weniger mit dem Fusionsprotein der Mutante (Y163F) umgehen konnten. Im Vergleich zum Wildtyp entstand eine insgesamt geringere Anzahl an Klonkolonien. Das erfolgreich integrierte BirA* zeigte nach Selektion immer eine mindestens doppelt so große Ausbeute an gebildeten Kolonien wie beim Wildtyp. Allerdings konnten beispielsweise bei einer transienten Überexpression von Flotillin-2 Konstrukten mit BirA* in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen keine Anhaltspunkte einer Störung der Zellfunktionen oder des Zellwachstums bzw. deren Kultivierung beobachtet werden (siehe dazu Kapitel 4.2 und 4.3). Auch konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich andere Flotillin-2 Fusionsproteine mit EGFP in HaCaT Zellen integriert werden.

5.2 Analyse des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg mittels der BioID-Methode

5.2.1 Lokalisation von BirA* und den Fusionskonstrukten in Flotillin-2 Knockout-HEK293T-Zellen

Flotilline kommen in unterschiedlichen Mengen in allen Gewebearten vor (Bickel et al., 1997; Volonté et al., 1999) und zeigen eine vielfältige und dynamische Zelllokalisierung (Santamaría et al., 2003), wobei sie sich auch häufig an der Zellmembran befinden können und als Marker für sphingolipidreiche Rafts dienen (Kokubo et al., 2003). Diese Lokalisierung kann durch Faktoren wie Chemokine, Proteine, Wachstumsfaktoren sowie posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Myristylierung beeinflusst werden (Kurrle et al., 2012a; Neumann-Glesen et al., 2007; Riento et al., 2009b). Dabei

spielt die Fähigkeit zur Oligomerisierung eine wichtige Rolle für die Assoziation mit Membran-Rafts (Babuke et al., 2009; Neumann-Giesen et al., 2004; Neumann-Giesen et al., 2007).

BirA ist eine 35-kDa DNA-bindende Biotin-Proteinligase, welche ursprünglich aus *Escherichia coli* stammt. Sie reguliert die Biotinylierung einer Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase und wirkt als transkriptioneller Repressor für das Biotin-Biosynthese-Operon (Chapman-Smith & Cronan, 1999). In dieser Arbeit wurde die Variante (R118G) BirA* verwendet, da sie im Gegensatz zum Wildtyp BirA keine Biotinylierungs-Zielsequenz benötigt (Choi-Rhee et al., 2004; Roux et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit habe ich zunächst die jeweilige intrazelluläre Lokalisation von BirA*, Flotillin-1 und Flotillin-2 mit der Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide transient in Flotillin-2 Knockout-HEK293T-Zellen transfiziert. Die Biotinligase BirA* allein konnte, wie zu erwarten, homogen im Zytosol verteilt dargestellt werden (Abbildung 14 A). Flotillin-1 und Flotillin-2 sind sowohl bei den Flotillin-2-Fusionsproteinen des Wildtyps, als auch bei der Mutante (Y163F) überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 14 B, C). Damit konnte ich zeigen, dass das BirA*-Tag die Lokalisation der Flotilline in der Zelle nicht verändert. Es kann daher angenommen werden, dass BirA* keinen störenden Einfluss als Fusionsprotein hat. Dabei ist es sicherlich von Vorteil, dass BirA* an den C-Terminus von Flotillin-2 angefügt worden ist (Abbildung 8). Dieser enthält die „Flotillin-Domäne“, welche für die Fähigkeit der Oligomerisierung wichtig ist (Bickel et al., 1997; Neumann-Giesen et al., 2004; Solis et al., 2007a; Volonté et al., 1999). Diese scheint weder in diesem, noch in anderen Versuchen beeinträchtigt worden zu sein. Der N-Terminus hingegen besitzt mit der SPFH/PHB-Domäne durch Phosphorylierungsstellen funktionsmodulierende Eigenschaften (Kurrle et al., 2012a), als auch Elemente zur Membranverankerung (Neumann-Giesen et al., 2004). Deshalb wurde auf eine Fusion von BirA* an den N-Terminus von Flotillin-2 verzichtet.

5.2.2 Die BioID konnte zur Darstellung des Interaktoms von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg in HEK-F2-Knockout Zellen etabliert werden

Um potenzielle Interaktionspartner von Flotillin-2 im Rahmen der MAP-Kinase-Signalkaskade zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die BioID-Methode etabliert und angewandt. Dazu wurden Fusionskonstrukte verwendet, bei denen Flotillin-2 mit einer modifizierten Biotinligase (BirA*) kombiniert ist, die im Vergleich zum Wildtyp (BirA) weniger selektiv arbeitet. Durch Anwendung eines Pulldown-Verfahrens mit magnetischen Streptavidin-Kügelchen, die stark an Biotin

binden, konnten die markierten Proteine isoliert werden. Schließlich wurden ausgewählte mögliche Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg mit Antikörpern im Western Blot getestet und identifiziert.

Der MAPK-Signalweg ist ein Schlüsselmechanismus in der zellulären Signalübertragung, der extrazelluläre Signale in zelluläre Reaktionen umwandelt. Er reguliert wesentliche biologische Prozesse, wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Stressreaktionen und Zellüberleben (Meister et al., 2013; Von Kriegsheim et al., 2008; Yoon & Seger, 2006). Dieser Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für viele Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), wie den EGFR. Er besteht aus einer Kaskade hochkonservierter Kinasen, die in präziser Abfolge aktiviert werden. Diese MAPK-Kaskade setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K, hier Raf), MAPK-Kinase (MAP2K, hier MEK) und MAPK (hier Erk). Der vorrangige Zweck dieses Signalwegs besteht darin, externe Signale wie Wachstumsfaktoren oder Stressreize in zelluläre Reaktionen zu übersetzen (Meister et al., 2013; Will, 2014).

Die Gerüstfunktion von Proteinen wie Flotillinen ist entscheidend für die effiziente und spezifische Signalübertragung in subzellulären Regionen. Sie bilden Multienzymkomplexe, fördern die räumliche Nähe der Signalpartner und minimieren mögliche Interferenzen mit anderen Signalkaskaden. Dies erhöht die Effizienz und Spezifität der Signalübertragung (Heinrich et al., 2002; Locasale et al., 2007; Meister et al., 2013).

In meinen Experimenten habe ich Fusionskonstrukte mit der Biotinligase BirA* verwendet. Durch ihren gemessenen Aktionsradius von etwa 10 nm (D. I. Kim et al., 2014) wurden vor allem direkte Interaktionen mit dem Protein nachgewiesen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 mit spezifischen Komponenten wie Raf, MEK und Erk interagiert und somit die Funktion eines Gerüstproteins übernimmt (Amaddii et al., 2012b). Flotillin-1 ist mit Flotillin-2 assoziiert und in der Lage, mit diesem Heterooligomere zu bilden (Babuke et al., 2009a). Durch diese enge Kopplung bzw. das Zusammenspiel beider Proteine konnte ihre Interaktion mittels der BioID mit anschließendem Pulldown nachgewiesen werden (Abbildung 15). Das mit Flotillin-2 fusionierte BirA* hat Flotillin-1 biotinyliert. Mit diesem Experiment konnte die Methode der BioID überprüft und etabliert werden.

Um zu zeigen, dass die Biotinylierung von Flotillin-1 durch das Fusionsprotein Flotillin-2 mit BirA* wirklich funktionierte, musste gewährleistet sein, dass beide Proteine während des Pulldowns getrennt voneinander vorlagen. Aufgrund der Bildung von Heterooligomeren könnte Flotillin-1 nämlich auch passiv im nicht-biotinylierten Zustand mit-präzipitiert werden. Dazu wurde in einem Experiment (Abbildung 16) eine Lyse mit

einem starken Harnstoffpuffer durchgeführt. Vergleicht man diesen mit dem zuvor erwähnten Versuch (Abbildung 15) fällt auf, dass im Pulldown des Flotillin-2 Wildtyps auch ein Signal für Flotillin-1 bei der Probe ohne Biotin zu verzeichnen ist. Grundsätzlich könnte diese Tatsache durch den ungleichen Versuchsaufbau erklärt werden und den jeweils unterschiedlich verwendeten Lysepuffer. In weiteren, in dieser Arbeit nicht gezeigten Experimenten unter Verwendung von Harnstoff, konnten unspezifische Bindungsmuster beobachtet werden. In dem in Abbildung 15 dargestellten Versuch handelt es sich allerdings um eine spezifische Flotillin-Detektion, da die Negativkontrolle BirA* kein Signal ergibt. Außerdem könnten auch Differenzen des Biotingehaltes im Zellmedium selbst auftreten. Die Biotinkonzentration könnte herstellungsbedingt innerhalb unterschiedlicher FCS-Chargen variieren. Es stellt sich jedoch grundlegend die Frage, ob es nicht eine geeignetere Methode als die der Harnstofflyse gäbe.

Auch konnte ich eine Interaktion zwischen dem Flotillin-2-BirA*-Fusionsprotein und EGFR sowie Erk nachweisen (Abbildung 17). Dieses Zusammenspiel wird jedoch eher über das Flotillin-1 Protein koordiniert (Amaddii et al., 2012b; Banning et al., 2012b; Meister, 2014). Durch die Fähigkeit der Heterooligomerisierung mit Flotillin-2 ist vermutlich die räumliche Anordnung und die Nähe zu den einzelnen Komponenten in diesem Komplex für eine erfolgreiche Biotinylierung verantwortlich. Allerdings konnte keines der möglichen Interaktionspartner wie Raf, MEK oder phosphoryliertes Erk detektiert werden. Während Raf im Western Blot nach Immundetektion gar nicht abgebildet werden konnte, wurden MEK und phosphoryliertes Erk in den Lysaten, nicht aber im Pulldown nachgewiesen (Abbildung 20). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass womöglich der Biotinylierungsradius von BirA* für eine Markierung der jeweiligen Proteine nicht ausreichte. Das Fusionsprotein Flotillin-2-BirA* ist daher in der Lage, nur Flotillin-1 zu biotinylieren, nicht aber jedes der mit Flotillin-1 interagierenden Proteine. Diese haben durch Assoziation mit Flotillin-1 vermutlich einen noch weiteren räumlichen Abstand zu BirA* im Fusionsprotein.

Neben der BioID mit BirA* gibt es noch die Variante der BioID2. Diese Biotinligase der zweiten Generation leitet sich aus einem anderen Bakterienstamm ab (*Aquifex aeolicus*). Die modifizierte Biotinligase ist kleiner als die der BioID und bietet eine präzisere Ausrichtung und Lokalisation des Fusionsproteins. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein kleineres *Tag* ein Fusionsprotein weniger in seiner Funktion und Lokalisation stört (D. I. Kim et al., 2016b). Sie erfordert zudem weniger Biotin, was in Systemen mit begrenzter Biotinverfügbarkeit von Vorteil ist. Außerdem besitzt sie die Fähigkeit, durch einen erweiterten flexiblen Linker die Anpassung des Biotinylierungsbereichs zu ermöglichen. Dies kann insbesondere bei der Erforschung großer Proteine oder Komplexkomponenten von Interesse sein (D. I. Kim et al., 2016a, 2016b; D. I. Kim &

Roux, 2016). Möglicherweise könnten Interaktionspartner von Flotillin-2 im MAPK-Signalweg, welche in meinen Versuchen nicht alle darstellbar waren, mit einem erweiterten Aktionsradius einer anderen Ligase, wie der BioID2, detektiert werden. Ein zu kleiner Radius schränkt die Erkennung relevanter Proteininteraktoren für ein größeres Protein oder einen Proteinkomplex ein. Ein größerer Radius wiederum würde eine Markierung von Proteinen mit mehr Abstand zum Fusionsprotein ermöglichen. Möglicherweise würden jedoch dann auch solche markiert, die keine direkten Interaktionspartner von Flotillin-2 darstellen und die Spezifität beeinträchtigen. In Studien von Kim et al. konnte gezeigt werden, dass der Biotinylierungsbereich von BioID2 tatsächlich durch einen molekularen, flexiblen Linker vergrößert werden konnte. Dies ermöglicht die Identifizierung von Proteinen, die weit über den Bereich der Ligase allein hinausgehen. Der zwischen einem Protein (Nup43) und BioID2 eingebaute Linker war 25 nm lang und bestand aus 13 Wiederholungen von GGGGS. Das Einfügen des Linkers verursachte dabei keine abnorme proteolytische Prozessierung des Fusionsproteins und führte zu einer Biotinylierung von endogenen Proteinen in lebenden Zellen. Außerdem haben Beobachtungen gezeigt, dass die Spezifität für die Region in der Nähe von Nup43 erhalten blieb. Durch die Verwendung eines flexiblen Linkers könnten die Anwender daher mehr Flexibilität bei der Gestaltung ihrer experimentellen Planung erhalten. Dies würde zum einen für die Untersuchung großer Proteine, deren räumliche Dimensionen den Biotinylierungsbereich überschreiten und zum anderen für die Analyse der Zusammensetzung großer Protein-Komplexe gelten. Aber auch eine Untersuchung der Protein-Zusammensetzung in spezifischen subzellulären Bereichen wäre dadurch möglich (D. I. Kim et al., 2016b).

Die BioID ist eine gut etablierte Methode zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen und wurde bereits in lebenden Zellen und verschiedenen Tiermodellen eingesetzt. Allerdings benötigt die in meinen Experimenten für das Enzym-Labeling verwendete Ligase (BirA*) einen Biotinylierungszeitraum von etwa 15 -18 Stunden. Auch die Inkubationszeit der Streptavidin Beads mit den Lysatproben bei 4°C erfolgte relativ lange über Nacht. Um in diesem längeren Zeitraum den Abbau von Proteinen und eine Dephosphorylierung zu vermeiden bzw. zu reduzieren, wurden neben dem Arbeiten auf Eis den Lysaten Protease-Inhibitoren (PI) sowie Phosphatase-Inhibitoren (NaF, Vanadat) hinzugefügt. Vor allem bei Versuchen für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen wie phospho-EGFR waren trotzdem keine oder nur schwache Signale im Western Blot des Pulldowns vorzufinden (Abbildung 19). Dies spiegelt sich auch im Experiment zum Nachweis weiterer phosphorylierter Proteine des MAPK-Signalweges wieder (Abbildung 20 A). Vermutlich wurden durch die lange Inkubationszeit trotz der beschriebenen Maßnahmen Phosphatgruppen und Proteine

enzymatisch abgebaut. Somit könnte ein späterer Nachweis durch Immundetektion erschwert oder verhindert worden sein bzw. kaum Signale detektiert werden. In den Lysatproben für Western Blot, welche nach der Zellernte direkt eingefroren wurden, konnten die jeweiligen Proteine deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 17 B, Abbildung 18 B, Abbildung 19, und Abbildung 20 B). Das legt die Vermutung nahe, dass die lange Inkubationszeit für die Pulldownproben nicht optimal gewesen sein könnte. Auch die Markierungszeit bzw. die Arbeitsgeschwindigkeit der verwendeten Ligase für meine Arbeit könnte eventuell zu langsam gewesen sein. In den Experimenten mit einer EGF-Gabe von 30 min vor der Zellernte musste auch das Biotin in der gleichen Zeit vorher hinzugefügt werden, um die Reaktion gleichzeitig zu starten. Auch wenn die Ligase schon vorher mit dem im Medium vorhandenen geringen Mengen an Rest-Biotin ihre Biotinylierungsfunktion begonnen haben könnte, kann dieser kürzere Zeitraum für die verwendete Ligase zu gering bzw. zu ineffektiv gewesen sein. In diesem Fall wäre es eine Überlegung, eine andere, schneller arbeitende Ligase einzusetzen, um womöglich eine signifikantere Signalstärke bei der Immundetektion zu erzielen.

Zur Beschleunigung der Proteinmarkierung wurden die Ligasen TurboID und MiniTurbo entwickelt. Sie ermöglichen die Biotinylierung von Proteinen in nur 10 Minuten und funktionieren auch bei niedrigen Temperaturen. Außerdem haben Studien von May et al. belegt, dass die TurboID die eindeutig überlegene Ligase zur Biotinylierung von Proteinen im ER-Lumen ist (May et al., 2020b). Die BioID hingegen zeigt sich in dieser Umgebung nur geringfügig effektiv. Daher könnte eventuell der Einsatz der TurboID für andere Umgebungen wie für Zellorganellen mit einem niedrigem pH-Wert oder im extrazellulären Raum nützlich sein, welche die herkömmliche BioID-Funktion beeinträchtigen könnten. Allerdings werden dazu noch weitere Studien notwendig sein, um die Arbeitseffektivität der TurboID in diesen Umfeldern zu analysieren. Generell bestehen jedoch noch Fragen hinsichtlich der Biotinylierungsaktivierung, der zellulären Toxizität und der Ligasestabilität. Die TurboID zeigte Anzeichen von Proteininstabilität und anhaltender Biotinylierung in Abwesenheit von exogenem Biotin, sowie einen Anstieg des Markierungsradius (Branon et al., 2018; May et al., 2020a).

Des Weiteren konnte insgesamt beobachtet werden, dass durch einen angewendeten Serumentzug mittels eines Mediumwechsels mit DMEM- 24 h vor der Zellernte in den Experimenten der Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 nur eine Proteinmenge von 1 bis 1,3 mg für den Pulldown eingesetzt werden konnte. Es zeigten sich schwächere Signale als im Versuch der Abbildung 17. Hier konnte ohne ein Hungern der Zellen (DMEM++) mit 2,6 mg Lysat eine etwa doppelt so große Menge für die Immundetektion verwendet werden. Der Einsatz eines anderen, geeigneteren Zellmediums könnte eventuell ein schnelleres sowie effektiveres Zellwachstum anregen.

Außerdem könnte man die Experimente von Anfang an mit einer größeren Anzahl an Zellen starten. Somit wäre vor dem Serumentzug eine höhere Zelldichte zu erwarten und damit eine entsprechend größere Ernteausbeute für den Pulldown möglich.

In Abbildung 19 ist der Nachweis der Interaktion von Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* mit phosphoryliertem EGFR nach Serumentzug und EGF-Gabe dargestellt. Flotilline assoziieren mit EGFR und bilden einen stabilen Komplex. Sie sind nicht nur entscheidend für eine adäquate Aktivierung des EGFR und somit des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs, sondern übernehmen auch als Gerüstbildner eine essenzielle Funktion dieses Wegs (Amaddii et al., 2012b). Flotilline besitzen mit dem N-Terminus und dem C-Terminus zwei Domänen. Der N-Terminus ist wichtig für die Funktionsgebung der Flotilline und kann durch Phosphorylierung der Tyrosinreste reguliert werden (Kurrle et al., 2012a). Die Phosphorylierung von Y160 bei Flotillin-1 und Y163 bei Flotillin-2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Endozytose (Riento et al., 2009a). Die Mutante Y163F von Flotillin-2 ist an dieser Stelle nicht mehr phosphorylierbar und kann folglich nicht mehr endozytiert werden (Babuke et al., 2009a). Die Stimulation mit EGF führt dabei zu einer Tyrosinphosphorylierung von Flotillinen. Die Mutante (Y163F) von Flotillin-2 kann nach EGF-Stimulation jedoch nicht mehr durch Src-Kinasen an der durch Phenylalanin ersetzten Tyrosinstelle phosphoryliert werden (Neumann-Glesen et al., 2007; Riento et al., 2009). Dadurch entfällt die Translokation in späte Endosomen (Babuke et al., 2009). Mit dem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Mutante mit dem phosphorylierten EGFR interagiert, da sie im Gegensatz zum Wildtyp nicht endozytiert werden kann und in der Plasmamembran verbleibt. Bei der Wildtyp-Variante sind keine signifikanten Signale zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass durch die Phosphorylierungsvorgänge an den entsprechenden Tyrosinresten eine Endozytose stattgefunden hat.

Außerdem konnte dargestellt werden, dass die Flotillin-2 Fusionsproteine vor allem im Ruhezustand bzw. ohne EGF-Gabe mit EGFR interagieren (Abbildung 18). Eine Aktivierung lässt nur noch sehr schwache und kaum erkennbare Assoziationen zwischen den Fusionsproteinen und dem EGFR zu. Diese deutlich schwächer abgebildeten Signale lassen vermuten, dass Flotillin-1 und Flotillin-2 nach EGFR-Aktivierung endozytiert werden. Durch die resultierende räumliche Distanz zueinander wird eine Biotinylierung, die nur in einem bestimmten Aktionsradius stattfindet, erschwert bzw. unmöglich. Wie auch schon in Abbildung 19 beobachtet, konnten insgesamt stärkere Signale bei der nicht-endozytierbaren Mutante detektiert werden.

5.3 Ausblick

Im ersten Teil meiner Arbeit konnten die jeweiligen Konstrukte in einen geeigneten Vektor (pSH-EFIREs) kloniert werden. Mit diesem gelang es zumindest BirA* stabil in das Genom der Keratinozyten mittels CRISPR-Cas9 zu integrieren. Im nächsten Schritt sollte nochmals versucht werden, auch Zelllinien mit Flotillin-2-BirA*-Fusionskonstrukten zu generieren. Dies könnte eventuell mit einer effizienteren Transfektionsmethode umgesetzt werden. Dabei wäre es wichtig, den Erfolg des korrekten Einbaus in den „AAV save harbor locus“ mittels Sequenzierung zu überprüfen. Mit diesen stabilen HaCaT-Zelllinien könnten dann weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Somit wäre es möglich, das Interaktom von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen unter Anwendung der BioID zu analysieren. Des Weiteren könnte die Identifizierung von Flotillin2-Interaktionspartnern in Keratinozyten unter verschiedenen Calciumkonzentrationen und in Anwesenheit von Antikörpern (v.A. Anti-Desmoglein-3 Antikörpern) erfolgen. In diesem Kontext wären auch zusätzliche Untersuchungen zur desmosomalen Adhäsion von Interesse. Bekannte Interaktionspartner könnten mit dem Western Blot, bisher unbekannte mit der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Auch wäre die jeweilige Lokalisation dieser Proteininteraktionen von Interesse. Es könnte in Experimenten dargestellt werden, ob sich die desmosomale Zusammensetzung in Zellen ändern würde, die kein Flotillin-2 oder die Mutante Y163F exprimieren. Neben Flotillin-2-KO-Zelllinien wäre es noch interessant, mit Flotillin-1-KO-Zellen Untersuchungen durchzuführen bzw. Interaktom von Flotillin-1 zu analysieren. Somit wäre ein Vergleich zwischen beiden Flotillin-Proteinen möglich, welche weitere Aufschlüsse zu deren Eigenschaften und Funktionen geben könnten. Dies wäre auch für mögliche therapeutische Ansätze im Hinblick auf das Krankheitsbild Pemphigus Vulgaris von Interesse. Eine Analyse von Zelllinien mit doppeltem Genknockout von Flotillin-1 und Flotillin-2 (Doppel-KO-Zellen) könnte Aufschluss darüber geben, ob sich die Auswirkungen der Zugabe von PV-IgG im Zusammenhang mit der Zell-Zell-Adhäsion weiter verstärken oder ob die Effekte aufgrund der Abwesenheit der Flotilline möglicherweise schwächer ausfallen würden.

Der zweite Teil meiner Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung der BioID und deren Anwendung zur Interaktionspartneranalyse von Flotillin-2 mit Proteinen des MAPK-Signalweges. Anschließende Arbeiten bzw. Untersuchungen könnten neben den von mir gezeigten Interaktionen weitere bekannte Proteine nachweisen. Dabei wäre es möglich, andere Biotinligasen mit einem erweiterten Markierungsradius zu verwenden, oder jene mit einer höheren Arbeitsgeschwindigkeit. Außerdem könnte mit einem geeigneteren Kulturmedium das Zellwachstum effizienter erfolgen. So wäre es möglich,

die jeweilige Lysatausbeute nach Mediumwechsel bis zum Serumentzug zu erhöhen. Damit ließen sich eventuell stärkere Signale abbilden und weitere Interaktionspartner detektieren. Zusätzlich wäre es interessant, neben den bereits bekannten Proteinwechselwirkungen auch unbekannte Interaktionspartner von Flotillin-2 zu identifizieren. Dies könnte durch die Anwendung der Massenspektrometrie erfolgen. Allgemein könnte ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Signalkaskade und der Zusammenhang der einzelnen Proteinwechselwirkungen einen besseren Überblick über die Funktion und Regulation dieses wichtigen Wegs beitragen. Gerade im Hinblick auf Störungen innerhalb des MAPK-Signalwegs, welcher mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert ist, könnten weitere Untersuchungen entscheidend für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sein. Weitergehend trägt dies dazu bei, die Funktionen und Eigenschaften der Flotilline weiter zu entschlüsseln.

6 Zusammenfassung

Pemphigus Vulgaris ist eine bullöse Autoimmunerkrankung, die Blasen auf der Haut und Schleimhaut verursacht. Sie entsteht durch die Wirkung von IgG-Autoantikörpern gegen desmosomale Strukturproteine Desmoglein 1 und 3. Die Folge ist der Verlust der intraepidermalen Adhäsion von Keratinozyten. Die Flotillin-Proteinfamilie kommt ubiquitär vor und zeigt ein großes Spektrum an Funktionen, wobei Flotillin-1 und Flotillin-2 oft eng miteinander verknüpft sind. Diese Proteine assoziieren mit Adhäsions- bzw. Adapterproteinen von Desmosomen und nehmen eine essenzielle Rolle bei der Integrität und Stabilität von Zell-Zell-Kontakten ein. Zudem fungieren Flotilline als Signalvermittler und gerüstbauende Elemente. Eine Verankerung der Flotilline mit der Plasmamembran wird sowohl über Oligomerisierung, als auch über Myristylierung, Palmytylierung und Cholesterinverbindungen vermittelt. Ein Ziel meiner Arbeit war mit Hilfe der BioID-Methode desmosomale Interaktionspartner von Flotillin-2 in humanen Keratinozyten genauer zu untersuchen, um in diesem Rahmen auf mögliche physiologische als auch pathologische Zusammenhänge schließen zu können. Es konnten jedoch nur für BirA* stabile Zelllinien generiert werden. Fusionskonstrukte des Wildtyp-Flotillin-2-BirA* sowie der Mutante (Y163F) konnten zwar kultiviert werden, jedoch zeigten diese keine Expression im Immunassay.

Flotilline sind auch an bestimmten Signalwegen wie dem Mitogen-aktivierte Proteinkinase Signalweg beteiligt, welcher durch den epidermalen Wachstumsfaktor stimuliert wird. Der MAPK-Signalweg stellt einen zentralen Mechanismus in der zellulären Signaltransduktion dar. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Antworten und reguliert diverse biologische Prozesse. Ein weiteres Anliegen meiner Untersuchungen war die Etablierung der BioID, um Interaktome von Flotillin-2 mit Komponenten dieses Weges zu untersuchen. Mit Hilfe des Enzym-Labelings konnten Interaktionspartner wie der EGFR und ERK identifiziert werden. In Abhängigkeit von der Aktivierung des EGFR mit EGF habe ich gezeigt, dass stärkere Interaktionen ohne Gabe des Liganden zu verzeichnen waren. Dabei interagiert die Mutante generell mehr mit dem EGFR, da sie im Gegensatz zum Wildtyp nicht endozytiert werden kann und in der Plasmamembran verbleibt. Weitere untersuchte Interaktionspartner wurden mit der verwendeten Biotinligase nicht identifiziert, da möglicherweise der Aktionsradius nicht ausreichte, um diese zu biotinylieren.

7 Summary

Pemphigus vulgaris is a bullous autoimmune disease that causes blisters of the skin and mucous membranes. It is caused by the production and reaction of IgG autoantibodies directed against desmosomal structural proteins, such as desmoglein 1 and 3. The result is acantholysis of the suprabasal skin layer of the epidermis or the loss of intraepidermal adhesion of keratinocytes. The flotillin protein family is found in all tissue types and has a wide range of functions, some of which show cell-typical variations. Flotillins are often involved in supporting various processes, whereby flotillin-1 and flotillin-2 are often closely linked. These proteins associate with adhesion or adapter proteins of desmosomes and play an essential role in the integrity and stability of structural proteins of cell-cell contacts. In addition to their function as signal mediators and scaffolding elements, flotillins support the establishment and organization of intercellular adhesion contacts. Anchoring of flotillins to the plasma membrane is mediated by oligomerization, as well as myristylation, palmitoylation and cholesterol. One aim of my work was to use the BioID method to analyze desmosomal interaction partners of flotillin-2 in human keratinocytes in order to identify possible physiological and pathological correlations. However, stable cell lines could only be generated for BirA*. Although fusion constructs of wild-type flotillin-2-BirA* and the mutant (Y163F) could be cultivated, they showed no expression of the fusion protein.

Flotillins are also involved in certain signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase signaling pathway, which is stimulated by the epidermal growth factor. The MAPK signaling pathway is a central mechanism in the transmission of extracellular signals into intracellular responses and regulates various biological processes. Another focus of my research was the establishment of BioID to investigate interactomes of flotillin-2 with components of this pathway. With the enzyme labeling method, interaction partners such as EGFR and ERK could be identified. Depending on the activation of EGFR with EGF, it was shown that stronger interactions were observed without administration of the ligand. The mutant generally interacts more with the receptor because, contrary to the wild type, it cannot be endocytosed and remains at the plasma membrane. Other interaction partners tested were not identified with the biotin ligase used, as the radius of action was possibly insufficient for biotinylation.

8 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAVS1	Adeno-assoziiertes Virus - integration site 1
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
AZA	Azathioprin
BioID	proximity-dependent biotin identification
BSA	Bovine Serum Albumine
Cas	CRISPR-assoziierte Gene
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
ddH ₂ O	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ESCRT	engl. endosomal sorting complex required for transport
et al.	et alteri
Fc	fragment crystallizable
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
Flot1	Flotillin-1
Flot2	Flotillin-2
fwd.	forward
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEF	Guanin-Austauschfaktor
GTP	Guanosintriphosphat

Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HaCaT	spontan immortalisierte humane Keratinozyten
HCL	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney cells
HRP	horseradish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IMM	Immunomix
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar
KO	knockout
LB	lysogeny broth
M	Mol
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methaol
MMF	Mycophenolatmofetil
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	non essential amino acids
NP-40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PF	Pemphigus foliaceus
pH	potential Hydrogenii
PI	Protease Inhibitor
Puro	Puromycin
PV	Pemphigus vulgaris
PV-IgG	Pemphigus vulgaris Autoantikörper vom Typ IgG
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RBD	Ras-bindende Domäne
rev.	reverse
rpm	Rounds per minute
rSAP	rekombinante Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	engl. sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Src	engl. sarcoma-associated kinase
Tag	engl. <i>tag</i> für ‚Markierung‘
TBST	Tris-buffered saline Tween20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylthylendiamin, `1,2-bis(dimethylamino)-ethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von Flotillin-1 und Flotillin-2, modifiziert nach (Kurrle et al., 2012b).	5
Abbildung 2: Darstellung des MAPK-Signalwegs, modifiziert nach (Meister et al., 2013).	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der BioID mit Pulldown, modifiziert nach (Roux et al., 2012) und https://www.abcam.com	15
Abbildung 4: Sequenz der zu mutagenisierenden Region.	32
Abbildung 5: Prinzip der Mutagenese.	32
Abbildung 6: Mutagenese Primer.	33
Abbildung 7: Prinzip der Klonierung mit den jeweiligen Schnittstellen der Plasmide.	36
Abbildung 8: Aufbau der Flotillin-2 Fusionskonstrukte und der Biotinligase BirA*	48
Abbildung 9: Sequenzierung der mutagenisierten Plasmide.	49
Abbildung 10: Agarose-Elektrophorese Verifizierung der Ligation.	50
Abbildung 11: Überprüfung der Expression von Flotillin2-Fusionskonstrukten und BirA* in pSH-EFIREs.	51
Abbildung 12: Western-Blot der Klone.	53
Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BirA*	54
Abbildung 14: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BirA*, Flotillin-1 und Flotillin-2 HEK-F2-Knockout-Zellen.	55
Abbildung 15: Western-Blots des Pulldowns (A) und der Lysate (B) nach BioID: Interaktion von Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* mit Flotillin-1 in HEK293T-Flotillin-2-KO Zellen.	58
Abbildung 16: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID und Harnstoff-Denaturierung: Interaktion von Fusionsprotein Flotillin-2-BirA* mit Flotillin-1 in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.	59
Abbildung 17: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit EGFR und ERK in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.	61
Abbildung 18: Western-Blot des Pulldowns (A) und der Lysate (B) nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit EGFR, Flotillin-1 und Flotillin-2 in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen, abhängig von EGF.	63
Abbildung 19: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Flotillin-2-BirA* mit phosphoryliertem EGFR in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen.	64

Abbildung 20: Western-Blot des Pulldowns und der Lysate nach BioID: Interaktion von Fusionsproteinen Flotillin-2-BirA* mit phosphorylierter ERK und total MEK in HEK-Flotillin-2-KO-Zellen. 66

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Geräte und Materialien	17
Tabelle 2: Kleinmaterial	19
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	23
Tabelle 5: DNA-Aufreinigungskits	25
Tabelle 6: Enzyme	25
Tabelle 7: Primäre Antikörper.....	26
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper	27
Tabelle 9: Plasmide	28
Tabelle 10: Primer	29
Tabelle 11: Bakterienstämme.....	29
Tabelle 12: Zelllinien	30
Tabelle 13: Nährmedien.....	30
Tabelle 14: Protokoll der PCR-Mutagenese	33
Tabelle 15: PCR-Mutagenese Thermozyklus	33
Tabelle 16: Protokoll des DpnI-Verdau	34
Tabelle 17: Sequenzierung	35
Tabelle 18: PCR-Primer	36
Tabelle 19: PCR-Ansatz	37
Tabelle 20: Protokoll der PCR.....	37
Tabelle 21: Protokoll des Insert-Verdau.....	39
Tabelle 22: Protokoll des 1. Vektor-Verdau	39
Tabelle 23: Protokoll des 2. Vektor-Verdau	39
Tabelle 24: Protokoll der Ligation.....	40
Tabelle 25: Protokoll des Kontroll- Restiktionsverdau.....	40

11 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. R., Spigelman, Z., Cavacini, L. A., & Posner, M. R. (2006). Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *The New England Journal of Medicine*, *355*(17), 1772–1779. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA062930>
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J., & Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO Journal*, *13*(7), 1610–1619. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1994.TB06424.X>
- Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., & Tikkanen, R. (2012a). 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>
- Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., & Tikkanen, R. (2012b). Flotillin-1/Reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(10), 7265–7278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
- 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*(5), 869–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90360-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90360-B)
- Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., & Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *40*(2 Pt 1), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(99\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(99)70183-0)
- Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., & Tikkanen, R. (2009a). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling*, *21*(8), 1287–1297. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2009.03.012>
- Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., & Tikkanen, R. (2009b). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling*, *21*(8), 1287–1297. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2009.03.012>

- Babuke, T., & Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology*, 86(9), 525–532. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2007.03.003>
- Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P., & Tikkanen, R. (2012a). Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PloS One*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045514>
- Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P., & Tikkanen, R. (2012b). Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PloS One*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045514>
- Banning, A., Tomasovic, A., & Tikkanen, R. (2011). Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 12(8), 725–735. <https://doi.org/10.2174/138920311798841708>
- Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y., & Schlessinger, J. (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 14(8), 5192–5201. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.8.5192-5201.1994>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–13802. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.21.13793>
- Bijlmakers, M. J., & Marsh, M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in Cell Biology*, 13(1), 32–42. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00008-9)
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9), 880. <https://doi.org/10.1038/NBT.4201>
- 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>
- Buday, L., & Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 73(3), 611–620. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90146-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90146-H)

- Chapman-Smith, A., & Cronan, J. E. (1999). Molecular biology of biotin attachment to proteins. *The Journal of Nutrition*, 129(2S Suppl). <https://doi.org/10.1093/JN/129.2.477S>
- Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., Van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H., & Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5112), 1338–1343. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8493579>
- 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(10), 1422–1436. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2011.03.009>
- Chen, R.-H., Sarnecki, C., & Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 12(3), 915–927. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.3.915-927.1992>
- Choi-Rhee, E., Schulman, H., & Cronan, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 13(11), 3043–3050. <https://doi.org/10.1110/PS.04911804>
- Cholera, M., & Chainani-Wu, N. (2016). Management of Pemphigus Vulgaris. *Advances in Therapy*, 33(6), 910. <https://doi.org/10.1007/S12325-016-0343-4>
- Crews, C. M., Alessandrini, A., & Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 478–480. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1411546>
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St.-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., & Desjardins, M. (2001a). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18507–18512. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101113200>
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St.-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., & Desjardins, M. (2001b). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18507–18512. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101113200>
- Dubois, V. P., Zotova, D., Parkins, K. M., Swick, C., Hamilton, A. M., Kelly, J. J., & Ronald, J. A. (2018). Safe Harbor Targeted CRISPR-Cas9 Tools for Molecular-Genetic Imaging of Cells in Living Subjects. *The CRISPR Journal*, 1(6), 440–449. <https://doi.org/10.1089/CRISPR.2018.0030>
- 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(1), 53–64.
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(00\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(00)00069-8)
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., & Weinberg, R. A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363(6424), 45–51.
<https://doi.org/10.1038/363045A0>
- Enk, A., Fierlbeck, G., French, L., Hertl, M., Messer, G., Meurer, M., Steinbrink, K., Stingl, G., Volc-Platzer, B., & Zillikens, D. (2009). Use of high-dose immunoglobulins in dermatology. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 7(9), 806–812.
<https://doi.org/10.1111/J.1610-0387.2009.07118.X>
- Eyre, R. W., & Stanley, J. R. (1988). Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 81(3), 807–812.
<https://doi.org/10.1172/JCI113387>
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., & Philips, M. (2009). Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Molecular Oncology*, 3(4), 297–307.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2009.06.004>
- Ge, L., Qi, W., Wang, L. J., Miao, H. H., Qu, Y. X., Li, B. L., & Song, B. L. (2011). Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 551–556. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1014434108>
- Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee*. (n.d.). Retrieved November 25, 2023, from https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:14947
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. L., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T., & Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1819–1833.
<https://doi.org/10.1091/MBC.12.6.1819>
- Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 8(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/NCB1342>
- Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S., & Gauthier-Rouvière, C. (2013a). Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 22), 5284–5292. <https://doi.org/10.1242/JCS.133975>

- Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S., & Gauthier-Rouvière, C. (2013b). Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 22), 5284–5292. <https://doi.org/10.1242/JCS.133975>
- Harman, K. E., Seed, P. T., Gratian, M. J., Bhogal, B. S., Challacombe, S. J., & Black, M. M. (2001). The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *The British Journal of Dermatology*, *144*(4), 775–780. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2133.2001.04132.X>
- Hashimoto, T., Ogawa, M. M., Konohana, A., & Nishikawa, T. (1990). Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *The Journal of Investigative Dermatology*, *94*(3), 327–331. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12874456>
- Hazarika, P., McCarty, M. F., Prieto, V. G., George, S., Babu, D., Koul, D., Bar-Eli, M., & Duvic, M. (2004). Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Research*, *64*(20), 7361–7369. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0823>
- Heinrich, R., Neel, B. G., & Rapoport, T. A. (2002). Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Molecular Cell*, *9*(5), 957–970. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00528-2)
- Hofman, E. G., Ruonala, M. O., Bader, A. N., van den Heuvel, D., Voortman, J., Roovers, R. C., Verkleij, A. J., Gerritsen, H. C., & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. (2008). EGF induces coalescence of different lipid rafts. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 15), 2519–2528. <https://doi.org/10.1242/JCS.028753>
- Howe, C. L., Valletta, J. S., Rusnak, A. S., & Mobley, W. C. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron*, *32*(5), 801–814. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00526-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00526-8)
- Huang, F., Jiang, X., & Sorkin, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of the beta2 subunit of clathrin adaptor complex AP-2 reveals the role of a di-leucine motif in the epidermal growth factor receptor trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43411–43417. <https://doi.org/10.1074/JBC.M306072200>
- Joly, P., & Litrowski, N. (2011). Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clinics in Dermatology*, *29*(4), 432–436. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2011.01.013>
- Joly, P., Mouquet, H., Roujeau, J.-C., D'Incan, M., Gilbert, D., Jacquot, S., Gougeon, M.-L., Bedane, C., Muller, R., Dreno, B., Doutre, M.-S., Delaporte, E., Pauwels, C., Franck, N., Caux, F., Picard, C., Tancrede-Bohin, E., Bernard, P., Tron, F., ...

- Musette, P. (2007). A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *The New England Journal of Medicine*, 357(6), 545–552. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA067752>
- Kim, D. I., Birendra, K. C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., & Roux, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), E2453. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1406459111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.1406459111.SD02.XLSX>
- Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K., & Roux, K. J. (2016a). A Highlights from MBoC Selection: An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), 1188. <https://doi.org/10.1091/MBC.E15-12-0844>
- Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K., & Roux, K. J. (2016b). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), 1188–1196. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>
- Kim, D. I., & Roux, K. J. (2016). Filling the void: Proximity-based labeling of proteins in living cells. *Trends in Cell Biology*, 26(11), 804. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2016.09.004>
- Kim, J. H., & Kim, S. C. (2019). Paraneoplastic Pemphigus: Paraneoplastic Autoimmune Disease of the Skin and Mucosa. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01259>
- Kneisel, A., & Hertl, M. (2011a). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 9(10), 844–857. <https://doi.org/10.1111/J.1610-0387.2011.07793.X>
- Kneisel, A., & Hertl, M. (2011b). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 9(10), 844–857. <https://doi.org/10.1111/J.1610-0387.2011.07793.X>
- Kokubo, H., Helms, J. B., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Horikoshi, Y., & Yamaguchi, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Research*, 965(1–2), 83–90. <https://doi.org/doi.org/10.1091/mbc.12.10.3031>
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., & Koo, C. H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid β -protein precursor I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by

- labeled monoclonal antibody. *Journal of Cell Science*, 109(5), 991–998. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.5.991>
- Kotterman, M. A., & Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 15(7), 445. <https://doi.org/10.1038/NRG3742>
- Kridin, K., & Schmidt, E. (2021). Epidemiology of Pemphigus. *JID Innovations*, 1(1), 100004. <https://doi.org/10.1016/J.XJIDI.2021.100004>
- Kurrle, N., John, B., Meister, M., Tikkanen, R., Kurrle, N., John, B., Meister, M., & Tikkanen, R. (2012a). Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization. *Protein Phosphorylation in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/48598>
- Kurrle, N., John, B., Meister, M., Tikkanen, R., Kurrle, N., John, B., Meister, M., & Tikkanen, R. (2012b). Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization. *Protein Phosphorylation in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/48598>
- Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013a). Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS One*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084393>
- Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013b). Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084393>
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417–421. <https://doi.org/10.1038/358417A0>
- Langhorst, M. F., Reuter, A., & Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(19–20), 2228–2240. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5166-4>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.011>
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., & Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 363(6424), 85–88. <https://doi.org/10.1038/363085A0>
- Locasale, J. W., Shaw, A. S., & Chakraborty, A. K. (2007). Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13307–13312. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0706311104>
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., & Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431–442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90167-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90167-B)
- Mahoney, M. G., 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. <https://doi.org/10.1172/JCI5252>
- Málaga-Trillo, E., Laessing, U., Lang, D. M., Meyer, A., & Stuermer, C. A. O. (2002). Evolution of duplicated reggie genes in zebrafish and goldfish. *Journal of Molecular Evolution*, 54(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/S00239-001-0005-1>
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, 14(13), 3136–3145. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB07316.X>
- May, D. G., Scott, K. L., Campos, A. R., & Roux, K. J. (2020a). Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/CELLS9051070>
- May, D. G., Scott, K. L., Campos, A. R., & Roux, K. J. (2020b). Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051070>
- Meister, M. (2014). *A Novel Role for Flotillins in Activation and Endosomal Sorting of Transmembrane Receptors*. Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Meister, M., Bänfer, S., Gärtner, U., Koskimies, J., Amaddii, M., Jacob, R., & Tikkanen, R. (2017). Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo. *Oncogenesis*, 6(6). <https://doi.org/10.1038/ONCSIS.2017.47>
- Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes*, 4(3), 356–371. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES4030356>
- Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A., & Tikkanen, R. (2013). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4854. <https://doi.org/10.3390/IJMS14034854>

- Meister, M., Zuk, A., & Tikkanen, R. (2014). Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *The FEBS Journal*, *281*(13), 2956–2976. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12834>
- Meurer, M. (2012). Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clinics in Dermatology*, *30*(1), 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2011.03.013>
- Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., & Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5114), 1658–1661. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8503013>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., & Parton, R. G. (2002a). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48834–48841. <https://doi.org/10.1074/JBC.M209082200>
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., & Parton, R. G. (2002b). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48834–48841. <https://doi.org/10.1074/JBC.M209082200>
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., Herzog, V., & Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical Journal*, *378*(Pt 2), 509–518. <https://doi.org/10.1042/BJ20031100>
- 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*(Pt 3), 395–406. <https://doi.org/10.1242/JCS.03336>
- 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*(Pt 3), 395–406. <https://doi.org/10.1242/JCS.03336>
- Orczyk, R. R. (2022). *Interaktion von Flotillin-2 mit desmosomalen Proteinen: Etablierung der BioID-Methode*. <https://doi.org/10.22029/JLUPUB-9176>
- Papapetrou, E. P., & Schambach, A. (2016). Gene Insertion Into Genomic Safe Harbors for Human Gene Therapy. *Molecular Therapy*, *24*(4), 678. <https://doi.org/10.1038/MT.2016.38>

- Payne, A. S., Hanakawa, Y., Amagai, M., & Stanley, J. R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(5), 536–543. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2004.07.006>
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., & Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO Journal*, *10*(4), 885–892. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB08021.X>
- Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *The FEBS Journal*, *281*(9), 2214–2227. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12775>
- Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., & Hertl, M. (2018). Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *54*(1). <https://doi.org/10.1007/S12016-017-8662-Z>
- Porro, A. M., Seque, C. A., Ferreira, M. C. C., & E Silva Enokihara, M. M. S. (2019). Pemphigus vulgaris. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *94*(3), 264–278. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20199011>
- Pust, S., Dyve, A. B., Torgersen, M. L., Van Deurs, B., & Sandvig, K. (2010). Interplay between toxin transport and flotillin localization. *PloS One*, *5*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008844>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, *200*(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/JCB.201211138>
- Resnik, N., Sepčić, K., Plemenitaš, A., Windoffer, R., Leube, R., & Veranič, P. (2011). Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(2), 1499–1507. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.189464>
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009a). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 7), 912–918. <https://doi.org/10.1242/JCS.039024>
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009b). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 7), 912–918. <https://doi.org/10.1242/JCS.039024>
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R., & Wandinger-Ness, A. (2005). A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in

- human kidney epithelia. *The Biochemical Journal*, 392(Pt 1), 29–38. <https://doi.org/10.1042/BJ20050645>
- Roux, K. J. (2013). Marked by association: techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3657–3664. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1287-3>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B., & May, D. G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), 19.23.1-19.23.15. <https://doi.org/10.1002/CPPS.51>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., & Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, 363(6424), 83–85. <https://doi.org/10.1038/363083A0>
- Santamaría, A., Fernández, P. L., Farré, X., Benedit, P., Reventós, J., Morote, J., Paciucci, R., & Thomson, T. M. (2003). PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle. *The American Journal of Pathology*, 162(3), 897–905. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63885-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63885-0)
- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S. W., & Simons, M. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(11), 2874–2882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008>
- 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 (Cambridge, England)*, 124(2), 577–587. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.2.577>
- Sharma, P., Mao, X., & Payne, A. S. (2007). Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *Journal of Dermatological Science*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2007.05.005>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007a). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *The Biochemical Journal*, 403(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007b). Reggie/flotillin proteins are organized into stable

- tetramers in membrane microdomains. *The Biochemical Journal*, 403(2), 313–322. <https://doi.org/10.1042/BJ20061686>
- Solis, G. P., Hülsbusch, N., Radon, Y., Katanaev, V. L., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2013). Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 24(17), 2689–2702. <https://doi.org/10.1091/MBC.E12-12-0854>
- Solis, G. P., Schrock, Y., Hülsbusch, N., Wiechers, M., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2012). Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1812–1825. <https://doi.org/10.1091/MBC.E11-12-1006>
- Solomon, S., Masilamani, M., Rajendran, L., Bastmeyer, M., Stuermer, C. A. O., & Illges, H. (2002). The lipid raft microdomain-associated protein reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. *Immunobiology*, 205(1), 108–119. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00114>
- Sorkina, T., Caltagarone, J., & Sorkin, A. (2013). Flotillins regulate membrane mobility of the dopamine transporter but are not required for its protein kinase C dependent endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 14(6), 709. <https://doi.org/10.1111/TRA.12059>
- Stanley, J. R., & Amagai, M. (2006). Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 355(17), 1800–1810. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA061111>
- Stanley, J. R., Koulu, L., & Thivolet, C. (1984). Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(2), 313–320. <https://doi.org/10.1172/JCI111426>
- Staubach, S., Razawi, H., & Hanisch, F. G. (2009). Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics*, 9(10), 2820–2835. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200800793>
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., & Schneider, A. (2010). Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26279–26288. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.134775>
- Stuermer, C. A. O., Lang, D. M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S. O., & Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2.

- Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 3031–3045.
<https://doi.org/10.1091/MBC.12.10.3031>
- Stuermer, C. A. O., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Hanwehr, S. H. von, Guse, A. H., & Plattner, H. (2004). PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), 1731–1733. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-2150FJE>
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyripides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 425–427. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01467-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01467-X)
- Tidyman, W. E., & Rauen, K. A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2009.04.001>
- Ulrichs, P., Guglietta, A., Dreier, T., Van Bragt, T., Hanssens, V., Hofman, E., Vankerckhoven, B., Verheesen, P., Ongenae, N., Lykhopiy, V., Javier Enriquez, F., Cho, J. H., Ober, R. J., Sally Ward, E., De Haard, H., & Leupin, N. (2018). Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(10), 4372–4386. <https://doi.org/10.1172/JCI97911>
- van Beek, N., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2019). [Therapy of pemphigus]. *Der Hautarzt: Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 70(4). <https://doi.org/10.1007/S00105-019-4385-9>
- Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016a). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP28820>
- Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016b). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP28820>
- Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016c). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP28820>
- Volonté, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T., & Lisanti, M. P. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a

- hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12702–12709. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.18.12702>
- Von Kriegsheim, A., Preisinger, C., & Kolch, W. (2008). Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 484, 177–192. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-398-1_12
- Wang, Q., Zhu, F., & Wang, Z. (2007). Identification of EGF receptor C-terminal sequences 1005-1017 and di-leucine motif 1010LL1011 as essential in EGF receptor endocytosis. *Experimental Cell Research*, 313(15), 3349–3363. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2007.06.014>
- Will, H. (2014). Proteine. *Molekularbiologie Kurz Und Bündig*, 63–130. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55110-9_3
- Yarden, Y., & Schlessinger, J. (1987). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 26(5), 1434–1442. <https://doi.org/10.1021/BI00379A034>
- Yoon, S., & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 24(1), 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- Zhao, W., Wang, J., Zhu, H., & Pan, M. (2021). Comparison of Guidelines for Management of Pemphigus: a Review of Systemic Corticosteroids, Rituximab, and Other Immunosuppressive Therapies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 61(3), 351–362. <https://doi.org/10.1007/S12016-021-08882-1>
- Zhou, M., Rubinstein, M., Lax, I., Schlessinger, J., Felder, S., Hurwitz, D. R., & Ullrich, A. (1993). Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry*, 32(32), 8193–8198. <https://doi.org/10.1021/BI00083A020>

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, 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.“

Unterschrift

Ort, Datum

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen einen besonderen Dank aussprechen. Durch ihre beständige Unterstützung, ausgezeichnete Organisation und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren, hat sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin, Frau Dr. Antje Banning. Sie hat mich mit stets lösungsorientierten Vorschlägen unterstützt, hervorragend betreut und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen gehabt.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Tikkanen, bei der ich immer auf Hilfe und Rat zählen konnte. Ein spezieller Dank richtet sich an Simone Kegel und Ralf Füllkrug, die mich hervorragend in die praktischen Tätigkeiten im Labor eingeführt haben und mir während meiner Arbeiten zur Seite standen. Danke auch an Dr. Miroslava Didiasova, Dr. Anna Zakrzewicz, Benedikt Beckert, Simon Feldhoff, Inga Nordhues, Ralph Orczyk, Yada Galaly, Sonja Müller und Julia Viehmann für eure Unterstützung, die schöne Zeit im Labor und das unterhaltsame Miteinander.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Danke Mama und Papa, dass ihr mich in jeglicher Hinsicht unterstützt, an mich glaubt, mich motiviert, mir als Vorbilder dient und immer für mich da seid! Danke auch an Adrian, der mir fortwährend zur Seite steht – einen besseren Bruder kann man sich kaum vorstellen. Von Herzen bedanke ich mich auch bei meinem Partner Raphael und unserem gemeinsamen Sohn Arthur für ihre unendliche Liebe. Danke für deine Unterstützung, die kulinarische Versorgung und die tollen Urlaube.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Freunde, die immer für mich da sind. Dabei gilt ein besonderer Dank Luci, die mich durch das Studium begleitet hat und zu einer wertvollen Freundin und Patin meines Sohnes geworden ist.

Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.