

Die Flotillin-Proteinfamilie:
Rolle bei der cholinergen EGFR-Transaktivierung
und beim Arf-vermittelten Membrantransport

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

vorgelegt von Sina Kühne
aus Dresden
Gießen 2015

Aus dem Biochemischen Institut der Justus-Liebig Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. R. Tikkanen.

Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen (Justus Liebig-Universität, Gießen)

2. Gutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau

Tag der Disputation: 11. November 2015

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
II. Abbildungsverzeichnis	VI
III. Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
<i>1.1 Das Non-neuronale cholinerge System (NNCS).....</i>	<i>1</i>
1.1.1 Acetylcholin und Acetylcholin-Rezeptoren	1
1.1.2 Muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im NNCS	2
1.1.2.1 Muskarinischen Acetylcholinrezeptoren in humanen Keratinozyten.....	4
1.1.3 Signaltransduktion der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren	5
1.2.4 Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors durch GPCR	7
1.1.4.1 Der „Triple-Membrane-Passing“ Signalweg der GPCR-induzierten Transaktivierung des EGFRs.....	8
1.1.4.2 Matrix-Metalloproteinasen und Metalloprotease-Disintegrine	8
1.1.4.3 EGF-ähnliche Liganden.....	10
<i>1.2 Die Familie der Membrane Raft-assoziierten Flotillin-Proteine</i>	<i>12</i>
1.2.1 Vorkommen.....	13
1.2.3 Struktur.....	13
1.2.4 Funktion.....	15
1.2.4.1 Die Rolle von Flotillinen in Wachstumsfaktor-Signalwegen.....	15
<i>1.3 Die Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren</i>	<i>17</i>
1.3.1 Der ADP-Ribosylierungsfaktor 6	18
1.3.1.1 Die Funktionen von Arf6.....	19
1.3.1.2 Die Rolle von Arf6 im Membranlipid-Metabolismus und Membrantransport- prozessen	19
1.3.1.3 Der Einfluss von Arf6 auf die Internalisierung von GPCR.....	21
<i>1.4 Ziele der vorliegenden Studie</i>	<i>22</i>
2. Material	23
2.1 Materialien und Geräte	23
2.2. Chemikalien und Reagenzien	24
2.3 Puffer und Lösungen	26
2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	29
2.4.1 Primärantikörper.....	29
2.4.2 Sekundärantikörper	30
2.4.3 Fluorophor-gekoppelte Reagenzien und Fluoreszenzfarbstoffe.....	30

2.5 Synthetische Oligonukleotide	31
2.5.1 DNA-Primer	31
2.5.2 DNA-Konstrukte und Vektoren	31
2.5.3 siRNA-Sequenzen	32
2.6 Bakterien-Stämme	33
2.7 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung.....	33
2.8 Antibiotika	33
2.9 Stimulationsfaktoren und Inhibitoren.....	34
2.10 Software.....	35
3. Methoden.....	35
3.1 Zellbiologische Standardmethoden	35
3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien	35
3.1.2 Stimulierung und Inhibierung der Signaltransduktion	35
3.1.3 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA.....	36
3.1.4 Transienter siRNA-Knockdown.....	36
3.1.5 Immunfluoreszenz	36
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	37
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion, Restriktion und Ligation	37
3.2.3 Quantitative Real-time- qPCR.....	38
3.2.4 Transformation, Plasmid-DNA-Amplifikation und Aufreinigung.....	38
3.3 Biochemische Methoden.....	39
3.3.1 Synthese und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	39
3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Zelllinien für die Proteinanalytik	39
3.3.3 Co-Immunopräzipitation	39
3.3.4 GST-Pulldown-Assay.....	40
3.3.5 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western Blot.....	40
3.4 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung.....	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten	42
4.1.1 Transkriptionelle Regulation von EGFR-Zielgenen nach CCh- und EGF-Stimulation	42
4.1.2 Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von EGFR- nachgeschalteten Genen.....	44
4.1.3 Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von Liganden der EGF-Familie in HaCaT-Keratinocyten	46

4.1.2.2 Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von MMPs und ADAMs.....	49
4.1.3 Flotilline in der cholinergen EGFR-Transaktivierung.....	52
4.1.3.1 Cholinerge Induktion von Flotillinen	52
4.1.3.2 Einfluss von Flotillinen auf die cholinerge ERK/MAPK-Signaltransduktion	53
4.2 <i>Die Beteiligung von Flotillinen und der kleinen GTPase Arf6 an endosomal</i> <i>Transportprozessen</i>	55
4.2.1 Interaktion von Flotillinen und Arf6	56
4.2.2. Zelluläre Lokalisation von Flotillinen nach ektopischer Expression von Arf6	58
4.2.3 Einfluss der Aktivität von Arf6 auf die EGF-induzierte Flotillin-Endozytose.....	60
4.2.4 Einfluss von Flotillinen auf den Aktivitätszustand von Arf6	63
4.2.6 Funktioneller Zusammenhang von Flotillinen und Arf6 während der Transport- prozesse von Arf6-Frachtmolekülen	65
5. Diskussion	68
5.1 <i>Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten</i>	68
5.1.1 Einfluss der cholinergen EGFR-Transaktivierung auf die Genregulation der MMP/ADAM-Familie und EGF-ähnlicher Liganden	69
5.1.2 Cholinerge Induktion der Flotillin-Genexpression.....	74
5.1.3 Flotilline als bedeutende Regulatoren in der cholinergen EGFR-Transaktivierung und nachgeschalteten Transkriptionsregulation	75
5.2 <i>Die Kooperation von Flotillinen und Arf6 in endosomal</i> <i>Transportprozessen</i>	77
5.2.1 Der Einfluss von Arf6 auf die EGF-vermittelte Endozytose von Flotillinen	77
5.2.3 Einfluss von Flotillinen auf die Arf6-Aktivität – Sind Flotilline Arf6-Effektoren?...	79
5.2.4 Der funktionelle Zusammenhang von Flotillinen und Arf6 am Membrantransport des Arf6-Frachtmoleküls BACE-1	80
5.3 <i>Ausblick</i>	82
5.3.1 Die Rolle der GPCR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und Flotillinen in der Karzinogenese	82
5.3.2 Die Rolle von Flotillinen und Arf6 in der endosomal <i>Sortierung von BACE-1 und dessen Bedeutung für die Alzheimer</i> <i>Erkrankung</i>	84
6. Literaturverzeichnis.....	86
7. Zusammenfassung.....	107
7.1 <i>Summary</i>	112
IV. Curriculum vitae.....	114
V. Publikationen	115
VI. Danksagung	116
VII. Erklärung und Eidesstattliche Versicherung	117

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ADAMs	Metalloprotease-Disintegrine
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Adaptorprotein
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
BACE1	<i>Beta-site APP cleaving enzyme 1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CA	konstitutiv aktiv
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CCh	Carbachol
C-terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2
F1	Flotillin-1
F2	Flotillin-2
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GEF	Guanin-Nukleotid Austauschfaktor

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
GGA	Golgi-lokalisiertes, γ -Adaptin-enhaltendes, Arf-bindendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindende Proteine
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HeLa	Henrietta Lacks (Ursprung der Zervixkarzinom-Zellen)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	kilo Dalton
mAChR	Muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP Kinase-Kinase/ MAP-ERK-Kinase
MeOH	Methanol
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MG	Molekulargewicht
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP5K	Phosphatidylinositol -4-phosphat-5- kinase
PKC	Proteinkinase C
PKB	Protein kinase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMPS	<i>Triple membrane passing</i> Signalweg

II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1:</i> Signaltransduktion der muskarinischen ACh-Rezeptoren. _____	6
<i>Abb. 1.2:</i> Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten. _____	122
<i>Abb. 1.3:</i> Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Flotillinen. _____	144
<i>Abb. 1.4:</i> Domänenstruktur von Arf6. _____	19
<i>Abb. 4.1:</i> Cholinerge Induktion von MAPK-Zielgenen. _____	443
<i>Abb. 4.2:</i> Inhibierung der cholinergen Induktion von MAPK-Zielgenen durch Hemmung der mAChRs, des EGFR und MAPK-Signalwegs. _____	455
<i>Abb. 4.3a:</i> Inhibierung der cholinergen Induktion von Genen spezifischer EGF-ähnlicher Liganden durch Hemmung der mAChRs, des EGFR und MAPK-Signalwegs. _____	47
<i>Abb. 4.3b:</i> Cholinerge Stimulation von HaCaT-Keratinocyten zeigt keinen Effekt auf die transkriptionelle Regulation der EGFR-Liganden BTC, EGF und EPGN. _____	48
<i>Abb. 4.4:</i> Inhibierung der cholinergen Induktion von MMPs und ADAMs durch Inhibierung der mAChRs, des EGFR und MAPK-Signalwegs. _____	510
<i>Abb. 4.5:</i> Erhöhung der Flotillin-Expression nach cholinenger Stimulation in HaCaT-Keratinocyten. _____	532
<i>Abb. 4.6:</i> Die CCh-induzierte transkriptionelle Regulation von MAPK-Zielgenen, EGF-ähnlicher Liganden und MMP-3 ist abhängig von Flotillin-1. _____	53
<i>Abb. 4.7:</i> Immunbiochemische Untersuchung der Expression von Arf6-Konstrukten in HeLa-Zellen. _____	56
<i>Abb. 4.8:</i> Nachweis der Interaktion zwischen Flotillinen und Arf6. _____	57
<i>Abb. 4.9:</i> Zelluläre Lokalisation von Flotillin-2 nach Arf6-Überexpression. _____	59
<i>Abb. 4.10:</i> Flotilline sind nach Überexpression von Arf6-WT in endosomalen Kompartimenten lokalisiert. _____	621
<i>Abb. 4.11:</i> Die Depletion von Flotillinen beeinflusst die Aktivität von Arf6. _____	64
<i>Abb. 4.12:</i> Die Lokalisation von BACE-1 nach ektopischer Expression von Arf6-WT in Flotillin-depletierten HeLa-Zellen. _____	66

III. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Spezifität der EGF-ähnlichen Liganden für einen bestimmten ErbB-Rezeptor.</i>	11
<i>Tab. 2: Die verwendeten Materialien und Laborgeräte mit den jeweiligen Herstellern.</i>	23
<i>Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien mit dem jeweiligen Hersteller.</i>	24
<i>Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.</i>	26
<i>Tab. 5: Die verwendeten Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen, dem Molekulargewicht (MG)des Antigens und den Hersteller.</i>	29
<i>Tab. 6: Die verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und Herstellern.</i>	30
<i>Tab. 7: Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Moleküle, sowie deren Verdünnung und Hersteller.</i>	30
<i>Tab. 8: Liste der DNA-Primer mit den dazugehörigen Sequenzen und Annealing-Temperaturen.</i>	31
<i>Tab. 9: Die verwendeten Plasmide und Konstrukte, sowie deren Referenzen.</i>	32
<i>Tab. 10: Die verwendeten siRNAs mit den jeweiligen Sequenzen.</i>	32
<i>Tab. 11: Die verwendeten Bakterien-Stämme, deren Verwendung und Referenz.</i>	33
<i>Tab. 12: Die verwendeten humanen Zelllinien und deren Kultivierung.</i>	33
<i>Tab. 13: Liste der verwendeten Antibiotika.</i>	34
<i>Tab. 14: Die verwendeten Stimulationsfaktoren und Inhibitoren mit den eingesetzten Konzentrationen und dem Hersteller.</i>	34
<i>Tab. 15: Die verwendeten Computerprogramme, sowie deren Verwendung und Herstellerfirma.</i>	35

1. Einleitung

1.1 Das Non-neuronale cholinerge System (NNCS)

1.1.1 Acetylcholin und Acetylcholin-Rezeptoren

Acetylcholin (ACh) ist ein bedeutendes Signalmolekül, welches hauptsächlich als Neurotransmitter bekannt ist und die chemische Neurotransmission in Neuronen, Interneuronen und der motorischen Endplatte vermittelt. ACh spielt jedoch ebenfalls als autokriner/parakriner Signalüberträger in der Zell-Zell-Kommunikation von nicht-neuronalen Zellen eine wichtige Rolle ¹. Die Synthese von ACh findet praktisch in jeder Zelle statt, wobei ACh eine intermediäre Rolle in der Interaktion von nicht-neuronalen Zellen mit ihrer Umgebung und dem Nervensystems spielt. Das System aus ACh, synthetisierenden Enzymen, Transportern und Rezeptoren, sowie Enzymen, die an der Degradation von ACh beteiligt sind, wird als cholinerges System bezeichnet. Nicht-neuronales ACh wurde in einer Vielzahl humaner Zellen und verschiedener Organsysteme, wie in Epithelzellen (Atemwege, Verdauungs- und Urogenitaltrakt), sowie in Endothelzellen und mesothelialen Gewebe und sogar in Immun- ² und Blutzellen nachgewiesen ¹. Als eines der bestuntersuchteten Modelle des non-neuronalen cholinergen Systems (NNCS) dienen insbesondere Keratinozyten, in denen nicht-neuronales ACh in die autokrine und/oder parakrine Regulation vieler wichtiger Zellfunktionen, wie die Zell-Differenzierung und Mitose, die Organisation des Zytoskeletts und von Zell-Zell-Kontakten ^{1,3}, sowie Wundheilungsprozesse ⁴⁻⁶ involviert ist. Die cholinerge Signalübertragung ist ebenfalls für die Zell-Differenzierung, Migration und Proliferation von Keratinozyten und weiteren Zellen der Hautschichten von Bedeutung ^{7,8}. Wie im neuronalen System sind im NNCS meist dieselben molekularen Komponenten an der Synthese und Ausschüttung von Acetylcholin beteiligt. Die Synthese von Acetylcholin erfolgt durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin, das aus der Nahrung aufgenommen wird und nicht körpereigen synthetisiert werden kann ⁹, wobei nicht-neuronales ACh ebenfalls durch die Carnitinacetyltransferase synthetisiert werden kann ^{10,11}. In nicht-neuronalen Zellen sind insbesondere die Cholin-Transporterproteine 1-5 (CTL1-5) an der Wiederaufnahme von Cholin beteiligt ^{12,13}, zudem konnte in HaCaT-Keratinozyten die Expression des hochaffinen Cholintransporters CHT1 nachgewiesen werden ¹⁴. In den meisten nicht-neuronalen Zellen wird ACh nach der Synthese ohne eine vesikuläre Speicherung in das extrazelluläre Medium ausgeschüttet ¹⁵⁻¹⁷. Die Degradation von ACh in Cholin und Acetat wird wiederum von der Acetylcholinesterase (AChE) und der weniger spezifischen Butyrylcholinesterase katalysiert.

Im NNCS sind zumeist dieselben Rezeptorsubtypen und ähnliche Signaltransduktionswege, welche auch von neuronalen Zellen genutzt werden, an der Kommunikation zwischen Zellen und der Aufrechterhaltung der Organ-Homöostase involviert. Extrazelluläres ACh wirkt dabei grundsätzlich auf zwei unterschiedliche Typen von AChRs, die muskarinischen und nikotinischen AChR, wobei die meisten peripheren Zellen mindestens einen AChR-Typ exprimieren. Bei nikotinischen AChRs (nAChR) handelt es sich um liganden-gesteuerte, ionotrope Rezeptoren, die aus 5 symmetrisch angeordneten Proteinuntereinheiten bestehen. Die muskarinischen AChRs (mAChR) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ¹⁸⁻²⁰, die an der Regulation von verschiedensten physiologischen Funktionen, wie der Neurotransmission, Photo- und Chemorezeption, sowie metabolischen Prozessen, Wachstum und Differenzierung involviert sind ²¹. Durch ihre Kopplung an heterotrimere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) können GPCRs je nach Subtyp ein bestimmtes *second messenger* System initiieren. Die mAChRs werden als Sieben-Transmembranrezeptoren beschrieben, da sie sieben konservierte Transmembrandomänen (TM) ausbilden, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen, inklusive des extrazellulären Amino-Terminus, miteinander verbunden sind (Abb.1). Jede der transmembranen Helices besteht etwa aus 20-27 Aminosäuren, wobei die Bindungsfurche für ACh von den extrazellulären Domänenstrukturen gebildet wird. In Säugern konnten anhand von Klonierungsstudien fünf Rezeptorsubtypen (M₁-M₅) identifiziert werden, wobei jeder mAChR-Subtyp von verschiedenen Gen-Loci im humanen Genom kodiert wird. Die für mAChRs kodierenden Gene enthalten keine Introns und sind hochkonserviert ²²⁻²⁴. Wichtige Unterscheidungsmerkmale der mAChR-Subtypen sind ihre Expression in unterschiedlichen Geweben und Organen, sowie die Kopplung an verschiedene G-Proteine und die dadurch beeinflussbaren Effektorproteine. Die M₁, M₃, M₅ mAChR-Subtypen sind vorzugsweise an Pertussis-Toxin-insensitive G-Proteine gekoppelt, die zur Klasse der G_q und G₁₁-Proteine gehören, wohingegen die M₂ und M₄ mAChRs bevorzugt an die Pertussis-Toxin-sensitiven G_{i/o}-Proteine koppeln. Dementsprechend wird die Familie der mAChR wiederum in inhibierende (M₂ und M₄) und exzitatorische Rezeptoren (M₁, M₃ und M₅) unterteilt ¹⁸.

1.1.2 Muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im NNCS

Die Rolle von mAChRs im NNCS ist divers und abhängig von der Verbreitung einzelner mAChR-Subtypen in verschiedenen Geweben und Funktion der Zellen, sowie von internen und externen Umgebungsbedingungen. Neben anderen cholinergen Komponenten des NNCS wie ACh, ChAT und AChE konnten mAChRs in einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen und Organsystemen, wie in Keratinozyten ⁶, Krebszellen ^{25,26}, Immunzellen ²⁷, in Epithelzellen der Atemwege ²⁸ und der Blase ²⁹, sowie in vaskulären Endothelzellen ³⁰ und reproduktiven

Organen³¹ nachgewiesen werden. Viele nicht-neuronale Zellen sind in der Lage mehrere mAChR-Subtypen zu exprimieren, wobei das Expressionslevel jedes Subtyps variiert^{19,32}. Im humanen Urothelium wurde anhand von immunohistochemischen Analysen ein unterschiedliches Verteilungsmuster der mAChR-Subtypen gezeigt, wobei die M₁-Expression auf basale Urothelzellen beschränkt ist und der M₂-Subtyp ausschließlich in Schirmzellen nachgewiesen werden konnte. Dagegen sind die M₃ und M₄ Rezeptoren homogen im Urothelium verbreitet und die Ausprägung des M₅ mAChR wird von luminalen zu basalen Zellen graduell geringer³³. Zusätzlich scheint der M₃ Rezeptor als ein Hauptregulator der glatten Muskulatur die Kontraktion des Detrusormuskel zu vermitteln³⁴. In Epithelzellen der Trachea reguliert der M₁ Rezeptor zusammen mit nikotinischen Rezeptoren die Proliferation, wobei ACh einen Konzentrations-abhängigen Anstieg der Zellproliferation verursacht³⁵. Zudem bewirkt eine Blockade der muskarinischen und nikotinischen Rezeptoren in Epithelzellen der Atemwege eine Reduktion der Zell-Zell-Verbindungen, das wiederum zu einer Zunahme interzellulärer Abstände und dadurch zu einer erhöhten Permeabilität, sowie zur Reduktion der Barrierefunktion führt³⁶. Außerdem beeinflussen mAChRs die Aktivität von Kinozilien-tragenden Zellen, die apikale Chloridsekretion, sowie die durch ACh inhibierte Natrium- und Wasserabsorption und somit den Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien (Mukoziliäre Clearance)³⁷. Die Depletion oder Blockierung des M₃ Rezeptors zeigte, dass der durch die Zilien-tragenden Zellen geförderte Partikeltransport der Atemwege, sowie die Transportgeschwindigkeit durch den M₃ Rezeptoren stimuliert wird, wohingegen dieser Prozess durch den M₂-Subtypen inhibiert wird³⁸. Im peripheren Lungengewebe ist vor allem der M₄ Rezeptor vorhanden, welcher dort eine Rolle in der Autoinhibierung der ACh-Ausschüttung spielen könnte³⁹. Humane Kardiomyozyten exprimieren die mAChRs M₁ und M₃, welche in die Regulation der Blutzirkulation involviert sind. Durch die Stimulation dieser mAChRs werden vasoaktive Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*) und Prostaglandine von Endothelzellen freigesetzt³. Für die Funktion des Immunsystems ist die Expression von mAChRs ebenfalls von Bedeutung. Die meisten leukämischen Zellen und mononuklären Leukozyten exprimieren alle 5 mAChR-Subtypen, wobei die Expression abhängig vom Immunstatus in T-Lymphozyten variiert. Demnach werden in frisch isolierten, nicht-aktiven CD4- und CD8-Zellen die mAChRs M₁, M₃, M₄ und M₅ ausgebildet. Nach einer *in vitro* Aktivierung von CD4 T-Zellen durch T-Zell Rezeptor (TCR)/CD3- *crosslinking* werden M₁ und M₅ Rezeptoren hingegen hochreguliert. In CD8-Zellen wird wiederum die Expression von M₁ und M₄ gesteigert, wohingegen die M₃-Expression runterreguliert wird⁴⁰. Die immunologische Stimulation beispielsweise mit einem Proteinkinase C Aktivator führt zu einer Erhöhung der M₅ Rezeptor-Genexpression in Lymphozyten⁴¹.

1.1.2.1 Muskarinischen Acetylcholinrezeptoren in humanen Keratinozyten

Die detailliertesten Analysen der Rolle von nicht-neuronalen ACh in der zellulären Regulation wurden anhand epidermaler Zellen bei der Untersuchung intakter Haut, der Wundheilung und in kultivierten Keratinozyten durchgeführt^{8,42-44}. Die für diese Studie verwendeten HaCaT-Keratinozyten stellen einen weitgehend genutzten Modell-Zelltyp für immortalisierte und nicht-tumorigene Keratinozyten dar, die trotz verschiedenster chromosomaler Veränderungen eine relativ normale Differenzierungskapazität aufweisen⁴⁵⁻⁴⁷ und aufgrund dessen eine Alternative zu frisch isolierten Zellen darstellen. In den 1990er Jahren zeigten Grando *et al.*, dass Zellen der humanen Epidermis nikotinische und muskarinische Rezeptoren exprimieren, wobei die mRNA aller 5 mAChR-Subtypen in Keratinozyten detektiert werden konnte^{48,49}. In humanen Keratinozyten spielen mAChRs eine wichtige Rolle in der Migration, Differenzierung, Proliferation und Adhäsion. Außerdem sind mAChR auch in die Entwicklung der epidermalen Architektur involviert und tragen somit zur Barrierefunktion bei. Durch die Synthese und Ausschüttung von ACh beeinflussen Keratinozyten außerdem benachbarte Melanozyten, mit denen sie eine sogenannte epidermale Melanineinheit bilden und die M₁ und M₅ Rezeptoren exprimieren⁵⁰. Anhand der *in situ* Hybridisierung und Antikörperfärbungen wurde die Expression der M₁ und M₄ Subtypen in suprabasalen Hautschichten nachgewiesen, wohingegen die M₂, M₃ und M₄ Rezeptoren vor allem in der basalen Schicht exprimiert werden^{6,29,48}. Die Regenerierung der Haut, wie beispielsweise der Wundheilungsprozess, ist stark abhängig von der Zellproliferation, Zelladhäsion und Migration. Für den Wundheilungsprozess sind dabei die Beteiligung von Metalloproteasen und letztendlich auch der Zusammenbau von Adhärenzverbindungen von Bedeutung⁴². In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass bestimmte mAChRs der Keratinozyten an der Modulation der Migration und Wundheilung beteiligt sind, wobei diese Prozesse durch den M₄-Subtyp gefördert und durch den M₃ Rezeptor inhibiert werden. Außerdem weisen weitere Studien daraufhin, dass M₄ Rezeptoren die Expression von sogenannten migratorischen Integrinen ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 5$ und $\alpha V\beta 6$) erhöhen, die wiederum mit der Migration von Zellen verbunden sind. Die Hochregulierung von $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen, welche als sedentäre Integrine bezeichnet werden, wird wiederum von M₄ Rezeptor gefördert⁴³. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass die Migration von Keratinozyten durch ACh induziert⁵¹ und durch Stimulation von mAChRs die Proliferation von isolierten gingivalen Keratinozyten angeregt wird, indem Proliferationsmarker wie PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), Ki67 (*nuclear antigen*) und Cyclin D1 induziert werden⁴².

1.1.3 Signaltransduktion der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren

GPCRs sind ähnlich wie Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) an der Aktivierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade und somit auch an der Stimulierung der Zellproliferation beteiligt⁵². Während dieses Prozesses interagieren unterschiedliche Proteine der GPCR und RTK-Signalwege. Dadurch entstehen komplexe Interaktionsnetzwerke bei der Regulation der MAPK-Aktivität, die wiederum an physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Die Bindung eines Liganden an mAChRs bewirkt die Kopplung der Rezeptoren an multiple G-Proteinsubtypen, die aus einer α -Untereinheit mit der Guanin-Nukleotid Bindestelle und GTPase Aktivität, sowie einer dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit bestehen. Die α -, $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind im inaktiven GDP-gebundenen Zustand miteinander assoziiert. Im aktivierten Zustand koppeln mAChR mit ihrer dritten intrazellulären Schleife an bestimmte G-Proteinuntereinheiten^{53,54}, wobei es nach Ligandenbindung an den mAChR zu einer Konformationsänderung der Transmembranhelices kommt, das gleichermaßen die Konformation der intrazellulären Schleifen beeinflusst und so die G-Protein-Bindestelle freigibt⁵⁵. Die Interaktion des GPCRs mit dem G-Protein bewirkt wiederum den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Die dadurch verursachte Konformationsänderung der drei flexiblen Regionen der $G\alpha$ -Untereinheit führt zur deren Aktivierung und Dissoziation des $\beta\gamma$ -Heterodimers. Die entstandene α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex interagieren mit nachgeschalteten Effektoren und sind an deren Regulation beteiligt. Bisher wurden 27 verschiedene α -Untereinheiten, die aufgrund ihrer Funktion in der nachgeschalteten Signaltransduktion in vier Subfamilien G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ eingeteilt werden können, sowie fünf β - und 14 γ -Untereinheiten identifiziert⁵⁶. Abhängig von der Kopplung an ein bestimmtes G-Protein aktivieren mAChR nach cholinergem Stimulierung verschiedene nachgeschaltete Effektormoleküle und somit unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege. Die muskarinische Signaltransduktion führt u.a. zur Aktivierung der MAP-kinase ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), die unter anderem an der Regulation des Zellzyklus involviert ist, der JNK (*Jun amino-terminal kinase*) und der p38 MAPK, die an der Wachstumskontrolle, Immunantwort und Apoptose beteiligt ist⁵⁷.

Wie bereits im Abschnitt 1.1.2 beschrieben, sind M_1 , M_3 , M_5 mAChR-Subtypen vorzugsweise an G_q und G_{11} -Proteine gekoppelt. Nach Aktivierung der G-Proteine dissoziieren diese vom Rezeptor und aktivieren daraufhin die Membran-assoziierten Enzyme Phospholipase D (PLD) und Phospholipase C (PLC) über ihre α -Untereinheit (Abb.1). Die Aktivierung der PLC führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂), infolgedessen Diacylglycerol und der sekundäre Botenstoff Inositol-trisphosphat (IP₃) gebildet wird. Dies führt wiederum zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium und erleichtert die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)^{58,59}. Die den M_1 , M_3 und M_5 Rezeptoren nachgeschaltete

Aktivierung von ERK1/2 und der MAPK-Kaskade erfolgt vorzugsweise über die Aktivierung der Kinase Raf (*rapidly accelerating fibrosarcoma*)^{60,61}. Die Aktivierung der bevorzugt an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelten mAChRs M_2 und M_4 bewirkt wiederum die Inhibierung der Adenylatzyklase und somit eine Reduktion des cAMP-Levels (Abb.1). Zusätzlich wird auch die Aktivierung von Kalium-Kanälen und nicht-selektiven Kationenkanälen über M_2 und M_4 Rezeptoren reguliert^{53,62}. Neben der α -Untereinheit ist auch der $\beta\gamma$ -Komplex der G-Proteine an der Integration mitogener Signalwege beteiligt⁶³. Bedeutende Mediatoren der $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung des MAPK Signalwegs sind die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und die zyttoplasmatischen Tyrosinkinase Src⁶⁴. Durch die Aktivierung des $\beta\gamma$ -Komplex erfolgt dabei die Rekrutierung der Src-kinase und PI3K zur Plasmamembran und zudem die Aktivierung der Shc- und Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) –Adapterproteine und letztendlich ERK1/2 über den Ras/Raf-Signalweg^{52,65,66}. Der $\beta\gamma$ -abhängige Mechanismus wird vor allem bevorzugt von M_2 und M_4 Rezeptoren genutzt, um die PKC-unabhängige ERK1/2-Aktivierung über die sequenzielle Aktivierung von Ras, Raf und MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) zu vermitteln⁶⁷ (Abb.1).

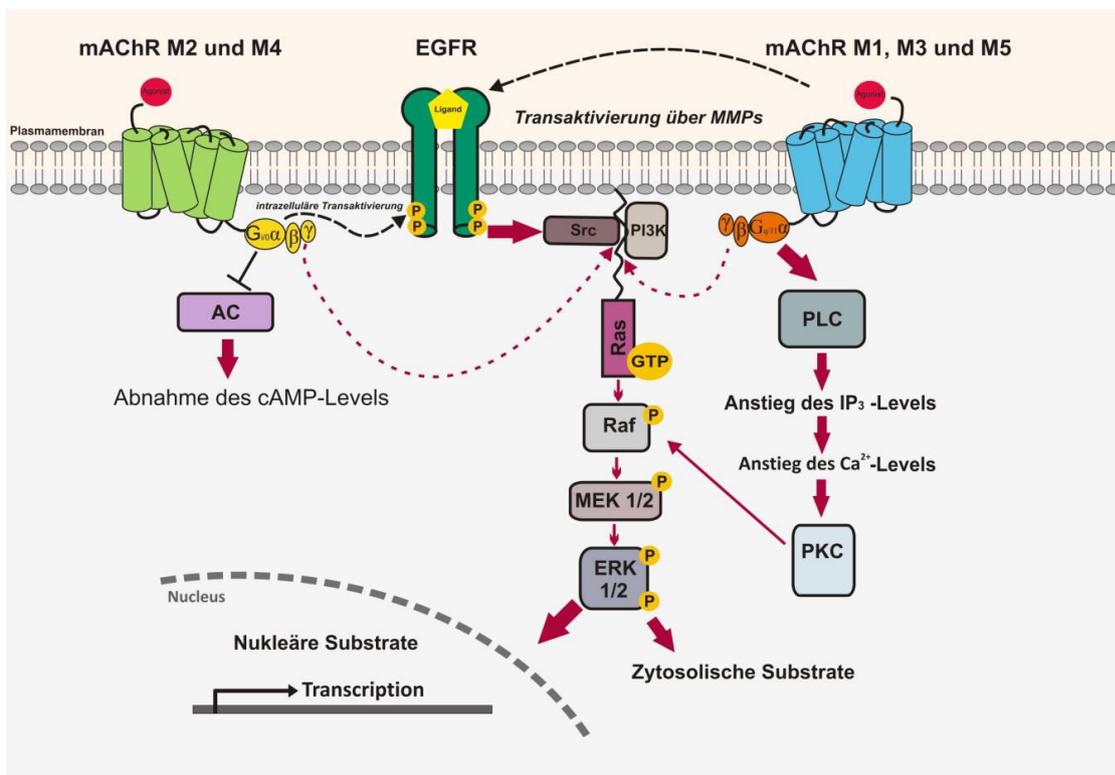


Abb. 1.1: Signaltransduktion der muskarinischen ACh-Rezeptoren. Nach cholinergischer Stimulation koppeln mAChRs an trimere G-Proteine bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. M_2 und M_4 mAChRs koppeln bevorzugt an $G_{i/o}$ -Proteine und inhibieren nach ihrer Aktivierung die Adenylatzyklase, infolgedessen es zu einer Abnahme des cAMP-Levels kommt. Die M_2 - und M_4 -vermittelte Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) erfolgt über einen intrazellulären Mechanismus. M_1 , M_3 und M_5 mAChRs koppeln vorzugsweise an $G_{q/11}$ -Proteine und aktivieren nach

cholinergem Stimulation die PLC, woraufhin das Level an IP_3 und Ca^{2+} steigt. Dies führt zur Aktivierung der PKC und nachfolgend zur MAPK-Aktivierung über die Raf-Kinase. Die M_1 -, M_3 - und M_5 -vermittelte Transaktivierung des EGFR findet extrazellulär über die Aktivierung von MMPs und nachfolgender proteolytischer Freisetzung von EGFR-Liganden statt. Ein Signalweg der von allen mAChR-Subtypen zur Aktivierung der ERK/MAPK-Kaskade genutzt wird, involviert die Aktivierung der PI3K und Src-Kinase.

Die Terminierung der muskarinischen Signaltransduktion, die direkt mit der Rezeptor-Desensibilisierung korreliert, wird durch die Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten bewirkt. Eine PKC-vermittelte Phosphorylierung reduziert die Fähigkeit des Rezeptors mit G-Proteinen zu interagieren und diese zu aktivieren. Einige G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) sind ebenfalls in der Lage mAChRs zu phosphorylieren. Im Gegensatz zur PKC phosphorylieren GRKs nur Agonist-gebundene Rezeptoren und erleichtern so die Bindung von β -Arrestin, welches wiederum die G-Protein/Rezeptor-Interaktion unterdrückt. Die Phosphorylierung des Rezeptors wird durch eine niedrige Konzentration an G-Proteinen, sowie durch Membran-Phospholipide stimuliert⁶⁸, wobei GRKs an PIP₂ und über ihr C-terminales Ende an freie $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden⁶⁹. Durch diese Interaktion wird die GPCR-vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade terminiert⁷⁰. Die Aktivität der GRK2 wird durch eine *Feedback*-Inhibierung reguliert, wobei ERK1 die GRK2 am Serin 670 phosphoryliert, das zur Beendigung der $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung und somit zu einer verringerten Aktivität der GRK führt⁷¹.

1.2.4 Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors durch GPCR

Zusätzlich zu den in Abschnitt 1.1.3 beschriebenen Signalwegen der mAChRs sind auch RTKs durch einen Transaktivierungsmechanismus an der Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch GPCRs beteiligt. Der Begriff der Transaktivierung beschreibt somit die Tyrosin-Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von RTKs durch einen Agonist-stimulierten GPCR. Daub *et al.* gelang es erstmals die Rolle von RTKs als nachgeschaltete Mediatoren in mitogenen Signalwegen von Agonist-stimulierten GPCRs nachzuweisen⁷². Weitere Studien konnten den Transaktivierungsmechanismus in einer Vielzahl von Zelltypen wie humanen Keratinozyten, primären Maus-Astrozyten, PC-12 Zellen, sowie in Zellen der glatten Muskulatur nachweisen^{73,74}. Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist in diesem Zusammenhang einer der am besten charakterisierten Signalproteine der cholinergen MAPK-Signalkaskade, der durch eine GPCR-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird⁷⁵. Der EGFR gehört zur ErbB-Familie, welche aus vier nah verwandten Rezeptortypen, den EGFR (ErbB1) und ErbB2-4, besteht. Die Expression aller vier ErbB-Rezeptoren konnte im Übrigen in HaCaT-Keratinozyten bestätigt werden⁷⁶. Die ErbB-Rezeptoren enthalten eine

extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne mit zusätzlichen regulatorischen Sequenzabschnitten, sowie einzelne hydrophobe Transmembrandomänen. Durch die Bindung eines Liganden an ErbB-Rezeptoren werden Homo- und Heterodimere gebildet und es kommt zur Trans-Autophosphorylierung der dimerisierten Rezeptormoleküle und damit zur Rezeptoraktivierung. Die Aktivierung des EGFR führt im Folgenden zur Interaktion mit dem Adaptorprotein Grb2 und dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos, der die Aktivierung der Membran-assoziierten GTPase Ras vermittelt, welche die Raf-Kinase phosphoryliert. Die aktive Raf-Kinase wiederum phosphoryliert MEK an zwei Serin-Resten. Die MAPK Kaskade führt letztendlich zur Aktivierung von ERK1/2, die entweder weitere zytoplasmatische Substratproteine phosphoryliert oder in den Nukleus transloziert, wo sie wiederum Dusp1 (*dual specificity phosphatase 1*) und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie u.a. Elk-1 aktiviert.

1.1.4.1 Der „Triple-Membrane-Passing“ Signalweg der GPCR-induzierten Transaktivierung des EGFRs

Der von Prenzel *et al.* postulierte Mechanismus des *Triple-Membrane-Passing* Signalwegs (TMPS) beschreibt die GPCR-induzierte Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die zur Prozessierung von Membran-ständigen EGF-ähnlichen Liganden-Vorläufern führt. Infolgedessen wird der Ligand freigesetzt und aktiviert den EGFR in autokriner und/oder parakriner Weise. Dieser Mechanismus der Liganden-abhängigen Transaktivierung beinhaltet somit drei Membranpassagen, die zur Aktivierung von EGFRs führen^{75,77,78} (Abb.2). Die Relevanz dieses TMPS-Mechanismus konnte für viele GPCR gezeigt werden, inklusive dem Dopamin D2 Rezeptor⁷⁹, α 1-adrenergetischen Rezeptor⁸⁰, Angiotensin II Rezeptor⁸¹, G-Protein-gekoppelten Membran-Östrogenrezeptor⁸² und mAChRs^{72,73,83}. In Abhängigkeit vom Zelltyp und vom molekularen Transaktivierungsmechanismus können alternativ zum TMPS weitere intrazelluläre Signalwege, wie beispielsweise eine Fyn-Kinase-vermittelte Aktivierung des EGFR involviert sein (Abb.1).

1.1.4.2 Matrix-Metalloproteinasen und Metalloprotease-Disintegrine

An der Transaktivierung des EGFRs sind die zwei Proteinfamilien der MMPs und Metalloprotease-Disintegrine (ADAMs) beteiligt. Die MMPs gehören zur Gruppe der Zink-abhängigen Endopeptidasen, die in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie der Zellproliferation, Differenzierung, Vaskularisierung und Migration involviert sind. MMPs spielen außerdem eine Schlüsselrolle in der Modulation von Zell-Matrix Interaktionen, indem sie die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix katalysieren. Die Familie der humanen MMPs umfasst rund 25 Mitglieder, inklusive der Kollagenasen (MMP-1, 8 und 1),

Gelatinasen (MMP-2 und 9), Stromelysine (MMP-3, -10 und -11), Matrilysine (MMP-7), Makrophagen Metalloelastasen (MME, MMP-12)⁸⁴ und Membran-Typ MMPs (MMP-14, -15 und -16). Die Expression der meisten MMPs wird durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine reguliert⁸⁵. Die katalytische Aktivität wird durch ein Zink-Ion als Kofaktor und eine konservierte Konsensussequenz in der aktiven Domäne der MMPs vermittelt, wobei drei Histidin-Reste der katalytischen Sequenz als Liganden zum Zink-Ion dienen⁸⁶. Die katalytische Domäne der MMPs enthält zusätzlich zum Zink-Ion zwei bis drei Calcium-Ionen, die für die Stabilisierung und die katalytische Aktivität verantwortlich sind. MMPs werden als sezernierte oder Membran-gebundene, inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene, synthetisiert. Dabei halten die freien Sulfhydryl-Gruppen von Cysteinen in der Prodomäne die Protease in einer inaktiven Konformation bis die Prodomäne entfernt ist⁸⁷. Die Aktivierung der MMPs wird durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Propeptids bewirkt. Die meisten MMPs können auch extrazellulär durch andere aktivierte MMPs oder auch Furin-ähnliche Serin-Proteasen aktiviert werden⁸⁵.

ADAMs sind integrale Typ I -Transmembranproteine und gehören wie die MMPs zur Metzinkin-Subfamilie der Proteasen. Sie sind an der Regulation von Zell-Zell-Interaktionen und die Prozessierung von Protein-Ektodomänen involviert⁸⁸. Die ADAM-Familie umfasst 40 Mitglieder, wobei 19 *ADAM*-Gene im humanen Genom identifiziert wurden. Einige ADAMs weisen mehrere Spleiß-Varianten und unterschiedliche zelluläre Expressionsmuster auf. Die allgemeine Domänenstruktur von ADAMs besteht aus einer N-terminalen Prodomäne, einer Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne, sowie einer Cystein-reichen- und EGF-ähnlichen-Domäne. Im Gegensatz zu den MMPs koordinieren in ADAMs Cystein-Reste in der Prodomäne das Zink-Ion innerhalb der Metalloprotease-Domäne, wodurch die Metalloprotease-Domäne in einer inaktiven Konformation vorliegt. Erst nach Abspaltung der Prodomäne wird das Zink-Ion frei und die ADAM-Protease aktiviert. Die Prolin-reiche zytoplasmatische Domäne einiger ADAMs weist putative Konsensus-Phosphorylierungsstellen auf und scheint so als regulatorische Domäne an der Weiterleitung von intrazellulären Signalen beteiligt zu sein⁸⁹. Interessanterweise konnte nur in etwa der Hälfte aller ADAMs eine katalytische Zink-bindende Konsensussequenz identifiziert werden. Obwohl alle bekannten ADAMs relativ konservierte Metalloprotease-Domäne aufweisen, sind ADAMs ohne Zink-bindende Konsensussequenz katalytisch inaktiv.

Über den exakten Mechanismus der MMP/ADAM-Aktivierung nach der Stimulierung eines GPCR durch einen bestimmten Agonisten ist bisher wenig bekannt. In diesem Zusammenhang konnten in der cytoplasmatischen Domäne vieler ADAMs eine Prolin-reiche Src-Homologe (SH3)-Bindungsdomäne, sowie potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden^{90,91}, wodurch eine Interaktion mit verschiedenen PTKs der Src-Familie, inklusive der Src- und Fyn-Kinase, sowie Adapterproteinen, wie Grb2 vermittelt und somit die Funktion der

ADAMs beeinflusst wird ⁹²⁻⁹⁴. Zusätzlich interagiert beispielsweise ADAM12 direkt und spezifisch über seiner N-terminale Prolin-reiche Region der zytoplasmatischen Domäne mit der SH3-Domäne der Src-Kinase ⁹⁵ oder der SH3-Domäne der regulatorischen p85 α -Untereinheit der PI3K ⁹⁶. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 durch einen Ca^{2+} -Influx bzw. der PKC-Aktivierung vermittelt wird ⁹⁷.

1.1.4.3 EGF-ähnliche Liganden

In Säugern sind neben EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) sechs weitere lösliche EGF-ähnliche Peptid-Wachstumsfaktoren an der Aktivierung des EGFR durch autokrine und parakrine Stimulation involviert, einschließlich des *Transforming growth factor- α* (TGF α), Epigen (EPGN), Epiregulin (EREG), Betacellulin (BTC), Amphiregulin (AREG) und des *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF). Zu dieser Gruppe gehören außerdem die Neureguline, die an ErbB3 und ErbB4 binden, jedoch nicht an dem Transaktivierungsmechanismus beteiligt sind ⁹⁸. Die EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren sind mit rund 6-10 kDa sehr kleine Peptide und beinhalten ein zentrales Sequenzmotiv, welches auch als EGF-Modul oder –Domäne bekannt ist und die Interaktion mit dem EGFR vermittelt. Diese etwa 40 Aminosäuren lange Konsensus-Sequenz bestehend aus 6 konservierten Cystein-Resten, die über drei intramolekulare Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind ⁹⁹. Das EGF-Motiv ist auf zwei Exons kodiert und ist etwa 25 Aminosäure-Reste von der Transmembrandomäne lokalisiert ¹⁰⁰. Alle EGF-ähnlichen Liganden werden als Typ I –Transmembranprotein synthetisiert und enthalten zusätzlich zum EGF-Modul eine N-terminale Pro-Region, eine Membran-nahe Region, eine hydrophobe Transmembran-Domäne und ein C-terminales zytoplasmatisches Fragment. Die EGF-ähnlichen Liganden binden und aktivieren spezifisch multiple ErbB-Rezeptoren. Die Spezifität der Liganden für einen bestimmten ErbB-Rezeptor ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Nur ErbB1 und ErbB4 sind autonome Rezeptoren, da sie in der Lage sind, nachgeschaltete Signalwege durch Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung zu aktivieren. Für ErbB2 sind bisher keine endogenen Liganden bekannt und ErbB3 weist keine Tyrosinkinase-Aktivität auf, wodurch beide Rezeptoren nicht als Homodimere, sondern nur in Assoziation mit anderen Liganden-gebundenen ErbB-Rezeptoren oder auch als ErbB2-ErbB3-Dimer in intrazellulären Signalwegen agieren können ¹⁰¹. Die Heterodimerisierung von diversen ErbB-Rezeptoren steigert die Spezifität und Diversität von Signalwegen, die durch bestimmte Liganden aktiviert werden. ErbB2 liegt in einer primär aktiven Konformation vor, welche die Interaktion mit anderen ErbB-Rezeptoren erleichtern könnte, beispielsweise mit den bevorzugten Bindungspartner EGFR. Die Heterodimerisierung von ErbB2 und EGFR bewirkt die Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGFR, woraufhin ErbB2 vom EGFR dissoziiert und mit ErbB3 heterodimerisiert ¹⁰².

Tab. 1: Spezifität der EGF-ähnlichen Liganden für einen bestimmten ErbB-Rezeptor.

EGF-ähnlicher Ligand	Spezifität für ErbB-Rezeptor
EGF	ErbB1
TGF- α	ErbB1
HB-EGF	ErbB1; ErbB4
AREG	ErbB1
BTC	ErbB1; ErbB4
EREG	ErbB1; ErbB4
EPGN	ErbB1

Die Aktivität von ErbB-Rezeptoren ist unter physiologischen Bedingungen abhängig von der Verfügbarkeit eines spezifischen Liganden. Da alle EGF-ähnlichen Liganden als Transmembranprotein synthetisiert werden, müssen diese posttranslational modifiziert werden. Die bedeutendste posttranslationale Modifikation wird unter dem Begriff *ectodomain shedding* beschrieben. Bei diesem Prozessierungsprozess kommt es durch spezifische MMPs und ADAMs zur proteolytischen Freisetzung des extrazellulären und EGF-Modul-enthaltenden Liganden. An dieser posttranslationalen Prozessierung sind jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nur einige ADAMs (ADAM 9, 10, 12, 15, 17 und 19) beteiligt. Für die EGFR-Transaktivierung von Bedeutung sind vor allem HB-EGF, TGF α , AREG und möglicherweise EREG^{99,103}, die durch ADAM 10, 12, 15 und 17 prozessiert werden¹⁰⁴. Die proteolytische Freisetzung des EGFR-Liganden führt zur Transaktivierung von EGFRs, die in derselben Membran (autokrin) oder Membranen von benachbarten (parakrin) lokalisiert sind¹⁰⁵.

Die cholinerge Aktivierung des MAPK- und Akt-Signalwegs ist in HaCaT-Keratinocyten noch nicht vollständig bekannt. Jedoch ist die cholinerge Aktivierung der MAPK-Kaskade in HaCaT-Zellen vollständig von der EGFR-Transaktivierung durch einen mAChR (hauptsächlich M₁ und M₃) über den TMPS abhängig. Dabei vermitteln MMPs, die im Übrigen durch Batimastat inhibiert werden können, die Transaktivierung des EGFR durch die proteolytische Freisetzung des EGFR-Liganden. Der intrazelluläre Signalweg, in dem die Proteinkinasen Src und PI3K involviert sind, ist größtenteils für die Aktivierung der Akt-Kinase notwendig. Die Akt-Aktivierung kann aber durch Inhibierung von MMPs partiell reduziert werden. Dementsprechend ist die Aktivierung der MMPs bzw. die proteolytische Freisetzung von EGFR-Liganden für den Akt-Signalweg in HaCaT-Zellen nicht essentiell. Im Gegensatz dazu hat die Inhibierung der PI3K und Src-Kinase keinen Einfluss auf die ERK/MAPK-Aktivierung nach cholinergen Stimulus¹⁰⁶ (Abb.1.2).

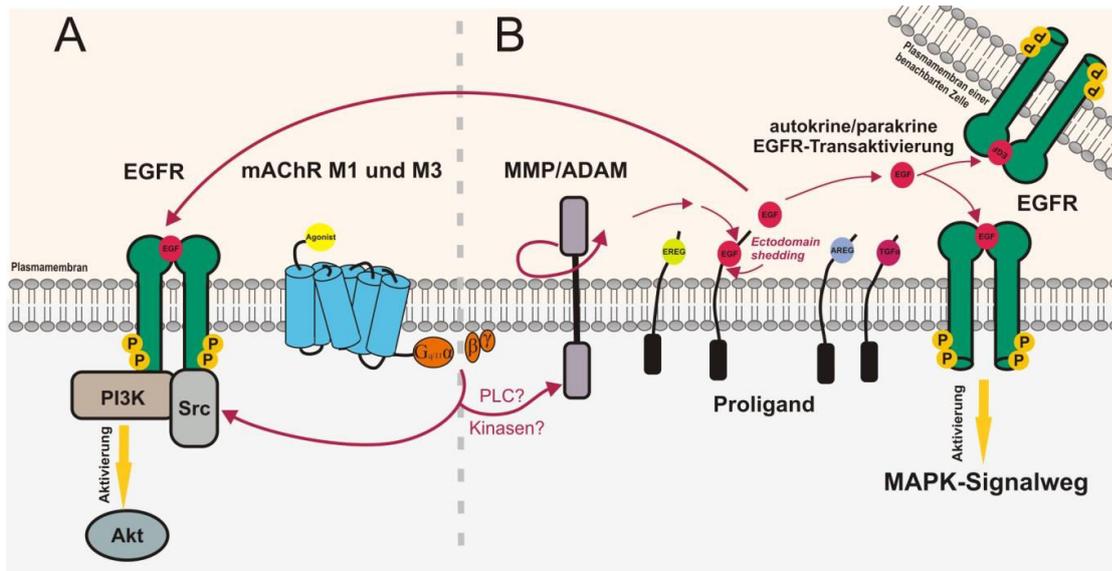


Abb.1.2: Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten. Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten. Die cholinerge Stimulation von M₁ und M₃ mAChRs führt A) zur Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs über die PI3K und Src-Kinase, der letztendlich zur Aktivierung der Akt-Kinase führt. B) Die ERK/MAPK-Aktivierung nach cholinerner Stimulation eines mAChRs in HaCaT-Zellen ist vollständig abhängig von der MMP-vermittelten, extrazellulären EGFR-Transaktivierung, den sogenannten *Triple-Membrane-Passing* Signalweg. Die Aktivierung von MMPs bewirkt dabei die Prozessierung von Membran-ständigen EGFR-Ligandenvorstufen (*ectodomain shedding*). Durch die Proteolyse wird der lösliche EGFR-Ligand freigesetzt und aktiviert EGFRs benachbarter (parakrin) Zellen, sowie EGFRs der eigenen Zellmembran (autokrin).

1.2 Die Familie der Membrane Raft-assoziierten Flotillin-Proteine

Zur Proteinfamilie der Flotilline gehören die zwei homologen und hoch-konservierten Proteine Flotillin-1 und Flotillin-2. Beide Flotilline sind durch Fettsäure-Modifikationen und hydrophobe Bereiche im N-Terminus, sowie über eine Homo- und Heterooligomerisierung fest mit Lipid-Mikrodomänen, den sogenannten *Membrane rafts*, assoziiert. Das erstmals von Simons und Ikonen 1997 postuliert Konzept der *Membrane rafts* beschreibt diese nach heutiger Definition als kleine (10-200 nm), dynamisch fluktuierende und geordnete Membran-Nanostrukturen bestehend aus Glykosphingolipiden, Cholesterol und bestimmten Membranproteinen^{107,108}. Durch Lipid-Lipid-, Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen können sich diese Nanostrukturen zu Plattformen verbinden, dessen Spezifität und Funktion durch die Zusammensetzung verschiedener Komponenten der biologischen Membranen bestimmt ist. In diesen Mikrodomänen-Plattformen können u.a. Adaptorproteine, bestimmte Rezeptoren, Ionenkanäle, Signalproteine und Enzyme assembliert werden, wobei diese Plattformen wiederum als Basis für diverse Prozesse, wie der Signaltransduktion, Membrantransportprozesse und der viralen Infektion dient¹⁰⁸. Flotilline werden auch als

Reggie-Proteine bezeichnet, das auf ihre ursprüngliche Entdeckung während der Regeneration von retinalen Ganglienzellen des Goldfischs nach einer Sehnervläsion zurückzuführen ist ¹⁰⁹. Gleichzeitig fanden Bickel *et al.* diese Proteine in den flotierenden und Detergenz-resistenten *Membrane raft*-Fraktionen von Membranpräparationen muriner Lungenzellen und benannten sie Flotillin-1 und Flotillin-2 ¹¹⁰. Die zwei unabhängigen Entdeckungen dieser Proteine führten zu einer unterschiedlichen Benennung und Nummerierung, wobei Reggie-1 mit Flotillin-2, sowie Reggie-2 mit Flotillin-1 identisch ist.

1.2.1 Vorkommen

Die Familie der Flotilline ist ubiquitär verbreitet, wobei sich beide Flotilline durch eine hohe Sequenzhomologie auf mRNA-Level und Protein-Ebene auszeichnen ^{111,112}. Dementsprechend konnten Flotilline in allen bisher untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden, wobei die Flotillin-Expression in Organen wie Herz, Lunge, Plazenta und Gehirn besonders hoch, aber hingegen in der Pancreas und der Leber geringer ist ^{113,114}. Ebenso weisen sich Flotilline durch eine hohe Similarität zwischen den Spezies aus, beispielsweise durch eine bis zu 98,1%ige Homologie zwischen Mensch und Maus ¹¹⁵. Außerdem konnten Flotillin-ähnliche Proteine ebenfalls in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Metazoa, nicht aber knospenden *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen oder *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden ^{113,115}. Auf zellulärer Ebene weisen Flotilline eine dynamische subzelluläre Verteilung auf, die zumeist vom Zelltyp und Differenzierungsstatus der Zelle abhängig ist. In den meisten Zellen ist ein Anteil der Flotilline unter physiologischen Wachstumsbedingungen an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ¹¹⁶. Ihre Lokalisation konnte ebenfalls in vesikulären Strukturen, wie Endosomen und Lysosomen ¹¹⁶, sowie in Exosomen ¹¹⁷ beobachtet werden. Flotillin-1 konnte speziell im Golgi-Netzwerk und im Zusammenhang mit der PTOV-1 Phosphatase im Nukleus nachgewiesen werden ^{118,119}. Die Lokalisation von Flotillin-2 konnte wiederum u.a. in Zell-Zell-Kontakten gezeigt werden ¹²⁰. Eine Stimulierung mit Wachstumsfaktoren kann die Lokalisation von Flotillinen verändern, wobei sie durch Src-Kinasen Tyrosin-phosphoryliert und von der Plasmamembran in endosomale Strukturen aufgenommen werden ¹²¹.

1.2.3 Struktur

Flotilline gehören zur evolutionär hoch-konserviert SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C)- Proteinfamilie ^{115,122}, wobei Flotillin-1 und -2 ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa aufweisen und 427 bzw. 428 Aminosäuren umfassen, aber von zwei unterschiedlich Genen kodiert werden ¹²³. Die hoch konservierte und N-terminal-lokalisierte SPFH-Domäne, die auch als Prohibitin Homologie-Domäne (PHB) bezeichnet wird, ist in diversen pro- und eukaryotischen Membranproteinen enthalten ¹²⁴. Außerdem enthält die SPFH-Domäne der Flotilline Acylierungen, welche die Assoziation mit der Plasmamembran vermitteln ^{120,125}.

Dabei weist Flotillin-1 eine Palmytylierung am Cystein-Rest 34 auf, die zusammen mit den beiden hydrophoben Regionen für die Membranassoziation verantwortlich ist ¹²⁶. Im Gegensatz dazu ist Flotillin-2 durch multiple Lipidmodifikationen, einschließlich einer Myristylierung und mehreren Palmytylierungen, mit der Plasmamembran verbunden, wobei die palmytylierten Cystein-Reste 19 und 20 in hydrophoben Abschnitten der SPFH-Domäne liegen ¹²⁰. Die am C-Terminus lokalisierte und aus einer charakteristischen Wiederholung eines kurzen Alanin (A)- und Glutamat (E)-Sequenzmotivs bestehende Flotillin-Domäne bildet α -Helices in einer *coiled-coil*-Struktur aus und vermittelt die Homo- und Heterooligomerisierung ^{127,128}. Die Oligomerisierung spielt bei vielen zellulären Prozessen wie der Assoziation mit *Membrane rafts*, sowie in endozytotischen Prozessen, der Zellteilung und in EGF-vermittelten Signalwegen eine Rolle ^{121,127,129}. Zudem enthalten Flotilline einige putative Phosphorylierungsstellen, denen eine funktionelle Bedeutung, wie beispielsweise dem Tyrosin-Rest 160 in Flotillin-1 und Tyrosin 163 in Flotillin-2, zugeschrieben werden konnte ^{121,127-129}. Flotilline sind in der Lage, sich gegenseitig zu stabilisieren, da nach einer siRNA-vermittelten Depletion von Flotillin-1 oder -2 die Expression des jeweiligen anderen Flotillins verringert wird. Interessanterweise besteht eine höhere Abhängigkeit von Flotillin-1 an Flotillin-2 als umgekehrt, da es zu einer verstärkten Reduktion von Flotillin-1 nach Depletion von Flotillin-2 kommt, während Flotillin-1-depletierte Zellen oft kaum eine Reduktion des Flotillin-2-Levels aufweisen ^{128,130,131}. Aufgrund der durch Acylierungen, Homo- und Heterooligomersierung und durch C-terminale hydrophobe Bereiche vermittelten Assoziation von Flotillinen mit *Membrane rafts*, werden Flotilline als *Membrane raft*-Markerproteine beschrieben.

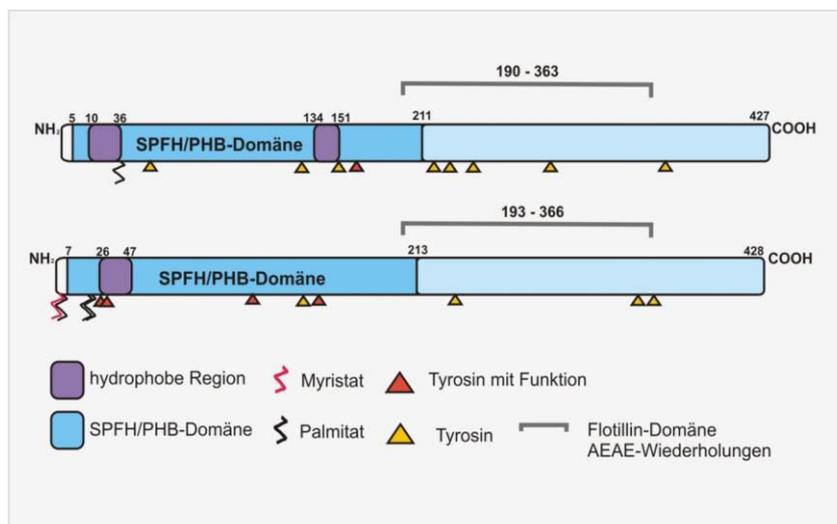


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Flotillinen. Flotillin-1 und -2 gehören der SPFH-Protein-Superfamilie an und enthalten eine C-terminal lokalisierte „Flotillin“-Domäne bestehend aus kurzen Alanin (A)- und Glutamat (E)-Sequenzmotiven. Flotilline besitzen außerdem post-translationale Lipidmodifikation, die für die Membranassoziation essentiell sind. Flotillin-1 ist an der AS

Cystein 34 palmyliert, wohingegen Flotillin-2 an Glycin 2 myristyliert und an Cystein 4, 19 und 20 palmyliert ist. Die funktionelle Bedeutung einiger Tyrosin-Reste der Flotilline sind bereits beschrieben wurden.

1.2.4 Funktion

Flotilline sind funktionell in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert, die vor allem von der divergierenden Expression und Lokalisation der Flotilline in der Zelle abhängig sind. Dementsprechend sind Flotilline an der Regulation von Membrantransportprozessen wie der Endo-/Exozytose und Phagozytose, des Aktin-Zytoskeletts, der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion, sowie an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt^{120,121,130,132,133}. Zudem wird vermutet, dass Flotilline in der Lipid-Organisation der Membran involviert sind, wobei Flotilline ihre eigenen Mikrodomänen bilden. Ebenso scheint Flotillin-2 an der Rekrutierung von Cholesterol an die Membran beteiligt zu sein, da Flotilline eine sogenannte *cholesterol recognition interaction amino acid consensus* (CRAC)-Sequenz besitzen und Flotillin-2 in der Lage ist, Cholesterin zu binden¹³⁴. Außerdem wird angenommen, dass Flotilline bei der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Internalisierung von verschiedenen Proteinen, wie beispielsweise des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteins CD59 beteiligt sind¹¹⁴.

Flotilline werden außerdem auch mit diversen pathologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht, wobei in neurodegenerativen Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* und *Morbus Parkinson* eine veränderte Flotillin-Expression beobachtet werden konnte^{135,136}. Zudem ist eine erhöhte Flotillin-Expression in Skelettmuskelzellen bei Typ 2 Diabetes nachgewiesen worden¹³⁷. Des Weiteren spielen Flotilline eine bedeutende Rolle in der Zellproliferation und damit auch Karzinogenese. In diesem Kontext konnte in vielen humanen Krebszellen eine erhöhte Expression von Flotillinen beobachtet werden, wie beispielweise in Lungen-Adenokarzinomen, hepatozellulären Karzinomzellen, sowie Magen-, Darm- und Brust-Krebs¹³⁸. Ebenso scheint eine Überexpression von Flotillinen mit der Metastasierung in Zusammenhang zu stehen, da beispielsweise in Melanom-Metastasen die Expression von Flotillin-2 erhöht ist¹³⁹. Andererseits verursacht eine Depletion von Flotillin-1 in Prostatakarzinom-Zellen eine reduzierte Zellproliferation¹¹⁸ und die Flotillin-2-Depletion konnte mit einer Reduktion der Lungen-Metastasierung in Zusammenhang gebracht werden¹⁴⁰.

1.2.4.1 Die Rolle von Flotillinen in Wachstumsfaktor-Signalwegen

Als ein Hauptbestandteil von nicht-caveolären *Lipid raft*-Mikrodomänen werden Flotilline mit einer Vielzahl von Signalwegen, u.a. mit der EGFR-Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht¹³⁰. Eine Stimulation des EGFR bewirkt eine Tyrosin-Phosphorylierung von Flotillinen durch Kinasen der Src-Familie^{121,129,141}. Zudem konnte eine Interaktion zwischen Flotillinen

und Src-Kinasen gezeigt werden¹²¹. In diesem Kontext ist bekannt, dass der Tyrosin-Rest 160 von Flotillin-1 und Tyrosin 163 von Flotillin-2 direkt durch die Src-Kinase phosphoryliert werden, infolgedessen Flotilline von der Plasmamembran in späte Endosomen endozytiert werden¹³⁰. Die EGF-Stimulierung führt außerdem zu einer Größenzunahme der Flotillin-Heterooligomere, das die Internalisierung der Flotilline in späte Endosomen induzieren könnte¹²⁷. Für die Endozytose des EGFRs wiederum werden Flotilline nicht *per se* benötigt, sondern sie sind vielmehr am EGF-induzierten Clustering des EGFRs beteiligt, wobei Flotilline mit dem EGFR konstitutiv einen Komplex bilden¹³⁰. Insbesondere Flotillin-1 ist dabei für das Clustering und die Aktivierung des EGFRs, sowie die nachgeschaltete MAPK-Aktivierung notwendig¹³⁰. Während der EGFR-Signaltransduktion wird Flotillin-1 zudem eine Rolle als MAPK-Gerüstproteine zugeschrieben, indem es direkt mit verschiedenen Kinasen der MAPK Kaskade, wie beispielsweise Flotillin-1 mit Raf, MEK1 und ERK1/2, interagiert¹³⁰. Demzufolge verursacht eine Depletion von Flotillin-1 eine verminderte Aktivierung des EGFR und eine beeinträchtigte MAPK-Signaltransduktion. Ein gegensätzlicher Effekt lässt sich jedoch bei einer Flotillin-2 Depletion beobachten, die zu einer erhöhten MAPK-Aktivierung und infolgedessen auch zu einer höheren Proliferationsrate von kultivierten Zellen führt¹³¹. Durch ihre Rolle in der EGFR-Signaltransduktion werden ERK1/2 nachgeschalteten Transkriptionsregulatoren, wie der *Serum response factor* (SRF), sowie die Expression von Egr1 und cFos^{142,143} durch Flotilline beeinflusst. Da in der Flotillin-Promotorregion wiederum Bindungsstellen für Egr1 und das *Serum response element* (SRE) identifiziert wurden, gelten Egr1 und der SRF als positive Regulatoren der Expression von Flotillinen^{144,145}. Durch die Regulierung von Egr1 können Flotilline zudem mit dem Zell-Überleben und der Apoptose in Verbindung gebracht werden, da eine erhöhte Egr1-Expression zu einer erhöhten Expression des Tumorsuppressorgen p53 auf mRNA- und Proteinebene führt¹³¹. Die Effekte von Flotillinen auf die Aktivierung von RTKs und der nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade konnte zusätzlich anhand eines Flotillin-*knockout*-Mausmodells, insbesondere der Flotillin-2-*knockout* Maus näher untersucht werden. Ohne erkennbare Veränderungen des Phänotyps und Entwicklungsdefekte sind Flotillin-*knockout* Mäuse überlebensfähig und fertil. Dabei ist in Flotillin-1- sowie Flotillin-2-*knockout* Mäusen die Expression des jeweilig verbleibenden Flotillins reduziert^{131,140,146}, welches in Flotillin-*knockout* Mäusen zudem nicht mehr in *Membrane rafts* lokalisiert ist. Infolgedessen bleibt die Bildung von spezifischen Flotillin-Mikrodomänen aus^{140,141}. Übereinstimmend mit den Studien an kultivierten Zellen weist die Untersuchung von bestimmten Organen der Flotillin-2-*knockout*-Maus auf eine erhöhte Aktivität des MAPK-Signalwegs, einschließlich einer erhöhten Expression der ERK1/2-nachgeschalteten Effektoren Egr1 und cFos, hin¹³¹. Neben ihrer Rolle in der RTK-Signaltransduktion werden Flotilline zusätzlich mit weiteren Signaltransduktionswegen, wie GPCR-Signalwege in Zusammenhang gebracht. Dabei interagieren Flotillin-1 und -2 direkt über ihren N-terminalen Bereich mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit

der trimeren G-Proteinen von GPCRs, wobei diese Interaktion unabhängig vom Nukleotid-Bindungszustand der $G\alpha_q$ -Untereinheit ist ¹⁴⁷. In diesem Kontext konnte zudem eine Abhängigkeit der M_2 mAChR-induzierten ERK-Aktivierung von Flotillinen gezeigt werden ¹⁰⁶, bei welcher Flotilline vermutlich ebenfalls als Gerüstproteine fungieren.

1.3 Die Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren

Die ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) werden der Ras-Superfamilie zugeordnet, die wiederum in die fünf Subfamilien Rab, Rho, Ras, Ran und Arf untergliedert werden kann ¹⁴⁸. Die hoch- konservierte Arf-Familie besteht aus GTP-bindenden Proteinen mit einer geringen Molekularmasse von etwa 20 kDa und 180 Aminosäuren, inklusive den Arf-ähnlichen Proteinen (ArIs) und SarI ^{149,150}. Arf-Homologien sind ubiquitär in allen eukaryotischen Organismen vertreten und hoch konserviert. Arf-Proteine wurden ursprünglich als zelluläre Kofaktoren der Cholera-Toxin-katalysierten ADP-Ribosylierung der heterotrimeren G-Proteine entdeckt. In Säugern werden die sechs eng verwandten Arf-Proteine basierend auf ihren Sequenzhomologien in drei Klassen eingeteilt, wobei Arf1, -2 und -3 in Klasse I, Arf4 und -5 in Klasse II und Arf6 in Klasse III eingeordnet werden ^{149,151}. Klasse I Arf-Proteine sind an der Regulierung der Assemblierung von diversen Hüll-Komplexen in sekretorischen Signalwegen beteiligt und aktivieren außerdem Enzyme des Phospholipidmetabolismus ¹⁵², wohingegen die Funktion von Arf5 der Klasse II vor allem im frühen Golgi-Transport vermutet wird ¹⁵³. Die kleinen GTPasen der Arf-Familie enthalten eine Konsensus-Sequenz und eine N-terminale Myristoylierung an der zweiten N-terminalen Aminosäure Glycin der amphipatischen Helix. Durch die ko-translationale Myristylierung sind die Arf-Proteine nach GTP-Bindung in der Lage in die Plasmamembran zu inserieren und unterscheiden sich dadurch von anderen GTPasen der Ras-Superfamilie. Der Abstand zwischen amphipatischer Helix zum restlichen Protein ist in Arf-Proteinen im Gegensatz zu anderen Ras-GTPasen sehr gering, wodurch die Bindung eines Effektorproteins wie Hüll-Proteine oder Lipid-modifizierende Enzyme nah der Plasmamembran erfolgen kann ¹⁵⁴. Ebenso wie andere GTPasen durchlaufen Arf-Proteine eine zyklische Konformationsänderung, die von dem gebundenen Guanin-Nukleotid abhängig ist, wobei Arf-Proteine eine hohe Affinität zu Guanin-Nukleotiden aufweisen. Dementsprechend wechseln sie in diesem dynamischen Prozess zwischen einer GTP-gebundenen aktiven und einer GDP-gebundenen inaktiven Konformation. Die Bindung und Hydrolyse von GTP korreliert mit der Lokalisierung von Arf-Proteinen innerhalb der Zelle. Demzufolge liegen Arfs in ihrer inaktiven Konformation im Zytoplasma gelöst vor und werden im aktiven Zustand an die Plasmamembran transloziert ^{151,155,156}.

Des Weiteren interagieren Arf-Proteine mit regulatorischen Proteinen, den sogenannten *guanine nucleotid exchange factors* (GEFs) und *GTPase activation proteins* (GAPs), die als

Aktivatoren oder Inaktivatoren der Arf-Aktivität dienen. Bisher konnten 15 Arf-GEFs identifiziert werden, die in ihrer Struktur, Größe und subzellulären Verteilung variieren, sowie in Subfamilien untergliedert sind¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Die hohe Spezifität der GEFs für eine bestimmte Arf-Isoform ist vermutlich für die subzelluläre Lokalisation der Arf-Proteine verantwortlich, das wiederum für ihre Funktion eine maßgebliche Rolle spielt^{157,161}. Für die Stimulierung der GTP-Hydrolyse und somit für die Terminierung der Arf-Aktivität sind Arf-GAPs verantwortlich. Bisher konnten über 30 GAPs in Säugern identifiziert werden¹⁵¹. Die GAP-Domänen enthalten ein konserviertes und invariables Motiv bestehend aus Cysteinen, die mit einem Zink-Ion eine Zinkfinger-Struktur bilden. Außerdem enthalten GAPs ein Argininfinger-Struktur, die wiederum für die katalytische Funktion verantwortlich ist¹⁶². Anhand verschiedener *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Arf-Proteine eine klare Präferenz für spezielle GAPs und GEFs ausprägen¹⁵⁷.

Durch den oben beschriebenen Zyklus der GTP-Bindung und -Hydrolyse sind Arf-Proteine zusammen mit anderen kleinen GTPasen und Effektorproteinen in der Lage den Phospholipid-Metabolismus, Membrantransportprozesse wie die Endozytose, Exozytose und Recyclingprozesse, sowie die Organisation des Zytoskeletts inklusive der Aufrechterhaltung der Organellenintegrität zu regulieren^{149,163-165}. Während des Membrantransports sind Arf-Proteine an der Bildung eines Transport-Vesikels beteiligt, indem sie mit vesikulären Hüll-Proteinen interagieren. Zu den Arf-abhängigen Proteinen gehören u.a. die Adaptorproteine 1-3 (AP1-3) und die Golgi-assoziierten *γ-ear containing Arf-binding* (GGA)-Proteine¹⁵⁴. Die Rekrutierung von Arf-Proteinen trägt zur Deformation und Knospung der Membran und letztendlich zum Einschluss und Transport von Fracht-Molekülen bei¹⁶⁶. Die Einschnürung der Membran und die damit verbundene Entstehung des Transport-Vesikels erfolgt dabei u.a. mittels der PLD, wohingegen die anschließende Ablösung des Hüll-Komplexes durch die Arf-Inaktivierung unterstützt wird¹⁶⁷.

1.3.1 Der ADP-Ribosylierungsfaktor 6

Der ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (Arf6) ist neben Arf1 einer der am besten untersuchten Arf-Proteine, wobei Arf6-Homologe in den meisten eukaryotischen Organismen, ausgenommen in Pflanzen, gefunden werden konnten. Wie alle Proteine der Arf-Familie ist auch Arf6 am zweiten Glycin-Rest myristyliert und enthält eine N-terminale Konsensus-Sequenz, welche die Membran-Insertion und somit die subzelluläre Lokalisation beeinflusst. In diesem Kontext konnten D'Souza-Schorey *et al.* zeigen, dass nicht-myristylierte Arf6-Formen in verschiedenen intrazellulären Strukturen falsch lokalisiert sind und nicht in der Lage sind in die Membran zu inserieren¹⁶⁸. Desweiteren ist diese Lipidmodifikation für die Funktion von Arf6 im Membrantransport, wie für die Fusion endosomaler Strukturen essentiell¹⁶⁹.

1.3.1.1 Die Funktionen von Arf6

Die Lokalisierung von aktiven Arf6 konnte hauptsächlich an der Plasmamembran und in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Dort ist es an der Regulation der peripheren Membrandynamik und des kortikalen Aktin-Zytoskeletts an der Zellmembran beteiligt^{155,170}. Dementsprechend spielt Arf6 für die Reorganisation des Zytoskeletts eine Rolle, wie beispielweise in der Ausbildung von Aktin-reichen Membranausstülpungen durch Aktin-Polymerisation^{171,172}. Arf6 ist ebenso in die Fc-vermittelte Phagozytose¹⁷³ und in die Regulation von Sekretionsprozessen¹⁷⁴ involviert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Arf6 die Internalisierung von E-Cadherin von Zell-Zell-Kontakten zu frühen Endosomen fördert, das zum Abbau von Adhärenz-Verbindungen in Epithelzellen führt¹⁷⁵. Im Zusammenhang mit der Zytokinese wird vermutet, dass Arf6 eine Rolle während der Ingression der Teilungsfurche spielt. Während der Mitose variiert die Menge an Arf6 drastisch und es kommt zur Veränderung der Lokalisation und Aktivität. Arf6 wird an der Teilungsfurche akkumuliert und könnte dort an der Membran-Umbau während der Zellteilung beteiligt sein¹⁷⁶. Eine Depletion von Arf6 verursacht die Entstehung von polyploiden Zellen, das letztendlich zur Tumorgenese führt¹⁷⁷. Die Studien von Tague *et al.* weisen außerdem daraufhin, dass Arf6 in die Regulation der Invasion von Tumorzellen involviert ist. Dabei führt die Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs zu einem erhöhten Auswuchs an Aktin-reichen Invadopodien von Melanomzellen¹⁷⁸. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Arf6 und einige Arf6-Regulatoren in metastatischen Krebszellen überexprimiert sind^{179,180}. Arf6 reguliert dort die Internalisierung und Transport von Integrinen, die für die Migration und Invasion von Kazinom-Zellen essentiell ist¹⁷⁶.

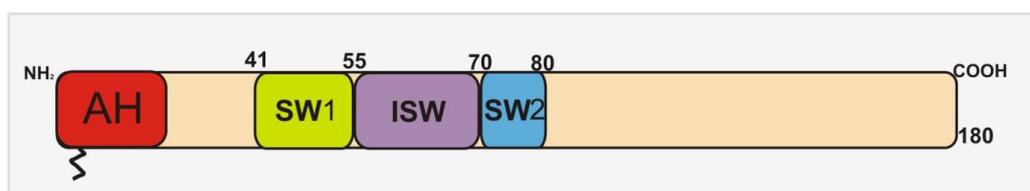


Abb. 1.4: Domänenstruktur von Arf6. Die kleine GTPase Arf6 besteht aus 180 AS, wobei sich die Switch 1-Domäne zwischen AS 41 und 55 und die Switch 2-Domäne zwischen den AS 70 und 80 befindet. Beide Switch-Regionen flankieren die Interswitch-Region, die sich von AS 55-70 erstreckt. N-terminal befindet sich die amphipatische Helix (AH), die am 2. Glycin-Rest eine Myristylierung trägt.

1.3.1.2 Die Rolle von Arf6 im Membranlipid-Metabolismus und Membrantransportprozessen

Arf6 reguliert Enzyme des Membranlipid-Metabolismus und vermittelt dementsprechend die Aktivierung der PLD und der Typ 1 Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase (PIP5K), die

zusätzlich auch in der Regulation von exozytotischen Prozessen vermutet werden¹⁸¹. Die Arf6-vermittelte Aktivierung der PLD durch direkte Bindung führt zu einem Anstieg von Phosphatidsäure, die wiederum als Kofaktor für die Aktivierung der PIP5K dient, woraufhin das Level an PIP2 in der Zellperipherie ansteigt¹⁸². Außerdem wird die Interaktion von aktivierten Arf-Proteinen mit GAPs durch ein erhöhtes Level an Phosphatidsäure erleichtert¹⁴⁹. Einige Studien konnten die Kolo-kalisation von Arf6 und der PIP5K an der Plasmamembran und endosomalen Membranen belegen, wo die Menge an PIP2 direkt mit dem Aktivierungsgrad von Arf6 korreliert¹⁸³. Phosphatidsäure und PIP2 können hier verschiedene Aktin-bindende Proteine rekrutieren, was wiederum zu Veränderungen im kortikalen Aktin-Netzwerk führt¹⁸⁴.

Die Rolle von Arf6 in Membrantransportprozessen wurde als Erstes in Chinesischen Hamster Ovarienzellen dokumentiert, in denen die Expression einer dominant-negativen Arf6-Form das endosomale Recycling verhindert^{155,174,185,186}. Verschiedene Studien konnten die Rolle von Arf6 in endosomalen Transportprozessen zeigen, in denen es sowohl die Clathrin-abhängige als auch die Clathrin-unabhängige Endozytose reguliert¹⁷⁵. Wie bereits erwähnt, steigt aufgrund der von Arf6-vermittelten PLC- und anschließenden PIP5K-Aktivierung das Level an PIP2, welches wiederum eine wichtige Rolle in der Regulierung der Clathrin-abhängigen Endozytose, sowie anderen Prozessen wie der Exozytose und der Assoziation der Membran mit dem Zytoskelett spielt^{187,188}. Während der Clathrin-abhängigen Endozytose rekrutiert aktives Arf6 und PIP2 das Adapterprotein AP-2 und Clathrinmoleküle an die Plasmamembran, die dort als *Coat*-Komponenten des knospenden Vesikels dienen (*Clathrin-coated pits*)^{168,187}. Die Depletion von endogenem Arf6 durch RNA-Interferenz zeigte, dass nicht nur die Clathrin-abhängige, sondern auch die Clathrin-unabhängige Endozytose von Arf6 beeinflusst wird¹⁸⁹. In Clathrin-unabhängigen Prozessen spielt wiederum AP-2 eine wichtige Rolle, in dem es die post-endozytotische Sortierung von Frachtmolekülen vermittelt. In diesem Arf6-regulierten Membrantransport assoziiert aktiviertes Arf6 direkt mit dem AP-2 und reguliert so post-endozytotische Transportwege von Arf6-Frachtmolekülen wie des Haupthisto-kompatibilitätskomplex I (MHC-I), von β 1-Integrinen, des Myelin-Membran-Proteins PMP-22, der Beta-Sekretase 1 und des M₂ mAChR¹⁹⁰. Nach der Endozytose bzw. Internalisierung wird Arf6 zusammen mit den restlichen Membranbestandteilen aus den frühen Endosom zurück zur Plasmamembran transportiert¹⁹¹.

Wegen seiner zentralen Rolle in intrazellulären Transportprozessen wird Arf6 mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Arf6 ist beispielsweise ein bedeutender Faktor in der Ausbildung eines invasiven Phänotyps beim Brustkrebs. Desweiteren hat Arf6 einen wichtigen Einfluss in der Niemann Pick-Krankheit (NPC), die durch Defekte im endosomalen Transportprozessen und der dadurch verursachten Akkumulation von freiem Cholesterin und anderen Lipiden in späten endosomalen und lysosomalen Kompartimenten charakterisiert ist. Schweitzer *et al.* konnten zeigen, dass in humanen Fibroblasten von NPC-

Patienten die Aktivierung von Arf6 den Cholesterol-Transport aus endosomalen Recyclingkompartimenten und die Abnahme der intrazellulären Cholesterol-Akkumulation verstärkt ¹⁹².

1.3.1.3 Der Einfluss von Arf6 auf die Internalisierung von GPCR

Nach der Stimulation eines GPCR sind diese in der Lage nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren und werden anschließend desensitisiert und internalisiert. Dabei führt die Stimulation eines GPCR, wie des β -adrenergen und luteinisierenden-Hormon Rezeptors, zur Aktivierung von Arf6. In diesem Zusammenhang konnten Claing *et al.* die Interaktion von Arf6 mit β -Arrestin nachweisen, wobei β -Arrestin die Rezeptor-Endozytose durch die Aktivierung von Arf6 reguliert. Außerdem reduziert die Überexpression eines Arf6 GAPs die Internalisierung des β -adrenergen Rezeptors, wobei zusätzlich eine Kolo-kalisation von β -Arrestin und dem Arf6 spezifischen GEF ARNO nachweisen werden konnte und die Rezeptor-Endozytose durch Aktivierung von Arf6 verstärkt wird ¹⁹³. Zudem stimuliert ARNO die Freisetzung von β -Arrestin von den Andockstellen der Membran ¹⁹⁴. Arf6 ist zusätzlich für die Endozytose des Endothelin Typ B-Rezeptors, des Transferrin-Rezeptors (TnfR) und des Vasopressin Typ 2 (V₂R)- sowie Angiotensin Typ 1-Rezeptors essentiell ¹⁸⁹. Die Internalisierung des M₂ mAChR verläuft ebenfalls über einen Arf6-abhängigen Endozytoseweg, wobei die Agonist-stimulierte Internalisierung und das Recycling von Arf6 reguliert werden. Die M₂-Endozytose wird dabei durch die Expression einer konstitutiv-aktiven Form von Arf6 (Arf6-CA) vermindert, jedoch die Rate und der Umfang des Recycling verstärkt ¹⁹⁴. Zudem konnte in humanen Chorionkrebs-Zellen (JEG-3), die mit dem M₂ mAChR und entweder mit Wildtyp-, dominant-negativen (DN) oder konstitutiv-aktiven Arf6 kotransfiziert wurden, eine starke Zunahme der M₂-Endozytose nach Expression von Arf6-DN gezeigt werden ¹⁹⁵. In HeLa-Zellen konnte jedoch beobachtet werden, dass die Expression von Arf6-CA oder eines vorgeschalteten Arf6-Aktivators die M₂-Internalisierung bis zu 50% inhibiert und Arf6-DN keinen Einfluss auf die Endozytose nimmt ¹⁹⁴. Demzufolge wird angenommen, dass die regulatorische Rolle von Arf6 in der M₂-Internalisierung Zelltyp-spezifisch ist. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass der M₂ mAChR initial über einen Clathrin-unabhängigen und Arf6-assoziierten Weg internalisiert wird ¹⁹⁴. Weitere Studien von Houndolo *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die M₂-Internalisierung über den Clathrin-abhängigen Weg in Arf6-depletierten Zellen inhibiert ist ¹⁸⁹.

1.4 Ziele der vorliegenden Studie

Für die Regulation der cholinergen Signaltransduktion in HaCaT-Keratinocyten sind die EGFR-Transaktivierung, sowie die nachgeschaltete Aktivierung der MAPK-Kaskade von besonderer Bedeutung. Dabei ist bisher nur wenig über die transkriptionellen Effekte, die durch die EGFR-Transaktivierung vermittelt werden, bekannt. In dieser Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden: a) Welche Gene, deren Genprodukte an der EGFR-Transaktivierung involviert sind, werden durch die cholinerge Stimulation transkriptionell reguliert? b) Sind die Mitglieder der Flotillin-Proteinfamilie bei der cholinergen Regulation der Transkription beteiligt?

Flotilline sind an endosomalen Transportprozessen von bestimmten Fracht-Molekülen beteiligt, deren Transport durch die kleine GTPase Arf6 reguliert wird. Demzufolge sollte hier die mögliche Kooperation von Flotillinen und Arf6 während endosomaler Membrantransportprozesse näher untersucht werden. Insbesondere sollte eine mögliche Arf6-Effektorfunktion von Flotillinen, sowie der Einfluss von Arf6 auf die EGF-induzierte Endozytose von Flotillinen untersucht werden.

2. Material

2.1 Materialien und Geräte

Die in der Doktorarbeit verwendeten Materialien und Geräte mit den dazugehörigen Herstellern und dem Firmensitz sind in Tabelle 1 aufgeführt. Gebrauchsmaterialien, beispielsweise Reaktionsgefäße, Falkons, Pipettenspitzen, sowie Zellkulturflaschen und –platten wurden von BD Bioscience (Heidelberg, DE), Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE), Sarstedt (Nümbrecht, DE) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Tab. 2: Die verwendeten Materialien und Laborgeräte mit den jeweiligen Herstellern.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Incucell Bakterien-Inkubator	Sanyo, München (DE)
Magnet-Eppendorf-Ständer (DynaI)	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Hamiltonspritzen (1000 µl und 25 µl)	Unimetics Coporation; Los Angeles (USA)
Schüttler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach (DE)
Spektralphotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Airflow-Control (EN 14175)	WALDNER Inc., MA (USA)
TECAN infinite M200	TECAN, Crailsheim (DE)
Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus)	Bandelin, Berlin (DE)
Rotator	neoLab, Heidelberg (DE)
Ultraviolett-Strahler	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch (DE)
Waagen:	
MonoBloc Chemikalienwaage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen (DE)
Feinwaage (si-64)	Denver Instrument, Bohemia (USA)
Zentrifugen:	
Mikro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Microcentrifuge 200 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Tischzentrifuge	Labnet, Langenfeld (DE)
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop LSM T-PMT 710	Carl Zeiss, Göttingen (DE)
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)

Gerätebezeichnung	Hersteller
Zellkultur:	
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg (DE)
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Gelelektrophorese und Western-Blot:	
Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	neoLab, Heidelberg (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Blot-Kammer (BioRad)	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
Nitrocellulose-Membran (Whatman® Protran)	Whatman, Dassel (DE)
Entwickler-Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Röntgenfilm (Super RX Fuji medical X-ray Films)	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Polymerase Kettenreaktion :	
TPersonal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
BioRad CFX Connect™ Real-Time System	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Die für die Doktorarbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind mit deren jeweiligen Herstellern und dessen Niederlassungen in Tabelle 3 gelistet.

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien mit dem jeweiligen Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
AG9	Calbiochem/Merck, Darmstadt (DE)
Aprotinin	Roth, Karlsruhe (DE)
B-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
BioRad Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	GE Healthcare, München (DE)
Coomassie Brilliant Blau G-250	AppliChem, Darmstadt (DE)
DABCO (1,4-Diazabicyclo (2,2,2)-octan)	Fluka, Neu-Ulm (DE)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Merck, Darmstadt (DE)
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	Life Technologies, Darmstadt (DE)

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
Dynabeads (Protein A und G)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
ECL Western blotting detection reagent	GE Healthcare, München (DE)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt (DE)
FCS (Fötale Kälberserum)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Gelmount mounting medium	Biomedica, Foster City, CA (USA)
Glutathion-Sepharose Beads	GE Healthcare, München (DE)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe (DE)
Leupeptin Hemisulfat	Roth, Karlsruhe (DE)
Lipofectamine 2000	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Applichem, Darmstadt (DE)
Lysozym	Roth, Karlsruhe (DE)
MACSfectin	Miltenyi Biotech, Finnland
Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Neu-Ulm (DE)
Natriumdesoxycholat	Applichem, Darmstadt (DE)
NOG (Octyl- β -D-glucopyranosid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
NP-40 (Nonidet P 40)	Fluka, Neu-Ulm (DE)
OptiMEM	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Pansorbin cells	Merck, Darmstadt (DE)
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ponceau S	Applichem, Darmstadt (DE)
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München (DE)
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin 1,2- Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris	Applichem, Darmstadt (DE)
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Tween 20	Applichem, Darmstadt (DE)

Alle nicht in Tabelle 2 aufgelisteten Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt, DE), Fluka (Neu-Ulm, DE), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE), Merck (Darmstadt, DE) und Roth (Karlsruhe, DE) erworben.

2.3 Puffer und Lösungen

Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Blockpuffer	1 x TBST (Tris gepufferte Saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% Methanol
Co-immunopräzipitations (Co-IP) Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 5 mM EDTA Triton X-100
Coomassie Entfärberlösung	5% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie Färbelösung	1% Coomassie Brilliant Blue 42,5% Ethanol 5% Methanol 10% Eisessig
DNA-Probenpuffer	75% (v/v) Glycerol 2 mg/ml Bromphenolblau 4 mg/ml Xylencyanol 50 mM EDTA
ECL-Lösung (Verstärkte Chemilumineszenz-Lsg.)	100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarinsäure 1% H ₂ O ₂

Material und Methoden

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
GST-Bindepuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 5 mM β -Mercaptoethanol 0,1% Triton X-100 10% Glycerin
GST-Elutionspuffer	Siehe GST-Bindepuffer 20 mM reduziertes Glutathion
GST-Lysepuffer (pH 7.5)	50 mM HEPES (pH 7.5) 150 mM NaCl 1mM EDTA 5% Glycerol 0.1% NP-40 Frisch zugeben: 1.5 μ M Aprotinin , 23 μ M Leupeptin 1.5 μ M Pepstatin A, 1 mM PMSF 1 mM DTT
Glycerol Stock-Puffer	65% Glycerol 0,1 M $MgSO_4$ 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Lämmli-Laufpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar pure pro Liter
LB-Medium	20 g LB (Luria/Miller)
Lyse-Puffer (Stürmer)	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
PBS (1x) (Phosphat gepufferte Saline, pH 7,4)	150 mM NaCl 20 mM NaH_2PO_4
Ponceau Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure

Material und Methoden

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Pulldown-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 0,1% SDS 0,5% Na-desoxycholat 1% Triton X-100 10% Glycerin 1 mM Dithiothreitol
Pulldown-Waschpuffer	50 mM Tris HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1% Nonidet P 40 10% Glycerin 1 mM Dithiothreitol
SDS-Ladepuffer (4x)	250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 100 mM DTT 20% β-Mercaptoethanol
Stripp-Lsg. Alkalisch	0,1 M NaOH (pH 12,7)
Stripp-Lsg. Sauer	0,1 M Glycin (pH 2,5)
1 x TBST (Tris gepuffertes Kochsalz & Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 0,1 mM EDTA
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA

2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

2.4.1 Primärantikörper

In den Tabellen 4-7 sind die in der Arbeit für Westernblots (WB), Immunfluoreszenz (IF) und Co-Immunopräzipitation (IP) eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper, sowie Fluorophor-gekoppelte Moleküle und Fluoreszenzfarbstoffe aufgelistet.

Tab. 5: Die verwendeten Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen, dem Molekulargewicht (MG) des Antigens und den Hersteller.

Antigen	Wirt	WB	Verdünnung		MG [kDa]	Hersteller
			IF (Fixierung)			
c-myc (A14)	Kaninchen	-	-			Cell Signaling, Danvers (USA)
Dusp1	Kaninchen	1:1000	-		39	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
FLAG (M2)	Maus	1:500	1:100 (MeOH)		-	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Flotillin-1	Maus	1:1000	1:25 (MeOH)		47	BD Transduction Labs, Heidelberg (DE)
Flotillin-1	Kaninchen	1:1000	1:100 (MeOH)		47	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Flotillin-2	Maus	1:1000	1:25 (MeOH)		47	BD Transduction Labs, Heidelberg (DE)
Flotillin-2 (C-terminal)	Kaninchen	1:1000	1:100 (MeOH)		57	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Egr1	Kaninchen	1:1000	-		75	Cell Signaling, Danvers (USA)
ERK 1/2	Kaninchen	-	1:1000		43/41	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
Phospho-ERK 1/2 (Y204)	Maus	-	1:1000		43/41	Santa Cruz Biotechnology Cruz, CA (USA)
GAPDH	Maus	-	1:10.000		37	Abcam, Cambridge (UK)
GFP	Maus	1:1000	-		27	Roche Applied Science, Mannheim (DE)
GFP	Kaninchen	1:2000			27	Clontech Laboratories, Mountain View, CA (USA)
GST (Glutathion-S-Transferase)	Maus	1:10.000				Merck, Darmstadt (DE)
HA (Hämagglutinin)	Maus	1:1000				Covance, Emeryville, CA (USA)

Material und Methoden

HA (Hämagglutinin)	Kaninchen	1:1000			Abcam, Cambridge (UK)
LAMP3 (MX 49.129.5)	Maus			44	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
MEK 1/2	Kaninchen	1:1000		45/47	Cell Signaling, Danvers (USA)
Phosho-MEK 1/2 (S217/221)	Kaninchen	1:1000		45/47	Cell Signaling, Danvers (USA)

Abkürzungen: GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

2.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 6: Die verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und Herstellern.

Antikörper	Verdünnung		Hersteller
	WB	IF	
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:10.000	-	Dako, Hamburg (DE)
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:10.000	-	Dako, Hamburg (DE)
Goat anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488		1:300	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488		1:300	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Donkey anti-mouse IgG-Cy3		1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)

Abkürzungen: HRP, Meerrettichperoxidase

2.4.3 Fluorophor-gekoppelte Reagenzien und Fluoreszenzfarbstoffe

Tab. 7: Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Moleküle, sowie deren Verdünnung und Hersteller.

Bezeichnung	Verdünnung für DNA-Gele	Verdünnung für IF	Hersteller
Ethidiumbromid	1:10.000	-	Dako, Hamburg (DE)
DAPI		1:10.000	Dako, Hamburg (DE)

Abkürzungen: DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol

2.5 Synthetische Oligonukleotide

2.5.1 DNA-Primer

Die für die quantitative Real-time RCR verwendeten DNA-Primer wurden spezifisch für die jeweilige cDNA mit PerlPrime unter Verwendung der NCBI Referenz-Sequenzen entworfen. Alle aufgeführten Primer wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE) erworben und sind in Tabelle 7 mit Sequenzen und Annealing-Temperaturen aufgelistet.

Tab. 8: Liste der DNA-Primer mit den dazugehörigen Sequenzen und Annealing-Temperaturen.

Gen	Primer forward (5' zu 3')	Primer reverse (5' zu 3')	T _{Annealing} [°C]
<i>cFos</i>	TGGTGAAGACCGTGTGTCAGGAG	TGATCTGTCTCCGCTTGGAGTG	60
<i>Dusp1</i>	GGAGGACAACCAGGCAGAC	AGGTAAGCAAGGCAGATGGTGG	60
<i>Egr1</i>	TTCAACCCTCAGGCGGACAC	GTCTCCACCAGCACCTTCTCGT	60
<i>HPRT</i>	GCAGTCCCAGGGTGCCTG	GGCCTCCCATCTCCTTCAT	60
<i>Ywhaz</i>	AGGTTGCCGCTGGTGATGAC	GGCCAGACCCAGTCTGATAGGA	60
<i>Rpl13a</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	60
<i>EGF</i>	GCAGCTTCAGGACCACAACCA	AAACCATTCCCATCTGCTGGCT	60
<i>HB-EGF</i>	GTCTGTCTGCTGGTCATCGTGG	CCCAGCCGATTCCCTTGAGCA	60
<i>BTC</i>	GCGGAAAGGCCACTTCTCTAGG	TCATCACAGACACAGGAGGGCG	60
<i>EREG</i>	GGTTTCCATCTTCTACAGGCA	TGTCTTCTGTCTGAACTAAAGCTG	60
<i>AREG</i>	GATACTCGGCTCAGGCCATTATGC	TCAAATCCATCAGCACTGTGGTCC	60
<i>TGF-α</i>	GCTGATACACTGCTGCCAGGTC	AGCAAGCGGTTCTTCCCTCAG	60
<i>EPGN</i>	ACTCCAGAGGCTGACACAGGAC	GGAGTTTCGCTCTTGTACCCCA	60
<i>ADAM17</i>	TCGAGGGTGGATGAAGGAGAAGAG	GGACTGTTCTGTCACTGCACTG	62
<i>ADAM10</i>	TCCACAGCCCATTGAGCAA	GCGTCTCATGTGTCCCATTTG	60
<i>ADAM8</i>	CACCAAAGCAGGTCATCAAGCCA	GCAACCTTTGGGCCAACAGCAC	62
<i>MMP-1</i>	CTGCCAAATGGGCTTGAAGCTGC	AGTTCTAGGGAAGCCAAAGGAGCT	62
<i>MMP-2</i>	CCTGACATTGACCTTGGCACCG	GTCCGCCAAATGAACCGGTCTT	62
<i>MMP-3</i>	ATTCAGTCCCTCTATGGACCTCCC	ACAGCATCAAAGGACAAAGCAGGA	58
<i>MMP-7</i>	TGGGAACAGGCTCAGGACTATCTC	TGACGCGGGAGTTTAACATTCCAG	62
<i>MMP-9</i>	TTCTTCTCTGGGCGCCAGGT	CCGCTGAACAGCAGCATCTTCC	58

2.5.2 DNA-Konstrukte und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide bzw. DNA-Konstrukte sind in Tabelle 8 aufgelistet. Für die Generierung der Flag-getaggten Arf6-Konstrukte wurde eine Subklonierung des Arf6-Inserts in einen Flag-tag-enthaltenen pcDNA3.1-Vektor vorgenommen.

Tab. 9: Die verwendeten Plasmide und Konstrukte, sowie deren Referenzen.

Konstrukt	Vektor	Insert / Tag	Resistenz	Referenz
pcDNA3.1 (Leervektor)	pcDNA3.1	-	Amp/Neo	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Arf6 WT-HA-pcDNA3.1	pcDNA3.1	Human ARF6-WT / HA	Amp/Neo	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Arf6 Q67L-HA-pcDNA3	pcDNA3.1	Human ARF6-CA / HA	Amp/Neo	Furmann <i>et al.</i> , 2002
Arf6 WT-Flag-pcDNA3	pcDNA3.1	Human ARF6-WT / Flag	Amp/Neo	AG Tikkanen
Arf6 Q67L-Flag-pcDNA3	pcDNA3.1	Human ARF6-CA / Flag	Amp/Neo	AG Tikkanen
Arf6 T27N-Flag-pcDNA3	pcDNA3.1	Human ARF6-DN / Flag	Amp/Neo	AG Tikkanen
BACE1-myc	pcDNA3.1	Human BACE1, full length	Amp/Neo	Tesco <i>et al.</i> ; 2007
GST	pGEX4T-1	Human GST	Amp	GE Healthcare, München (DE)
GGA3 _{VHS-GAT} -GST	pGEX4T-1	Human GGA3, nur VHS and GAT-Domäne	Amp	Dell' Angelica <i>et al.</i> , 2000

Abkürzungen: HA, Hämagglutinin; CA, konstitutiv aktiv; DN, dominant negativ

2.5.3 siRNA-Sequenzen

Die für die Depletion von Flotillin-1 und Flotillin-2 verwendeten siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Die verwendeten siRNAs mit den jeweiligen Sequenzen.

Name	Gen	Sequenz (5' zu 3')
F1-siRNAa	Flotillin-1 Gen- ID: 10211	UAAUUAGUUGGGACUACUCUGCCUC GAGGCAGAGAAGUCCCAACUAAUUA
F1-siRNAb	Flotillin-1 Gen- ID: 10211	UUUCCUGCUUGGCUUUAGCUUCCCG CGGGAAGCUAAAGCCAAGCAGGAAA
F2-siRNAa	Flotillin-2 Gen-ID:2319	ACACCCGUCACAGUUAAGCUACCC GGGUAGCUUUAACUGUGACGGGUGU
F2-siRNAb	Flotillin-2 Gen-ID: 2319	UUCACAUCCAGCAUCUCCUUCUUGC GCAAGAAGGAGAUGCUGGAUGUGAA
Kontroll-siRNA (<i>non-silencing control</i>)	-	Sequenz mit einem mittlerem GC-Gehalt ohne signifikante Homologie zu bekannten murinen und humanen Gensequenzen

2.6 Bakterien-Stämme

Die verwendeten Bakterien-Stämme sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Kultivierung der Bakterien-Stämme erfolgt in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten bei 37°C.

Tab. 11: Die verwendeten Bakterien-Stämme, deren Verwendung und Referenz.

Bezeichnung	Organismus	Verwendung	Referenz
XL-1 Blue	<i>E. coli</i>	Plasmid-Amplifikation	Stratagene, La Jolla, CA
Rosetta (DE3)pLysS	<i>E. coli</i>	Synthese rekombinanter Proteine	Novagen, Darmstadt (DE)

2.7 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung

Die humanen Zelllinien, die für die experimentelle Durchführung dieser Arbeit und deren Kultivierung, Wachstumseigenschaften und Referenzen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 12: Die verwendeten humanen Zelllinien und deren Kultivierung.

Bezeichnung	Beschreibung	Wachstum	Kultivierung	Referenz
HeLa	human Cervix-Adenokarcinoma-Zellen	adhärent	DMEM +10% FCS + 1% Pen/Strep S, 8% CO2	ATCC, Rockville, MD (USA)
HaCaT	humane immortalisierte Keratinozyten	adhärent	DMEM +10% FCS + 1% Pen/Strep, 1% NEAA, 1% Natrium Pyruvat, 8% CO2	¹⁹⁶ Boukamp <i>et al.</i> 1988

Abkürzungen: FCS, Fötales Kälberserum; Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin; NEAA, nicht-essentielle Aminosäuren

Für die Generierung von stabilen Flotillin-Knockdown-Zellen wurde das *Mission Lentiviral shRNA* System (Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE) mit shRNAs mit Sequenzen gerichtet gegen humane Flotillin-1 bzw. -2 Gene verwendet. Dieses lentivirale System wurde ebenfalls in früheren Studie zur Herstellung von stabilen Flotillin-depletierten HeLa-, MCF7- und MCF10A-Zellen genutzt ^{197,198}.

2.8 Antibiotika

Die in der Arbeit verwendeten Antibiotika mit Herstellerfirma und Firmensitz, sowie die jeweiligen Arbeits-/Endkonzentrationen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 13: Liste der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	250 µg/ml	Roth, Karlsruhe (DE)
Kanamycin	50 µg/ml	Roth, Karlsruhe (DE)
G418	500 mg/ml	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Penicillin/ Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Pyromycin	2 µg/ml	Life Technologies, Darmstadt (DE)

2.9 Stimulationsfaktoren und Inhibitoren

Die verwendeten Stimulationsfaktoren und Inhibitoren mit ihren jeweiligen Funktionen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 14: Die verwendeten Stimulationsfaktoren und Inhibitoren mit den eingesetzten Konzentrationen und dem Hersteller.

Bezeichnung	Funktion	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
CCh	Carbachol; Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin	1 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	10 ng/µl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
AG9	Inaktives Analogon, welches als Negativ-Kontrolle für die EGFR-Inhibition dient	1 µM	Calbiochem, Nottingham (UK)
PD 153035	Spezifischer (EGFR)-Tyrosinkinase-Inhibitor	1 µM	Calbiochem, Nottingham (UK)
U0126	MEK 1/2-Inhibitor	10 µM	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)
Atropin	Kompetitiver mAChR-Inhibitor, Anticholinergikum	25 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)

Abkürzungen: CCh, Carbachol; EGF, Epidermal Growth Factor

2.10 Software

Die verwendeten Computerprogramme, die für die Erstellung der Thesis benötigt wurden, sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tab. 15: Die verwendeten Computerprogramme, sowie deren Verwendung und Herstellerfirma.

Programm	Verwendung	Herstellerfirma
CorelDRAWX4 EXTENDED	Erstellung der Immunfluoreszenz-Bilder und der Western-Blot-Abbildungen	Corel Deutschland GmbH, Unterschleißheim (DE)
GraphPad Prism 5	Statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc, San Diego, CA (USA)
Quantity One ® 4.5.1	Densitometrische Auswertung der Western Blots	Bio-Rad Laboratories, CA (USA)
Zen 2009 Light Edition	Bearbeitung der Immunfluoreszenz-Bilder	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München (DE)
PerlPrimer for Microsoft Windows	Primer-Design	199

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung humaner Cervix-Adenokarzinoma (HeLa)- Zellen und humaner Keratinozyten (HaCaT) erfolgt in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem hohen Glucose-Anteil (4,5 g/l) bei 37°C, 8% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Zur Kultivierung beider Zelllinien werden zum Medium zusätzlich 10% Fötales Kälber-Serum (FCS) und 100 units/ml Penicillin, sowie 100 µg/ml Streptomycin hinzugegeben. Dem Kulturmedium für HaCaT-Zellen werden zusätzlich 1% Natrium-Pyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren hinzugefügt. Die Kultivierung stabiler Flotillin-Knockdown-Zellen erfolgt im Selektionsmedium, wobei dem jeweiligen Kulturmedium zusätzlich 2 µg/ml Puromycin hinzugegeben werden (Tab.11).

3.1.2 Stimulierung und Inhibierung der Signaltransduktion

Für die Stimulierung und Inhibierung von Signaltransduktionswegen werden HaCaT-Zellen verwendet, die eine Konfluenz von 80-100% aufweisen. Für die Stimulierung mit

Wachstumsfaktoren werden die Zellen unter Serum-freien Bedingungen für 18 Stunden vor der Behandlung inkubiert, um eine effektive Akkumulation von inaktiven Wachstumsfaktor-Rezeptoren an der Plasmamembran zu erreichen. Die Stimulierung erfolgt mit 10 ng/ μ l Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und 1 mM Carbachol (CCh) in der jeweilig angegebenen Stimulationsdauer bei 37°C in Serum-freiem Medium. Kontroll-Zellen werden in Serum-freiem Medium ohne Stimulanzen inkubiert. Für die Inhibierung von mAChR werden HaCaT-Zellen 30 Minuten vor der CCh-Stimulierung mit 25 μ M Atropin prä-inkubiert. Der EGFR-Kinase Inhibitor PD 153035 und das inaktive Analogon AG9 werden in einer Arbeitskonzentration von 1 μ M mit einer Prä-Inkubationsdauer von 5 Minuten verwendet. Zur Inhibierung von MEK 1/2 erfolgt eine Vorinkubation von 2 Stunden mit U0126 in einer Konzentration von 10 μ M.

3.1.3 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmiden werden Zellen verwendet, die auf 6 cm-Platten bis zu einer Konfluenz von ~80% gewachsen sind. Die transiente Transfektion von Plasmid-DNA erfolgt mittels Lipofectamin 2000 oder MACSfectin in Serum-freiem Medium. Dafür werden nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers 4 μ l Lipofectamin 2000 und 2 μ l MACSfectin für die Transfektion von 1 μ g DNA verwendet. Unter Verwendung von Lipofectamin 2000 wird nach einer vier- bis sechsstündige Inkubation bei 37°C ein Medium-Wechsel vorgenommen und die Zellen über Nacht in Serum-haltigen Medium inkubiert. Alternativ werden 0,5 μ g Plasmid-DNA in Zellen auf Deckgläschen in einer 12-*well*-Platten transfiziert.

3.1.4 Transienter siRNA-Knockdown

Der gezielte Knockdown von bestimmten Genen (Tab. 10) erfolgt mit Hilfe der RNA-Interferenz Methode mittels synthetisch modifizierter siRNA Oligonukleotid-Duplikate. Die transiente Transfektion von siRNA erfolgt nach oben beschrieben Methode (3.1.3), wobei Zellen mit einer Konfluenz von ~80% mit 20 nM siRNA in Serum-freiem Medium (OptiMEM oder DMEM ohne Zusätze) transfiziert werden. Als Kontrolle dient eine siRNA mit einem mittleren GC-Gehalt. Eine optimale Knockdown-Effizienz ist 48 Stunden nach der Transfektion erreicht.

3.1.5 Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläschen im 12-*well* gewachsenen Zellen, entweder Wachstumsfaktor-stimuliert oder unter regulären Wachstumsbedingungen (*steady state*), werden mit kaltem Methanol für 10 Minuten bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Die fixierten Zellen werden mit PBS gewaschen, mittels 1% BSA in PBS 10 Minuten geblockt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 25 μ l

in 1% BSA/PBS verdünntem Primärantikörper inkubiert (Tabelle 4). Desweiteren werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern, die ebenfalls in der entsprechenden Blocklösung angesetzt wurden, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung des Zellkerns wird 1µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (Tabelle 6), welcher mit der nucleären und doppelsträngiger DNA interagiert, verwendet. Nach drei Waschschritten in PBS werden die Deckgläschen kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit 50 mg/ml DABCO-versetzten Gelmount auf Objektträger eingebettet. Die Aufnahmen und Analyse erfolgen mit dem Zeiss LSM710 konfokalem Laserscanning Mikroskop (Tabelle 1) und der *Zen 2009 Light Edition* Software (Tabelle 4).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolation aus HaCaT-Zellen findet mittels des *Nucleospin® RNA II* Isolation-Kits (Macherey-Nagel, Düren, DE) oder nach der *peqGOLD TriFast™FL*-Methode (peqlab, VWR International GmbH, Erlangen, DE) nach Herstelleranweisung statt. Desweiteren erfolgt ein DNA-Eliminierungsschritt, in dem die DNA mittels der DNase I (10 U, NEB, Frankfurt, DE) verdaut wird. Für die cDNA-Synthese werden 3 µg RNA eingesetzt und nach Zugabe von 25 µM Oligo(dT)-Primer, 30 µM *random Hexamer*-Oligonukleotide und der *M-MuLV* Reverse Transcriptase (NEB, Frankfurt, DE) vier Minuten bei 72°C vorinkubiert und anschließend 2 Stunden auf 37°C abgekühlt, sowie 10 Minuten auf 94°C erhitzt.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion, Restriktion und Ligation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird unter Verwendung der in Tabelle 7 aufgelisteten Primerpaare und des *One Taq* DNA Polymerase-Systems (NEB, Frankfurt a.M., DE) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Template	10 ng
Primer forward (100 µM)	0,5 µl
Primer reverse (100 µM)	0,5 µl
dNTP-Mix (10nM)	1 µl
5x <i>One Taq Standard Reaction Buffer</i>	10 µl
<i>One Taq</i> DNA Polymerase	0,25 µl
dd H ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Temperatur	Dauer	
94°C	30 sek	30x
94°C	15 sek	
T _m -4°C	30 sek	
72°C	30 sek – 3 min (1 min/kb)	
68°C	5 min	

Die PCR-Produkte werden mittels eines 1%igen Agarosegels mit 10 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (Tabelle 3) visualisiert und analysiert. Unter Verwendung des *Pure PCR Purification* Kit (Roche, Mannheim, DE) werden die PCR-Produkte aufgereinigt und nachfolgend einem Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen der Firma *New England Biolabs* (NEB) nach dem Herstellerprotokoll unterzogen. Die Desphosphorylierung des Vektors wird mittels der *Shrimp alkaline* Phosphatase (Roche, Mannheim, DE) ausgeführt. Anschließend erfolgt die Ligation des Vektors mit dem Insert mittels der *T4-DNA-Ligase* (1 U/Reaktion, Roche, Mannheim, DE). Die Sequenz des so generierten Konstrukts wird über die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, DE) sequenziert.

3.2.3 Quantitative Real-time- qPCR

Die quantitative *Real-time* PCR wird mit 0,8 µl 5-fach verdünnter cDNA in einem 9 µl *iTaq™ Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, München, DE) mittels des BioRad CFX Connect™ *Real-Time* Systems durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primer-Paare liegen zwischen 58°C und 62°C (Tabelle 7). Das Primer-Design erfolgte spezifisch für Ziel-cDNA-Sequenz mit Hilfe des *PerlPrimer*-Programms¹⁹⁹. Die qPCR-Produkte werden nach der Δ Ct-Methode quantifiziert und analysiert, wobei das geometrische Mittel der 3 Referenzgene *Rpl13a*, *HPRT* and *Ywhaz* für die Normalisierung verwendet werden²⁰⁰.

3.2.4 Transformation, Plasmid-DNA-Amplifikation und Aufreinigung

Die Plasmid-DNA wird über einen Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden in den kompetenten *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Die transformierten Bakterien werden über Nacht bei 37°C auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum (Tabelle 12) selektiert. Am darauffolgenden Tag werden 50 ml Antibiotika-enthaltendes LB-Medium mit Einzelkolonien der LB-Agar-Platten inokuliert und erneut bei 37°C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt mittels des *GenElute Plasmid Mini Kits* (Sigma-

Aldrich, Taufkirchen, DE) oder des *NucleoBond Xtra Midi EF* Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE) nach dem Herstellerprotokoll.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Synthese und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Synthese eines rekombinanten Proteins wird der *E. coli*-Stamm *Rossetta* mit einer bestimmten Plasmid-DNA (Tabelle 8) transformiert und in einem Antibiotika-haltigen LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 im Schüttler inkubiert. Die Proteinsynthese wird durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, wobei die Inkubation 6 Stunden im Schüttler bei 37°C erfolgt. Nach der Induktion wird das Bakterienpellet mit PBS gewaschen und mittels GST-Lysepuffer, dem zusätzlich 100 µg/ml Lysozym, 1,5 µM Aprotinin, 23 µM Leupeptin, 1,5 µM Pepstatin A, 1 mM PMSF und 1 mM DTT frisch zugegeben wurden, lysiert. Die Lysate werden gleichzeitig zweimal 30 Sekunden (Amplitude 95%) sonifiziert. Die rekombinanten Proteine werden über Nacht bei 4°C auf dem Rotator an Glutathion-Sepharose Beads gebunden und somit immobilisiert. Für die Visualisierung der Expressions-Induktion wird eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau und anschließende Behandlung mit einer Coomassie-Entfärberlösung (Tabelle 3) durchgeführt.

3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Zelllinien für die Proteinanalytik

Nach einem Wachsritt mit PBS werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturgefäß gelöst. Das Zellpellet wird in Stürmer-Lysepuffer, versetzt mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Tabelle 3), resuspendiert und auf Eis für 30 Minuten lysiert. Lösliche Proteine werden durch Zentrifugation bei 15.000 rpm für 10 Minuten von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mittels der *BioRad Bradford*-Reagenz nach dem Herstellerprotokoll. Für die folgende Proteinanalyse wird eine äquivalente Proteinmenge in 4x SDS-Ladepuffer (Tabelle 3) bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht und anschließend eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und ein Western Blot durchgeführt.

3.3.3 Co-Immunopräzipitation

Für die Durchführung einer Co-Immunopräzipitation werden die Zellen in CO-IP-Puffer (Tabelle 3), versetzt mit einem Protease Inhibitor-Cocktail und 60 mM NOG (Tabelle 2), lysiert. Abschließend werden die Lysate zweimal mittels 50 µl Pansorbin-Zellen (fixierte *Staphylococcus aureus*) für 15 Minuten vorgereinigt. Zu dem vorgereinigten Lysat werden Antikörper-gekoppelte Dynabeads A zugegeben und rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Dynabeads dreimal in COIP-Puffer gewaschen, bei 95°C 5 Minuten in 2x SDS-Ladepuffer aufgeköcht und über eine SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Input-Kontrolle dient 10% des Lysats, welches in 4x SDS-Ladepuffer aufgenommen und aufgeköcht wurde.

3.3.4 GST-Pulldown-Assay

Mit Hilfe des GST-Pulldown *in vitro*-Assays können Proteininteraktion identifiziert und verifiziert werden. Dazu werden die Zellen in COIP-Puffer lysiert und die Lysate mit 10 µg eines aufgereinigten GST-getaggtten Proteins (Abschnitt 3.3.1) oder eines GST-Proteins, die vorher an Glutathion Sepharose-Beads gekoppelt wurde, über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend werden die Beads dreimal in COIP-Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 2 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert. Die Beads werden in 2x SDS-Ladepuffer aufgeköcht und proteinbiochemisch analysiert. In diesem Versuchsteil wird der GST-Pulldown für den Aktivitätsnachweis von Arf6-WT in Flotillin-depletierten HeLa-Zellen verwendet. Für dieses Aktivitäts-Assay wird eine trunkierte GST-gekoppelte Variante des GGA3-Proteins (GGA3_{VHS-GAT}-GST, Tabelle 8) verwendet, welches nur die VHS- und GAT-Domäne des Proteins umfasst und voran Arf6-WT im aktiven Zustand binden kann. Dabei korreliert der Aktivitätszustand von Arf6-WT direkt mit Menge des an GGA3_{VHS-GAT}-GST gebundenen Arf6, welches immunologisch mittels SDS-PAGE und Western-Blot nachgewiesen werden kann.

3.3.5 SDS-PAGE-Gelektrophorese und Western Blot

Für die immunbiochemische Analyse werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts in einer 10-12%-igen SDS-PAGE in einer Gelektrophorese-Kammer bei 25 mA aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm anhand der *BioRad* Blot-Kammer bei 400 mA transferiert. Als Kontrolle für die Qualität des Transfers und als Ladekontrolle dient die anschließende Membran-Färbung mit einer Ponceau S -Lösung (Tabelle 3). Nach Entfärbung der Membran in TBST werden unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5% Magermilch in TBST für 45 Minuten geblockt. Anschließend werden die Membranen mit einer Primärantikörper-Lösung (Tabelle 4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Ladekontrolle für eine äquivalent-geladene Proteinmenge und als Reinheitskontrolle von Pulldown- und Immunpräzipitationsproben dient die Detektion von GAPDH. Am darauffolgenden Tag werden die Membranen dreimal in TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen, bevor die 60-minütige Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgt (Tabelle 5). Nachdem die Membran erneut dreimal in TBST gewaschen wurde, wird die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers mittels der *ECL*

Western blotting detection-Reagenz vorgenommen. Für eine erneute Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper wird die Membran vorher 20 Minuten mit einer sauren und alkalischen Stripp-Lösung, sowie nachfolgend mit einem Blockpuffer behandelt (Tabelle 3).

3.4 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung

Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die densitometrische Analyse der mittels Western Blot visualisierten Proteinfragmente wird über die *Quantity One* Software durchgeführt. Alle Aufnahmen, die über das konfokale Laserscanning Mikroskop aufgenommen wurden, werden exportiert und mit der *ZEN* Software analysiert. Im Folgenden werden die Aufnahmen mittels *CorelDRAW X4* für weitere Verwendungen dargestellt. Für die statistischen Analysen wird die *GraphPad Prism 5* Software genutzt, wobei *One-way*- und *Two-way*-Varianzanalysen (ANOVA), sowie der Bonferroni-Vergleichstest für die Auswertung angewendet wird. Die Daten sind in Form des Mittelwerts \pm Standardabweichung gezeigt. Die so erhaltenen Signifikanzen sind im Vergleich zu einer festgelegten Kontrolle angeben, wobei Werte mit $p < 0.05$ als signifikant (* oder #), mit $p < 0.01$ als sehr signifikant (** oder # #) und mit $p < 0.001$ als hoch-signifikant (***) oder # # #) angezeigt werden. Die vorhergehend beschriebene Software, die für die Ergebnisanalyse dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Tabelle 14 zusammengefasst.

4. Ergebnisse

4.1 Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten

Nach einem cholinergen Stimulus können verschiedene Signaltransduktionswege abhängig vom Aktivierungsmechanismus und des Zelltyps an der Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion beteiligt sein (Abb.1.1). Einer dieser Mechanismen, die zur Aktivierung der MAPK-Signalkaskade nach Stimulation eines mAChR führt, ist die Transaktivierung des EGFR. Diese Transaktivierung wird durch die MMP/ADAM-vermittelte proteolytische Freisetzung von EGF-ähnlichen Liganden nach einem cholinergen Stimulus induziert. Obwohl der EGFR-Transaktivierungsmechanismus für die cholinerge MAPK-Aktivierung und Regulation der cholinergen Signaltransduktion in HaCaT-Keratinocyten eine bedeutende Rolle spielt¹⁰⁶, ist wenig über die transkriptionelle Regulation, die durch die EGFR-Transaktivierung vermittelt wird, bekannt. Dementsprechend lag ein besonderer Fokus dieser Studie auf der MAPK-induzierten Transkription von Genen, deren Genprodukte an der EGFR-Transaktivierung involviert sind, sowie von MAPK-Zielgenen nach cholinenger Stimulation in HaCaT-Keratinocyten. Für die Untersuchung des transkriptionellen Effekts, der durch den MAPK-Signalweg vermittelt wird, wurden die Transkriptmengen von EGFR-nachgeschalteten Genen, sowie EGF-ähnlichen Liganden und Metalloproteasen anhand der RT-qPCR bestimmt.

4.1.1 Transkriptionelle Regulation von EGFR-Zielgenen nach CCh- und EGF-Stimulation

Anhand vorheriger Studien an HaCaT-Keratinocyten ist bekannt, dass die cholinerge Stimulierung von mAChRs die Transaktivierung des EGFR und infolgedessen die Aktivierung der MAPK-Kaskade bewirkt. Dementsprechend ist die Aktivierung der MAP-Kinase ERK nach cholinenger Stimulation in HaCaT-Zellen grundlegend abhängig von der EGFR-Aktivierung¹⁰⁶. Die cholinerge Aktivierung von ERK wiederum resultiert in einer veränderten transkriptionellen Regulation von MAPK-Zielgenen. Für die Untersuchung der durch cholinerge ERK-Aktivierung vermittelten transkriptionellen Antwort wurden HaCaT-Zellen zwei bzw. vier Stunden mit CCh stimuliert und mittels der Western Blot-Methode, sowie quantitativen RT-PCR analysiert. In einem Kontrollexperiment erfolgte eine Stimulierung mit EGF mit gleicher Inkubationsdauer, um den transkriptionellen Effekt, der durch cholinerge Stimulation vermittelt wird, mit der direkten Aktivierung von EGFR bzw. ERK durch EGF vergleichen zu können. Die Aktivierung von ERK, die nach EGF bzw. CCh-Stimulation auf Proteinebene anhand der Phosphorylierung gezeigt werden konnte, bewirkt eine signifikante Induktion des Egr1, die

sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.1 A und B). Allerdings ist die Egr1-Induktion im Vergleich zur direkten EGF-Stimulierung auf Proteinebene schwächer und scheint eine geringere Induktionsdauer zu haben (Abb. 4.1 A). Die Induktion bzw. Aktivierung des Egr1 wiederum bewirkt eine erhöhte Transkription von weiteren MAPK-Zielgenen, die beispielsweise für Dusp1 und cFos kodieren. Die cFos- und Dusp1-Induktion konnte nach 2-stündiger Stimulierung mit CCh und EGF mit Hilfe quantitativer RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich nach 4-stündiger CCh- bzw. EGF-Stimulierung in beiden Fällen ein Abfall der Transkriptmenge (Abb. 4.1 C und D).

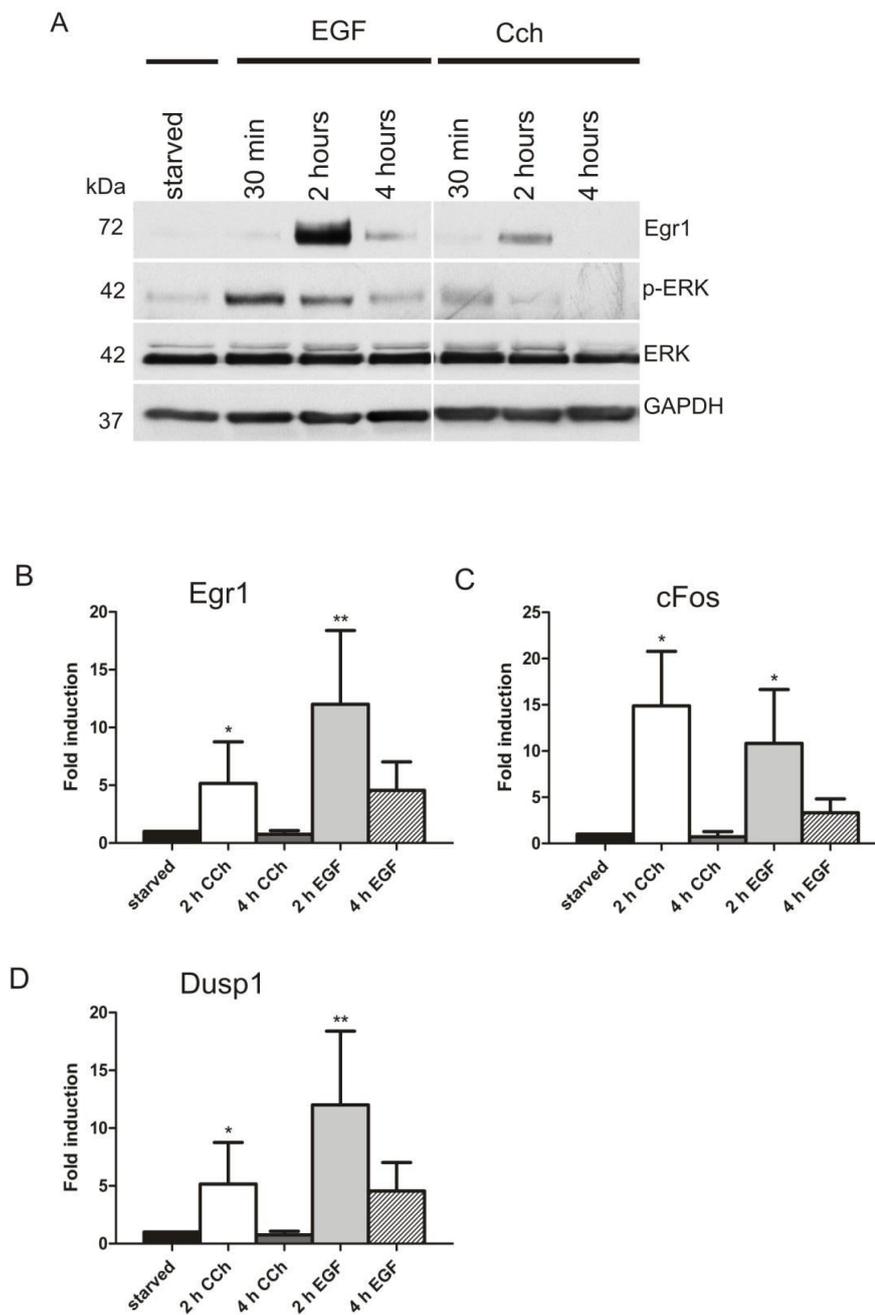


Abb. 4.1: Cholinerge Induktion von MAPK-Zielgenen. Die Induktion der Expression nach 30 Minuten bis zu 4 Stunden wurde auf Proteinebene mittels Western Blot für Egr1 (A) und auf mRNA-Ebene anhand der quantitativen RT-PCR-Analyse für Egr1 (B), cFos (C) und Dusp1 (D) bestimmt. (A) zeigt einen repräsentativen Western Blot der cholinergen bzw. EGF-vermittelten Induktion von Egr1 von drei unabhängigen Experimenten. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung der quantitativen RT-PCR-Werte erfolgte mittels der *One-way*-Varianzanalyse (ANOVA) im Vergleich zu nicht-stimulierten Bedingungen (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4.1.2 Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von EGFR- nachgeschalteten Genen

Nachfolgend wurde untersucht, ob die cholinerge Induktion der Transkription von ERK-nachgeschalteten Genen von der mAChR-vermittelten Transaktivierung des EGFR abhängig ist oder ein anderer intrazellulärer Signalweg parallel zur Aktivierung von EGFRs oder der MAPK-Kaskade involviert ist. Hierfür wurden HaCaT-Zellen vor der Stimulierung mit CCh mit spezifischen Inhibitoren vorbehandelt, wobei die Inhibierung von mAChRs durch Atropin erfolgte. Zudem wurde die EGFR-Kinase-Aktivität mittels PD 153035 gehemmt und die MEK1/2-Kinase durch U0126 spezifisch inhibiert. Die Analyse der quantitativen RT-PCR ergab, dass die cholinerge Induktion von Egr1 nach Inhibierung von mAChRs und des EGFR signifikant gehemmt wurde (Abb. 4.2 A und B) und demzufolge von der EGFR-Transaktivierung vermittelt wird. Zusätzlich wird die cholinerge Hochregulation der Egr1-Transkriptmenge durch MAPK-vermittelte Signalwege induziert, was erwartungsgemäß für ein MAPK-reguliertes Protein anhand einer signifikanten Hemmung der cholinergen Induktion durch den spezifischen MEK1/2-Inhibitor gezeigt wurde (Abb. 4.2 C). Durch Inhibierung von mAChRs und der MEK1/2 konnte die cholinerge Induktion von cFos signifikant reduziert werden (Abb. 4.2 D und F), wohingegen die EGFR-Hemmung keinen Effekt auf die cFos-Induktion hat (Abb. 4.2 E). Dies lässt auf eine Abhängigkeit der cFos-Induktion von der Aktivierung mAChRs und des MAPK-Signalwegs nach cholinenger Stimulation schließen, die jedoch nicht durch eine EGFR-Aktivierung vermittelt wird. Zudem ist das basale Transkriptionslevel durch die Inhibierung der MEK1/2 signifikant herabgesetzt (Abb. 4.2 F), was auf eine transkriptionelle Regulation durch MEK-Kinasen auch unabhängig von cholinergen Stimuli hinweist. Zudem konnte eine signifikante Inhibierung der Induktion von Dusp1 nach Vorbehandlung mit Atropin gezeigt werden (Abb. 4.2 G), nicht aber nach Inhibierung von EGFR oder MEK1/2 (Abb. 4.2 H und I). Demzufolge wird die Dusp1-Induktion durch cholinerge Stimulation des mAChR vermittelt, wobei diese unabhängig von EGFR-Aktivität und der MAPK-Aktivierung ist.

Ergebnisse

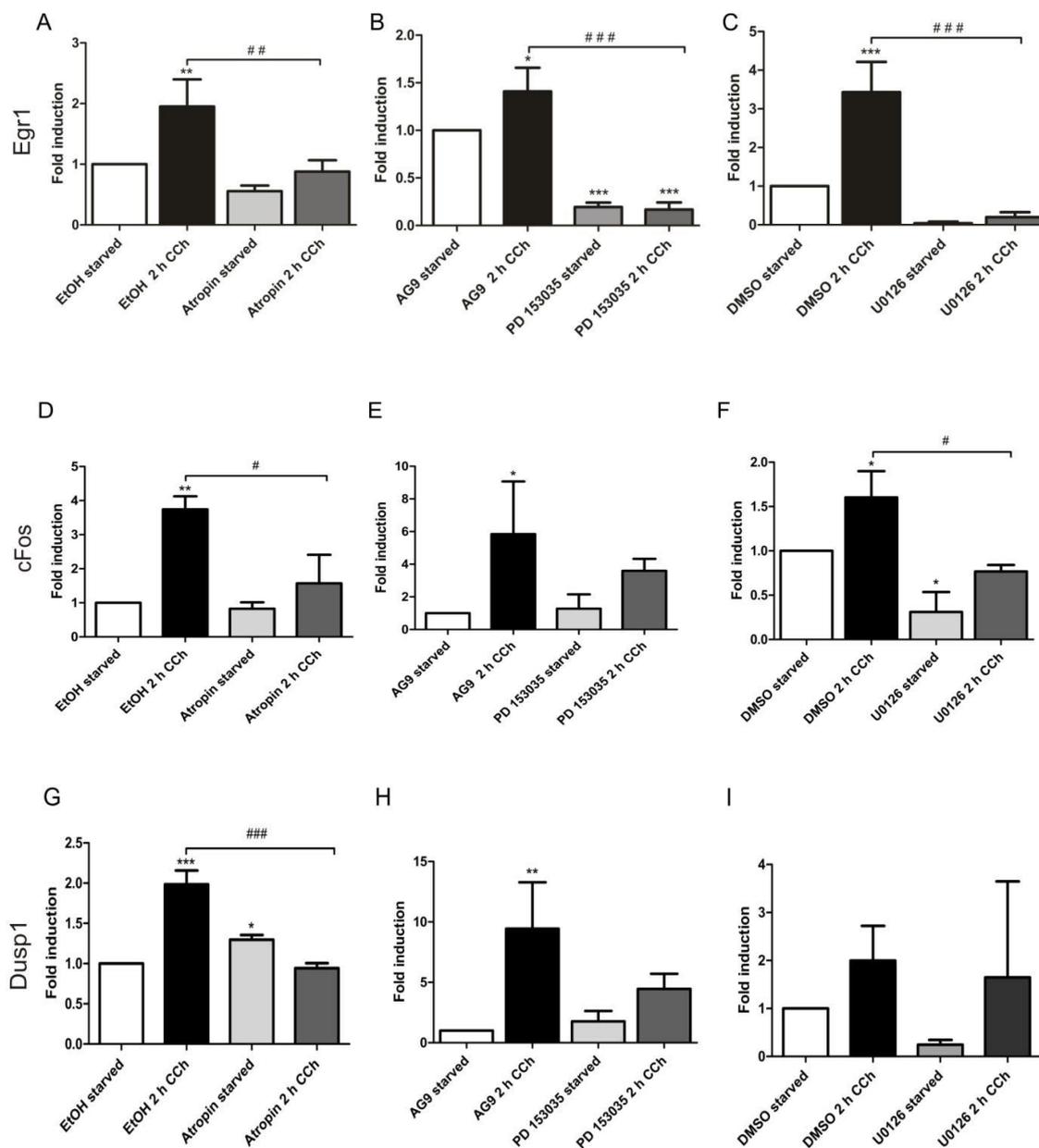


Abb. 4.2: Inhibition der cholinergen Induktion von MAPK-Zielgenen durch Hemmung der mAChRs, des EGFR und MAPK-Signalwegs. Die graphische Darstellung der quantitativen RT-PCR-Analyse zeigt die relative Expression von Egr1 (A-C), cFos (D-F) und Dusp1 (G-I) nach 2-stündiger Stimulation mit 1 mM CCh und Vorinkubation mit den spezifischen Inhibitoren für mAChRs (A, D und G; Atropin), EGFR (B, E und H; PD 153035) oder MEK1/2 (C, F und I; U0126). Die Expression der spezifischen Gene wurde auf die Transkriptmenge der *Ywhaz*, *HPRT* und *Rp113a* Referenzgene normalisiert. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *One-way*- und *Two-way*-Varianzanalysen (ANOVA) *versus* nicht-stimulierter Kontrolle (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) bzw. *versus* CCh-stimulierter Probe ohne Inhibitor (#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$).

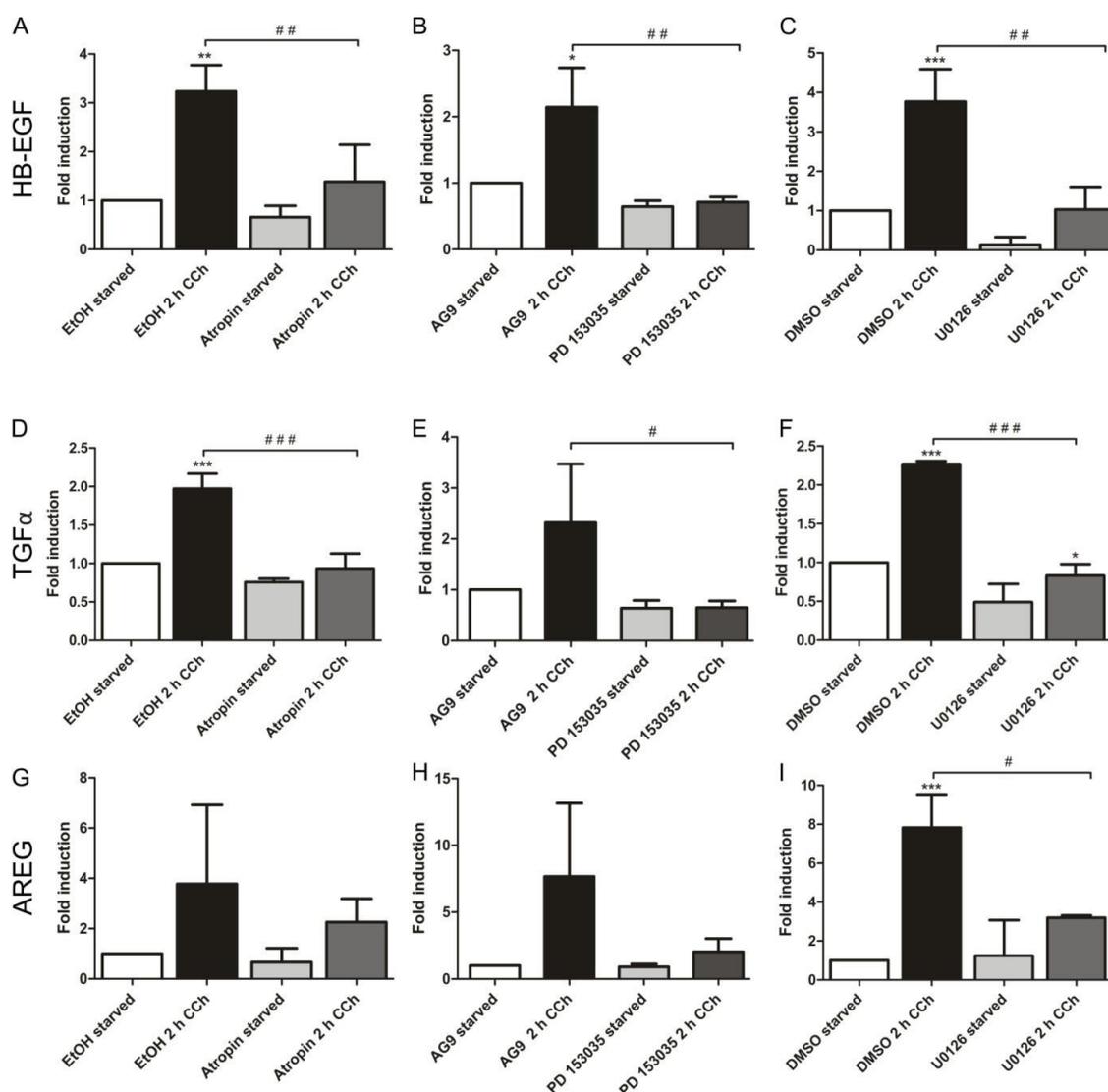
4.1.3 Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von Liganden der EGF-Familie in HaCaT-Keratinocyten

In HaCaT-Keratinocyten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die ERK-Aktivierung nach cholinergem Stimulus die proteolytische Freisetzung von EGFR-Liganden durch Metalloproteasen während der EGFR-Transaktivierung voraussetzt¹⁰⁶. Anhand der quantitativen RT-PCR wurde hier analysiert, wie die Expression von ausgewählten Genen kodierend für EGF-ähnliche Liganden und MMPs/ADAMs nach cholinergem Stimulus von HaCaT-Zellen beeinflusst wird. Laut Literatur sind jedoch nur einige EGFR-Liganden (TGF- α , HB-EGF, AREG und möglicherweise EREG) an der Transaktivierung in HaCaT-Zellen involviert²⁰¹⁻²⁰⁴. Aus früheren Studien geht hervor, dass HB-EGF und TGF- α die bedeutendsten Liganden sind, welche die EGFR-Transaktivierung nach Stimulierung eines GPCR vermitteln²⁰⁵, aber auch AREG scheint in einigen Fällen in diesen Mechanismus involviert zu sein^{206,207}. Ferner ist bekannt, dass die Liganden TGF- α , HB-EGF^{208,209}, sowie AREG, EREG^{210,211} und EPGN²⁰³ in epidermalen Keratinocyten exprimiert werden. Nach vorhergehendem Primer-Design und -Optimierung konnte die Expression von TGF- α , HB-EGF, AREG, EREG und EPGN in HaCaT-Keratinocyten bestätigt und die Expression weiterer Liganden der EGF-Familie inklusive EGF und BTC nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Expression dieser EGF-ähnlichen Liganden durch einen cholinergen Stimulus beeinflusst wird. Dementsprechend wurde die Transkription von TGF- α , HB-EGF, AREG und EREG nach 2-stündiger Stimulierung mit CCh untersucht. Die EGF-Liganden TGF- α und HB-EGF sind nach 2-stündiger CCh-Stimulierung signifikant hochreguliert (Abb. 4.3a A-F). Die Induktion des AREG-Transkripts nach cholinergem Stimulus zeigt eine hohe Variabilität zwischen den Experimenten und konnte folglich keine Signifikanz erreichen (Abb. 4.3a G-I). Die EREG-mRNA wurde ebenfalls signifikant nach CCh-Stimulierung induziert (Abb. 4.3a J-L). Allerdings konnte keine cholinerge Induktion von EGF und der EGF-ähnlichen Liganden BTC und EPGN, die ebenfalls an Signalwegen der EGFR/ErbB-Familie beteiligt sind, nach 2- und 4-stündiger CCh-Stimulierung nachgewiesen werden (Abb. 4.3b A-C).

Nach einer Vorbehandlung mit dem spezifischen Inhibitor und anschließender 2-stündiger Stimulierung mit CCh wurde die mRNA-Menge der untersuchten EGF-ähnlichen Liganden mittels quantitativer RT-PCR detektiert und analysiert. Für die EGFR-Liganden TGF- α und HB-EGF, deren Genexpression nach Stimulierung mit CCh signifikant hochreguliert ist, konnte durch die Inhibition von mAChRs, des EGFR und der MEK-Kinase eine signifikante Reduktion ihrer Transkriptmengen nach cholinergem Stimulus gezeigt werden (Abb. 4.3a A-F). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass die cholinerge Induktion dieser Liganden von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und diesem nachgeschalteten MAPK-Signalweg vermittelt

Ergebnisse

wird. Ähnliche Ergebnisse konnten für den EGFR-Liganden AREG gezeigt werden, bei dem die Induktion nach CCh-Stimulation stark variiert, aber eine klare Induktionstendenz aufweist (Abb. 4.3a I). Aufgrund der hohen Varianz in der cholinergen AREG-Induktion konnte nach der Inhibierung von mAChRs und des EGFR nur eine tendenzielle aber nicht-signifikante Reduktion der Transkriptmenge bestimmt werden (Abb. 4.3a G und H). Eine signifikante Reduktion der cholinergen Induktion konnte nach Hemmung von MEK-Kinasen nachgewiesen werden (Abb. 4.3a I). Die Induktion der EREG-Genexpression, die nach cholinenger Stimulation signifikant hochreguliert ist, konnte durch Inhibierung von mAChRs und EGFRs signifikant gehemmt werden (Abb. 4.3a J und K). Diese Induktionsinhibierung konnte jedoch nicht nach Inhibierung von MEK1/2 beobachtet werden, da die cholinerge EREG-Induktion ebenfalls nach Prä-Inkubation mit U0126 signifikant war (Abb. 4.3a L). Diese Ergebnisse zeigen, dass die EREG-Transkription durch mAChR- und EGFR-abhängige Signalwege induziert wird, die jedoch nicht von einer cholinergen Aktivierung der MAPK-Kaskade abhängig sind.



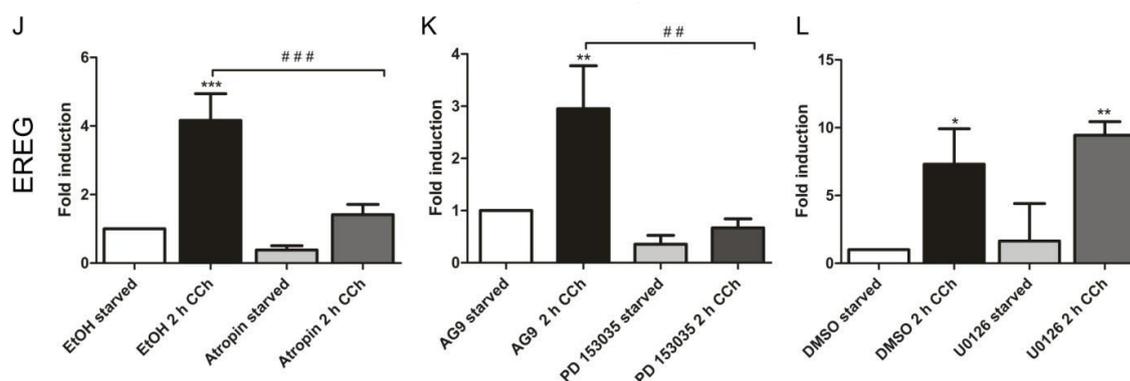


Abb. 4.3a: Inhibierung der cholinergen Induktion von Genen spezifischer EGF-ähnlicher Liganden durch Hemmung der mAChRs, des EGFR und MAPK-Signalwegs. Die Analyse der quantitativen RT-PCR zeigt die relative Expression der EGF-ähnlichen Liganden HB-EGF (A-C), TGF- α (D-F), AREG (G-I) und EREG (J-L) nach 2-stündiger Stimulierung mit 1 mM CCh und Vorbehandlung mit den spezifischen Inhibitoren für mAChRs (A, D, G und J; Atropin), des EGFR (B, E, H und K; PD 153035) oder MEK1/2 (C, F, I und L; U0126). Die Expression der spezifischen Gene wurde auf die Expression der Referenzgene *Ywhaz*, *HPRT* und *Rp113a* normalisiert. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *One-way*-Varianzanalyse (ANOVA) versus der nicht-stimulierten Kontrolle (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

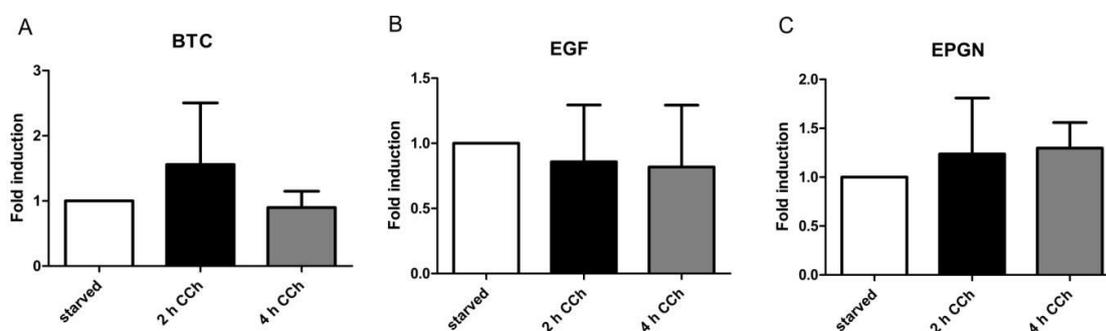


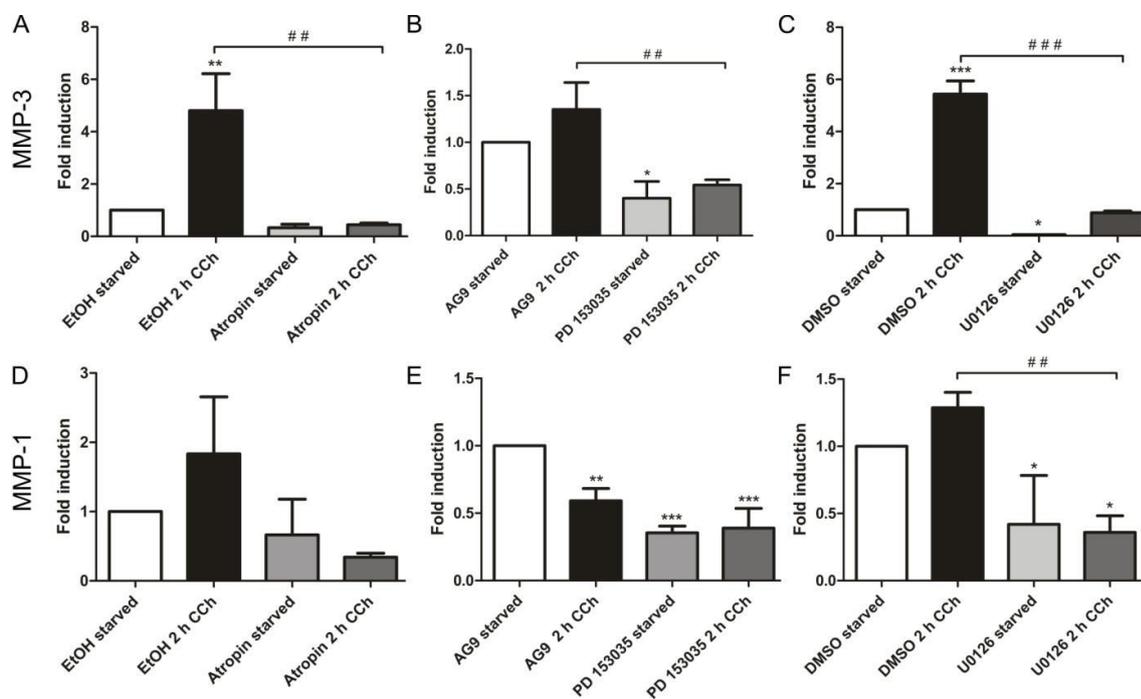
Abb. 4.3b: Cholinerge Stimulation von HaCaT-Keratinocyten zeigt keinen Effekt auf die transkriptionelle Regulation der EGFR-Liganden BTC, EGF und EPGN. Graphische Darstellung der relativen Expression der Liganden BTC (A), EGF (B) und EPGN (C) nach 2- und 4-stündiger Stimulation mit 1 mM CCh. Die Expression der spezifischen Gene wurde auf die Expression der Referenzgene *Ywhaz*, *HPRT* und *Rp113a* normalisiert. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *One-way*-Varianzanalyse (ANOVA) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle.

4.1.2.2 *Effekt der mAChR-, EGFR- und MAPK-Inhibierung auf die cholinerge Induktion von MMPs und ADAMs*

Durch frühere Studien konnte gezeigt werden, dass der Breitbandspektrum-Inhibitor Batimastat, der verschiedene MMPs und ADAMs inhibieren kann, die Ausschüttung von EGFR-Liganden während der EGFR-Transaktivierung hemmt. Dies führt wiederum zu einer kompletten Inhibierung der ERK-Aktivierung nach cholinergem Stimulation in HaCaT-Keratinocyten¹⁰⁶. Dementsprechend fokussierte sich die Expressionsanalyse der getesteten MMPs und ADAMs auf zwei Kriterien, welche die Hemmung durch Batimastat und/oder die Beteiligung an der EGFR-Liganden-Prozessierung während der EGFR-Transaktivierung voraussetzt. Der Breitbandspektrum-Inhibitor Batimastat bindet Zink-Atome innerhalb der Metalloprotease-Domäne, was eine reversible Inhibition der MMPs bewirkt²¹². Demzufolge werden für diese Studie nur die MMPs/ADAMs untersucht, die durch Batimastat gehemmt werden und somit auch katalytisch aktiv sind. Der Literatur zu Folge können die Metalloproteasen MMP-1, -2, -3, -7 und -9²¹³⁻²¹⁵, sowie ADAM8 und ADAM17²¹⁶ durch Batimastat gehemmt werden und sind an der Prozessierung von EGFR-Liganden beteiligt. Die quantitative RT-qPCR-Analyse ergab, dass alle vorherig erwähnten MMPs und ADAMs in HaCaT-Keratinocyten exprimiert werden.

Von allen MMPs und ADAMs, deren Transkriptmenge bestimmt wurde, konnte nur für MMP-3 eine systematische Induktion nach einer 2-stündigen Stimulierung mit CCh nachgewiesen werden (Abb. 4.3 A-C). Eine geringe aber nicht-signifikante Induktion konnte für MMP-1 nach 2-stündiger cholinergem Stimulation detektiert werden (Abb. 4.3 D und F). Der Grad der cholinergem ADAM17-Induktion variierte stark, wobei eine ADAM17-Induktion nach 2-stündigem CCh-Stimulus in einigen Experimenten gezeigt werden konnte (Abb. 4.3 I). Jedoch bestand in der überwiegenden Anzahl der Experimente eine tendenzielle, aber nicht signifikante Hochregulierung des ADAM17-Gens nach cholinergem Stimulation (Abb. 4.3 H). Ebenso konnte beobachtet werden, dass die ADAM8-Expression nach cholinergem Stimulation stark variiert (Abb. 4.3 M-O), das eine nachfolgende Bewertung der quantitativen RT-PCR-Analyse unter Verwendung von Inhibitoren nicht möglich machte. Im Gegensatz dazu konnte für MMP-2 keine Induktion durch einen cholinergem Stimulus nachgewiesen werden (Abb. 4.3 J-L). Zudem kann durch die Inhibierung von mAChRs, des EGFR und der MEK1/2-Kinase auch die cholinerge Induktion von bestimmten MMPs/ADAMs gehemmt werden. Anhand der Analyse der quantitativen RT-PCR ließ sich nachweisen, dass die durch CCh-induzierte Erhöhung der MMP-3-Expression nach einer Vorinkubation mit allen drei Inhibitoren signifikant reduziert wird (Abb. 4.3 A-C). Diese signifikante Reduktion der Transkriptmenge zeigt eine deutliche Abhängigkeit der MMP-3-Transkriptionsregulation von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und MAPK-Aktivierung. Zusätzlich konnte eine signifikante Reduktion der basalen Transkriptmenge nach Inhibierung von EGFRs und der MEK-Kinase gemessen werden

(Abb. 4.3 B und C), was wiederum eine Abhängigkeit der MMP-3-Expression von der EGFR- und MAPK-Aktivität ohne Involvierung eines mAChRs-vermittelten cholinergen Stimulus nachweist. Ebenso ist die basale Expression von MMP-1 durch die Behandlung mit PD 153035 und U0136 signifikant (Abb. 4.3 E und F) und nach Hemmung von mAChRs tendenziell reduziert (Abb. 4.3 D), das eine MMP-1-Transkriptionsregulation durch die EGFR- und MAPK-Aktivität verdeutlicht. Die cholinerge Induktion der ADAM17-Transkription, die jedoch zwischen den Experimenten eine hohe Variabilität aufweist, konnte nur durch Inhibierung der MEK-Kinase signifikant gehemmt werden (Abb. 4.3 I). Interessanterweise konnte nach Behandlung mit Atropin und U0126 eine signifikante Reduktion des basalen ADAM17-Transkript-Levels beobachtet werden (Abb. 4.3 G und I). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass nach einer Hemmung der mAChRs und der MEK-Kinase, unabhängig von einer cholinergen Stimulation, die transkriptionelle Regulation von ADAM17 verändert und die Expression des ADAM17-Gens reduziert wird. Zusätzlich konnte kein Einfluss einer mAChR-, EGFR- oder MEK-Inhibition auf die basale Expression von MMP-2 nachgewiesen werden (Abb. 4.3 J-L), das eine deutliche Unabhängigkeit der Transkriptionsregulation von MMP-2 von der EGFR-Transaktivierung und MAPK-Aktivität aufzeigt.



Ergebnisse

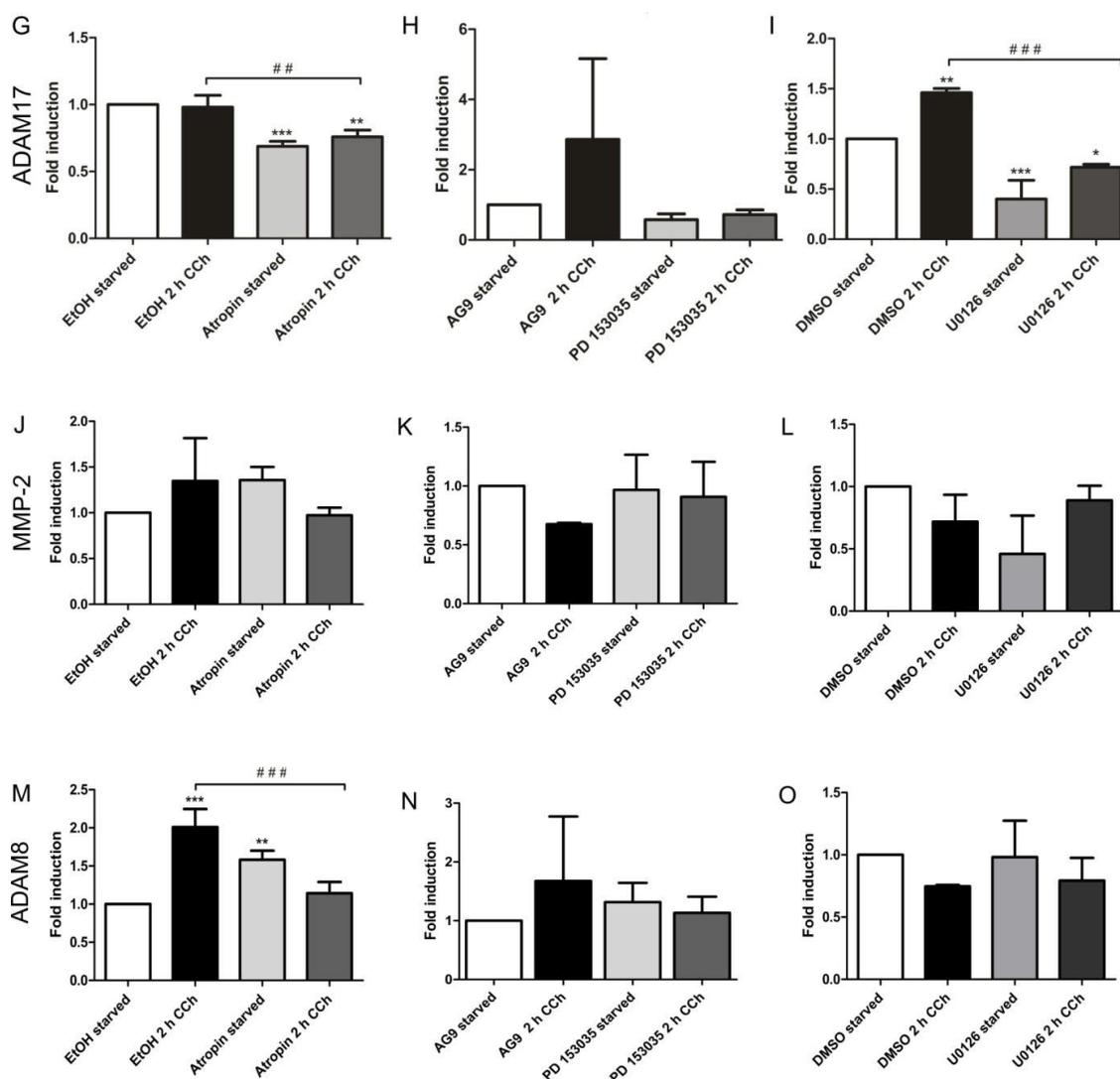


Abb. 4.4: Inhibierung der cholinergen Induktion von MMPs und ADAMs durch Inhibierung der mAChRs, EGFRs und MAPK-Signalwege. Graphische Darstellung der anhand der quantitativen RT-PCR analysierten Transkriptmenge der spezifische MMPs/ADAMs MMP-3 (A-C), MMP-1 (D-F), ADAM17 (G-I), MMP-2 (J-L) und ADAM8 (M-O) nach 2-stündiger Stimulation mit 1 mM CCh und Vorbehandlung mit den spezifischen Inhibitoren für mAChRs (A, D, G, J und M; Atropin), EGFR (B, E, H, K und N; PD 153035) oder MEK1/2 (C, F, I, L und O; U0126). Die Expression der spezifischen Gene wurde auf die Transkriptmenge der *Ywhaz*, *HPRT* und *Rp113a* Referenzgene normalisiert. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *One-way*- und *Two-way*-Varianzanalysen (ANOVA) im Vergleich zur der nicht-stimulierten Kontrolle (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) bzw. im Vergleich zur CCh-stimulierten Bedingung ohne Inhibitor (# #, $p < 0.01$; # # #, $p < 0.001$).

4.1.3 Flotilline in der cholinergen EGFR-Transaktivierung

Anhand vorheriger Studien konnte eine bedeutende Rolle von Flotillinen während der Aktivierung des EGFRs und in der Regulation des MAPK-Signalwegs nachgewiesen werden^{130,131}. Nach EGF-Stimulierung bilden Flotilline mit dem EGFR konstitutiv einen Komplex und sind somit am Clustering des EGFRs beteiligt. Durch ihre Interaktion mit diversen MAPK-Kinasen wird Flotillinen eine Funktion als *bona fide* MAPK-Gerüstproteine zugeschrieben¹³⁰. Demzufolge haben Flotilline ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von ERK1/2 nachgeschalteten Transkriptionsregulatoren, wie Egr1, Dusp1 und cFos, wobei Egr1 als positiver Regulator der Flotillin-Expression identifiziert wurde¹³¹. Im Folgenden wurde nun der Einfluss von Flotillinen auf die durch die EGFR-Transaktivierung-vermittelten transkriptionellen Effekte nach cholinergem Stimulus von mAChRs untersucht.

4.1.3.1 Cholinerge Induktion von Flotillinen

Die cholinerge Aktivierung der MAPK-Kaskade wird in HaCaT-Keratinocyten direkt durch die EGFR-Transaktivierung vermittelt¹⁰⁶ und führt zur Induktion der Egr1-Genexpression (Abb. 4.2 A-C). Da Flotilline als direkte Zielgene des Egr1-Transkriptionsfaktors nachgewiesen wurden und Egr1 somit als positiver Regulator der Flotillin-Expression angesehen wird¹⁴⁴, wurde initial untersucht, ob die Expression von Flotillinen durch einen cholinergen Stimulus induziert werden kann. Die Analyse der quantitativen RT-PCR ergab eine signifikante Erhöhung der Flotillin-1 und Flotillin-2 Transkriptmengen nach 2-stündiger CCh-Stimulation (Abb. 4.5 A). Dementsprechend konnte nach 8-stündigem cholinergen Stimulus ein mäßiger Anstieg des Proteinlevels beobachtet werden (Abb. 4.5 B). Diese Resultate zeigen, dass Flotillin-kodierende Gene durch cholinerge Signalwege in humanen HaCaT-Keratinocyten reguliert werden.

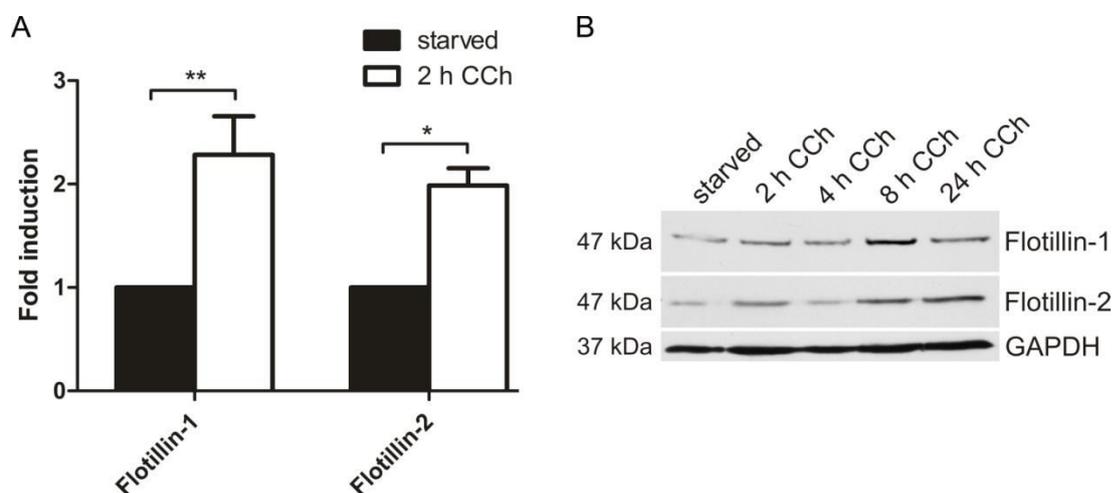
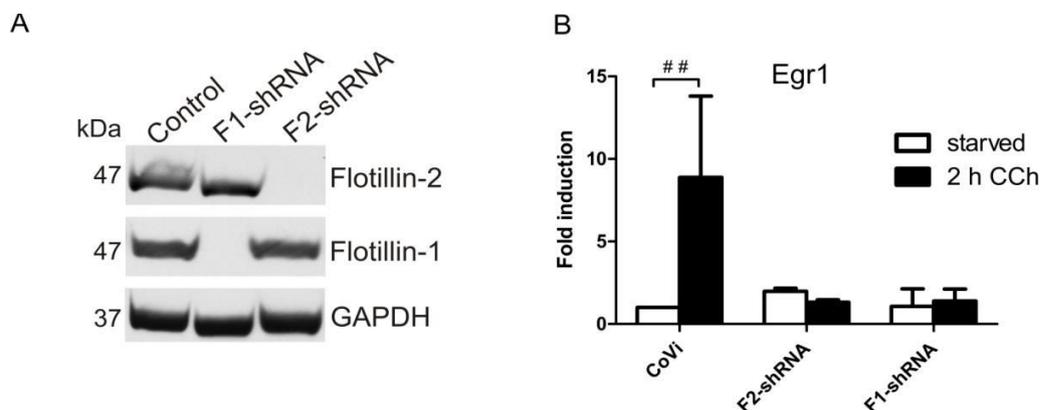
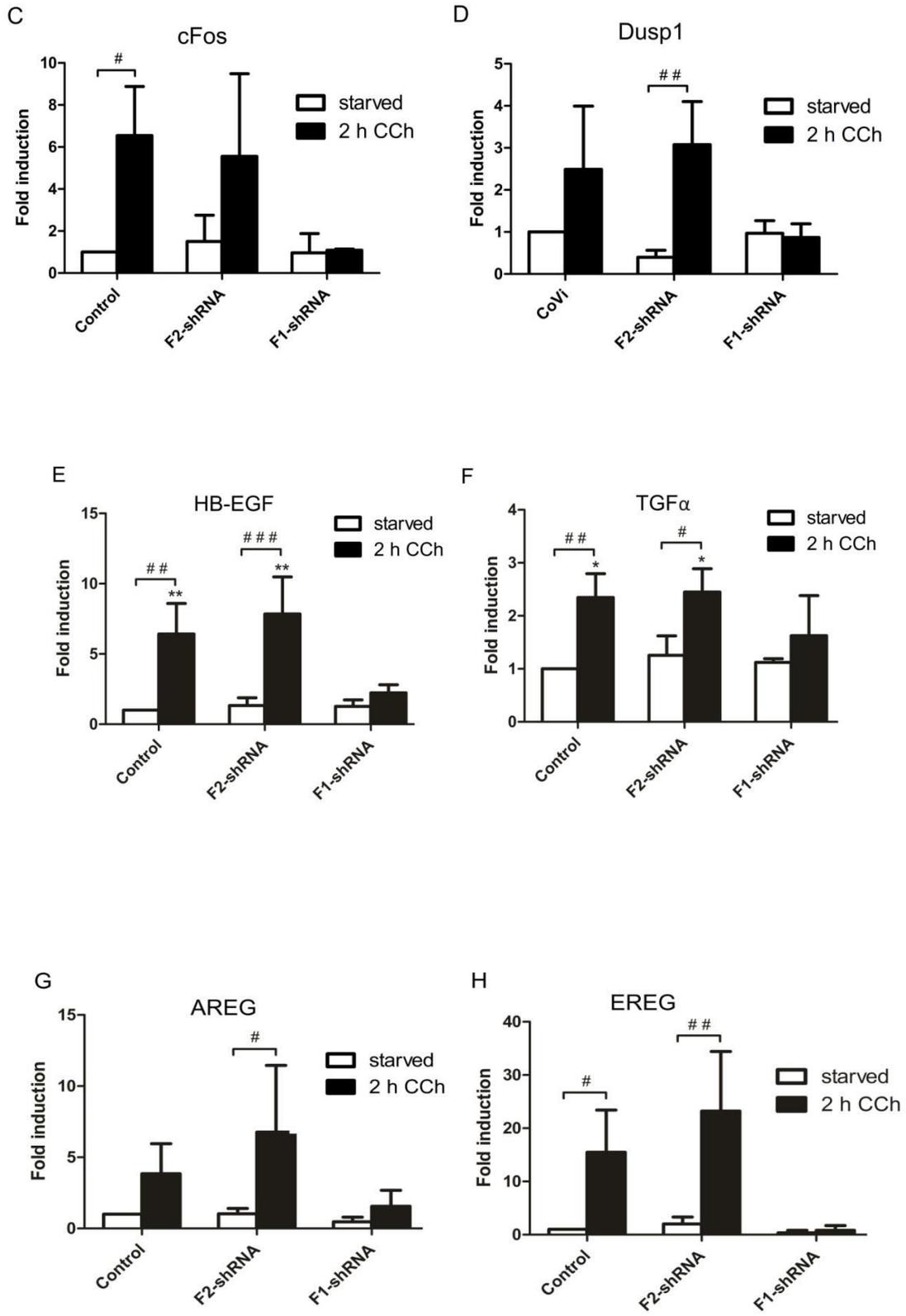


Abb. 4.5: Erhöhung der Flotillin-Expression nach cholinergem Stimulation in HaCaT-Keratinocyten. HaCaT-Zellen wurden mit 1mM CCh in der angegebenen Inkubationsdauer inkubiert und anschließend die Flotillin-Expression auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) analysiert. (A) Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der *One-way*-Varianzanalyse (ANOVA) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). In (B) ist ein repräsentativer Western Blot der Flotillin-Induktion nach cholinergem Stimulation von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.1.3.2 Einfluss von Flotillinen auf die cholinerge ERK/MAPK-Signaltransduktion

Durch vorherige Untersuchungen an HaCaT-Keratinocyten mit einer transienten siRNA-vermittelten Depletion von Flotillinen konnte eine Rolle von Flotillinen in der cholinergen ERK-Aktivierung nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte ERK-Aktivierung nach Depletion von Flotillin-1²¹⁷. Aufgrund der Rolle von Flotillin-1 in der cholinergen ERK-Aktivierung wurde nachfolgend der Einfluss von Flotillinen auf die transkriptionelle Induktion von MAPK-Zielgenen nach cholinergem Stimulation in stabil Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen untersucht. Dabei konnte eine deutliche Verminderung der Induktion der EGF-ähnlichen Liganden HB-EGF, TGF α , AREG und EREG nach 2-stündiger CCh-Stimulierung in Flotillin-1-depletierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.6 E-H). Dieser Effekt konnte in Flotillin-2-depletierten HaCaT-Zellen jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 4.6 E-H). Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit der vorherigen Beobachtung, dass die Depletion von Flotillin-2 keinen Einfluss auf die cholinerge ERK-Aktivierung hat²¹⁷. Darüber hinaus konnte der gleiche Effekt einer Flotillin-1-Depletion auf die cholinerge Induktion von MMP-3 beobachtet werden, wobei die Depletion von Flotillin-1 in eine signifikant reduzierte MMP-3-Induktion resultiert und die Abwesenheit von Flotillin-2 die Induktion nach CCh-Stimulierung nicht beeinflusst (Abb. 4.6 I). Diese Resultate zeigen, dass die cholinerge EGFR/MAPK-Aktivierung und die dadurch induzierten transkriptionellen Effekte auf die untersuchten EGFR-Liganden und MMP-3 von Flotillin-1 abhängig sind.





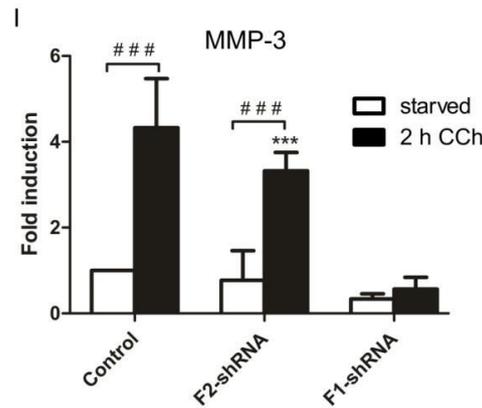


Abb. 4.6: Die CCh-induzierte transkriptionelle Regulation von MAPK-Zielgenen, EGF-ähnlicher Liganden und MMP-3 ist abhängig von Flotillin-1. (A) Der repräsentative Western-Blot zeigt die Effizienz der stabilen Deletion von Flotillin-1 und Flotillin-2 in HaCaT-Keratinocyten. Die Analyse der quantitativen RT-PCR-Analyse veranschaulicht die relative Expression von Egr1 (B), cFos (C), Dusp1 (D), sowie HB-EGF (E), TGF α (F), AREG (G), EREG (H) und MMP-3 (I) nach 2-stündiger CCh-Stimulation von stabil Flotillin-2 (F2-shRNA)- und Flotillin-1 (F1-shRNA)-depletierten HaCaT-Keratinocyten. Die Expression der spezifischen Gene wurde auf die Transkriptmenge der Referenzgene *Ywhaz*, *HPRT* und *Rp113a* der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *One-way*- und *Two-way*-Varianzanalysen (ANOVA) im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontroll-Zellen (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) bzw. *versus* nicht-stimulierter Bedingung der jeweiligen Zelllinie (##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$).

4.2 Die Beteiligung von Flotillinen und der kleinen GTPase Arf6 an endosomalen Transportprozessen

Die ersten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der kleinen GTPase Arf6 und Flotillinen konnten anhand der Masterarbeit von Alexandra Zuk in dieser Arbeitsgruppe erbracht werden. Die ursprüngliche Idee für diese Untersuchungen liegt vor allem in der funktionellen Beteiligung von Flotillinen und Arf6 an diversen Membrantransportprozessen^{127,182,189,218–220}, vor allem im Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg^{194,221}. Eine mögliche Kooperation von Flotillinen und Arf6 lässt sich in der Clathrin-unabhängigen Endozytose des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Protein CD59 vermuten, welches als ein Arf6-Frachtmolekül beschrieben ist und dessen Internalisierung scheinbar durch eine Flotillin-Depletion reduziert wird¹¹⁴. Dementsprechend liegt der Fokus dieser Studie darin, die Interaktion von Flotillinen und Arf6, sowie den funktionellen Zusammenhang beider Proteine bei endozytotischen Transportprozessen zu untersuchen.

Für die Untersuchung der Lokalisation und Funktion wurden zusätzlich zum Arf6-Wildtyp (WT) zwei mutierte Formen von Arf6 verwendet, die entweder im aktiven oder inaktiven Zustand blockiert sind. Die konstitutiv aktive (CA) Arf6-Mutante ist aufgrund einer Punktmutation (Q67L) nicht in der Lage, das gebundene GTP zu hydrolysieren und verbleibt somit in seiner aktiven Konformation. Die dominant negative (DN) Mutante (T27N) liegt in einer inaktiven Konformation vor, wobei diese einen stabilen Komplex mit dem Arf6-GEF EFA6 bildet und der Austausch von GDP zu GTP durch EFA6 nicht mehr katalysiert werden kann²²². Für die Immunfluoreszenz- und Interaktionsstudien wurden Hämagglutinin (HA)-markierte Konstrukte des Arf6-WT, sowie der beiden Arf6-Mutanten verwendet. Zur Durchführung des indirekten Pulldowns zur Aktivitätsuntersuchung von Arf6 wurde ein Flag-markiertes Arf6-WT-Konstrukt verwendet. Vorab wurde eine Überprüfung der Expression der jeweiligen Arf6-Konstrukte mittels Western Blot durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit diesen Konstrukten transfiziert und anhand einer SDS-PAGE und des Western Blots analysiert. Anhand des Western Blots konnte die Expression aller Arf6-Formen mit HA-Tag und Flag-Tag auf Protein-Ebene in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte Arf6-DN systematisch sowohl in der Flag- als auch HA-getagten Form die schwächste Expression. Ein deutlich höheres Expressionslevel als Arf6-WT konnte für Flag- und HA-getagtes Arf6-CA detektiert werden (Abb. 4.7).

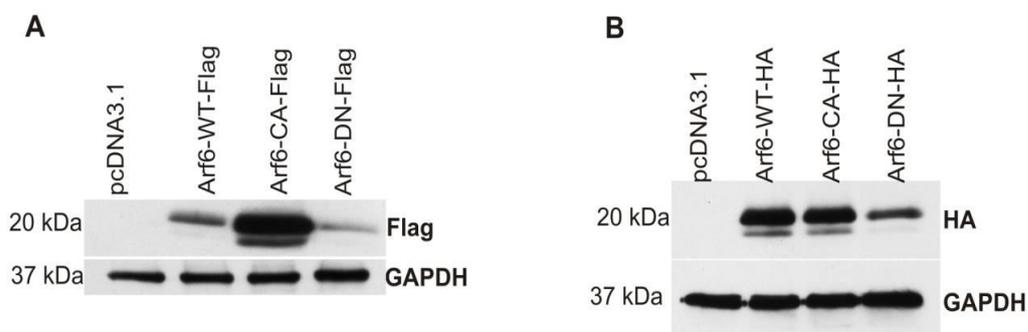


Abb. 4.7: Immunbiochemische Untersuchung der Expression von Arf6-Konstrukten in HeLa-Zellen. Analyse der Proteinlysate von HeLa-Zellen, die entweder mit einem Arf6-Wildtyp (WT)-Konstrukt, konstitutiv aktiven (CA), dominant negativen (DN) Arf6-Konstrukt oder dem Leervektor-pcDNA3.1 transient transfiziert wurden. Die Western Blots zeigen die Detektion der jeweiligen Arf6-Form mittels Antikörpern gegen den Flag- (A) oder HA-Tag (B). Als Ladekontrolle dient die Detektion von GAPDH.

4.2.1 Interaktion von Flotillinen und Arf6

Eine mögliche Interaktion zwischen Arf6 und Flotillinen wurde anhand der Koimmunpräzipitation untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen transient mit den HA-getagten

Arf6-Konstrukten, sowie dem Leervektor-pcDNA3.1 als Negativkontrolle transfiziert. Aus den Lysaten wurden mittels Dynabead- Protein A-gekoppelten Antikörpern gegen Flotillin-1 Proteine kopräzipitiert, die in Lage sind, mit Flotillin-1 zu interagieren. Als Input dienen 10% des Gesamtllysats, anhand dessen die Expression der entsprechenden Arf6-Form bestätigt werden konnte. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte anhand eines Western Blots und spezifischen Antikörper gegen Flotillin-1 und -2, sowie gegen den HA-Tag zur Detektion der jeweiligen Arf6-Form. Die für die Immunpräzipitation und die Detektion der präzipitierten Proteine eingesetzten spezifischen Antikörper stammen aus unterschiedlichen Spezies, wodurch die Detektion eines falsch-positiven Signals (Ig-Ketten) vermieden wird. Die Analyse der Präzipitate ergab, dass Flotillin-1 mit allen drei Arf6-Formen koimmunpräzipitiert werden konnten. Unter Beachtung des geringeren Expressionslevels von Arf6-DN, welches im Gesamtllysate (Input-Proben) detektiert werden konnte, ist auch das Detektionssignal des kopräzipitierten Arf6-DN im Vergleich zu Arf6-WT und -CA erwartungsgemäß schwächer. Zusätzlich konnten in der Koimmunpräzipitation endogenes Flotillin-2 detektiert werden (Abb. 4.8). Um dieses Ergebnis zusätzlich überprüfen zu können, wurde eine Koimmunpräzipitation mit Antikörpern gegen den HA-Tag durchgeführt und die Kopräzipitation von Flotillinen mit den HA-getagten Arf6-Proteinen belegt (nicht gezeigt).

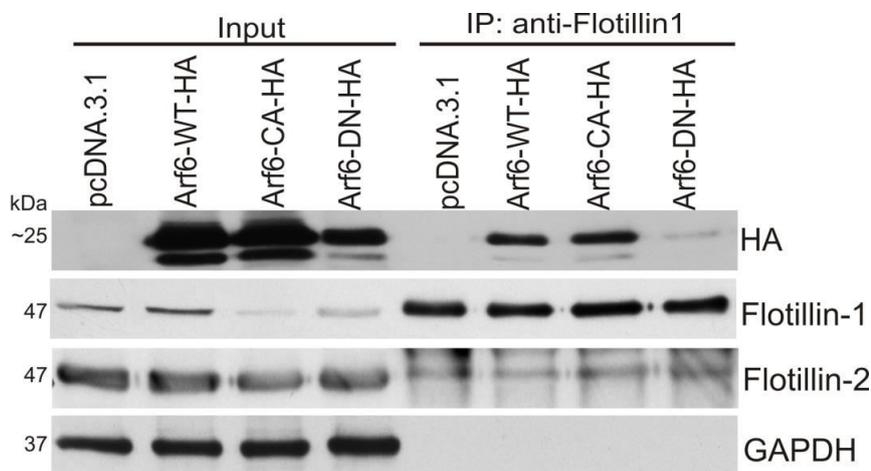


Abb. 4.8: Nachweis der Interaktion zwischen Flotillinen und Arf6. HeLa-Zellen wurden transient mit HA-getagten Arf6-WT, -CA, -DN oder dem Leervektor (pcDNA3.1) transfiziert und anschließend lysiert. Die Immunpräzipitation wurde unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen Flotillin-1 durchgeführt. Die Analyse des Inputs und Präzipitats (IP: anti-Flotillin-1) erfolgte anhand eines Western Blots und anschließender Detektion von Flotillin-1 und -2 und der koimmunpräzipitierten HA-getagten Arf6-Proteine.

4.2.2. Zelluläre Lokalisation von Flotillinen nach ektopischer Expression von Arf6

Nachdem eine Interaktion zwischen Flotillinen und Arf6 nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss der unterschiedlichen Arf6-Formen auf die Flotillin-Lokalisation untersucht. Für diese Studie wurden HeLa-Zellen verwendet, die unter Wachstumsbedingungen auf Deckgläsern kultiviert wurden. Für die folgende immunzytochemische Untersuchung wurden die HeLa-Zellen mit Konstrukten kodierend für HA-getagtes Arf6-WT, -CA und -DN transfiziert und in Methanol fixiert. Die anschließende Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte mittels anti-HA-Tag gerichteter Antikörper zur Visualisierung der Lokalisation der jeweiligen Arf6-Formen, sowie mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, mit dem die zelluläre Lokalisation von Flotillin-2 detektiert werden konnte. Aufgrund der schlechten Detektierbarkeit der Flotillin-1-Immunfluoreszenz mit den verfügbaren polyklonalen Flotillin-1-Antikörpern wurde in diesem Versuchsteil nur Flotillin-2 näher betrachtet. Anhand der immunzytochemischen Untersuchung der Arf6-WT-überexprimierenden Zellen konnte unter Wachstumsbedingungen die Lokalisation von Arf6 an der Plasmamembran, sowie im Zytosol nachgewiesen (Abb. 4.9) und damit die Beobachtungen früherer Studien bestätigt werden¹⁶⁸. Da die Wildtyp-Form von Arf6 in Abhängigkeit eines gebundenen Guanin-Nukleotids zwischen dem aktiven und inaktiven Aktivitätszustand wechselt, weist die hier beobachtete zytosolische Arf6-Lokalisation auf die lösliche und inaktive Arf6-WT-Form hin, wohingegen die gezeigte Plasmamembran-assoziierte Form den aktiven Zustand von Arf6-WT nachweist (Abb. 4.9). Die nachgewiesene Lokalisation von Arf6 in Arf6-WT-überexprimierenden HeLa-Zellen unter Wachstumsbedingungen konnte somit die Beobachtungen früherer Studien bestätigen¹⁵⁴. Im Vergleich zu pcDNA3-Leervektor-transfizierten Zellen ist nach einer Arf6-WT-Überexpression eine vermehrte Lokalisation des endogenen Flotillin-2 in endosomalen Strukturen zu beobachten. In ARF6-CA-überexprimierenden Zellen ließ sich die Lokalisation der CA-Arf6-Form an der Plasmamembran und in endosomalen Strukturen nachweisen. Interessanterweise konnte Arf6-CA auch im Zytoplasma detektiert werden, wo ebenfalls Arf6-CA-positive Aggregate vorgefunden wurden. Zusätzlich wurde Flotillin-2 nach Überexpression der aktiven Arf6-Form größtenteils in endosomalen Strukturen beobachtet. In Arf6-DN-überexprimierenden Zellen konnte eine erhöhte Anzahl an Arf6-positiven Vesikeln in perinukleären Bereichen und eine tendenzielle, aber nicht quantifizierbare Größenzunahme dieser vesikulären Strukturen nachgewiesen werden, was auch in früheren Studien gezeigt werden konnte²²⁰. Zudem konnte im Vergleich mit den Leervektor-transfizierten Zellen eine ähnliche subzelluläre Verteilung von Flotillin-2 beobachtet werden, bei der Flotillin-2 an der Plasmamembran und in endosomalen Strukturen detektiert werden konnte. Anhand der Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Arf6-WT die zelluläre Lokalisation von Flotillinen beeinflusst (Abb. 4.9). Da diese Ergebnisse einen ersten Hinweis

darauf geben, dass Arf6 in seiner aktivierten Form einen Einfluss auf die Lokalisation von Flotillinen hat, wurde im Folgenden der Einfluss von Arf6 auf die EGF-induzierte Endozytose von Flotillinen untersucht.

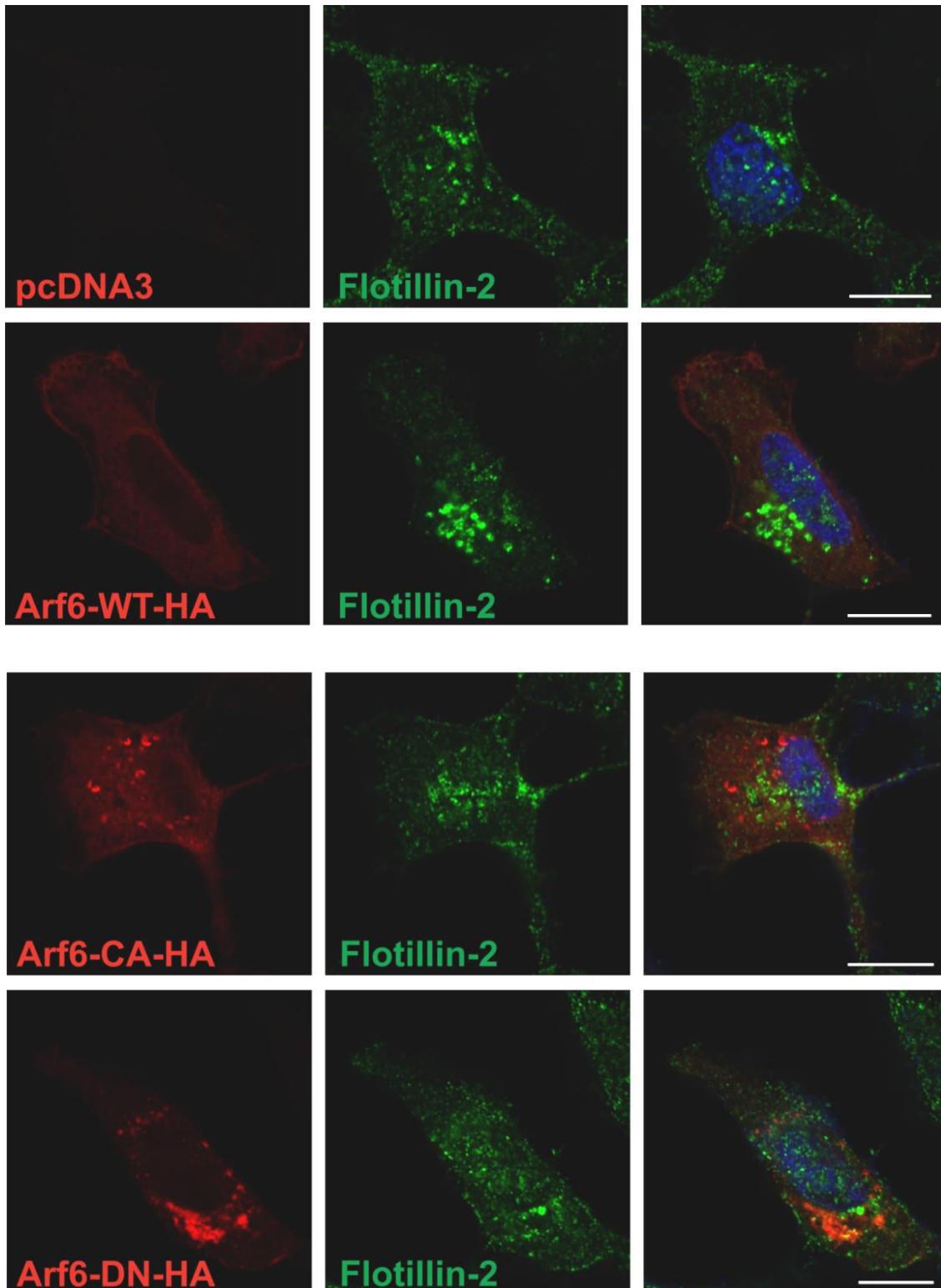


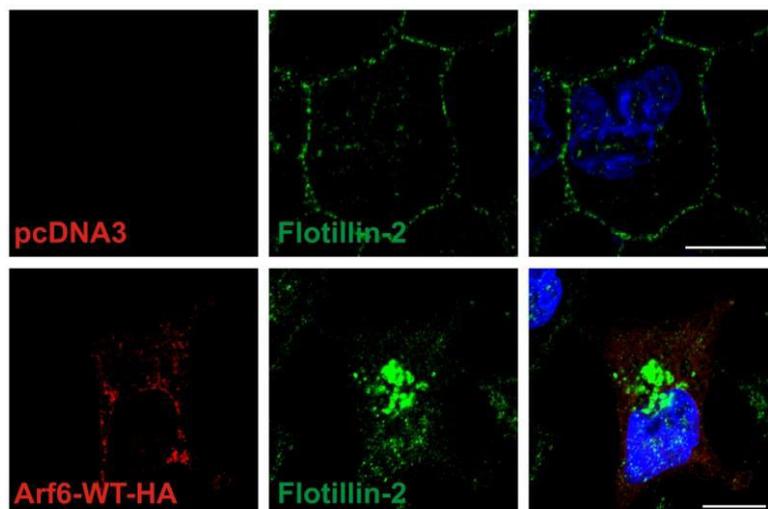
Abb. 4.9: Zelluläre Lokalisation von Flotillin-2 nach Arf6-Überexpression. Unter Wachstumsbedingungen kultivierte HeLa-Zellen wurden transient mit pcDNA3-Konstrukten kodierend für die HA-getagten Wildtyp (WT)-, konstitutiv aktiv (CA)- und dominant negativen (DN)-Arf6-Proteine, sowie dem Leervektor transfiziert und in Methanol fixiert. Die immunzytochemische Detektion der Arf6-Proteine erfolgte mittels Maus-anti-HA-Tag-Antikörper (in rot dargestellt) und die Markierung des endogenen Flotillin-2 mit Kaninchen-anti-F2C-Antikörper (in grün dargestellt). Die Zellkerne sind anhand des dsDNA-spezifischen Farbstoffs DAPI markiert (blau). Der angegebene Maßstab entspricht 10 μm .

4.2.3 Einfluss der Aktivität von Arf6 auf die EGF-induzierte Flotillin-Endozytose

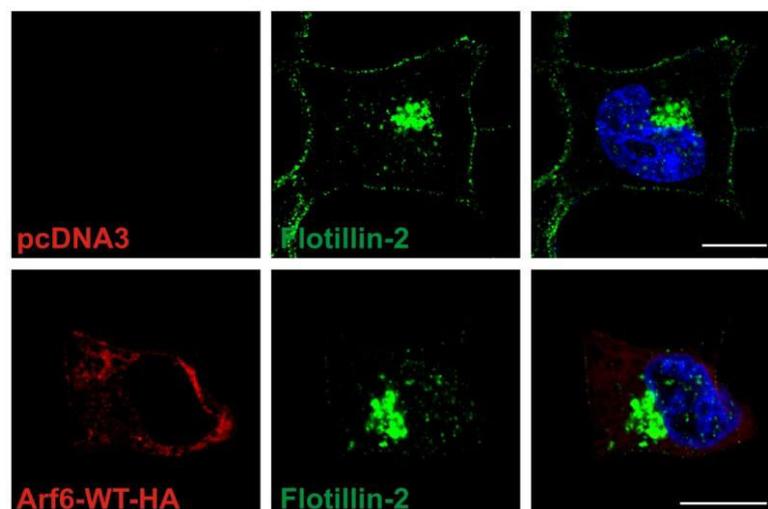
Aus früheren Studien geht hervor, dass sich die Lokalisation von Flotillinen durch Stimulierung mit EGF verändert. Die EGF-Stimulierung bewirkt eine Tyrosinphosphorylierung von Flotillinen¹²¹, sowie eine Größenzunahme von Flotillin-Heterooligomeren und geht mit der Endozytose von Flotillinen einher¹³⁰. Um einen Einfluss der Arf6-Aktivität auf die Flotillin-Lokalisation nach EGF-Stimulierung weitergehend analysieren zu können, wurden HeLa-Zellen vor der Stimulation mit pcDNA.3-HA-Arf6-WT, -CA und -DN transfiziert und immunzytochemisch untersucht. Die EGF-Stimulierung der transfizierten HeLa-Zellen erfolgte in Serum-freien Medium für 10 Minuten, woraufhin die Zellen in Methanol fixiert wurden. Für die anschließende Immunfluoreszenzmarkierung der Arf6-Formen wurde ein HA-Tag gerichteter Antikörper verwendet. Die Markierung des endogenen Flotillin-2 wurde wie oben bereits beschrieben, durchgeführt. Während Flotillin-2 ohne EGF-Stimulierung überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert war, konnte nach einer Überexpression mit der Arf6-WT-Form eine intrazelluläre Flotillin-2-Lokalisation beobachtet werden (Abb. 4.10 A). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Arf6-WT-Überexpression die Lokalisation von Flotillin-2 bereits in Abwesenheit eines EGF-Stimulus beeinflusst, indem seine Lokalisation an die Plasmamembran durch Recycling verhindert wird. Nach EGF-Stimulierung wurde Flotillin-2 in Leervektor-transfizierten Zellen erwartungsgemäß neben ihrer Lokalisation vor allem in endosomalen Strukturen und an der Plasmamembran nachgewiesen. Nach EGF-Stimulierung konnte in Arf6-WT-exprimierenden Zellen eine vermehrte Lokalisation von Flotillin-2 in endosomalen Strukturen in perinukleären Bereichen beobachtet werden. Im Unterschied zu den Leervektor-Kontrollzellen ist Flotillin-2 jedoch nicht an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 4.10 B). Dies deutet darauf hin, dass durch eine Überexpression der Arf6-WT-Form die Lokalisation von Flotillin-2 auch nach EGF-Stimulierung signifikant verändert wird (Abb. 4.10 C). Die Untersuchung eines Einflusses des Aktivitätszustandes von Arf6 auf die Flotillin-Endozytose erfolgte anhand der Überexpression der CA- und DN-Mutationsform von Arf6 in HeLa-Zellen nach EGF-Stimulierung. Nach Überexpression der Arf6-CA und -DN-Form in nicht-stimulierten Zellen war eine Lokalisation von Flotillin-2 an der Plasmamembran und in

endosomalen Strukturen erkennbar (Abb. 4.10 D). Eine erhöhte Anzahl an Flotillin-2-positiver endosomaler Strukturen, welche in Arf6-WT-und -CA-überexprimierten Zellen nach EGF-Stimulierung (Abb. 4.10 B und E) beobachtet werden konnte, wurde jedoch in Arf6-DN-exprimierenden Zellen nicht nachgewiesen. Zudem scheint Flotillin-2 nach ARF6-DN-Überexpression wenig bis kaum endozytiert zu sein. Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass Arf6 in seiner aktiven Form die Endozytose von Flotillin-2 nicht zu beeinflussen scheint, sondern vielmehr einen Einfluss auf deren Recyclingprozess haben könnte. Die inaktive Form (DN) von Arf6 dagegen könnte einen inhibitorischen Effekt auf Flotillin-Endozytose aufweisen. Auf Grund der geringen Expression von Arf6-DN war es jedoch nicht möglich, dies zuverlässig zu quantifizieren.

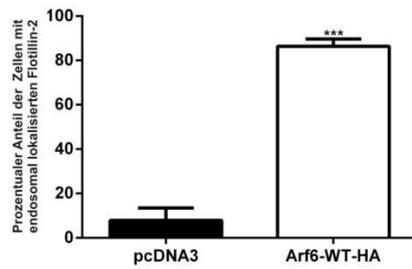
A Serum-freie/ nichtstimulierte Bedingung



B 10 min 100 ng/ml EGF

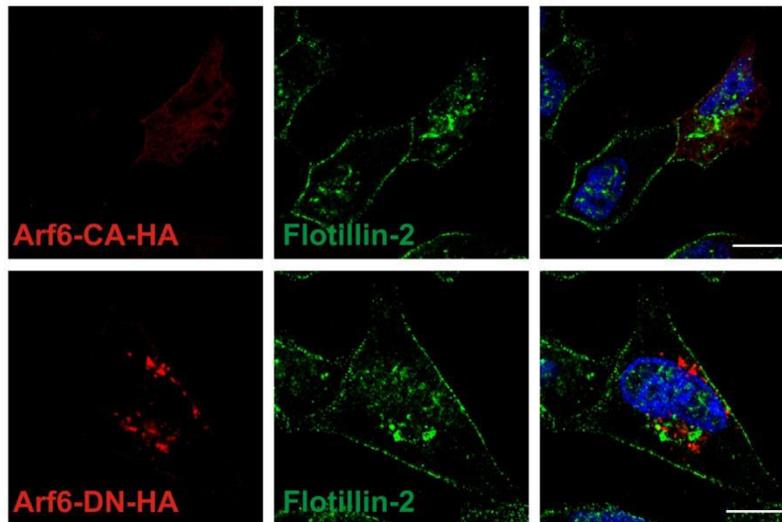


C



D

Serum-freie/ nichtstimulierte Bedingung



E

10 min 100 ng/ml EGF

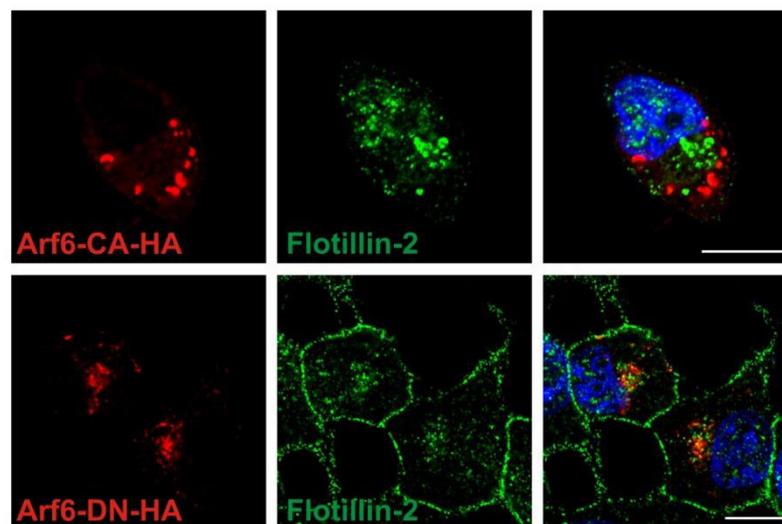


Abb. 4.10: Flotilline sind nach Überexpression von Arf6-WT in endosomalen Kompartimenten lokalisiert. HeLa-Zellen wurden in Serum-freiem Medium auf Deckgläschen kultiviert und transient mit dem pcDNA3-Leervektor (A und B, obere Reihe) oder pcDNA3-HA-Tag-Arf6-WT (A und B untere Reihe), -CA (D und E, obere Reihe) und -DN (D und E, untere Reihe) transfiziert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 100 ng/ml EGF für 10 Minuten (B und E) und die Zellfixierung in Methanol.

Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde mittels monoklonaler anti-HA-Tag-Antikörper zur Detektion der Arf6-Formen (rot) und polyklonalen anti-Flotillin-2-Antikörper (grün) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels des dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (blau) visualisiert. Der angegebene Maßstab entspricht 10 μm . (C) Die graphische Darstellung zeigt den prozentualen Anteil an Zellen, die eine endosomale Flotillin-2-Lokalisation aufweisen. Für die statistische Auswertung wurden jeweils 50 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählt. Die statistische Analyse erfolgte anhand der Student'schen t-Verteilung (*t-Test* für ungepaarte Stichproben; ***, $p < 0.001$).

4.2.4 Einfluss von Flotillinen auf den Aktivitätszustand von Arf6

Anhand eines Aktivitäts-Assays sollte untersucht werden, ob Flotilline die Aktivität von Arf6 beeinflussen können, das auf eine Effektorfunktion der Flotilline hinweisen würde. Der Aktivitätszustand von Arf6 kann mittels der Golgi-lokaliserten, γ -Adaptin-enthaltenen, Arf-bindenden (GGA) Proteine überprüft werden, die in einer früheren Studie als Arf-Effektoren identifiziert wurden²²³. Die allgemeine Domänenstruktur von GGA-Proteinen enthält u.a. eine Arf-bindende GAT-Domäne²²⁴ (Abb. 4.11 A). Diese GAT-Domäne ist ausschlaggebend für die Untersuchung des Arf6-Aktivitätszustands, da nur aktive, GTP-gebundene Arf-Proteine an diese Domäne binden²²³. Für das Aktivitäts-Assay wurde dementsprechend eine trunke Version des GGA3-Proteins verwendet, das nur aus der Arf-bindenden GAT-Domäne, sowie der VHS-Domäne zur korrekten Faltung und Stabilisierung des Proteins besteht. Mit Hilfe des GST-gekoppelten GGA3-VHS-GAT-Proteins konnte das Aktivitäts-Assay zur Untersuchung des Arf6-Aktivitätszustands etabliert werden. Nach Transformation der entsprechenden Konstrukte in *Rosetta*-Bakterien konnte das GST-GGA3-VHS-GAT-Protein produziert und anschließend aufgereinigt werden. Zusätzlich erfolgte die Kopplung der GST-Proteine an Glutathion-Sepharose-Beads, die mit den Lysaten von transient Arf6-WT-Flag transfizierten Flotillin-depletierten HeLa-Zellen inkubiert wurden. Für die Überprüfung der stabilen Flotillin-Depletion mittels shRNAs und der Expression von Arf6-WT-Flag-Konstrukts wurden 10% des Gesamtlisats vor der Inkubation entnommen. Die Input- und Pulldown-Proben wurden anhand eines Western Blots und der immunbiochemischen Detektion von Flotillinen, sowie des Flag-Tags der Arf6-Proteine analysiert. Zudem erfolgte eine Färbung der Nitrozellulose-Membran mit der Ponceau S -Proteinfärbelösung, die eine vergleichbare Menge an eingesetzten GST-Proteinen bestätigen konnte. Mit Hilfe des Aktivitäts-Assays konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Flotillinen den Aktivitätszustand von Arf6 beeinflusst. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine signifikant reduzierte Menge an GGA3-VHS-GAT-gebundenen Arf6 in Flotillin-1- und Flotillin-2-depletierten HeLa-Zellen bestimmt werden. Da Arf6 nur in seinem aktiven Konformationszustand an das GGA3-VHS-GAT-Protein bindet, weist die reduzierte Menge an gebundenen Arf6 auf eine signifikant verringerte Aktivität von Arf6 in Abwesenheit von

Flotillinen hin (Abb. 4.11 B und C). Zudem lässt sich anhand dieser Beobachtung eine Arf6-Effektorfunktion von Flotillinen vermuten.

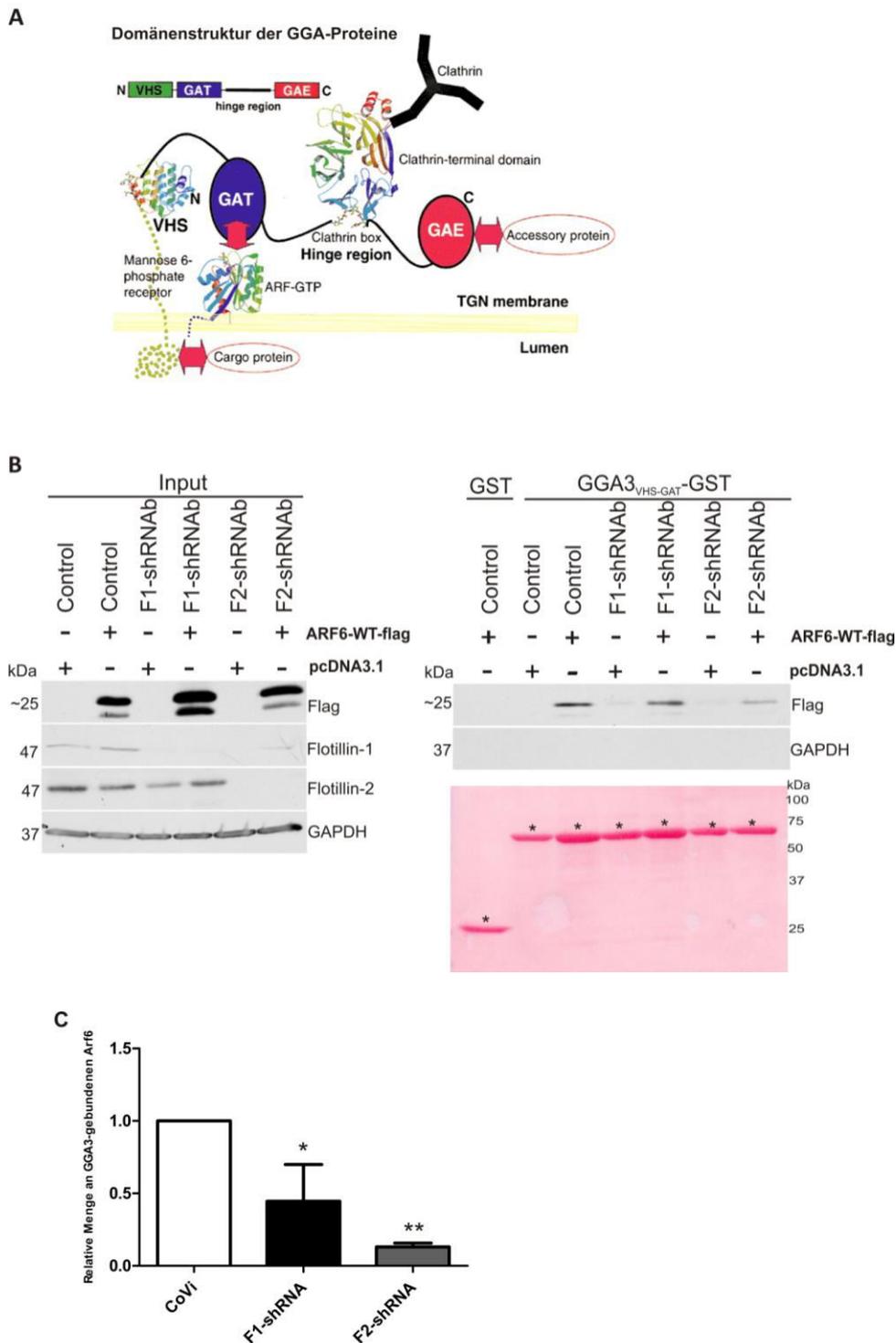


Abb. 4.11: Die Depletion von Flotillinen beeinflusst die Aktivität von Arf6. (A) Domänenstruktur von Golgi-lokalisierten, γ -Adaptin-enhaltenden, Arf-bindenden (GGA)-Proteinen bestehend aus einer VHS-, GAT- und GAE-Domäne. Die GAT-Domäne der GGA-Proteine bindet Arf6 in seiner aktiven Konformation. Eine Bestimmung des Aktivitätszustands von Arf6 in Flotillin-depletierten HeLa-Zellen erfolgt aufgrund der Menge an Arf6, das an ein trunkiertes GGA3^{GAT-VHS}-Protein gebunden hat.

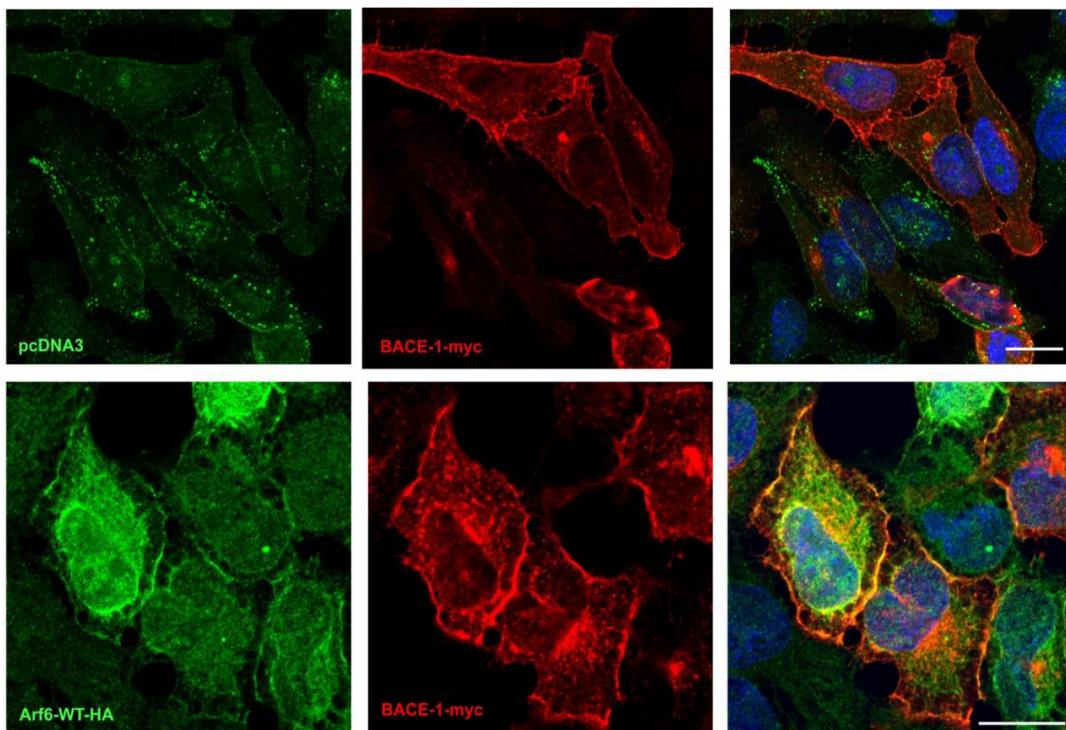
(Verändert nach Wakatsuki S, High Energy Accelerator Research Organization, KEK; <http://pfweis.kek.jp>). (B) Ein repräsentativer Western Blot des Aktivitäts-Assays von Arf6. Stabil Flotillin-1 (F1-shRNA) und Flotillin-2 (F2-shRNA) depletierte HeLa-Zellen wurden transient mit dem Arf6-WT-Flag-getagten Konstrukt transfiziert. Die Lysate wurden für ein GST-Pulldown-Assay mit Glutathion-Sepharose Beads-gekoppelten GGA3^{-VHS-GAT}-GST oder GST als Negativkontrolle eingesetzt. Als Input dienten 10% des Gesamtllysats. Die Analyse des Aktivitäts-Assays wurde mittels Western Blot und anschließender Ponceau S-Färbung der Nitrozellulose-Membran, sowie der darauffolgenden Detektion des Flag-getagten Arf6-WT durchgeführt. (C) Die Menge des GGA3^{-VHS-GAT}-GST gebundenen Arf6 wurde anhand der densitometrischen Methode quantifiziert und auf die Arf6-Menge der jeweiligen Input-Proben normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der *One-way*-Varianzanalyse (ANOVA) *versus* der gebundenen Arf6-Menge der Kontroll-Zellen (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

4.2.6 Funktioneller Zusammenhang von Flotillinen und Arf6 während der Transportprozesse von Arf6-Frachtmolekülen

Da die vorherigen Studien auf eine Arf6-Effektorfunktion von Flotillinen hinweisen, sollte anhand der nächsten Versuchsdurchführung ein möglicher funktioneller Zusammenhang beider Proteine während endosomaler Transportprozesse am Beispiel des Arf6-Frachtmoleküls BACE-1 (*β -site APP cleaving enzyme-1*) untersucht werden. Durch ein spezifisches Sortierungssignal (*acidic cluster dileucine*, ACDL) am zytoplasmatischen Ende von BACE-1 wird sowohl die Endozytose als auch die endosomale Sortierung und das Recycling dieser Protease vermittelt²²⁵⁻²²⁷. Flotillin-1 bindet direkt an das Dileucin-Motiv des Sortierungssignals, wobei Flotillin-2 durch eine Flotillin-1-vermittelte Interaktion mit BACE-1 interagiert. Um eine mögliche Kooperation von Flotillinen und Arf6 während endosomaler Transportprozesse des Arf6-Frachtmoleküls BACE-1 zu untersuchen, wurden stabile Flotillin-1 (F1-shRNA)- und Flotillin-2 (F2-shRNA)-depletierte HeLa-Zellen verwendet^{197,198}, die zusätzlich mit einem Arf6-WT-HA- und BACE-1-myc-pcDNA3-Konstrukt transient kotransfiziert wurden. Die Überprüfung der Flotillin-Expression erfolgte anhand der Western Blot-Methode und konnte mit einer Effizienz von über 90% bestätigt werden. Die anschließende Immunfluoreszenzmarkierung wurde anhand von Antikörpern gerichtet gegen den myc-Tag von BACE-1, sowie anti-HA-Tag-Antikörpern zur Visualisierung von Arf6-WT durchgeführt. In den Leervektor-transfizierten Zellen ist BACE-1 in vesikulären Strukturen, aber nicht an der Plasmamembran lokalisiert. Nach einer Überexpression von Arf6-WT konnten wiederum traubenartig angeordnete Arf6-positive Vakuolen nachgewiesen werden. Außerdem war in Zellen mit einem geringeren Expressionslevel von Arf6-WT eine verringerte Anzahl dieser vakuolären Strukturen erkennbar (Abb. 4.12 A).

Bereits in früheren Studien wurde eine Lokalisation von BACE-1 in diesen Arf6-positiven Strukturen beschrieben, die wiederum auf eine Blockierung der endosomalen Sortierung dieses Arf6-Frachtmoleküls nach einer Überexpression von Arf6-CA zurückzuführen ist²²⁸. Im Gegensatz dazu konnte hier nach ektopischer Expression von Arf6-WT jedoch keine Kolo-kalisation von Arf6-WT und BACE-1 in den vakuolären Strukturen beobachtet werden (Abb. 4.12 A). In Flotillin-2-depletierten Zellen konnte eine deutliche Akkumulation von BACE-1 in perinukleären Bereichen sowohl in Leervektor- als auch Arf6-WT-transfizierten Zellen detektiert werden (Abb. 4.12 C). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung zeigten bereits die Untersuchungen von John *et al.*, dass die Depletion von Flotillinen zu einer endosomalen Akkumulation von BACE-1 in perinukleären Bereich führt²²⁹. Zudem scheinen die Arf6-positiven Vakuolen-Cluster in Flotillin-2-depletierten Zellen in einer verringerten Anzahl vorzuliegen (Abb. 4.12 C). Aufgrund des unterschiedlichen Expressionslevels von Arf6-WT in der Zellpopulation ist dieser Effekt der Flotillin-2-Depletion jedoch nicht quantifizierbar. Zusätzlich konnte eine Kolo-kalisation von Arf6-WT und BACE-1 an der Plasmamembran in Flotillin-2-depletierten Zellen gezeigt werden (Abb. 4.12 C). In Flotillin-1-depletierten Zellen liegt BACE-1 ebenfalls in perinukleären Bereichen akkumuliert vor, wobei ein Einfluss der Arf6-WT-Überexpression auf die BACE-1-Lokalisation nicht erkennbar ist (Abb. 4.12 B).

A



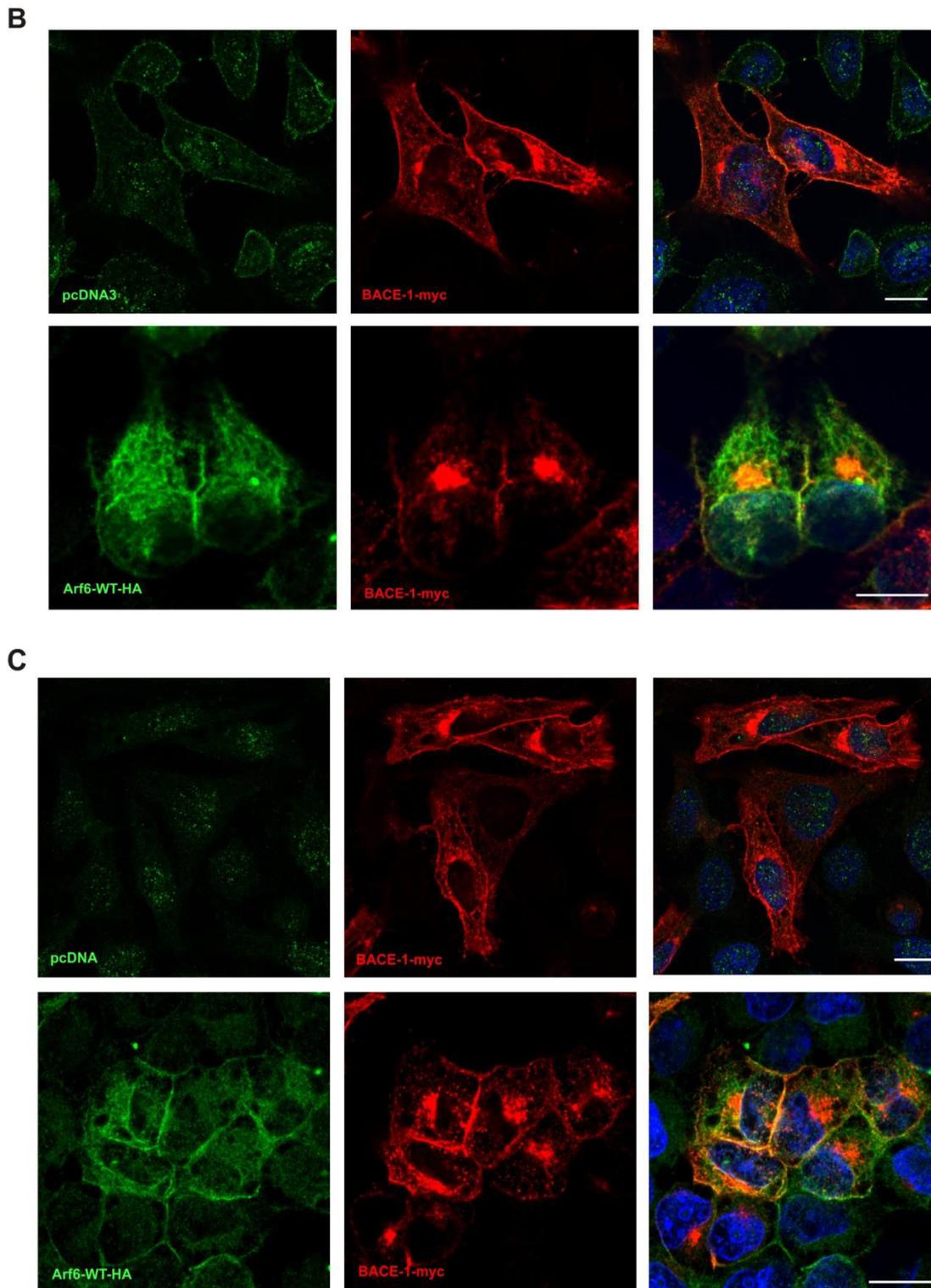


Abb. 4.12: Die Lokalisation von BACE-1 nach ectopischer Expression von Arf6-WT in Flotillin-depletierten HeLa-Zellen. (A) Kontroll-Zellen, die mit pcDNA3 (obere Abbildung) oder Arf6-WT-HA-pcDNA3 (untere Abbildung) und pcDNA3-BACE-1-myc kotransfiziert wurden und die Koexpression von pcDNA3 bzw. Arf6-WT-HA und BACE-1-myc in stabil Flotillin-1- (B) und Flotillin-2- (C)-depletierten HeLa-Zellen. Die Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte anhand spezifischer Antikörper gerichtet gegen den myc-Tag von BACE-1 (rot) und HA-Tag von Arf6-WT (grün). Der angegebene Maßstab entspricht 10 μm .

5. Diskussion

5.1 Cholinerge EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten

Die GPCR-vermittelte Transaktivierung des EGFR ist ein bedeutender Bestandteil in einer Vielzahl von Studien, in denen der molekulare Mechanismus der EGFR-Transaktivierung detaillierter charakterisiert und in verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden konnte^{72,73}. Durch die Aktivierung des EGFR werden verschiedenste zelluläre Effekte vermittelt, inklusive der Proliferation, Differenzierung, Migration und Überlebensprozesse der Zelle, sowie die Inhibierung apoptotischer Prozesse²³⁰⁻²³³. Der molekulare Mechanismus der cholinergen EGFR-Transaktivierung und die dadurch vermittelte Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade konnten ebenfalls für epidermale Keratinocyten²³⁴, wie HaCaT-Zellen beschrieben werden¹⁰⁶. In primären epidermalen Keratinocyten wird die EGFR-Transaktivierung als ein bedeutender Mechanismus für die Regulation der Proliferation, des Wachstums und der Migration^{99,234,235}, die u.a. auch an der Wundheilung und Tumorgenese beteiligt sind, postuliert^{236,237}. In HaCaT-Keratinocyten wird die cholinerge ERK-Aktivierung komplett abhängig von einem extrazellulärem EGFR-Transaktivierungsmechanismus vermittelt, wobei dies der hauptsächliche Mechanismus zu sein scheint, der von mAChRs zur Aktivierung der MAPK-Kaskade in diesen Zellen genutzt wird¹⁰⁶. Die durch mAChRs extrazellulär vermittelte Transaktivierung des EGFR findet über den Mechanismus des TMPS statt, in welchem die Aktivierung von MMPs und ADAMs zur proteolytischen Freisetzung von EGFR-Liganden und letztendlich zur Aktivierung des EGFR und der MAPK-Kaskade führt^{75,77}. Die Aktivierung von ERK1/2 resultiert u.a. in der Transkriptionsregulation von Genen kodierend für cFos, Dusp1 und Egr1 (*Immediate early genes*). In HaCaT-Keratinocyten ist jedoch in diesem Zusammenhang nur wenig über die transkriptionellen Effekte, welche durch die cholinerge EGFR-Transaktivierung und der nachgeschalteten ERK/MAPK-Aktivierung vermittelt werden, bekannt. In dieser Studie konnte die cholinerge Aktivierung von ERK1/2 bestätigt werden und zusätzlich eine Erhöhung der Proteinmenge von Egr1 nach mAChR-Stimulierung nachgewiesen werden. Damit korrelierend konnte eine deutliche Erhöhung der Egr1-Transkriptmenge und im Weiterem eine Induktion der Dusp1- und cFos-Genexpression nach cholinenger Stimulation gezeigt werden. In weiteren Versuchen wurde mittels spezifischer Inhibitoren für die Hemmung von mAChRs, EGFRs und MEK1/2 eine Abhängigkeit der Egr1-Induktion von der EGFR-Transaktivierung nach cholinergen Stimulus nachgewiesen, da nach Inhibierung der genannten Komponenten des Transaktivierungsmechanismus, sowie der MAPK-Kaskade eine cholinerge Induktion ausblieb. In diesem Kontext ist bekannt, dass eine Aktivierung und Translokation von ERK1/2 in den Zellkern die Aktivierung des Transkriptionsaktivators Elk-1 vermittelt, welches wiederum an das *serum response element* (SRE) in der Promotorregion von verschiedenen

Genen, u.a. auch des Egr1-Genes bindet²³⁸. Die Resultate dieser Studie weisen somit auf eine direkte cholinerg-induzierte Transkriptionsregulation von Egr1-Genen vermittelt über die EGFR-Transaktivierung, sowie ERK1/2-Aktivierung und ERK1/2-nachgeschalteter Transkriptionsaktivatoren hin. Im Gegensatz dazu scheint die cholinerge Transkription von cFos und Dusp1 nur partiell über die EGFR-Transaktivierung reguliert zu werden. Anhand der quantitativen RT-PCR ließ sich keine cholinerge Induktion dieser Gene nach Hemmung von mAChRs nachweisen, wobei die cholinerge Induktion nach EGFR-Hemmung nur partiell inhibiert wurde. Diese Resultate weisen daraufhin, dass die cFos- und Dusp1-Genregulation nach cholinergem Stimulus durch weitere cholinerg-aktivierte Signalwege unabhängig von der EGFR-Aktivität reguliert werden. Am Beispiel der cholinergen Dusp1-Induktion, die zusätzlich unabhängig vom MEK1/2 bzw. ERK1/2-Aktivierung zu sein scheint, lässt sich eine cholinerge Transkriptionsregulation durch einen zweiten mAChR-vermittelten Aktivierungsmechanismus vermuten. In diesem wird nach Stimulation eines mAChR der EGFR über einen intrazellulären Mechanismus aktiviert, der u.a. durch Ca^{2+} , der PYK-2- oder Fyn-Kinase vermittelt sein könnte^{239,240}. Nachfolgend wird über die PI3K und Src-Kinase die Akt-Kinase aktiviert, wobei der Akt-Signalweg die Transkriptionsregulation von Dusp1 nach cholinergem Stimulus beeinflussen könnte. Die cholinerge Induktion dieser Gene impliziert eine Rolle der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung in der transkriptionellen Genregulation. Im Zusammenhang mit der cholinergen EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten beschäftigten sich bereits frühere Studien mit der Fragestellung, welche mAChRs an diesem Prozess beteiligt sind. Unter Verwendung der quantitativen RT-PCR-Analyse konnte die Expression aller 5 mAChR-Subtypen in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden¹⁰⁶, wobei in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Metzger *et al.* das höchste Expressionslevel für den M₃ mAChR bestätigt werden konnte²⁰⁵ und die M₁, M₂ und M₄ Subtypen ein geringeres Expressionslevel aufwiesen¹⁰⁶. Durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren spezifisch für einen bestimmten mAChR-Subtyp konnte die Beteiligung von bestimmten mAChRs an der cholinergen MAPK-Aktivierung identifiziert werden. Dabei konnte ein starker inhibitorischer Effekt auf die cholinerge ERK-Aktivierung durch die Inhibierung des M₁- und M₃-Subtyps beobachtet werden, das stark auf eine Beteiligung der mAChR-Subtypen M₁ und M₃ an der EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Zellen hindeutet¹⁰⁶.

5.1.1 Einfluss der cholinergen EGFR-Transaktivierung auf die Genregulation der MMP/ADAM-Familie und EGF-ähnlicher Liganden

Wie bereits im Abschnitt 5.1 für HaCaT-Keratinocyten beschrieben wurde, führt die mAChR-vermittelte EGFR-Transaktivierung durch den MMP/ADAM-abhängigen Mechanismus des TMPS zur Aktivierung der MAPK-Kaskade. Bisher sind jedoch die Effekte der cholinergen

ERK/MAPK-Aktivierung auf die Transkriptionsregulation von MMPs/ADAMs und EGF-ähnliche Liganden nicht untersucht wurden. In diesem Kontext wird angenommen, dass die durch cholinerge EGFR- und MAPK-Aktivierung induzierten transkriptionellen Effekte zu einer erhöhten Expression von Genen führt, deren Genprodukte an der EGFR-Transaktivierung beteiligt sind. Dementsprechend lag der Fokus dieser Studie in erster Linie auf der Untersuchung eines cholinergen Effekts auf die Transkriptionsregulation von Genen kodierend für bestimmte Metalloproteinasen der MMP- und ADAM-Familie, sowie EGF-ähnlichen Liganden in HaCaT-Keratinocyten. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen, konnte die Expression aller 7 EGFR-Liganden, sowie von ADAM8, 10, 17 und MMP-1, -2, -3, -7, -9 anhand der quantitativen PCR in HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang beschäftigte sich eine Vielzahl von Studien in anderen Zelllinien mit der Identifizierung von MMPs/ADAMs und EGF-ähnlicher Liganden, die an der EGFR-Transaktivierung beteiligt sind. Dabei konnte insbesondere die Beteiligung der EGFR-Liganden HB-EGF, TGF- α ²¹¹ und AREG²¹⁰, aber auch BTC²⁴¹ an der Liganden-abhängigen EGFR-Transaktivierung beschrieben werden. Zusätzlich konnte die Involvierung der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 an der EGFR-Aktivierung durch GPCRs nachgewiesen werden²⁴²⁻²⁴⁴. Unter der Vielzahl von ADAMs, die an der Ligandenprozessierung beteiligt sind²⁴⁵, wird jedoch nur ADAM10, 12, 15 und 17 eine Bedeutung für die EGFR-Transaktivierung durch GPCRs beigemessen¹⁰⁴. Des Weiteren konnte die Beteiligung bestimmter Metalloproteinasen der MMP- und ADAM-Familie an der spezifischen Ligandenprozessierung gezeigt werden, wobei insbesondere die Beteiligung von ADAM17 an der Prozessierung der für die EGFR-Transaktivierung bedeutendsten Liganden TGF- α , HB-EGF und AREG beschrieben wurde^{210,235,237,246-248}. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ADAM10^{249,250}, ADAM12²⁵¹ und ADAM15^{248,252}, sowie MMP-3²⁵³, MMP-7²⁵⁴, MMP-2 und -9²⁵⁵ ebenfalls in der Lage sind, HB-EGF zu prozessieren. Zusätzlich ist ADAM10 am *ectodomain shedding* von AREG während der GPCR-vermittelten Transaktivierung von EGFR beteiligt²⁵⁶. Die Prozessierung von EGF und BTC wurde bisher nur im Kontext mit ADAM10 beschrieben, wobei diese Liganden wahrscheinlich nicht durch ADAM17 prozessiert werden^{105,245,257}. Eine weitere Rolle von ADAM17 konnte jedoch in der Ligandenprozessierung von EGN und EREG bestätigt werden²⁵⁸. Zusätzlich ist bekannt, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp während der EGFR-Transaktivierung durch einen spezifischen GPCR-Agonist die Aktivierung verschiedener ADAMs vermittelt werden, die aber den gleichen EGFR-Liganden prozessieren können^{104,210,248}.

In dieser Arbeit konnte anhand der quantitativen RT-PCR-Analyse die Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, sowie ADAM8 und ADAM17 in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden, wobei nur für MMP-3 eine deutliche und reproduzierbare cholinerge Induktion der Genexpression gezeigt werden konnte. In bisherigen Untersuchungen konnte eine

transkriptionelle Regulation von MMPs nur nach einer direkten EGFR-Aktivierung durch EGF-Stimulation in verschiedenen Zelllinien, wie Fibroblasten und Tumorzellen, aber nicht in epidermalen Keratinozyten beschrieben werden. Dabei konnte in Fibroblasten eine Konzentrations-abhängige Hochregulierung der Genexpression von MMP-1, -3 und -7 und der Proteinsynthese nach EGF-Stimulierung nachgewiesen werden ^{259,260}. Zudem konnte in Blasenkrebs-Zellen eine erhöhte MMP-9 Proteinmenge nach EGF-Behandlung gezeigt werden, wohingegen die MMP-2 Expression sowohl in Krebszellen als auch in Fibroblasten nicht durch EGF beeinflusst zu sein scheint ^{259,261}. Außerdem zeigte sich in EGFR-defizienten embryonalen Fibroblasten ein geringeres mRNA-Level von MMP-2, -9, -11, -13 und -17. Zudem impliziert die Induktion der MMP-3 Expression unter Verwendung einer konstitutiv aktiven Form von MEK1 eine Rolle des ERK-Signalwegs als nachgeschalteter Effektor der EGFR-vermittelten MMP-Expression ²⁶².

Ein cholinergischer Effekt auf die Transkriptionsregulation von MMPs und EGFR-Liganden wurde bisher nur in einer Studie von Xie *et al.* im Zusammenhang mit der Dickdarm-Krebszelllinie H508 beschrieben ²⁶³. Im Gegensatz zu den in dieser Studie verwendeten HaCaT-Zellen sind in H508 Darmkrebszellen MMP-2 und MMP-3 nicht exprimiert, wohingegen aber eine ACh-induzierte transkriptionelle Hochregulierung von MMP-1, sowie zusätzlich von MMP-7 und MMP-10 detektiert werden konnten. Zusätzlich wird in diesem Kontext angenommen, dass die cholinerge Induktion durch Transkriptions-regulatorische Bereiche in den Promotorregionen der MMP-7-Gene reguliert wird, da diese potentielle Zielsequenzen für ERK-nachgeschaltete Transkriptionsregulatoren enthalten ²⁶³. Obwohl derselbe mAChR-Subtyp in H508- als auch HaCaT-Zellen an der EGFR-Transaktivierung beteiligt zu sein scheint, weist die nachgewiesene cholinerge Induktion von bestimmten MMPs auf eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation nach cholinergen Stimulus hin, die vermutlich u.a. abhängig vom Zelltyp und der Ligandenexpression variiert. Zudem konnte in dieser Studie anhand der Verwendung des mAChR-Inhibitors Atropin und spezifischer EGFR- und MEK1/2-Inhibitoren gezeigt werden, dass die transkriptionelle Induktion von MMP-3 nach cholinergischer Stimulation in HaCaT-Keratinozyten von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung abhängig ist. Die cholinerge Induktion von MMP-3 korreliert mit der im oberen Abschnitt erwähnten Beobachtung, welche die hochregulierte MMP-3 Expression nach direkter EGFR-Aktivierung und zudem eine Abhängigkeit der MMP-3 Induktion von der ERK/MAPK-Aktivierung zeigte ²⁶². Außerdem konnte eine EGF-induzierte Expressionserhöhung für MMP-2 in Fibroblasten detektiert werden ²⁶², wohingegen die MMP-2 Transkription nach cholinergischer Stimulation in HaCaT-Zellen nicht induziert wird. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die MMP-2 Genexpression nicht cholinerg über die mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung reguliert wird, aber in einigen Zelltypen von einer EGF-induzierten EGFR/MAPK-Aktivierung abhängig ist. Durch die in HaCaT-Zellen intermittierend nachgewiesene Reduktion des basalen

Transkriptlevels von MMP-1 und ADAM17 nach Hemmung von EGFR und MEK1/2, deren Genexpression ebenfalls nicht cholinerg induziert zu sein scheint, kann die Vermutung einer EGFR/MAPK-abhängigen Genregulation bestimmter MMPs bestärkt werden. Prinzipiell können jedoch die Effekte einer EGF- oder cholinergen Stimulation auf die Genregulation von MMPs, wie am Beispiel von MMP-2, auch Zelltyp-spezifisch vermittelt werden. Zusätzlich konnte in HaCaT-Keratinocyten ein verringertes mRNA-Level von MMP-1, MMP-2, ADAM10 und ADAM17 nach einer spezifischen Inhibierung von EGFR und MEK1 nachgewiesen werden. Außerdem wird die in H508-Darmkrebszellen nachgewiesene cholinerge Induktion von MMP-7 nicht über den PI3K/Akt-Signalweg, sondern durch die EGFR-Transaktivierung und post-EGFR-ERK-Signalwege vermittelt ²⁶³. In Übereinstimmung mit diesem Befund ist die cholinerg-induzierte MMP-3 Transkriptionsregulation von der EGFR/MAPK-Aktivierung abhängig, jedoch wird die ERK-Aktivierung in HaCaT-Keratinocyten vollständig durch den MMP-vermittelten EGFR-Transaktivierungsmechanismus und unabhängig von der Src/Akt/PI3K-Aktivierung vermittelt ¹⁰⁶.

Obwohl sich viele Studien mit der strukturellen und funktionellen Analyse von EGF-ähnlichen Liganden beschäftigten und eine Vielzahl von Funktionen in der Entwicklung und Physiologie in unterschiedlichsten Zelltypen, sowie in der Pathogenese beschrieben werden konnte, wurde die transkriptionelle Regulation von EGF-ähnlichen Liganden durch einen cholinergen Stimulus bisher jedoch nicht näher betrachtet. In Keratinocyten sind EGF-ähnliche Liganden u.a. an der Regulation der Zellproliferation, Migration, Zelladhäsion, inflammatorischen Prozessen ^{264,265}, sowie an der Wundheilung ²⁶⁶ und Tumorgenese ²⁶⁷⁻²⁶⁹ beteiligt. Anhand der quantitativen PCR gelang in dieser Studie der Expressionsnachweis aller sieben EGF-ähnlichen Liganden in HaCaT-Keratinocyten, wobei jedoch nur vier EGFR-Liganden, inklusive HB-EGF, TGF- α , AREG und EREG nach cholinenger Stimulation transkriptionell induziert werden. Bisher konnten nur vier EGF-ähnliche Liganden, inklusive TGF- α ²⁰¹, AREG ²⁰⁴, HB-EGF ²⁰² und EREG ²⁰³ in epidermalen Keratinocyten identifiziert werden. Zudem konnten unterschiedliche Expressionslevel dieser EGFR-Liganden in nicht-stimulierten Keratinocyten nachgewiesen werden, wobei diese eine detektierbare Menge an AREG-mRNA aufwiesen, aber nur sehr geringe Transkriptmengen von TGF- α , HB-EGF und EREG mittels der semiquantitativen PCR gemessen werden konnten ²⁰³. In dieser Arbeit konnte zusätzlich dazu eine klare Abhängigkeit der cholinergen Induktion von HB-EGF und TGF- α von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und nachgeschalteten MAPK-Aktivierung gezeigt werden. Die cholinerge Transkription von AREG wird zwar abhängig von der MAPK-Aktivierung reguliert, zeigte aber keine eindeutige Abhängigkeit von einer mAChRs- oder EGFR-Aktivierung. Im Gegensatz dazu wird die EREG-Transkription abhängig von der cholinergen Aktivierung des mAChR und EGFR in HaCaT-Zellen reguliert. Die Resultate am Beispiel von EREG und AREG lassen vermuten, dass die Transkription von

EGFR-Liganden zwar cholinerg induziert wird, aber auch weitere intrazelluläre Signalwege an der Transkriptionsregulation beteiligt sein können. Insbesondere die Abhängigkeit der cholinergen EREG-Induktion von der mAChR- und EGFR-Aktivität, die aber zumindest teilweise unabhängig von der MAPK-Kaskade vermittelt zu sein scheint, deutet darauf hin, dass während der cholinergen EGFR-Transaktivierung ein anderer EGFR-nachgeschalteter Signaltransduktionsweg unabhängig von der MEK/ERK-Aktivierung die EREG-Transkription reguliert. Die spezifische Hochregulierung der MMP- und EGFR-Ligandenexpression, die sowohl in HaCaT- als auch H508-Zellen²⁶³ gezeigt werden konnte, weist auf einen positiven *feed-forward*-Mechanismus hin, der durch die cholinerg-induzierte Aktivierung des mAChR/EGFR/MAPK-Signalwegs vermittelt wird. Durch diesen Mechanismus wird gewährleistet, dass durch die EGFR-Transaktivierung vermittelte Transkriptionserhöhung und folglich den Anstieg der Proteinmenge mehr prozessierbare EGFR-Liganden und MMPs/ADAMs zur Verfügung gestellt werden, welche den Transaktivierungsprozess vorantreiben. In dieser Studie wurde jedoch der *feed-forward*-Mechanismus in HaCaT-Zellen nicht weitergehend geprüft und bedarf weiterer Untersuchungen, wie die Analyse der freigesetzten Liganden auf Proteinebene.

In HaCaT-Keratinocyten ist bisher nicht bekannt, welche Metalloproteinasen der MMP- und ADAM-Familie während der cholinergen EGFR-Transaktivierung aktiviert und welche EGF-ähnlichen Liganden durch diese prozessiert und ausgeschüttet werden. Da die ADAM/MMP-Aktivierung und EGFR-Ligandenprozessierung Zelltyp-spezifisch ist und zudem abhängig von den beteiligten mAChRs zu sein scheint²⁴⁸, benötigt es weitere Untersuchungen der MMP-katalysierten Ligandenfreisetzung während des Transaktivierungsmechanismus in HaCaT-Zellen, wie beispielsweise durch das *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Erste Hinweise auf eine Beteiligung bestimmter EGFR-Liganden an der mAChR-vermittelten Transaktivierung konnten durch eine frühere Studie, in der die EGFR-Endozytose in Abhängigkeit einer Stimulation mit EGF, HB-EGF und TGF- α untersucht wurde, erbracht werden. Dabei konnte keine CCh-induzierte EGFR-Endozytose beobachtet werden, wohingegen EGF, HB-EGF und TGF- α dessen Endozytose bewirken¹⁰⁶. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass sich je nach EGFR-Ligand die Kinetik der Endozytose und die post-endozytotische Sortierung unterscheiden kann, wobei HB-EGF neben BTC am effizientesten die Endozytose induzieren kann²⁷⁰. Obwohl in verschiedensten Publikation gezeigt werden konnte, dass HB-EGF und TGF- α an EGFR binden und zudem an der EGFR-Transaktivierung beteiligt sind^{210,211}, ist es jedoch aufgrund ihrer Rolle in der Vermittlung der EGFR-Endozytose¹⁰⁶ unwahrscheinlich, dass diese EGFR-Liganden in den Transaktivierungsmechanismus involviert sind. Jedoch kann eine Beteiligung dieser EGFR-Liganden in der EGFR-Aktivierung nach cholinergischer Stimulation in HaCaT-Keratinocyten nicht ausgeschlossen werden. Um der Frage nachzugehen, warum die Genexpression von HB-EGF und TGF- α trotzdem durch einen

cholinergen Stimulus hochreguliert ist, bietet sich die Theorie eines *cross-induction* Mechanismus an, der bereits in einigen früheren Studien in Keratinozyten nachgewiesen werden konnte^{202,203,271}. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass einige EGF-ähnliche Liganden in der Lage sind, die Transkription weiterer Liganden zu induzieren. Insbesondere im Hinblick auf diese Studie, in der die Expression von HB-EGF, EREG, AREG und TGF- α nachgewiesen wurde, konnte eine EREG-induzierte Erhöhung des mRNA-Levels von TGF- α , HB-EGF und AREG beschrieben werden. Zudem wurde eine verstärkte mRNA-Synthese von EREG durch Stimulierung mit den EGFR-Liganden TGF- α , HB-EGF und AREG beobachtet. Diese Beobachtungen zeigen, dass die vier EGFR-Liganden über den *cross-induction* Mechanismus miteinander interagieren und deuten darauf hin, dass die EREG-Genexpression potentiell durch TGF- α , HB-EGF und AREG autokrin induziert werden kann²⁰³. Diese Befunde und der mögliche Ausschluss von TGF- α und HB-EGF aufgrund der durch sie vermittelten EGFR-Endozytose lassen eine besondere Rolle von EREG, aber auch AREG an der cholinergen EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinozyten vermuten.

5.1.2 Cholinerge Induktion der Flotillin-Genexpression

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit geht hervor, dass die Genexpression von Flotillinen durch einen cholinergen Stimulus induziert werden kann, was sowohl an einer Erhöhung des Transkriptlevels als auch der Proteinmenge von Flotillin-1 und -2 gezeigt werden konnte (Abb. 4.5). In diesem Zusammenhang konnten anhand einer früheren Studie, in der die transkriptionelle Regulation von humanen und murinen Flotillinen untersucht wurde, bedeutende regulatorische Sequenzen in der proximalen Promotorregion nachgewiesen werden, durch welche die Expression von Flotillinen reguliert wird. Zudem ist die Promotoraktivität nach Wachstumsfaktor-Stimulierung und der dadurch vermittelten Aktivierung des MAPK-Signalwegs erhöht, wodurch die Gene von Flotillin-1 und -2 als transkriptionelle Zielgene von ERK1/2 identifiziert wurden¹⁴⁴. Nach Wachstumsfaktor-stimulierter Aktivierung des MAPK-Signalwegs dimerisieren aktivierte ERK1/2 und translozieren in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren wie Elk-1^{272,273} und cFos^{274,275} binden und phosphorylieren können. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 wiederum bildet einen Komplex mit dem *Serum response factor* (SRF) und bindet im Komplex mit diesem an ein *Serum response element* (SRE) in der Promotorregion verschiedener *immediate early genes* (unmittelbare induzierte Gene), wie cFos¹⁴³ und Egr1¹⁴². In Übereinstimmung damit konnte in dieser Studie eine EGF-induzierte ERK1/2-Aktivierung, sowie eine Zunahme des Egr1-Proteinlevels nach 2-stündiger EGF-Stimulierung in HaCaT-Keratinozyten gezeigt werden. Zusätzlich konnten verschiedene Bindungsregionen für Egr1 und das SRE innerhalb humaner Flotillin-Promotor gefunden werden¹⁴⁴, wobei Egr1 und SRE die Genexpression unabhängig voneinander oder in Kooperation induzieren können²⁷⁶. Durch diesen Prozess wird die Promotoraktivierung und

somit die Genexpression von Flotillinen mit ERK1/2 und Egr1 als bedeutende Flotillin-Transkriptionsregulatoren bewirkt.

5.1.3 Flotilline als bedeutende Regulatoren in der cholinergen EGFR-Transaktivierung und nachgeschalteten Transkriptionsregulation

In dieser Studie konnte korrelierend mit einer reduzierten ERK1/2-Aktivierung eine deutliche Inhibierung der cholinergen Induktion der MAPK-Zielgene cFos, Dusp1 und Egr1 in Flotillin-1-depletierten HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesem Befund geht aus vorangegangenen Untersuchungen an HaCaT-Zellen hervor, dass die cholinerge EGFR-Transaktivierung und die nachgeschaltete MAPK-Aktivierung von Flotillin-1 abhängig sind²¹⁷. Zudem zeigten vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe, dass Flotilline eine bedeutende Rolle in der RTK/MAPK-Signaltransduktion spielen, wobei durch eine Depletion von Flotillin-1 die EGF-induzierte Phosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten des EGFR verringert, was zu einer ineffizienten Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt^{130,131}. Des Weiteren wird durch die Depletion von Flotillin-1 das EGF-induzierte Clustering des EGFR reduziert¹³⁰. Dieser Defekt im EGFR-Clustering könnte mit der Abhängigkeit der Flotilline voneinander, sowie der Bildung von Heterooligomeren in Zusammenhang gebracht werden. Dabei wird durch die Depletion von Flotillin-1 die Bildung von Flotillin-Heterooligomeren gehemmt, wobei zusätzlich die Flotillin-2-Homooligomerisierung induziert werden könnte^{127,128,131}. Die Flotillin-abhängige Komplexbildung könnte zum Zusammenbringen essentieller Signalkomponenten, wie u.a. Grb2 an der Zelloberfläche führen und somit zur MAPK-Aktivierung beitragen. Zudem könnte Flotillin-1 auch an der Lokalisation des EGFR in *Membrane rafts* beteiligt sein¹³⁰. Zusätzlich zu dem direkten Einfluss auf die EGFR-Aktivierung konnte eine weitere Funktion von Flotillin-1 in der Regulation der EGFR-nachgeschalteten MAPK-Signaltransduktion beschrieben werden. In diesem Kontext konnte eine direkte Interaktion von Flotillin-1 mit verschiedenen Kinasen der MAPK-Signalkaskade, wie MEK1/2 und ERK1/2 gezeigt werden, aufgrund dessen Flotillin-1 eine Bedeutung als *bona fide* Gerüstprotein in der Regulation des MAPK-Signalwegs zugeschrieben wird¹³⁰. Da die Depletion von Flotillin-1 eine verringerte Aktivierung des EGFR und der nachgeschalteten ERK-Aktivierung zur Folge hat¹³⁰, wird dadurch auch die EGF-induzierte Transkription bestimmter ERK1/2-Zielgene reduziert. Eine Depletion von Flotillin-2 bewirkt jedoch keine Reduktion der cholinergen Aktivierung von ERK1/2¹³⁰ und Induktion der MAPK-Zielgene, wobei aber eine leichte Reduktion der Flotillin-1-Proteinmenge nachgewiesen werden konnte. Das verbleibende Flotillin-1 scheint jedoch für eine effiziente ERK1/2-Aktivierung und die nachgeschaltete Transkriptionsregulation von MAPK-Zielgenen in Flotillin-2-depletierten Zellen auszureichen. Durch diese vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass

Flotilline, insbesondere Flotillin-1, durch ihre Funktionen in der EGF-vermittelten EGFR/MAPK-Signaltransduktion¹³⁰ einen bedeutenden Einfluss auf die Transkriptionsregulation von MAPK-Zielgenen, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor *Egr1* haben¹⁴⁴.

Wie in dieser Studie gezeigt werden konnte, ist die cholinerge Induktion der Genexpression von bestimmten MMPs/ADAMs und EGF-ähnlicher Liganden abhängig von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und der damit verbundenen Aktivierung des MAPK-Signalwegs. Da wiederum eine Abhängigkeit der cholinergen EGFR/MAPK-Aktivierung und der dadurch vermittelten transkriptionellen Induktion von Flotillin-1 nachgewiesen werden konnte, ist ein zusätzlicher Einfluss von Flotillin-1 auf die cholinerg-induzierte Genexpression der EGFR-Liganden HB-EGF, TGF- α , AREG und EREG, sowie von MMP-3 denkbar. In Übereinstimmung damit konnte eine deutlich verringerte cholinerge Induktion der Genexpression der vier EGFR-Liganden und MMP-3 nach einer Depletion von Flotillin-1 nachgewiesen werden. Die cholinerge Genexpression des EGFR-Liganden EREG wird als Einziges unabhängig von der MAPK-Aktivierung induziert. Dadurch konnte übereinstimmend mit vorherigen Befunden der Einfluss von Flotillin-1 auf die EGFR-Aktivierung¹³⁰ auch während des cholinergen Transaktivierungsmechanismus bestätigt werden, wobei eine deutlich reduzierte Induktion von EREG nach cholinerg Stimulation in Flotillin-1-depletierten Zellen ersichtlich wird. Durch zwei frühere Studien können Flotilline außerdem mit der Aktivierung von mAChR als initialen Schritt der cholinergen EGFR-Transaktivierung in Zusammenhang gebracht werden. In SB2 Melanom-Zellen konnte eine Interaktion von Flotillin-2 mit dem GPCR *protease activated receptor-1* (PAR-1) und zusätzlich eine funktionelle Assoziation anhand der durch Überexpression von Flotillin-2 bedingten Hochregulierung von PAR-1 nachgewiesen werden¹³⁹. Bedeutend für diesen Kontext konnte in UTP-aktivierten Zellen Flotillin-2 als ein Bindungsprotein der G-Proteinuntereinheit *Gaq* identifiziert werden. Dabei ist die Interaktion von Flotillin-2 mit der *Gaq*-Untereinheit des PY2-Nukleotidrezeptors unabhängig vom Nukleotidbindungszustand bzw. der Aktivität des *Gaq*-Proteins¹⁴⁷. Die mAChR-Subtypen M_1 , M_3 und M_5 sind ebenfalls bevorzugt an die trimere G-Proteinuntereinheit *Gaq* gekoppelt, durch welche die nachgeschaltete Signaltransduktion dieser mAChRs vermittelt wird. Mit besonderem Fokus auf den M_3 mAChR, der in HaCaT-Zellen das höchste Expressionslevel aufweist und zudem an der cholinergen EGFR-Transaktivierung beteiligt zu sein scheint, ist dementsprechend ein Einfluss von Flotillinen ebenso auf die Aktivierung von mAChRs möglich. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die cholinerge Transkriptionsinduktion von bestimmten Genen, die an der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung in HaCaT-Keratinocyten beteiligt sind, nicht nur abhängig von der cholinerg vermittelten EGFR- und MAPK-Aktivierung ist, sondern zusätzlich durch Flotillin-1 reguliert wird.

5.2 Die Kooperation von Flotillinen und Arf6 in endosomalen Transportprozessen

Erste Hinweise, welche für die Untersuchung einer Kooperation von Flotillinen und Arf6 im endosomalen Transport von Bedeutung sind, konnten aufgrund einer funktionellen Beteiligung beider Proteine an diversen Membrantransportprozessen beschrieben werden. Zudem sind Flotilline als Bestandteile von *Membrane raft*-Mikrodomänen identifiziert wurden und eine Funktion von Arf6 als Recyclingfaktor konnte beim Transport von *Membrane raft*-Komponenten zur Plasmamembran beschrieben werden²⁷⁷. Eine Beteiligung beider Proteine wird unter Anderem an der Clathrin-unabhängigen Endozytose von bestimmten Proteinen und Rezeptoren angenommen^{127,128,182,190,219,278}. Sowohl Flotilline als auch Arf6 wurden dabei als Schlüsselfaktoren in der Regulation von Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen beschrieben²⁷⁹. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass zumindest Flotillin-1 an Clathrin-unabhängigen Endozytoseprozessen beteiligt ist^{114,221}, wohingegen Arf6 an Clathrin-vermittelten als auch an Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen von verschiedenen Proteinen, u.A. einigen GPCRs involviert ist^{189,194}. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise anhand einer Depletion von Arf6 eine Inhibierung der M₂-Internalisierung nachgewiesen werden¹⁸⁹. Zudem konnten neben dem M₂ mACR u.a. auch das Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Protein CD59 und BACE-1 als Frachtmoleküle von Arf6 identifiziert werden^{228,280,281}. Ein theoretischer Zusammenhang zwischen Flotillinen und Arf6 lässt sich anhand der Clathrin-unabhängigen Internalisierung des CD59 vermuten, da die Depletion von Flotillin-1 anscheinend zu einer reduzierten Internalisierung des Arf6-Frachtmoleküls CD59 führt¹¹⁴.

5.2.1 Der Einfluss von Arf6 auf die EGF-vermittelte Endozytose von Flotillinen

Basierend auf vorherigen Untersuchungen, die auf eine Internalisierung von Flotillinen über einen Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg hinweisen²⁸², an welchem auch die kleine GTPase Arf6 beteiligt sein kann^{114,283,284}, wurde in dieser Studie der Einfluss von Arf6 auf die EGF-induzierte Endozytose von Flotillinen untersucht. In diesem Kontext ist bereits bekannt, dass Flotilline als Regulatoren des MAPK-Signalwegs dienen²⁸⁵ und während der EGFR-Signaltransduktion endozytiert werden, aber die Aufnahme des EGFR von der Plasmamembran nicht beeinflussen¹³⁰.

Für die jeweiligen immunzytochemischen Studien wurden sowohl Arf6-WT als auch seine konstitutiv aktive (CA) und dominant negative (DN) mutierte Form in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Überexpression dieser HA-getagten Konstrukte war vor allem deshalb nötig, weil endogenes Arf6 durch spezifische Antikörper schlecht nachweisbar ist. Zudem konnte anhand der Überexpression einer bestimmten Arf6-Mutante die Wirkung eines spezifischen Aktivitätszustands von Arf6 analysiert werden. Vorab konnte anhand der immunzytochemischen Untersuchungen jedoch ein Einfluss der Überexpression von Arf6-

mutierten Formen auf verschiedene physiologische Prozesse, die u.a. auch phänotypisch in Erscheinung traten, beobachtet werden. Anhand der Immunfluoreszenz von Arf6-DN-überexprimierenden Zellen konnte ebenfalls wie in vorherigen Untersuchungen eine erhöhte Anzahl perinukleär lokalisierter Arf6-positiver Vesikel gezeigt werden, welche sich ebenfalls in ihrer Größe von physiologischen Vesikeln zu unterscheiden scheint^{287,288}. Die auch in dieser Studie beobachtete Ansammlung von Arf6-positiven vesikulären Strukturen könnte auf einen Kompensationsmechanismus der für die Zelle nicht tolerierbaren Konzentration der DN-Form zurückzuführen sein. Zusätzlich ließ sich mittels Immunfluoreszenzaufnahmen von Arf6-CA-exprimierenden Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation und Arf6-positive Aggregate im Zytosol nachweisen. Auch in diesen Fall scheint die Bildung von Aggregaten ein Kompensationsmechanismus der Zelle zu sein, um die toxische Wirkung der CA-Form einzuschränken. Zudem konnte auch ein teilweise atypischer Phänotyp der Arf6-CA-überexprimierenden Zellen beobachtet werden, welche in einigen Fällen sogar Plasmamembranausstülpungen auszubilden scheinen. Diese Effekte stehen im Zusammenhang mit der Beteiligung von Arf6 an der Regulation der Zytoskelett-Organisation. Beispielsweise kann dabei eine Aktin-Polymerisation die Bildung von Zellausläufern bewirken^{172,173}, wobei die überexprimierte CA-Form eine Dysregulation dieses Prozesses hervorrufen könnte.

Anhand der Überexpression von Arf6-WT, -CA- oder -DN konnte in dieser Arbeit eine Interaktion von Flotillinen mit Arf6 bestätigt werden. Zudem scheint die Aktivität von Arf6 keinen Einfluss auf die Flotillin-2-Lokalisation zu haben. Übereinstimmend mit vorherigen Untersuchungen zeigte sich eine eher dynamische subzelluläre Lokalisation von Flotillinen unter physiologischen Wachstumsbedingungen einer Zelle (Abb. 4.9)^{117,120,128}. Die Lokalisation von Flotillinen kann jedoch durch eine Stimulierung mit Wachstumsfaktoren verändert werden, bei welcher eine Flotillin-Translokation von der Plasmamembran in endosomale Kompartimente stattfindet^{121,127,129}. Die Regulierung der Wachstumsfaktor-induzierten Endozytose von Flotillinen wurde bereits in früheren Studien untersucht²⁸⁹, wobei jedoch ein Einfluss von Arf6 nicht näher betrachtet wurde. Anhand der Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Arf6-WT eine überwiegend endosomale Lokalisation und perinukleäre Akkumulation von Flotillin-2 vor und nach EGF-Stimulierung bewirkt (Abb. 4.10). In diesem Kontext ist bisher unbekannt, ob die EGF-induzierte Translokation von Flotillin-2 in endosomale Strukturen durch aktives Arf6 gefördert oder das Recycling von Flotillinen inhibiert wird. Interessanterweise konnte eine ähnliche intrazelluläre Akkumulation von Flotillinen in endosomalen Strukturen ebenso nach einer Depletion der schweren Kette von Clathrin oder Überexpression einer Dynamin-2-Mutante nachgewiesen werden²⁹⁰, wobei insbesondere das Recycling von Flotillinen vom Endosom zurück zur Plasmamembran dadurch beeinflusst zu sein scheint²⁹⁰. Die während des Serum-Entzugs beobachtete vermehrte Akkumulation von Flotillin-2 in endosomalen Kompartimenten nach

Arf6-WT-Überexpression könnte demzufolge auf einen möglichen Effekt von Arf6 auf das Recycling von Flotillinen hinweisen. Die Ergebnisse dieser Studie weisen jedoch auf einen Zusammenhang von Arf6 und der Endozytose von Flotillinen hin, da Flotilline nach Überexpression der Arf6-DN-Mutante überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert und im Vergleich zu Arf6-WT-überexprimierenden Zellen weniger in endosomalen Strukturen vorliegen. Letztendlich bleibt jedoch die Frage offen, ob Flotilline als Frachtmoleküle von Arf6 endozytiert werden oder ob Flotilline als Arf6-Effektoren dienen.

5.2.3 Einfluss von Flotillinen auf die Arf6-Aktivität – Sind Flotilline Arf6-Effektoren?

Für die Untersuchung der möglichen Effektorfunktion von Flotillinen auf die Arf6-Aktivität wurden GGA-Proteine verwendet. Die ubiquitär verbreitete GGA-Proteinfamilie aus *Trans-Golgi-Netzwerk* (TGN)- lokalisierten Hüllproteinen beinhaltet wiederum die drei Isoformen GGA1-3. GGA-Proteine vermitteln als monomere Clathrin-Adaptorproteine die Sortierung am TGN und sind allgemein an der Regulation von vesikulären Transportprozessen, beispielsweise zwischen Endosomen und dem TGN beteiligt ²²⁴. GGA-Proteine wurden aufgrund ihrer Funktion als Arf6-Effektoren, die bereits anhand früherer Studien beschrieben werden konnte (Abschnitt 4.2.5) ²²³, für diese Studie verwendet. Die Effektorfunktion von GGA-Proteinen wird u. A. durch die Arf-bindende GAT-Domäne vermittelt, welche neben einer N-terminalen VHS-Domäne, einer GAE (γ -Adaptin AP-1-homologe)-Domäne und der Clathrin-bindenden Hinge-Region die modulare Domänenstruktur von GGA-Proteinen bildet ²²⁴ (Abb. 4.11 A). Die Grundlage für die Untersuchung des Aktivitätszustands von Arf-Proteinen ist die von Dell'Angelica *et al.* nachgewiesene Bindung von Arf-Proteinen in Abhängigkeit von ihrem aktiven GTP-gebundenen Zustand an die GGA-GAT-Domäne ²²³. Die Interaktion von Arf-Proteinen mit der GGA-GAT-Domäne wurde zusätzlich durch Untersuchungen mittels einer nicht-funktionellen GAT-Domäne, an die Arf-Proteine auch in ihrer aktiven Konformation nicht binden konnten, bestätigt. Aufgrund der Interaktion von Arfs mit der GGA-GAT-Domäne wird durch den GDP-GTP-Zyklus von Arf-Proteinen *in vivo* die Rekrutierung von GGAs an bestimmte Membranen reguliert. Dies bestätigt wiederum, dass GGAs nicht als Regulatoren von Arf-GTPasen, wie etwa GEFs und GAPs, sondern als Arf6-Effektoren fungieren ²²³. Basierend auf dem Nachweis, dass eine GAT-vermittelte Interaktion der drei GGA-Isoformen mit allen sechs Arf-Proteinen möglich ist ²⁹¹, wurde in dieser Studie eine GGA3-VHS-GAT-trunkierte Version für die Untersuchung des Aktivitätszustandes von Arf6 verwendet. Anhand der Masterarbeit von Alexandra Zuk und durch Vorversuche dieser Studie zur Etablierung des Arf6-Aktivitäts-Assays konnte bestätigt werden, dass Arf6-WT und seine CA-mutierte Form in der Lage sind an GGA3-VHS-GAT zu binden, wohingegen eine deutlich verringerte Interaktion mit der Arf6-DN-Mutante nachgewiesen werden konnte ²⁸⁸. In diesem Zusammenhang konnte

zusätzlich anhand von Western Blot-Analysen der Proteinlysate von Arf6-WT, -CA und -DN-exprimierenden Zellen eine deutlich schwächere Expression von Arf6-DN im Vergleich zur WT- und CA-exprimierten Form gezeigt werden (Abb. 4.7). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich die überexprimierte Arf6-DN-Form negativ auf verschiedene zelluläre Prozesse auswirkt und aufgrund dessen möglicherweise vermehrt degradiert wird. Eine Degradation der ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten T27N-mutierten Form von Arf6-DN konnte auch in weiteren *in vitro* Studien gezeigt werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die T27N-Form dazu tendiert, ihr gebundenes GDP schneller zu verlieren. Als Alternative zur T27N-Form wurde deshalb die Verwendung der T44N-mutierten Arf6-Form vorgeschlagen, die eine deutlich verringerte Affinität zu GTP aufweist und somit wesentlich stabiler in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Konformation vorliegt²⁸⁷.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitäts-Assay konnte ein Einfluss von Flotillinen auf die Aktivität von Arf6 anhand stabil Flotillin-depletierter Zellen nachgewiesen werden. Dabei bewirkt sowohl eine Depletion von Flotillin-1 als auch Flotillin-2 eine deutlich verringerte Interaktion von Arf6 mit der VHS-GAT-Domäne von GGA3. Entsprechend der vorher beschriebenen Effektorfunktion von GGA3 gehen diese Befunde mit einer deutlich reduzierten Aktivität von Arf6 in Abwesenheit von Flotillin-1 und -2 einher, das wiederum auf eine Effektorfunktion von Flotillinen hinweist. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang eine Bindung von Flotillin-1 und -2 an GGA3-VHS-GAT nachgewiesen werden²⁸⁸. Demzufolge könnte Arf6 die Interaktion von Flotillinen mit GGA3 als Bindeglied unterstützen, was durch eine Depletion von Arf6 im Folgenden überprüft werden könnte. Zudem besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Flotilline einen direkten Einfluss auf GGA-Proteine haben und aufgrund dessen die Aktivität von Arf6 beeinflussen, das anhand eines direkten Pulldowns nachgewiesen werden könnte. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass Flotillin-1 an der Erkennung und Sortierung von ubiquitinierten Frachtproteinen beteiligt ist²⁹⁰. Da auch GGA3 in die Sortierung und dem Transport von ubiquitinierten Proteinen involviert ist²⁹², könnte darin ein Zusammenhang für die direkte Interaktion von GGA3 und Flotillinen vermutet werden²²⁹.

5.2.4 Der funktionelle Zusammenhang von Flotillinen und Arf6 am Membrantransport des Arf6-Frachtmoleküls BACE-1

Auf der Grundlage von zwei früheren Studien, welche auf eine Rolle von Flotillinen und Arf6 an der endosomalen Sortierung von BACE-1 hinweisen^{228,229}, wurde in dieser Arbeit die Kooperation beider Proteine an endosomalen Transportprozessen am Beispiel von BACE-1 untersucht. Anhand Immunfluoreszenzstudien ließ sich die Lokalisation von BACE-1 in Leervektor-transfizierten Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran und in vesikulären

Strukturen nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte nach Überexpression von Arf6-WT eine Bildung traubenartig angeordneter Arf6-positiver Strukturen beobachtet werden, wobei die Anzahl dieser Strukturen mit dem Arf6-Expressionslevel zu korrelieren scheint (Abb. 4.12 A). Diese Arf6-positiven vakuolären Strukturen wurden ebenfalls von Sannerud *et al.* nach Überexpression der Arf6-CA-Mutante nachgewiesen. Dabei konnte jedoch im Gegensatz zur ektopischen Expression von Arf6-WT (Abb. 4.12 A) eine Kolokalisation von Arf6-CA und BACE-1 in diesen vakuolären Strukturen gezeigt werden. Die Lokalisation BACE-1 in diesen Arf6-positiven Vakuolen interpretieren Sannerud *et al.* als eine durch die ektopische Expression der aktiven Arf6-Form verursachte Hemmung der endosomalen Sortierung des Arf6-Frachtmoleküls BACE-1²²⁸. Da anhand der Immunfluoreszenzstudien dieser Arbeit keine Kolokalisation von BACE-1 und Arf6-WT beobachtet wurde, ist die Bildung der traubenartigen Arf6-positiven Strukturen in diesem Fall wahrscheinlich auf das erhöhte Arf6-Expressionslevel zurückzuführen, wobei aber ein Einfluss der Arf6-Überexpression auf den endosomalen Transport von BACE-1 nicht ausgeschlossen werden kann. Übereinstimmend mit den Befunden von John *et al.* konnte nach Flotillin-Depletion eine veränderte subzelluläre Lokalisation von BACE-1 nachgewiesen werden, welche in einer Akkumulation von BACE-1 in perinukleären Bereichen resultiert (Abb. 4.12 B und C)²²⁹. Eine quantitative Auswertung der nach Flotillin-Depletion beobachteten Effekte auf die BACE-1-Lokalisation ist jedoch aufgrund des teilweise stark unterschiedlichen Arf6-Expressionslevels nicht möglich. Dennoch lassen die in dieser Studie gezeigten Resultate vermuten, dass möglicherweise durch die Depletion von Flotillin-2 die Ausbildung der traubenartigen Arf6-positiven Strukturen, die in Anwesenheit von Flotillinen nach Arf6-Überexpression nachgewiesen werden konnten, verringert ist. Zusammenfassend weisen die Resultate dieser Studie auf keinen kooperativen Einfluss von Arf6 und Flotillinen auf die endosomale Sortierung und den Membrantransport von BACE-1 hin.

Bereits in früheren Studien konnte eine Interaktion von Flotillin-1 und BACE-1 in HEK 293-Zellen nachgewiesen werden²⁹³, wobei die Untersuchungen von John *et al.* auf eine direkte Bindung von Flotillin-1 an das Dileucin-Motiv am zytoplasmatischen Ende von BACE-1 hinweisen. Im Gegensatz dazu scheint die BACE-1-Assoziation mit Flotillin-2 indirekt über die Heterooligomeresierung mit Flotillin-1 vermittelt zu sein²²⁹. Dieses Dileucin-Motiv ist ein spezifische Sortierungssignal (*acidic cluster dileucine*, ACDL) am C-terminalen Ende von BACE-1, welches sowohl die Endozytose als auch die endosomale Sortierung und das Recycling dieser Protease vermittelt²²⁵⁻²²⁷. Zudem stellt das Dileucin-Sortierungssignal Bindestellen für verschiedene Sortierungsfaktoren, wie beispielsweise für GGA-Proteine zur Verfügung, wodurch die Sortierung von BACE-1 in Endosomen stattfinden kann²⁹⁴. Außerdem scheint GGA2 mit Flotillin-1 um die Dileucin-Bindestelle in BACE-1 zu konkurrieren, das wiederum eine Rolle von Flotillin-1 in der endosomalen Sortierung von BACE-1 vermuten

lässt. Eine Depletion von Flotillin-1 bewirkt eine veränderte endosomale Lokalisation von BACE-1, wobei BACE-1 akkumuliert in späten endosomalen Strukturen in perinukleären Bereichen vorliegt. Zudem konnte in stabil Flotillin-depletierten Zellen ein erhöhtes Level von BACE-1 beobachtet werden, das eine erhöhte Halbwertszeit und eine verringerte Degradation von BACE-1 vermuten lässt²²⁹. Zusätzlich ist durch die Studien von Sannerud *et al.* Arf6 als bedeutender Regulator der BACE-1-Sortierung identifiziert wurden, wobei aktives Arf6 die Sortierung von BACE-1 zu frühen Endosomen vermittelt. Die Arf6-regulierte Sortierung von BACE-1 ist ebenfalls abhängig von dem C-terminalen Dileucin-Motiv in BACE-1, wobei jedoch bisher keine direkte Interaktion von Arf6 und BACE-1, beispielsweise über das Dileucin-Motiv gezeigt werden konnte und diese Interaktion möglicherweise durch GGA-Proteine vermittelt wird.

5.3 Ausblick

5.3.1 Die Rolle der GPCR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und Flotillinen in der Karzinogenese

In vielen Krebsarten sind GPCRs²⁹⁵, sowie der EGFR und/oder seine endogenen Liganden überexprimiert²⁹⁶ und tragen durch die autokrine Aktivierung verschiedener Signalwege zur Proliferation und Wachstum von Krebszellen bei. Somit hat eine Fehlfunktion von GPCR-EGFR-*Crosstalk*-Signalwegen einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf von verschiedenen Krebserkrankungen und ist wiederum mit einer schlechten Prognose und Überlebensrate verbunden²⁹⁷. Der Zelltyp-spezifische *Crosstalk* zwischen GPCR und dem EGFR konnte in verschiedensten Krebstypen, wie Lungen-, Brust-, Prostata-, Ovarial- und Darmkrebs^{231,243,263,298,299}, sowie in verschiedenen Kopf/Hals-Karzinomen (u.a. Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches, HNSCC)^{300,301} nachgewiesen werden. In einer Vielzahl von Studien konnte außerdem eine Verbindung zwischen der Karzinogenese und MMP/Liganden-vermittelten Transaktivierung des EGFR (TMPS) gezeigt werden^{244,248,252,256,263}. Demzufolge könnte ein detailliertes Verständnis des cholinergen, MMP/Liganden-vermittelten EGFR-Transaktivierungsmechanismus und der nachgeschalteten Signalwege zur Charakterisierung bestimmter Krebstypen beitragen, sowie als Therapieansatz dienen. Für die Untersuchung einer Beteiligung von bestimmten Liganden und MMPs an cholinerg-induzierten Effekten auf die Zellproliferation könnten zum Einem Inhibitoren verwendet werden, welche die Freisetzung von spezifischen EGFR-Liganden (z.B. CRM197 als spezifischer nicht-toxischer Inhibitor der HB-EGF-Freisetzung) und MMPs hemmen (u.a. GM6001 als nicht-selektiver MMP-Inhibitor). Zum anderen könnten neutralisierende Antikörper gegen einen bestimmten Liganden verwendet werden. Zudem kann die Freisetzung

spezifischer Liganden während der cholinergen EGFR-Transaktivierung in verschiedenen Zelllinien anhand des ELISA-Assays sowohl in den Proteinextrakten als auch im Kulturmedium bestimmt werden. Im Folgenden könnten Zellen mit einem konditionierten Kulturmedium von cholinerg stimulierten und GPCR-exprimierenden Zellen bzw. mit einem Medium angereichert mit bereits bekannten EGFR-Liganden kultiviert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, welcher spezifische EGF-ähnliche Ligand einen Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Signalwege oder auch auf die Proliferation nach cholinerg Stimulation haben könnte. In diesem Kontext wurde insbesondere die Beteiligung der EGFR-Liganden HB-EGF, TGF- α und AREG, sowie verschiedener Metalloproteinasen der ADAM- und MMP-Familie (einschließlich MMP-2, -7, ADAM10, -15 und -17) an der Proliferation, Überlebensprozessen, Migration, Invasion und Metastasierung von verschiedenen Krebszelltypen beschrieben^{244,248,252,256,263}. Die vollständige Charakterisierung der GPCR-vermittelten EGFR-Transaktivierung, sowie die dadurch regulierten Signalwege und die transkriptionellen Regulation der Genexpression könnte insbesondere im Hinblick auf die Krebstherapie als Grundlage zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika beitragen. Neben der bereits bekannten Inhibierung des EGFR durch Gefitinib und Erlotinib könnten weitere Krebsmedikamente in Kombination verwendet werden, die in verschiedene Schritte der cholinergen EGFR-Transaktivierung eingreifen, einschließlich der Inhibierung von bestimmten GPCRs, MMPs/ADAMs und der EGFR-Liganden-Freisetzung. Dieser Therapieansatz wäre vor allem für Patienten von Bedeutung, die auf bisherige Medikamente bspw. EGFR-Inhibitoren nicht ansprechen (sog. *Non-Responder*).

Zudem konnte anhand vorheriger Studien eine funktionelle Verbindung von Flotillinen zu verschiedenen humanen Krebsarten dargestellt werden (zusammengefasst in¹³⁸). Von Bedeutung ist dabei insbesondere die Rolle von Flotillinen in der Regulation von zellulären Signalwegen, die wiederum die Proliferation und Überlebensprozesse der Zelle steuern. Einer dieser Signalwege ist dabei die EGFR/MAPK-Signaltransduktion, in der eine Beteiligung von Flotillinen bereits beschrieben wurde¹³⁰. Zusätzlich konnte anhand dieser Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere Flotillin-1 einen entscheidenden Einfluss auf die cholinerge EGFR-Transaktivierung und die Aktivierung der nachgeschalteten MAPK-Kaskade, sowie auf die dadurch vermittelte transkriptionelle Regulation von verschiedenen Genen hat (Abschnitt 5.3 und 5.4). Bedeutend ist zudem eine Überexpression von Flotillinen in verschiedenen Krebszelltypen (zusammengefasst in¹³⁸), die mit einer Invasion und Metastasierung, sowie dadurch zumeist mit einer niedrigen Überlebensrate verbunden ist. In diesem Zusammenhang konnte am Beispiel von Brustkrebs gezeigt werden, dass eine Depletion von Flotillin-1 die Inhibierung der Proliferation und Tumorentwicklung bewirkt³⁰². Außerdem konnte eine erhöhte Flotillin-2-Expression in einer tumorigenen Melanoma-Zelllinie nachgewiesen werden, wobei diese Überexpression vor allem mit Lymphknoten-Metastasen assoziiert ist¹³⁹. Eine Überexpression von Flotillin-1 konnte wiederum in Lungenadenokarzinom-, hepatozellulären

Karzinom- und in ösophagealen Plattenepithel-Zellen gezeigt werden^{303,304}. Basierend auf dem genauen Kenntnis einer Beteiligung von Flotillinen an der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und MAPK-Signalwege könnten Krebstherapeutika entwickelt werden, die einen gezielten Einfluss auf Flotilline haben und so in bestimmte Signalwege, die zur Karzinogenese beitragen, eingreifen. Diese Krebstherapieansätze könnten so möglicherweise zu einem anti-proliferativen Effekt und einer Reduktion der Metastasierung verschiedener Krebstypen dienen. Allerdings ist die Entwicklung einer gezielten Therapie bezogen auf Flotilline schwierig, da eine Veränderung von Flotillinen in der Zelle beispielsweise durch eine Depletion unterschiedliche Effekte auf die Aktivität spezifischer Signalwege zeigt¹³⁸.

5.3.2 Die Rolle von Flotillinen und Arf6 in der endosomalen Sortierung von BACE-1 und dessen Bedeutung für die Alzheimer Erkrankung

Anhand einer kürzlich veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe, die eine Rolle von Flotillinen während der endosomalen Sortierung von BACE-1 aufzeigte²²⁹, und durch die Untersuchungen von Schneider *et al.* zum Flotillin-vermittelten Clustering des APP³⁰⁵ konnte eine bedeutende Implikation von Flotillinen in der Alzheimer'schen Erkrankung beschrieben werden. Zudem wurde eine Akkumulation von Flotillin-1 im Gehirn von Alzheimer-Patienten nachgewiesen^{135,306,307}. Ein wichtiges Merkmal dieser Alters-assoziierten neurodegenerativen Erkrankung ist die Akkumulation von Amyloid β -Peptid-enthaltenden Plaques im Gehirn, wobei das Amyloid β -Peptid als ein Produkt der sequenziellen proteolytischen Prozessierung des APP durch BACE-1 und γ -Sekretasen gebildet wird³⁰⁸. In diesem Kontext wird vermutet, dass die APP-Prozessierung nach dessen Endozytose durch die Aspartyl-Protease BACE-1 in sauren endosomalen Kompartimenten stattfindet³⁰⁹. Das erhöhte Proteinlevel, sowie der beeinträchtigte Transport und die Stabilisierung von BACE-1 in Flotillin-depletierten Zellen resultieren in einer verstärkten APP-Prozessierung und damit in einem erhöhten Level des Amyloid β -Peptid, wodurch eine Rolle von Flotillinen in der Alzheimer-Erkrankung vermutet wird. Untersuchungen von Sannerud *et al.* weisen zudem daraufhin, dass die BACE-1-Sortierung abhängig von der Arf6-Aktivierung in frühen Endosomen stattfindet, wo hauptsächlich die Prozessierung des APP erfolgt²²⁸. In diesen Untersuchungen konnte keine direkte Interaktion von Arf6 und BACE-1, beispielsweise über das Dileucin-Motiv gezeigt werden, welche jedoch im Folgenden anhand eines Pulldown-Assays und einer Immunopräzipitation analysiert werden könnte.

Für einen möglichen Mechanismus der Kooperation von Arf6 und Flotillinen beim endosomalen Transport von BACE-1 ist insbesondere von Bedeutung, dass GGA-Proteine als Arf6-Effektoren dienen und anhand dieser Arbeit eine wahrscheinliche Effektorfunktion von Flotillinen auf Arf6 nachgewiesen wurde. Zudem konnte eine Effektorfunktion von Flotillinen

auf GGA-Proteine bereits vorher identifiziert werden ^{229,289}. In diesem Zusammenhang konnte eine Interaktion von Flotillinen mit Arf6 bestätigt werden, wobei noch nicht bekannt ist, welche Bindungsdomänen für diese Interaktion verantwortlich sind. Über die Interaktionsdomänen beider Proteine könnten weitere Untersuchungen beispielsweise anhand der *Yeast Two Hybrid*-Methode oder eines GST-Pulldown-Assays mit trunkierten Formen von Arf6 und Flotillinen Aufschluss geben. Die Interaktion zwischen Arf6 und Flotillinen könnte die Bindung von GGA-Proteinen an das Dileucin-Motiv von BACE-1 beeinflussen, welche wiederum für die korrekte endosomale Sortierung von BACE-1 von Bedeutung ist. Ferner könnte Arf6 als ein Mediator zwischen Flotillinen und GGA-Proteinen dienen, der zur Feinabstimmung der kompetitiven Bindung von GGAs und Flotillinen an BACE-1 beitragen könnte. Übereinstimmend damit könnte die Überexpression von Arf6-WT die Feinabstimmung dieser Regulation aus dem Gleichgewicht bringen und somit zu einer Fehlregulierung der endosomalen Sortierung führen, wie anhand der Immunfluoreszenz in Arf6-WT-überexprimierenden Kontroll-Zellen gezeigt worden ist (Abb. 4.12 A). In Abwesenheit von Flotillinen konnte eine Reduktion der Arf6-Aktivität gezeigt werden, die in eine verringerte Interaktionsfähigkeit von Arf6 mit GGA-Proteinen resultiert. Die reduziertere Arf6-Bindung an GGAs könnte wiederum eine Veränderung der Bindungseigenschaften von GGA-Proteinen an das BACE-1-Dileucin-Motiv zur Folge haben. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die GGA-Bindung an das Dileucin-Motiv in Abwesenheit von Flotillinen verstärkt wird ²²⁹. Anhand der vorher beschriebenen Befunde ist somit zusätzlich zu Flotillinen eine Rolle von Arf6 in der Alzheimer Erkrankung denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. & Racké, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacol. Ther.* **77**, 59–79 (1998).
2. Klapproth, H. *et al.* Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **355**, 515–523 (1997).
3. Wessler, I. & Kirkpatrick, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 1558–1571 (2008).
4. Oztürk, F., Kurt, E., Inan, U. U., Emiroğlu, L. & Ilker, S. S. The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. *Cornea* **18**, 466–471 (1999).
5. Curtis, B. J. & Radek, K. a. Cholinergic Regulation of Keratinocyte Innate Immunity and Permeability Barrier Integrity: New Perspectives in Epidermal Immunity and Disease. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 28–42 (2012).
6. Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., Kawashima, K. & Grando, S. A. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Hormone and Metabolic Research* **39**, 125–135 (2007).
7. Sawada, Y. *et al.* Cholinergic urticaria: studies on the muscarinic cholinergic receptor M3 in anhidrotic and hypohidrotic skin. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2683–2686 (2010).
8. Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Karlsson, E., Wessler, I. & Grando, S. A. The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration. *J. Biol. Chem.* **280**, 39220–39228 (2005).
9. Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R. & Kirkpatrick, C. J. The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* **72**, 2055–2061 (2003).
10. Tucek, S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J. Physiol.* **322**, 53–69 (1982).
11. Lips, K. S. *et al.* Acetylcholine and Molecular Components of its Synthesis and Release Machinery in the Urothelium. *Eur. Urol.* **51**, 1042–1053 (2007).
12. Okuda, T. & Haga, T. High-affinity choline transporter. *Neurochem. Res.* **28**, 483–488 (2003).
13. Haberberger, R. V., Pfeil, U., Lips, K. S. & Kummer, W. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 943–948 (2002).
14. Pfeil, U. *et al.* Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci.* **72**, 2087–2090 (2003).

15. Elwary, S. M. A., Chavan, B. & Schallreuter, K. U. The vesicular acetylcholine transporter is present in melanocytes and keratinocytes in the human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1879–1884 (2006).
16. Hanna-Mitchell, A. T. *et al.* Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci.* **80**, 2298–2302 (2007).
17. Kawashima, K. & Fujii, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and Therapeutics* **86**, 29–48 (2000).
18. Wess, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 69–99 (1996).
19. Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**, 279–290 (1998).
20. Baldwin, J. M., Schertler, G. F. & Unger, V. M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* **272**, 144–164 (1997).
21. Fukuhara, S., Chikumi, H. & Gutkind, J. S. RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661–1668 (2001).
22. Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C. & Brann, M. R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**, 527–532 (1987).
23. Bonner, T. I., Young, A. C., Brann, M. R. & Buckley, N. J. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403–410 (1988).
24. Kubo, T. *et al.* Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**, 411–6 (1986).
25. Gutkind, J. S., Novotny, E. A., Brann, M. R. & Robbins, K. C. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4703–4707 (1991).
26. Cunningham, J. M., Lennon, V. A., Lambert, E. H. & Scheithauer, B. Acetylcholine receptors in small cell carcinomas. *J. Neurochem.* **45**, 159–167 (1985).
27. Kawashima, K., Fujii, T., Watanabe, Y. & Misawa, H. Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. in *Life Sciences* **62**, 1701–1705 (1998).
28. Lips, K. S. *et al.* Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci.* **80**, 2263–2269 (2007).
29. Kawashima, K. & Fujii, T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J. Pharmacol. Sci.* **106**, 167–173 (2008).

30. Kirkpatrick, C. J. *et al.* The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn. J. Pharmacol.* **85**, 24–28 (2001).
31. Sastry, B. V. R. Human placental cholinergic system. *Biochemical Pharmacology* **53**, 1577–1586 (1997).
32. Wess, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 423–450 (2004).
33. Bschiepfer, T. *et al.* Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sci.* **80**, 2303–2307 (2007).
34. Chess-Williams, R., Chapple, C. R., Yamanishi, T., Yasuda, K. & Sellers, D. J. The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *J. Auton. Pharmacol.* **21**, 243–248 (2001).
35. Metzen, J., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Kilbinger, H. & Wessler, I. Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sci.* **72**, 2075–2080 (2003).
36. Jansen, J. W., Fleuren-Jakobs, A. M., De Pont, J. J. & Bonting, S. L. Blocking by 2,4,6-triaminopyrimidine of increased tight junction permeability induced by acetylcholine in the pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **598**, 115–126 (1980).
37. Acevedo, M. Effect of acetyl choline on ion transport in sheep tracheal epithelium. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **427**, 543–546 (1994).
38. Klein, M. K. *et al.* Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur. Respir. J.* **33**, 1113–1121 (2009).
39. Kilbinger, H., Von Bardeleben, R. S., Siefken, H. & Wolf, D. Prejunctional muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in airways. *Life Sci.* **56**, 981–987 (1995).
40. Qian, J., Galitovskiy, V., Chernyavsky, A. I., Marchenko, S. & Grando, S. A. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes Immun.* **12**, 222–230 (2011).
41. Fujii, T., Watanabe, Y., Inoue, T. & Kawashima, K. Upregulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem. Res.* **28**, 423–429 (2003).
42. Grando, S. A., Pittelkow, M. R. & Schallreuter, K. U. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1948–1965 (2006).
43. Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Wess, J., Karlsson, E. & Grando, S. A. Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J. Cell Biol.* **166**, 261–272 (2004).
44. Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., Kawashima, K. & Grando, S. a. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm. Metab. Res.* **39**, 125–135 (2007).

45. Boukamp, P., Breitkreutz, D., Stark, H. J. & Fusenig, N. E. Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. *Differentiation* **44**, 150–161 (1990).
46. Boukamp, P. *et al.* Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCat. *Genes Chromosom. Cancer* **19**, 201–214 (1997).
47. Breitkreutz, D. *et al.* Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 273–286 (1998).
48. Grando, S. A., Kist, D. A., Qi, M. & Dahl, M. V. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 32–36 (1993).
49. Ndoye, A. *et al.* Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 410–416 (1998).
50. Buchli, R., Ndoye, A., Arredondo, J., Webber, R. J. & Grando, S. A. Identification and characterization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed in human skin melanocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **228**, 57–72 (2001).
51. Nguyen, V. T. *et al.* Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J. Cell Sci.* **114**, 1189–1204 (2001).
52. Pierce, K. L. *et al.* Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors. A co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J. Biol. Chem.* **276**, 23155–23160 (2001).
53. Hulme, E. C., Lu, Z. L., Saldanha, J. W. & Bee, M. S. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 29–34 (2003).
54. Shah, N., Khurana, S., Cheng, K. & Raufman, J.-P. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C221–C232 (2009).
55. Gutkind, J. S. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Networks by G Protein-Coupled Receptors. *Sci. Signal.* **2000**, re1 (2000).
56. Liebmann, C. & Böhmer, F. D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr. Med. Chem.* **7**, 911–943 (2000).
57. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–183 (2001).
58. Alea, M. P., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Fuxe, K. & Garriga, P. Differential expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in Jurkat cells and their signaling. *J. Neuroimmunol.* **237**, 13–22 (2011).
59. Nahorski, S. R., Tobin, A. B. & Willars, G. B. Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. in *Life Sciences* **60**, 1039–1045 (1997).

60. Kim, J. Y. *et al.* Signalling pathway leading to an activation of mitogen-activated protein kinase by stimulating M3 muscarinic receptor. *Biochem J* **337** (Pt 2, 275–280 (1999).
61. Hawes, B. E., van Biesen, T., Koch, W. J., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 17148–53. (1995).
62. Felder, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* **9**, 619–625 (1995).
63. Carpenter, G. EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci. STKE* **2000**, pe1 (2000).
64. Hawes, B. E., Luttrell, L. M., van Biesen, T. & Lefkowitz, R. J. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 12133–12136 (1996).
65. Lopez-Illasaca, M. Linkage of G Protein-Coupled Receptors to the MAPK Signaling Pathway Through PI 3-Kinase gamma. *Science* **275**, 394–397 (1997).
66. Luttrell, L. M., Delia Rocca, G. J., Van Biesen, T., Luttrell, D. K. & Lefkowitz, R. J. Gβγ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 4637–4644 (1997).
67. Crespo, P. *et al.* Signaling through Transforming G Protein-coupled Receptors in NIH 3T3 Cells Involves c-Raf Activation: Evidence for a Protein Kinase C-Independent Pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 21103–21109 (1994).
68. Hosey, M. M., Benovic, J. L., DebBurman, S. K. & Richardson, R. M. Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci.* **56**, 951–955 (1995).
69. Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. & Lefkowitz, R. J. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707–11710 (1995).
70. Koch, W. J., Hawes, B. E., Allen, L. F. & Lefkowitz, R. J. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12706–12710 (1994).
71. Pitcher, J. A. *et al.* Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **274**, 34531–34534 (1999).
72. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. & Ullrich, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557–560 (1996).
73. Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. & Ullrich, A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16**, 7032–7044 (1997).
74. Zwick, E. *et al.* Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.* **272**, 24767–24770 (1997).

75. Prenzel, N. *et al.* EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884–888 (1999).
76. Marqués, M. M., Martínez, N., Rodríguez-García, I. & Alonso, A. EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp. Cell Res.* **252**, 432–438 (1999).
77. Leserer, M., Gschwind, A. & Ullrich, A. Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life* **49**, 405–409 (2000).
78. Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. & Ullrich, A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20**, 1594–1600 (2001).
79. Wang, C., Buck, D. C., Yang, R., Macey, T. A. & Neve, K. A. Dopamine D2 receptor stimulation of mitogen-activated protein kinases mediated by cell type-dependent transactivation of receptor tyrosine kinases. *J. Neurochem.* **93**, 899–909 (2005).
80. Shah, B. H., Shah, F. B. & Catt, K. J. Role of metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in alpha-adrenoceptor-stimulated MAP kinase phosphorylation in GT1-7 neurons. *J. Neurochem.* **96**, 520–532 (2006).
81. Shah, B. H. *et al.* Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2035–2048 (2004).
82. Filardo, E. J., Quinn, J. A. & Sabo, E. Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids* **73**, 870–873 (2008).
83. Belcheva, M. M. & Coscia, C. J. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *NeuroSignals* **11**, 34–44 (2002).
84. Kerkelä, E., Böhling, T., Herva, R., Uria, J. A. & Saarialho-Kere, U. Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. *Bone* **29**, 487–493 (2001).
85. Brinckerhoff, C. E. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 207–214 (2002).
86. Stocker, W. & Bode, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: The metzincins. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 383–390 (1995).
87. Bode, W., Gomis-Ruth, F. X. & Stockler, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Lett.* **331**, 134–140 (1993).
88. Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G. & White, J. M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275–278 (1995).
89. Roghani, M. *et al.* Metalloprotease-disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 3531–3540 (1999).

90. Wolfsberg, T. G. & White, J. M. ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* **180**, 389–401 (1996).
91. Weskamp, G., Krätzschmar, J., Reid, M. S. & Blobel, C. P. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* **132**, 717–726 (1996).
92. Poghosyan, Z. *et al.* Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **277**, 4999–5007 (2002).
93. Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A. & Blobel, C. P. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* **274**, 31693–31699 (1999).
94. Abram, C. L. *et al.* The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 16844–16851 (2003).
95. Kang, Q., Cao, Y. & Zolkiewska, A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem. J.* **352 Pt 3**, 883–892 (2000).
96. Kang, Q., Cao, Y. & Zolkiewska, A. Direct Interaction between the Cytoplasmic Tail of ADAM 12 and the Src Homology 3 Domain of p85 alpha Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase in C2C12 Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 24466–24472 (2001).
97. Nagano, O. *et al.* Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation. *J. Cell Biol.* **165**, 893–902 (2004).
98. Falls, D. L. Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research* **284**, 14–30 (2003).
99. Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* **284**, 2–13 (2003).
100. Van Zoelen EJ1, Stortelers C, Lenferink AE, V. de P. M. The EGF domain: Requirements for binding to receptors of the ErbB family. *Vitam Horm* **59**, 99–131 (2000).
101. Bublil, E. M. & Yarden, Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 124–134 (2007).
102. Engelman, J. A. & Cantley, L. C. The role of the ErbB family members in non-small cell lung cancers sensitive to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4372s–4376s (2006).
103. Schneider, M. R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of Cellular Physiology* **218**, 460–466 (2009).
104. Ohtsu, H., Dempsey, P. J. & Eguchi, S. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C1–C10 (2006).

105. Hinkle, C. L. *et al.* Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family. The juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 24179–24188 (2004).
106. Ockenga, W., Kühne, S., Bocksberger, S., Banning, A. & Tikkanen, R. Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Is Required for Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Muscarinic Acetylcholine Receptors in HaCaT Keratinocytes. **15**, 21433–21454 (2014).
107. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
108. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688–699 (2010).
109. Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F. & Stuermer, C. A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* **124**, 577–587 (1997).
110. Bickel, P. E. *et al.* Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 13793–13802 (1997).
111. Banning, A., Tomasovic, A. & Tikkanen, R. Functional Aspects of Membrane Association of Reggie/Flotillin Proteins. *Current Protein and Peptide Science* **12**, 725–735 (2011).
112. Volonté, D. *et al.* Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo: Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* **274**, 12702–12709 (1999).
113. Edgar, A. J. & Polak, J. M. Flotillin-1: Gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 53–64 (2001).
114. Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46–54 (2006).
115. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Málaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 343–357 (2006).
116. Stuermer, C. A. *et al.* Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3031–3045 (2001).
117. De Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344 (2003).
118. Santamaría, A. *et al.* PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1900–1911 (2005).

119. Gkantiragas, I. *et al.* Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1819–1833 (2001).
120. Neumann-Giesen, C. *et al.* Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem. J.* **378**, 509–518 (2004).
121. Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M. & Tikkanen, R. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **120**, 395–406 (2007).
122. Browman, D. T., Hoegg, M. B. & Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology* **17**, 394–402 (2007).
123. Lang, D. M. *et al.* Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J. Neurobiol.* **37**, 502–523 (1998).
124. Tavernarakis, N., Driscoll, M. & Kyrpides, N. C. The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 425–427 (1999).
125. Liu, J., DeYoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H. & Saltiel, A. R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 16125–16134 (2005).
126. Morrow, I. C. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel Golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 48834–48841 (2002).
127. Babuke, T. *et al.* Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cell. Signal.* **21**, 1287–1297 (2009).
128. Solis, G. P. *et al.* Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochem. J.* **403**, 313–322 (2007).
129. Riento, K., Frick, M., Schafer, I. & Nichols, B. J. Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J. Cell Sci.* **122**, 912–918 (2009).
130. Amaddii, M. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 plays a dual role in the activation of receptor tyrosine kinase/map kinase signaling. *J. Biol. Chem.* (2012).
doi:10.1074/jbc.M111.287599
131. Banning, A., Regenbrecht, C. R. A. & Tikkanen, R. Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cell. Signal.* **26**, 198–207 (2014).
132. Dermine, J. F. *et al.* Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18507–18512 (2001).
133. Babuke, T. & Tikkanen, R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology* **86**, 525–532 (2007).

134. Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R. & Wandinger-Ness, A. A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochem. J.* **392**, 29–38 (2005).
135. Kokubo, H., Lemere, C. A. & Yamaguchi, H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurosci. Lett.* **290**, 93–96 (2000).
136. Jacobowitz, D. M. & Kallarakal, A. T. Flotillin-1 in the substantia nigra of the Parkinson brain and a predominant localization in catecholaminergic nerves in the rat brain. *Neurotox. Res.* **6**, 245–257 (2004).
137. James, D. J. *et al.* Skeletal Muscle of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats Exhibits Reduced Insulin-Stimulated Glucose Transport and Elevated Levels of Caveolin and Flotillin. *Diabetes* **50**, 2148–2156 (2001).
138. Banning, A., Kurrle, N., Meister, M. & Tikkanen, R. Flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and cancer. *Cells* **3**, 129–49 (2014).
139. Hazarika, P.; McCarty, M.F.; Prieto, V.G.; George, S.; Babu, D.; Koul, D.; Bar-Eli, M.; Duvic, M. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res.* **64**, 7361–7369 (2004).
140. Berger, T. *et al.* Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene* **32**, 1–6 (2012).
141. Ludwig, A. *et al.* Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *J. Cell Biol.* **191**, 771–781 (2010).
142. Sakamoto, K. M. *et al.* 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* **6**, 867–871 (1991).
143. Shaw, P. E., Schröter, H. & Nordheim, A. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* **56**, 563–572 (1989).
144. Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P. & Tikkanen, R. Transcriptional Regulation of Flotillins by the Extracellularly Regulated Kinases and Retinoid X Receptor Complexes. *PLoS One* **7**, (2012).
145. Von Kriegsheim, A., Preisinger, C. & Kolch, W. Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods Mol. Biol.* **484**, 177–192 (2008).
146. Bitsikas, V., Riento, K., Howe, J. D., Barry, N. P. & Nichols, B. J. The role of flotillins in regulating $\text{A}\beta$ production, investigated using flotillin 1^{-/-}, flotillin 2^{-/-} double knockout mice. *PLoS One* **9**, e85217 (2014).
147. Sugawara, Y. *et al.* The lipid raft proteins flotillins / reggies interact with G α q and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase. **19**, 1301–1308 (2007).
148. Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846 (2005).

149. Moss, J. & Vaughan, M. Structure and function of ARF proteins. Activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12327–12330 (1995).
150. Nie, Z., Hirsch, D. S. & Randazzo, P. A. Arf and its many interactors. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 396–404 (2003).
151. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362–375 (2011).
152. Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
153. Claude, A. *et al.* GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J. Cell Biol.* **146**, 71–84 (1999).
154. Gillingham, A. K. & Munro, S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 579–611 (2007).
155. Donaldson, J. G. Multiple Roles for Arf6: Sorting, Structuring, and Signaling at the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 41573–41576 (2003).
156. Pasqualato, S., Ménétrey, J., Franco, M. & Cherfils, J. The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO Rep.* **2**, 234–238 (2001).
157. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 475–482 (2000).
158. Jackson, C. L. & Casanova, J. E. Turning on ARF: The Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology* **10**, 60–67 (2000).
159. Chardin, P. *et al.* A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481–484 (1996).
160. Morinaga, N., Moss, J. & Vaughan, M. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12926–12931 (1997).
161. Kawasaki, M., Nakayama, K. & Wakatsuki, S. Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 681–689 (2005).
162. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
163. Nie, Z. & Randazzo, P. A. Arf GAPs and membrane traffic. *J. Cell Sci.* **119**, 1203–1211 (2006).
164. Burd, C. G., Strohlic, T. I. & Gangi Setty, S. R. Arf-like GTPases: Not so Arf-like after all. *Trends in Cell Biology* **14**, 687–694 (2004).

165. Kahn, R. A. *et al.* Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1269–1272 (2005).
166. Moss, J. & Vaughan, M. Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431–21434 (1998).
167. Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C. S. & Cantley, L. C. Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403–21406 (1994).
168. D'Souza-Schorey, C. & Stahl, P. D. Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp. Cell Res.* **221**, 153–159 (1995).
169. Lenhard, J. M., Kahn, R. A. & Stahl, P. D. Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of in vitro endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* **267**, 13047–13052 (1992).
170. Sabe, H. Requirement for Arf6 in Cell Adhesion, Migration, and Cancer Cell Invasion. *Journal of Biochemistry* **134**, 485–489 (2003).
171. D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. & Van Aelst, L. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445–5454 (1997).
172. Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. & Donaldson, J. G. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 6, 855–866 (1999).
173. Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G. & Greenberg, S. A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 19977–19981 (1998).
174. Caumont, A. S., Galas, M. C., Vitale, N., Aunis, D. & Bader, M. F. Regulated exocytosis in chromaffin cells: Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **273**, 1373–1379 (1998).
175. Palacios, F. & D'Souza-Schorey, C. Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J. Biol. Chem.* **278**, 17395–17400 (2003).
176. Schweitzer, J. K. & D'Souza-Schorey, C. Localization and activation of the ARF6 GTPase during cleavage furrow ingression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 27210–27216 (2002).
177. Li, R. Cytokinesis in development and disease: Variations on a common theme. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 3044–3058 (2007).
178. Tague, S. E., Muralidharan, V. & D'Souza-Schorey, C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9671–9676 (2004).
179. Sabe, H. *et al.* The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* **10**, 982–993 (2009).

180. Tushir, J. S. & D'Souza-Schorey, C. ARF6-dependent activation of ERK and Rac1 modulates epithelial tubule development. *EMBO J.* **26**, 1806–1819 (2007).
181. Aikawa, Y. & Martin, T. F. J. ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J. Cell Biol.* **162**, 647–659 (2003).
182. Martin, T. F. J. PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 493–499 (2001).
183. Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. & Donaldson, J. G. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* **154**, 1007–1017 (2001).
184. Honda A1, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, K. Y. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521–532 (1999).
185. Radhakrishna, H. & Donaldson, J. G. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* **139**, 49–61 (1997).
186. Powelka, A. M. *et al.* Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* **5**, 20–36 (2004).
187. Paleotti, O. *et al.* The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J. Biol. Chem.* **280**, 21661–21666 (2005).
188. Nebl, T., Oh, S. W. & Luna, E. J. Membrane cytoskeleton: PIP2 pulls the strings. *Curr. Biol.* **10**, (2000).
189. Houndolo, T., Boulay, P.-L. & Claing, A. G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 5598–5604 (2005).
190. Lau, A. W. & Chou, M. M. The adaptor complex AP-2 regulates post-endocytic trafficking through the non-clathrin Arf6-dependent endocytic pathway. *J. Cell Sci.* **121**, 4008–4017 (2008).
191. Naslavsky, N., Weigert, R. & Donaldson, J. G. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol. Biol. Cell* **14**, 417–431 (2003).
192. Schweitzer, J. K., Pietrini, S. D. & D'Souza-Schorey, C. ARF6-mediated endosome recycling reverses lipid accumulation defects in Niemann-Pick type C disease. *PLoS One* **4**, (2009).
193. Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Endocytosis of G protein-coupled receptors: Roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* **66**, 61–79 (2002).
194. Delaney, K. A., Murph, M. M., Brown, L. M. & Radhakrishna, H. Transfer of M2 muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 33439–33446 (2002).

195. Weigert, R., Yeung, A. C., Li, J. & Donaldson, J. G. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3758–3770 (2004).
196. Boukamp, P. *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761–771 (1988).
197. Kurrle, N. *et al.* Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS One* **8**, (2013).
198. Kurrle, N. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells. *BMC Cancer* **13**, 575 (2013).
199. Marshall, O. J. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **20**, 2471–2472 (2004).
200. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
201. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, P. M. Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. *Nature* **328**, 817 – 820 (1987).
202. Hashimoto, K. *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 20060–20066 (1994).
203. Shirakata, Y. *et al.* Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5748–5753 (2000).
204. Cook, P. W. *et al.* A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2547–2557 (1991).
205. Metzger, M., Just, L., Boss, A. & Drews, U. Identification and functional characterization of the muscarinic receptor M3 in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Cells Tissues Organs* **180**, 96–105 (2005).
206. Maas-Szabowski, N., Stärker, A. & Fusenig, N. E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *J. Cell Sci.* **116**, 2937–2948 (2003).
207. Haglund, K. & Dikic, I. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science* **125**, 265–275 (2012).
208. Grøvdal LM1, Stang E, Sorkin A, M. I. Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp Cell Res.* **300**, 388–395 (2004).
209. Sato, K., Sato, A., Aoto, M. & Fukami, Y. c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 1078–1087 (1995).

210. Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. & Ullrich, A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* **22**, 2411–2421 (2003).
211. Wetzker, R. & Böhmer, F.-D. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 651–657 (2003).
212. Macaulay, V. M. *et al.* Phase I Study of Intrapleural Batimastat (BB-94), a Matrix Metalloproteinase Inhibitor , in the Treatment of Malignant Pleural Effusions 1. **5**, 513–520 (1999).
213. De Angelis, T., Noè, A., Chatterjee, M. & Mulholland, J. Stromelysin-1 activation correlates with invasiveness in squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 759–766 (2002).
214. Zaid, M. A., Afaq, F., Syed, D. N., Dreher, M. & Mukhtar, H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochem. Photobiol.* **83**, 882–888 (2007).
215. Song, H. Y. *et al.* Suppression of TNF-alpha-induced MMP-9 expression by a cell-permeable superoxide dismutase in keratinocytes. *BMB Rep.* **44**, 462–467 (2011).
216. Sommer, A. *et al.* Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 23678–23689 (2012).
217. Kühne, S., Ockenga, W., Banning, A. & Tikkanen, R. Cholinergic Transactivation of the EGFR in HaCaT Keratinocytes Stimulates a Flotillin-1 Dependent MAPK-Mediated Transcriptional Response. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 6447–6463 (2015).
218. Solis, G. P. *et al.* Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1812–1825 (2012).
219. Tanabe, K. *et al.* A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1617–1628 (2005).
220. D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I. & Stahl, P. D. A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**, 1175–1178 (1995).
221. Cremona, M. L. *et al.* Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat. Neurosci.* **14**, 469–477 (2011).
222. Cohen, L. A. & Donaldson, J. G. Analysis of Arf GTP-binding protein function in cells. *Current Protocols in Cell Biology* (2010). doi:10.1002/0471143030.cb1412s48
223. Dell'Angelica, E. C. *et al.* GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **149**, 81–93 (2000).
224. Xie, L. *et al.* Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **281**, 7253–7259 (2006).

225. Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447 (2003).
226. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. Y. & Doms, R. W. Maturation and endosomal targeting of ??-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease ??-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737 (2000).
227. Pastorino, L., Ikin, A. F., Nairn, A. C., Pursnani, A. & Buxbaum, J. D. The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta). *Mol. Cell. Neurosci.* **19**, 175–185 (2002).
228. Sannerud, R. *et al.* ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, E559–E568 (2011).
229. John, B., Meister, M., Banning, A. & Tikkanen, R. Flotillins bind to the dileucine sorting motif of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. *FEBS J.* **281**, 2074–2087 (2014).
230. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137 (2001).
231. Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A. & Ullrich, A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1203–1208 (2003).
232. Zhang, J. *et al.* Role of EGFR transactivation in preventing apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa*-infected human corneal epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2569–2576 (2004).
233. Jost, M., Huggett, T. M., Kari, C. & Rodeck, U. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1519–1527 (2001).
234. Wang, Z. *et al.* GPR48-Induced keratinocyte proliferation occurs through HB-EGF mediated EGFR transactivation. *FEBS Lett.* **584**, 4057–4062 (2010).
235. Oikawa, H., Maesawa, C., Tatemichi, Y., Nishinari, Y. & Nishiya, M. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells. *Life Sci.* **97**, 137–144 (2014).
236. Pullar, C. E. & Isseroff, R. R. The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J. Cell Sci.* **119**, 592–602 (2006).
237. Yin, J. & Yu, F. S. X. ERK1/2 mediate wounding- and G-protein-coupled receptor ligands - Induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 132–139 (2009).
238. Shin, S. Y., Lee, J. H., Min, B. & Lee, Y. H. The translation inhibitor anisomycin induces Elk-1-mediated transcriptional activation of egr-1 through multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Exp. Mol. Med.* **38**, 677–685 (2006).

239. Stirnweiss, J., Valkova, C., Ziesché, E., Drube, S. & Liebmann, C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cell. Signal.* **18**, 1338–1349 (2006).
240. Keely, S. J., Calandrella, S. O. & Barrett, K. E. Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T84 cells is mediated by intracellular Ca²⁺, PYK-2, and p60(src). *J. Biol. Chem.* **275**, 12619–12625 (2000).
241. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E. & Prentki, M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* **52**, 124–132 (2003).
242. Roelle, S. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **278**, 47307–47318 (2003).
243. Zajac, M. *et al.* GPR54 (KISS1R) Transactivates EGFR to Promote Breast Cancer Cell Invasiveness. **6**, (2011).
244. Cianfrocca, R. *et al.* The endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor signaling converge on β -catenin to promote ovarian cancer metastasis. *Life Sci.* **91**, 550–556 (2012).
245. Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**, 769–779 (2004).
246. Peschon, J. J. An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* **282**, 1281–1284 (1998).
247. Sunnarborg, S. W. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J. Biol. Chem.* **277**, 12838–12845 (2002).
248. Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A. & Ullrich, A. Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.* **279**, 47929–47938 (2004).
249. Yan, Y., Shirakabe, K. & Werb, Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.* **158**, 221–226 (2002).
250. Maretzky, T. *et al.* Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.* **2**, 229 (2011).
251. Asakura, M. *et al.* Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* **8**, 35–40 (2002).
252. Schäfer, B., Gschwind, A. & Ullrich, A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* **23**, 991–999 (2004).

253. Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A. & Klagsbrun, M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J. Biol. Chem.* **272**, 31730–31737 (1997).
254. Yu, W. H., Woessner, F., McNeish, J. D. & Stamenkovic, I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* **16**, 307–323 (2002).
255. Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T. & Levin, E. R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 2701–2712 (2003).
256. Kasina, S., Scherle, P. A., Hall, C. L. & MacOska, J. A. ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation. *Cell Prolif.* **42**, 799–812 (2009).
257. Sanderson, M. P. *et al.* ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* **280**, 1826–1837 (2005).
258. Weber, S. & Saftig, P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* **139**, 3693–3709 (2012).
259. Cury, P. R. *et al.* The effect of epidermal growth factor on matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase gene expression in cultured human gingival fibroblasts. *Arch. Oral Biol.* **52**, 585–590 (2007).
260. Domeij, H. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. 302–306 (2002).
261. Nutt, J. E., Durkan, G. C., Mellon, J. K. & Lunec, J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: The induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine. *BJU Int.* **91**, 99–104 (2003).
262. Kajanne, R. *et al.* EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J. Cell. Physiol.* **212**, 489–497 (2007).
263. Xie, G., Cheng, K., Shant, J. & Raufman, J.-P. Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G755–G763 (2009).
264. Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. & Girolomoni, G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1365–1374 (2008).
265. Schneider, M. R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: insights from rodent models. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 173–181 (2008).
266. Shirakata, Y. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J. Cell Sci.* **118**, 2363–2370 (2005).
267. Vassar, R. & Fuchs, E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- α during epidermal development and differentiation. *Genes Dev.* **5**, 714–727 (1991).

268. Dominey, A. M. *et al.* Targeted overexpression of transforming growth factor alpha in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ.* **4**, 1071–1082 (1993).
269. Shibata, M. A., Ward, J. M., Green, J. E. & Merlino, G. Enhanced sensitivity to tumor growth and development in multistage skin carcinogenesis by transforming growth factor-alpha-induced epidermal growth factor receptor activation but not p53 inactivation. *Mol. Carcinog.* **18**, 160–170 (1997).
270. Roepstorff, K. *et al.* Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor. 1115–1127 (2009). doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x
271. Barnard, J. A. *et al.* Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J. Biol. Chem.* **269**, 22817–22822 (1994).
272. Rao, V. N. & Reddy, E. S. elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene* **9**, 1855–1860 (1994).
273. Yang, S. H., Yates, P. R., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. & Sharrocks, A. D. The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 710–720 (1998).
274. Gille, H., Sharrocks, A. D. & Shaw, P. E. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**, 414–417 (1992).
275. Chen, R. H., Abate, C. & Blenis, J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10952–10956 (1993).
276. Jung, H. L., Jung, C. R., Lee, C. H. & Im, D. S. Egr-1 and serum response factor are involved in growth factors- and serum-mediated induction of E2-EPF UCP expression that regulates the VHL-HIF pathway. *J. Cell. Biochem.* **105**, 1117–1127 (2008).
277. Balasubramanian, N., Scott, D. W., Castle, J. D., Casanova, J. E. & Schwartz, M. A. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1381–1391 (2007).
278. McKay, J., Wang, X., Ding, J., Buss, J. E. & Ambrosio, L. H-ras resides on clathrin-independent ARF6 vesicles that harbor little RAF-1, but not on clathrin-dependent endosomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 298–307 (2011).
279. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
280. Naslavsky, N., Weigert, R. & Donaldson, J. G. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3542–3552 (2004).
281. Eyster, C. A. *et al.* Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic* **10**, 590–599 (2009).

282. Aït-Slimane, T., Galmes, R., Trugnan, G. & Maurice, M. Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3792–3800 (2009).
283. Howes, M. T., Mayor, S. & Parton, R. G. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 519–527 (2010).
284. Frick, M. *et al.* Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding. *Curr. Biol.* **17**, 1151–1156 (2007).
285. Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A. & Tikkanen, R. Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 4854–4884 (2013).
286. Kato, N., Nakanishi, M. & Hirashima, N. Flotillin-1 regulates IgE receptor-mediated signaling in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J. Immunol.* **177**, 147–154 (2006).
287. Macia, E. *et al.* The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **117**, 2389–2398 (2004).
288. Zuk, A. Mechanismen der EGF-stimulierten Endozytose von Flotillinen. (Justus-Liebig Universität Giessen, 2011).
289. Meister, M., Zuk, A. & Tikkanen, R. Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *FEBS J.* **281**, 2956–2976 (2014).
290. Meister, M. A Novel Role for Flotillins in Activation and Endosomal Sorting of Transmembrane Receptors. (2014).
291. Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. & Nakayama, K. GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem. J.* **365**, 369–378 (2002).
292. Puertollano, R. & Bonifacino, J. S. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat. Cell Biol.* **6**, 244–251 (2004).
293. Hattori, C. *et al.* BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J. Neurosci. Res.* **84**, 912–917 (2006).
294. He, X., Chang, W. P., Koelsch, G. & Tang, J. Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: Implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett.* **524**, 183–187 (2002).
295. Li, S., Huang, S. & Peng, S.-B. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int. J. Oncol.* **27**, 1329–1339 (2005).
296. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16 (2006).
297. Marinissen, M. J. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**, 368–376 (2001).

298. Bhola, N. E. & Grandis, J. R. Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci* **13**, 1857–1865 (2008).
299. Liebmann, C. EGF receptor activation by GPCRs: An universal pathway reveals different versions. *Molecular and Cellular Endocrinology* **331**, 222–231 (2011).
300. Thomas, S. M. *et al.* Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **66**, 11831–11839 (2006).
301. Kalyankrishna, S. & Grandis, J. R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2666–2672 (2006).
302. Lin, C. *et al.* Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3089–3099 (2011).
303. Zhang, S.-H. *et al.* High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **8**, e64709 (2013).
304. Song, L. *et al.* Flotillin-1 promotes tumor necrosis factor-NF-kappaB receptor signaling and activation of NF-kappab in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Gastroenterology* **143**, (2012).
305. Schneider, A. *et al.* Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J. Neurosci.* **28**, 2874–2882 (2008).
306. Chen, T.-Y., Liu, P.-H., Ruan, C.-T., Chiu, L. & Kung, F.-L. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 266–272 (2006).
307. Rajendran, L. *et al.* Increased Abeta production leads to intracellular accumulation of Abeta in flotillin-1-positive endosomes. *Neurodegener. Dis.* **4**, 164–170 (2007).
308. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
309. Yan, R. *et al.* Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533–537 (1999).

7. Zusammenfassung

Einleitung

Das Non-neuronale cholinerge System und die mAChR-vermittelte EGFR-Transaktivierung

Als bedeutender autokriner/parokriner Signalüberträger konnte Acetylcholin (ACh) in einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere Keratinozyten dienen als ein gut untersuchtes Modell des non-neuronalen cholinergen Systems (NNCS), welches an der Regulation vieler wichtiger Zellfunktionen, wie der Proliferation, Differenzierung, Migration und der Wundheilung in diesen Zellen beteiligt ist. ACh wirkt grundsätzlich auf zwei unterschiedliche Rezeptortypen, die nikotinischen und muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRs) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), wobei durch ihre Kopplung an bestimmte heterotrimeren Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (sog. G-Proteine) die Initiierung der mAChR-vermittelten Signaltransduktion erfolgt. Dabei koppeln die exzitatorischen M_1 , M_3 und M_5 mAChR-Subtypen bevorzugt an die Pertussis-Toxin-insensitiven G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ -Untereinheiten der trimeren G-Proteine, wobei die M_2 und M_4 -Subtypen vorzugsweise an die inhibierenden $G_{\alpha_{i0}}$ -Proteinuntereinheiten gekoppelt sind. Diese Kopplung an bestimmte G-Proteinuntereinheiten ist grundlegend für die Signaltransduktion nach der Aktivierung von mAChRs. Die Interaktion von GPCRs mit der trimeren G-Proteinuntereinheit bewirkt die Aktivierung (GTP-Bindung) der α -Untereinheit und deren Dissoziation von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des trimeren G-Proteins. Die α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Heterodimer interagieren im Folgenden mit nachgeschalteten Effektoren verschiedenster Signaltransduktionswege, wobei sowohl die α - als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit u.a. die Aktivierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade vermitteln können. Die Aktivierung der M_1 , M_3 und M_5 mAChRs führt zur Aktivierung von Membran-assoziierten Enzymen, wie der Phospholipase C und Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat-Kinase, infolgedessen Diacylglycerol und der sekundäre Botenstoff Inositol-trisphosphat gebildet und intrazelluläres Calcium mobilisiert wird. Die dadurch bewirkte Aktivierung der Proteinkinase C führt zur Ras/Raf-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 und nachgeschalteter MAPK-Signalwege. Die Aktivierung von M_2 und M_4 mAChRs bewirkt wiederum die Inhibierung der Adenylatzyklase und somit die Reduktion des intrazellulären cAMP-Levels. Ebenso sind mAChRs durch einen cholinergen Transaktivierungsmechanismus von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an der Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion beteiligt. Dabei führt der Mechanismus des *Triple-Membrane-Passing*-Signalwegs (TMPS) zur mAChR-induzierten Aktivierung von Metalloproteinasen der MMP/ADAM-Familie, die zur Prozessierung von Membran-ständigen EGF-ähnlichen Liganden und letztendlich zur autokrinen und/oder parakrinen Aktivierung von epidermalen

Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFRs), sowie zu dessen nachgeschalteter MAPK-Aktivierung führt. Die aktivierte MAP-Kinase ERK1/2 aktiviert zytoplasmatische Substrate oder nach Translokation in den Nukleus verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie cFos und Egr1.

Die Proteinfamilie der Flotilline

Die ubiquitär verbreitete und hoch-konservierte Proteinfamilie der Flotilline besteht aus den zwei Mitgliedern Flotillin-1 (Reggie-2) und Flotillin-2 (Reggie-1). Flotilline assoziieren mit Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membran-Mikrodomänen (sog. *Membrane rafts*) über Acylierungen (Palmitoylierung in Flotillin-1, Myristoylierung und Palmitoylierung in Flotillin-2) und hydrophoben Bereichen der SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C)-Domäne, sowie Hetero- und Homooligomerisierungen. Diese Mikrodomänen dienen als Plattformen für diverse zelluläre Prozesse, wie die Signaltransduktion und den Membrantransport. Dementsprechend sind Flotilline an der Regulation von Membrantransportprozessen, der Organisation des Zytoskeletts, der Zell-Matrix-Adhäsion, sowie der Zellproliferation, Migration und Tumorgenese beteiligt. Zudem sind Flotilline in verschiedene Signaltransduktionswege, einschließlich des Insulin- und EGFR/MAPK-Signalwegs involviert. Insbesondere Flotillin-1 spielt dabei eine bedeutende Rolle bei der EGFR-vermittelten MAPK-Signaltransduktion, in welcher Flotillin-1 am EGFR-Clustering beteiligt ist und zudem durch eine direkte Interaktion mit MAP-Kinasen (u.a. ERK1/2 und MEK1/2) als *bona fide* Gerüstprotein dient. Flotilline zeigen eine eher dynamische und Zelltyp-spezifische zelluläre Lokalisation, wobei sie überwiegend an der Plasmamembran und in endosomalen Vesikeln lokalisiert sind. Die Lokalisation von Flotillinen kann durch Stimulierung mit Wachstumsfaktoren, wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) verändert werden, wobei es zu einer vermehrten Translokation von Flotillinen in endosmale Vesikel kommt. Dabei geht die Endozytose von Flotillinen mit einer Src-Kinase-vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung und einer Größenzunahme der Oligomere einher.

Der ADP-Ribosylierungsfaktor 6

ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) sind kleine GTPasen der Ras-Superfamilie, die aufgrund ihrer Sequenzhomologien in drei Klassen unterteilt werden, wobei Arf6 zu Klasse III der Arf-Proteine zählt. Arf-Proteine durchlaufen in Abhängigkeit ihres gebundenen Guanin-Nukleotids eine zyklische Konformationsänderung. Dabei sind Arfs in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form zytoplasmatisch lokalisiert und translozieren in ihrem aktiven GTP-gebundenen Zustand zur Plasmamembran, wo sie durch eine kotranslationale Myristoylierung ihrer amphipatischen Helix in den Membran-Bilayer inserieren. Die vielfältigen Funktionen von Arf-Proteinen liegen vor allem in der Regulation von Enzymen des Phospholipid-Metabolismus, des Membrantransports, wie der Endozytose und des Recyclings, sowie in der Organisation des

Zytoskeletts. Während endosomaler Transportprozesse ist Arf6 sowohl an der Regulation der Clathrin-vermittelten als auch Clathrin-unabhängige Endozytose beteiligt. Unabhängig vom Endozytoseweg ist Arf6 in die Internalisierung der meisten GPCRs involviert, wobei dementsprechend eine Beteiligung von Arf6 an der Endozytose des M₂ mAChR angenommen wird.

Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die durch die cholinerge EGFR-Transaktivierung und Aktivierung der MAPK-Signalkaskade vermittelten transkriptionellen Effekte, welche die Expression von MAPK-Zielgenen, sowie Genen für EGF-ähnliche Liganden und Metalloproteasen der MMP- und ADAM-Familie regulieren, untersucht werden. Zusätzlich sollte eine mögliche transkriptionelle Regulation von Flotillin-Genen durch die cholinerge EGFR/MAPK-Aktivierung und der Einfluss von Flotillinen auf die transkriptionelle Regulation der untersuchten Gene näher betrachtet werden. Außerdem wurde in dieser Arbeit das Wechselspiel von Flotillinen und der kleinen GTPase Arf6 während endosomaler Transportprozesse untersucht. In diesem Zusammenhang sollte eine Interaktion von Flotillinen und Arf6, sowie der Einfluss von Flotillinen auf die Arf6-Aktivität nachgewiesen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Die transkriptionelle Regulation der Gene von EGF-ähnlichen Liganden, MMPs/ADAMs, sowie MAPK-Zielgenen vermittelt durch die cholinerge EGFR-Transaktivierung

In HaCaT-Keratinocyten führt die mAChR-vermittelte EGFR-Transaktivierung nach cholinergem Stimulation zu einer MMP/ADAM-abhängigen Aktivierung der MAPK-Signalkaskade. Anhand der quantitativen RT-PCR-Analyse wurde in diesem Kontext die CCh-vermittelte Induktion der MAPK-Zielgene Egr1, cFos und Dusp1 in HaCaT-Keratinocyten untersucht. Dabei konnte die cholinerge Induktion dieser MAPK-Zielgene gezeigt werden. Insbesondere für CCh-induzierte Egr1-Genexpression konnte eine vollständige Abhängigkeit von der mAChR-vermittelten EGFR-Transaktivierung und MAPK-Aktivierung nachgewiesen werden. Die cholinerg-induzierte Genexpression von cFos und Dusp1 wiederum wird nicht komplett durch die cholinerge EGFR-Transaktivierung vermittelt, sondern zusätzlich durch weitere cholinerg-aktivierte Signalwege unabhängig der EGFR/MAPK-Aktivierung reguliert. Die Analyse der cholinergen Induktion von Genen der EGF-ähnlichen Liganden ergab einen Anstieg der Gentranskription von TGF α , HB-EGF, AREG und EREG nach CCh-Stimulation von HaCaT-Keratinocyten. Für die CCh-induzierte Induktion von EREG konnte eine Abhängigkeit von der mAChR-vermittelten EGFR-Aktivierung, nicht aber von der MAPK-Aktivierung gezeigt werden, was auf eine Genregulation von EREG durch weitere cholinerg aktivierte Signalwege hinweist. Zudem wurde die cholinerge Induktion von MMPs/ADAMs

untersucht, wobei die Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, sowie ADAM8 und ADAM17 in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die CCh-induzierte Expressionsregulation von MMP-3 zeigte zusätzlich eine deutliche Abhängigkeit von der mAChR-vermittelten Transaktivierung und des nachgeschalteten MAPK-Signalweg. Die cholinerge Induktion spezifischer EGFR-Liganden und MMPs/ADAMs weist zusätzlich auf einen *feed-forward* Mechanismus hin, der durch die cholinerge EGFR-Transaktivierung vermittelt wird. Dieser Mechanismus führt zu einer erhöhten Transkription von Genen, deren Genprodukte an der EGFR-Transaktivierung beteiligt sind, das wiederum durch eine vermehrte Produktion bestimmter MMPs/ADAMs und EGF-ähnlicher Liganden die Aufrechterhaltung des Transaktivierungsmechanismus fördert. Zusätzlich konnte eine cholinerge Induktion von Flotillinen auf mRNA- und Proteinebene beobachtet werden. Übereinstimmend damit konnten in vorherigen Studien Bindungsstellen für Egr1 und den *Serum response Faktor* (SRF) in der Promotorregion von Flotillinen identifiziert werden, wodurch die Genexpression von Flotillinen mit ERK1/2 bzw. Egr1 als bedeutende positive Transkriptionsregulatoren reguliert wird. Die Rolle von Flotillinen, insbesondere Flotillin-1, in der EGFR/MAPK-Aktivierung konnte bereits beschrieben werden, wobei in dieser Studie korrelierend damit eine deutliche Reduktion der MAPK-Zielgene Egr1 und Dusp1 durch eine Depletion von Flotillin-1 gezeigt werden konnte. Zusätzlich wurde eine Reduktion der cholinergen Induktion von HB-EGF, TGF- α , AREG, EREG und MMP-3 durch die Depletion von Flotillin-1 bewirkt. Eine Depletion von Flotillin-2 zeigte wiederum keinen Effekt auf die cholinerge Induktion der untersuchten Gene, was auf einen Kompensationsmechanismus des verbleibenden Flotillin-1 hinweist.

Das Wechselspiel von Flotillinen und der kleinen GTPase Arf6 während endosomaler Membrantransportprozesse

Für die Untersuchung der Lokalisation und der funktionellen Interaktion von Flotillinen und Arf6 wurde zusätzlich zum Arf6-WT zwei mutierte Formen, die konstitutiv aktive (CA) und dominant negative (DN)-Mutante, in HeLa-Zellen überexprimiert. Anhand der Koimmunpräzipitation konnte so eine Interaktion von Flotillinen mit allen Arf6-Formen nachgewiesen werden, wobei die Expressionsanalyse eine schwächere Expression der Arf6-DN-Mutante aufzeigte. Anhand immunzytochemischer Studien wurde der Einfluss von Arf6, welches nachweislich an der Clathrin-unabhängigen Endozytose beteiligt ist, auf die EGF-induzierte Endozytose von Flotillinen untersucht. Dabei konnte unter Serum-Entzug nach Überexpression von Arf6-WT eine überwiegend endosomale Akkumulation von Flotillin-2 nach EGF-Stimulierung beobachtet werden. Im Folgenden wurde der Fragestellung nachgegangen, ob Flotilline als Arf6-Effektoren dienen oder als Frachtmoleküle von Arf6 endozytiert werden. Anhand eines Aktivitäts-Assays konnte die Bindung der aktiven Formen von Arf6 (Arf6-WT und -CA) an die GAT-Domäne von GGA3-Proteinen nachgewiesen werden. Zudem konnte

eine deutlich reduzierte Interaktion von Arf6 mit der GGA3-GAT-Domäne nach Depletion von Flotillin-1 und -2 beobachtet werden, was direkt mit einer verringerten Aktivität von Arf6 in Abwesenheit von Flotillinen korreliert und eine Arf6-Effektorfunktion von Flotillinen vermuten lässt. Der funktionelle Zusammenhang von Flotillinen und Arf6 während endosomaler Membrantransportprozesse wurde mittels einer Koexpression von Arf6-WT und BACE-1 in stabil Flotillin-depletierten HeLa-Zellen untersucht. Dabei wurde nach Überexpression von Arf6-WT eine Bildung von traubenartig-angeordneten, Arf6-positiven vakuolären Strukturen in Kontroll-Zellen beobachtet, das auf einen Effekt der ektopischen Arf6-Expression hinweisen könnte. Nach ektopischer Expression von Arf6 in Flotillin-depletierten Zellen war eine Akkumulation von BACE-1 in perinukleären Bereichen erkennbar. In diesem Zusammenhang konnte in früheren Studien eine direkte Bindung von Flotillin-1 an die Dileucin-Sortierungssequenz am C-Terminus von BACE-1 nachgewiesen werden. Dementsprechend wird eine Rolle von Flotillinen in der endosomalen Sortierung von BACE-1 angenommen, wobei zusätzlich eine Konkurrenz von Flotillinen und GGA-Proteinen um die Dileucin-Bindungsstelle in BACE-1 vermutet wird. Zudem weisen frühere Untersuchungen auf eine Arf6-regulierte Sortierung von BACE-1 hin, in denen jedoch keine direkte Bindung von Arf6 an das C-terminale Dileucin-Motiv in BACE-1 nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit konnte die transkriptionelle Regulation von MAPK-Zielgenen, sowie von Genen kodierend für EGF-ähnliche Liganden und MMP/ADAM-Metalloproteasen durch einen cholinergen Stimulus näher charakterisiert werden. Zudem sind Flotilline, deren Gene ebenfalls cholinerg induziert werden, für die der EGFR-MAPK-Aktivierung nachgeschalteten Transkriptionsregulation von bestimmten EGFR-Liganden und MMP-3 notwendig, wobei Flotillin-1 hierbei als hauptsächlicher Regulator der cholinergen Genexpression dient.

Anhand dieser Studie konnte eine Interaktion von Arf6 mit Flotillinen, sowie der Einfluss von Flotillinen auf die Arf6-Aktivität nachgewiesen werden, was auf eine Arf6-Effektorfunktion von Flotillinen hinweist. Jedoch konnte in diesem Zusammenhang kein Einfluss der Arf6-Aktivität auf die EGF-induzierte Flotillin-Endozytose nachgewiesen werden.

7.1 Summary

Acetylcholine (ACh) is an important auto-/paracrine mediator in the regulation of a variety of cellular functions, like the cell communication and signal transduction of neuronal but also non-neuronal cells. Generally, ACh acts on both muscarinic and nicotinic subtypes of ACh receptors. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) belong to the family of G-Protein coupled receptors (GPCRs), which contain a conserved structural motif of seven α -helical transmembrane domains. The five mAChR-subtypes (referred as M_1 to M_5) are able to initiate a number of intracellular signal transduction pathways dependent on their bound GTP-binding protein (G protein). The excitatory M_1 , M_3 and M_5 mAChRs are preferentially coupled to $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ -subunits of G-proteins, whose activation results in an increased level of diacylglycerol and inositol-trisphosphate. The inhibitory M_2 and M_4 subtypes mainly interact with $G\alpha_{i/o}$ -subunits of heterotrimeric G-proteins, which leads to inhibition of the adenylyl cyclase and subsequently to a reduced level of cAMP. Beside the canonical pathway, mAChRs are able to indirectly activate the MAPK-signal transduction via the EGFR signal transactivation pathway. The mAChR-mediated EGFR-transactivation takes place through a so called triple-membrane-passing-signal (TMPS) pathway, which involves the activation of matrix metalloproteinases (MMPs/ADAMs) and subsequently the proteolytic cleavage of membrane-bound EGF-like ligand-precursors. The release of active EGF-like ligands leads to an autocrine and/or paracrine activation of the EGFR and downstream MAPK signal pathway, as well as to ERK-mediated transcriptional response.

The highly conserved and ubiquitously expressed flotillins are constitutively associated with cholesterol- and sphingolipid-enriched membrane microdomains (membrane rafts) by acylations. The ability of flotillin to oligomerize induces the formation of flotillin microdomains that serve as signaling platforms involved in the regulation of several cellular processes, including membrane trafficking and signal transduction. Thus, flotillins play an important role in the EGFR activation and downstream MAPK-signaling. Upon stimulation with the epidermal growth factor (EGF), flotillins are tyrosine-phosphorylated by Src-kinase that initiates the translocation of flotillins from the plasma membrane to endosomal compartments via an endocytotic pathway that is postulated to be clathrin-independent.

ADP-ribosylation factors (Arfs) are small GTPases of the Ras-superfamily that cycle between an inactive, cytoplasmic GDP-bound and a membrane-associated, active, GTP-bound state. Arf6 is involved in the regulation of the phospholipid-metabolism, rearrangement of the cortical actin cytoskeleton and in membrane transport processes, such as recycling and the clathrin-dependent and independent endocytosis. Independently of the endocytotic pathway, Arf6 participates in the internalization of many GPCRs, such as M_2 mAChRs.

The major aim of this study was to address the transcriptional effects that are mediated through the cholinergic transactivation of the EGFR by mAChRs and the role of flotillins in the cholinergic EGFR/MAPK-activation. The present study shows the cholinergic induction of the

MAPK target gene *Egr1* which is also a positive transcriptional regulator of the flotillin-gene expression. Consistent with the induced *Egr1*-expression, cholinergic stimulation of HaCaT cells results in increased flotillin expression. In order to test the cholinergic effect on the expression of selected EGF-like ligands and MMPs/ADAMs that are mediated by the MAPK pathway, the present study reveals a cholinergic induction of $TGF\alpha$, HB-EGF, AREG and EREG. Interestingly, upregulation of EREG upon cholinergic stimulation is induced dependently of the mAChR-mediated EGFR-transactivation, but independent on MAPK-activation, suggesting a regulation of EREG-gene expression via an additional cholinergic signal pathway. In addition, the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3 as well as ADAM8 and ADAM17 could be detected in HaCaT keratinocytes, whereas the cholinergic induction of MMP-3 is strongly dependent of the mAChR-mediated EGFR-transactivation mechanism and the downstream MAPK activation. Thus, the cholinergic induction of specific EGF-like ligands and MMPs/ADAMs implicates the existence of a *feed-forward* mechanism, which leads to an increased level of activating EGFR ligands and sheddases to facilitate the EGFR transactivation mechanism. Consistent with the role of flotillins, especially flotillin-1, in the EGFR-MAPK activation, depletion of flotillin-1 results in an impaired transcriptional induction of the MAPK target genes *Egr1* and *Dusp1* and the EGF-like ligands HB-EGF, $TGF-\alpha$, AREG, EREG, as well as MMP-3 upon cholinergic stimulation. The cholinergic induction of these genes is not affected by knockdown of flotillin-2. Therefore, this study shows the requirement of flotillin-1 for the cholinergic induced transcriptional regulation of these genes mediated via mAChR downstream signaling processes.

In order to study a functional connection between flotillins and Arf6, this study shows an interaction between flotillins and Arf6. Furthermore, depletion of flotillins results in a reduced activity of Arf6-WT, implicating an Arf6-effector function of flotillins. Overexpression of Arf6-WT prevented flotillin-2 from localizing to the plasma membrane in cells grown without serum, whereas a clear effect on the EGF-induced endocytosis of flotillin-2 was not observed. However, a dominant-negative Arf6 may exhibit an inhibitory effect on flotillin-2 endocytosis. The cooperation between flotillins and Arf6 in endosomal transport processes was investigated by overexpression of Arf6-WT and the Arf6-cargo BACE-1. In the presence of flotillins, overexpression of Arf6-WT leads to the formation of grape-like clusters of Arf6-positive vacuoles but does not grossly affect BACE-1 localization. However, knockdown of flotillins results in an accumulation of BACE-1 in perinuclear regions but this is most likely not dependent on Arf6. A direct binding of flotillins to the dileucine motif on the C-terminal tail of BACE-1 has been shown, suggesting a role of flotillins in endosomal sorting of BACE-1. Furthermore, previous studies implicate an additional role of Arf6 in the BACE-1 sorting. Altogether, the results of this study unveil a novel functional connection between flotillins and Arf6 in the context of membrane transport processes.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

V. Publikationen

- S. Kühne**, W. Ockenga, A. Banning, and R. Tikkanen, “Cholinergic Transactivation of the EGFR in HaCaT Keratinocytes Stimulates a Flotillin-1 Dependent MAPK-Mediated Transcriptional Response,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, pp. 6447–6463, 2015.
- S. Kühne**, **F. Wunderer**, A. Jilg, K. Ackermann, T. Sebesteny, E. Maronde, and J. H. Stehle, “Clock gene expression in the human pituitary gland,” *Endocrinology*, vol. 154, pp. 2046–2057, 2013, *equal contribution
- W. Ockenga, **S. Kühne**, S. Bocksberger, A. Banning, and R. Tikkanen, “Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Is Required for Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Muscarinic Acetylcholine Receptors in HaCaT Keratinocytes, vol. 15, pp. 21433–21454, 2014
- W. Ockenga, **S. Kühne**, S. Bocksberger, A. Banning, and R. Tikkanen, “Non-neuronal functions of the M2 muscarinic acetylcholine receptor,” *Genes (Basel)*, vol. 4, pp. 171–197, 2013. Review
- Kurrle N., Ockenga W., Meister M., Debus F., **Kühne S.**, John B., Banning A., Tikkanen R. (2013): Phosphatidylinositol 3-kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon flotillin-1 depletion in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 13(1):575.
- Meister M., **Kühne S.**, Zuk A., Tikkanen R.: Flotillins: novel regulators of the small GTPase Arf6. (manuscript in preparation)

Posterpräsentation	Symposium	Postertitel
October 3-6, 2013	Molecular Life Sciences, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology	Cooperation of Arf and flotillins in membrane trafficking
November 10, 2012	1st annual meeting with LOEWE-Research Focus on Non-Neuronal Cholinergic Systems	Role of membrane raft- associated flotillins in cholinergic signaling
August 28-30, 2014	1st annual meeting with LOEWE-Research Focus on Non-Neuronal Cholinergic Systems	Arf6 and Flotillins cooperate during cargo sorting in endosomes

VI. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Ritva Tikkanen, die mir die Möglichkeit für diese Arbeit gegeben und mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Ihr danke ich insbesondere für ihre engagierte Betreuung und ihr fortwährendes Interesse und ihre Gedanken, die in meine beiden wissenschaftlichen Projekte eingeflossen sind.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Antje Banning für die Betreuung dieser Arbeit, in der sie mir immer mit Rat und Tat, vor allem bei Fragen zur Analyse der quantitativen *RT-PCR*, zur Seite stand. Aber auch für eine herzliche Arbeitsatmosphäre und viele wissenschaftliche Tips und Gespräche, sowie ihre Hilfsbereitschaft möchte ich ihr danken.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Möglichkeit an dem von ihm organisierten Seminar zu non-neuronalen cholinergen Systemen teilnehmen zu können und außerdem für die Nutzung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops.

Zudem möchte ich mich bei all meinen Kollegen bedanken, die mich täglich auf diesem Weg begleitet haben und für die schöne Zusammenarbeit im Labor. Außerdem möchte ich Melanie Meister für die gemeinsame Zeit am Mikroskop und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen danken. Ein liebes Dankeschön auch an Petra Janson für ihre Hilfsbereitschaft und insbesondere Ralf Füllkrug, der mit vielen lustigen aber auch ernsten, interessanten Gesprächen eine große Unterstützung für mich war. Ein ganz besonderer und lieber Dank auch an Frauke, Wymke und Julia für die gemeinsame und schöne Zeit, sowohl im Labor als auch im Büro bei „unserem Kaffchen“, die mir jetzt schon sehr fehlt. Ich danke allen Drei für ihre moralische Unterstützung und ihre Hilfe, sowie ein immer offenes Ohr für wissenschaftliche, aber auch private Probleme. Die vielen schönen Gespräche mit Frauke über Gott und die Welt, sowie unsere Tiere haben unsere Pausen zu einer besonders schönen Zeit gemacht. Allen ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tikkanen, wie Nina Kurrle, Julia Murr, Simone Bocksberger und insbesondere Bincy John danke ich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Ein ganz besonderes Dankeschön von Herzen gilt dabei meiner Mama, die mich immer in allen Lebenslagen mit vielen lieben und aufheiternden Worten und Taten unterstützt hat, mein Vorbild ist und mir das Alles möglich gemacht hat. Von Herzen danke ich auch meinem Freund Irfan, der mit mir alle schweren, aber auch wunderschönen Zeiten mit viel Verständnis und seiner unendlichen Unterstützung und dem Glauben an mich durchgestanden hat. Für ihren lieben Beistand und die schönen Zeiten in unserer Freundschaft danke ich insbesondere meiner Freundin Silke.

VII. Erklärung und Eidesstattliche Versicherung

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

Ort, Datum

Unterschrift