

Interaktionsanalysen zwischen Flotillinen und Desmogleinen

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

vorgelegt von

Panico, Francesca Vanessa
aus Worms

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut, Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Tikkanen

2. Gutachter: Prof. Dr. Oksche

Tag der Disputation:
20.11.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zelladhäsion.....	1
1.2	Desmosomen	3
1.2.1	Molekulare Zusammensetzung	5
1.2.2	Die intrazelluläre <i>cadherin-like-sequence</i> (ICS).....	7
1.2.3	Dynamik und Stoffwechsel der Desmosomen	9
1.3	Desmosom-assoziierte Krankheiten	10
1.4	Die Mikrodomänen in der Zelladhäsion	12
1.5	Flotilline.....	13
1.5.1	Struktur.....	13
1.5.2	Funktionelle Bedeutung der Tyrosine der Flotilline	16
1.5.3	Vorkommen.....	16
1.5.4	Funktionen.....	18
1.5.5	Flotilline in der Zelladhäsion	19
1.5.6	Flotilline im Desmosomen	19
1.6	Ziele dieser Arbeit	21
2	Material	22
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Puffer	23
2.3	Antikörper.....	25
2.4	Synthetische Oligonukleotide.....	27
2.5	Plasmide.....	27
2.6	Kommerzielle Kits.....	28
2.7	Bakterienstämme	29
2.8	Zelllinien.....	29
2.9	Technische Ausstattung.....	30

2.10	Software	31
3	Methoden.....	32
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.1.2	Aufreinigung, Gelelektrophorese und -extraktion	33
3.1.3	Restriktionsverdau zu GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS	34
3.1.4	Ligation	34
3.1.5	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	34
3.1.6	Plasmidpräparation (Mini)	34
3.1.7	Plasmidpräparation (Midi)	35
3.2	Biochemische Methoden	36
3.2.1	Proteinexpression von GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS/ -CPD	36
3.2.2	Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	36
3.2.3	Indirekter GST-Pulldown.....	37
3.2.4	SDS-PAGE.....	38
3.2.5	Western-Blot	39
3.2.6	Detektion	39
3.2.7	Strippen	40
3.3	Zellbiologische Methoden	41
3.3.1	Zellkultur von HeLa- und hTert-Zellen	41
3.3.2	Passagieren der HeLa- und hTert-Zellen	41
3.3.3	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA.....	42
3.3.4	Ernte und Einfrieren der Zellen.....	42
3.3.5	Immunfluoreszenz.....	42
4	Ergebnisse	44
4.1	<i>In vivo</i> Expression und Kolokalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in humanen Keratinozyten.....	44

4.1.1	Expression der Zelladhäsionsproteine der Desmoglein-Familie und der lipid raft-assoziierten Proteine Flotillin-1 und-2 in humanen Keratinozyten	44
4.1.2	Kolokalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in hTert-Zellen	46
4.2	Proteininteraktionen zwischen den Flotillinen-1/-2 und den Verkürzten zytoplasmatischen Domänen der Desmogleine-1/-3	48
4.2.1	Klonierung von pGEX-GST-hDsg-1/-2/-3-IA-ICS	48
4.2.2	Proteinexpression von GST-hDsg-1/-3-IA-ICS und -CPD	51
4.2.3	Proteininteraktionsnachweis zwischen GST-hDsg-1/-3-IA-ICS/-CPD und Flotillinen	53
4.3	Interaktionsverhalten verschiedener Flotillin-2 Mutanten und der kompletten zytoplasmatischen Domäne (CPD) des Desmoglein-3	55
5	Diskussion	59
5.1	Flotilline interagieren über die intrazelluläre <i>cadherin-like-sequence</i> mit Desmogleinen	59
5.2	Tyrosin-163 nimmt Einfluss auf die Interaktion zu Desmoglein-3 und übernimmt eine regulatorische Rolle in der Desmosomendynamik	62
5.3	Fazit	66
6	Zusammenfassung	67
6.1	Summary	68
7	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Zellverbände höherer Organismen müssen besonderen Anforderungen genügen: Durch Zell-Zell-Kontakte können sich ganze Gewebearten zu komplexen Organsystemen verbinden, um ihren Aufgaben gerecht zu werden. Epithelzellen müssen eine abgeschlossene und schützende Oberfläche bilden, die durch Reißfestigkeit und gleichzeitiger Flexibilität in der Lage ist, von außen einwirkenden Kräften standzuhalten. Des Weiteren müssen sie zur Wundheilung und dem Verschluss eines Defektes befähigt sein und Kommunikation unter den Zellen ermöglichen. All dies ermöglicht ein widerstandsfähiger und zugleich dynamischer Zellverband. Die verschiedenen, in Geweben aller Art vorkommenden Verbindungen zwischen Zellen fasst man unter dem Begriff Zelladhäsion zusammen.

In der Zelladhäsion können diverse Zell-Zell-Kontakte voneinander unterschieden werden. So gibt es die apikolateral gelegenen *tight junctions*, welche gürtel- oder punktartige Zusammenschlüsse zwischen Zellen bilden (siehe Abb.1). Sie sind ein essentieller Bestandteil der dichten Barrierefunktion des Epithels. Um Kommunikation und den Austausch kleiner Moleküle zwischen den Zellen zu ermöglichen, bilden die *gap junctions* tunnelartige Verbindungen zu benachbarten Zellen aus. Durch sie kommt z.B. die Erregungsweiterleitung im Herzmuskelgewebe zustande. Damit ein Gewebe mit der jeweiligen Basalmembran verbunden ist, können sogenannte Hemidesmosomen einen Zell-Matrix-Kontakt herstellen. Weiterhin sind *adhaerens junctions* und Desmosomen in der Lage, mit dem Zytoskelett der eigenen und benachbarten Zellen zu interagieren, wobei *adhaerens junctions* mit Aktin- und Desmosomen mit Intermediärfilamenten interagieren (siehe Abb. 1). Diese Verbindungen zum Zytoskelett der Zelle gewährleisten einen stabilen und zugleich dynamisch-flexiblen Zellzusammenschluss. Die Fläche, an denen die Zellen durch *adhaerens junctions* und Desmosomen verbunden sind nennt man *anchor/ plaque region*, dementsprechend werden diese Zellkontakte auch als *anchoring junctions* bezeichnet (Delva *et al.* 2009; Green *et al.* 2010; Harris and Tepass 2010). Diese Arbeit fokussiert sich auf die Desmosomen und deren Interaktion mit den *raft*-assoziierten Flotillinen.

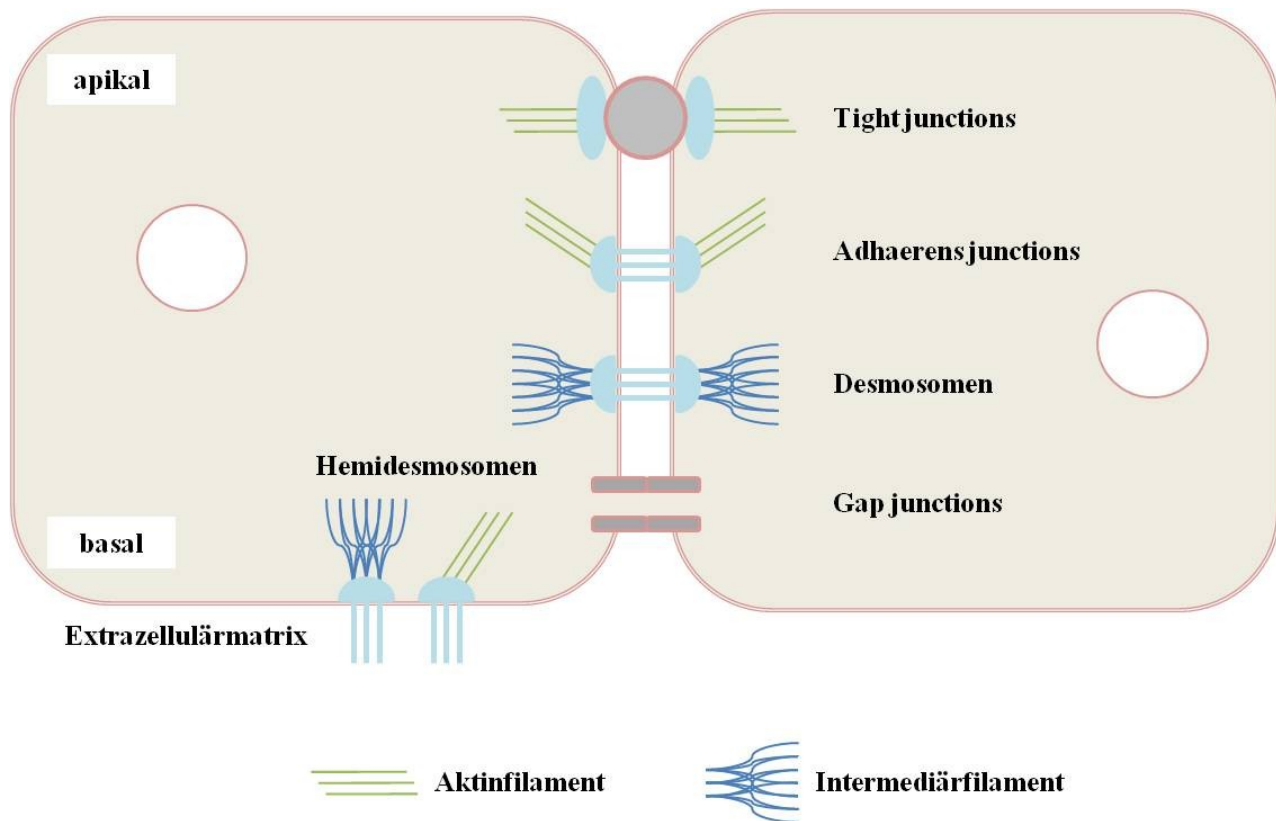


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Zellkontakte

Hier dargestellt sind die verschiedenen Zellkontakte am Beispiel eines Epithelzellverbandes, wie er im einschichtigen Epithel vorkommt. Apikolateral zu erkennen sind *Tight junctions*, die durch ihre Verbindungen zum Zytoskelett benachbarter Zellen eine gürtelförmige, dichte Verbindung zwischen den Zellen herstellt. Desweiteren sind die zur Zellkommunikation notwendigen, tunnelartigen *Gap junctions* dargestellt, die den Übertritt kleiner Moleküle und Salze zu benachbarten Zellen zulassen. Außerdem basal anzutreffen sind die zellmatrixinteragierenden Hemidesmosomen, die einen Zellverbund fest mit dem jeweiligen Zytoskelett einerseits und andererseits mit der Basalmembran verbinden.

Adhaerens junctions und Desmosomen können quer über die laterale Zelloberfläche verteilt vorkommen und stellen punktförmige Verbindungen zu benachbarten Zellen her. Die *anchoring junctions* interagieren mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts. Die *adhaerens junctions* stellen Verbindungen zu Aktinfilamenten und die Desmosomen zu Intermediärfilamenten der Zellen her.

1.2 Desmosomen

Desmosomen sind punktartige Zell-Zell-Kontakte, die durch extrazelluläre Interaktionen zwischen ihren spezifischen Proteinen, benachbarte Zellen verbinden und den Zellzusammenschluss durch intrazelluläre Interaktionen mit Intermediärfilamenten stabilisieren (siehe Abb. 1). Sie sind in allen Epithelien zu finden und verteilen sich entlang der lateralen Zellmembran. Desmosomen beinhalten spezielle, transmembranöse Adhäsionsproteine, die in einen extra- und intrazellulären Abschnitt unterteilt werden. Die extrazellulären Domänen binden kalziumabhängig an Domänen der benachbarten Zellen und bilden den Zell-Zell-Kontakt aus (Delva *et al.* 2009).

Der intrazelluläre Abschnitt des Desmosoms wird in drei morphologisch unterschiedliche Zonen unterteilt: die, der Plasmamembran angrenzende, *core-region*, die äußere Plaqueregion und die innere Plaqueregion. Zusammengefasst spricht man vom zytoplasmatischen Plaque, der mikroskopisch als verdichtete Zone erkennbar ist. Dieser deutlich erkennbare Abschnitt wird aus den im Desmosom akkumulierten Proteinen und Zytoskelettanteilen gebildet (Delva *et al.* 2009). Intermediärfilamente aus dem Inneren der Zellen strahlen in den zytoplasmatischen Plaque ein, um dort über Mediatorproteine in Kontakt mit dem intrazellulären Teil der desmosomalen Adhäsionsproteine zu treten (siehe Abb. 2). Die Funktion der Mediatoren im Desmosom übernehmen Vertreter der Armadillo- und Plakin-Proteinfamilien, wie Plakophilin, Plakoglobin/ γ -Catenin und Desmoplakin. Das Desmoplakin nimmt dabei eine Schlüsselposition ein, da es den Kontakt zum Zytoskelett herstellt (siehe Abb. 2) (Delva *et al.* 2009). Neben den Mediatoren gibt es einige Desmosom-assoziierte Proteine, deren Interaktion und Funktion bis jetzt ungeklärt sind (Kowalczyk and Green 2013).

Erst die Verwebung dieser einzelnen Strukturen befähigt ein Gewebe, wie z.B. der Haut, hohem mechanischem Stress standzuhalten und einwirkende Kräfte auf ein netzartiges Gebilde zu übertragen (siehe Abb. 2) (Delva *et al.* 2009; Kowalczyk and Green 2013).

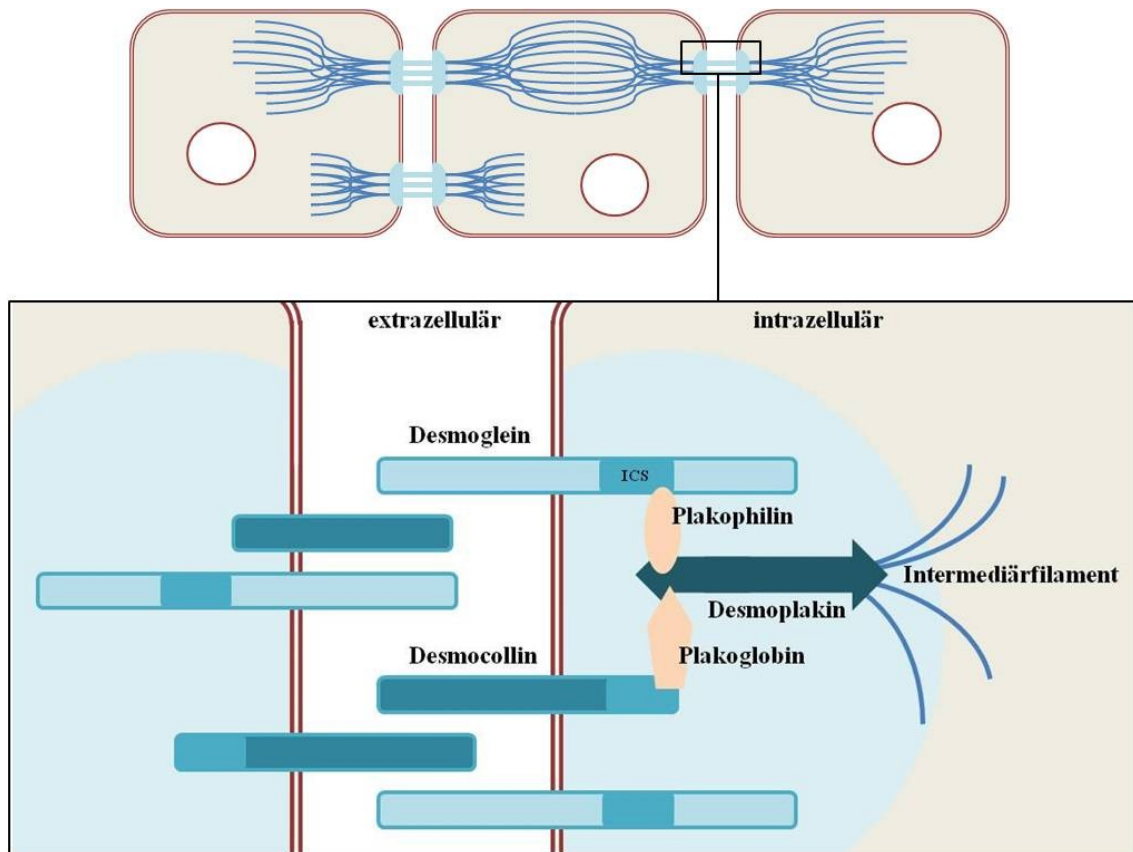


Abbildung 2: Aufbau des Desmosoms

Im oberen Abschnitt der Abbildung sind Desmosomen im Zellverband dargestellt. Die Desmosomen bilden im Gewebe ein breites, verwobenes Netz, das benachbarte Zellen miteinander verbindet und ideale Kraftverteilung und Widerstandskraft gewährleistet. Der schwarze Kasten zeigt die extrazellulär gelegenen Domänen der desmosomalen Cadherine (türkis eingefärbt: Desmoglein und Desmocollin), die den Zell-Zell-Kontakt ausbilden. Die Adhäsionsproteine verlaufen transmembranär in den Intrazellulärraum. Innerhalb der Zelle bilden die desmosomalen Cadherine Verbindungen zu Mediatorproteinen und den Intermediärfilamenten aus. Die verdichtete zytoplasmatische Plaqueregion (hellblauer Halbkreis) ist auch mikroskopisch sichtbar.

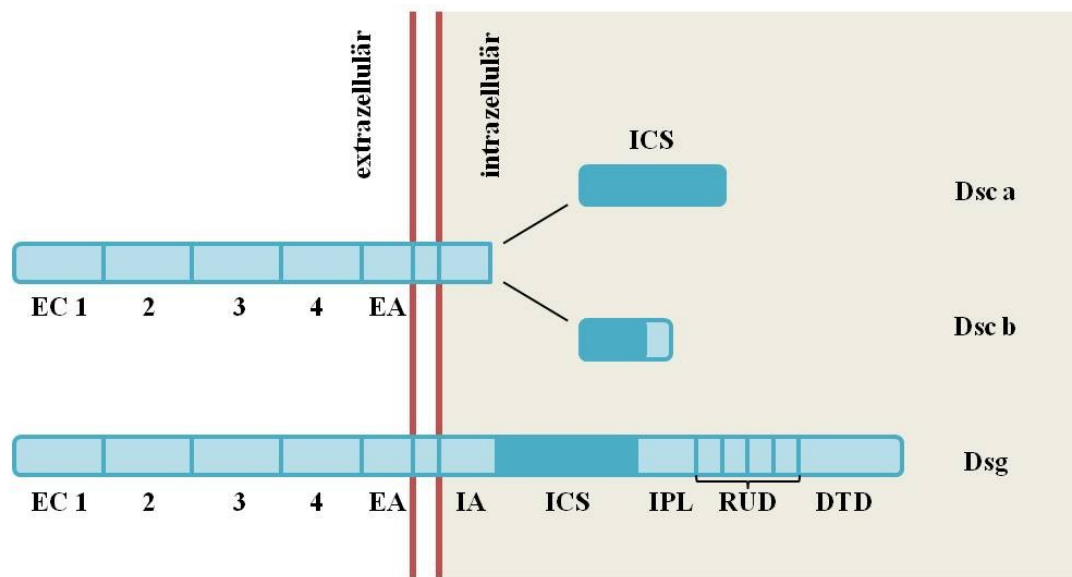
1.2.1 Molekulare Zusammensetzung

Die Adhäsionsmoleküle der verschiedenen Zell-Zell-Kontakte werden in der Familie der Cadherine zusammengefasst. Die Cadherin-Proteine fungieren als transmembranöse, kalziumabhängig bindende Adhäsionsrezeptoren. Sie ermöglichen durch ihren variablen Zusammenbau der extra- und intrazellulären Domänen spezifische Zellerkennung und –Kommunikation, was zu ihrer Beteiligung an diversen zellulären Prozessen, wie Morpho- und Angiogenese oder auch Transmitterübertragungen führt (Angst 2001). Sie werden in klassische, proto-, desmosomale- und atypische Cadherine unterteilt (Harris and Tepass 2010).

Die desmosomalen Cadherine bilden kalziumabhängige, starke Interaktionen untereinander und zu Mediatorproteinen aus. Sie werden in die Desmogleine 1-4 (Dsg) und die Desmocolline 1-3 (Dsc) unterteilt. Die Desmocolline werden zusätzlich in eine längere „a“- und eine, durch alternatives *splicen* verkürzte, „b“-Isoform, unterschieden. In Keratinozyten sind Desmoglein-1 und -3 die vorrangig exprimierten Proteine, um Zell-Zell-Kontakte aufzubauen, Desmoglein-2 und -4 spielen hier eine untergeordnete Rolle. Je nach Gewebeart variiert der Zusammenbau der Desmosomen (Nekrasova and Green 2013).

Desmogleine und Desmocolline enthalten vier extrazelluläre Cadherin-Homologiedomänen (EC), gefolgt von einem extrazellulären Anker (EA), der durch eine transmembranöse Domäne mit dem intrazellulären Anker (IA) verbunden wird. Alle Desmogleine und die längeren „a“-Isoformen der Desmocolline enthalten die darauffolgende intrazelluläre *cadherin-like sequence* (ICS). Die intrazelluläre prolinreiche *linker* Region (IPL), die in ihrer Anzahl variablen *repeat unit domains* (RUD) und eine aus Glycinwiederholungen bestehende *desmoglein terminal domain* (DTD), sind in der Subfamilie der Desmogleine, jedoch nicht in den Desmocollinen vorzufinden (siehe Abb. 3) (Delva *et al.* 2009).

Die Funktion der, IPL, RUD und DTD der Desmogleine, sowie die generelle Regulation der Interaktionsmechanismen im Desmosom, sind noch nicht vollständig geklärt. Die Desmogleine können anhand der Wiederholungszahl der RUD's unterschieden werden, hierbei gilt: Dsg-1 enthält fünf, Dsg-2 sechs, Dsg-3 zwei und Dsg-4 drei Wiederholungssequenzen (Delva *et al.* 2009).



EC 1 - 4: extrazelluläre Cadherin-Homologie

EA: extrazellulärer Anker

IA: intrazellulärer Anker

ICS: intrazelluläre Cadherin-like-sequence

IPL: intrazellulärer Prolin-linker

RUD: repeat-unit-domains

DTD: Desmoglein-terminal-domain

Abbildung 3: Domänenstruktur der desmosomalen Cadherine

Dargestellt sind die transmembranösen Domänen der Desmocolline (Dsc a und b) und Desmogleine (Dsg). Im extrazellulären Aufbau sind die desmosomalen Cadherine identisch, sie bestehen aus 4 extrazellulären Cadherin-Homologiedomänen und einem darauffolgenden extrazellulären Anker.

Intrazellulär erkennt man eine unterschiedliche Konstitution: das deutlich längere Desmoglein enthält einen intrazellulären Anker auf den die intrazelluläre *cadherin-like-sequence* (ICS), eine Prolinreiche *linker* Region, die in ihrer Anzahl, je nach Desmoglein-Isoform, variierenden *repeat-unit-domains* und die Desmoglein-spezifische *terminal-domain* folgen. Die Desmocolline sind kürzer. Nur die „a-Formen“ der Desmocolline (Dsc a), enthalten die vollständige ICS.

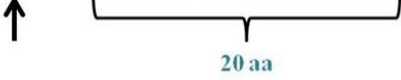
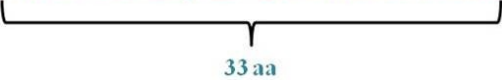
1.2.2 Die intrazelluläre *cadherin-like-sequence* (ICS)

Durch einen variablen Zusammenbau ihrer zytoplasmatischen Domänen sind Cadherine in der Lage, je nach Anforderung und Gewebeart spezifische Interaktionen einzugehen und so verschiedenste Zell-Zell-Kontakte aufzubauen (Harris and Tepass 2010). Die intrazelluläre *cadherin-like-sequence* (ICS) definiert eine in hohem Maße konservierte Aminosäuresequenz im zytoplasmatischen C-Terminus der desmosomalen Cadherine. Ihre Ähnlichkeit zu der *Cadherin cytoplasmatic domain* der klassischen Cadherine verleiht der ICS ihren Namen (Shapiro and Weis 2009).

Heute ist bekannt, dass diese Sequenz als eine spezifische Interaktionsfläche für Mediatorproteine wie z.B. β -Catenin und p120 Catenin fungiert, wodurch ihr eine Schlüsselposition in verschiedenen Adhäsionsapparaten zukommt. Im Desmosom treten Plakoglobin/ γ -Catenin und Plakophiline über diese Sequenz in Verbindung zu den Desmogleinen und α -Desmocollinen (Mathur 1994; Angst 2001; Shapiro and Weis 2009). Versuche um Mathur zeigten sogar, dass das Fehlen der ICS in Desmoglein-1 zum fehlerhaften Aufbau des Adhäsionskomplexes und zur Unfähigkeit der Interaktion mit dem Zytoskelett führten (Mathur 1994).

Interaktionsanalysen mit den desmosomalen Cadherinen zeigten zudem, dass die verkürzten Isoformen der Desmocolline (Dsc b) keine ICS enthalten (siehe Abb. 3). Die Aminosäuresequenzen von Dsc a und b sind bis zu einem gewissen Punkt identisch (siehe Pfeil in Abb. 4). Danach enden die längeren Dsc a-Formen mit der ICS und die b-Formen mit einer veränderten Sequenz. Die b-Formen sind nicht in der Lage, mit Mediatorproteinen zu interagieren und ihre Funktion ist weitgehend unbekannt (Angst 2001; Völlner 2016).

A

NP_001933	693	FMESYFCQKAYAYADEDEGRPSNDCLLIYDIEGV---G	707-760	Dsg 1
NP_001934	771	FLRNYFTDKAASYTEEDENHTAKDCLLVYSQEETE---	785-838	Dsg 2
NP_001935	788	FLDSYFSQKAFACAEEDDGQEAANDCLLIYDNEGADATG	802-858	Dsg 3
NP_077739	822	FTQPRLGEEKVYLCGQDEEHKHCEDYVCSYNYEGK---G	836-889	Dsc 1a
NP_077740	829	FTQPRLGEEKVYLCNQDENHKHAQDYVLTYNIEGR---G	843-896	Dsc 2a
NP_001932	824	FTQPRLGEEKLHRCNQNEEDRMPSQDYVLTYNIEGR---G	838-891	Dsc 3a
				
NP_001933		---GSPAGSVGCCSFIGEDLDDSFDDTLGPKFKKLADISLG	707-760	Dsg 1
NP_001934		E---SLNASIGCCSFIEGELDDRFLDDLGLKFKTLAEVCLG	785-838	Dsg 2
NP_001935		DATGSPVGSVGCCSFIADDLDDSFDDSLGPKFKKLAEISLG	802-858	Dsg 3
NP_077739		---GSLAGSVGCCSDRQEEEGLEFLDHLEPKFRTLAKTCIK	836-889	Dsc 1a
NP_077740		---GSVAGSVGCCSERQEEDGLEFLDNLEPKFRTLAEACMK	843-896	Dsc 2a
NP_001932		---GSPAGSVGCCSEKQEEDGLDFLNNLEPKFITLAEACTK	838-891	Dsc 3a
				

B

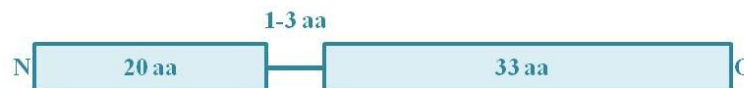


Abbildung 4: Vergleich der intrazellulären *cadherin-like-sequence* (ICS)

A: Zu sehen sind die Aminosäuresequenzen der intrazellulären *cadherin-like-sequence* für die Desmogleine 1-3 (Dsg 1/2/3) und die längeren Isoformen der Desmocolline 1-3a (Dsc 1a/2a/3a). Türkis hervorgehoben sind die sich ähnelnden, hoch konservierten ICS-Abschnitte der einzelnen Adhäsionsmoleküle. **Pfeil:** Letzte gemeinsame Aminosäure in den Proteinsequenzen der langen und kurzen Desmocollin-Isoformen. **B:** Schematische Darstellung der ICS-Proteinsequenz.

1.2.3 Dynamik und Stoffwechsel der Desmosomen

Der Einfluss, den Desmosomen auf die Stabilität und Widerstandskraft eines Gewebes nehmen, ist enorm und von großer Bedeutung. Sie müssen nicht nur einen stabilen Zellkontakt herstellen, sondern auch flexibel in ihren Auf- und Abbaumechanismen sein, um Anforderungen wie epidermalem Wachstum, Differenzierung oder Wundheilung gerecht werden zu können. Die Dynamik im Auf- und Abbau der Desmosomen ist komplex und dessen Verständnis könnte Hinweise bezüglich Gewebserneuerung, sowie Pathophysiologie diverser Krankheiten liefern (Green *et al.* 2010; Harris and Tepass 2010; Kowalczyk and Green 2013; Stahley *et al.* 2014).

Alle desmosomalen Cadherine werden zu Beginn ihrer Synthese als Vorstufenproteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert, um von dort aus zum Golgi-Apparat und anschließend zur Plasmamembran transportiert zu werden. Der Transport durch die Zelle erfolgt Kinesinabhängig entlang der Mikrotubuli und scheint mit Unterstützung von Armadilloproteinen abzulaufen (Green *et al.* 2010). Desmogleine lassen sich in einer in Detergenzien, wie Triton X100-löslichen und einer nicht-löslichen Fraktionen nachweisen. Die nicht-lösliche Fraktion enthält Desmogleine, die bereits in Desmosomen integriert sind, wohingegen die Desmogleine der löslichen Fraktion verwendet werden können um „Leaks“ zwischen Adhäsionskomplex und Intermediärfilament aufzufüllen (Völlner 2016).

Bis heute ist nicht ganz geklärt, welche Mechanismen den Auf- und Abbau der Desmosomen regulieren. Da Kalzium eine stabilisierende und damit regulierende Wirkung auf Cadherine hat (Angst 2001), ist eine Ansammlung von Desmogleinen an der Zellmembran bei erhöhter Kalziumkonzentration und bei Ausbildung neuer Zellkontakte zu beobachten (Green *et al.* 2010). Im Umkehrschluss werden diese Zell-Zell-Kontakte bei erniedrigter Kalziumkonzentration instabiler und vermehrt abgebaut. So kann dieser Effekt beispielsweise bei dem Krankheitsbild des Morbus Darier, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung mit Schädigung des zytosolischen Kalziumtransports, beobachtet werden (Green *et al.* 2010).

Als weitere Regulatoren im Auf- und Abbau der Desmosomen werden Spezielle Serinproteasen und –Inhibitoren, die während der Wundheilung exprimiert werden, diskutiert (Kowalczyk and Green 2013). Ebenfalls regulatorisch einflussnehmend

werden die Wechselwirkungen unter den intrazellulären Domänen der Desmogleine selbst vermutet (Kowalczyk and Green 2013; Yulis *et al.* 2018).

1.3 Desmosom-assoziierte Krankheiten

Eine Vielzahl an Krankheiten wird durch autoimmun- bzw. genetisch bedingter Störungen im Bereich der Desmosomen hervorgerufen. Ein genetischer Defekt im Bereich der desmosomalen Cadherine (Dsc 2, Dsg 2, unter anderem) führt zu insuffizienten Zellkontakten innerhalb der kardialen Muskelschicht (interkalierende *disc*) und zum späteren Krankheitsbild der „arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie“ (ARVC). Das Myokard muss hohen Druckbelastungen standhalten und ist auf einen stabilen Zellverband, sowie auf eine koordinierte Erregungsweiterleitung angewiesen, um seiner Pumpfunktion nachkommen zu können. Durch den desmosomalen Defekt kommt es im Laufe der Zeit zu bindegewebsartigen Umbauten des kardialen Myokards, mit Ausbildung globaler und regionaler Funktionsstörungen. Der Untergang funktioneller Myokardzellen führt zu einer Muskelatrophie und Störung der Erregungsleitung im Herzmuskel. Letzten Endes kommt es zur Ausbildung von ventrikulären Rhythmusstörungen mit Verlust der Pumpfunktion des rechten Herzens. Die ARVC wird für unklare, plötzliche Todesfälle bei jungen, sportlichen Menschen verantwortlich gemacht (Wichter 2005).

In der Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen sind diverse Adhäsionsmoleküle direkter Angriffspunkt für fehlgeleitete Autoantikörper und führen zum Erscheinungsbild der blasenbildenden Hauterkrankungen. Klinisch präsentieren sie sich durch schmerzhafte Blasen- und Erosionsbildung an Haut und Schleimhäuten, hervorgerufen durch die Auflösung der Adhäsionskontakte und Ablösung der einzelnen Hautschichten voneinander (Schmidt and Zillikens 2011).

Die autoimmunbedingten, blasenbildenden Erkrankungen können anhand der angegriffenen Zellkontakte und der daraus spezifischen Blasenbildung klassifiziert werden. Sind die desmosomalen Proteine Angriffsziel des Immunsystems, werden sie dem Formenkreis der Pemphiguskrankheiten zugeordnet. Hierzu zählen unter anderem der Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, paraneoplastische Pemphigus und der IgA-Pemphigus (Altmeyer 2018a).

Der Pemphigus vulgaris wird als chronisch verlaufende, akantholytische Autoimmunerkrankung mit schwerem bis tödlichem Verlauf definiert. Mit einer Inzidenz von 0,15/100000 ist er einer der am häufigsten vorkommenden bullösen Dermatosen in Deutschland. Unter anderem werden Desmoglein-1 und -3 bei diesem Krankheitsbild durch Autoantikörper angegriffen. Die Bindung der Antikörper im Gewebe ist mit einer Entzündungsreaktion verbunden, die durch autoinflammatorische Mechanismen zur Zerstörung der Desmosomen führt. Dies bewirkt eine intraepidermale Ablösung der Keratinozyten und einen Integritätsverlust ganzer Gewebsabschnitte (Altmeyer 2018b).

Wichtige Hinweise über die Assemblierung und die Regulation des desmosomalen Adhäsionskomplexes lieferten Studien über die durch Pemphigus-Antikörper induzierte Endozytose der Desmogleine (Stahley *et al.* 2014). Durch das Verständnis über Degradierungs-/Abbaumechanismen des Desmosoms sollten Rückschlüsse auf Organisation und Konstruktion der Zellkontakte möglich werden (Stahley *et al.* 2014; Völlner *et al.* 2016). Es wurde vermutet, dass dieser Endozytoseweg clathrinunabhängig und dafür mithilfe cholesterinreicher Membranabschnitte, sogenannter *lipid rafts*, abläuft. Mittlerweile konnte zwar gezeigt werden, dass Clathrin beteiligt ist (Meister *et al.* 2014), jedoch ließ diese Hypothese die cholesterinreichen Mikrodomänen in den Vordergrund diverser Untersuchungen bezüglich ihrer Rolle in der Zelladhäsion rücken.

1.4 Die Mikrodomänen in der Zelladhäsion

Die Plasmamembran ist angereichert mit Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Domänen. Diese beweglichen Mikrodomänen oder auch *membrane-/lipid-rafts*, verleihen der Zelle die Fähigkeit, sich an diverse Anforderungen anzupassen und stellen dynamisch fluktuierende und funktionelle Kompartimente in der Zellmembran dar. Sie können sich durch Lipid-Lipid-, Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen zu Plattformen verbinden und durch eine enorme Variabilität in ihrer Zusammensetzung verschiedenste Aufgaben in der Membran übernehmen (Simons and Sampaio 2011).

Es wurde beobachtet, dass es in Zellen, die mit Pemphigus vulgaris-Antikörpern (PV-AK) behandelt wurden zu einer Akkumulation der Adhäsionsproteine in *membrane-rafts* mit anschließender Endozytose dieses Membranabschnittes und letztendlicher Zerstörung des Desmosoms kommt. Die durch PV-AK initialisierte Endozytose der Desmogleine ist ein mit *lipid-rafts* assoziierter Vorgang, woraus die Hypothese entstand, dass die Mikrodomänen eine regulatorische Funktion im Desmosomen-Auf- und -Abbau übernehmen (Stahley *et al.* 2014).

An anderer Stelle konnte gezeigt werden, dass die Membrandomänen in der Lage sind, Cholesterolassoziierte Proteine zu akkumulieren, diese dadurch örtlich zu organisieren und so den Zusammenbau transmembranöser Proteinkomplexe zu fördern (Resnik *et al.* 2011). Hier wird klar, welche Rolle die *membrane-rafts* im Zusammenbau der verschiedenen Zell-Zell-Kontakte spielen müssen, da es sich bei jedem Einzelnen um hochkomplexe, transmembranöse Adhäsionskomplexe handelt, die cholesterolabhängig konstruiert werden. Eine Interaktion zwischen den Desmogleinen und den Membrandomänen konnte bereits nachgewiesen werden (Stahley *et al.* 2014). Umso wichtiger wurde es, sich die genauen Interaktionspartner der verschiedenen Adhäsionskomponenten anzuschauen. Beeinflussende Faktoren in Zell-Zell-Verbindungen scheinen die *raft*-assoziierten Flotilline zu sein. Die Flotilline wurden als „Cadherinpartner“ beschrieben und spielen somit, auch in den Desmosomen, eine vielleicht entscheidende, aber bis jetzt noch unvollständig geklärte Rolle (Guillaume *et al.* 2013).

1.5 Flotilline

Die Flotilline-1 und -2 wurden erstmals in Zusammenhang mit axonaler Regeneration in retinalen Fischzellen beschrieben, und in dieser Studie als Reggie-1/-2 benannt (Schulte 1997). Gleichzeitig beschrieb die Arbeitsgruppe um Bickel zwei neu entdeckte Proteine in Detergenzresistenten *membrane-rafts* und nannte sie Flotilline (Bickel *et al.* 1997). Später wurde klar, dass es sich um identische Entdeckungen handelte, wobei Reggie-1 dem Flotillin-2 und Reggie-2 dem Flotillin-1 entspricht. Heute ist bekannt, dass Flotilline ubiquitär in Säugerzellen exprimiert werden und durch ihre Fettsäuremodifikationen mit den *lipid-rafts* assoziieren. Sie sind somit u. A. in Vorgänge der Signaltransduktion, des Membrantransports und deren Organisation involviert (Meister and Tikkanen 2014).

1.5.1 Struktur

Flotillin-1 und -2 sind homologe, hoch-konservierte Proteine, mit einer molekularen Masse von je etwa 48 kDa, die eine 50%-ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen. Man kann sie in zwei Bereiche aufteilen: den N-terminalen Bereich, der durch einige Fettsäuremodifikationen für die Membraninteraktion zuständig ist und den C-terminalen Bereich, der zur Oligomerisierung benötigt wird und eine für Flotilline spezifische Domäne enthält (siehe Abb. 5). Beide Bereiche mit ihren jeweiligen Fähigkeiten werden benötigt, um die Assoziation der Flotilline zu den *membrane rafts* herzustellen. Vor allem Flotillin-1 hat sich als Markerprotein für diese Membranabschnitte etabliert.

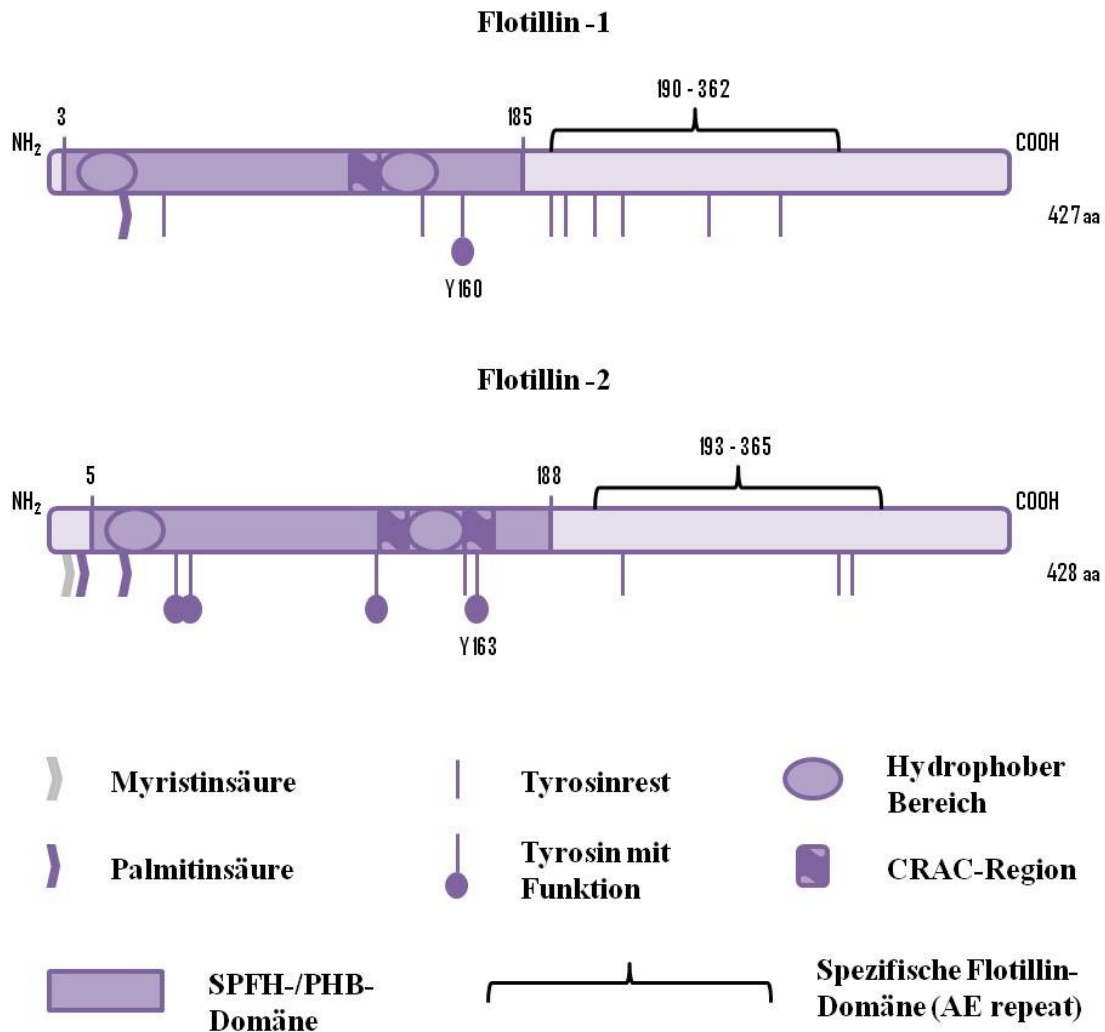


Abbildung 5: Molekularstruktur der Flotilline

Flotillin-1 und -2 enthalten im N-terminalen Bereich die dunkel lila eingefärbte SPFH- (PHB-) Domäne, mit markierten hydrophoben Bereichen, den CRAC-Regionen und die funktional wichtigen Tyrosine Y-160 /-163. Außerdem im N-terminalen Abschnitt lokalisiert sind die unterschiedlichen Acylierungen, die zur Membranassoziation notwendig sind. Flotillin-1 enthält lediglich eine Palmitinsäure, wohingegen Flotillin-2 mehrere Palmitinsäuren und eine Myristinsäure zur Assoziation benötigt. Im hell lila gefärbten C-Terminus der Flotilline sind die flotillinspezifischen Domänen markiert, die α -Helices ausbilden und zur Oligomerisierung von Nöten sind.

Beide Flotilline enthalten im N-terminalen Abschnitt eine Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C- (SPFH), oder auch als Prohibitin-Homologie- (PHB), bezeichnete Domäne, die sie durch diverse Fettsäuremodifikationen befähigt mit den Mikrodomänen zu interagieren. In Flotillin-1 wird die Assoziation durch eine posttranslationale Palmitoylierung an Cystein-34 vermittelt. Flotillin-2 wird kotranslational an Glycin-2 myristyliert und anschließend, davon abhängig, an Cystein-4, -19 und -20 palmitoyliert.

Die Interaktion zwischen Flotillin-2 und der Plasmamembran ist abhängig von diesen Acylierungen, da gezeigt werden konnte, dass Flotillin-2-Mutanten, die kein myristyliertes Glycin enthielten, nicht palmitoyliert werden konnten und ihre Assoziation zu *lipid-rafts* vollständig verloren (Neumann-Giesen 2005). Des Weiteren enthält die SPFH-Domäne sogenannte CRAC-Bereiche, die mutmaßlich als Cholesterolerkennungs-Sequenzen fungieren sollen (Roitbak *et al.* 2005). Ebenfalls in SPFH lokalisiert sind funktionell bedeutende Tyrosinreste, besonders hervorzuheben sind hier das Tyrosin-160 (Y-160) des Flotillin-1 und das Tyrosin-163 (Y-163) des Flotillin-2, die durch Src-Kinasen phosphoryliert werden und damit Einfluss auf Lokalisation und Funktion der Flotilline nehmen (siehe Abb. 5 und Abschnitt 1.5.2), (Neumann-Giesen 2005; Neumann-Giesen *et al.* 2007; Babuke *et al.* 2009; Riento *et al.* 2009).

Der C-terminale Abschnitt beider Flotilline enthält eine spezifische Flotillin-Domäne, die α -Helices in einer *coiled-coil*-Struktur ausbildet. Diese Struktur ist durch typische Wiederholungen eines Alanin- und Glutamat-Sequenzmotivs (AE *repeat*) charakterisiert (siehe Abb. 5) und vermittelt wahrscheinlich die Homo- und Heterooligomerisierung unter den Flotillinen, wobei auch eine Rolle der SPFH-Domäne in der Oligomerausbildung diskutiert wird (Bodin *et al.* 2014). Flotilline streben eine Oligomerstruktur an und scheinen so einen regulatorischen und stabilisierenden Einfluss aufeinander zu nehmen (Solis *et al.* 2007; Babuke *et al.* 2009).

1.5.2 Funktionelle Bedeutung der Tyrosine der Flotilline

Seit der Entdeckung, dass Flotilline auf eine EGF-Stimulation hin in vesikulären Strukturen der Zelle akkumulieren, wird die Wirkung der Tyrosinphosphorylierung auf Flotilline und deren Beteiligung an diversen *signaling*-Prozessen der Zelle untersucht (Babuke and Tikkanen 2007; Riento *et al.* 2009; Chartier *et al.* 2011; Amaddii *et al.* 2012). Verschiedene Fettsäuremodifikationen sind für die Lokalisation und Assoziation zur Plasmamembran nötig, aber auch die Phosphorylierung der Tyrosinreste scheint eine Rolle in der subzellulären Verteilung und Lokalisation der Proteine zu spielen (siehe Abb. 6) (Neumann-Giesen *et al.* 2004).

In Studien von Neumann-Giesen wurden verschiedene Flot-2 Mutanten generiert, um den Einfluss der verschiedenen Tyrosinreste auf die Lokalisation und Funktion der Flotilline zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass Flotillin-2 nach EGF-Stimulation an mehreren Tyrosinen durch die Src- bzw. Fyn-Kinase phosphoryliert wird. Speziell die Phosphorylierungen an Y-163 des Flotillin-2 und an Y-160 des Flotillin-1 sind notwendig, um Flotillin, gemeinsam mit dem assoziierten Membranabschnitt, ins Zellinnere aufzunehmen und es zu befähigen, in vesikulären Strukturen zu akkumulieren. Ist Y-163 in Flotillin-2 nicht vorhanden, bleibt es fest mit den Mikrodomänen der Plasmamembran verbunden, und lässt sich kaum in intrazellulären Strukturen nachweisen (Neumann-Giesen *et al.* 2007; Riento *et al.* 2009).

1.5.3 Vorkommen

Flotilline oder Flotillin-ähnliche Proteine werden in diversen Säugerzellen, Bakterien, Pilzen und Pflanzen exprimiert. Ihr Vorkommen und ihre Lokalisation variieren Gewebs- und Stoffwechselabhängig. Sie kommen in manchen Geweben wie z.B. in Muskel- oder neuronalem Gewebe in höheren Konzentrationen vor. Aufgrund ihrer Assoziation zu Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen sind sie hauptsächlich an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert, wo sie z.B. in Zell-Zell-Kontakten akkumulieren (Siehe Abb. 6) (Bodin *et al.* 2014).

Flotilline kommen zwar auch als Monomere in Zellen vor, sind aber hauptsächlich als Oligomere Strukturen nachweisbar. Die Homo- und Heterooligomerisierung erhöht die Affinität zu den *lipid-rafts*, und in dieser Form ist es den Flotillinen möglich, sich in intrazellulären Kompartimenten anzusammeln.

In Studien konnte festgestellt werden, dass Flotillin-2 nur in Verbindung mit Flotillin-1 in Endosomen aufgenommen werden kann (Babuke *et al.* 2009). In einer Studie von Neumann-Giesen konnte die vermehrte Ansammlung beider Flotilline im Zellinneren von HeLa-Zellen, mittels *epidermal-growth-factor*-Stimulation (EGF) induziert werden. Vor allem Flotillin-2 ist in diversen Zelltypen in vesikulären Strukturen, die möglicherweise späten Endosomen entsprechen, detektiert worden (Neumann-Giesen *et al.* 2004; Völlner 2016). Zusammengefasst sprechen diese Beobachtungen dafür, dass es, abhängig vom Zelltyp und deren Differenzierungsstadium, zu einer breiten subzellulären Verteilung beider Flotilline kommen kann (Babuke *et al.* 2009).

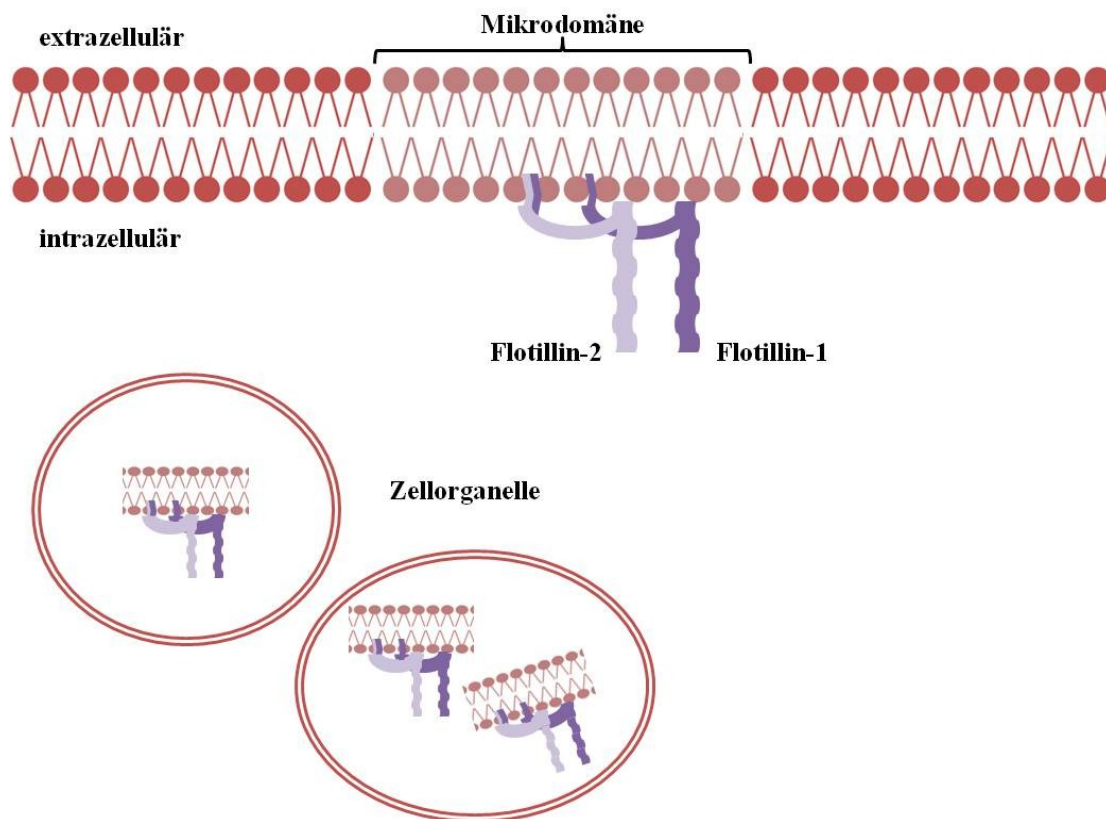


Abbildung 6: Zelluläre Lokalisierung von Flotillin

Vereinfachte Darstellung der Flotillin-Oligomere mit ihren verschiedenen Lokalisationen in der Zelle. Flotilline sind sowohl an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, als auch in vesikulären Strukturen im Zellinneren aufzufinden.

Flotilline sind also in der Lage, sich strukturell gegenseitig zu stabilisieren, scheinen aber auch einen regulatorischen Einfluss aufeinander zu haben, da in Experimenten mit Flotillin-*knockout*-Organismen (Flot-KO) eine voneinander abhängige Expression beobachtet werden konnte. In Zellen mit Flotillin-2 Depletion konnte eine Reduktion des Flotillin-1-Protein-Levels nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde eine schwächere Reduktion des Flotillin-2-Levels in Flotillin-1 depletierten-Zellen beobachtet, was auf eine höhere Abhängigkeit in der Expression von Flotillin-1 zu -2 schließen lässt (Solis *et al.* 2007; Banning *et al.* 2014).

1.5.4 Funktionen

Eine genaue Funktion konnte den *raft*-assoziierten Flotillinen noch nicht zugeordnet werden, allerdings sind sie in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Durch ihre Plasmadomänenassoziation sind sie maßgeblich an Signal- und Membrantransportprozessen wie z.B. Insulin-*signaling*, der MAP-Kinase-Signaltransduktion, Phagozytose, sowie an der Dynamik des Zytoskeletts und Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt (Babuke and Tikkanen 2007; Neumann-Giesen *et al.* 2007; Amaddii *et al.* 2012; Meister and Tikkanen 2014; Banning *et al.* 2018).

Den Heterooligomeren der Flotilline wurde eine *scaffolding*-Funktion in diversen Membrantransportprozessen zugeschrieben (Bodin *et al.* 2014). Andere Ergebnisse zeigen sogar, dass die Flotillinendozytose unter EGF-Stimulation von der Heterooligomerisation abhängig ist, da Flotillin-1 im Oligomer vorhanden sein muss, um Flotillin-2 aufzunehmen. Damit würden Flotilline neben der stabilisierenden auch eine regulatorische Instanz in der Endozytose darstellen (Babuke *et al.* 2009). Weitere regulatorische Aufgaben, z.B. im endosomalen Stoffwechsel oder in der Reifung der Phagozyten werden vermutet (Dermine *et al.* 2001; John *et al.* 2014; Meister and Tikkanen 2014).

1.5.5 Flotilline in der Zelladhäsion

Es wird angenommen, dass durch die Organisation von Mikrodomänen cholesterolreiche Abschnitte in der Membran bereitgestellt werden, die wiederum notwendig sind, um Adhäsionsmoleküle zu akkumulieren und Zell-Zell-Kontakte aufzubauen (Resnik *et al.* 2011). Flotilline scheinen in diesem Zusammenhang eine *scaffolding*-Funktion auszuüben und bilden sozusagen die Basis für den Aufbau cadherinabhängiger Zelladhäsion (Bodin *et al.* 2014). Sie werden von der Arbeitsgruppe um Guillaume als neue „Cadherinpartner“ mit essentieller Bedeutung für Cadherin-Assemblierung und deren Integrität in Zell-Zell-Kontakte beschrieben. Ihre Anhäufung in Zelladhäsiven Komplexen steigt mit der Menge an Adhäsionsmolekülen, und ihre Depletion führt zu erheblichen Defekten der Zellverbindungen (Guillaume *et al.* 2013). Mehrere Assoziationen zu verschiedensten Adhäsionsmolekülen konnten bereits nachgewiesen werden. In Experimenten mit menschlichen Nierenzellen konnten Kollokalisierungen zwischen endogener Flotillin-2-Domänen, E-Cadherin und β -Catenin dargestellt werden (Roitbak *et al.* 2005). Eine Assoziation von Flotillin-1 zu E-Cadherin und zu p120-Catenin konnte durch die Arbeitsgruppe um Chartier aufgezeigt werden (Chartier *et al.* 2011). Auch das Mediatorprotein Plakoglobin/ γ -Catenin, das der Armadillo-Proteinfamilie angehört und im desmosomalen Adhäsionskomplex den Kontakt zum Desmoplakin und schließlich zum Intermediärfilament vermittelt, interagiert direkt mit Flotillinen (Kurrle *et al.* 2013).

1.5.6 Flotilline im Desmosomen

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass eine Flotillin-Depletion zu zerstörten desmosomalen Zellkontakten mit veränderter Desmoglein-3 Lokalisation und verminderter Expression führt. Flotilline beeinflussen damit direkt die Stärke und Ausbildung der Zelladhäsion im Epithel (Völlner *et al.* 2016). Desweiteren konnte in Zellen, die mit Pemphigus vulgaris-Antikörpern (PV-AK) behandelt wurden, eine geringere Plasmamembran-assoziierte Flotillin-2-Fraktion nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass Flotilline nicht nur in gesunder, sondern auch in kranker Haut, eine Rolle in der Stabilisierung der Desmosomen spielen. (Völlner *et al.* 2016).

Beide Flotilline konnten zudem in interkalierenden *discs* (IDs) tierischen und menschlichen Herzmuskelgewebes nachgewiesen werden (Kessler *et al.* 2019). Die ID enthält *adhaerens junctions* und Desmosomen, um benachbarte Herzmuskelzellen und deren Zytoskelette miteinander zu verbinden. Hier konnte eine Interaktion unter den Flotillinen nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, führen desmosomale Schäden bei der ARVC zu schweren Herzschäden mit tödlichen Folgen (siehe Abschnitt 1.3). Bezüglich der desmosomalen Pathogenese konnte zwar keine direkte Verbindung zu den Flotillinen hergestellt werden, es wird jedoch vermutet, dass Flotilline regulierend auf die Expression eines bestimmten Ionenkanals wirken und dadurch die fehlgeleitete Herzmuskelerregung mitbeeinflussen (Kessler *et al.* 2019). Diese Beobachtungen lassen Flotilline als regulatorische und notwendige Faktoren im Zellverband und dessen Assemblierung vermuten.

Wie genau Flotilline mit dem Desmosom interagieren ist noch nicht bekannt. Bis jetzt konnte eine direkte Interaktion zwischen Flotillinen und den Desmogleinen, Desmocollinen, sowie γ -Catenin nachgewiesen werden, die alle essenzielle Komponenten des desmosomalen Adhäsionskomplex darstellen (Kurrle *et al.* 2013; Völlner *et al.* 2016). In früheren Interaktionsanalysen unserer Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass beide Flotilline mit den Desmogleinen 1-3 und den langen Desmocollin-Isoformen „a“, jedoch nicht mit den verkürzten „b“-Formen, interagierten (Völlner 2016). In diesen Isoformen der Desmocolline fehlt die intrazelluläre-*cadherin-like-sequence* (ICS), und Flotilline können nicht interagieren (siehe Abb. 3 und Abschnitt 1.2.2). Auf Seiten der desmosomalen Adhäsionsproteine ist bekannt, dass die meisten Mediatorproteine, wie z.B. γ -Catenin, über die ICS mit ihnen interagieren (siehe Abschnitt 1.2.2). Die ICS übernimmt hier eine vermittelnde Rolle in der Interaktion zwischen desmosomalen Cadherinen und ihren Interaktionspartnern.

Die direkte Interaktion zwischen Flotillinen, den desmosomalen Interaktionspartnern einerseits, sowie den Desmogleinen und Desmocollinen andererseits, lässt eine Art Brückenfunktion vermuten. Möglicherweise interagiert Flotillin ebenfalls über die ICS mit Desmogleinen und Desmocollinen und unterstützt hiermit die Interaktion zu Mediatorproteinen. Die oben genannten Beobachtungen lassen die ICS als Interaktionsfläche zwischen Flotillinen und desmosomalen Cadherinen vermuten. Der Nachweis einer Interaktion auf dieser Fläche würde die Bedeutung dieser intrazellulären Domäne hervorheben.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die aufgeführten Ergebnisse lassen Flotilline als Interaktionspartner mit funktioneller und möglicherweise auch regulatorischer Funktion im Adhäsionskomplex des Desmosoms vermuten. Die Interaktionsfläche zwischen Desmogleinen und Flotillinen ist bisher nicht genau definiert. Um die Rolle der Flotilline im desmosomalen Stoffwechsel verstehen zu können, soll die molekulare Interaktion zwischen Desmogleinen und Flotillinen in dieser Arbeit näher eingegrenzt werden. Mithilfe von neu generierten GST-Fusionsproteinen, welche die verkürzte, auf den IA-ICS-Abschnitt beschränkte, intrazelluläre Domäne der Desmogleine enthalten, sollen *in vitro*-Interaktionsanalysen mit Flotillinen durchgeführt werden. Des Weiteren sollen Versuche mit Flotillin-2-Tyrosin-Mutanten durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von Flotillinen bei der Interaktion eine Rolle spielt.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt (DE)
Agarose	Roth, Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
Aprotinin	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe (DE)
Coomassie brilliant blue G-250	AppliChem, Darmstadt (DE)
Cutsmart buffer	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M. (DE)
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>), High glucose	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Marker	NEB, Frankfurt a.M. (DE)
ECL western blotting detection reagents	GE Healthcare, München (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Gluthatione-sepharose-beads 4B	GE Healthcare, München (DE)
Kanamycin	Roth, Karlsruhe (DE)
KGM (<i>Keratinocyte Growth Medium</i>)	PromoCell, Heidelberg (DE)
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Roth, Karlsruhe (DE)
LB-Medium	Roth, Karlsruhe (DE)
Leupeptin	Roth, Karlsruhe (DE)
Lysozyme	Roth, Karlsruhe (DE)

MACSfectin	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Octyl-beta-D-glucopyranoside	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Pansorbin cells	Merck, Darmstadt (DE)
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe (DE)
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt (DE)
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Q5 reaction buffer	NEB, Frankfurt a.M. (DE)
Salzsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Super Script Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
TEMED (Tetramethylthylendiamin, '1,2-bis (dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris	AppliChem, Darmstadt (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

2.2 Puffer

Eigens angesetzte Puffer und deren Zusammensetzung sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 2 Pufferzusammensetzungen

Blockierungspuffer (WB)	5% Milchpulver in TBST
Co-IP-Puffer	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA 0,5% Triton
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure
Coomassie-Blau-Entfärber	2% Metahnlol; 7,5% Essigsäure

DNA Puffer	75% (v/v) Glycerol; 2mg/ml Bromphenolblau; 4 mg/ml Xylencyanol; 50 mM EDTA
ECL Lösung (verstärkte Chemielumineszenz-Lösung)	1250 µM 3-aminophtalhydrazide (Luminol); 200 µM p-Cumarsäure; 100 mM TrisHCl pH 8,5; 1:1000 10% H ₂ O ₂
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes (pH 6,8); 2 mM MgCl ₂ ; 5 mM EGTA (pH 8); 4% PFA
GST Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,01% Triton X-100; 1 mM DTT; 40 mM reduziertes Gluthation
Lämmli-Gelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar-Pulver; 1 L LB-Medium
LB-Medium (Luria/Miller)	25 g LB-Brühe in 1 L Wasser
PBS	150 mM NaCl; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; titrieren mit NaOH bis sich ein pH von 7,4 einstellt
Ponceau Färbelösung	0,1% ponceau-red; 5% Essigsäure
SDS Puffer/ Proteinladepuffer (4x)	250 mM Tris-HCl pH 6,8%; 8% SDS; 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau; 100 mM DTT; 20% 2-mercaptoethanol
Stripping Basislösung für WB	0,1 M NaOH
Stürmerlysepuffer	50 Mm Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 2mM EDTA; 1% NP-40
TAE (1x)	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM
(0,5x für DNA Gele)	EDTA (pH 8,0)
TBST	10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,4; titrieren mit HCl bis sich ein pH von 7,4 einstellt
TE-Puffer	Tris pH 8,0; 0,1 mM EDTA
Transferpuffer für WB	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 10% v/v Methanol

2.3 Antikörper

In den nachfolgenden Tabellen finden sich primäre und sekundäre Antikörper, die für den Western Blot (WB), die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) oder den indirekten Pulldown (IP) verwendet wurden. Zuletzt sind einzelne Farbstoffe oder Enzymreagenzien aufgelistet.

Tabelle 3 primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	WB	IF	IP	Firma
Flotillin-1	Mouse	1:1000	1:150		BD, Heidelberg (DE)
Flotillin-1	Rabbit	1:2000		2 µg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Flotillin-2(F2C)	Rabbit	1:1000	1:150	2 µg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Flotillin-2 /ESA	Mouse	1:1000	1:50		BD, Heidelberg (DE)
Desmoglein 1	Mouse	1:1000			BD, Heidelberg (DE)
Desmoglein 1	Rabbit		1:50		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (DE)
Desmoglein 2	Mouse	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (DE)
Desmoglein 3	Mouse	1:500	1:100	2 µg	BioRad, München (DE)
GAPDH	Mouse	1:10000			Abcam, Cambridge (UK)

Tabelle 4 sekundäre Antikörper

Antikörper/ Konjugat	WB	IF	Firma
Goat anti mouse/ HRP*	1:10000		Dako, Wiesentheid (DE)
Goat anti rabbit/ HRP*	1:10000		Dako, Wiesentheid (DE)
Goat anti mouse/ CY3		1:300	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (UK)
Goat anti rabbit/ AlexaFluor488		1:300	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (UK)

*HRP: Horseradish peroxidase

Tabelle 5 Farbstoffe und Enzyme

	DNA Gele	IF	Firma
Ethidiumbromid	1:10000		Dako, Wiesentheid (DE)
DAPI*		1:10000	Dako, Wiesentheid (DE)

*

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

2.4 Synthetische Oligonukleotide

DNA-Primer wurden dazu verwendet ausgewählte menschliche Gensequenzen mittels PCR zu vervielfältigen. Alle Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich in Taufkirchen bezogen. Nachfolgend sind alle Primer und ihre Basenfolge von 5' zu 3' aufgeführt.

Tabelle 6 Primer

Name	Sequenz 5' zu 3'	NCBI Ref Seq.
hDsg1_cyt_BamHI_fw	CTATAGGATCCTGTGATTGTGGAGGTGCTCCTC	NM_001942.2
hDsg1-ICS-STOP-EcoRI	CTATAGAATTCCCTATCCTAGGCTGATGTCTGCC	
hDsg2_cyt_BamHI_fw	CTATAGGATCCATGTGCCATTGCGGAAAGGGC	NM_001943.3
hDsg2-ICS-STOP-SalI	CTATAGTCGACCTAACCCAGGCAAACTTCAGCTAG	
hDsg3_cyt_EcoRI_fw	CTATAGAATTCTTGACCTGTGACTGTGGGGCAG	NM_001944.2
hDsg3-ICS-STOP-SalI	CTATAGTCGACTCAGCCTTCACCATCAACACCAAGG	

2.5 Plasmide

Verwendete Plasmide und DNA-Konstrukte zur Synthese und Vervielfältigung einzelner Proteine sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 7 Plasmide

Name	Vektor	Insert/Tag	NCBI Ref Seq./ Referenz
GST pGEX4T-1	pGEX4T-1	GST	GE Healthcare, München (DE)
GST-Dsg-1/2/3-IA-ICS	pGEX4T-1	GST	Francesca V. Panico AG Tikkanen
GST-Dsg-1-CPD	pGEX4T-1	h-Dsg1 (1923-3363) /GST	NM_001942.2 (Völlner 2016)

GST-Dsg-2-CPD	pGEX4T-1	h-Dsg2 (2088-3545) /GST	NM_001943.3 (Völlner 2016)
GST-Dsg-3-CPD	pGEX4T-1	hDsg-3 (2024-3108) /GST	NM_001944.2 (Völlner 2016)
pEGFP-N1	pEGFP-N1	EGFP	Clontech, Mountain View, CA (USA)
R1-WT-pEGFP	pEGFP-N1	<i>Rat reggie-1</i> (1-226) /EGFP	(Neumann-Giesen 2005)
R1-Y163F-pEGFP	pEGFP-N1	Siehe R1-WT-pEGFP, Tyrosin 163 mutiert zu Phenylalanin	(Neumann-Giesen 2005)
6x YF-pEGFP	pEGFP-N1	Siehe R1-WT-pEGFP, Tyrosin 24, 124, 158, 241, 348 und 351 mutiert zu Phenylalanin	(Neumann-Giesen 2005)
R1-G2A-pEGFP	pEGFP-N1	Siehe R1-WT-pEGFP, Glycin 2 mutiert zu Alanin	(Neumann-Giesen 2005)

2.6 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits und Säulen zur Aufreinigung der hergestellten DNA-Replikate sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8 Aufreinigungs Kits

Name	Protokoll	Firma
Plasmid DNA purification KIT, „Nucleo Spin Plasmid (NoLid)	Isolation of high-copy plasmid DNA from e. coli	Macherey-Nagel, Düren (DE)
Plasmid DNA	High-copy plasmid	Macherey-Nagel, Düren

purification KIT; „Nucleo Bond Xtra Midi“	purification (Midi, Maxi)	(DE)
High Pure PCR Product Purification Kit		Roche, Mannheim (DE)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up		Macherey-Nagel, Düren (DE)

2.7 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten, bei 37° C kultiviert und sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 9 Bakterienstämme

Name	Organismus	Anwendung	Referenz
XL-1 Blue	E.coli	Plasmidamplifikation	Stratagene, San Diego (USA)
Rosetta (DE3)pLysS	E.coli	Proteinexpression	Merck, Darmstadt (DE)

2.8 Zelllinien

Die Zelllinien, Kultivierungsbedingungen und die Zusammensetzung der Wachstumsmedien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 10 Wachstumsmedien

Medium	Inhaltsstoffe
DMEM++/++	10% fetales Kalbserum; 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Nicht-essentielle-aminosäuren (NEAA); 1% Natrium Pyruvat
KGM	Fetales Kalbserum 0,004 ml/ml, Epidermaler Wachstumsfaktor 0,125 ng/ml, Insulin 5µg/ml, Hydrokortison 0,33 µg/ml, Adrenalin 0,39 µg/ml, Transferrin, holo 10 µg/ml, CaCl ₂ 0,05 mM, Gentamycin 30 mg/ml

Tabelle 11 Zelllinien

Name	Beschreibung	Kulturbedingungen
HaCaT	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten (Boukamp et al, 1988)	DMEM++/++; 8% CO ₂ ; 37°C
HeLa	Humane epitheliale Zervixkarzinomzellen	DMEM++ 8% CO ₂ 37°C
hTert	Immortalisierte humane Keratinozyten	KGM 8% CO ₂ 37°C

2.9 Technische Ausstattung

Tabelle 12 technische Ausstattung

Gerät	Model	Firma
Agarosegel-elektrophorese-Kammer	Typ Midi-large	Neo-Lab, Heidelberg (DE)
Acrylamidgel-elektrophorese-Kammer	Mighty-small II	GE Healthcare, München (DE)
Transfertank für WB	Criterion blotter	BioRad, München (DE)
Bakterienschüttler	KS-15	Edmund-Bühler GmbH, Bodelshausen (DE)
Bakterieninkubator	Incucell	MMM, Darmstadt (DE)
Zellkulturinkubator	CO2 Incubator	Sanyo, Osaka (JP)
Clean Bench	HeraSafe KS	Thermo-Fisher-Scientific, Dreieich (DE)
PCR Thermocycler	TPersonal	Biometra, Göttingen (DE)
Photometer	Bio Photometer Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)

Mikroplattenleser	Infinite M200	Tecan, Männedorf (CH)
Sonicator	Sonopuls	Bendelin, Berlin (DE)
Lichtmikroskop	AE 31	Motic, Wetzlar (DE)
Konfokales Laserscan Mikroskop	LSM710 Confocal LSM	Carl-Zeiss, Jena (DE)
Zentrifugen	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen (DE)
	J2-21	Beckmann Coulter, Sinsheim (DE)
	Optima LE-80K	Beckmann Coulter, Sinsheim (DE)

2.10 Software

2007 Microsoft Office System

ImageJ 1:52e

Citavi 6

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase-chain-reaction* (PCR) stellt heutzutage eine Standardmethode in der Molekularbiologie dar, um eine DNA-Matrize (Template) *in vitro* zu vervielfältigen.

Dafür werden eine DNA-Polymerase, DNA-/ cDNA-Matrize, zwei Primer und ausreichend Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt, um in drei Schritten, exakte DNA-Kopien herzustellen. Erster Schritt ist hierbei eine Denaturierungsphase, darauf folgen eine Annealingphase und schließlich eine Elongationsphase, die den letzten Schritt der PCR darstellt. Alle drei Phasen folgen bestimmten Temperaturen und Zeiten, die beliebig oft wiederholt werden können, um so zu einer exponentiellen Vermehrung des Templates zu gelangen.

Die PCR wurde genutzt um die Gensequenzen für die Fusionsproteine GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS zu vervielfältigen. Als Template wurden bereits klonierte Plasmide aus der AG Tikkanen verwendet, welche die gesamte zytoplasmatische Domäne des Desmogleins enthielten (GST-Dsg-1/2/3-CPD, siehe Tabelle 7 und Abb. 7).

Die DNA wurde dazu in je einem Ansatz mit insgesamt 100 µl als Matrize verwendet. Eingesetzt wurden: 73 µl DEPC-Wasser, 20 µl 5x Q5 *reaction buffer* MgCl₂, 2 µl dNTPs (10 mM), je 1 µl der Primer 1 und 2, 2 µl des Templates und 1 µl der Polymerase Q5 (NEB). Nachdem die Template-DNA einmalig bei 94°C für 2 min denaturiert wurde, folgte ein weiterer Denaturierungsschritt bei 98°C für 20 s, ein Annealingschritt bei 69°C für 30 s und schließlich die Synthese bei 72°C für 1 min. Nachdem der Zyklus 35-mal wiederholt war erfolgte eine finale Elongation für 10 min, bei 72°C, um die vollständige Verlängerung der DNA-Produkte zu gewährleisten.

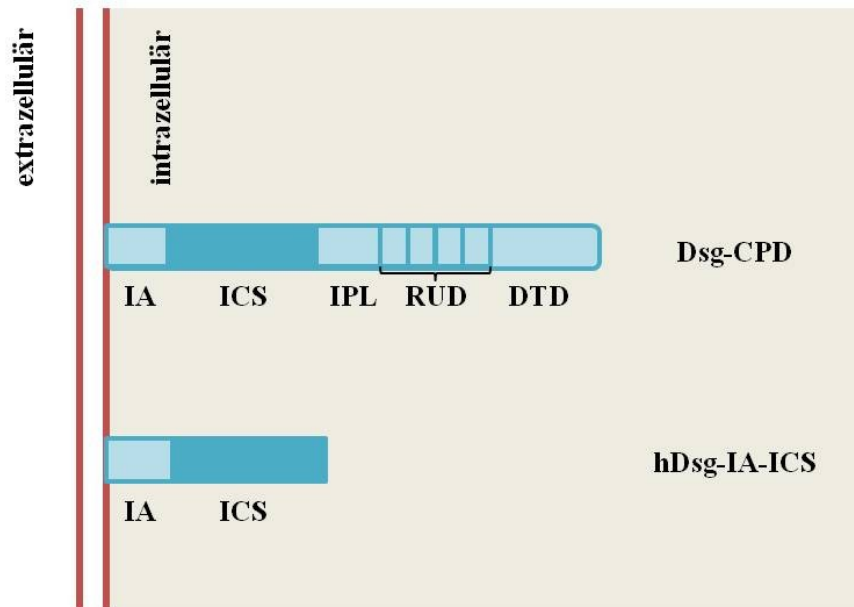


Abbildung 7: Die intrazellulären Domänen der Desmogleine

Dargestellt ist die komplette intrazelluläre Domäne der Desmogleine (Dsg-CPD) und die verkürzte zytoplasmatische Domäne (Dsg-IA-ICS), die für Interaktionsanalysen kloniert wurde (siehe Abschnitt 4.2.1). IA: intrazellulärer Anker; ICS: intrazelluläre *cadherin-like-sequence*; IPL: intrazellulärer *prolin-linker*; RUD: *repeat-unit-domains*; DTD: Desmoglein-*terminal-domain*

3.1.2 Aufreinigung, Gelelektrophorese und -extraktion

Nach der PCR wurden die gewonnenen Produkte laut Herstellerangaben mittels Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Je 5 µl des Ansatzes wurden mit Ladepuffer und Ethidiumbromid versetzt und anschließend mittels Gelelektrophorese in 1%-igem Agarosegel aufgetrennt.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten im elektrischen Feld voneinander getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE 0,5x verwendet. Das kanzerogene Ethidiumbromid, welches in Nukleinsäuren interkaliert, dient der Visualisierung einzelner Banden durch UV-Licht. Mithilfe eines aufgetragenen Größenstandards konnte man die gewünschten Konstrukte unter ultravioletter Beleuchtung identifizieren. Um die aufgetragene Probe aus dem Gel zu extrahieren wurde das Gel-Extraktions Kit der Firma Macherey-Nagel, laut Herstellerangaben verwendet.

3.1.3 Restriktionsverdau zu GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS

Je 30 µl der zuvor gewonnenen Ansätze wurden nun mit je 20 µl dest. Wasser, 6 µl *Cutsmart-buffer*, und jeweils 2 µl der passenden Restriktionsenzyme versetzt. Der Restriktionsverdau wurde für Desmoglein-1 mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI, für Desmoglein-2 mit BamHI und SalI und für Desmoglein-3 mit EcoRI und SalI durchgeführt. Es wurde mit Enzymen der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M., DE) gearbeitet. Der Verdau fand über Nacht, bei 37°C statt.

3.1.4 Ligation

Die aufgereinigten Produkte wurden in folgendem Ansatz ligiert: je 4 µl des bereits geschnittenen PCR-Produktes, 4 µl geschnittener, dephosphorylierter Vektor (pGEX-4T1), 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl Ligase. Die Ligation fand für 12 h bei 16°C statt.

3.1.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Plasmidamplifikation wurden die neu gewonnenen Vektoren in kompetente *E. coli*-Stämme (XL1-Blue) transformiert. Zu Beginn der Transformation wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl gekühlten *E. coli* für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sek. bei 45° C. Daraufhin wurde der Ansatz direkt in Eis für 2 Min. heruntergekühlt. Danach folgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium, ohne Antibiotikazusatz und die Überführung in ein Reaktionsgefäß. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen bei 37°C für 45 Min. im Bakterienschüttler mit 220 rpm bewegt. Nach der erfolgten Inkubation wurden die transformierten Zellen auf selektive LB-Agarplatten, die entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert und o/n bei 37 °C inkubiert. Zur späteren Proteinexpression wurden die Plasmide, wie oben beschrieben, in den *E. coli*-Stamm Rosetta transformiert.

3.1.6 Plasmidpräparation (Mini)

Zum Herstellen von Kulturmedien wurde je 5 ml LB-Medium (= Minikultur), mit entsprechendem Antibiotikazusatz, durch eine von den Platten gepickte Einzelkolonie, angeimpft. Anschließend erfolgte die Inkubation im Bakterienschüttler bei 220 rpm, über Nacht, bei 37°C.

Am nächsten Tag erfolgte eine Minipräparation der Plasmid-DNA. Hierfür wurden zunächst je 2 ml der Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 rpm. Die Überstände wurden verworfen und auf die Pellets wurde erneut 2 ml Bakteriensuspension gegeben. Daraufhin erfolgte eine wiederholte Zentrifugation unter oben aufgeführten Bedingungen.

Die so entstandenen Pellets wurden nun mittels *Plasmid DNA purification* Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben, aufgereinigt. Die DNA-Konzentration in den einzelnen Eluaten wurde mittels photometrischer Messung festgestellt.

3.1.7 Plasmidpräparation (Midi)

Nachdem durch eine Sequenzierung das gewünschte Insert in richtiger Richtung und ohne Mutationen der Gensequenz nachgewiesen werden konnte, wurde eine Plasmidpräparation mit größerem Ausgangsvolumina durchgeführt (= Midi).

Hierfür wurden 100-125 ml LB-Medium, unter Zusatz eines selektiven Antibiotikums, im Erlenmeyerkolben mit einer zuvor angesetzten Minikultur (siehe Minipräp) angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht, bei 37°C mit 220 rpm im Bakterenschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Isolierung des Plasmids mittels *Purification*-Kit von Macherey-Nagel. Die Anwendung erfolgte laut Herstellerangaben.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Proteinexpression von GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS/ -CPD

Um einen indirekten Pulldown durchzuführen und eine Proteininteraktion im Western Blot nachweisen zu können, mussten die Proteine GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS / -CPD exprimiert werden. Dazu wurden je 5 ml LB-Medium mit einzelnen Kolonien zuvor transformierter E-coli-Stämme (Rosetta) angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 220 rpm im Bakterieneschüttler inkubiert.

Mit 2 ml der Minikulturen wurden nun je 200 ml frisches LB-Medium angeimpft und erneut im Bakterieneschüttler bei 37°C mit 220 rpm inkubiert. Um die optimale Induktionsdichte des Mediums zu erkennen, wurde nach 1, 1,5 und 2 h die OD600 bestimmt. Optimale Induktionsbedingungen ergaben sich bei einer OD600 von 0,4-0,6. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Lösungen mit IPTG (0,15 mM) induziert und über Nacht bei Raumtemperatur mit 220 rpm im Bakterieneschüttler bewegt. Um die Induktionseffizienz zu messen, wurden jeweils vor und nach Induktion 1 ml der Lösung entnommen, die Bakterien pelletiert und lysiert, und mittels SDS-Page aufgetrennt, um die gewünschten Proteine in der Coomassie-Färbung darzustellen.

3.2.2 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die zuvor durchgeführte Proteinexpression erbrachte ein Fusionsprotein mit eingebautem Glutathion-S-Transferase-Tag, das befähigt ist an glutathionassoziierte Strukturen zu binden. Um diese Fähigkeit zu nutzen, wurden Glutathion-Sepharose-Beads der Firma GE Healthcare zur Aufreinigung verwendet. Diese Beads sind kovalent mit Glutathion verbunden und können so eine Bindung mit den Fusionsproteinen eingehen. Die gebundenen Proteine konnten durch Zentrifugation von anderen Zelllyseprodukten getrennt werden.

Dafür wurde die induzierte Bakteriensuspension abzentrifugiert. Zu den gewonnenen Pellets wurde der mit DTT, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A (1:1000) und PMSF (1:100) vorbereitete GST-Elutionspuffer gegeben. Danach wurde das Zellpellet auf Eis 2x mittels einminütiger Ultraschall-Behandlung in Lösung gebracht.

Um eine vollständige Zelllyse durchzuführen, wurde Lysozym (1:150) eingesetzt. Nachdem die Reaktionsgefäße für 15 min bei Raumtemperatur rotierten, wurde die Suspension erneut mit Ultraschall behandelt. Nach einer Ruhephase auf Eis für weitere 15 min wurde das Gemisch für 30 min mit 16000 rpm bei 4°C zentrifugiert.

Die zur Auftrennung verwendeten Glutathion-Sepharose-Beads wurden in doppelt destilliertem Wasser und kaltem PBS gewaschen, abzentrifugiert, im mit Proteinase Inhibitor Cocktail (PI) angereichertem GST-Waschpuffer gelöst und zu den Lysaten gegeben. Die Fusionsproteine konnten nun bei 4°C über Nacht auf einem Rotationsrad an die Beads binden.

Die rotierte Suspension wurde am darauffolgenden Tag zentrifugiert und zunächst 3x mit kaltem PBS + 0,1% TritonX-100, anschließend 3x mit kaltem PBS gewaschen und in PBS + 10% Glycerol aliquotiert und bei -20°C verstaut. Um eine Quantifizierung der an die GST-Beads gebundenen Fusionsproteine durchzuführen, wurden Proben der Suspension mit SDS Ladepuffer versehen und in der SDS-PAGE gemeinsam mit bekannten Mengen an BSA aufgetragen.

3.2.3 Indirekter GST-Pulldown

3.2.3.1 Vorbereitung des HeLa-Lysats

Um die Proteininteraktionen zwischen Desmogleinen und dem zellulären Flotillin 1 bzw. 2 analysieren zu können, wurde ein Pulldown-Assay mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Beim Pulldown werden die mit einem Tag versehenen Fusionsproteine GST-hDsg-1/2/3-IA-ICS/ -CPD an eine Matrix (GST-Beads) gebunden und somit immobilisiert. Nach der Zugabe möglicher Interaktionspartner (Zelllysate), verbleiben diese an dem immobilisierten Protein und können anschließend gemeinsam detektiert werden. Der Interaktionspartner Flotillin wurde dafür aus HeLa Zellen extrahiert.

Flotillin enthaltende HeLa-Zellen wurden auf Eis für 30 min in Stürmerlysepuffer, der mit PI und N-Octylglucosid versetzt wurde, inkubiert. Die hergestellten HeLa-Lysate wurden zunächst bei 15000 rpm, für 12 min bei 4°C zentrifugiert.

3.2.3.2 GST-Pulldown

Die HeLa-Lysate wurden mit 5 µg der Fusionsproteine und 100 µl 10% BSA versetzt. Inkubiert wurde rotierend über Nacht bei 4°C.

Zum Waschen der inkubierten Beads wurde je 1 ml CO-IP-Puffer auf die pelletierten Beads gegeben, danach gründlich vermischt und bei 12000 rpm für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels *Hamilton*-Glasspritze (1000 µl) abgezogen, wobei darauf zu achten war möglichst keine Beads mit abzuziehen. Nach fünfmaligem Waschen wurde die gereinigte Suspension mit Ladepuffer versetzt, bei 94°C für 5 min aufgeköcht und zur SDS-PAGE aufs Gel geladen.

3.2.4 SDS-PAGE

Die „sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis“ (SDS-PAGE) ist ein Standardinstrument der Biochemie, bei dem man sich die negative Ladung der Proteinmoleküle nach Natriumdodecylsulfat-Zugabe (SDS), zu Nutze macht, um diese im elektrischen Feld durch ein permeables Gel laufen zu lassen und sie letztendlich nach ihrer Größe aufzutrennen.

Die Gele basieren auf Polyacrylamid und wurden wie folgt hergestellt:

Sammelgel (4 %):

4,2 mM Tris (pH 6,8)
0,1 % SDS
4 % Acrylamid
0,1 % TEMED

Trenngel (10 %):

0,5 % APS
12,5 mM Tris (pH 8,0)
0,1 % SDS
10 % Acrylamid
0,1 % TEMED
0,5 % APS

Nachdem die vorbereiteten Proben mit 4x SDS-Puffer versetzt wurden, ließ man die Proteine bei 94°C für 4 min denaturieren. Die Proben wurden in das Sammelgel geladen und im 1x Lämmli-Laufpuffer für mindestens 1 h bei 15 mA aufgetrennt. Hatten die Banden das Trenngel erreicht wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht und ca. 1 cm vor Ende des Gels wurde der Vorgang gestoppt.

3.2.5 Western-Blot

Der Western-Blot wurde dazu genutzt, die zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen und diese sichtbar zu machen.

Dafür wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, das die im Gel fixierten Proteine dazu befähigt, aus diesem heraus auf die Membran zu wandern. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften die Proteine an der eingelegten Membran, und das Muster der vorherigen Auftrennung bleibt erhalten. Mit weiteren Reaktionen können nun Proteinbindungen auf der Membran nachgewiesen werden.

Als Puffer wurde einfacher Transferpuffer verwendet und die Blotkammer wurde mit 400 mA für 1 h betrieben. Die Gele wurden zusammen mit der Membran in dafür vorgesehen Schlitten eingelegt und jede Seite mit je einem Schaumstoffschwamm und Filterpapier bedeckt.

Ob die aufgetrennten Proteine auf der Membran hafteten, wurde mittels einer Ponceau-S-Färbung kontrolliert. Hierzu wurde die Membran kurz in Ponceau-Färbelösung inkubiert, anschließend fotografiert und mit destilliertem Wasser und TBST abgewaschen.

3.2.6 Detektion

Die Detektion der Proteinbindung wurde mittels Immunfärbung durchgeführt. Hierbei macht man sich die hochspezifische Interaktion zwischen Antigen und Antikörper zu Nutze. Dafür gibt man auf die geblockte Membran einen ersten Antikörper, der an das gewünschte Antigen bindet. Danach wäscht man ungebundene Antikörper weg und inkubiert den Blot mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten, zweiten Antikörper.

Dieser bindet an den ersten Antikörper und kann durch eine lumineszierende Reaktion sichtbar gemacht werden. Um zu gewährleisten, dass Antikörper ihre spezifischen Antigene detektieren, muss vor der Antikörperinkubation sichergestellt werden, dass freie Bindungsstellen „geblockt“ sind. Dazu wurde der Blot für 30 min in 5% Milchpulver inkubiert, das besonders viel Casein enthält und freie Bindungsstellen damit „blockiert“.

Die geblockte Membran wurde dann mit dem 1. Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten 3 Waschschrte mit 1x TBST für je 10 min und danach die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit 1x TBST wurde der Blot mit 2 ml ECL-Lösung und 2 µl 10%-iges H₂O₂ für 3 min inkubiert, um die lumineszierende Peroxidasereaktion zu initiieren. Anschließend wurde abgetrocknet und in einer Röntgenkassette fixiert. Abhängig von der Signalstärke wurde ein Röntgenfilm 5 s bis 5 min belichtet.

3.2.7 Strippen

Um weitere Immundetektionen mit derselben Membran durchführen zu können, müssen die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wird eine Denaturierung der Antikörperbindungen mittels NaOH durchgeführt

Die Membran wurde dazu für 5 min in 0,1 M NaOH inkubiert und anschließend in dest. Wasser abgewaschen. Nach einem 5-minütigem Waschschrte mit 1x TBST wurde die Membran erneut mit 5% Milchpulverblocklösung inkubiert und konnte nun für weitere Immundetektionen verwendet werden.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultur von HeLa- und hTert-Zellen

In dieser Doktorarbeit wurden humane Cervix-Adenokarzinomzellen (HeLa) kultiviert, um die Flotilline zu überexprimieren, und immortalisierte humane Keratinozyten-Zellen (hTert), um die Kolokalisation und Expression von humanem Desmoglein-1/-2/-3 und Flotillin 1/2 *in vivo* aufzuzeigen.

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem hohen Glucoseanteil (4,5 g/l) bei 37°C, 8% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit und unter Zugabe von 10% Fetalem Kälber-Serum (FCS), 100 units/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung der hTert-Zellen erfolgte in einem speziellen Keratinozyten-Wachstumsmedium und unter den gleichen atmosphärischen Bedingungen. Um die Zelladhäsion und Ausbildung von Desmosomen zu fördern, wurde die Zelllinie in manchen Experimenten mit zusätzlichen 2 mM CaCl₂ kultiviert.

3.3.2 Passagieren der HeLa- und hTert-Zellen

Um Subkulturen der gewachsenen HeLa-Kultur herzustellen, wurde der adhärente Monolayer bei einer Konfluenz von ca. 80% gesplittet. Nachdem das vorhandene Medium abgesaugt wurde, erfolgte ein Waschgang mit PBS. Anschließend erfolgte ein Detachement mit Hilfe von 500 µl erwärmter Trypsinlösung, welche durch die zugesetzten Peptidasen einen Abbau der Extrazellulärmatrix bewirkte. Dies führte zur Ablösung der Zellen vom Zellgefäßboden. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml DMEM++ resuspendiert und die Suspension wurde entweder auf anderen Zellkulturflaschen ausgesät, um für weitere Experimente genutzt werden zu können oder je nach Wachstumsgeschwindigkeit, verdünnt und als Erhaltungskultur angelegt.

Das Passagieren der hTert-Zellen erfolgte leicht modifiziert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen 10 min mit PBS-EDTA inkubiert und anschließend unter Zugabe von Trypsin abgelöst. Das Trypsin wurde mit 2% FCS-PBS inaktiviert und im Anschluss wurden die Zellen bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml KGM resuspendiert und $1,65 \times 10^5$ Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.3.3 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

Plasmide, die zuvor im Labor von Frau Dr. Tikkanen hergestellt wurden und verschiedene Flotillin 2-Mutationen codierten, wurden mittels transienter Transfektion in HeLa-Zellen eingebracht. Dafür wurde je 1 µg der Flotillin 2-Plasmide mit 100 µl *OptiMEM* und 4 µl *MACSfectin* für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Als die kultivierten HeLa-Zellen eine ca. 60%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das alte Medium entfernt und durch frisches DMEM++ ersetzt. Anschließend wurde der jeweilige Plasmid-Ansatz auf die Wells gegeben. Diese wurden dann bei 37°C, über Nacht, im Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Ernte und Einfrieren der Zellen

Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen geerntet und anschließend als Pellet eingefroren. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen 1 Mal mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde das PBS im Well belassen und die Zellen mittels Gummischaber mobilisiert, in ein Falconröhrchen überführt und mit 1000 rpm, bei 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -80°C trocken eingefroren.

3.3.5 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden Antigene mittels Antikörper, an die ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, detektiert. Um das gemeinsame Vorkommen von Dsg-1/-2/-3 und Flotillin-1/-2 nachweisen zu können, wurden die hTert-Keratinocyten in einer Dichte von 7×10^4 auf 15 mm Ø Deckgläschen ausgesät. Nach einem Tag in KGM mit 0,05 mM CaCl_2 folgte eine Kultivierung für 5 Tage in KGM mit 2 mM CaCl_2 . Die Kontrollzellen verblieben in KGM mit 0,5 mM CaCl_2 .

Fixiert und permeabilisiert wurden die Zellen mit kaltem Methanol für 10 min bei -20°C. Darauf folgten: das Waschen mit PBS und 15-minütige Blockieren mit 1% BSA. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur mit dem in 1% BSA/PBS verdünnten, Primärantikörper. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern für 60 Min. inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen kurz mit

dest. Wasser abgespült und mit 50 mg/ml DABCO-versetztem Gelmount auf Objektträger fixiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde 1 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Expression und Koloalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in humanen Keratinozyten

4.1.1 Expression der Zelladhäsionsproteine der Desmoglein-Familie und der lipid raft-assoziierten Proteine Flotillin-1 und-2 in humanen Keratinozyten

In dieser Arbeit sollte die Interaktionsstelle der Desmogleine und der Membran-assoziierten Flotilline genauer charakterisiert werden. Um nun die Expression der Flotilline und Desmogleine *in vivo* zu untersuchen, wurden immortalisierte humane Keratinozyten (hTert) verwendet. Die Epidermis ist aus Keratinozyten aufgebaut, die histologisch voneinander unterscheidbare Hautschichten ausbilden und durch diverse Zell-Zell-Kontakte verbunden sind. Besonders im *Stratum spinosum* lassen sich bereits mikroskopisch zahlreiche desmosomale Zellkontakte erkennen und verleihen dieser Hautschicht ihre stachelige Morphologie (Lüllmann-Rauch 2015). In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die vier Isoformen der Desmogleine je nach Hautschicht in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert werden. In apikal gelegeneren Schichten sind Desmoglein-1, -3 und -4 vorrangig vertreten, wohingegen in der basalen Schicht der Desmoglein-2-Anteil präsenter ist (Delva *et al.* 2009). Ebenfalls exprimiert werden beide Flotilline, die ubiquitär in Säugerzellen nachweisbar sind (siehe Abschnitt 1.5).

Für diesen Versuch wurden hTert-Zellen einmal in KGM mit der ursprünglichen CaCl_2 -Konzentration von 0,05 mM und einmal unter zusätzlicher CaCl_2 -Gabe bei einer Konzentration von 2 mM kultiviert. Nachdem die Monolayer eine geeignete Konfluenz erreicht hatten, konnten sie geerntet werden und zu Zelllysaten weiterverarbeitet werden. Eine Auftrennung mittels SDS-Page, Übertragung via Western Blot und anschließende Immunodetektion ermöglichte den Nachweis der gesuchten Proteine.

Es zeigte sich, dass sowohl die Desmogleine als auch die Flotilline in den unterschiedlich kultivierten Zelllinien nachweisbar sind. In den mit 2 mM CaCl_2 kultivierten Zellen wurden alle Desmoglein-Isoformen vermehrt exprimiert und ergaben eine stärkere Bande.

Das am schwächsten nachweisbare Desmoglein-2 kommt in der Epidermis eher selten und hauptsächlich in basalen Zellschichten der intakten Epidermis vor (Delva *et al.* 2009). Bei den Flotillinen zeigte sich keine Kalziumabhängige Expression und es bildeten sich gleichstarke Banden in den unterschiedlichen Zelllinien aus (Siehe Abb. 8).

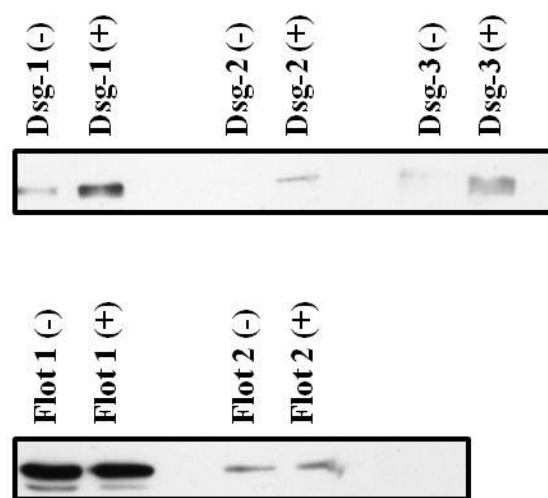


Abbildung 8: Detektion von Desmogleinen und Flotillinen im Keratinozytenlysat

Zu sehen sind die unterschiedlichen Desmogleinbanden bei etwa 150 kDa und die Flotillinbanden auf der Höhe von 48 kDa. Mit (-) ist das Zellysat, dass mit 0,05 mM CaCl_2 kultiviert wurde und mit (+) ist das Zellysat mit zusätzlichen 2 mM CaCl_2 gekennzeichnet.

4.1.2 Kolokalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in hTert-Zellen

Um die nachgewiesenen Proteine topographisch einzuordnen und eventuelle Kolokalisationen von Desmoglein-3 und Flotillin-2 aufzuzeigen, wurden hTert-Zellen auf Deckgläschen bis zu einer geeigneten Konfluenz kultiviert und anschließend fixiert. Desmoglein-3 und Flotillin-2 wurden fluoreszierend markiert, um gemeinsame Lokalisationen in der Zelle sichtbar zu machen. Für diesen Versuch wurde ebenfalls ein Ansatz in KGM mit einer CaCl_2 -Konzentration von 0,05 mM und ein weiterer mit einer gesteigerten CaCl_2 -Konzentration von 2 mM kultiviert. Das zusätzliche CaCl_2 sollte die Ausbildung von desmosomalen Zellkontakten fördern und Schlussfolgerungen darüber liefern, inwiefern sich die Proteinlokalisationen in unterschiedlichen Wachstumsbedingungen verhalten.

Es ergaben sich einige Unterschiede in den verschiedenen kultivierten Reihen. Zunächst erkennt man in den Kulturen mit 0,05 mM CaCl_2 -Konzentration eine verminderte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und einen daraus resultierenden „aufgelockerten“ Zellverbund, der wenig bis keine desmosomale Verbindungen zeigt. Betrachtet man die zu detektierenden Proteine, sind sowohl das Desmoglein, als auch das Flotillin, eher in perinukleären Vesikeln aufzufinden, wobei das Flotillin-2 etwas verstreuter im gesamten Zytoplasma vorkommt. (siehe Abb. 9A). Die vesikulären Strukturen stellen entweder den Golgi-Apparat oder frühe und späte Endosomen dar, die Flotillin und Desmoglein aufgenommen haben.

Die mit 2 mM CaCl_2 kultivierten Zellen erscheinen stabiler und stärker miteinander verbunden. Es zeigt sich eine Anreicherung der Zellmembran mit Desmoglein-3 und eine deutliche Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Desmoglein-3 ist kaum noch in vesikulären Strukturen aufzufinden. Dagegen ist Flotillin-2 immer noch hauptsächlich in Vesikeln lokalisiert, die nun nicht mehr nur perinukleär, sondern eher in Richtung Zellperipherie gerichtet vorkommen. Aber auch eine Verlagerung von Flotillin-2 an die Zellmembran ist vorzufinden. Beide Proteine zeigen eine intensivere Anfärbbarkeit in dieser Kultur (siehe Abb. 9B).

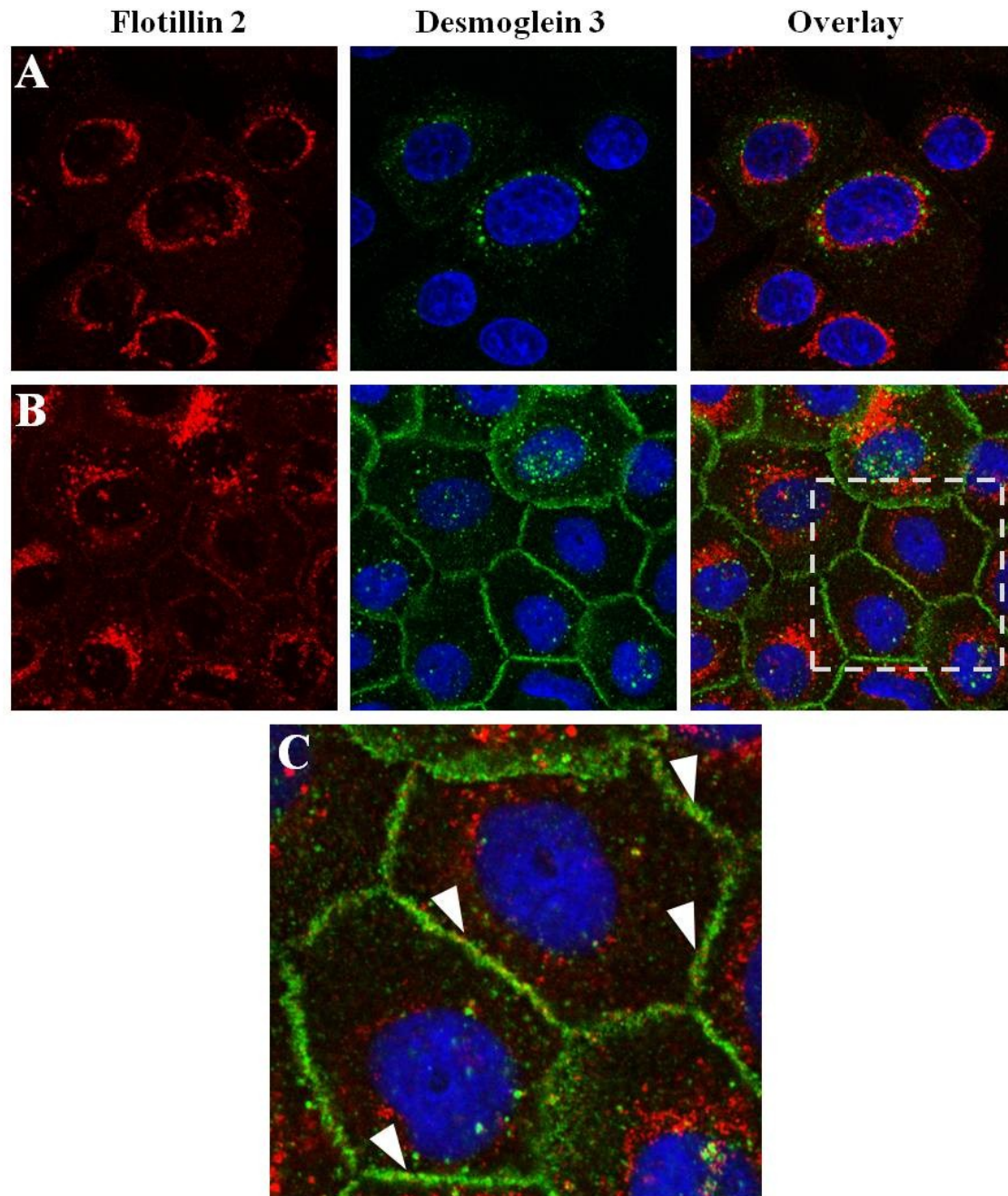


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in hTert-Zellen

HTert-Keratinocyten wurden für insgesamt 8 Tage auf Deckgläschen kultiviert, anschließend fixiert und mit Antikörpern fluoreszierend markiert. **A** In der Zellreihe ohne zusätzliche CaCl₂-Behandlung sind Flotillin-2 (rot) und Desmoglein-3 (grün) in vesikulären Strukturen rund um den Zellkern aufzufinden. **B** Die mit 2mM CaCl₂ kultivierte Zellreihe zeigt eine Anreicherung von Desmoglein-3 an der Zellmembran. Eine kleine Fraktion des Flotillins lässt sich hier ebenfalls detektieren, wobei der Hauptanteil weiterhin in Vesikeln organisiert ist. **C** Eine partielle Kolokalisation (Pfeilspitzen) von Desmoglein 3 und Flotillin lässt sich an den Zellverbindungen aufzeigen. DAPI-Färbung (blau) markiert den Zellkern bzw. die DNA.

Bis jetzt wurde eine Kolokalisation von Desmoglein-3 und Flotillin-2 in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Auch hier zeigte sich der Hauptanteil des Flotillins in endosomalen Vesikeln, wobei die an der Zellmembran aufzufindende Fraktion mit Desmoglein-3 kolokalisierte (Völlner *et al.* 2016). In den hTert-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei eine geringere Dichte an Kolokalisationen nachweisbar war.

4.2 Proteininteraktionen zwischen den Flotillinen-1/-2 und den Verkürzten zytoplasmatischen Domänen der Desmogleine-1/-3

4.2.1 Klonierung von pGEX-GST-hDsg-1/-2/-3-IA-ICS

Kolokalisationen unter zwei Proteinen sind hilfreich, um vermutete Bindungen darzustellen, können jedoch keine Aussage zur Interaktion zwischen den detektierten Proteinen machen. Die *raft*-assoziierten Flotilline sind fähig, an die desmosomalen Cadherine zu binden und scheinen eine regulierende Rolle in der Zelladhäsion zu spielen (Völlner *et al.* 2016). Die genaue Interaktionsfläche zwischen Desmogleinen und Flotillinen ist jedoch noch nicht bekannt. Um einzugrenzen, welcher Abschnitt des zytoplasmatischen Desmogleins mit Flotillinen interagiert, wurden demnach Interaktionsanalysen mit verkürzten Domänen der Desmogleine und Flotillinen *in vitro* durchgeführt.

Hierzu wurde aus bereits vorhandenen Vektoren (pGEX-GST-hDsg-1/-2/-3-CPD) die verkürzten intrazellulären Sequenzen für GST-hDsg-1/-2/-3-IA-ICS, bestehend aus IA-ICS-Sequenz (IA-ICS), kloniert (siehe Abb. 10). Um die gewonnenen Gensequenzen, in der anschließenden Ligation in den Vektor pGEX4T-1 einzubringen, wurden der Vektor und die Sequenzen durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI und SalI vorbereitet (siehe Abschnitt 3.1.3 und Abb. 10). Nach erfolgter Ligation wurden die Plasmide zur Amplifikation in *E. coli*-Stämme der Gattung XL-1 Blue transformiert. Anschließend wurde eine DNA-Präparation durchgeführt, so dass eine Sequenzierung der hergestellten Plasmide stattfinden konnte (siehe Abb. 10). Nach erfolgreicher Sequenzierung (siehe Abb. 11) konnte das klonierte Plasmid GST- hDsg-1/-2/-3-IA-ICS für die Proteinexpression der verkürzten Desmoglein-Domänen weiterverwendet werden.

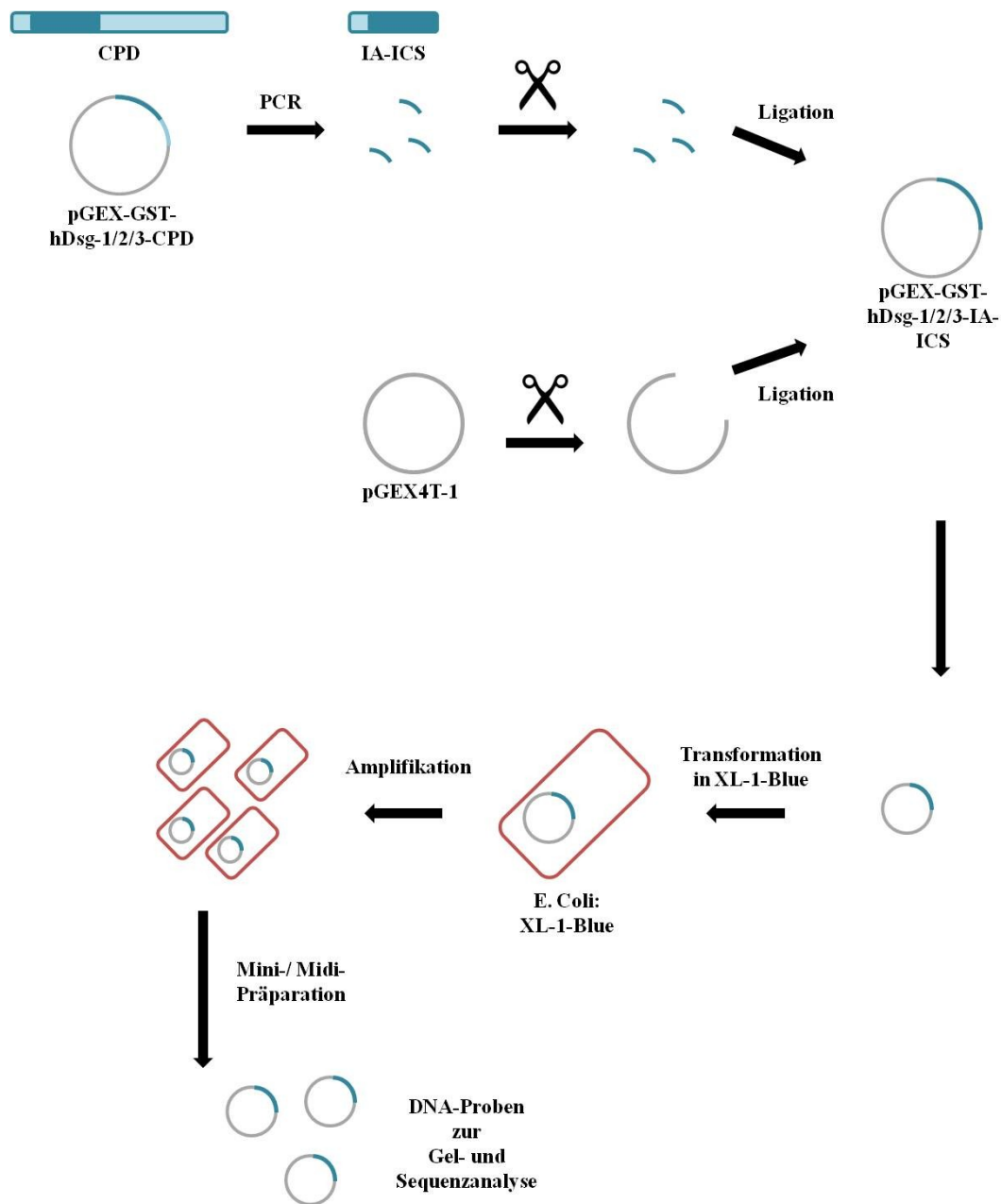


Abbildung 10: Klonierung von pGEX-GST-hDsg-1/-2/-3-IA-ICS

Im oberen Teil des Flussdiagramms sieht man die Bearbeitung der kompletten zyttoplasmatischen Domäne der Desmogleine (CPD) zu der verkürzten Domäne IA-ICS, mittels PCR und Restriktionsverdau (Schere). Als Produkt erhielt man pGEX-GST-hDsg-1/-2/-3-IA-ICS. Im unteren Abschnitt ist die Aufbereitung der DNA für Gel- und Sequenzanalyse aufgezeigt (siehe Abb. 11).

Dsg-1

CDCGGAPRSAAGFEPVPECSDGAIHSWAVEGPQPEPRDITTVIPQIPP
DNANIIECIDNSGVYTNEYGGREMQDLGGGERMTGFELTEGVKTSMP
EICQEYSGTLRRNSMRECREGGLNMNFME SYFCQKAYAYADEDEGRPS
NDCLLIYDIEGVGSPAGSVGCCSFIGEDLDDSFLLDTLGPKFKKLADIS
LGKESYPDLDPSPWPPQSTEPVCLPQETEPVVS GHPPISP HFGTTTVIS
ESTYPSGPGVLHPKPI LDPLGYGNVTVTESYTTS DTLKPSVHVHDNRP
ASNVV VTERVVGPISGADLHGMLEMPDLRDGSNVIVTERVIAPSSSLP
TSLTIHHPRESSNVV VTERVIQPTSGMIGSLSMHPELANAHNVIVTER
VVSGAGVTGISGTTGISGGIGSSGLVGTSMGAGSGALSGAGISGGGIG
LSSLGGTASIGHMRSSSDH HFNQTIGSASPSTARSRITKYSTVQYSK-

Dsg-2

MCHCGKGAKGFTP IPGTIEMLHPWNNEGAPPEDKVVP SFLPVDQGGSL
VGRNGVGGMAKEATMKGSSASIVKGQHEMSEMDGRWEEHRSLLSGRA
TQFTGATGAIMTTETT KTARATGASRDMAGAQA AVALNEE FLRNYFT
DKAASYTEEDENHTAKDCLLVYSQEETESLNASIGCCSFIGELDDRF
LDDLGLKFKTLAEVCLG QKIDINKEIEQRQK PATETSMNTASHSLCEQ
TMVNSENTYSSGSSFPVPKSLQEANAEKVTQEIVTERSVSSRQAQKVA
TPLPDPMASRNVIATETS YVTGSTMPPTTVI LGPSQPQSLIVTERVYA
PASTLVDQPYANEGTVV VTERVIQPHGGG SNPLEGTQHLQDVPYVMVR
ERESFLAPSSGVQPTLAMPNIAVGQNVTVTERVLAPASTLQSSYQIPT
ENSMTARNTTVSGAGVPGPLPDFGLEESGHSNSTITTSSTRVTKHSTV
QHSYS-

Dsg-3

LTCDCGAGSTGGVTGGFI PVPDGSEGTIHQWGIEGAHPEDKEITNICV
PPVTANGADFMESSEVCTNTYARGTAVEGTSGMEMTTKLGAATESGGA
AGFATGTVSGAASGFGAATGVGICSSGQSGTMRTRHSTGGTNKDYADG
AISMNFLDSYFSQKAFACAEEDDGQEANDCLLIYDNEGADATGSPVGS
VGCCSFIADDLDDSFLLDSLGP KFKKLAEISLGVDGEGKEVQPPSKDSG
YGIESC GHPIEVQQTGFVKCQTLSGSQGASALSTSGSVQPAVSI PDPL
QHGNYLVTETYSASGSLVQPSTAGFDPLLTONVIVTERVICPISSVPG
NLAGPTQLRGSHTMLCTEDPCSR LI-

Abbildung 11: Sequenzierungsanalyse der auf IA-ICS verkürzten Desmogleinsequenzen

Zu sehen sind die korrekt klonierten, im Vektor enthaltenen Proteinsequenzen der verkürzten Desmogleindomänen. **In blau:** die Aminosäuresequenz des intrazellulären Ankers (IA). **In grün:** Die auf den Anker folgende Aminosäuresequenz der intrazellulären *cadherin-like-sequence* (ICS).

4.2.2 Proteinexpression von GST-hDsg-1/-3-IA-ICS und -CPD

Um die Interaktion zwischen Flotillin-1/-2 und den Fusionsproteinen GST-hDsg-1/-3-IA-ICS und -CPD im indirekten *Pulldown* untersuchen zu können, mussten die Proteine nach der Klonierung exprimiert werden.

Nach erfolgreicher Sequenzierung der neu hergestellten Expressionsplasmide für die verkürzte, zytoplasmatische Domäne der Desmogleine, wurden die Plasmide in *E. coli*-Stämme der Gattung Rosetta transformiert. Bereits vorhandene Plasmide, welche die komplette zytoplasmatische Sequenz der Desmogleine enthielten, wurden ebenfalls in Rosetta transformiert. Selektives LB-Medium (+ 250 µg/ml Ampicillin) wurde mit den gewachsenen Klonen angeimpft. Nach Erreichen einer geeigneten Wachstumsdichte, bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 wurde die Suspension mit 0,15 mM IPTG induziert. Vor und nach der Induktion wurden Proben der Bakteriensuspension entnommen. Nach einer Auftrennung durch *SDS-PAGE* konnten die exprimierten Proteine in einer Coomassie-Gel-Färbung sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 12). Anschließend konnten die Zellen durch eine Zellyse in Lösung gebracht und die Fusionsproteine aufgereinigt werden. Das Fusionsprotein mit der verkürzten Domäne für Desmoglein-2 wurde aufgrund der untergeordneten Rolle in Keratinozyten nicht für die Interaktionsanalysen verwendet.

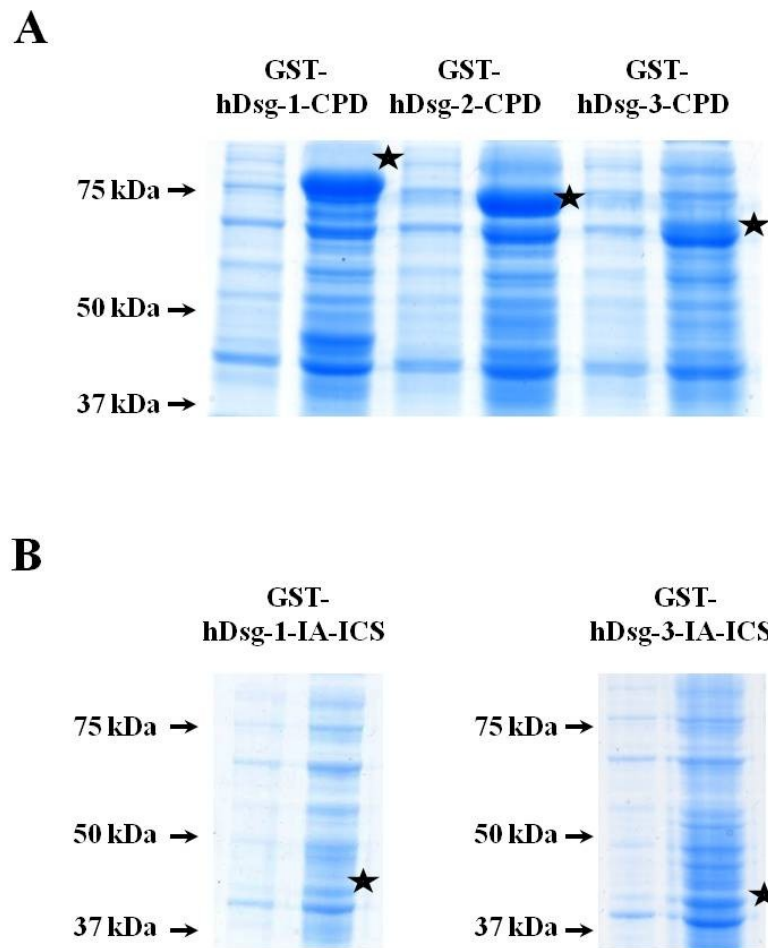


Abbildung 12: Coomassiefärbung der Proteinexpression der verschiedenen Desmoglein-Fusionsproteine

Induktionskontrolle anhand von Coomassie-Gelen **A** Die Fusionsproteine mit kompletter intrazellulärer Domäne (-CPD) wurden mit je einer Probe vor und einer nach Induktion der Bakteriensuspension geladen. Sie besitzen eine Größe zwischen 60 und 80 kDa. **B** Die Fusionsproteine mit den verkürzten intrazellulären Abschnitten (-IA-ICS) sind ca. 40 kDa groß. Auch hier wurden je eine Probe vor und eine nach Induktion geladen. **Sterne:** Gut zu erkennen sind die deutlich stärkeren Banden nach Induktion.

4.2.3 Proteininteraktionsnachweis zwischen GST-hDsg-1/-3-IA-ICS/-CPD und Flotillinen

Die Interaktionsanalyse wurde auf die Fusionsproteine GST-Dsg-1/-3-IA-ICS beschränkt, da Desmoglein-2 eher in basalen Zellschichten der intakten Epidermis nachweisbar ist und eine eher untergeordnete Rolle spielt (siehe Abschnitt 4.1.1).

Die zuvor exprimierten und aufgereinigten Proteine wurden mit Keratinozytenlysaten, die Flotillin-1 und -2 enthielten, inkubiert und gewaschen. Nach Auftrennung der immobilisierten Proteine in der *SDS-PAGE* und anschließender Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran via *Western Blot*, wurden die Membranen in *Ponceau S* angefärbt. Die Anfärbung dient der Transferüberprüfung und lässt gleichzeitig eine Abschätzung über geladene Proteinmengen zu. Die Proben wurden mit einer Menge von je 5 µg Protein-Beads geladen und brachten dementsprechend gleich starke Banden hervor. Nachdem die Blotmembranen in 5% Magermilch geblockt wurden, konnten sie über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert werden. Nach 1-stündiger Inkubation mit dem 2. Antikörper wurden die Membranen entwickelt.

Es zeigte sich eine Interaktion zwischen den kompletten zytoplasmatischen (-CPD) und den verkürzten Domänen (-IA-ICS) bei Desmoglein-1/-3 und beiden Flotillinen (siehe Abb. 13). Die CPD- Sequenz der Desmogleine-1/-3 und auch die IA-ICS-Sequenz des Desmoglein-1 zeigen eine schwache Bande beim Nachweis mit Flotillin-1, wohingegen die IA-ICS-Sequenz des Desmoglein-3 eine stärkere Bande ausbildet (siehe Abb. 13 A und B).

Bei Inkubation mit dem Flotillin-2-Antikörper lassen sich unterschiedlich starke Banden nachweisen. Die komplette und die kurze Domäne des Desmoglein-1 bringen etwas schwächere Banden als die beiden Domänen des Desmoglein-3 hervor (siehe Abb. 13 C).

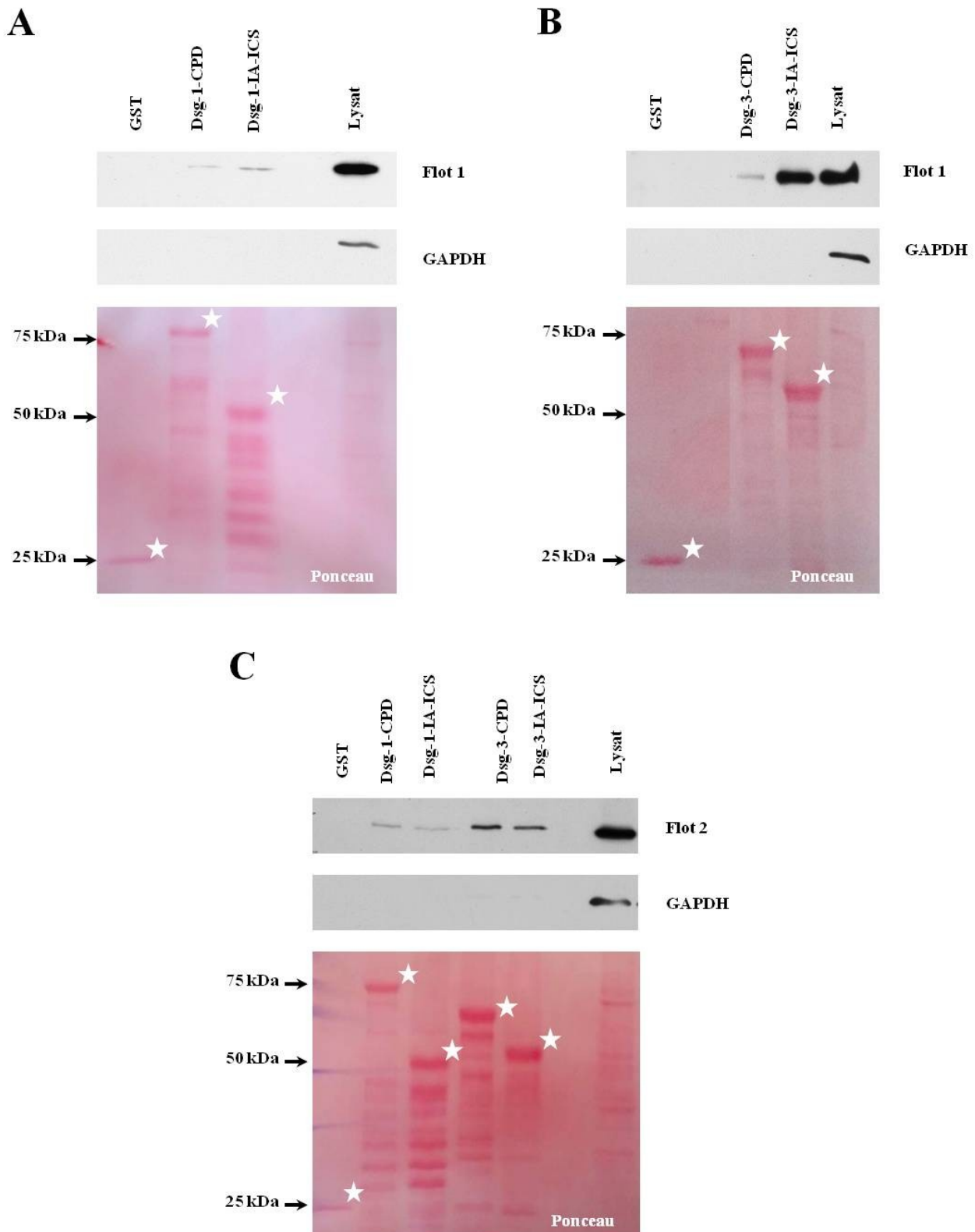


Abbildung 13: Proteininteraktionen zwischen Desmoglein-1/-3-IA-ICS/-CPD und Flotillin 1/-2

GST-Pulldown mit hergestellten *GST-Beads* und Keratinozytenlysaten. Für die *Pulldowns* wurden je 5 µg aufgereinigte und an Beads gekoppelte Fusionsproteine mit 1 mg Zelllysate verwendet. Es wurde jeweils 5 µg GST zur Negativkontrolle aufgetragen. **A** Die komplette und die verkürzte intrazelluläre Domäne des Desmoglein-1 interagieren mit Flotillin-1. **B** Beide Isoformen der zytosomatischen Domäne des Desmoglein-3 binden an Flotillin-1. **C** Flotillin-2 interagiert mit beiden Isoformen der Desmogleine-1 und -3. **Ponceau/Sterne:** Ladekontrollen der einzelnen Proben in der Ponceau-Färbung. Die verwendeten Fusionsproteine sind mit Sternen markiert.

4.3 Interaktionsverhalten verschiedener Flotillin-2 Mutanten und der kompletten zytoplasmatischen Domäne (CPD) des Desmoglein-3

In früheren Arbeiten aus der AG Tikkanen wurden verschiedene Flotillin-2 Mutanten kloniert, die funktionelle Unterschiede des Proteins hervorbrachten (Neumann-Giesen 2005). Je nach Mutation, wird Flotillin-2 seine Löslichkeit in der Zelle und möglicherweise sein Interaktionsverhalten zu Desmoglein-3 verändern. Inwiefern Fettsäuremodifikationen, Membranassoziation und die enthaltenen Tyrosine im Flotillin-2 Einfluss auf die Interaktion zu Desmoglein-3 nehmen, können so in *Pulldown*-Analysen untersucht werden.

Folgende Flotillin-2-Mutanten wurden dazu verwendet:

Bezeichnung des Mutanten	Mutation	Eigenschaften der Mutante
R1-WT-pEGFP	Keine	Wildtyp Flotillin-2
R1-Y163F-pEGFP	Austausch Tyrosin gegen Phenylalanin an Stelle 163 in der AS-Sequenz	Am Tyrosin 163 wird Flotillin-2, auf EGF-Stimulation hin, phosphoryliert und endozytiert. Fällt das Tyrosin von vornherein weg, bleibt es fix an der Plasmamembran lokalisiert.
R1-6x YF-pEGFP	Austausch von 6 Tyrosinen (aus insgesamt 8) gegen Phenylalanin, außer an den Stellen: 27 und 163	Wegfall 6 phosphorylierbarer Tyrosine in der Flotillinssequenz. Tyrosin-163 bleibt erhalten und kann weiterhin phosphoryliert werden. Außerdem bleibt Tyrosin-27 erhalten, da Flotillin sonst abgebaut würde. Es wird sich zeigen, ob die restlichen Tyrosine Einfluss auf die Interaktion nehmen

R1-G2A-pEGFP	Austausch Glycin gegen Alanin an Stelle 2 in der AS-Sequenz	Flotillin-2 wird an G2 der AS-Sequenz myristyliert. In Abhängigkeit davon wird Flotillin-2 palmityliert. Dies befähigt es mit den Mikrodomänen zu interagieren. Bleibt die Myristylierung aus, geht Flotillin-2 keine Interaktion zu Membranen ein.
--------------	---	---

Die bereits klonierten Plasmide mit den verschiedenen Flotillin-2 Mutanten wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Diese wurden für 5 Tage kultiviert, geerntet, pelletiert und anschließend mit 4 ml zuvor mit PI versetztem Sürmerlysepuffer lysiert. Die Lysate konnten nun für eine Interaktionsanalyse zwischen den Flotillin-2-Mutanten und dem Fusionsprotein GST-hDsg-3-CPD per *Pulldown* und anschließendem *Western Blot* verwendet werden.

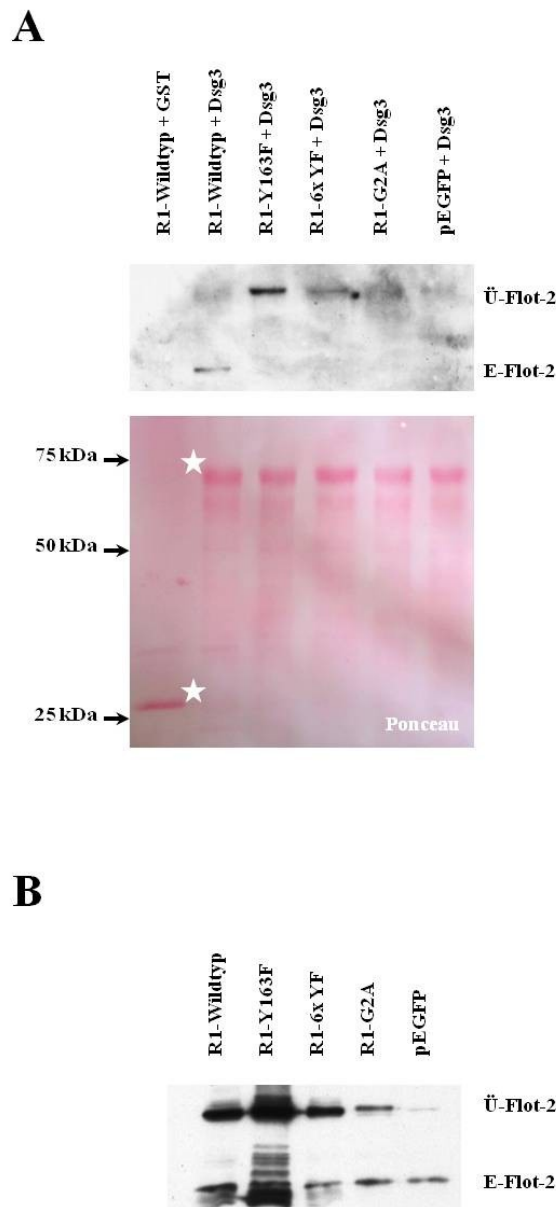


Abbildung 14: Proteininteraktion zwischen Flotillin-2-Mutanten und GST-hDsg-3-CPD

GST-*Pulldowns* mit GST-Dsg-3-CPD und den verschiedenen Flotillin-2 Mutanten (A) inklusive des *Western Blots* mit den verwendeten HeLa-Lysaten (B). Zur Negativkontrolle wurde im *Pulldown* jeweils 5 µg GST mit 900 µl Lysat aufgetragen. **A** Ergebnis der *Pulldowns* mit jeweils 900 µl Lysat und 5 µg der jeweiligen Beads aufgetragen. Zu sehen sind alle hergestellten Mutantenlysate, die Banden auf Höhe des überexprimierten Flotillin-2 (Ü-Flot-2) und endogenen Flotillin-2 (E-Flot-2) erscheinen lassen. **Sterne:** Zu sehen sind die Ladekontrollen der aufgetragenen Proben in der Ponceau-Färbung. **B** Detektion der Proteine in den verwendeten Lysaten. Alle Lysate wurden mit 15 µl Volumen geladen.

Die Ergebnisse zeigen, sowohl auf Höhe des überexprimierten Flotillin-2-EGFP (Ü-Flot-2) als auch auf Höhe des endogenen Flotillin-2 (E-Flot-2) Banden. Neben dem überexprimierten Flotillin-Mutanten exprimieren die HeLa-Zellen weiterhin endogenes Flotillin, das kleiner ist, als die Fusionsproteine und daher ein Interaktionsnachweis auf einer Höhe von ca. 48 kDa erscheint (E-Flot-2). Für unseren Versuch sind diese Banden zu vernachlässigen, da es sich hier um Bindungen mit natürlich vorkommenden Flotillin-2 handelt. Um das Interaktionsverhalten der Flotillin-2 Mutanten mit Desmoglein-3 isoliert betrachten zu können, müssten Interaktionsanalysen mit Flotillin-knock-out Zellen durchgeführt werden.

In Abbildung 14 A bildet die R1-Wildtyp-Dsg-3-Probe eine Bande auf Höhe von E-Flot-2, sowie eine schwache Bande auf der Höhe des überexprimierten Flotillin-2-EGFP, aus. Hier ist damit eine Interaktion vor allem zwischen endogenem Flotillin-2 und dem Desmoglein-Fusionsprotein GST-hDsg-3-CPD, das die komplette intrazelluläre Domäne des Desmoglein enthält, nachgewiesen worden.

Des weiteren ist in Abbildung 14 A zu erkennen, dass auf Höhe von Ü-Flot-2 eine deutliche Bande bei der R1-Y163F-Dsg-3- und eine schwache Bande bei der R1-6xYF-Dsg-3-Probe erscheint. Die R1-Y163F-Mutante enthält kein Tyrosin an Stelle 163. Diese Mutante bildet den deutlichsten Interaktionsnachweis aus und ist, wie in den Lysaten zu sehen, am stärksten überexprimiert worden (siehe Abb. 14 B). In der R1-6xYF-Mutante ist das Tyrosin-163 weiterhin vorhanden. Sollte Y-163 einen Einfluss auf die Interaktion nehmen, wäre hier ein anderes Ergebnis, als bei R1-Y163F-EGFP zu erwarten. Die R1-6xYF-Dsg-3-Probe bildet auf gleicher Höhe einen deutlich schwächeren Interaktionsnachweis aus (siehe Abb. 14 A). Dieser Unterschied kann jedoch nicht durch die schwächere Expression der 6xYF-Mutante erklärt werden, da das Verhältnis der Banden in den Lysaten deutlich geringer ist als in den *Pulldowns*.

Die in Abbildung 14 B aufgetragenen Lysate stellen eine Positivkontrolle für Flotillin-2 dar. Trotz gleichgeladener Mengen an Lysaten sind unterschiedlich starke Banden, bei Ü-Flot-2, und auch bei E-Flot-2 sichtbar, was für eine mutationsabhängige, variable Proteinexpression in der Zelle spricht.

5 Diskussion

5.1 Flotilline interagieren über die intrazelluläre *cadherin-like-sequence* mit Desmogleinen

Der Adhäsionsapparat des Desmosoms wurde vermehrt mit cholesterolreichen Plasmamembranabschnitten in Verbindung gebracht. Interaktionen zwischen den *lipid-raft* assoziierten Flotillinen und den desmosomalen Cadherinen, den Desmogleinen und Desmocollinen, konnten bereits nachgewiesen werden (Chartier *et al.* 2011; Resnik *et al.* 2011; Guillaume *et al.* 2013; Bodin *et al.* 2014; Stahley *et al.* 2014; Völlner *et al.* 2016). In dieser Arbeit soll die Interaktionsfläche zwischen Flotillinen und der intrazellulären Domäne der Desmogleine näher charakterisiert werden.

Eine Veränderung der intrazellulären Abschnitte in den Desmogleinen und anschließender Interaktionsanalyse mit Flotillin-1/-2, wird zu einer Eingrenzung der Interaktionsfläche führen. Dafür wurden Fusionsproteine, die auf die intrazellulären IA-ICS-Domänen der Desmogleine 1-3 verkürzt sind, kloniert und hergestellt. Desweiteren wurden Interaktionsanalysen zwischen Flotillin-1/-2 und der natürlich vorkommenden, kompletten intrazellulären Domäne der Desmogleine 1-3 durchgeführt. Die dafür verwendeten Fusionsproteine wurden aus bereits vorhandenen Konstrukten der AG exprimiert und hergestellt. Alle Fusionsproteine wurden anschließend via Western Blot und indirektem PD auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Flotillinen getestet.

Frühere Interaktionsanalysen der Arbeitsgruppe Tikkanen konnten zudem *in vivo*-Interaktionen zwischen den kompletten intrazellulären Desmoglein-Domänen der Desmogleine 1-3 und den Flotillinen-1/ -2, mittels Koimmunpräzipitation (CO-IP) nachweisen und durch die Verwendung aufgereinigter Fusionsproteine, direkte Interaktionen durch *Pulldown*-Analysen verifizieren (Völlner *et al.* 2016). Eine genauere Charakterisierung der Interaktionsstellen blieb dabei aus.

Diese Arbeit bestätigt zum einen die bekannten Ergebnisse von Völlner *et al.*, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass beide Flotilline Interaktionen mit der kompletten intrazellulären Domäne (CPD) der Desmogleine 1 und 3 eingehen (siehe Abb. 13). Zum anderen zeigen die neuen Ergebnisse dieser Arbeit, dass dabei die Interaktionsfläche der Desmogleine 1 und 3 eingegrenzt werden kann.

Durch Pulldown-Versuche konnte die Interaktion zwischen der intrazellulären IA-ICS-Domäne von Desmoglein-1 und -3 mit beiden Flotillinen gezeigt werden (siehe Abb. 13). Es scheint, als ob die Anwesenheit der weiteren Desmoglein-Sequenzen IPL, RUD und DTD zumindest für die Interaktion mit den Flotillinen nicht relevant sind, was die intrazelluläre IA-ICS-Domäne als wichtigen Interaktionsort hervorhebt.

Die ICS stellt sowohl in desmosomalen als auch in klassischen Cadherinen eine Interaktionsfläche für diverse Mediatorproteine dar (siehe Abschnitt 1.2.2). Proteine wie z.B. p120 Catenin oder β -Catenin interagieren über die, der ICS sehr ähnlichen, *Cadherin cytoplasmatic domain*, mit klassischen Cadherinen (Shapiro and Weis 2009). Im Desmosom vermittelt sie zwischen Mediatorproteinen wie den Plakophilinen, Plakoglobin/ γ -Catenin und desmosomalen Cadherinen (Mathur 1994; Angst 2001). Betrachtet man die Interaktionsanalysen zwischen Plakoglobin/ γ -Catenin, Desmoglein und Flotillin, ergibt sich ein weiterer Grund zur Annahme, dass die ICS von essentieller Bedeutung für die Interaktion zwischen Desmogleinen und Flotillinen ist.

Plakoglobin/ γ -Catenin ist ein Mediatorprotein, das in einer Vielzahl von Zelladhäsionskomplexen detektiert werden kann, und kommt sowohl in Desmosomen, als auch in *adhaerens junctions* vor. Es konnte nachgewiesen werden, dass Plakoglobin/ γ -Catenin sowohl mit der *Cadherin cytoplasmatic domain* klassischer Cadherine, als auch mit der ICS der Desmogleine interagiert (Mathur 1994). Außerdem wurde in früheren Versuchen eine direkte Bindung zwischen Plakoglobin/ γ -Catenin und den Flotillinen nachgewiesen (Kurrle *et al.* 2013). Die direkte Interaktion zwischen Plakoglobin/ γ -Catenin und Flotillin, und die Kenntnis über die direkte ICS-vermittelte Interaktion des Plakoglobin/ γ -Catenin zu Desmoglein lassen eine direkte Bindung von Flotillinen, ebenfalls über die ICS, vermuten.

Die IA-ICS-Domäne wurde bereits durch frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe als potenziell wichtige Interaktionsfläche vermutet. In Interaktionsanalysen zwischen Flotillinen und den Desmocollinformen (Dsc) -a und -b konnten Unterschiede im Interaktionsverhalten festgestellt werden (Völlner 2016). Die Flotilline waren im Stande an die längeren Dsc-a-Formen zu binden, gingen aber mit den kürzeren Dsc-b-Isoformen keine nachweisbare Interaktion ein (Völlner 2016). In den kürzeren b-Formen fehlt die ICS (siehe Abb. 3 und Abschnitt 1.2.2). Damit kann die ICS als

vermittelnder Bereich für eine Interaktion zwischen Flotillinen, Desmocollinen und Desmogleinen angenommen werden.

In dieser Arbeit wurde die ICS-Domäne nicht isoliert auf ihre Interaktionsfähigkeit getestet. Natürlich stellt die IA-Domäne, die der ICS vorgeschaltet ist, eine weitere potenzielle Interaktionsfläche für Flotilline dar. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass die ICS mit höherer Wahrscheinlichkeit die Interaktion vermittelt, da sie, wie oben aufgezeigt, eine hochaffine Interaktionsfläche für diverse andere Mediatorproteine bietet. Es wäre daher sinnvoll weitere Interaktionsanalysen zwischen den isolierten IA- und ICS-Domänen und den Flotillinen durchzuführen, um letztlich eine Interaktion zur IA-Region der Desmogleine ausschließen zu können.

Desweiteren könnten bei weiterführenden Versuchen punktmutierte Desmoglein-Mutanten hergestellt und in Interaktionsanalysen verwendet werden. Durch eine veränderte ICS-Struktur können diese dann zu einer finalen Charakterisierung der Interaktionsfläche zwischen Flotillinen und desmosomalen Cadherinen führen. Daraufhin könnten CO-IP-Analysen zwischen mutierten Desmogleinen, welche eine auf ICS verkürzte intrazelluläre Domäne enthalten, und Flotillinen einen Beweis der direkten Interaktion der Flotilline mit der ICS *in vivo* erbringen.

5.2 Tyrosin-163 nimmt Einfluss auf die Interaktion zu Desmoglein-3 und übernimmt eine regulatorische Rolle in der Desmosomendynamik

Die Flotilline enthalten Tyrosine, die von wichtiger Bedeutung für ihre Lokalisation und Funktion in der Zelle sind (siehe Abschnitt 1.5.2). In Flotillin-2 kommen insgesamt 8 Tyrosine vor. In früheren Ergebnissen zeigte sich, dass eine Phosphorylierung dieser Tyrosine, auf EGF-Stimulation hin, möglich ist (Neumann-Giesen 2005). Besonders das Tyrosin 163 (Y-163) im Flotillin-2 hat Einfluss auf das *raft*-assoziierte Protein. In Versuchen mit Flotillin-2-Mutanten, die dieses Tyrosin nicht mehr enthielten, konnte eine Änderung von Flotillin-2 beobachtet werden. Es war lediglich an der Plasmamembran, und nicht mehr in vesikulären Strukturen der Zelle nachzuweisen (Neumann-Giesen *et al.* 2007). Außerdem ist die Endozytose von Mikrodomänen und Flotillin-2, auf EGF Stimulation hin, von der Phosphorylierung an Y-163 und einer Oligomerisierung der Flotilline abhängig. Dadurch greift Flotillin in Prozesse der Signaltransduktion ein und übernimmt regulatorische Aufgaben im Zellstoffwechsel (Babuke and Tikkanen 2007; Babuke *et al.* 2009).

Es ist möglich, dass Tyrosine im Flotillin nicht nur dessen Lokalisation in der Zelle, sondern auch die Interaktion zu den Bindungspartnern verändern. Dies wiederum hätte einen Einfluss auf die Integrität einzelner Proteine in Proteinkomplexen, wie dem Desmosom. Um den Einfluss der verschiedenen Tyrosine im Flotillin-2 aufzuzeigen, wurden bereits vorhandene Mutanten ausgewählt und in HeLa-Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 4.3). Die Lysate wurden mit dem Fusionsprotein GST-hDsg-3-CPD inkubiert und anschließend auf ihr Interaktionsverhalten untersucht.

Die Mutation in der R1-Y163F-Mutante verändert die Eigenschaften des Flotillin-2 ganz entscheidend. So zeigten Neumann-Giesen *et al.*, dass durch den Austausch des funktional wichtigen Tyrosin-163 gegen Phenylalanin keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann, und die oben beschriebenen Effekte dadurch ausbleiben (Neumann-Giesen *et al.* 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen und erweitern diese Beobachtung. In den Versuchen konnten Interaktionen zwischen dem überexprimierten Flotillin-2-Mutanten und GST-hDsg-3-CPD nachgewiesen werden (siehe Abb. 14 A). Es zeigte sich ebenfalls eine Bande auf Höhe des endogen hergestellten Flotillin-2, das kleiner ist als die EGFP-getaggte Mutante und daher auf anderer Höhe erscheint (siehe Abb. 14 A).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Interaktion mit Desmoglein-3, obwohl die Flotillin-2-Mutante kein Tyrosin-163 mehr enthält bzw. an dieser Stelle, nicht mehr phosphoryliert werden kann.

R1-6xYF enthält nur die Tyrosine 163 und 27. Alle anderen Tyrosine wurden gegen Phenylalanin ausgetauscht, um den Einfluss des Tyrosin-163 auf die Interaktion zu Desmoglein-3 isoliert betrachten zu können. Tyrosin 27 ist notwendig, damit Flotillin stabil exprimiert wird. Wie Abbildung 14 A zeigt, konnte eine schwache Interaktion zwischen der überexprimierten R1-6xYF-Mutante und GST-hDsg-3-CPD nachgewiesen werden. Man könnte annehmen, dass eine geringere Expression der R1-6xYF- im Vergleich zur R1-Y163F-Mutante (siehe Abb. 14 B) diesen lediglich schwachen Interaktionsnachweis erbringt. Die Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Mutanten sind im Verhältnis zur nachgewiesenen Interaktion jedoch zu gering, um von einem Einfluss auf den Pulldownnachweis ausgehen zu können. Um die gezeigten Ergebnisse zu verifizieren ist es notwendig, weitere Interaktionsanalysen mit stabil exprimierenden Zellen, die keinen Unterschied in der Expression der verschiedenen Flotillin-2-Mutanten hervorbringen, zu untersuchen. Trotzdem lassen die hier erhobenen Ergebnisse vermuten, dass das weiterhin vorhandene und phosphorylierbare Tyrosin-163 eine Interaktion zu Desmoglein-3 zu verhindern scheint, weshalb die Hypothese aufgestellt werden kann, dass es Einfluss auf die Interaktion zu Desmogleinen und vielleicht auch zu anderen Cadherinen hat.

In der Arbeitsgruppe um Guillaume wurden die Flotilline als „Cadherinpartner“ mit stabilisierender Funktion in Zellkontakten beschrieben. Die Interaktion zwischen Flotillinen, Membranmikrodomänen und Cadherinen ist notwendig um Zellkontakte vor Endozytose und Degradierung zu schützen (Guillaume *et al.* 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das vorhandene Tyrosin-163 eine Interaktion zu Desmoglein-3 zu verhindern scheint. Anhand früherer Ergebnisse, ermöglicht eine Phosphorylierung an Y-163 eine Endozytose des Membranabschnittes (Neumann-Giesen *et al.* 2007). Das könnte darauf hinweisen, dass Y-163 eine Interaktion zu desmosomalen Cadherinen verhindert und nach Phosphorylierung die Internalisierung dieser Struktur ermöglicht. Das würde Flotillin-2 eine direkte Rolle im Auf- und Abbau von Adhäsionskomplexen zuschreiben, und gleichzeitig die Vermutungen von Guillaume bestätigen. Damit würden auch Annahmen von Bodin *et al.* bestätigt werden, in denen Flotilline durch ihren Einfluss auf Endozytose und Aktinfilamentumbau,

bereits indirekte, regulatorische Rollen in Adhäsionskomplexen zugeschrieben wurden (Bodin *et al.* 2014).

Flotillin-2 konnte bereits eine regulatorische Funktion in der Assemblierung von *adhaerens junctions* zugeordnet werden. In Flot-2 depletierten Zellen zeigte sich eine veränderte Morphologie der Adhäsionskomplexe und Interaktion unter den Mikrodomänen, E-cadherinen und Plakoglobin/ γ -Catenin (Kurrle *et al.* 2013). Auch in Studien von Guillaume *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein Flotillin-*knockdown* einen dramatischen Einfluss auf die Rekrutierung und die Sortierung von N- und E-Cadherinen in Zell-Zell-Kontakten nimmt, womit Flotillin ebenfalls eine direkte regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Guillaume *et al.* 2013).

Die Notwendigkeit der *lipid-rafts* im Auf- und Abbau der Desmosomen wurde bereits in diversen Arbeitsgruppen beschrieben. Hier wurde den Mikrodomänen eine regulierende Rolle in Assemblierung und Degradierung der Desmosomen zugeschrieben (Chartier *et al.* 2011; Bodin *et al.* 2014; Stahley *et al.* 2014; Völlner 2016). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Flotillin-2 und Y-163 als direkte regulatorische Faktoren an diesen Prozessen beteiligt sind und den Einfluss, den Mikrodomänen auf Zell-Zell-Kontakte nehmen, regulieren können.

Der regulatorische Einfluss, den Flotilline und Mikrodomänen auf Zell-Zell-Kontakte haben, wurde ebenfalls in einer Studie von Solis *et al.* untersucht. Hier zeigten sich veränderte und destruierte Zellkontakte in Zellen mit verminderter Flotillinkonzentration. Diese kamen durch eine verminderte Flotillin-vermittelte Internalisierung des EGF-Rezeptors (EGFR) zustande. Die Internalisierung des EGFR wird durch die Phosphorylierung der Flotilline durch Src-Kinasen vermittelt. Dadurch kam es letztendlich zu einer prolongierten Wirkung des EGF-Signalwegs und einem veränderten Einbau von E-Cadherinen in die Adhäsionskomplexe (Solis *et al.* 2012). Das Fehlen der direkten Flotillin-vermittelnden Regulation in dieser Studie führte letztendlich zu geschädigten Zellkontakten.

Durch die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse und in Zusammenschau aller dargestellten Beobachtungen lässt sich ein enormer Einfluss durch die phosphorylierbaren Tyrosine im Flotillin-2 auf die Dynamik der Zell-Zell-Kontakte vermuten. Desweiteren könnte Flotillin eine regulatorische Funktion, gesteuert über die Interaktionen zu Zelladhäsiven Proteinen, übernehmen.

Durch die hergestellte Mutante R1-G2A konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Fettsäuremodifikationen im Flotillin notwendig sind um mit der Plasmamembran zu interagieren. Durch eine Myristylierung am Glycin und multiple, davon abhängige, Palmitoylierung des Flotillin-2 wird die fixe Assoziation zu den Mikrodomänen möglich. Die hergestellte R1-G2A-Mutante enthält kein Glycin mehr und verliert dadurch seine Fettsäuremodifikationen. Dieser Mutant ging keine Interaktion zu den Mikrodomänen mehr ein. Außerdem konnte keine Phosphorylierung an dieser Mutante nachgewiesen werden, obwohl das Tyrosin-163 weiterhin enthalten war (Neumann-Giesen 2005). In den Ergebnissen dieser Arbeit kann keine Interaktion zwischen der R1-G2A-Mutante und Desmoglein-3 nachgewiesen werden. Das lässt die Vermutung zu, dass eine intakte Mikrodomänenassoziation des Flotillin-2 für die Interaktion zu Desmoglein notwendig ist. Dieses Ergebnis unterstützt jedoch unsere Vermutung, dass vorhandenes Tyrosin-163 eine Interaktion zu Desmoglein-3 beeinflusst.

Der Flotillin-2-Wildtyp enthält alle Tyrosine und kann potentiell phosphoryliert werden. Wie in vorigen Ergebnissen gezeigt wurde interagiert Flotillin-2 mit Desmoglein-3, es müsste also auch in dieser Interaktionsanalyse eine Bande erscheinen (siehe Abb. 13 C). Im *Pulldown* zeigte sich eine schwache Interaktion zwischen R1-WT-Protein und GST-hDsg-3-CPD (siehe Abb. 14 A). Dieser schwache Interaktionsnachweis steht jedoch nicht im Widerspruch zur aufgestellten Hypothese, dass Tyrosin-163 eine Interaktion zu Desmoglein-3 zu verhindern scheint. Die schwache Interaktion lässt sich durch die Kultivierung in FCS erklären. Man kann davon ausgehen, dass die Mutanten überwiegend phosphoryliert in der Zelle vorkommen, daher kaum eine Interaktion zu Desmoglein-3 zulassen, und deshalb nur einen schwachen Interaktionsnachweis zeigen. Weitere Versuche mit Flotillin-2-KO-Zellen werden genauere Aussagen zum Bindungsverhalten des R1-WT-Proteins zulassen.

Generell ist abzuwarten, ob weiterführende Versuche mit Flotillin-Mutanten (sowohl Flot-1 als auch -2) und Flotillin-KO-Zellen (bereits im Labor vorhanden) die bereits gewonnenen Erkenntnisse bestätigen und letztendlich zu *in vivo*-Nachweisen durch CO-IP führen können. Außerdem können EGF-Stimulierungsversuche den Einfluss, den die Phosphorylierung der Tyrosine auf deren Funktion nimmt, weiter analysieren und charakterisieren.

5.3 Fazit

Die Assemblierung und die Regulation der Desmosomen unterliegen einem empfindlichen Gleichgewicht, das diversen Anforderungen genügen muss. Die Mechanismen dahinter sind noch nicht gänzlich geklärt. Das Mitwirken und den Einfluss, den Mikrodomänen und Flotilline auf die desmosomale Zelladhäsion nehmen, sind ebenfalls noch zu klären. Unsere Ergebnisse konnten die Interaktion und das Interaktionsverhalten zwischen Flotillinen und Desmogleinen näher eingrenzen und charakterisieren. Die gezeigten Ergebnisse lassen die ICS mit hoher Wahrscheinlichkeit als Interaktionsfläche für Flotilline erscheinen. Desweiteren scheint das Tyrosin-163 im Flotillin-2 die Bindung zu Desmoglein-3 zu beeinflussen und könnte eine indirekt regulierende Wirkung auf das Grundgerüst des Desmosoms nehmen.

Durch die genaue Charakterisierung der Interaktionsfläche zwischen Flotillinen und den intrazellulären Domänen der Desmogleine wird das Zusammenspiel dieser Komponenten verständlicher werden und weitere Versuche bezüglich des desmosomalen Stoffwechsels ermöglichen. Vielleicht übernehmen die *raft*-assoziierten Proteine eine entscheidende Rolle in der Regulation des desmosomalen Auf- und Abbaus. Sollte sich herausstellen, dass Flotilline ebenfalls über die ICS mit desmosomalen Cadherinen interagieren, lässt das neue Vermutungen zu deren Funktion und Wirken im Desmosom zu. Vielleicht üben Flotilline über ihre direkte Nähe, und bereits nachgewiesene Interaktion zu Mediatorproteinen eine vermittelnde und regulierende „Brückenfunktion“ im Desmosom aus. Diese Funktion könnte durch die Phosphorylierung der Flotilline gesteuert werden. Durch eine verminderte „Brückenfunktion“ könnte es schließlich zu geschwächten Zellkontakten in Flotillin-depletierten Zellen oder auch aufgehobener Zelladhäsion in gesunden und krankhaften Zellen kommen.

Verständnis und Einbettung der Flotilline und Mikrodomänen in die Regulation und Organisation des Desmosoms werden die Pathophysiologie der Pemphiguskrankheiten klarer werden lassen. Neue Angriffspunkte und Perspektiven in der Entwicklung von Therapien sowohl dermalen, als auch systemischer Krankheiten könnten daraus entstehen.

6 Zusammenfassung

Die Desmosomen repräsentieren eine Variante der Zelladhäsion und verbinden benachbarte Zellen über Desmogleine und Desmocolline. Diese desmosomalen Adhäsionsproteine sind in der Lage, direkte Interaktionen unter benachbarten, extrazellulären Domänen aufzubauen, was zu einem festen Zellzusammenschluss führt. Gleichzeitig können sie mit ihren intrazellulären Domänen über Mediatorproteine mit den Intermediärfilamenten der jeweiligen Zelle interagieren und verteilen so die einwirkenden Kräfte auf eine breite Fläche.

Die Regulation und die Mechanismen hinter desmosomalem Auf- und Abbau wurden mit cholesterolreichen Membranabschnitten, den sogenannten *membrane-* oder *lipidrafts* in Verbindung gebracht. Diese sich variabel zusammensetzenden cholesterolreichen Mikrodomänen können durch den Einbau spezieller Membranstrukturen an diversen zellulären Prozessen mitwirken. So beteiligen sie sich beispielsweise an der Organisation von cholesterolabhängigen Zell-Zell-Kontakten. Über ihre assoziierten Proteine, die Flotilline-1 und -2, interagieren sie direkt mit Desmogleinen und Mediatorproteinen im Desmosom. Um regulatorisch wirken zu können, enthalten Flotilline phosphorylierbare Tyrosine, die eine fixe Assoziation zu den Mikrodomänen ermöglichen. Flotilline können über Src-Kinasen phosphoryliert werden und sind somit in diverse Signaltransduktionsprozesse involviert.

Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass sowohl Flotillin-1 als auch -2 direkt über die intrazelluläre *cadherine-like-sequence* (ICS) der Desmogleine-1-3 interagiert. Die ICS stellt eine hochaffine Interaktionsfläche für Mediatorproteine im Desmosom dar und nimmt eine Schlüsselposition in der Zelladhäsion ein. Die Interaktion über diese Fläche würde die Flotilline ins Zentrum der vermittelnden Strukturen im Desmosom bringen. Weiterhin konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass das Tyrosin-163 (Y-163) im Flotillin-2 Einfluss auf die Interaktion zu Desmoglein-3 nimmt. Es ist anzunehmen, dass dies eine Interaktion zu Desmoglein-3 sogar verhindert. Somit würde Flotillin-2 einen direkt beeinflussenden Faktor in der Assemblierung der Desmogleine im Desmosom darstellen.

6.1 Summary

Desmosomes represent a type of cell adhesion, that connects adjacent cells with the help of Desmogleins and Desmocollins. These adhesion proteins have the ability to interact directly with adjacent extracellular domains, leading to a strong cell association. Simultaneously, they distribute the external acting forces on a wide surface by connecting their intracellular domains to the respective cytoskeletal elements of the cell.

Regulation and mechanics behind desmosomal assembling were associated with cholesterol-rich membrane domains that are also called lipid- or membrane-rafts. These cholesterol-rich micro domains are involved in various cell processes, through their dynamic and variable and recruitment of special membrane-bound molecules such as EGF-Receptors. Through their associated proteins, Flotillin-1 and -2, membrane-rafts directly interact with Desmogleins, Desmocollins and the mediator proteins of the Desmosome. Due to containing phosphorylatable tyrosines, Flotillins have a regulatory effect allowing for a solid interaction with lipid-rafts. These tyrosines are phosphorylated by Src-kinases, leading to the involvement of flotillins in different cell signaling processes.

The results of the present study suggest that Flotillin-1 and -2 directly interact with the cadherine-like-sequence (ICS) of Desmogleins-1-3. The ICS demonstrates a significant affinity across its interaction area towards desmosomal mediator proteins and occupies a key position in cell adhesion processes. Demonstrating that the ICS is also the interaction area for Flotillins, would emphasize the role of Flotillins and microdomains in desmosomal assembly. Furthermore, results of the present study show an important role of Tyrosin-163 in Flotillin-2. This would imply that Flotillin-2 phosphorylation displays an influence on and even suppression of the interaction between Desmoglein-3 und Flotillin-2, leading to the conclusion that Flotillin-2 could have a direct regulatory function in desmosomal assembly.

7 Literaturverzeichnis

- Altmeyer P (2018a) *Pemphiguskrankheiten*. Altmeyers Enzyklopädie. Available at: <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/pemphiguskrankheiten-ubersicht-2959##>, last assessed 11/23/2018.
- Altmeyer P (2018b) *Pemphigus vulgaris*. Altmeyers Enzyklopädie. Available at: <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/pemphigus-vulgaris-2974##>, last assessed 11/23/2018.
- Amaddii M, Meister M, Banning A, Tomasovic A, Mooz J, Rajalingam K, Tikkanen R (2012) Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 7265–7278, doi:10.1074/jbc.M111.287599
- Angst B (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*: 629–641.
- Babuke T, Ruonala M, Meister M, Amaddii M, Genzler C, Esposito A, Tikkanen R (2009) Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling* **21**: 1287–1297, doi:10.1016/j.cellsig.2009.03.012
- Babuke T and Tikkanen R (2007) Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology* **86**: 525–532, doi:10.1016/j.ejcb.2007.03.003
- Banning A, Babuke T, Kurrle N, Meister M, Ruonala MO, Tikkanen R (2018) Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with α -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase. *Cells* **7**, doi:10.3390/cells7040028
- Banning A, Regenbrecht CRA, Tikkanen R (2014) Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular Signalling* **26**: 198–207, doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.001
- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997) Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13793–13802, doi:10.1074/jbc.272.21.13793
- Bodin S, Planchon D, Rios Morris E, Comunale F, Gauthier-Rouvière C (2014) Flotillins in intercellular adhesion - from cellular physiology to human diseases. *Journal of Cell Science* **127**: 5139–5147, doi:10.1242/jcs.159764

- Chartier NT, Lainé MG, Ducarouge B, Oddou C, Bonaz B, Albiges-Rizo C, Jacquier-Sarlin MR (2011) Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Experimental Cell Research* **317**: 1422–1436, doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.009
- Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP (2009) The desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a002543, doi:10.1101/cshperspect.a002543
- Dermine JF, Duclos S, Garin J, St-Louis F, Rea S, Parton RG, Desjardins M (2001) Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 18507–18512, doi:10.1074/jbc.M101113200
- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM (2010) Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a000125, doi:10.1101/cshperspect.a000125
- Guillaume E, Comunale F, Do Khoa N, Planchon D, Bodin S, Gauthier-Rouvière C (2013) Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of Cell Science* **126**: 5293–5304, doi:10.1242/jcs.133975
- Harris TJC and Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **11**: 502–514, doi:10.1038/nrm2927
- John BA, Meister M, Banning A, Tikkanen R (2014) Flotillins bind to the dileucine sorting motif of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. *The FEBS Journal* **281**: 2074–2087, doi:10.1111/febs.12763
- Kessler EL, van Stuijvenberg L, van Bavel JJA, van Bennekom J, Zwartsen A, Rivaud MR, Vink A, Efimov IR, Postma AV, van Tintelen JP, Remme CA, Vos MA, Banning A, Boer TP de, Tikkanen R, van Veen TAB (2019) Flotillins in the intercalated disc are potential modulators of cardiac excitability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **126**: 86–95, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.11.007
- Kowalczyk AP and Green KJ (2013) Structure, function, and regulation of desmosomes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **116**: 95–118, doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4
- Kurrle N, Völlner F, Eming R, Hertl M, Banning A, Tikkanen R (2013) Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PloS one* **8**: e84393, doi:10.1371/journal.pone.0084393
- Lüllmann-Rauch R (ed) (2015) *Taschenlehrbuch Histologie*, 5th edn. Georg Thieme Verlag.

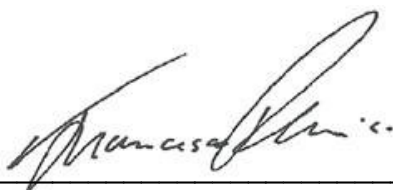
- Mathur M (1994) Interactions of the Cytoplasmatic Domain of the Desmosomal Cadherin Dsg1 with Plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*: 14075–14080.
- Meister M and Tikkanen R (2014) Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes* **4**: 356–371, doi:10.3390/membranes4030356
- Meister M, Zuk A, Tikkanen R (2014) Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *The FEBS journal* **281**: 2956–2976, doi:10.1111/febs.12834
- Nekrasova O and Green KJ (2013) Desmosome assembly and dynamics. *Trends in Cell Biology* **23**: 537–546, doi:10.1016/j.tcb.2013.06.004
- Neumann-Giesen C (2005) *Membrane Association and Tyrosine Phosphorylation of Reggie-1/Flotillin-2: Role in Signaling to the Actin Cytoskeleton*. Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main
- Neumann-Giesen C, Falkenbach B, Beicht P, Claasen S, Lüers G, Stuermer CAO, Herzog V, Tikkanen R (2004) Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical Journal* **378**: 509–518, doi:10.1042/BJ20031100
- Neumann-Giesen C, Fernow I, Amaddii M, Tikkanen R (2007) Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **120**: 395–406, doi:10.1242/jcs.03336
- Resnik N, Sepcic K, Plemenitas A, Windoffer R, Leube R, Veranic P (2011) Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 1499–1507, doi:10.1074/jbc.M110.189464
- Riento K, Frick M, Schafer I, Nichols BJ (2009) Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science* **122**: 912–918, doi:10.1242/jcs.039024
- Roitbak T, Surviladze Z, Tikkanen R, Wandering-Ness A (2005) A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *The Biochemical Journal* **392**: 29–38, doi:10.1042/BJ20050645
- Schmidt E and Zillikens D (2011) The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Deutsches Arzteblatt International* **108**: 399–405, I-III, doi:10.3238/arztebl.2011.0399
- Schulte T (1997) Reggie-1 and reggie-2: two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeberation.

- Shapiro L and Weis WI (2009) Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a003053, doi:10.1101/cshperspect.a003053
- Simons K and Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**: a004697, doi:10.1101/cshperspect.a004697
- Solis GP, Hoegg M, Munderloh C, Schrock Y, Malaga-Trillo E, Rivera-Milla E, Stuermer CAO (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *The Biochemical Journal* **403**: 313–322, doi:10.1042/BJ20061686
- Solis GP, Schrock Y, Hülsbusch N, Wiechers M, Plattner H, Stuermer CAO (2012) Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular Biology of the Cell* **23**: 1812–1825, doi:10.1091/mbc.E11-12-1006
- Stahley SN, Saito M, Faundez V, Koval M, Matheyses AL, Kowalczyk AP (2014) Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. *PloS one* **9**: e87809, doi:10.1371/journal.pone.0087809
- Völlner F (2016) *Flotillins as novel regulators of desmosome dynamics*. Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main
- Völlner F, Ali J, Kurrle N, Exner Y, Eming R, Hertl M, Banning A, Tikkanen R (2016) Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific Reports* **6**: 28820, doi:10.1038/srep28820
- Wichter T (2005) Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie: sportmedizinische Aspekte. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **5**: 118-125
- Yulis M, Kusters DHM, Nusrat A (2018) Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. *The Journal of Physiology* **596**: 3883–3898, doi:10.1113/JP275328

Erklärung zur Dissertation

„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.“

Darmstadt, 08.05.2019



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen und zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben, bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Tikkanen, die mir eine medizinische Doktorarbeit am Biochemischen Institut überhaupt erst möglich machte. Aus ihrer offenen und positiven Art schöpfte ich, sowohl für die Arbeit im Labor als auch danach, immer wieder Motivation. Außerdem stand ihre Tür immer offen für Nachfragen oder Anliegen meinerseits. Es ist keine Selbstverständlichkeit eine solche fürsorgliche und prompte Unterstützung zu erfahren—kiitos!

Weiterer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Tikkanen. Danke Dr. Antje Banning, Ralf Füllkrug, Petra Janson und Benedikt Beckert für eure schier unendliche Geduld, gute Musikauswahl und tolle Stimmung während dem Arbeiten im Labor und dem ein oder anderem „Spezialpipettierkurs“. Generell bin ich immer sehr gerne ins Labor gekommen, nicht zuletzt wegen der guten Gesellschaft und Stimmung im Team, dafür auch einen Dank an meine Mitstreiter Leonie Voll, Blendi Sahilu und Peter Krautwurst.

Die Zeit in der ich experimentell tätig war, war eine ganz besondere für mich persönlich. Eine Zeit voller Turbulenzen und Veränderungen in meinem Leben, die ich mit Hilfe einiger enger Freunde meistern konnte. Hier möchte ich mich bei Leonie Voll, Franziska Falm, Jessica Koch, Svenja Gruß, Lena Böhringer, Alica Köppel, Ann-Kristin und Thomas Dixon für ihre Unterstützung vor Ort bedanken, ohne die ich meine Arbeit im Labor vielleicht nicht beendet hätte. Mein Dank gilt generell Allen, die mir Kraft in dieser schweren Zeit gegeben und an mich gedacht haben.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern, Tante Hedi, Onkel Karl-Heinz, Gabi, Torsten und Stefan Korndörfer, Onkel Robert und Tante Gabi, die mich mit ihrem fast schon „blinden Vertrauen“ in mein Können, immer unterstützt und angetrieben haben.

Ein Grazie mille möchte ich an die ganze Familie Hess und das Praxisteam der dazugehörigen Hausarztpraxis in Darmstadt entsenden. Vielen Dank für die Zeit und

Motivation, die mir dort gegeben wurden, um neben dem beruflichen Einstieg meine Dissertation fertigstellen zu können.

Last but not least kommen, die Menschen in meinem Leben, die mich schon sehr lange begleiten und ohne die ich nie soweit gekommen wäre. Jeder der mich und meine Geschichte kennt, weiß dass das nicht nur eine Floskel ist, sondern vielmehr eine tiefe Dankbarkeit für langjährige Freundschaften auf die ich unendlich stolz bin.

Allen voran Eva Kling. Danke für deine „Ennergiie“, die du in mich und diese Arbeit gesteckt hast und für deine immer präsente, inspirierende und unentbehrliche Freundschaft - Alles andere als mittelständisch!

Danke Hanna Neumann, Anne Gunzer, Miriam Fritz, Andreas Reichl, Thorsten Helfmann, Jonas Böhm, Grit und Nora Hädicke, Theresa Schmidt, Julia Henkel, Iris Schokis, Anna Wieduwilt, Jon Magnus und Peggy Oertel.

Ihr alle seid meine 2. Familie und gebt mir Kraft und Selbstvertrauen, die mich befähigen dieses verrückte Leben zu meistern.

Ich freue mich auf noch viele aufregende Jahre mit euch.

Es ist tatsächlich vollbracht...der Knaller.