

Die Tumor-assoziierten Adhäsionsmoleküle EpCAM und Claudin-7 – Identifizierung und Charakterisierung eines Proteinkomplexes

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

**Markus Ladwein
aus Dillingen**

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Holger Puchta
Referent:	Prof. Dr. med. Margot Zöller
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Wedlich
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Dezember 2005

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären, wenn man
nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.

Johann-Wolfgang von Goethe

ZUSAMMENFASSUNG

Krebs stellt die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen dar, wobei in der Regel der Prozess der Metastasierung den Grenzstein kurativer Therapie setzt. Metastasierung ist ein vielstufiger, komplexer Prozess, der bislang noch nicht hinreichend erklärt werden konnte. Zentrale Ereignisse sind u. a. Lösen einzelner Zellen vom Primärtumor, Abbau extrazellulärer Matrix und Einwandern der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße. Da die metastasierende Tumorzelle sich zuerst aus dem primären Gewebsverband lösen muss, könnte man davon ausgehen, dass Zell-Zell Adhäsionsmoleküle den Prozess der Metastasierung eher unterbinden denn fördern. Das prominenteste Zell-Zell Adhäsionsmolekül E-Cadherin, welches auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet wird, ist tatsächlich in der Lage, den Prozess der Metastasierung einzuschränken. Dies gilt jedoch nicht für das epitheliale Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM. Dieses panepithelial exprimierte Transmembranprotein weist eine gesteigerte Expression in nahezu allen Karzinomzellen auf und wird in direkten Zusammenhang mit Tumorprogression und Metastasierung gebracht. Der molekulare Mechanismus, durch welchen EpCAM fördernden Einfluss auf die Dissemination transformierter Zellen vom Primärtumor nimmt, ist noch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass EpCAM in Tumorzellen und nicht-tumorigenen Zellen über eine direkte Protein-Protein Interaktion mit einem weiteren Transmembranprotein assoziiert ist - dem „tight junction“ Protein Claudin-7. Dabei handelt es sich um eine äußerst stabile, Claudin-7-spezifische Assoziation. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäureabschnitte von EpCAM konnten auf seine Transmembrandomäne und die Cystein-arme Region beschränkt werden. Eine Beteiligung der beiden extrazellulär gelegenen, funktionell aktiven EGF-Domänen sowie der zytoplasmatischen Domäne für die Assoziation mit Claudin-7 konnte ausgeschlossen werden. Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation beider Adhäsionsproteine ist es gelungen, ihre Existenz in cholesterinreichen Membranmikrodomänen nachzuweisen, wobei eine Phosphorylierung von Claudin-7 essentiell von seiner Lokalisation in „raft“-ähnlichen Membranstrukturen abhängt. Da cholesterinreiche Membranmikrodomänen als Plattformen zur Initiierung und Transduktion zellulärer Signale gelten, könnte die Phosphorylierung von Claudin-7 sowie die Anordnung des Proteinkomplexes in „raft“-ähnlichen Membranbereichen einen Hinweis auf die funktionelle Aktivität der EpCAM-Claudin-7 Interaktion liefern. Letztlich sei erwähnt, dass für Pankreaskarzinome eine erhöhte Expression sowohl für EpCAM als auch für Claudin-7 gegenüber normalem Pankreasgewebe nachgewiesen werden konnte.

Die Resultate der vorliegenden Dissertation liefern somit eine solide Basis zur Beantwortung der Frage ob und auf welche Art und Weise der stabile Proteinkomplex zwischen EpCAM und Claudin-7 zur Tumorprogression und Metastasierung beiträgt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Tumorprogression und Metastasierung	2
1.1.1 Ausreichende Versorgung der Zelle mit Wachstumsfaktoren	2
1.1.2 Insensitivität der Zelle gegenüber Wachstumsinhibitoren.....	3
1.1.3 Resistenz der Zelle gegenüber kontrolliertem Zelltod (Apoptose)	3
1.1.4 Unlimitiertes replikatives Potential der Zelle	4
1.1.5 Unterstützende Gefäßneubildung (Neoangiogenese) des Tumors.....	5
1.1.6 Gewebsinvasion und Metastasierung	6
1.2 Einfluss von Oberflächenmolekülen auf Tumorprogression und Metastasierung	7
1.3 Das epitheliale Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM	10
1.3.1 Molekulare Struktur und Funktion	10
1.3.2 EpCAM bei Tumorprogression und Metastasierung	13
1.3.3 Immuntherapie	16
1.4 Das BSp73 Tumorsystem	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Enzyme	21
2.1.3 Vektoren.....	21
2.1.4 Primer.....	22
2.1.5 cDNAs	23
2.1.6 Primärantikörper.....	23
2.1.7 Sekundärantikörper und -reagenzien.....	24
2.1.8 Radioisotope	24
2.1.9 Bakterien	24
2.1.10 Medien und Zusätze zur Kultivierung von Bakterien	24
2.1.11 Zelllinien	25
2.1.12 Zellkulturmedien und -zusätze	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	27
2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Bakterien	27
2.2.1.2 Generierung elektrokompenter <i>E.coli</i> Bakterien	27
2.2.2 Zellbiologische Methoden	27
2.2.2.1 Passagieren eukaryotischer Zellen.....	28
2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	28
2.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	28
2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse	28
2.2.2.5 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten	29
2.2.2.6 Immunelektronenmikroskopie	30
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	32
2.2.3.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab	32

2.2.3.3	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	33
2.2.3.4	Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA.....	33
2.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.3.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
2.2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.3.8	Transformation elektrokompenter Bakterien (Elektroporation).....	35
2.2.3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	36
2.2.3.10	Generierung von Deletionsmutanten und chimären Konstrukten durch gerichtete Mutagenese mittels PCR.....	37
2.2.3.11	Produktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	38
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.4.1	Oberflächenbiotinylierung von Zellen.....	39
2.2.4.2	Behandlung von Zellen mit Tunicamycin.....	40
2.2.4.3	Herstellung von Zelllysaten.....	40
2.2.4.4	Biotinylierung von Zelllysaten.....	41
2.2.4.5	Chemische Quervernetzung von Proteinen in Zelllysaten.....	41
2.2.4.6	Behandlung der Zelllysate mit Methyl- β -Cyclodextrin.....	42
2.2.4.7	Immunpräzipitation.....	42
2.2.4.8	Immundepletion von EpCAM und Claudin-7.....	42
2.2.4.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.2.4.10	Immunpräzipitation in großem Maßstab.....	43
2.2.4.11	GST-„pull down assay“.....	44
2.2.4.12	Kolloidal - Coomassie - Färbung von Proteingelen und massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden.....	44
2.2.4.13	Massenspektrometrie.....	45
2.2.4.14	Silberfärbung und Trocknung von Proteingelen.....	47
2.2.4.15	„ <i>In-vitro</i> kinase assay“.....	48
2.2.4.16	Western Blot Analyse.....	48
2.2.4.17	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	49
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	Ein 20 kDa Protein interagiert direkt mit EpCAM.....	51
3.1.1	Kopräzipitation eines 20 kDa Proteins mit EpCAM.....	51
3.1.2	Eine 55 kDa Bande erscheint nach DSP-Quervernetzung.....	53
3.2	Das 20 kDa Protein ist Claudin-7.....	58
3.2.1	Identifizierung des 20 kDa Proteins mittels massenspektrometrischer Analyse.....	58
3.2.2	Claudin-7 kopräzipitiert mit EpCAM unter stringenten Lysisbedingungen.....	60
3.3	Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in transformiertem humanem Pankreasgewebe.....	63
3.4	Nachweis der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 in diversen Karzinomzelllinien und einer nicht-tumorigenen Epithelzelllinie.....	65
3.4.1	Nachweis der Interaktion in Karzinomzelllinien der Ratte.....	65
3.4.2	Nachweis der Interaktion in humanen Karzinomzelllinien.....	66
3.4.3	Nachweis der Interaktion in der immortalisierten Epithelzelllinie HaCaT.....	68
3.5	Membranlokalisierung von EpCAM und Claudin-7 in Zellen der Duodenalmukosa.....	69
3.6	EpCAM interagiert nicht mit Claudin-1 und Claudin-3.....	71
3.7	Stöchiometrie der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7.....	73
3.7.1	Geringer Anteil an kopräzipitierenden EpCAM bzw. Claudin-7 Molekülen.....	73
3.7.2	Unvollständige Kolokalisation von EpCAM und Claudin-7.....	75
3.8	Identifizierung der für die Interaktion relevanten Aminosäuresequenzen von EpCAM.....	78
3.8.1	Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM ist nicht an der Interaktion mit Claudin-7 beteiligt.....	78
3.8.2	Keine Beteiligung der EGF-1 bzw. -2 Domäne von EpCAM an der Interaktion mit Claudin-7.....	83
3.9	Phosphorylierung von Claudin-7.....	87
3.9.1	Das phosphorylierte 20 kDa Protein ist Claudin-7.....	88

3.9.2	Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in cholesterinreichen Membran- mikrodomänen	90
3.9.3	Abhängigkeit der Claudin-7 Phosphorylierung von der Lokalisation in cholesterinreichen Membranmikrodomänen	96
4	DISKUSSION	99
4.1	Das Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM interagiert direkt mit dem „tight junction“ Protein Claudin-7	99
4.1.1	Das „tight junction“ Protein Claudin-7	100
4.1.2	Hohe Stabilität und Spezifität der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7	101
4.2	Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 in Karzinomzelllinien und einer immortalisierten Keratinozytenlinie	101
4.3	Subzelluläre Lokalisation von EpCAM und Claudin-7	102
4.4	Die interaktionsrelevanten Aminosäureabschnitte von EpCAM	104
4.5	Lokalisation von EpCAM und phosphoryliertem Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen	107
4.5.1	Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in Membranmikrodomänen	107
4.5.2	Die Relevanz von Membranmikrodomänen für die Phosphorylierung von Claudin-7	110
4.6	Claudin-7 und Tumorprogression	112
4.7	Modell der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7	114
4.8	Perspektiven	116
	LITERATURVERZEICHNIS	117
	DANKSAGUNG	138
	PUBLIKATIONSLISTE	139
	LEBENS LAUF	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AJ(s)	„adherens junction(s)“
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base(n)
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAM(s)	„cell adhesion molecule(s)“
CAR	Cystein-arme Region
CD	„cluster of differentiation“
CD44s	CD44 Standardisoform
CD44v	CD44 variante Isoform
cDNA	„complementary deoxyribonucleic acid“
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMC	„critical micelle concentration“
CO ₂	Kohlendioxid
COX 2	Cyclooxygenase 2
Cys	Cystein
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	„death inducing signaling complex“
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
DS	Desmosom(en)
DSP	Dithiobis-(Succinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
ED	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
EM	Elektronenmikroskopie
EpCAM	„epithelial cell adhesion molecule“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix
EZS	extrazelluläre Schleife
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
F	Farad
FCS	„fetal calf serum“
Forw	„forward“
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxy-Ethyl-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HGF	„hepatocyte growth factor“
HLB	„hydrophilic-to-lipophilic balance“
HRP	„horseradish peroxidase“
Hygro	Hygromycin
Ig	Immunglobulin
inkl.	inklusive
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IZS	intrazelluläre Schleife
JAM(s)	„junctional adhesion molecule(s)“
k	kilo
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
l _o	„liquid ordered phase“
l _d	„liquid disordered phase“
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEF	„leucocyte enhancer factor“
μ	mikro
m	Masse / Meter / milli
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	„matrix assisted laser desorption/ionisation“
MAP	„mitogen activated pathway“
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Millionen
MM	molekulare Masse
MMP	Matrix Metalloproteinase
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
MS	Massenspektrometrie
MT-MMP	Membran-Typ MMP
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NCAM	„neural cell adhesion molecule“
Neo	Neomycin
NHS	N-hydroxysuccinimid
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
OsO ₄	Osmium (VIII)-oxid
³² P	radioaktives Phosphorisotop
p	Protein

pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	„phosphate buffered saline“
Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
PCR	„polymerase chain reaction“
PDZ	Bezeichnung für eine Proteinbindungsdomäne, zusammengesetzt aus den Anfangsbuchstaben der Proteine: <u>P</u> SD-95, <u>D</u> isc-large A und <u>Z</u> O-1
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP2A	Proteinphosphatase 2A
ppm	„parts per million“
PSD	„post source decay“
PWO	<i>Pyrococcus woesei</i>
Rb	Retinoblastomprotein
Rev	„reverse“
RIPA	Radio Immuno Präzipitationsassay
RNA	„ribonucleic acid“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	„small interfering RNA“
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA Puffer
TCF	„T cell factor“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGF-β	„transforming growth factor-β“
Thr	Threonin
TJ(s)	„tight junction(s)“
TMD	Transmembrandomäne
TOF	„time of flight“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	„unit“
ÜN	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
vgl.	vergleiche
VT	Volumenteile
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)
WB	Western Blot
Wnt	„wingless-type“
WT	Wildtyp
z	Elementarladung
z. B.	zum Beispiel
ZPD	zytoplasmatische Domäne
ZO-1	„zonula occludens-1“

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1.1:	EpCAM-Struktur und homotypische Bindungsstellen	12
Abb. 3.1:	Koimmunpräzipitation eines 20 kDa Proteins mit EpCAM	52
Abb. 3.2:	Nach chemischer Quervernetzung mit DSP erscheint eine 55 kDa Bande	53
Abb. 3.3:	Die Interaktion von EpCAM und einem 20 kDa Protein widersteht äußerst stringenten Lysisbedingungen	55
Abb. 3.4:	Direkte Gegenüberstellung von DSP-Quervernetzung und Biotinylierung.....	56
Abb. 3.5:	Die 20 kDa und die 55 kDa Bande enthalten das gleiche Protein	57
Abb. 3.6:	Aufreinigung des 20 kDa Proteins zur massenspektrometrischen Analyse.....	59
Abb. 3.7:	EpCAM interagiert direkt mit Claudin-7.....	61
Abb. 3.8:	Koimmunpräzipitation von EpCAM und Claudin-7	62
Abb. 3.9:	Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in humanem Pankreastumorgewebe.....	64
Abb. 3.10:	Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM in BSp73ASML und PROb Zellen	65
Abb. 3.11:	Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM in diversen humanen Karzinomzelllinien	67
Abb. 3.12:	Assoziation von EpCAM und Claudin-7 in HaCaT Zellen	68
Abb. 3.13:	EpCAM und Claudin-7 sind in Epithelzellen des Zwölffingerdarms sowohl in „tight junctions“ als auch basolateral lokalisiert.....	70
Abb. 3.14:	Nur Claudin-7 kopräzipitiert mit EpCAM	72
Abb. 3.15:	Nur eine kleine Fraktion der jeweiligen Gesamtmenge von EpCAM und Claudin-7 interagiert miteinander in BSp73ASML Zellen.....	74
Abb. 3.16:	Kokalisation von EpCAM und Claudin-7	76
Abb. 3.17:	Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM ist für die Interaktion mit Claudin-7 nicht notwendig	80
Abb. 3.18:	Die C-terminale, zytoplasmatische Domäne von Claudin-7 ist für die Interaktion mit EpCAM nicht relevant.....	82
Abb. 3.19:	Tunicamycin-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von EpCAM mit Claudin-7	85
Abb. 3.20:	Beide EGF-Domänen sind nicht an der Interaktion beteiligt	87
Abb. 3.21:	Claudin-7 wird im „ <i>in-vitro</i> kinase assay“ phosphoryliert.....	89
Abb. 3.22:	EpCAM und Claudin-7 lokalisieren nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation teilweise in detergensresistenten Fraktionen	92
Abb. 3.23:	Die Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in den detergensunlöslichen Fraktionen ist M β CD-sensitiv	94
Abb. 3.24:	Densitometrische Analyse der in Abbildung 3.23 dargestellten Banden von EpCAM und Claudin-7	95
Abb. 3.25:	Die Phosphorylierung von Claudin-7 ist abhängig von der Lokalisation in cholesterinreichen Membranmikrodomänen.....	97
Abb. 4.1:	Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von Claudin-1, -3 und -7	106
Abb. 4.2:	Interaktionsmodell von EpCAM mit Claudin-7.....	114

Tabellen:

Tab. 2.1:	Primärantikörper.....	23
Tab. 2.2:	Sekundärantikörper und -reagenzien.....	24
Tab. 2.3:	PCR-Konstrukte	37
Tab. 2.4:	Klonierung der PCR-Konstrukte.....	38
Tab. 3.1:	Verwendete Detergenzien.....	54

1 EINLEITUNG

Krebs verdankt seinen Namen dem Römer Claudius Galenus (* um 129, † um 199), der beobachtet hatte, dass beim fortgeschrittenen Brustkrebs das krankhafte Gewebe oft wie der Körper eines Krebses aussieht. In den Blutgefäßen zur Versorgung der Geschwulst sah er die Beine dieses Krebses (Krebs = gr.-lat. Carcinom). Erst etwa 1700 Jahre später folgten erste Ansätze einer präzisen Definition der Natur bösartiger Tumore. Die heutige Definition, die alle Krebsformen einschließt, benennt als gemeinsames Element das unkontrollierte Wachstum entarteter Zellen. In den westlichen Industrienationen stellt Krebs nach Angaben des Robert Koch Instituts die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen dar. Jährlich sterben in Deutschland rund 200 000 Menschen an Krebs - Frauen und Männer etwa zu gleichen Anteilen (Robert Koch Institut, 2004). Dabei ist Lungenkrebs die häufigste Ursache männlicher Krebssterbefälle, während Brustkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen darstellt. Die Klassifizierung der Krebsarten erfolgt nach deren Ausgangsgewebe. So konnte ermittelt werden, dass etwa 83% aller Krebserkrankungen bei Erwachsenen auf entartete Epithelzellen zurückzuführen sind (American Cancer Society, 2000). Tumore, welche von Epithelzellen ausgehen, werden als Karzinome bezeichnet.

Innerhalb der letzten drei Jahrzehnte kann die Krebsforschung, basierend auf einem erweiterten Verständnis molekularbiologischer Prozesse, rasante Fortschritte verzeichnen. So weiß man heute, dass dynamische Veränderungen des Genoms von zentraler Bedeutung für die Entstehung maligner Tumore sind. Dies sind zum einen sogenannte Onkogene, deren Mutation zur Synthese strukturell veränderter oder fehlregulierter Proteine führt („gain of function“), und zum anderen Tumorsuppressorgene, die im physiologischen Kontext die Krebsentstehung verhindern, und erst durch Mutation und damit durch Verlust dieser Funktion („loss of function“) zur Krebsentstehung beitragen (Bishop und Weinberg, 1996). Allerdings ist die progressive Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Zelle häufig nicht die Folge eines einzelnen mutierten Gens, sondern ein Prozess, der in vielen aufeinander folgenden Schritten abläuft und mehrere Gene umfasst. Auch das altersbedingte Auftreten der meisten Krebsarten spricht stochastisch für mehrere aufeinander folgende Schritte (Renan, 1993). Die Entartung von Zellen ist mit den Grundprinzipien der Evolutionstheorie nach Darwin vergleichbar. Durch einzelne genetische Veränderungen kommt es dabei zu einem Wachstumsvorteil. Setzen sich mehrere solcher genetischer Veränderungen durch, führt das Zusammenspiel der Modifikationen zur malignen Progression der Zelle (Foulds, 1954; Nowell, 1976).

1.1 Tumorprogression und Metastasierung

Viele, wenn nicht alle Krebsarten, zeigen Gemeinsamkeiten in einigen grundlegenden Änderungen der Zellphysiologie. Diese werden von D. Hanahan und R. A. Weinberg in sechs Kardinaleigenschaften transformierter Zellen gruppiert:

- ausreichende Versorgung der Zelle mit Wachstumsfaktoren
- Insensitivität der Zelle gegenüber Wachstumsinhibitoren
- Resistenz der Zelle gegenüber kontrolliertem Zelltod (Apoptose)
- unlimitiertes replikatives Potential der Zelle
- unterstützende Gefäßneubildung (Neoangiogenese) des Tumors
- Gewebsinvasion und Metastasierung

Jede dieser sechs pathophysiologischen Veränderungen spiegelt eine Lücke im Abwehrmechanismus des Organismus gegen Krebs wider. Die Möglichkeit des Körpers, auf jeder dieser Ebenen der malignen Progression entgegenzuwirken, macht Krebs zu einer im Vergleich zur Lebensspanne seltenen Erkrankung (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.1 Ausreichende Versorgung der Zelle mit Wachstumsfaktoren

Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumsfaktoren, um von einem ruhenden in einen proliferierenden Zustand zu gelangen. Signale solcher sezernierten Wachstumsfaktoren oder Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) werden über Transmembran-Rezeptoren in die Zelle vermittelt. Da Tumorzellen solche Wachstumsfaktoren selbst in großer Menge produzieren können (autokrine Stimulation), sind sie im Gegensatz zu normalen Zellen von extrazellulären Stimuli unabhängig. Dies schließt eine mangelnde Abhängigkeit vom normalen Gewebsverband ein (Fedi et al., 1997). Die „erworbene Wachstumsfaktoren Autonomie“ wurde als erstes Charakteristikum beschrieben, in dem sich Tumorzellen von nicht-transformierten Zellen unterscheiden. Die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren ist ebenfalls bei vielen Tumoren dysreguliert. So werden in vielen Tumoren häufig Rezeptor-Tyrosinkinasen in erhöhter Anzahl detektiert. Dies kann selbst bei normaler Konzentration der Wachstumsfaktoren zu überschießender Proliferation führen (Fedi et al., 1997). Strukturelle Veränderungen solcher Rezeptoren, wie sie z. B. beim EGFR („epidermal growth factor receptor“) zu beobachten sind, können darüber hinaus zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Signalverarbeitung führen (DiFiore et al., 1987).

Bei den diversen Optionen der Selbststimulation und -regulation des Wachstums einer Tumorzelle ist jedoch unbestritten, dass das den Tumor umgebende Gewebe eine bedeutende Rolle spielt. M. Skobe und N. E. Fusenig formulieren deshalb: „Erfolgreiche Tumorzellen sind die, welche die Fähigkeit erlangt haben, ihre normalen Nachbarzellen zur Ausschüttung wachstumsstimulierender Substanzen zu bewegen“, (Skobe und Fusenig, 1998).

1.1.2 Insensitivität der Zelle gegenüber Wachstumsinhibitoren

In gesundem Gewebe wird die Homöostase und der Ruhezustand der Zellen (Zell-Quieszenz) durch anti-proliferative Signale gewährleistet. Inhibitoren der Zellproliferation, die in löslicher oder in der EZM bzw. der Zellmembran in immobilisierter Form vorliegen können, wirken wie Wachstumsfaktoren durch Bindung an einen signaltransduzierenden Rezeptor. In Abhängigkeit vom Signal kann es dabei zum Arrest der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus oder durch Ausdifferenzierung der Zelle zu einem völligen Verlust der Proliferationsfähigkeit kommen. Ein gut untersuchtes Beispiel für ein Proliferations-inhibierendes Molekül ist das Retinoblastomprotein (Rb). Hypophosphoryliertes Rb blockiert die Zellproliferation durch Veränderung der Funktion des E2F Transkriptionsfaktors, der eine Reihe von Genen kontrolliert, die den Übergang von der G₁- in die S-Phase ermöglichen (Weinberg, 1995). Der lösliche anti-proliferatorische Faktor TGF- β („transforming growth factor receptor- β “) verhindert eine weitere Phosphorylierung von Rb und somit dessen Inaktivierung (Hannon und Beach, 1994; Datto et al., 1997). In Tumoren kann die Anzahl der TGF- β Rezeptoren verringert sein, oder es werden mutierte, funktionell inaktive Rezeptoren exprimiert (Fynan und Reiss, 1993; Markowitz et al., 1995). Des Weiteren kann eine Überexpression des Proto-Onkogens *c-myc*, wie sie in vielen Tumoren beobachtet wird, zu einer negativen Beeinflussung der Zelldifferenzierung und zur Promotion des Zellwachstums führen (Kinzler und Vogelstein, 1996).

1.1.3 Resistenz der Zelle gegenüber kontrolliertem Zelltod (Apoptose)

Tumorzellexpansion wird nicht nur durch eine erhöhte Proliferationsrate erreicht, sondern auch indirekt aufgrund einer geringen Absterberate durch kontrollierten Zelltod (Apoptose) gefördert. Das apoptotische Programm verläuft, einmal angeschaltet, in einer präzisen Abfolge. Dabei werden sukzessive die Zellmembran sowie das Zytoskelett aufgelöst, der Nukleus fragmentiert und die Chromosomen abgebaut (Wyllie et al., 1980). J. Dhein und Mitarbeiter demonstrierten, dass die Aktivierung von FAS (CD95), einem Oberflächenrezeptor, durch

Ligandenbindung zur Ausbildung von Homotrimeren dieses Rezeptors führt (Dhein et al., 1992). Dadurch kommt es zur Anlagerung von Adapterproteinen wie FADD („FAS associated protein with death domain“) an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors, die sogenannte „death domain“ (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995). FADD vermittelt dann die Bindung von Caspasen an diesen Proteinkomplex, auch bezeichnet als DISC („death inducing signaling complex“), die schließlich zum Ablauf des apoptotischen Programms führen (Chinnaiyan et al., 1996; Medema et al., 1997).

Außerdem führen viele pro-apoptotische Signale zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien - einem potenten Katalysator der Apoptose (Green und Reed, 1998). Einige Mitglieder der Bcl-2 Protein-Familie besitzen pro-apoptotische, während andere anti-apoptotische Eigenschaften besitzen. Diese Proteine sind in der Lage, stimulierend (z. B. Bax) oder hemmend (z. B. Bcl-2) auf die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zu wirken.

Durch gesteigerte Onkogenexpression kann ebenfalls Apoptose induziert werden, und so scheint Apoptose das Hauptwerkzeug des Körpers zu sein, mutierte Zellen mit erhöhter Onkogenexpression zu eliminieren. Durch eine Reihe von Strategien können Tumorzellen jedoch Apoptoseresistenz erwerben. Am häufigsten wird der Verlust des pro-apoptotischen Regulators p53 beobachtet, der durch Mutation in mehr als 50% der Tumoren inaktiviert ist. Dies führt zum Ausfall einer Schlüsselkomponente des sensorischen Mechanismus zur Erkennung von DNA-Schäden, wodurch die Induktion der apoptotischen Effektor-Kaskade gehemmt werden kann. (Harris, 1996). Viele Lungen- und Kolonkarzinome umgehen eine FAS-induzierte Apoptose durch Überexpression eines signalunfähigen Rezeptors (Pitti et al., 1998). Generell werden in nahezu allen Tumoren Veränderungen gefunden, die eine Apoptoseresistenz ermöglichen.

1.1.4 Unlimitiertes replikatives Potential der Zelle

Mit Ausnahme sogenannter Stammzellen besitzen alle nicht-transformierten Zellen des Organismus ein limitiertes Teilungspotential. Auch dieser Kontrollmechanismus entfällt bei malignen Tumoren. *In-vitro* Untersuchungen belegen ein endliches replikatives Potential bei kultivierten Zellen (Hayflick, 1997), wodurch es nach einer definierten Anzahl von Teilungen zum Wachstumsstopp (Seneszenz) kommt. Diese Seneszenz kann bei kultivierten humanen Fibroblasten durch Ausschalten der Tumorsuppressorgene *p53* und *Rb* umgangen werden, so dass sie nach weiteren Teilungen das Stadium der Wachstumskrise erreichen. Charakteristisch für dieses Stadium sind Fusionen von Chromosomenenden, massiver Zelltod und das seltene Auftreten spontan transformierter Zellen (etwa eine aus zehn Mio.), welche die

Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung erworben haben. Dieser Prozess wird als Immortalisierung bezeichnet (Wright et al., 1989). C. M. Counter und Kollegen konnten zeigen, dass eine Limitierung der Zellteilungen in somatischen Zellen durch sechs Basenpaar lange, repetitive Segmente an den terminalen Regionen von Chromosomen, den sogenannten Telomeren, erfolgt. Da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, die 3'-Bereiche chromosomaler DNA während der S-Phase zu replizieren, werden die Telomere bei jeder Teilung um 50-100 bp verkürzt, wodurch es letztlich zur Wachstumskrise und zum Zelltod kommt (Counter et al., 1992).

Für das maligne Wachstum von Tumoren ist es daher unerlässlich, dass sich die Zellen *in vivo* die Fähigkeit zur unlimitierten Vermehrung aneignen, wie es bei einer spontanen Transformation *in vitro* der Fall ist (Wright et al., 1989; Hayflick, 1997). Malignen Zellen gelingt es jedoch die Länge ihrer Telomere aufrecht zu erhalten (Shay und Bacchetti, 1997). Dies erfolgt meist durch Aktivierung der Telomerase, die das Anhängen solcher sechser Wiederholungen an die terminalen Chromosomenbereiche katalysiert (Bryan und Cech, 1999). T. M. Bryan und Mitarbeitern gelang der Nachweis, dass auch durch zwischenchromosomale Rekombination manche Tumorzellen die Telomerlänge über einem Schwellenwert halten können (Bryan et al., 1995) und so zum unlimitierten Wachstum der Krebszellen beitragen.

D. Hanahan und R. A. Weinberg geben allerdings zu bedenken, dass die beschriebene Seneszenz ausschließlich ein Artefakt kultivierter Zellen darstellen könnte und somit kein Hindernis für Tumorprogression *in vivo* bedeutete (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.5 Unterstützende Gefäßneubildung (Neoangiogenese) des Tumors

Um alle Zellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, wird während der Organogenese ein sehr feines Kapillarnetz angelegt. Das Auswachsen bereits vorhandener Blutgefäße im Gewebe (Angiogenese) ist ein äußerst exakt regulierter Prozess. Um über eine minimale Größe hinaus zu wachsen, müssen Tumore die Fähigkeit erwerben, Angiogenese zu unterstützen (Bouck et al., 1996; Hanahan und Folkman, 1996; Folkman, 1997). Die Angiogenese wird durch eine Vielzahl positiv sowie negativ regulierender Signale im Gleichgewicht gehalten. Bislang sind etwa 20 Inhibitoren und genauso viele Induktoren bekannt. Zur Klasse der Induktoren gehören u. a. lösliche Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, wie beispielsweise der VEGF („vascular endothelial growth factor“) und der bFGF („basic fibroblast growth factor“), die beide an Rezeptor-Tyrosinkinasen auf endothelialen Zellen binden (Fedi et al., 1997; Veikkola und Alitalo, 1999). Auch die Signalübertragung durch Integrine spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. So exprimieren ruhende Gefäße ein

anderes Repertoire an Integrinen als sprießende Kapillaren (Varner und Cheresch, 1996; Giancotti und Ruoslahti, 1999). In dieser Weise wird das invasive Potential von endothelialen Zellen durch extrazelluläre Proteasen, die funktionell und physikalisch an Integrine gebunden sein können, diktiert (Stetler-Stevenson, 1999).

Die absolute Notwendigkeit der Neoangiogenese für das explosionsartige Wachstum von Tumoren wurde bereits vor über 30 Jahren postuliert (Folkman, 1997). In vielen Tumoren scheint die Angiogenese in einem frühen bis mittleren Stadium durch einen Schalter aktiviert zu werden. Dieser Schalter wird entweder durch ein Ungleichgewicht zwischen Induktoren und Inhibitoren (Hanahan und Folkman, 1996) oder durch veränderte Genexpression umgelegt (Singh et al., 1995; Volpert et al., 1997). K. M. Dameron und Kollegen konnten demonstrieren, dass in Tumorzellen der Verlust von p53 zum Absenken der Thrombospondin-1 Konzentration, einem Angiogenesehemmer, führen kann (Dameron et al., 1994). Manche Tumorzellen sind alternativ in der Lage, durch aktiviertes *ras* Onkogen vermehrt VEGF zu synthetisieren (Rak et al., 1995; Maxwell et al., 1999).

1.1.6 Gewebsinvasion und Metastasierung

Die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung ermöglicht es Krebszellen, sich aus dem Verband der Primärtumorzellen zu lösen und sich in entfernten Organen, in denen Platz und Nährstoffe zunächst nicht begrenzt sind, anzusiedeln. Invasive, metastasierende Zellen zeigen Veränderungen in einigen Molekülklassen, welche für die Fixierung der Zellen in ihrer Umgebung verantwortlich sind. Darunter sind Zell-Zell Adhäsionsmoleküle sowie Integrine, die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden (Aplin et al., 1998).

Einen weiteren wesentlichen Parameter stellen extrazelluläre Proteasen dar (Coussens und Werb, 1996; Chambers und Matrisian, 1997). Proteasen, die in der Lage sind, Bestandteile der EZM zu degradieren, werden über Transmembrandomänen, durch Bindung an spezifische Rezeptoren oder über die Assoziation mit Integrinen an der Zelloberfläche fixiert (Werb, 1997; Stetler-Stevenson, 1999). Dies erlaubt die Invasion von Krebszellen ins Stroma. Es ist allerdings nicht erforderlich, dass die Tumorzelle diese Proteasen selbst exprimiert (Werb, 1997), vielmehr kann sie sezernierte Proteasen der umgebenden Zellen nutzen.

Die Aktivierung und Rekrutierung extrazellulärer Proteasen sowie die veränderte Bindungskapazität von Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsproteinen stellen zentrale Prozesse bei frühen Schritten der Invasion und Metastasierung dar (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Fernregulation ist jedoch noch weitgehend ungeklärt und variiert vermutlich mit dem histologischen Ursprung eines Tumors. Besonders Untersuchungen zur Kommunikation dieser Oberflächenproteine untereinander sowie ihrer daraus resultierenden funktionellen

Aktivität in verschiedenen Zelllinien bzw. Geweben vor und nach Erwerb des tumorfördernden und metastatischen Potentials, scheinen viel versprechend.

1.2 Einfluss von Oberflächenmolekülen auf Tumorprogression und Metastasierung

Die Ausbildung von Tochtergeschwülsten in anderen Organen (Metastasen), machen etwa 90% der tumorbedingten Todesfälle aus (Sporn, 1996). Daher erscheint es sinnvoll, diejenigen Moleküle und Prozesse eingehender zu untersuchen, welche für die Dissemination einzelner Zellen vom Primärtumor verantwortlich sind. Der Kern des metastatischen Prozesses liegt in der Veränderung der Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen, durch welche die Interaktionen mit extrazellulärer Matrix und benachbarten Zellen reguliert wird. Die Mehrheit der Zelladhäsionsmoleküle („cell adhesion molecules“, abgekürzt CAMs) kann in vier Genfamilien zusammengefasst werden, den Selektinen, den Integrinen, der Immunglobulin Super-Familie und den Cadherinen (Bogenrieder und Herlyn, 2003). Für zahlreiche Mitglieder dieser vier Familien konnte eine Beteiligung bei der Ausbreitung maligner Tumore nachgewiesen werden (Johnson, 1999; Cavallaro und Christofori, 2001; Hsu et al., 2002). Außerdem spielen weitere Adhäsionsmoleküle eine Rolle, die keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden können. Zu ihnen gehören u. a. der Hyaluronsäure-bindende Oberflächenrezeptor CD44 (Ponta et al., 2003; Marhaba und Zoller, 2004), die Adhäsionsmolekülfamilie der Claudine sowie das homotypische Zell-Zell Adhäsionsprotein EpCAM.

Manche Krebszellen sind in der Lage, sich einer pathophysiologischen Situation anzupassen, indem sie die Expression von Integrinen, die für die Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind (Eliceiri, 2001; Hynes, 2002), ändern. So können vermehrt solche Integrine exprimiert werden, die pro-mitotische Signale in die Zelle übertragen (Giancotti und Ruoslahti, 1999; Lukashev und Werb, 1998). Die nach Integrin-Substratbindung in die Zelle vermittelten Signale können gerichtete Migration, Apoptoseresistenz oder den Eintritt in den Zellzyklus initiieren (Aplin et al., 1998; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Typische Beispiele sind die Assoziation der Integrine $\alpha 6\beta 4$ und $\alpha 6\beta 1$ mit dem Mitglied der EGFR-Familie ErbB2 (Falcioni et al., 1997), wodurch Zellproliferation und Invasivität stimuliert werden (Gambaletta et al., 2000).

Mitglieder der Immunglobulin Super-Familie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression. So kommt es bei Wilm's Tumoren, Neuroblastomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen zu einer Änderung in der Expression von NCAM („neural cell adhesion molecule“) von einer hoch-adhäsiven zu einer niedrig-adhäsiven Isoform (Johnson, 1991; Kaiser et al., 1996; Cavallaro und Christofori, 2001). Eine Korrelation zwischen einer redu-

zierten NCAM Expression und einer schlechten Prognose wurde für mehrere Krebstypen beschrieben (Fogar et al., 1997; Roesler et al., 1997; Tezel et al., 2001). Zu dem ist NCAM in der Lage, FGFRs („fibroblast growth factor receptors“) zu stimulieren und somit eine Signaltransduktionskaskade zu induzieren, welche Zell-Matrix Adhäsion und dadurch Zellmigration und Invasion positiv beeinflussen könnte (Cavallaro und Christofori, 2001).

Das Zell-Matrix Adhäsionsprotein CD44 weist oft eine erhöhte Expression in Tumorzellen auf (Ponta et al., 2003). Durch seine Fähigkeiten Zellproliferation, Matrix-Degradierung, Migration und Adhäsion in Verbindung mit assoziierten Molekülen aktiv zu beeinflussen, scheint dieses Transmembranprotein eine kritische Rolle bei Tumorprogression und Metastasierung zu spielen (Schmidt et al., 2004; Marhaba und Zoller, 2004). So konnten P. Herrlich und Mitarbeiter sowie H. Ponta und Kollegen demonstrieren, dass die v6 Isoform von CD44 in der Lage ist, die Formierung von Metastasen in Tiermodellen *in vivo* und das invasive Potential von Tumorzellen *in vitro* zu verändern (Gunthert et al., 1991; Herrlich et al. 1998; Ponta et al., 1998).

Das zur Familie der Cadherine gehörende Transmembranprotein E-Cadherin ist das bisher am besten untersuchte Zell-Zell Adhäsionsmolekül (Gumbiner et al., 2000). E-Cadherin ist für Ca^{2+} -abhängige, homophile Zell-Zell Interaktionen verantwortlich und ubiquitär auf epithelialen Zellen exprimiert (Takeichi, 1995). E-Cadherin wirkt auf vielfache Weise negativ auf das invasive und metastatische Potential von epithelialen Zellen, so dass die funktionelle Inaktivierung von E-Cadherin als Schlüsselprozess beim Erwerb dieser Eigenschaften gilt. In vielen epithelialen Krebsarten ist diese E-Cadherin Funktion durch Mutation, transkriptionelle Repression, proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne oder veränderte Proteininteraktionen gestört (Christofori und Semb, 1999). Der Verlust oder die Reduktion der E-Cadherin Expression korreliert mit verstärkter Aggressivität und Dedifferenzierung in den meisten Karzinomen und wirkt als prognostischer Indikator (Beavon, 2000). Intrazellulär ist E-Cadherin über seinen zytoplasmatischen Schwanz mit α - und β -Catenin assoziiert, welche die Bindung an das Aktin-Zytoskelett vermitteln. Veränderungen der in den E-Cadherin/Catenin-Komplex involvierten Proteine sind frühe Anzeichen einer Krebsentwicklung (Jiang 1996). Mehreren Arbeitsgruppen gelang der Nachweis, dass die Rekonstitution eines funktionsfähigen E-Cadherin Adhäsionskomplexes den invasiven Phänotyp vieler verschiedener Tumorzelltypen unterdrückt (Vleminckx et al., 1991; Luo et al., 1999; Hsu et al., 2000). Es wird sogar angenommen, dass der Verlust der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell Adhäsion als Voraussetzung für die Gewebsinvasion von Tumorzellen und die Formierung von Metastasen gilt (Birchmeier und Behrens, 1994). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wird E-Cadherin auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet (Perl et al., 1998). Nach einer Reduzierung der E-Cadherin Synthese konnte in manchen Tumorzellen eine *de novo* Expression von N-Cadherin beobachtet werden (Li und Herlyn, 2000; Tomita et

al., 2000). Dieser so genannte „cadherin switch“ induziert Zellmigration und erzielt damit einen gegenteiligen Effekt zur Funktion von E-Cadherin (Islam et al., 1996; Tran et al., 1999; Hazan et al., 2000; Li et al., 2001). Dieser Befund deutet darauf hin, dass eine Verlagerung der Expression vom pro-adhäsiven E-Cadherin hin zum pro-migratorischen N-Cadherin Tumorprogression und Metastasierung fördert (Li und Herlyn, 2000).

Die über 20 Mitglieder der Claudin-Familie mit einer molekularen Masse zwischen 20 und 27 kDa bilden das Rückrat von Zell-Zell Adhäsionsstrukturen, die als „tight junctions“ bezeichnet werden (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Aufgrund der herausragenden Funktion von „TJs“ für die Aufrechterhaltung der Polarität und die Kontrolle der parazellulären Permeabilität in Epithelgeweben sind sie auch für die Erforschung der Tumorprogression und Metastasierung von Karzinomen von besonderer Bedeutung (Mori et al., 1999; Sawada et al., 2003). „TJs“ sind an der Grenze zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran polarisierter Zelltypen lokalisiert und besitzen im wesentlichen zwei Aufgaben: (1.) Die Kontrolle des parazellulären Flusses von Ionen, Wasser und Makromolekülen durch das Öffnen und Schließen molekularer Poren und (2.) eine „Barrierenfunktion“ für die Erhaltung der unterschiedlichen Lipid- sowie Protein-Zusammensetzung der basolateralen bzw. apikalen Domäne der Plasmamembran (Farquhar et al., 1963; Claude, 1978; Cereijido et al., 1989; Schneeberger et al., 1992; Gumbiner et al., 1993; Tsukita et al., 2001). Deregulierung der Permeabilität sowie der Integrität der „TJs“ sind bisher in diversen Karzinomtypen beobachtet worden. Innerhalb der Gruppe zahlreicher „TJ“-Proteine sind es vor allem die Claudine, für welche eine fördernde Wirkung hinsichtlich der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren beschrieben worden ist (Mori et al., 1999; Sawada et al., 2003). Claudine sind integrale Membranproteine mit vier Transmembrandomänen und werden daher als Tetraspane bezeichnet. Kennzeichnend sind die beiden extrazellulären Schleifen, welche an homotypischer sowie heterotypischer Adhäsion von Claudin Molekülen beteiligt sind. Der relativ kurze C-terminale, zytoplasmatische Schwanz beinhaltet mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen und ein PDZ-Bindungsmotiv (benannt nach den Proteinen PSD-95, Disc-large A und ZO-1), durch welche die Tetraspane z. B. über ZO-1 („zonula occludens-1“) mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (Kornau et al., 1995; Furuse et al., 1999; Itoh et al., 1999; Itoh et al., 2001; Mitic et al., 2000; Tsukita et al., 2001; Hamazaki et al., 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass Claudin-1 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese sowie bei der Invasion und Metastasierung von Brust-, Pankreas- sowie Kolonkrebs spielt (Miwa et al., 2000; Tan et al., 2004; Tokes et al., 2005; Dhawan et al., 2005). Außerdem konnte eine Beteiligung von Claudin-1 an dem bereits erwähnten Wnt-Signaltransduktionsweg, der mit der Entwicklung von Tumoren in Zusammenhang gebracht wird, ermittelt werden (Miwa et al., 2000; Huelsken und Behrens, 2002; Korswagen et al., 2000). H. Miyamori und Kollegen konnten zeigen, dass Claudin-1 sowie die Claudine 2, 3 und 5 die Aktivierung der pro-Matrix Metallo-

proteinase-2 (pro-MMP-2) über die Membran-Typ Matrix Metalloproteinasen (MT-MMP) vermitteln können (Miyamori et al., 2001). MMP-2 ist eine Typ IV Kollagenase und als solche in der Lage, Kollagen IV, einen Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix, als Substrat zu verwenden (Liotta et al., 1977; Liotta et al., 1980; Salo et al., 1982). Häufig werden größere Mengen an MMP in malignen Tumoren und deren unmittelbarer Umgebung detektiert als in normalem, gutartigem oder prä malignem Gewebe. Die höchste Konzentration wird dabei im Bereich aktiver Invasion an der Tumor/Stroma Grenze gefunden (Sternlicht und Bergers, 2000). Studien über die Expression von Claudin-3 und Claudin-4 in malignen Ovarialkarzinomen zeigen eine hohe Expression in Tumorgeweben bei fehlender Expression in normalem Ovarialgewebe (Hough et al., 2000; Rangel et al., 2003; Heinzelmann-Schwarz et al., 2004). Die Autoren einer weiteren Publikation beschreiben eine deutliche Überexpression von Claudin-4 in immunhistochemisch untersuchten primären und metastatischen Pankreasadenokarzinomen im Gegensatz zu normalen Gewebeproben (Nichols et al., 2004).

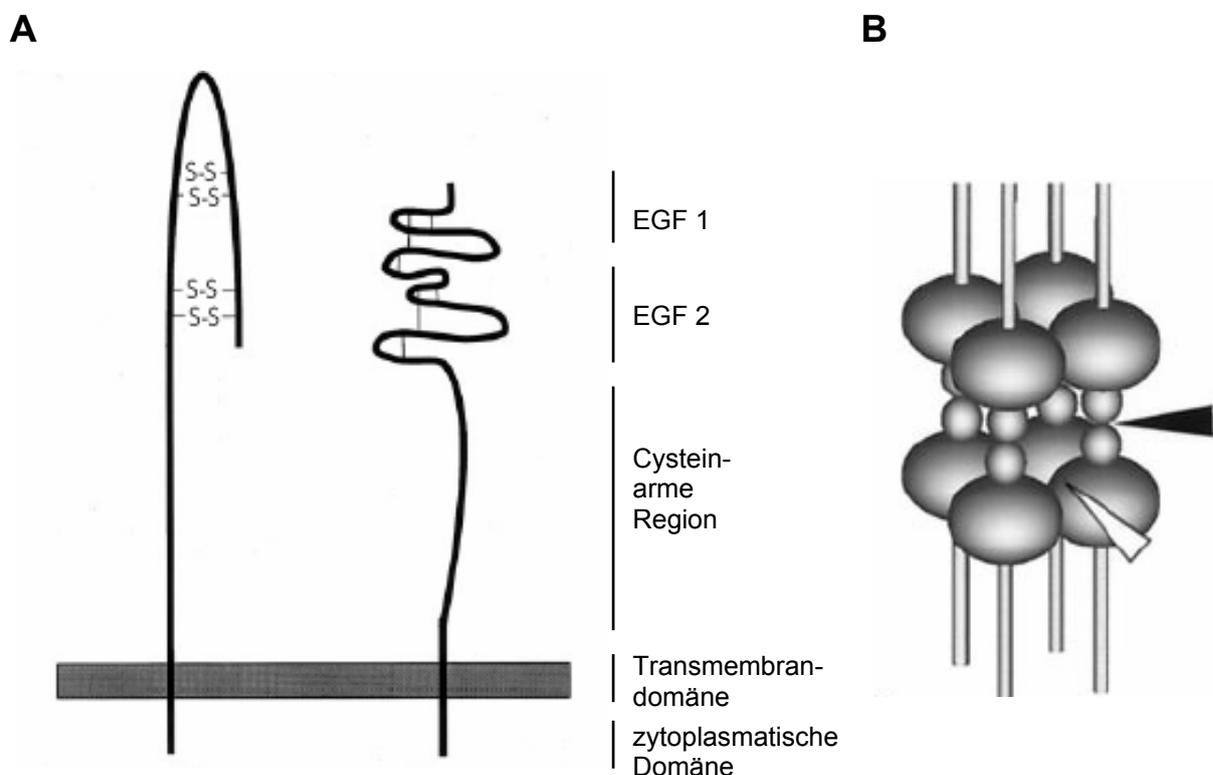
Ein weiteres Oberflächenmolekül, welches mit der Entwicklung und Ausbreitung von Karzinomen in Zusammenhang gebracht wird, ist das homotypische Zell-Zell Adhäsionsprotein EpCAM. Aufgrund seiner zentralen Bedeutung für den Inhalt der vorliegenden Arbeit wird EpCAM im folgenden Abschnitt separat beschrieben.

1.3 Das epitheliale Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM

1.3.1 Molekulare Struktur und Funktion

EpCAM („epithelial cell adhesion molecule“) ist ein Ca^{2+} -unabhängiges, homotypisches Zell-Zell Adhäsionsmolekül und in nahezu allen Epithelgeweben exprimiert (Moldenhauer et al., 1987; Momburg et al., 1987; Litvinov et al., 1994a, b; Litvinov et al., 1995; Cirulli et al., 1998; Balzar et al., 1999a). Die von EpCAM vermittelte Adhäsion ist jedoch relativ schwach im Vergleich zu der anderer Adhäsionsmoleküle, wie z. B. der klassischer Cadherine (Litvinov et al., 1994b). Das Typ 1 Transmembranprotein ist strukturell keiner der vier Hauptgruppen von Zelladhäsionsmolekülen, den Cadherinen, den Integrinen, der Immunglobulin-Super-Familie oder den Selektinen, zuzuordnen (Litvinov et al., 1995; Horwitz und Hunter, 1996; Aplin et al., 1998). Seine Aminosäuresequenz zeichnet sich durch eine hohe evolutionäre Konservierung aus und weist eine Homologie von 82% zwischen der humanen und der murinen Aminosäureabfolge auf (Bergsagel et al., 1992). Außerdem konnten eng mit EpCAM verwandte Sequenzen in Genomen aller Säugetiere und Vögel identifiziert werden (Linnenbach et al., 1993), was für eine wichtige funktionelle Bedeutung dieses Moleküls spricht.

Der extrazelluläre Abschnitt von EpCAM kann in zwei EGF („epidermal growth factor“-ähnliche Domänen (EGF-1 bzw. -2, AS 27-135) und eine Cystein-arme Region (CAR, AS 136-266) unterteilt werden (vgl. Abb. 1.1 A). Auf den extrazellulären Abschnitt folgt die Transmembrandomäne (TMD, AS 267-289) und eine relativ kurze, zytoplasmatische Sequenz (ZPD, AS 290-315). M. Balzar und Kollegen postulieren, dass ein Tetramer aus EpCAM Molekülen mit einem EpCAM-Tetramer einer angrenzenden Epithelzelle eine Verbindung eingeht (vgl. Abb. 1.1 B). Die Bildung des Tetramers sowie die interzelluläre Assoziation von EpCAM Proteinen wird laut der Autoren über die beiden EGF-Domänen vermittelt. Dabei ist die EGF-2 Domäne für die laterale Interaktion von vier EpCAM Molekülen auf einer Zelloberfläche verantwortlich, während die EGF-1 Domäne die interzelluläre Bindung zwischen Tetrameren zweier benachbarter Zellen reguliert (Balzar et al., 2001). Die Existenz von EpCAM-Tetrameren konnte auch von M. Trebak und Kollegen demonstriert werden (Trebak et al., 2001). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass EpCAM innerhalb der EGF-2 Domäne N-glykosyliert ist, wobei O-Glykosylierungen des Adhäsionsproteins ausgeschlossen werden konnten (Thampoe et al., 1988; Chong und Speicher, 2001). Einer potentiellen proteolytischen Schnittstelle in der Nähe des N-Terminus am Arginin 80 (Arg⁸⁰) (Szala et al., 1990; Bjork et al., 1993) wurde eine potentielle konformationsregulierende Funktion zugeordnet (Schon et al., 1994; Wurfel et al., 1999). In Abbildung 1.1 sind EpCAM sowie EpCAM-Tetramere schematisch dargestellt:



Nach Schon et al., 1993

Nach Balzar et al., 1999a, b

Abb. 1.1: EpCAM-Struktur und homotypische Bindungsstellen. A) Schematische Darstellung zweier EpCAM Modelle. Das erste Modell zeigt eine noch schleifenförmige Struktur des Transmembranproteins (Schon et al., 1993), während das von Balzar und Kollegen postulierte Modell den extrazellulären Aminosäureabschnitt in zwei EGF („epidermal growth factor“-)ähnliche Domänen (EGF-1 und -2, AS 27-135) und eine Cystein-arme Region (CAR, AS 136-266) einteilt (verändert nach Balzar et al., 1999a, b). Es folgen die Transmembrandomäne (TMD, AS 267-289) und ein kurzer zytoplasmatischer Schwanz (ZPD, AS 290-315). **B)** Abgebildet sind zwei interagierende EpCAM-Tetramere gegenüberliegender Zellmembranen. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die interzelluläre Assoziation vermittelt über die EGF-1 Domäne. Für die laterale Interaktion zur Formierung von Tetrameren auf einer Zelloberfläche ist laut M. Balzar und Mitarbeiter die EGF-2 Domäne (weißer Pfeil) verantwortlich (Balzar et al., 2001).

Außer den funktionell aktiven EGF-Domänen konnten M. Balzar und Mitarbeiter im zytoplasmatischen Schwanz von EpCAM zwei Bindungsstellen für α -Aktinin identifizieren. Beide Bindungsstellen sind für die Assoziation von EpCAM mit dem Aktin-Zytoskelett über α -Aktinin von Bedeutung. Wird der zytoplasmatische Teil deletiert, steht das verkürzte Transmembranprotein nicht mehr in Kontakt mit Mikrofilamenten, wodurch seine Fähigkeit zur Formierung stabiler Zell-Zell Adhäsionen gestört wird (Balzar et al., 1998).

EpCAM konnte trotz seiner homophilen Adhäsionseigenschaft keiner der typischen Adhäsionsstrukturen einer polarisierten Epithelzelle eindeutig zugeordnet werden. Das Transmembranprotein ist über die komplette basolaterale Membrandomäne verteilt, ohne dabei in den „tight junctions“, den „adherens junctions“ oder den Desmosomen bzw. Hemidesmosomen angereichert zu sein. Eine Aussage hinsichtlich funktioneller Aufgaben aufgrund einer bestimmten Membranlokalisation ist deshalb nicht möglich (Momburg et al., 1987; Balzar et al., 1999a, b; Winter et al., 2003b; Joo et al., 2005; Ladwein et al., 2005).

Die Aufklärung der funktionellen Relevanz des Transmembranproteins im Hinblick auf die Organisation und Regulation von Epithelgeweben ist bisher nur teilweise gelungen. So wird EpCAM in einer Reihe von Studien eine wichtige Rolle sowohl in der humanen als auch der murinen Embryogenese zugeschrieben. Eine Expression von EpCAM konnte in fötalen Lungen-, Nieren-, Leber-, Pankreas-, Haut- und Keimzellen beobachtet werden (Schiechl und Dohr, 1987; Tarmann et al., 1990; Kasper et al., 1995; Cirulli et al., 1995; Cirulli et al., 1998; Anderson et al., 1999). Epithelzellen der Lunge sind auch beim Erwachsenen EpCAM positiv, während Hepatozyten ihre EpCAM Expression in der Erwachsenenleber verlieren (Kasper et al., 1995; De Boer et al., 1999). N. M. Varki und Kollegen konnten ebenfalls nachweisen, dass EpCAM in fötalem Gewebe eine deutlich stärkere Immunreaktivität aufweist als in Epithelgeweben erwachsener Individuen (Varki et al., 1984). Eine weitere Arbeitsgruppe berichtet von einem Zusammenhang zwischen der Expression des homotypischen Adhäsionsmoleküls und der Entwicklung des humanen Pankreas (Cirulli et al., 1998). Die Auto-

ren beschreiben eine erhöhte EpCAM Expression während der fötalen Entwicklung der Inselzellen. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion der EpCAM Expression während der endokrinen Differenzierung unreifer, fötaler Pankreasepithelzellen beobachtet werden. Außerdem bewirkt die Inkubation von Pankreasepithelzellen mit EpCAM-spezifischen Antikörpern eine endokrine Differenzierung dieser Zellen, was durch eine erhöhte Glucagon- sowie Insulinproduktion der untersuchten Zellen bestätigt wurde. V. Cirulli und Mitarbeiter schließen aus diesen Befunden, dass EpCAM morphoregulatorische Funktionen während der Entwicklung des Pankreas besitzt. Zu dem stellte V. Cirulli fest, dass die Zellen, welche eine hohe EpCAM Expression aufweisen, eine deutlich höhere Proliferationsrate gegenüber Zellen mit geringer bzw. fehlender EpCAM Expression zeigen (Cirulli et al., 1998). Diese Beobachtung konnte auch von der Arbeitsgruppe um M. P. Schön bestätigt werden. Sie konnte belegen, dass die Expression von EpCAM direkt mit der Proliferation einer transformierten Keratinozytenlinie korreliert (Schön et al., 1994). Laut M. Balzar ergibt sich aus den beschriebenen Beobachtungen ein klarer Zusammenhang zwischen EpCAM und Signalkaskaden, die zur Regulation von Zellproliferation und -differenzierung beitragen (Balzar et al., 1999a).

Mehrere Arbeiten von S. V. Litvinov und Mitarbeitern zeigen, dass die ektopische Expression von EpCAM in Mausfibroblasten, welche natürlicherweise keine Zell-Zell Adhäsion aufweisen, die Entstehung von Zellaggregaten und das Verhindern von Zellstreuung vermitteln kann (Litvinov et al., 1994a, b; Litvinov et al., 1997). Daher müsste EpCAM, basierend auf seinen Adhäsionseigenschaften, eine eher inhibierende Wirkung auf Prozesse wie Tumorprogression und Metastasierung ausüben. Eine Reihe von Expressionsstudien sowie molekularbiologischer und biochemischer Analysen demonstrieren jedoch das Gegenteil und offenbaren eine grundlegende Bedeutung von EpCAM für die Entwicklung und Ausbreitung von Karzinomen.

1.3.2 EpCAM bei Tumorprogression und Metastasierung

EpCAM wurde 1979 als Kolorektalkarzinom-spezifisches Antigen zum ersten Mal beschrieben (Herlyn et al., 1979; Koprowski et al., 1979). Durch ausgedehnte Expressionsstudien konnte festgestellt werden, dass EpCAM in vielen Karzinomtypen überexprimiert ist. Besonders die Arbeitsgruppe um G. J. Hämmerling lieferte einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der gewebsspezifischen Expression von EpCAM, indem sie ein breites Spektrum von Epithelgeweben, aber auch von Binde-, Nerven- und Muskelgeweben sowie hämatopoetische Zellen einschließlich der Elemente des Immunsystems analysierten. Zu dem wurde eine große Anzahl von Tumoren unterschiedlichster Histologie untersucht (Momburg et al.,

1987; Moldenhauer et al., 1987). Dabei konnte EpCAM nur in normalen Epithelgeweben und Karzinomen detektiert werden. Es ist hervorzuheben, dass z. B. hepatozelluläre Karzinome EpCAM offensichtlich *de novo* exprimieren, während in normalen Hepatozyten, wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt, kein EpCAM nachgewiesen werden kann (Momburg et al., 1987).

In einem von M. Winter und Kollegen verfassten Bericht sind alle bis zum Ende des Jahres 2003 erstellten relevanten Expressionsstudien hinsichtlich des homotypischen Adhäsionsmoleküls zusammengefasst (Winter et al., 2003b). Aus der Analyse einer Fülle von immunzytochemisch bzw. immunhistochemisch generierten Daten von Zelllinien, Normalgeweben sowie tumorbefallenen Geweben aller Art ergaben sich folgende Hauptaussagen: (1.) EpCAM kann in Membranen proliferierender Zellen des Kolons, des Pankreas, der Brustdrüse, der Lunge und der regenerierenden Leber detektiert werden. (2.) Dagegen sind die Gewebe der normalen Leber, der Mundschleimhaut, der Magenschleimhaut, der Haut und des Gebärmutterhalses EpCAM-negativ. (3.) In allen Geweben, die eine konstitutive EpCAM Expression aufweisen, ist eine erhöhte Expression des Transmembranproteins in neoplastischen sowie dysplastischen Gewebebildungen zu beobachten. Außerdem kann es bei der Entstehung von Karzinomen aus EpCAM-negativen Epithelgeweben zur *de novo* Synthese des Transmembranproteins kommen. Die Autoren dieses Artikels postulieren, dass eine erhöhte Expression sowie eine *de novo* Expression von EpCAM ein früher Schritt in der malignen Transformation epithelialer Gewebe darstellt (zusammengefasst in Winter et al., 2003b). Weitere Studien, welche nach Erscheinen dieser Publikation durchgeführt wurden, unterstützen und bekräftigen die bisher gewonnenen Erkenntnisse (Spizzo et al., 2004; Heinzelmann-Schwarz et al., 2004; Joo et al., 2005).

Im Hinblick auf die metastasierungsfördernden Eigenschaften von EpCAM sind die Beobachtungen jedoch nicht so eindeutig. M. Winter und Kollegen verweisen darauf, dass sowohl Publikationen existieren, die für eine verstärkte Präsentation des Adhäsionsmoleküls auf der Oberfläche disseminierter Karzinomzellen (Momburg et al., 1987; Chaubal et al., 1999), als auch für eine reduzierte Expression von EpCAM in Metastasen sprechen (Takes et al., 2001; Winter et al., 2003a). Ein weiterer Bericht kommt durch Analysen der Anzahl der auf der Zelloberfläche präsentierten EpCAM Moleküle zu dem Schluss, dass sich vom Primärtumor abgelöste und bereits im Blutkreislauf zirkulierende Karzinomzellen etwa 10-fach weniger EpCAM Moleküle exprimieren als Zellen des Primärtumors (Rao et al., 2005). I. Songun und Kollegen können in einer breit angelegten Studie in Tumorgeweben von 300 Patienten mit Magenkrebs feststellen, dass der Verlust der EpCAM Expression besonders aggressive Tumore kennzeichnet. Die Autoren vermuten, dass dieser Befund in Zusammenhang mit der Promotion der Metastasierung von Magenkarzinomzellen stehen könnte (Songun et al., 2005).

Dass das Zell-Zell Adhäsionsmolekül eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Ausbreitung maligner, epithelialer Tumore spielt, steht aufgrund der bereits dargestellten Resultate außer Frage. Dennoch bleibt zu klären, durch welche molekularen Mechanismen EpCAM Einfluss auf diese Prozesse nimmt.

Zwei Veröffentlichungen von der Arbeitsgruppe um S. V. Litvinov liefern einige Hinweise, die zur Aufklärung beitragen könnten. Die Autoren postulieren, dass eine Überexpression von EpCAM die Zell-Zell Adhäsion klassischer Cadherine wie z. B. E-Cadherin (vgl. Abschnitt 1.2) außer Kraft setzt. Dabei wird die Gesamtmenge an zellulärem E-Cadherin jedoch nicht reduziert, sondern die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Aktin-Zytoskelett wird gestört. Die Autoren sprechen in diesem Fall von EpCAM als einem „anti“-Adhäsionsmolekül. Eine adhäsionsdefekte EpCAM-Mutante, welcher die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt, weist keine Aktivität hinsichtlich der Unterbrechung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell Adhäsion auf (Litvinov et al., 1997). Darüber hinaus konnten M. Winter und Kollegen zeigen, dass eine gesteigerte Expression von EpCAM die Verbindung zwischen dem über β -Catenin mit E-Cadherin assoziierten α -Catenin mit F-Aktin negativ beeinflusst. Der diesem Effekt zugrunde liegende molekulare Mechanismus konnte allerdings nicht entschlüsselt werden. Die Autoren schlagen vor herauszufinden, welche Moleküle an dem zellulären Kommunikationsweg zwischen EpCAM und E-Cadherin beteiligt sind (Winter et al., 2003a). Aufgrund der Cadherin-regulierenden Eigenschaften von EpCAM vermuten S. V. Litvinov und Mitarbeiter, dass EpCAM eine Rolle bei der Zellproliferation epithelialer Zellen und wahrscheinlich in der Tumorprogression spielen könnte (Litvinov et al., 1997). Diese Hypothese wird wiederum durch eine Reihe von Publikationen unterstützt, die eine Korrelation zwischen der Expression von EpCAM und einem proliferativen Phänotyp epithelialer Zellen bzw. der Entwicklung bösartiger Geschwülste und Formierung von Metastasen beobachten (Tandon et al., 1990; Tsubura et al., 1992; Zorzos et al., 1995; Litvinov et al., 1996; Takes et al., 1997; Wurfel et al., 1999).

Zwei weitere Studien verweisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression des Transmembranproteins und Tumorprogression. M. Münz und Kollegen berichten von einer verstärkten Induktion der Transkription sowie Proteinsynthese des Proto-Onkogens *c-myc* parallel zur *de novo* Expression von EpCAM u. a. in der humanen Karzinomzelllinie HEK293 und der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (Munz et al., 2004). Die Überexpression des Proto-Onkogens *c-myc* ist charakteristisch für eine Vielzahl von Karzinomtypen, wobei es in die Kontrolle des Zellzyklus, der Wachstumsregulation und der Zelldifferenzierung involviert ist (Amati et al., 1998; Dang, 1999; Dang et al., 1999; Pelengaris et al., 2002). Der Zellzyklus-regulierende Effekt von c-Myc besteht u. a. in der Initiierung der Transkription der Cycline A und E. Außerdem können die Autoren eine erhöhte Stoffwechselaktivität und Proliferation der EpCAM überexprimierenden Zellen nachweisen. Weiterhin wird

belegt, dass der zytoplasmatische Schwanz des Adhäsionsmoleküls für die beschriebenen Effekte, welche zur Tumorprogression beitragen können, verantwortlich ist (Munz et al., 2004). Obwohl sich die Datenlage in diesem Bericht nicht so eindeutig darstellt, wie sie von den Autoren diskutiert wird, ergeben sich daraus neue Perspektiven zur Erforschung krebsrelevanter Eigenschaften von EpCAM.

Die Resultate einer weiteren Arbeitsgruppe zeigen, dass eine reduzierte EpCAM Expression in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien mittels EpCAM-spezifischer siRNA („small interfering RNA“) die proliferative Kapazität sowie das invasive Potential dieser Zelllinien signifikant vermindert (Osta et al., 2004). Außerdem gelingt W. A. Osta und Mitarbeitern der Nachweis, dass nach der siRNA-Behandlung die Fraktion an zytoskelettverankerter E-Cadherin wieder ansteigt (siehe oben und vgl. Litvinov et al., 1997 und Winter et al., 2003a). Die Autoren sehen in diesem Vorgang die Hauptursache für die Verringerung der Zellproliferation und des invasiven Potentials in den mit EpCAM-spezifischer siRNA behandelten Mammakarzinomzellen. Zu dem konnte eine Reduzierung der im Zytoplasma lokalisierten Menge an β -Catenin nach EpCAM „gene silencing“ durch siRNA beobachtet werden (Osta et al., 2004). Diese Tatsache könnte sich auf den Wnt-Signaltransduktionsweg auswirken, in dem im Zytoplasma akkumuliertes β -Catenin eine zentrale Rolle spielt. Diese Signalkaskade führt zur Aktivierung der Expression zahlreicher Gene. Einige der resultierenden Genprodukte wie z. B. c-Myc, VEGF oder Cyclooxygenase 2 (COX 2) sind dafür bekannt, in die Entwicklung von Krebs involviert zu sein (Huelsen und Behrens, 2002; Korswagen et al., 2000).

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von EpCAM für Tumorprogression und Metastasierung verdeutlichen, dass eingehendere Analysen zum Verständnis des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus notwendig sind. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen könnten sich in Zukunft neue Therapieansätze für Krebspatienten entwickeln lassen.

1.3.3 Immuntherapie

EpCAM stellt aufgrund seiner Lokalisation an der Oberfläche von Karzinomzellen ein attraktives Ziel zur immuntherapeutischen Behandlung maligner Tumore dar. Der monoklonale Antikörper 17-1A (Herlyn et al., 1979; Koprowski et al., 1979) war einer der ersten EpCAM-spezifischen Antikörper, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wurden. Bei „Duke's C“ Kolorektalkarzinom-Patienten zeigte dieser Antikörper zwar keine Wirksamkeit gegenüber soliden Tumoren, dennoch konnte ein signifikant lebensverlängernder Effekt durch post-operative Behandlung der Patienten mit 17-1A nachgewiesen werden (Riethmüller et al., 1994; Gruber

et al., 1996; Riethmüller et al., 1998; Schwartzberg, 2001; White et al., 2001). In Deutschland wurde dieser Antikörper unter dem Namen Panorex[®] 1995 für klinische Routinebehandlungen zugelassen. Da es sich bei 17-1A um einen niedrig-affinen Antikörper handelt wurde versucht, durch Antikörper höherer Affinität bessere therapeutische Effekte zu erzielen. Die Studien mit den beiden hoch-affinen EpCAM-spezifischen Antikörpern GA733 und 323/A3 offenbarten jedoch Toxizitätsprobleme, da diese Antikörper auch gesundes, EpCAM-exprimierendes Epithelgewebe schädigten (Herlyn et al., 1991). Weitere viel versprechende Effekte konnten durch den Einsatz des anti-EpCAM Antikörpers MT201 in Bezug auf Darmkrebs, Eierstockkrebs und Brustkrebs *in vitro* sowie *in vivo* erzielt werden (Naundorf et al., 2002; Xiang et al., 2003; Prang et al., 2005). Außerdem konnten mehrere Arbeitsgruppen die hohe Wirksamkeit chimärer EpCAM/CD3 Antikörper, den sogenannten bispezifischen „single-chain“ Antikörpern, demonstrieren. Durch ihre Fähigkeit an EpCAM und den CD3-Rezeptor zytotoxischer T-Zellen gleichzeitig zu binden, sind sie in der Lage, zytotoxische T-Zellen an Stellen hoher EpCAM Expression zu konzentrieren. Die aktivierten zytotoxischen T-Zellen können somit spezifisch die malignen Tumorzellen eliminieren (Riesenberg et al., 2001; Wimberger et al., 2003; Ren-Heidenreich et al., 2004; Schmitt et al., 2004; Gronau et al., 2005; Heiss et al., 2005; Liljefors et al., 2005; Schlereth et al., 2005). Diese neue Art effektiver Antikörper muss ihre therapeutische Einsatzfähigkeit erst noch in klinischen Studien beweisen. Dennoch stellen sie eine innovative Behandlungsmöglichkeit für eine große Zahl an Krebspatienten in Aussicht.

1.4 Das BSp73 Tumorsystem

Der Beitrag der Oberflächenproteine bei Tumorprogression und Metastasierung wurde am Beispiel der Integrine, CAMs, CD44, Claudine und EpCAM gezeigt. Ein geeignetes System für solche Untersuchungen sind Zelllinien mit unterschiedlichem metastatischem Potential, aber gemeinsamer Abstammung von einer Parentallinie. Das BSp73 Tumorsystem stellt ein solches Modell dar. Die Parentallinie wurde dabei als stabile Zelllinie eines spontan aufgetretenen Adenokarzinoms (BSp73) des Pankreas einer BDX Ratte *in vitro* etabliert (Zoller et al., 1978). Nach mehreren aufeinanderfolgenden *in vivo* Passagen über subkutane Transplantation konnten Tumore mit unterschiedlichem metastatischem Potential etabliert werden. Diese Tumore waren wiederum Grundlage für die Etablierung *in vitro* kultivierbarer Zelllinien. Die als BSp73AS bezeichnete Sublinie verfügt über ein schwaches, die als BSp73ASML bezeichnete Schwesterlinie über ein sehr ausgeprägtes metastatisches Potential (Matzku et al., 1983). Nach Injektion in die Fußpfote von BDX-Ratten bilden BSp73AS Zellen lokale Tumoren und befallen, falls eine frühzeitige Entfernung des Primärtumors unterbleibt, die

dränierenden Lymphknoten. BSp73ASML bilden im Gegensatz dazu recht kleine Primärtumore, befallen aber die dränierenden Lymphknoten wesentlich früher und sind in der Lage, Lungenmetastasen zu bilden. Diese Fähigkeit zur Metastasierung behalten BSp73ASML Zellen auch nach mehreren *in vitro* Passagen. Die beobachteten Unterschiede bezüglich Morphologie, Wachstum, Adhärenz, Zytoskelettcharakteristika sowie die Expression bestimmter Proteasen werden nachfolgend aus den angegebenen Literaturstellen zusammengefasst (Matzku et al., 1983; Ben Ze'ev et al., 1986; Raz et al., 1986).

BSp73AS Zellen zeigen im Elektronenmikroskop eine epitheloide Morphologie und Spreiten unter Ausbildung einzelner langer Filopodien, während BSp73ASML als Sphäroide erscheinen, keinerlei Spreiten zeigen und von zahlreichen Mikrovilli übersät sind. Die Generationszeit *in vitro* liegt für BSp73AS bei 16 Stunden, für BSp73ASML bei 24 Stunden. Beide Zelllinien zeichnen sich durch eine Aneuploidie aus. Das Genom der BSp73AS Zellen besteht aus 47, das Genom der BSp73ASML Zellen aus 67 Chromosomen. Während BSp73AS eine gute bis sehr gute Bindungsfähigkeit an Laminin, Fibronectin und Kollagen des Typs II, III, IV und V sowie eine schwache Fähigkeit zur Bindung an Kollagen I besitzt, weist BSp73ASML eine wesentlich geringere Affinität zu diesen Substraten auf. Zytoskelett-Adaptoren membranständiger Proteine wie Vinculin, Talin und Vimentin sind auf BSp73AS Zellen deutlich nachweisbar, wohingegen sie auf BSp73ASML Zellen kaum vorhanden sind. Allerdings exprimiert BSp73ASML hohe Mengen der Proteasen Kathepsin B, Stromelysin und Plasminogenaktivator, die auf BSp73AS Zellen lediglich schwach nachweisbar sind. Mittlerweile wurden mehrere hundert Proteine, die auf beiden Sublinien differentiell exprimiert werden, durch DNA-CHIP Technologie gefunden (Nestl et al., 2001; Tarbe et al., 2002).

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle sollte einen ersten Schritt bei der Suche nach metastasierungsassoziierten Antigenen darstellen. Die Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Tumorzellmembranen lieferte nach Selektion Antikörper gegen fünf Antigene, die auf BSp73ASML hoch, auf BSp73AS dagegen nicht exprimiert werden (Matzku et al., 1989). Mit Hilfe dieser mAk wurden die entsprechenden Antigene identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Molekül mit Ähnlichkeit zum uPAR, C4.4A (Rosel et al., 1998), um $\alpha 6\beta 4$ Integrin (Herlevsen et al., 2003), um eine variante Isoform des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (Gunthert et al., 1991), um das Tetraspanin D6.1A (Claas et al., 1998) sowie um das bereits beschriebene homotypische Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM (Wurfel et al., 1999).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der metastasierenden Ratten Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73ASML ist ein Proteinkomplex bestehend aus dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM, den beiden Tetraspaninen D6.1A und CD9 sowie dem Zell-Matrix Adhäsionsmolekül CD44v identifiziert worden (Schmidt et. al., 2004). Alle vier Transmembranproteine werden in nicht-transformierten Epithelzellen exprimiert. Jedoch ist die Relevanz der individuellen Moleküle für Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung ebenfalls dokumentiert worden (Gunthert et al., 1991; Seiter et al., 1993; Claas et al., 1998; Wurfel et al., 1999; Tanaka et al., 2002; Munz et al., 2004; Marhaba und Zoller, 2004). Der Komplex aus den vier Tumor-assoziierten Proteinen konnte nur unter milden Lysisbedingungen nachgewiesen werden, wobei die Assoziation der beteiligten Proteine nicht auf direkten Protein-Protein Interaktionen beruht (Schmidt et. al., 2004). Hinzu kommt, dass die bisherige Analyse und Charakterisierung des Proteinkomplexes aus EpCAM, D6.1A, CD9 und CD44v noch keine entscheidenden Hinweise auf den Funktionsmechanismus von EpCAM für die Entstehung und Ausbreitung von Karzinomen lieferte.

Daher sollte im Rahmen dieser Dissertation ermittelt werden, ob das Tumor-assoziierte Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM noch mit anderen als den bisher bekannten Proteinen eine Interaktion eingeht. Die potentiellen Interaktionspartner sollten identifiziert werden, und die Assoziation einer eingehenden biochemischen sowie molekularbiologischen Charakterisierung unterzogen werden. Expressionsanalysen und die Aufklärung subzellulärer Lokalisation sollten Aufschluss über potentielle funktionelle Konsequenzen einer Protein-Protein Interaktion geben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma, Seelze
3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	Sigma, Seelze
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Seelze
Ampicillinsulfat	Sigma, Seelze
Biotin-Sulfo- <i>N</i> -hydroxysuccinimid-Ester (Biotin-X-NHS)	Calbiochem, Darmstadt
Brij98	Fluka, Buchs, Schweiz
Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate	Sigma, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiobi-(Succinimidylpropionat) (DSP)	Pierce, Rockford, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Seelze
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Seelze
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Glutathion-Agarose	Sigma, Seelze
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
HEPES	Sigma, Seelze
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Seelze
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchrom (III)-sulfat (Kaliumchromalaun)	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Calbiochem, Darmstadt
Lubrol WX (17A17)	Serva, Heidelberg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Mayer's Hämalaun	AppliChem, Darmstadt

β -Mercaptoethanol	Sigma, Seelze
Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)	Sigma, Seelze
Mowiol (4-88)	Calbiochem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, Seelze
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma, Seelze
Paraformaldehyd	Sigma, Seelze
Penicillin	Sigma, Seelze
Pepton 140	Gibco BRL, Eggenstein
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Seelze
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein - Molekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ribonuclease A	Sigma, Seelze
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma, Seelze
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Seelze
Triton X-100	Sigma, Seelze
Trypsin	Sigma, Seelze
Tunicamycin	Sigma, Seelze
Tween 20	Serva, Heidelberg

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „Zur Analyse“ und wurden von den Firmen Merck Biosciences (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Seelze) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Alle Restriktionsendonucleasen und andere modifizierende Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder PeqLab (Erlangen) bezogen.

2.1.3 Vektoren

pcDNA3.1(+)/Neo: Eukaryotischer Expressionsvektor mit Neomycin Selektionsmarker (Invitrogen, Karlsruhe).

pcDNA3.1(+)/Hygro:	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Hygromycin Selektionsmarker (Invitrogen, Karlsruhe).
pCMV-TAG-3B:	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Neomycin Selektionsmarker und der Sequenz für einen N-terminalen Myc-Anhang (Stratagene, La Jolla USA).
pGEX-4T-2:	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Generierung von Glutathion-S-Transferase (GST) - Fusionsproteinen (Amersham Biosciences, Freiburg).

2.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Operon Biotechnologies GmbH, Köln, synthetisiert:

1) T7:	5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
2) BGH:	5' – TAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'
3) cldn7-forw:	5' – ATATAAAGCTTACCACCATGGCTAACTCGGGCCTGCAA – 3'
4) cldn7-rev:	5' – TATATAGGATCCTCACACGTATTCCTTAGAGGA – 3'
5) EpCAM Δ ZPD-rev:	5' – TATATACTCGAGTCATGTAGATATAACCAGGACAAC – 3'
6) Myc-cldn7-forw:	5' – TATATAGGATCCATGGCTAACTCGGGCCTGCAA – 3'
7) Myc-cldn7-rev:	5' – TATATAAAGCTTTTACACGTATTCCTTAGAGGA – 3'
8) Myc-cldn7 Δ ZPD-rev:	5' – TATATAAAGCTTTTCAAGGGCAGGAGCAAGAGAGCAG – 3'
9) ZPD-EpCAM-forw:	5' – TATATAGGATCCATCGAAGGTCGTTCTACAAGGAAGAGATCA GCA – 3'
10) ZPD-EpCAM-rev:	5' – TATATACTCGAGTTAATTAATTAAGGCATTGAGCTCTCTGTGT AT – 3'
11) EpCAM Δ EGF1+2-Myc-forw:	5' – GACCGGCGTCGAGTCTTTCTGAGGCTCTCT – 3'
12) EpCAM Δ EGF1+2-Myc-rev:	5' – AGAAAGACTCCGAGAGAGTGAGGACCTACT – 3'
13) EpCAM-ED-rev:	5' – CTCTGGAATCTGCATGGAAAACCTCCGGGGC – 3'
14) EpCAM-TMD-ZPD-forw:	5' – AGACCTCAGGGCCTCACGGCTGGGATCATC – 3'
15) CD44v4-7-TMD-ZPD-forw:	5' – TCCATGCAGATTCCAGAGTGGCTTATCATC – 3'
16) CD44v4-7-ED-rev:	5' – CGTGAGGCCCTGAGGTCTCCTCGCAGGACC – 3'

2.1.5 cDNAs

EpCAM: Die „full length“ cDNA, die für das EpCAM (Claas et al., 1998) der Ratte kodiert, wurde bereits im Rahmen früherer Projekte in pcDNA3.1(+)/Neo kloniert.

Claudin-7: Die Claudin-7 cDNA der Ratte wurde mittels PCR (Primer: cldn7-forw und cldn7-rev) aus der cDNA-Bank der Ratten Kolonkarzinom-Zelllinie REGb (Claas et al., 1998) amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit Hind III und BamH I in pcDNA3.1(+)/Neo und pcDNA3.1(+)/Hygro kloniert.

CD44v4-7: Die „full length“ cDNA, die für das CD44v4-7 (meta-1) (Gunthert et al., 1991) der Ratte kodiert, wurde bereits im Rahmen früherer Projekte in pcDNA3.1(+)/Neo kloniert.

2.1.6 Primärantikörper

Antikörper	Isotyp	Spezifität	Quelle / Referenz
9E10	Maus IgG1 mAk	anti-Myc	American Type Culture Collection (Evan et al., 1985)
A2.6	Maus IgG1 mAk	anti-CD44v6	S. Matzku, DKFZ, Heidelberg (Matzku et al., 1989)
anti-Caveolin-1 (N20): sc-894	Kaninchen IgG pAk	anti human-Caveolin-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Claudin-1	Kaninchen IgG pAk	anti-human Claudin-1	Neo Markers, Fremont, USA
anti-Claudin-3	Kaninchen IgG pAk	anti-human Claudin-3	Neo Markers, Fremont, USA
anti-Claudin-7	Meerschweinchen Serum	anti-human Claudin-7	W. W. Franke, DKFZ, Heidelberg (Pape et al., 2004)
D5.7	Maus IgG1 mAk	anti-Ratte D5.7 (EpCAM)	S. Matzku, DKFZ, Heidelberg (Matzku et al., 1989)
D6.1	Maus IgG1 mAk	anti-Ratte D6.1A	S. Matzku, DKFZ, Heidelberg (Matzku et al., 1989)
HEA125	Maus IgG1 mAk	anti-human EpCAM	G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg (Momburg et al., 1987)
Ox26	Maus IgG2a mAk	anti-Ratte Transferrin-Rezeptor	European Collection of Animal Cell Culture (Jefferies et al., 1984)
Ox50	Maus IgG1 mAk	anti-CD44	Paterson et al., 1987

Tab. 2.1: Primärantikörper. In dieser Tabelle sind alle verwendeten Primärantikörper unter Angabe der Isotypen und der Spezifität dargestellt.

2.1.7 Sekundärantikörper und -reagenzien

Spezies	Spezifität und Isotyp	Konjugat	Quelle / Referenz
/	ExtrAvidin (Streptavidin)	HRP	Sigma, Seelze
Esel	anti-Maus IgG	HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Ziege	anti-Meerschweinchen IgG	HRP	Dianova, Hamburg
Ziege	anti-Kaninchen IgG	HRP	BD PharMingen, San Diego, USA
Ziege	anti-Meerschweinchen IgG	Biotin	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, USA
Ziege	anti-Maus IgG	Biotin	Dianova, Hamburg
Esel	anti-Maus IgG	Cy2	Dianova, Hamburg
Esel	anti-Meerschweinchen IgG	Cy3	Dianova, Hamburg

Tab. 2.2: Sekundärantikörper und -reagenzien. Alle verwendeten Sekundärantikörper sowie das Sekundärreagenz ExtrAvidin sind in dieser Tabelle dargestellt.

2.1.8 Radioisotope

^{32}P : Redivue [γ - ^{32}P] ATP, Amersham Biosciences, Freiburg;

2.1.9 Bakterien

E. coli DH5 α : Bei diesem Bakterienstamm handelt es sich um einen rekombinationsdefizienten Suppressorstamm, der für Plasmidpräparationen verwendet wurde.

DH5 α Genotyp: $\Phi 80d$ lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169;

2.1.10 Medien und Zusätze zur Kultivierung von Bakterien

Luria Bertani (LB) Medium: 10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1000 ml ddH₂O aufgefüllt und autoklaviert;

Nach dem Autoklavieren wurde das LB-Medium auf ca. 60 °C abgekühlt und 60 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Das Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Luria Bertani (LB) Agar: 1% (w/v) Bactoagar in LB Medium; autoklaviert;

Nach dem Autoklavieren wurde der LB-Agar auf ca. 60 °C abgekühlt und 60 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Der LB-Agar wurde anschließend in Petrischalen gegossen und erkalten lassen. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.11 Zelllinien

BSp73AS: *Rattus norvegicus* (BDX) schwach metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Matzku et al., 1983).

BSp73ASML: *Rattus norvegicus* (BDX) stark metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Matzku et al., 1983).

804G: *Rattus norvegicus* (ACI) metastasierende Blasenkarzinom-Zelllinie (Izumi et al., 1981).

PROb: *Rattus norvegicus* (BDIX) metastasierende Kolonkarzinom-Zelllinie (Reisser et al., 1993).

HaCaT: *Homo sapiens* Immortalisierte Hautkeratinozyten-Zelllinie (Boukamp et al., 1988).

HEK 293T: *Homo sapiens* Nierenkarzinom-Zelllinie (Graham et al., 1977).

Panc89: *Homo sapiens* metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Okabe et al., 1983).

Capan 1: *Homo sapiens* metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Fogh et al., 1977).

BxPC3 :	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Tan et al., 1986).
8.18:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ, Heidelberg).
MiaPaCa 2:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Yunis et al., 1977).
Colo375 :	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie (Morgan et al., 1980).
SW707:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Kolorektalkarzinom-Zelllinie (Tumorbank, DKFZ, Heidelberg).
SW480:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Kolorektalkarzinom-Zelllinie (Trainer et al., 1988).
SW948:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Kolorektalkarzinom-Zelllinie (Leibovitz et al., 1976).
WiDr:	<i>Homo sapiens</i> metastasierende Kolorektalkarzinom-Zelllinie (Noguchi et al., 1979).

2.1.12 Zellkulturmedien und -zusätze

Kulturmedien:	RPMI 1640; DMEM supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS;
Antibiotika:	100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wurde den Zellkulturmedien routinemäßig zugesetzt.
PBS:	137 mM NaCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4;
Trypsin:	0,25% (w/v) in PBS;
EDTA:	5 mM in PBS, pH 8,0;

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Bakterien

500 µl dichtgewachsener Bakterienrasen wurde mit 500 µl 50% (w/v) Glycerin in ddH₂O gemischt, eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Anzucht wurde ein Aliquot der tiefgefrorenen Bakterienkultur mit einer Impföse entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Nach ÜN Inkubation bei 37 °C konnten wiederum einzelne Klone gepickt und angeimpft werden.

2.2.1.2 Generierung elektrokompetenter *E.coli* Bakterien

Eine einzelne Kolonie *E.coli* Bakterien (Stamm DH5α) wurde in 5 ml LB-Medium ÜN bei 37 °C in einem Bakterenschüttler kultiviert. Mit 4 ml aus der ÜN-Kultur wurden 400 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien 15 min bei 4 000 x g zentrifugiert und in 400 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in 200 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O wurden die Bakterien ein weiteres Mal zentrifugiert und in 10 ml 10% (w/v) Glycerin in ddH₂O resuspendiert. Abschließend, nach der letzten Zentrifugation, wurden die Bakterien in 2 ml 10% (w/v) Glycerin in ddH₂O aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren. Entscheidend für die Transformationseffizienz der Bakterien war das konsequente Arbeiten auf Eis und das Vorkühlen aller benötigten Gefäße und Agenzien.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Generelle Arbeitsroutinen:

Kultivierung: Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5% (v/v) CO₂ und 100% Luftfeuchte inkubiert.

Waschen: Alle Zellen wurden durch Resuspension und Zentrifugation (600 x g, 5 min) gewaschen.

2.2.2.1 Passagieren eukaryotischer Zellen

Adhärente Zellen wurden vor dem Erreichen völliger Konfluenz mit PBS gewaschen und mit 5 mM EDTA in PBS oder 0,25% (w/v) Trypsin in PBS von den Zellkulturschalen abgelöst. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturschalen verteilt.

2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Einfriermedium: 10% DMSO (v/v) in FCS;

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mittels Trypsin oder EDTA aus den Kulturflaschen abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Da der Einfrierprozess langsam ablaufen sollte (etwa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), wurden die Zellen zunächst ÜN bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, bevor sie in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert wurden.

2.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

4×10^6 Zellen wurden pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und ÜN bis etwa 60% Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und 1,5 ml frisches Medium zugegeben. 1,5 µg Plasmid-DNA wurde in 100 µl serumfreiem Medium vorgelegt und mit 10 µl PolyFect Transfektionsreagenz (QIAGEN, Hilden) versetzt. Die Bildung von DNA-PolyFect Komplexen wurde durch 10 min Inkubation bei RT erreicht. Anschließend wurden diese Komplexe mit 600 µl Medium inkl. 10% FCS gemischt und auf die Zellen pipettiert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen geerntet.

2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse

Elvanol: 20% (w/v) Mowiol in 2/3 PBS, pH 8,0; 1/3 Glycerin;

Runde Glasplättchen von 14 mm Durchmesser wurden autoklaviert und einzeln in die Wells einer 24-Well-Platte verteilt. Daraufhin wurden pro Well 3×10^4 BSp73ASML bzw. PROb Zellen ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank kultiviert. Die auf den Glasplättchen adhärer-

ten Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen und anschließend 5 min in eiskaltem (-20 °C) Methanol und 30 s in eiskaltem (-20 °C) Aceton fixiert. Nach 15 min Trocknen bei RT wurden die Glasplättchen kurz mit PBS gewaschen und mit je 40 µl D5.7-Hybridomüberstand oder 40 µl anti-Claudin-7 Serum (Verdünnung 1:5 000) für 1 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen für 45 min bei 4 °C mit 40 µl (5 µg/ml) Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten dabei Cy2-markierter Esel anti-Maus Antikörper (Anregung bei 489 nm, Emission bei 506 nm) bzw. Cy3-markierter Esel anti-Meerschweinchen Antikörper (Anregung bei 548 nm, Emission bei 562 nm). Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und einmal kurz in ddH₂O und 100% Ethanol gespült. Danach wurden die Glasplättchen zum Trocknen ausgelegt. Unterdessen wurden die Objektträger beschriftet und mit je zwei Tropfen Elvanol versehen. Die getrockneten Glasplättchen wurden dann, unter Vermeidung von Luftblasen, zellseitig auf das Elvanol gelegt, leicht angedrückt und ÜN bei 4 °C getrocknet. Die mikroskopische Analyse erfolgte an dem konfokalen „Laser Scanning“ Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland).

2.2.2.5 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten (nach H. E. Schaefer und R. Fischer)

Beschichtung für Objektträger: 5,0 g Gelatine wurden in 1000 ml ddH₂O 3 x aufgekocht und 0,5 g Kaliumchromalaun zugeben.

Vectastain-Lösung: 2 Tropfen Reagenz A (Avidin) wurden mit 2 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) in 10 ml PBS gemischt (Vectastatin ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA).

AEC-Lösung 1: 2,1 ml 0,1 M Essigsäure wurden mit 7,9 ml 0,1 M Natriumacetat gemischt.

AEC-Lösung 2: 4,0 mg AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol) wurden in 500 µl Dimethylformamid gelöst.

Die Objektträger wurden 5-10 min in Beschichtungslösung eingetaucht, bei 37 °C etwa 12 h trocknen lassen und bei 4 °C aufbewahrt. Nach der Präparation der Ratten Pankreata wurden diese mit Einbettmedium (Neg -50, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) über-

schichtet und mittels flüssigem Stickstoff auf Korkplättchen fixiert. Die Organe wurden anschließend bei -20 °C mit einer Schnittdicke von 5-7 µm im Kryostat (HM 505 N, Microm, Walldorf) geschnitten, auf die vorbereiteten Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden nach dem Trocknen für 4 min in einer Chloroform/Aceton-Lösung (1:1) fixiert und nochmals über Nacht trocknen gelassen. Die fixierten Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet und mit je 100 µl PBS/BSA zur Blockierung endogener Peroxidasen für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach diesem Blockierungsschritt wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen, trocknen gelassen und mit je 10 µl der Primärantikörper HEA125 (20 µg/ml) oder anti-Claudin-7 Serum (Verdünnung 1:200) 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Proben wurden anschließend einmal in PBS gewaschen und trocknen gelassen. Darauf folgte die Inkubation mit je 100 µl der Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus-Biotin (Verdünnung 1:150) bzw. anti-Meerschweinchen-Biotin (Verdünnung 1:250) für 30 min in einer feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte wurden dann dreimal in PBS gewaschen und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Proben mit je 100 µl Vectastain-Lösung für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal in PBS gewaschen und wiederum trocknen lassen. AEC-Lösung 1 und 2 wurden gemischt und mit 5 µl H₂O₂ versetzt. Je 100 µl der AEC-Lösung wurde pro Schnitt aufgetragen und 5-20 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben getrocknet und mit Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt. Schließlich wurden die Gewebeschnitte mit Kaisers Glyceringelatine überschichtet, das Deckglas aufgelegt und im Mikroskop (DMRBE, Leica, Bensheim) ausgewertet.

2.2.2.6 Immunelektronenmikroskopie

Cacodylat-Puffer:	50 mM Na-Cacodylat, pH 7,2;
Glutaraldehyd-Lösung:	2,5% Glutaraldehyd; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl ₂ in Cacodylat-Puffer, pH7,2;
Saccharose-Lösung:	200 mM Saccharose; 50 mM HEPES, pH 5,8;
Natriumthiosulfat-Lösung:	250 mM Natriumthiosulfat; 50 mM HEPES in ddH ₂ O, pH 5,8;
0,2% OsO ₄ -Lösung:	0,2% (w/v) OsO ₄ in Cacodylat-Puffer;

2% Uranylacetat-Lösung: 2% (w/v) Uranylacetat in Methanol;

Bleicitrat-Lösung: 1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 1,76 g Na-Citrat-Dihydrat; 8 ml 1 M NaOH; auf 50 ml ddH_2O aufgefüllt (vorher frisch abgekocht);

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden die Kryostatschnitte 7 min in 2% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte 2 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS. Die Inkubationszeit für den Primärantikörper betrug mindestens 2 h, gefolgt von drei 5 min Waschschritten in PBS. Die Sekundärantikörper, Esel anti-Maus- bzw. Ziege anti-Meerschweinchen IgG, die an 1,4 nm große kolloidale Goldpartikel („Nanogold“; Biotrend, Köln) gekoppelt waren, wurden über Nacht inkubiert. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper wurden die Präparate mit 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer nachfixiert (15 min, RT) und anschließend kurz in Cacodylat-Puffer gewaschen. Dem folgten zunächst zwei 10 min Inkubationen in Saccharose-Lösung, anschließend eine Silberverstärkung für 3 bis 8 min (Silver Enhancement Kit, Nanoprobes, Stony Brooks, New York, USA), zwei 8 min Waschschrritte in Natriumthiosulfat-Lösung und 8-10 Waschschrritte in ddH_2O . Die Nachfixierung mit 0,2% OsO_4 erfolgte für 30 min auf Eis. Die Entwässerung und die Einbettung wurden nach der von Langbein und Kollegen beschriebenen Methode durchgeführt (Langbein et al., 2004). Die Präparate wurden zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol auf Eis, je 5 min, gefolgt von 100% Ethanol bei RT, 2 x 20 min) und anschließend in 100% Propylenoxid (2 x 20 min) entwässert. Nach dem die Zellen bzw. die Gewebeschnitte über Nacht in einem Propylenoxid/Epon-Gemisch (1:1, v/v) belassen worden waren, wurde eine mit Epon gefüllte Gelatine-kapsel (Serva, Heidelberg) übergestülpt. Die Polymerisierung des Epons erfolgte für 48 h bei 60 °C. Nach dem Absprengen des Deckglases durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden mit einem Reichert Ultracut Schneidegerät (Leica, Bensheim) 50 nm Ultradünnschnitte angefertigt und auf mit 1% Piloform beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen. Die Schnitte wurden 15 min in 2% Uranylacetat-Lösung und 5 min in Bleicitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert. Die Elektronenmikroskopie wurde mit einem EM900 Elektronenmikroskop der Firma LEO (Oberkochen) durchgeführt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Puffer P1: 25 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 1% (w/v) Glukose; 10 µg/ml RNaseA;

Puffer P2: 2% (w/v) SDS; 0,4 M NaOH;

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 4,8;

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums ÜN bei 37 °C in einem Bakterieneschüttler kultiviert. Davon wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien für 30 s bei 15 000 x g sedimentiert. Nach Resuspension in 250 µl P1 wurden die Bakterien mit 400 µl P2 lysiert (5 min, RT, mehrmaliges Invertieren) und das Gemisch mit 300 µl P3 neutralisiert. Nach Abzentrifugation der lysierten Bakterienbestandteile (15 min, 15 000 x g) und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß, wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol, mehrmaligem Invertieren und Zentrifugation für 15 min bei 15 000 x g präzipitiert. Die DNA wurde anschließend einmal mit 70% Ethanol gewaschen (5 min, 15 000 x g) und nach 5-15 min Trocknen bei RT in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.3.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

QBT-Puffer: 43,83 g NaCl; 10,46 g MOPS, pH 7,0; 150 ml Isopropanol; 15 ml 10% Triton X-100; mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt;

QC-Puffer: 58,44 g NaCl; 10,46 g MOPS, pH 7,0; 150 ml Isopropanol; mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt;

QF-Puffer: 73,05 g NaCl; 6,06 g Tris, pH 8,5; 150 ml Isopropanol; mit ddH₂O auf 1 l ddH₂O aufgefüllt;

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium, unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums, ÜN bei 37 °C in einem Bakterieneschüttler kultiviert. 100 ml LB-Medium mit

entsprechendem Antibiotikum wurden mit 100 µl der ÜN-Kultur inokuliert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 6 000 x g wurde das Pellet in 4 ml P1 resuspendiert, mit 4 ml P2 durch mehrmaliges Invertieren für 5 min bei RT lysiert und nach Durchmischung mit 4 ml P3 für 20 min auf Eis neutralisiert. Nach anschließender Zentrifugation (20 000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der klare Überstand über eine mit QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde danach zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Der Präzipitation der DNA aus dem Eluat mittels 0,7 VT Isopropanol (15 000 x g, 30 min, 4 °C) folgte einmaliges Waschen des DNA Pellets mit 2 ml 70% Ethanol (15 000 x g, 10 min, 4 °C). Die DNA konnte nach 5-10 min Trocknen in 200 µl ddH₂O aufgenommen und Quantität sowie Qualität photometrisch bestimmt werden (vgl. Abschnitt 2.2.3.3).

2.2.3.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm (λ_{260}). Für die Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption bei 260 nm wird photometrisch in Quarzküvetten gemessen, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml Oligonukleotide enthält, besitzt unter diesen Bedingungen eine optische Dichte von 1 (1 OD₂₆₀). Dieser OD-Wert dient zur Bestimmung der unbekanntes DNA-Konzentration einer Lösung. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt, basierend auf der Absorption durch aromatische Aminosäurereste, bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäure abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

2.2.3.4 Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA

Dieses Verfahren dient der Kontrolle und Isolation einzelner DNA-Fragmente. Es basiert auf der Tatsache, dass Restriktionsenzyme doppelsträngige DNA an spezifischen palindromen Sequenzen „schneiden“ und dabei gleich lange („blunt end“) oder unterschiedlich lange („sticky end“) Enden der beiden DNA Stränge hinterlassen. Dadurch wird es möglich, DNA-Fragmente einer definierten Länge zu erhalten. Für den Restriktionsverdau von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen der jeweiligen Restrik-

tionsenzyme eingehalten. Nach dem Verdau wurde die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA, pH 8,3;

6 x Ladepuffer: 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol; 40% (w/v) Glycerin;

Marker: „GeneRuler“ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot);

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA Fragmenten wurden Agarosegele mit 0,8 - 1,5% Agarosegehalt präpariert. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf < 60 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelform mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach etwa 20-30 min war die Agaroselösung zu einem Gel polymerisiert und konnte nach Entfernung des Kamms in die Gelkammer eingesetzt werden. Der restliche Teil der Gelkammer wurde mit TAE-Puffer so weit aufgefüllt, bis das Gel leicht bedeckt war. Die Proben wurden mit 1/6 Volumenteile (VT) 6 x Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker in die durch den Kamm vorgefertigten Geltaschen pipettiert. Bei 5 V/cm wurden die DNA-Proben ihrer Masse entsprechend aufgetrennt. Anschließend konnte das Gel auf einem Transilluminator (Eagle Eye II, Herolab, Wiesloch) mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm analysiert und fotografiert werden, da die DNA unter diesen Bedingungen durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar wird.

2.2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Lysispuffer QG: QIAGEN, Komposition nicht angegeben;

Waschpuffer PE: QIAGEN, Komposition nicht angegeben;

Die Banden elektrophoretisch aufgetrennter DNA Proben wurden mit einem sauberen Skalpell aus den Gelen geschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Pro 100 mg Agarosegel wurden 300 µl

Lysispuffer QG zugesetzt, und die Gelstücke bei 50 °C für 10 min in einem Schüttler depolymerisiert. Die DNA-Agarose Lösung wurde auf eine QIAquick Säule pipettiert und 1 min bei 15 000 x g zentrifugiert, wobei die DNA-Moleküle mit einer Größe zwischen 40 bp und 50 kb bei hoher Salzkonzentration selektiv an das QIAquick Silica-Gel gebunden wurden. Sämtliche Kontaminationen wie Agarose, Proteine, Salze oder Ethidiumbromid banden nicht und wurden durch Waschen mit Puffer PE entfernt. Die DNA konnte durch Zentrifugation mit 50 µl ddH₂O eluiert werden.

2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Anschluss an einen Restriktionsverdau können DNA-Fragmente, die komplementäre Enden besitzen, miteinander ligiert werden. Hierzu wurden Vektor und DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:10, T4-DNA-Ligase-Puffer (10 x), T4-DNA-Ligase und ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt (je kleiner das DNA-Fragment, desto größer der molare Überschuss des Fragments). Die Ligation wurde für „sticky end“ Ligationen bei RT etwa 4 h und für „blunt end“ Ligationen bei 16 °C ÜN durchgeführt. Anschließend konnten die Ligationsansätze direkt für die Transformation elektrokompenter Bakterien eingesetzt werden.

2.2.3.8 Transformation elektrokompenter Bakterien (Elektroporation) (Dower et. al., 1988)

SOC-Medium: 20 g (w/v) Pepton; 5 g (w/v) Hefeextrakt; 0,5 g (w/v) NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glukose;

5 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA wurden mit 50 µl elektrokompenter Bakterien, die auf Eis aufgetaut wurden, gemischt. Das Bakterien-DNA Gemisch wurde in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt, die in die Elektroporationseinrichtung eingesetzt wurde. Unter der angelegten Spannung von 2,5 kV, der elektrischen Kapazität von 25 µF und einem elektrischen Widerstand von 200 Ω wurde ein elektrischer Impuls von 4,5 -5,0 ms manuell ausgelöst. Der auf die Bakterien ausgeübte Elektroschock bewirkt die Plasmidaufnahme. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte durch ausplattieren von 100 µl Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und ÜN Inkubation bei 37 °C.

2.2.3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR, Mullis et al., 1986)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Folgende Komponenten wurden dabei für eine PCR Reaktion verwendet:

10,0 µl	10 x <i>Pwo</i> -Puffer (PeqLab, Erlangen)
0,8 µl	dNTP-Mix 25 mM
2,0 µl	(50 –100 ng) Plasmid-DNA (Template)
5,0 µl	Forward Primer 25 µM
5,0 µl	Reverse Primer 25 µM
2,5 µl	<i>Pwo</i> -Polymerase (PeqLab, Erlangen)
74,7 µl	ddH ₂ O
<hr/>	
100 µl	Gesamtvolumen

Die Reaktionen wurden in einem PCR Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt. Die PCR Bedingungen, wie Temperatur und Dauer der einzelnen Zyklen, waren abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments sowie von der Länge und Zusammensetzung der verwendeten Primer.

2.2.3.10 Generierung von Deletionsmutanten und chimären Konstrukten durch gerichtete Mutagenese mittels PCR

Die verwendeten Primer (siehe Abschnitt 2.1.4) sowie die Matrizen zur Generierung der jeweiligen Konstrukte sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Konstrukt	1. PCR		2. PCR		3. PCR	
	Primer	Matrize	Primer	Matrize	Primer	Matrize
EpCAM Δ ZPD	1)	EpCAM	/	/	/	/
	5)	cDNA	/	/	/	/
(Myc-) Claudin-7	6)	Claudin-7	/	/	/	/
	7)	cDNA	/	/	/	/
(Myc-) Claudin-7 Δ ZPD	6)	Claudin-7	/	/	/	/
	8)	cDNA	/	/	/	/
ZPD-EpCAM	9)	EpCAM	/	/	/	/
	10)	cDNA	/	/	/	/
EpCAM Δ EGF 1+2-Myc	1)	EpCAM	11)	EpCAM	1)	Konstrukte aus 1. und 2. PCR
	12)	cDNA	2)	cDNA	2)	
Ep-ED/CD44- TMD-ZPD	1)	EpCAM	15)	CD44v4-7	1)	Konstrukte aus 1. und 2. PCR
	13)	cDNA	2)	cDNA	2)	
CD44-ED/CD44- TMD-ZPD	1)	CD44v4-7	14)	EpCAM	1)	Konstrukte aus 1. und 2. PCR
	16)	cDNA	2)	cDNA	2)	

Tab. 2.3: PCR-Konstrukte. In dieser Tabelle sind alle per PCR generierten Konstrukte dargestellt inklusive der erforderlichen Primer und Matrizen. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.1.4 beschrieben.

Der N-terminale Myc-Anhang der beiden Claudin-7 Konstrukte ist in Klammern dargestellt, da der Myc-Anhang nicht per PCR angefügt wurde. Der Vektor pCMV-Tag-3B, in den die beiden Claudin-7 Konstrukte hineinkloniert wurden, enthält auf der 3'-Seite der „multiple cloning site“ bereits die Sequenz für diesen Myc-Anhang. Die resultierenden Proteine wurden dann als Myc-Claudin-7 bzw. Myc-Claudin-7 Δ ZPD bezeichnet. Die mittels PCR erzeugten Konstrukte wurden anschließend in die jeweiligen Vektoren kloniert und zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge, nach Amplifikation und Aufreinigung, sequenziert (MWG Biotech GmbH, Ebersberg). Zur Vervollständigung sind auch die Wildtyp-Konstrukte in der folgenden Tabelle aufgeführt. In der Tabelle 2.4 sind alle Konstrukte und die Restriktionsschnittstellen mit Hilfe derer sie in die entsprechenden Vektoren kloniert wurden dargestellt:

Konstrukt	Restriktionsschnittstellen	Vektor
EpCAM	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Neo
	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Hygro
Claudin-7	3' Hind III, 5' BamH I	pcDNA3.1(+)/Neo
	3' Hind III, 5' BamH I	pcDNA3.1(+)/Hygro
EpCAM Δ ZPD	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Neo
(Myc-) Claudin-7	3' BamH I, 5' Hind III	pCMV-Tag-3B
(Myc-) Claudin-7 Δ ZPD	3' BamH I, 5' Hind III	pCMV-Tag-3B
ZPD-EpCAM	3' BamH I, 5' Xho I	pGEX-4T-2
EpCAM Δ EGF 1+2-Myc	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Neo
Ep-ED/CD44- TMD-ZPD	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Neo
CD44-ED/CD44- TMD-ZPD	3' Hind III, 5' Xho I	pcDNA3.1(+)/Neo

Tab. 2.4: Klonierung der PCR-Konstrukte. In dieser Tabelle sind die 3'- bzw. 5'-Restriktionsschnittstellen der per PCR generierten Konstrukte (vgl. Tab. 2.3) und die Vektoren aufgelistet, in welche die Konstrukte hineinkloniert wurden. Ausführliche Beschreibungen der Vektoren sind in Abschnitt 2.1.3 angegeben.

2.2.3.11 Produktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Nukleotidsequenz, welche für die zytoplasmatische Domäne von EpCAM (ZPD-EpCAM) kodiert, wurde in den Vektor pGEX-4T-2 kloniert (vgl. Abschnitt 2.1.3). Dieser Vektor besitzt auf der 3'-Seite der „Multiple Cloning Site“ eine für die Glutathion-S-Transferase (GST) kodierende Sequenz. Durch die Translation wurde daher ein Fusionsprotein bestehend aus GST und ZPD-EpCAM gebildet.

Das Plasmid pGEX-4T-2 - ZPD-EpCAM wurde zunächst in Bakterien des Stammes *E.coli* DH5 α transformiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 12 ml der Vorkultur wurden 1 l LB-Medium angeimpft, welches 2% Glukose enthielt und bis zu einer OD₆₀₀ kultiviert wurde. Nach Induktion der Transkription durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0,1 mM Endkonzentration) wurde die Kultur weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 4 000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 30 ml kaltem 1 x PBS mit 10% Glycerin und 1 mM PMSF aufgenommen. Die Bakterienzellen wurden danach durch eine Ultraschallbehandlung (3 x 30 s) auf Eis aufgeschlossen. Nach Zugabe

von Triton X-100 (1% Endkonzentration) wurden die Proben 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 15 000 x *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand einer Affinitätschromatographie unterzogen. Die im Überstand vorliegenden Fusionsproteine wurden über eine Glutathion-Agarose-Säule aufgereinigt. Dabei wurden die GST-Fusionsproteine spezifisch an die Glutathion-Agarose gebunden und konnten mittels reduziertem Glutathion eluiert werden. Das reduzierte Glutathion wurde mit einer Endkonzentration von 10 mM in einem 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 8,0, gelöst. Wurde diese Lösung auf die Säule gegeben, verdrängte das reduzierte Glutathion das an das Glutathion der Agarose-Säule gebundene GST-Fusionsprotein, welches am Ende der Säule aufgefangen wurde. Nach der Bestimmung der Konzentration des aufgereinigten GST-Fusionsproteins GST-ZPD-EpCAM konnte es in weiteren Experimenten eingesetzt werden.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Verwendete Proteinase- oder Phosphataseinhibitoren:

Proteinase-Inhibitoren: 2 mM PMSF;
 1 x Proteinase Inhibitor Cocktail;

Phosphatase-Inhibitoren: 1 mM Natriumorthovanadat;
 10 mM NaF;
 100 mM Okadaic Acid;

Je nach Erfordernissen des Experiments wurden Proteinase- oder Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt und Tris-, PBS- oder HEPES-Puffer verwendet.

2.2.4.1 Oberflächenbiotinylierung von Zellen

Biotinylierungspuffer: 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM PMSF;
 1 x Protease Inhibitor Mix; 100-500 µg/ml Biotin-X-NHS;

PBS-Glycin: 200 mM Glycin in PBS;

Bei der Biotinylierung bindet der Biotin-Sulfo-*N*-hydroxysuccinimid-Ester (Biotin-X-NHS) an freie Aminogruppen eines Proteins, z. B. an die freie Aminogruppe der Aminosäure Lysin.

Das Biotin-X-NHS bindet dabei kovalent an die NH₂-Gruppe und bildet unter Abspaltung der NHS-Gruppe eine Amidbindung. Die Biotin markierten Oberflächenproteine einer Zelle können dann im Western Blot durch „Horseradish Peroxidase“ (HRP) - konjugiertes Streptavidin (isoliert aus *Streptomyces avidinii*), welches selektiv an Biotin bindet, detektiert werden. Eine kommerziell erhältliche Form von HRP-gekoppeltem Streptavidin ist das von Amersham Pharmacia vertriebene ExtrAvidin.

Die adhärennten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml/25 cm² Flaschenoberfläche frisch angesetzter Biotinylierungspuffer zugegeben und die Zellen unter sanftem Schütteln für 30 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Biotinesters wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS-Glycin gespült, wobei das Glycin die noch freien Bindungsstellen des überschüssigen Biotinesters blockiert.

2.2.4.2 Behandlung von Zellen mit Tunicamycin

Tunicamycin Stocklösung: 10 mg/ml in DMSO;

Tunicamycin verhindert die N-Glykosylierung von Proteinen durch die Blockierung des ersten Schrittes im Syntheseweg der „Core“-Oligosaccharide am Endoplasmatischen Retikulum (Heifetz et al., 1979). Adhärennte BSp73ASML Zellen wurden über Nacht (18 h) mit 10 µg Tunicamycin, gelöst in DMSO, pro Milliliter Kulturmedium behandelt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einer Lyse mit den entsprechenden Detergenzien unterzogen.

2.2.4.3 Herstellung von Zelllysaten

Lysispuffer: 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM PMSF;
1 x Protease Inhibitor Mix; 1% (v/v) Detergens;

6 x Laemmli-Puffer: 300 mM Tris, pH 6,8; 12% (w/v) SDS; 0,6% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin;

Adhärennte Zellen wurden dreimal mit eiskaltem, detergensfreiem Lysispuffer gewaschen und anschließend mittels eines Zellschabers in den Lysispuffer überführt und für 2 h bei 4 °C rotiert. Danach wurden die unvollständig gelösten Zellbestandteile sowie die Zellkerne durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 20 000 x g) sedimentiert und das geklärte Lysat in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt oder mit 1/6 VT 6 x Laemmli-Puffer gemischt, 5 min bei 95 °C gekocht, und einer SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse unterzogen.

2.2.4.4 Biotinylierung von Zelllysaten

Die Zellen wurden in 1% Triton X-100 lysiert, das Lysat aliquotiert und 200 µg/ml Biotin-X-NHS den Aliquots der Lysate zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 200 mM PBS-Glycin, pH 7,4, zugegeben, um noch freie Bindungsstellen des Biotinesters durch Bindung an die freie Aminogruppe des Glycins zu inaktivieren. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT wurden die Lysate zur Immunpräzipitation eingesetzt oder direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen.

2.2.4.5 Chemische Quervernetzung von Proteinen in Zelllysaten

DSP Stocklösung: 100 mM DSP in DMSO;

PBS-Glycin: 200 mM Glycin in PBS;

DSP gehört zur Gruppe der homobifunktionellen Quervernetzungsreagenzien. Das bedeutet, dass DSP zwei strukturgleiche aminoreaktive Gruppen besitzt, die über eine Amidbindung freie Aminogruppen miteinander interagierender Proteine (Distanz $\leq 1,2$ nm) binden können. Die kovalent gebundenen Proteine können somit als Komplex in einer Immunpräzipitation isoliert und nach einer SDS-PAGE im Western Blot analysiert werden.

Die Zellen wurden in 1% Triton X-100 lysiert, das Lysat aliquotiert und das organische Lösungsmittel DMSO (als Kontrolle) oder 1 mM DSP, gelöst in DMSO, den Aliquots der Lysate zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde 200 mM PBS-Glycin, pH 7,4, zugegeben, um noch freie Bindungsstellen des DSP durch Bindung an die freie Aminogruppe des Glycin zu inaktivieren. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT wurden die Lysate zur Immunpräzipitation eingesetzt oder direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen.

2.2.4.6 Behandlung der Zelllysate mit Methyl- β -Cyclodextrin

Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) extrahiert Cholesterin aus der Zellmembran und zerstört dadurch cholesterinreiche Membranmikrodomänen. Nach der Lyse der verwendeten Zellen wurde dem Zelllysate 20 mM M β CD zugesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die behandelten Lysate einer Immunpräzipitation unterzogen oder direkt in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden.

2.2.4.7 Immunpräzipitation

Die jeweiligen Zelllysate wurden mit Hybridomüberstand (D5.7, D6.1 oder Ox26), anti-Claudin-7 Serum oder anderer verwendeter Antikörper versetzt und für 2 h bei 4 °C zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde 1/20 VT Protein G Sepharose zugesetzt und das Gemisch für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die an die Protein G Sepharose gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexe viermal mit eiskaltem Lysispuffer gewaschen, um unspezifische Signale zu minimieren. Das Protein G Sepharose Pellet wurde in 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend der Auftrennung in einer SDS-PAGE unterzogen.

2.2.4.8 Immundepletion von EpCAM und Claudin-7

4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in 2 ml Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Das Lysat wurde anschließend in vier Proben á 500 μ l aufgeteilt und je fünf aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen unterzogen. Dabei wurden die Lysate entweder mit 200 μ l D5.7-Hybridomüberstand, 2,5 μ l anti-Claudin-7 Serum in 200 μ l RPMI 1640 Medium, 200 μ l Ox26 Hybridomüberstand oder 200 μ l RPMI 1640 Medium inkubiert. Nach Inkubation mit Protein G Sepharose und Zentrifugation der Proben wurde der Überstand (Lysat) abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Mit diesen Lysaten wurde anschließend eine weitere IP durchgeführt. Die Protein G Sepharose Pellets wurden nach jeder Runde in 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und eingefroren. Die fünfte Depletionsrunde wurde ÜN vorgenommen. Aus den Lysaten wurden somit die Antigene EpCAM und Claudin-7 vollständig depletiert. Die Immunpräzipitationen mit Ox26 dienten dabei als Negativkontrolle für unspezifische Signale. Das RPMI 1640 Medium wurde als Verdünnungskontrolle eingesetzt, da alle vier Lysate durch fünffache Zugabe von je 200 μ l

Hybridomüberstand bzw. RPMI 1640 Medium stark verdünnt wurden. Dieser Schritt war notwendig, um eine korrekte und exakte Vergleichbarkeit zwischen antigendepletierten und undepletierten Lysaten zu gewährleisten. Die Präzipitate, sowie die antigendepletierten Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.2.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Rotiphorese Gel 30:	Acrylamidmix, bestehend aus 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH ₂ O;
Trenngel:	375 mM Tris, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 8-12% Acrylamidmix; 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1% (v/v) TEMED;
Sammelgel:	375 M Tris, pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 3-5% Acrylamidmix; 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1% (v/v) TEMED;
Marker:	PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas (St. Leon-Rot);
Laufpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS;

Zur Herstellung der Gele wurden 5 ml Trenngellösung zwischen zwei sich in einer Gießvorrichtung befindlichen Glasplatten gegossen, mit 1 ml ddH₂O überschichtet und zur Polymerisation 30 min bei RT belassen. Anschließend wurde das Wasser abgegossen, das polymerisierte Trenngel mit 2 ml Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach einer weiteren halbstündigen Polymerisationsphase wurde der Kamm entfernt und die Taschen zur Entfernung des nicht polymerisierten Acrylamids mit ddH₂O gespült. Das Gel wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und die Proteinproben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde anschließend bei einer Spannung von 200 V durchgeführt.

2.2.4.10 Immunpräzipitation in großem Maßstab

2 x 10⁸ BSp73ASML Zellen wurden mit einem Zellschaber in detergensfreiem Lysispuffer geerntet. Der Zellaufschluss wurde durch 30 Zyklen in einem Dounce-Homogenisator er-

reicht und die Zellfragmente durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g für 1 h bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets einer Lyse mit 1% Triton X-100 unterzogen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 20 000 x g für 10 min wurden die Triton X-100 unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der Überstand (Lysat) wurde anschließend in zwei gleiche Volumina aufgeteilt, wobei eine Hälfte mit dem organischen Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle inkubiert und die andere Hälfte mit dem chemischen Quervernetzungsreagenz DSP (1 mM Endkonzentration) versetzt wurde. Nach der chemischen Quervernetzung wurden beide Proben einer Immunpräzipitation mit D5.7 unterzogen. Schließlich wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Kolloidal-Coomassie gefärbt.

2.2.4.11 GST-„pull down assay“

Das Prinzip eines GST-„pull down assays“ entspricht im Wesentlichen dem einer Immunpräzipitation. Ein GST-Fusionsprotein, hier GST-ZPD-EpCAM (die zytoplasmatische Domäne von EpCAM fusioniert mit GST, vgl. Abschnitt 2.2.3.11) wurde zusammen mit einem Zelllysate (1% Triton X-100) inkubiert. Pro 500 µl Lysat (1×10^6 BSp73ASML-Zellen) wurden 500 µg des aufgereinigten Fusionsproteins zugegeben. Dabei kann es zur Ausbildung von Komplexen zwischen dem GST-Fusionsprotein und potentiellen Interaktionspartnern aus dem Zelllysate kommen. Nach Zugabe von Glutathion-Agarose wurde das GST-Fusionsprotein an das Glutathion gebunden und durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mehrfach mit Lysispuffer gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C 5 min gekocht. Die Proben konnten danach in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot hinsichtlich ihrer mit dem GST-Fusionsprotein interagierenden Moleküle analysiert werden. Für das GST-ZPD-EpCAM Konstrukt würde ein positives Signal im Western Blot bedeuten, dass ein Protein unter den gegebenen Lysisbedingungen spezifisch mit dem zytoplasmatischen Teil assoziiert ist. Als Negativkontrolle diente dabei aufgereinigtes GST-Protein, mit dem parallel ein GST-„pull down assay“ durchgeführt wurde.

2.2.4.12 Kolloidal - Coomassie - Färbung von Proteingelen und massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden

Bei der Herstellung der Gele, der anschließenden Coomassie-Färbung sowie der Vorbereitung der Gele auf eine massenspektrometrische Untersuchung, ist darauf zu achten, das Gel nicht durch Keratine oder sonstige Proteine zu kontaminieren.

Fixierungslösung: 7% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol;

Färbelösung: 4 VT „Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate“ (Sigma, Seelze); 1 VT Methanol;

Entfärber A: 10% (v/v) Essigsäure; 25% (v/v) Methanol;

Entfärber B: 25% (v/v) Methanol;

Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel durch 1 h Inkubation in Fixierungslösung. Anschließend wurde das Gel für 2 h mit Färbelösung bedeckt. Die Entfärbung erfolgte unter leichtem Schütteln für 30 s in Entfärber A und bis zu 1 Tag in Entfärber B. Nach der Dokumentation des gefärbten Gels wurden alle Banden von Interesse mit einem sauberen Skalpell herausgetrennt und tryptisch verdaut. Die Vorbereitung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden von der zentralen Einrichtung des DKFZ (Zentrale Proteinanalytik, Dr. M. Schnölzer) durchgeführt.

2.2.4.13 Massenspektrometrie

Trypsin-Spaltung:

Die Proteinbanden wurden aus dem mit kolloidalem Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnitten, in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und nacheinander mit 100 µl ddH₂O und 100 µl Acetonitril/ddH₂O (1:1, v/v) gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke mit 100 µl 10 mM DTT versetzt und bei 56 °C eine Stunde inkubiert. Nach der Reduktion wurden die Gelstücke mit H₂O gewaschen und zur Alkylierung der Cysteine mit 100 µl 55 mM Iodacetamid 30 min bei RT inkubiert. Die Gelstücke wurden danach jeweils fünfmal mit 100 µl ddH₂O und 100 µl Acetonitril/ddH₂O (1:1, v/v) gewaschen und mit 100 µl 100% Acetonitril dehydriert. Anschließend wurden je nach Größe der Gelstücke 5-10 µl Trypsinlösung („Sequencing grade modified trypsin“, Promega, Mannheim, 16 ng/µl) zugegeben und die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde durch Einfrieren der Proben gestoppt.

MALDI-Massenspektrometrie:

MALDI („matrix assisted laser desorption/ionisation“) - Massenspektren wurden mit einem „Reflex II time-of-flight“ Instrument (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen) aufgezeichnet, das mit einer SCOUT-26 Probenquelle und einem 337 nm Stickstofflaser ausgerüstet ist. Alle Massenspektren wurden im Positiv-Ionen-Reflektor-Modus mit verzögerter Extraktion („positive ion reflector mode with delayed extraction“) aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 26,5 kV, die Spannung des Reflektors 30,0 kV und die Spannung der Extraktionsplatte 20,6 kV. Die Spektren wurden aus 50 bis 200 individuellen Laserschüssen aufaddiert. Die Spektren wurden intern mit den beiden Autolyseprodukten des Trypsins bei m/z (Masse-zu-Ladungs Verhältnis) 842,50 und m/z 2211,10 kalibriert.

Für die massenspektrometrische Analyse des tryptischen Verdaus wurden die Proben auf „Anchor-Targets“ aufgebracht. Hierzu wurde zunächst 1 μ l der Probe, und vor dem vollständigen Eintrocknen, 1 μ l der Matrixlösung (gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (Sigma-Aldrich, Seelze) in 0,1% TFA/33% Acetonitril zehnfach verdünnt mit Ethanol/Aceton (2:1 v/v)) auf individuelle „Spots“ auf dem „Target“ pipettiert. Nach dem Eintrocknen wurden die „Spots“ mit 0,1% wässriger TFA-Lösung gewaschen und mit 0,5 μ l Ethanol/Aceton/0,1% TFA (6:3:1 v/v/v) umkristallisiert.

„Post source decay“ (PSD)-Analyse:

PSD-Analysen wurden im Positiv-Ionen-Reflektor-Modus mit verzögerter Extraktion durchgeführt. Die Ausblendung des untersuchten Ions erfolgte mit einer Genauigkeit von ± 40 Da. Die Spannung des Reflektors wurde schrittweise in 14 Stufen erniedrigt, so dass 14 Segmente erhalten wurden. Für jedes Segment wurden mindestens 200 individuelle Laserschüsse aufaddiert. Das gesamte Fragment-Ionen-Spektrum erhielt man durch Zusammenfügen aller Segmente mit der FAST Software (Bruker-Daltronik GmbH, Bremen). Die Kalibrierung der Fragment-Ionen-Spektren wurde extern mit den Fragmentmassen des adeno-corticotropen Hormons 18-39 (ACTH 18-39) durchgeführt.

Datenbanksuche:

Einfach geladene monoisotopische Peptidmassen wurden als Eingabe bei der Datenbanksuche verwendet. Die Suche wurde mit der NCBI Inr Datenbank und dem ProFound Algorithmus (<http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe>) durchgeführt. Isoelektrische Punkte von

0 bis 14 wurden zugelassen, Carbamidomethylierung der Cysteine wurden als fixe und Oxidation der Methionine wurde als mögliche Modifikationen in die Suche einbezogen. Maximal eine nicht erfolgte tryptische Spaltung wurde berücksichtigt und eine Abweichung der monoisotopischen Peptidmassen von +/-100 ppm oder +/- 0,1 Da wurde toleriert.

Mit den Fragmentmassen aus PSD Experimenten wurde in der NCBInr Datenbank gesucht, wobei der MS-Tag Algorithmus aus dem „Protein Prospektor Software Paket“ (<http://prospector.ucsf.edu>) verwendet wurde. Hierbei wurde eine Massenabweichung des Elternmoleküls von +/- 0,1 Da und der Fragment-Ionen von +/- 0,5-0,8 Da toleriert.

2.2.4.14 Silberfärbung und Trocknung von Proteingelen

Fixierungslösung:	150 ml Ethanol; 50 ml Essigsäure; 300 ml ddH ₂ O;
Sensitivierungslösung:	0,3% (w/v) Kalium Tetrathionat; 0,5 M Kaliumacetat; 30% (v/v) Ethanol;
Färbelösung:	0,5% (w/v) Silbernitrat;
Entwickler:	7,5 g Kaliumcarbonat, 31,3 µl Natriumthiosulfatpentahydrat (10%); 75 µl Formalin (37%); auf 500 ml mit ddH ₂ O aufgefüllt;
Stopplösung:	20 g Tris; 10 ml Essigsäure; auf 500 ml mit ddH ₂ O aufgefüllt;

Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel durch 4 x 30 min Inkubation in Fixierungslösung. Um die Empfindlichkeit der Silberfärbung zu erhöhen wurde das Gel für 45 min mit der Sensitivierungslösung überschichtet und 6 x 10 min in ddH₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte für 1-2 h in Silbernitratlösung. Nach kurzem Waschen in ddH₂O, max. 15 s, wurde das Gel für 30-40 min in Entwicklerlösung inkubiert. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Einlegen des Gels für 45 min in Stopplösung beendet. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung des gefärbten Gels für 2 h bei 80 °C im Vakuumtrockner (Gel Dryer, Model 583, Biorad, Philadelphia, USA) und die Dokumentation des Ergebnisses.

2.2.4.15 „In-vitro kinase assay“

„Kinase assay“-Puffer: 25 mM HEPES, pH 7,2; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 5 mM MnCl₂; 1 mM Natriumorthovanadat; 10 mM Natriumfluorid;

Für einen „in-vitro kinase assay“ wurde zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt, wobei alle verwendeten Puffer phosphatfrei gehalten wurden. Das Protein G Sepharose Pellet wurde nach der IP einmal mit Lysispuffer ohne Detergens und einmal mit „kinase assay“-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde anschließend mit 50 µl „kinase assay“-Puffer, der 10 µCi [γ -³²P] ATP enthielt, für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 VT 6 x Laemmli-Puffer gestoppt. Die Probe wurde dann 5 min bei 95 °C gekocht und einer SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiografie unterzogen.

2.2.4.16 Western Blot Analyse (modifiziert nach Towbin et al., 1979)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol;

Blockierungslösung: 5% fettfreies Milchpulver; 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS;

PBST: 0,1% Tween 20 in PBS;

Detektion: ECL Western Blotting Detection Reagents;

Polyacrylamidgele wurden nach Ende der Elektrophorese 10-15 min, je nach Dicke des Gels, bei RT in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde eine Nitrozellulosemembran mit den Maßen des Gels 15 min in ddH₂O aktiviert und anschließend weitere 15 min in Transferpuffer eingelegt. Zwei Schaumstoffpolster sowie vier auf Gelgröße zugeschnittene Whatman 3MM-Filterpapiere wurden ebenfalls 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer der Proteine wurden zwei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier, das Gel, die Membran und wieder zwei Lagen Filterpapier zwischen die Schaumstoffpolster platziert und in die Transfervorrichtung eingespannt. Dieses „Sandwich“ wurde in die Transferkammer gehängt, die mit Transferpuffer gefüllt wurde. Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte ÜN bei 4 °C und einer Spannung von 30 V. Die immobilisierten Proteine konnten dann wie folgt detektiert werden:

Antikörpernachweis:

Die Membranen wurden, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, für 1 h in 5% fettfreiem Milchpulver (w/v) in PBST auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Membranen 3 x 5 min in PBST gewaschen und mit 2-5 µg/ml aufgereinigtem Primärantikörper oder Hybridomüberstand für 1 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen in PBST wurden die Membranen mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper für 1 h unter Schütteln inkubiert und überschüssiger Antikörper durch wiederholtes Waschen in PBST entfernt. Für den Fall des Nachweises biotinylierter Proteine wurden die Membranen mittels ExtrAvidin (Sigma, Seelze) inkubiert. Abschließend wurden die Membranen mit 1 ml ECL-Substrat Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg) pro 60 cm² Membran für 1 min inkubiert, zwischen zwei Whatman 3MM-Filterpapieren getrocknet und die Membran auf einem Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Anschließend wurden die Filme mittels der Entwicklermaschine „Amersham Hyperprocessor“ (Amersham Biosciences, Freiburg) entwickelt. Die Markerbanden wurden auf den Film übertragen, um eine Größenzuordnung der Signale zu ermöglichen.

Autoradiografie:

Im Falle radioaktiv markierter Proteine (³²P) wurden die Membranen nach dem Transfer zwischen zwei Whatman 3MM-Filterpapieren getrocknet und in einer Entwicklerkassette auf einem Hyperfilm MP (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Um die Entwicklungsdauer abschätzen zu können, wurde zuvor die Menge der Radioaktivität auf der Membran mit einem Zählrohr gemessen. Die Entwicklungszeiten lagen zwischen 2 und 14 Tagen. Anschließend wurden die Filme mittels der Entwicklermaschine „Amersham Hyperprocessor“ (Amersham Biosciences, Freiburg) entwickelt. Nach dem Entwickeln wurden die Banden des Größenmarkers auf den Film übertragen, um eine Größenzuordnung der Signale zu ermöglichen.

2.2.4.17 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (modifiziert nach Schuck et al., 2003)

Saccharoselösungen: 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM PMSF;
1 x Protease Inhibitor Mix; 5-50% Saccharose;

BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Brij98 enthielt, lysiert. Danach wurden nicht gelöste Zellfragmente und Zellkerne durch Zentrifugation bei 20 000 x g 10 min bei 4 °C abgetrennt. Lysate von etwa 5×10^6 Zellen wurden auf 40% Saccharosekonzentration eingestellt. 4,5 ml dieser Lösung wurden in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Diese erste Schicht wurde dann vorsichtig mit 4,5 ml 30% Saccharoselösung und danach mit 3,0 ml 5% Saccharoselösung überschichtet. Diese Proben wurden dann 18 h bei 200 000 x g (Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld) in einem SW41Ti Rotor (Beckman Coulter, Krefeld) bei 4 °C zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufs wurden 12 Fraktionen (jeweils 1 ml), beginnend vom oberen Ende des Gradienten, abgenommen. Aliquots jeder Fraktion wurden anschließend entweder einer Immunpräzipitation mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 unterzogen oder direkt in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Als Positivkontrolle für die detergensunlöslichen Fraktionen (unvollständig solubilierte Proteine) diente dabei Caveolin und für die detergenslöslichen Fraktionen (vollständig solubilierte Proteine) der Transferrin-Rezeptor.

3 ERGEBNISSE

Zur Identifizierung mit EpCAM interagierender Proteine war ein konventioneller Western Blot (WB) aufgrund der unbekanntem Identität möglicher assoziierter Proteine als Analyse-methode ungeeignet. Um erste Hinweise auf potentielle Kandidaten zu erhalten, wurde deshalb die Methode der Oberflächenbiotinylierung angewandt. Dazu wurden adhären-te Zellen der stark metastasierenden Ratten Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73ASML mit membranimpermeablem Biotin-X-NHS behandelt, in einem Triton X-100 enthaltenden Puffer lysiert und einer Immunpräzipitation (IP) unter Verwendung der Antikörper D5.7 (Maus anti-Ratten EpCAM), D6.1 (Maus anti-Ratten D6.1A) und A2.6 (Maus anti-Ratten CD44v6) unterzogen. Die Immunpräzipitationen mit D6.1 und A2.6 dienten als Negativkontrollen, da beide Transmembranproteine, das Tetraspaninmolekül D6.1A und das Zell-Matrix Adhäsionsmolekül CD44, von BSp73ASML exprimiert werden und unter den vorgegebenen Lysisbedingungen nicht mit EpCAM assoziiert sind (Schmidt et al., 2004). Die im Anschluss an die Immunpräzipitation erfolgte Auftrennung der Proteine in einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und nachfolgende Analyse im Western Blot erbrachte keinen Hinweis auf kopräzipitierende Proteine. In der EpCAM IP konnte keine kopräzipitierende Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Experiment ergeben sich drei mögliche Schlussfolgerungen: (1.) EpCAM ist in der Zelllinie BSp73ASML nicht unmittelbar mit weiteren Proteinen assoziiert; (2.) Es handelt sich um intrazelluläre Proteine, die durch eine Oberflächenbiotinylierung nicht detektierbar sind; Oder (3.) die extrazelluläre(n) Domäne(n) eines assoziierten, integralen Membranproteins ist nicht biotinylierbar. Es ist bekannt, dass extrazelluläre Domänen einiger Transmembranproteine z. B. aufgrund einer bestimmten Konformation des Proteins oder posttranslationaler Modifikationen kaum biotinylierbar sind. Aus diesem Grund wurde versucht, mit Hilfe der Biotinylierung eines BSp73ASML Lysats das Problem zu umgehen.

3.1 Ein 20 kDa Protein interagiert direkt mit EpCAM

3.1.1 Kopräzipitation eines 20 kDa Proteins mit EpCAM

Mittels Biotinylierung des Lysats können auch zytoplasmatische Proteine bzw. intrazelluläre Domänen von Transmembranproteinen mit dem Biotin-X-NHS-Ester in Kontakt gebracht werden. Die Immunpräzipitation unter Verwendung der Antikörper D5.7, D6.1 und A2.6 wurde wiederholt. Nach anschließender SDS-PAGE und Detektion der Proben im Western Blot konnte eine mit EpCAM kopräzipitierende Bande detektiert werden, die in der Immunpräzipi-

tation mit D6.1 und A2.6 nicht auftaucht. In Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass EpCAM, im Gegensatz zu dem Tetraspanin D6.1A oder der varianten Isoformen von CD44, in der Lage ist, unter den gegebenen, stringenten Lysisbedingungen (1% Triton X-100) ein Produkt einer molekularen Masse von etwa 20 kDa zu präzipitieren:

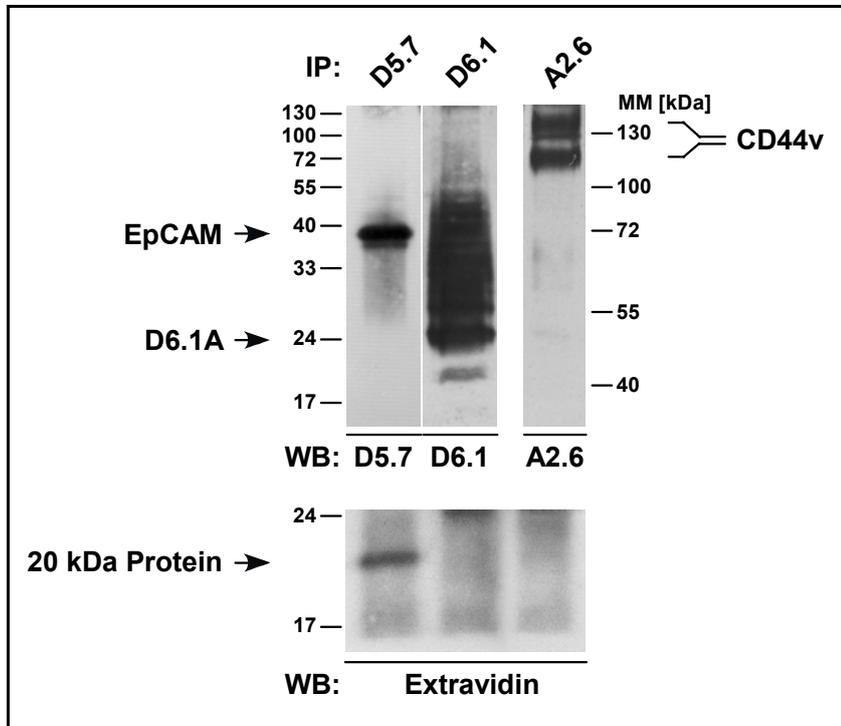


Abb. 3.1: Koimmunpräzipitation eines 20 kDa Proteins mit EpCAM. 3×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, 1 x Protease Inhibitor Mix, 1% Triton X-100) aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend biotinyliert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.4) und in gleichen Anteilen für die Immunpräzipitation (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.7) eingesetzt. Dabei wurden die Proben mit D5.7 (Maus anti-Ratten-EpCAM), D6.1 (Maus anti-Ratten-D6.1A) oder A2.6 Antikörper (Maus anti-Ratten-CD44v6) inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte für das D5.7- und D6.1-Präzipitat in einer 12%igen und für das A2.6-Präzipitat in einer 8%igen SDS-PAGE (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.9). Zur Inkubation mit ExtrAvidin sind alle Proben in einer 12%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt worden. Im anschließenden Western Blot (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.16) wurden die Nitrozellulosemembranen mit den entsprechenden Primärantikörpern bzw. ExtrAvidin inkubiert. Als Sekundärantikörper diente Esel anti-Maus-HRP. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des „Enhanced Chemiluminescence“ Systems (Amersham Biosciences, Freiburg) (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.16).

Dieses Ergebnis deutet auf die Existenz eines Komplexes aus EpCAM und einem 20 kDa Molekül hin. Außerdem scheint das EpCAM-assoziierte 20 kDa Protein entweder ein zyto-

plasmatisches Protein zu sein oder ein Transmembranmolekül, dessen extrazelluläre Aminosäuresequenz nicht zu biotinylieren ist. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich bei der 20 kDa Bande um ein Artefakt aufgrund der verwendeten biochemischen Methode handelte, waren weitere Experimente notwendig.

3.1.2 Eine 55 kDa Bande erscheint nach DSP-Quervernetzung

Ein weiteres Mittel zur Untersuchung und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen ist die chemische Quervernetzung mit Dithiobis-(Succinimidylpropionat) (DSP). Diese Substanz ist in der Lage, Proteine, deren Distanz weniger als 1,2 nm beträgt, kovalent aneinander zu binden. Aufgrund des geringen Abstands der beteiligten Moleküle ist gewährleistet, dass nur *direkte* Bindungspartner quervernetzt werden.

Im folgenden Experiment wurde DSP eingesetzt, um die Frage zu klären, ob ein 20 kDa Molekül direkt mit EpCAM über eine Protein-Protein Interaktion assoziiert ist. Die Inkubation der Lysate von BSp73ASML Zellen und Zellen der Ratten Kolonkarzinom-Zelllinie PROb mit verschiedenen DSP-Konzentrationen diente zur exakteren Abschätzung einer möglichen Interaktion. Aufgrund der Unlöslichkeit von DSP in Wasser wurde das chemische Quervernetzungsreagenz in dem unpolaren, organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) solubilisiert. Mit DMSO allein versetzte Lysate dienen als Negativkontrolle. Die Resultate sind in Abbildung 3.2 dargestellt:

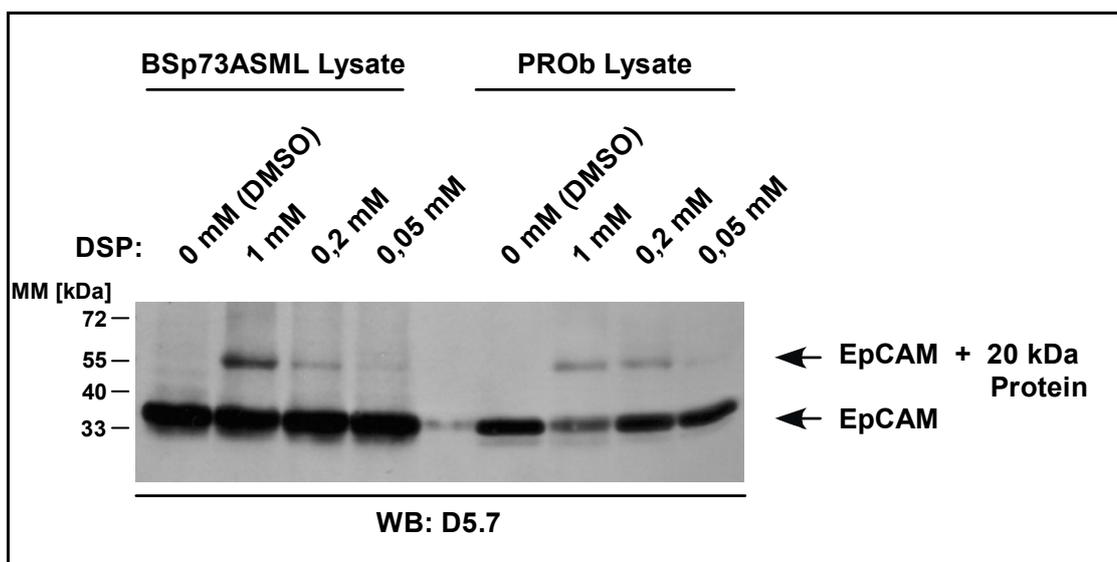


Abb. 3.2: Nach chemischer Quervernetzung mit DSP erscheint eine 55 kDa Bande. 4×10^6 BSp73ASML Zellen bzw. 4×10^6 PROb Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Gleiche Teile des jeweiligen Lysats wurden mit 1 mM, 0,2 mM oder

0,05 mM DSP gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. mit reinem Lösungsmittel (DMSO) (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.5) behandelt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der Nachweis von EpCAM mittels Inkubation mit D5.7 als Primärantikörper. Als Sekundärantikörper diente Esel anti-Maus-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Die mit DSP behandelten Proben aus Abbildung 3.2 weisen neben EpCAM (38 kDa) eine zusätzliche Bande bei etwa 55 kDa auf, deren Intensität mit sinkender DSP-Konzentration abnimmt. In der Negativkontrolle mit DMSO hingegen (Spur 1 und 5) ist keine 55 kDa Bande zu erkennen. Diese Beobachtung spricht für einen Komplex bestehend aus EpCAM und einem 20 kDa Molekül, in dem beide Moleküle über eine direkte Protein-Protein Interaktion miteinander assoziiert sind. Die Hypothese, dass es sich bei der 55 kDa Bande um einen Komplex, bestehend aus EpCAM und einem spezifisch gebundenen 20 kDa Protein handelt, musste durch weitere Experimente abgesichert werden. Unter Verwendung von Detergenzien unterschiedlicher Stringenz (Tab. 3.1) wurde zunächst die Stabilität der möglichen Protein-Protein Interaktion überprüft.

Detergens	Art	CMC [% (w/v)]	HLB-Wert
SDS	anionisch	0,23	40
Triton X-100	nicht-ionisch	0,021	13,5
Lubrol WX	nicht-ionisch	0,006	14,9
Brij98	nicht-ionisch	0,004	15,3

Tab. 3.1: Verwendete Detergenzien. In der Regel gilt für nicht-ionische Detergenzien: Je niedriger der Wert der „hydrophilic-to-lipophilic balance“ (HLB), desto stringenter ist das Detergens. Diese Annäherung gilt hauptsächlich für Detergenzien einer bestimmten Serie, wie z. B. der Triton- oder der Brij-Serie. Die Stringenz ist ein Maß für die Eigenschaft eines Detergens, Proteine vollständig in Lösung zu bringen. SDS als denaturierendes, anionisches Detergens nimmt in dieser Tabelle eine Sonderstellung ein. Sein HLB-Wert kann daher nicht mit denen der anderen Detergenzien verglichen werden. Die kritische Mizellenkonzentration (CMC, „critical micelle concentration“) gibt an, in welcher Konzentration das Detergens vorliegen muss, um in wässriger Lösung Mizellen bilden zu können und damit Proteine lösen zu können (<http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/det/det2.htm>).

Die in der Tabelle 3.1 aufgeführten Detergenzien wurden im nachstehenden Experiment zur Lyse von BSp73ASML Zellen verwendet. Nach DSP-Quervernetzung und paralleler Behandlung der Zelllysate mit DMSO als Negativkontrolle wurden die Proben in einer SDS-PAGE

elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit D5.7 Antikörper:

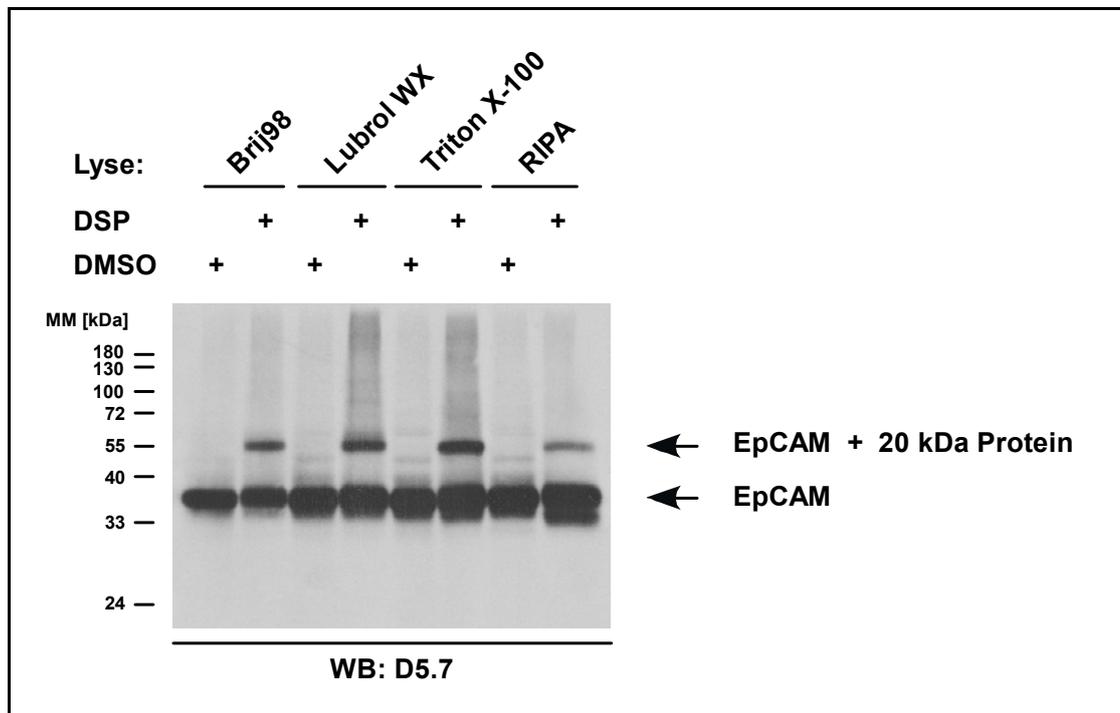


Abb. 3.3: Die Interaktion von EpCAM und einem 20 kDa Protein widersteht äußerst stringenten Lysisbedingungen. Je 3×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffern aufsteigender Stringenz (1% Brij98, 1% Lubrol, 1% Triton X-100 und RIPA [50 mM HEPES, pH 7,2; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% Natriumdeoxycholat; 0,1% SDS]) lysiert und gleiche Teile des jeweiligen Lysats mit 1 mM DSP bzw. DMSO (neg. Kontrolle) behandelt. Die Auftrennung sowie die Detektion der Proben erfolgte wie unter Abbildung 3.2 beschrieben.

Der Abbildung 3.3 lässt sich entnehmen, dass die Interaktion zwischen EpCAM und einem 20 kDa Molekül unter allen verwendeten Lysisbedingungen stabil ist. Der 55 kDa Komplex ist sogar nach einer Lyse der BSp73ASML Zellen in denaturierendem RIPA-Puffer detektierbar. Dieses Resultat deutet auf eine außergewöhnlich starke Assoziation zwischen EpCAM und einem 20 kDa Protein hin. Weitere Experimente lieferten Hinweise darauf, dass die 55 kDa Bande (vgl. Abb. 3.2 und 3.3) und die 20 kDa Bande (vgl. Abb. 3.1) das gleiche Protein enthalten.

Zunächst wurden die biochemischen Methoden DSP-Quervernetzung und Biotinylierung parallel durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Triton X-100 Lysate von BSp73ASML Zellen einer DSP- bzw. Biotin-X-NHS-Behandlung unterzogen. Nach einer Immunpräzipitation mit dem Antikörper D5.7 wurden die Proben in einer SDS-PAGE separiert. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe der in Abbildung 3.4 angegebenen Antikörper und Reagenzien detektiert:

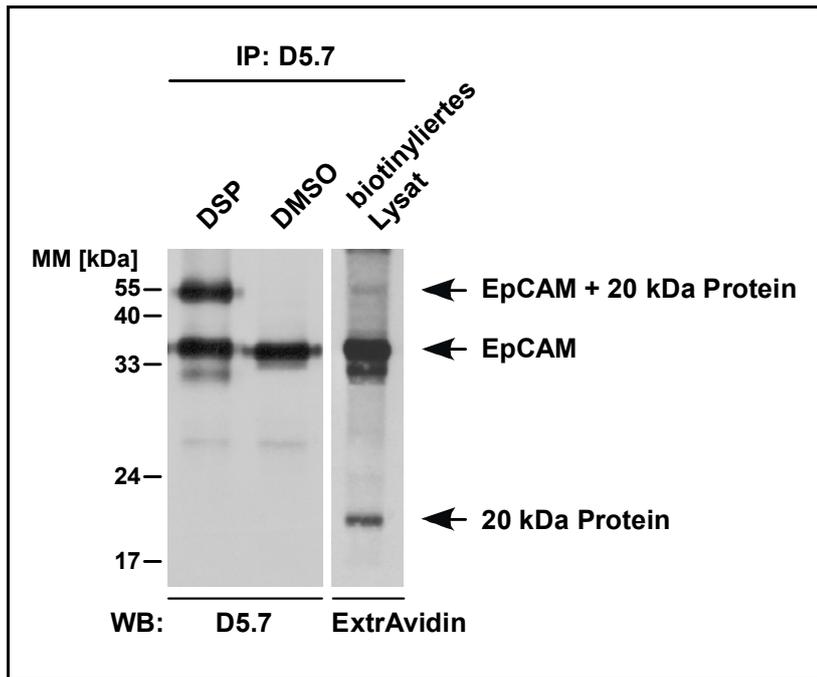


Abb. 3.4: Direkte Gegenüberstellung von DSP-Quervernetzung und Biotinylierung. 4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Gleiche Mengen des Lysats wurden entweder mit 1 mM DSP oder dem organischen Lösungsmittel DMSO (Spur 1 und 2) bzw. 0,2 mg/ml Biotin-X-NHS (Spur 3) inkubiert. Die Immunpräzipitation sowie die Auftrennung der Proben und die Detektion der Proteine wurde gemäß der Beschreibung unter Abbildung 3.1 vorgenommen.

In Spur 3 der Abbildung 3.4 ist wiederum das mit EpCAM kopräzipitierende 20 kDa Molekül zu erkennen. Die 55 kDa Bande (Spur 1) könnte also tatsächlich aus einem Komplex aus EpCAM, mit einer molekularen Masse von 38 kDa, und dem 20 kDa Protein zusammengesetzt sein. Mit Hilfe einer Silberfärbung wurde der Versuch unternommen, diese Hypothese zu verifizieren, da die detektierte 20 kDa Bande im Vergleich zur EpCAM Bande ein nur schwaches Signal ergab. Die Silberfärbung stellt eine sehr empfindliche Proteinfärbetechnik dar und eignet sich sehr gut zur Detektion geringer Proteinmengen (Sensitivitätsgrenze: etwa 1 ng Protein). Für die Silberfärbung wurden BSp73ASML Zelllysate unter der Verwendung des stringenten Detergens Triton X-100 hergestellt. Nach Behandlung der Lysate mit DSP bzw. DMSO wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Polyacrylamidgel anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Abbildung 3.5 zeigt das Resultat dieser Färbung:

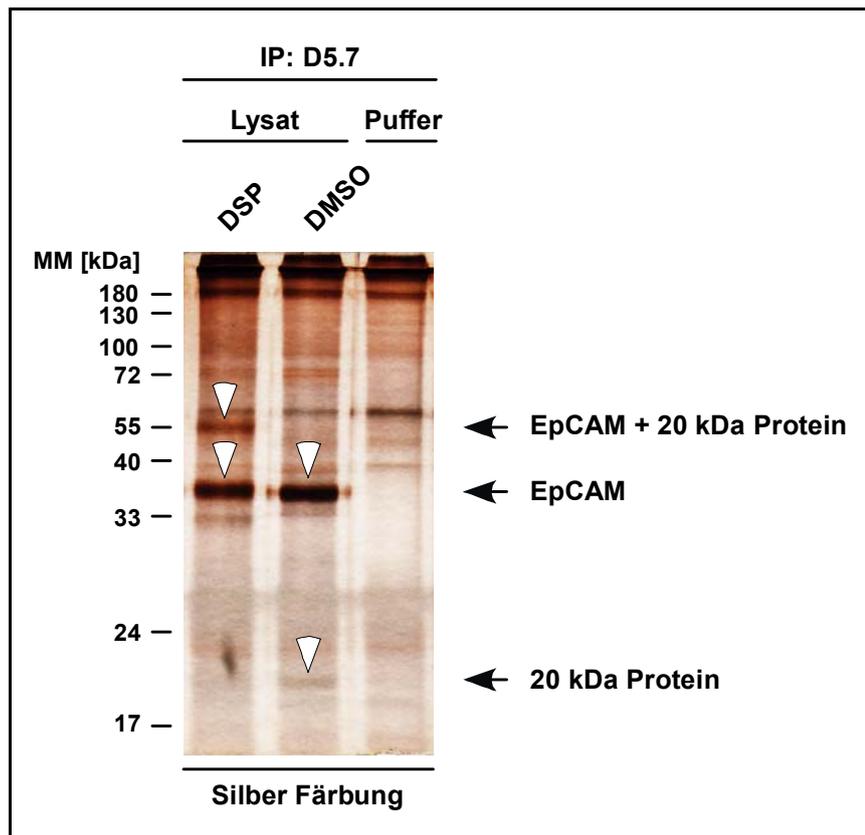


Abb. 3.5: Die 20 kDa und die 55 kDa Bande enthalten das gleiche Protein. Gleiche Anteile des Lysats (1% Triton X-100) von 4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden entweder mit 1 mM DSP (Spur 1) oder DMSO (Spur 2) behandelt. Immunpräzipitationen wurden mit D5.7 durchgeführt und die Proben nach Auftrennung in einem 12%igen Polyacrylamidgel einer Silberfärbung unterzogen. Zur Identifizierung unspezifischer Banden wurde eine Kontroll-Immunpräzipitation ohne zelluläres Material, d. h. mit Lysispuffer als Lysat-Ersatz, vorgenommen (Spur 3). Das gefärbte Polyacrylamidgel wurde anschließend getrocknet (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.14).

Die in Spur 2 (DMSO) aufgetragene Probe der Abbildung 3.5 zeigt ein ähnliches Bandenmuster wie die biotinylierte Probe in Abbildung 3.4 (Spur 3), wobei das deutlich sichtbare Signal bei 38 kDa der Molekülmasse von EpCAM entspricht. Des Weiteren ist eine Bande bei etwa 20 kDa zu erkennen. Mittels Silberfärbung konnte damit ebenfalls bestätigt werden, dass eine mit EpCAM unter stringenten Lysisbedingungen kopräzipitierende 20 kDa Bande auftritt. Im Gegensatz zur DMSO-Kontrollprobe (Spur 2), ist die 20 kDa Bande in der mit DSP behandelten Probe (Spur 1) nahezu vollständig verschwunden. Dieser Befund ist ein direkter Hinweis darauf, dass ein 20 kDa Molekül durch die DSP-Quervernetzung kovalent an EpCAM gebunden wird. Offensichtlich enthalten die 55 kDa Bande und die 20 kDa Bande das gleiche Protein. Die in Spur 3 aufgetragene Probe zeigt den durch Lysispuffer und Immunpräzipitation verursachten Hintergrund.

So konnte mit Hilfe von zwei unabhängigen Detektionsmethoden, dem Western Blot und der Silberfärbung festgestellt werden, dass ein 20 kDa Protein mit EpCAM kopräzipitiert und eine 55 kDa Bande nach DSP-Quervernetzung auftritt. Die Möglichkeit, dass beide Banden Artefakte aufgrund der verwendeten Methoden darstellten, konnte daher nahezu ausgeschlossen werden. Außerdem deuten die Resultate nach DSP-Behandlung auf eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen EpCAM und einem weiteren Molekül hin, welche selbst unter äußerst stringenten Lysisbedingungen noch stabil ist. Die Silberfärbung lieferte schließlich ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei der zusätzlichen Masse in der 55 kDa Bande, sowie bei dem 20 kDa Molekül um das gleiche Protein handelt.

3.2 Das 20 kDa Protein ist Claudin-7

3.2.1 Identifizierung des 20 kDa Proteins mittels massenspektrometrischer Analyse

Die Identifizierung des 20 kDa Proteins erfolgte über eine massenspektrometrische Analyse. Hierzu wurde eine Immunpräzipitation in großem Maßstab vorgenommen. Eine größere Anzahl BSp73ASML Zellen wurde durch mechanisches Aufbrechen im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und bei 100 000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Mit Hilfe dieses Zwischenschritts wurde Membranmaterial im Pellet angereichert, wobei lösliche, zytoplasmatische Proteine entfernt wurden. Nach der Lyse des Pellets mit anschließender DSP-Quervernetzung und folgender Immunpräzipitation, wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Daraufhin wurden die im Polyacrylamidgel separierten Proteine mittels Kolloidal-Coomassie gefärbt. Die Sensitivitätsgrenze für eine Färbung von Proteinen mit dem Kolloidal-Coomassie-Farbstoff liegt bei einer Proteinmenge von etwa 100 ng. In Abbildung 3.6 ist die mit DSP bzw. DMSO behandelte Probe nach SDS-PAGE und Kolloidal-Coomassie Färbung dargestellt:

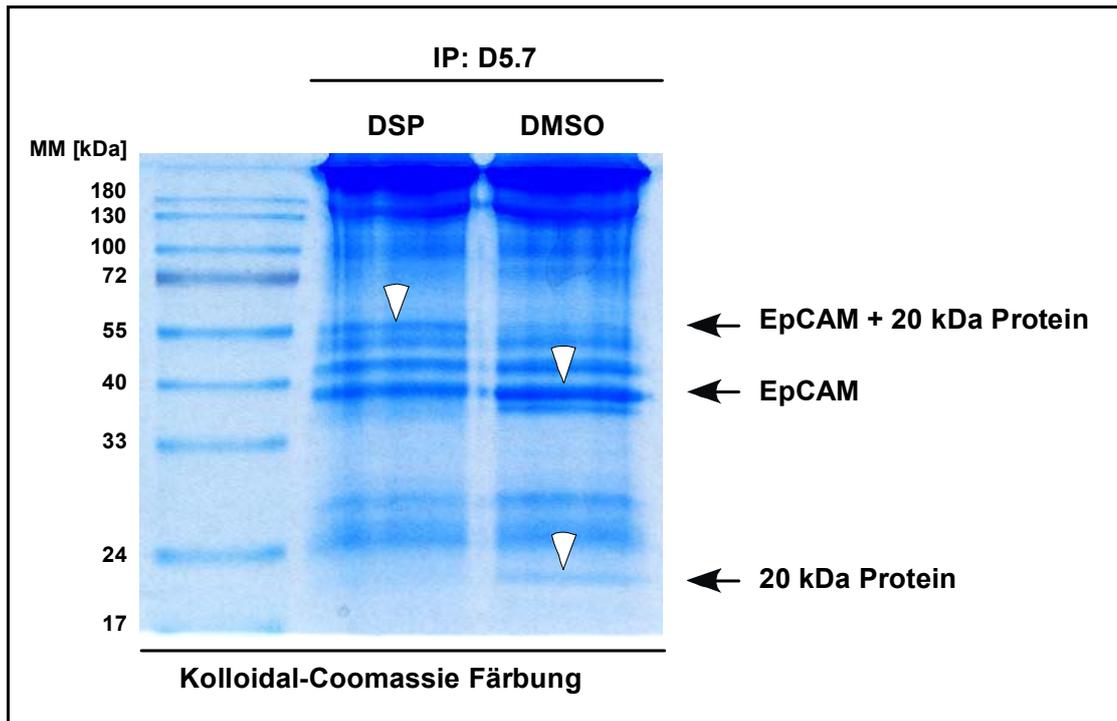


Abb. 3.6: Aufreinigung des 20 kDa Proteins zur massenspektrometrischen Analyse. 2×10^8 BSp73ASML Zellen wurden in 30 ml detergentenfreiem Lysispuffer homogenisiert. Durch Ultrazentrifugation bei $100\,000 \times g$ für 4 h wurden die Zellfragmente pelletiert und in 1% Triton X-100 enthaltendem Puffer lysiert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.10). Nach Abtrennung des unlöslichen Materials durch Zentrifugation bei $20\,000 \times g$ wurden gleiche Teile des Lysats mit 1 mM DSP oder DMSO behandelt und anschließend einer IP mit D5.7 unterzogen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE mit anschließender Kolloidal-Coomassie-Färbung (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.12). Die markierten Banden wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und einer massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF und PSD (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.13) unterzogen. Die massenspektrometrischen Analysen sind von Sabine Fiedler und Dr. Martina Schnölzer, Abteilung Zentrale Proteinanalytik, DKFZ, durchgeführt worden.

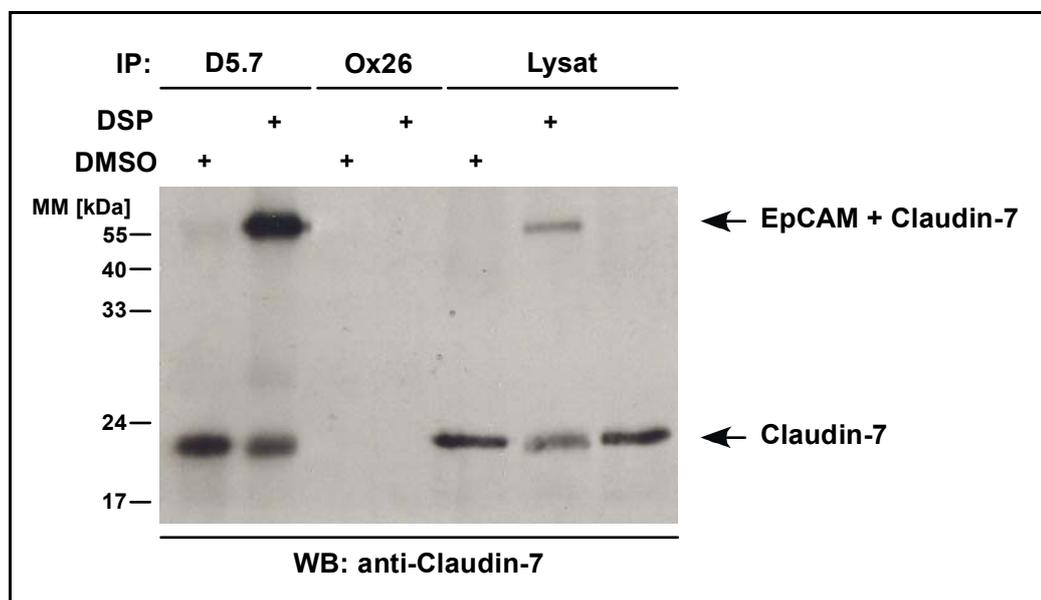
Der obere weiße Pfeilkopf in der mit DSP behandelten Probe markiert in Abbildung 3.6 eine 55 kDa Bande, die in der Negativkontrolle mit DMSO nicht auftritt. Es handelt sich hierbei um den bereits im Western Blot und in der Silberfärbung gezeigten Komplex zwischen EpCAM und dem 20 kDa Protein. Die EpCAM Bande ist in beiden Proben deutlich bei etwa 38 kDa zu sehen, während eine 20 kDa Bande nur in der DMSO-Kontrolle erscheint. Um die Identität des 20 kDa Proteins zu ermitteln, wurden die 55 kDa Bande (EpCAM + 20 kDa Protein), die 38 kDa Bande (EpCAM) und die 20 kDa Bande (unbekanntes Protein) mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt, tryptisch verdaut und einer „matrix assisted laser desorption/ionisation“ - Massenspektrometrie (MALDI-MS) mit anschließendem „time of flight“ - Analysator (TOF) unterzogen. Nach der Analyse folgte die Zuordnung der erhaltenen Massenspek-

tren durch einen Datenbankabgleich (Datenbank NCBI Nr. 10.21.2003). Die 38 kDa Bande konnte dabei als EpCAM identifiziert werden. Die Analyse der 55 kDa Bande ergab kein eindeutiges Resultat. Zwar ist es gelungen die Existenz von EpCAM in dieser Bande nachzuweisen, jedoch war die Identifizierung weiterer Proteine durch den Einsatz von DSP unmöglich geworden. Dagegen zeigte die Analyse der 20 kDa Bande ein intensives Peptidsignal im Massenspektrum bei einem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) von 1723,86. Aus der folgenden Sequenzierung mittels der „post source decay“ - „matrix assisted laser desorption/ionisation“ (PSD-MALDI)-Analyse resultierte das tryptische Peptid „MYDSVLALPAATQATR“, das eindeutig als das „tight junction“ Protein Claudin-7 über einen Datenbankabgleich identifiziert werden konnte.

3.2.2 Claudin-7 kopräzipitiert mit EpCAM unter stringenten Lysisbedingungen

Eine erste Bestätigung der massenspektrometrischen Untersuchungen lieferte ein Western Blot mit einem polyklonalen anti-Claudin-7 Antikörper. Mit Hilfe dieses Antikörpers gelang es, die Existenz von Claudin-7 in einem Komplex mit EpCAM zu verifizieren (Abb. 3.7). Die mit DSP respektive DMSO behandelten BSp73ASML Lysate wurden Immunpräzipitationen mit D5.7 und anti-Transferrin-Rezeptor Antikörper (Ox26) unterzogen und nach elektrophoretischer Auftrennung in einer SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Zusätzlich wurde auch DSP- bzw. DMSO-behandeltes und unbehandeltes Lysat ohne folgende Immunpräzipitation auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgte mittels anti-Claudin-7 und D5.7 Antikörper:

A



B

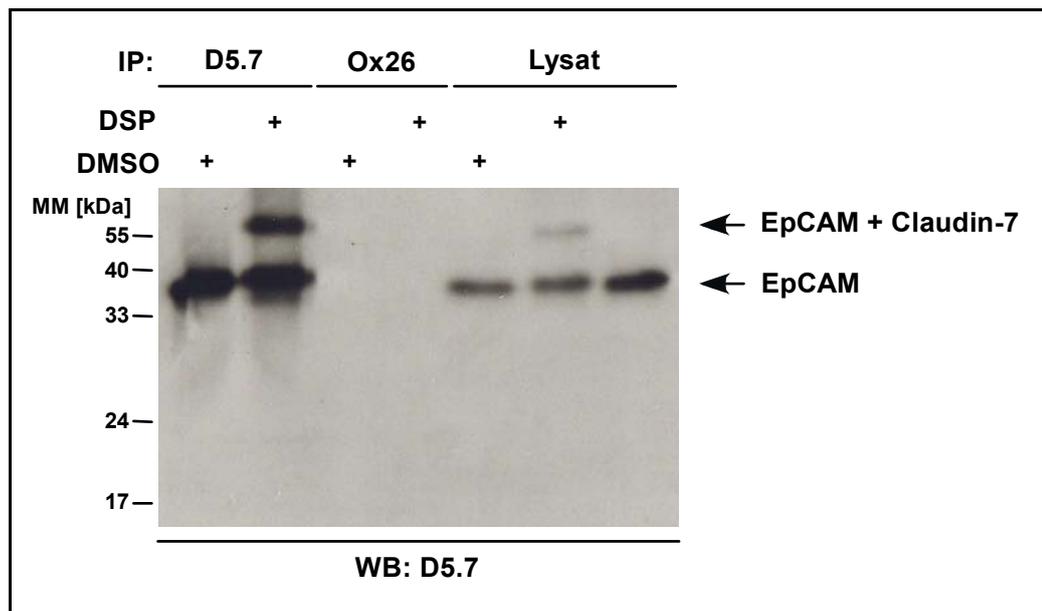


Abb. 3.7: EpCAM interagiert direkt mit Claudin-7. 1×10^7 BSp73ASML Zellen wurden in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. Gleiche Anteile des Lysats wurden mit 1 mM DSP bzw. DMSO inkubiert. Eine Probe (Lysat, Spur 6) blieb unbehandelt. In der anschließenden IP wurden je zwei Proben mit D5.7 oder Ox26 (anti-Transferrin-Rezeptor, neg. Kontrolle) inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12%igen Polyacrylamidgelen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese im WB mit **A)** anti-Claudin-7 und **B)** D5.7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten **A)** Ziege anti-Meerschweinchen-HRP und **B)** Esel anti-Maus-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Bei Betrachtung der Abbildung 3.7 A wird deutlich, dass Claudin-7 mit EpCAM kopräzipitiert (Spur 1), und dass Claudin-7 nach DSP-Behandlung auch in der 55 kDa Bande detektierbar ist (Spur 2 und 6). Damit konnte belegt werden, dass EpCAM zusammen mit Claudin-7 einen Komplex bildet, der unter den stringenten Triton X-100 Lysisbedingungen stabil ist, und dass es sich dabei um eine direkte Protein-Protein Interaktion der beiden Transmembranproteine handelt.

Die gleichen Proben detektiert mit dem D5.7 Antikörper (Abb. 3.7 B) ergeben nach DSP-Quervernetzung und Immunpräzipitation das bereits bekannte und mehrfach bestätigte, typische Bandenmuster (vgl. Abb. 3.2 und 3.4). Die Immunpräzipitationen mit dem anti-Transferrin-Rezeptor Antikörper Ox26 dienten als Negativkontrolle. Durch das Auftragen des unbehandelten Lysats (Spur 7) wurde die Existenz der Einzelmoleküle EpCAM und Claudin-7 im verwendeten BSp73ASML Lysat bestätigt.

Bisher wurde der Nachweis erbracht, dass EpCAM in der Lage ist, Claudin-7 in einer Immunpräzipitation auszufällen. Zur Bestätigung der Assoziation beider Proteine musste noch demonstriert werden, dass auch Claudin-7 die Fähigkeit besitzt, EpCAM kopräzipitieren zu können. Zu diesem Zweck wurden BSp73ASML Zellen in einem Triton X-100 enthaltendem Puffer lysiert und je einer Immunpräzipitation mit dem Antikörper D5.7 oder anti-Claudin-7 unterzogen. Die Proben wurden anschließend per SDS-PAGE separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Western Blot durch Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Das Resultat ist in Abbildung 3.8 zusammengefasst:

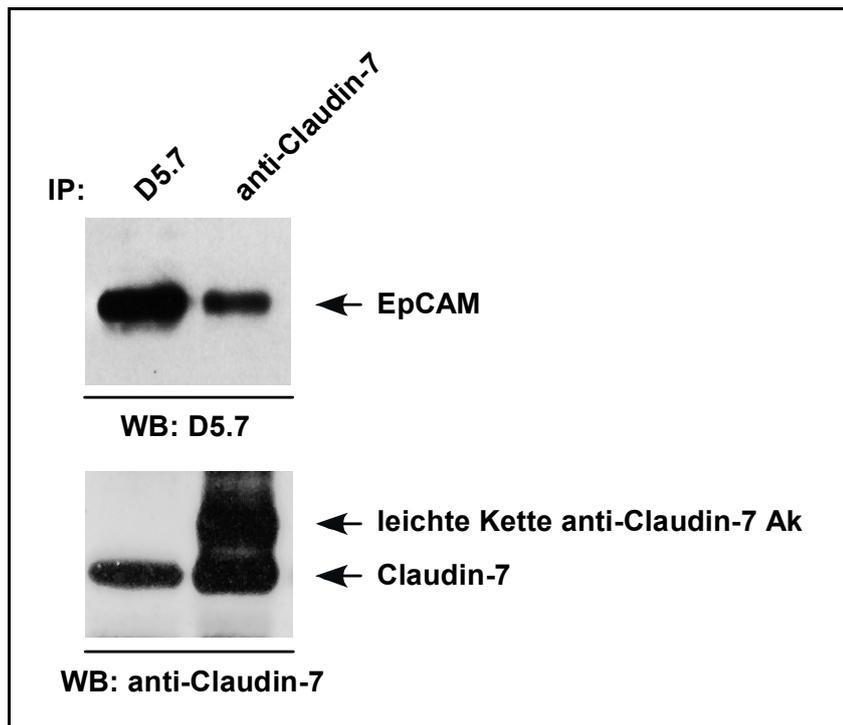


Abb. 3.8: Koimmunpräzipitation von EpCAM und Claudin-7. 2×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. Gleiche Mengen des Lysats wurden entweder einer D5.7 oder anti-Claudin-7 IP unterzogen und in einem 12%igen Acrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese im WB mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion wurde wie unter Abbildung 3.1 beschrieben vorgenommen.

In Abbildung 3.8 zeigt sich, dass auch Claudin-7 unter stringenten Lysisbedingungen EpCAM kopräzipitiert, was die Assoziation beider Proteine bestätigt (Spur 2). Aufgrund der bisher durchgeführten Experimente gelang also der Nachweis, dass das Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM und das „tight junction“ Protein Claudin-7 über eine direkte und äußerst stabile Protein-Protein Interaktion assoziiert sind.

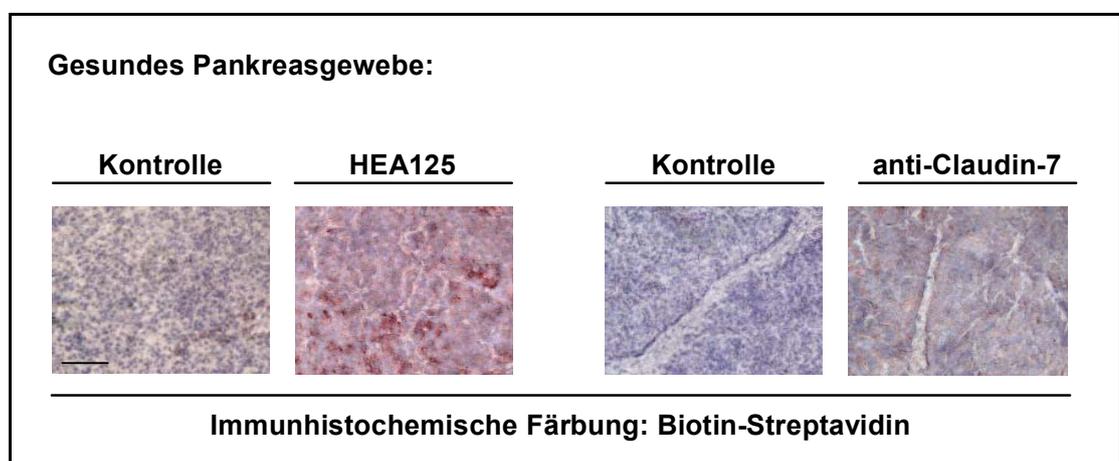
In der Immunpräzipitation mit dem anti-Claudin-7 Antikörper tritt eine zweite Bande oberhalb des Claudin-7 Signals auf (Spur 2, unterer Blot). Diese Bande wurde bereits bei der Charakterisierung des anti-Claudin-7 Antikörpers als leichte Kette dieses Antikörpers identifiziert (Dr. U.-F. Pape, persönliche Mitteilung). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese Bande in den Immunpräzipitationen mit anti-Claudin-7 immer wieder zu sehen sein - es wird jedoch nicht mehr näher darauf eingegangen.

3.3 Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in transformiertem humanem Pankreasgewebe

Nach der erfolgreichen Identifizierung des über eine direkte Protein-Protein Interaktion mit EpCAM assoziierten Proteins als Claudin-7 in der stark metastasierenden Ratten Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73ASML galt es zu klären, ob auch Claudin-7 in Karzinomzellen signifikant überexprimiert ist. Die gesteigerte Expression von EpCAM ist ein wichtiges Merkmal nahezu aller Karzinomzelllinien, während normale Epithelzellen eine deutlich geringere Präsenz des Transmembranproteins auf ihrer Oberfläche aufweisen (Winter et al., 2003b; Osta et al., 2004).

In Abbildung 3.9 sind deshalb immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten gesunder humaner Pankreasgewebe sowie von humanen Pankreastumoren gegenübergestellt worden. Insgesamt wurden fünf gesunde Gewebe sowie 30 Tumore untersucht. 27 der 30 getesteten, tumorbefallenen Gewebeproben zeigten eine EpCAM Expression. Von diesen 27 EpCAM-positiven Gewebeproben wurden zehn auf ihre Claudin-7 Expression überprüft, die alle eine deutliche immunhistochemische Färbung des Tetraspanmoleküls zeigten. Beispiele der Färbungen sind in Abbildung 3.9 dargestellt:

A



B

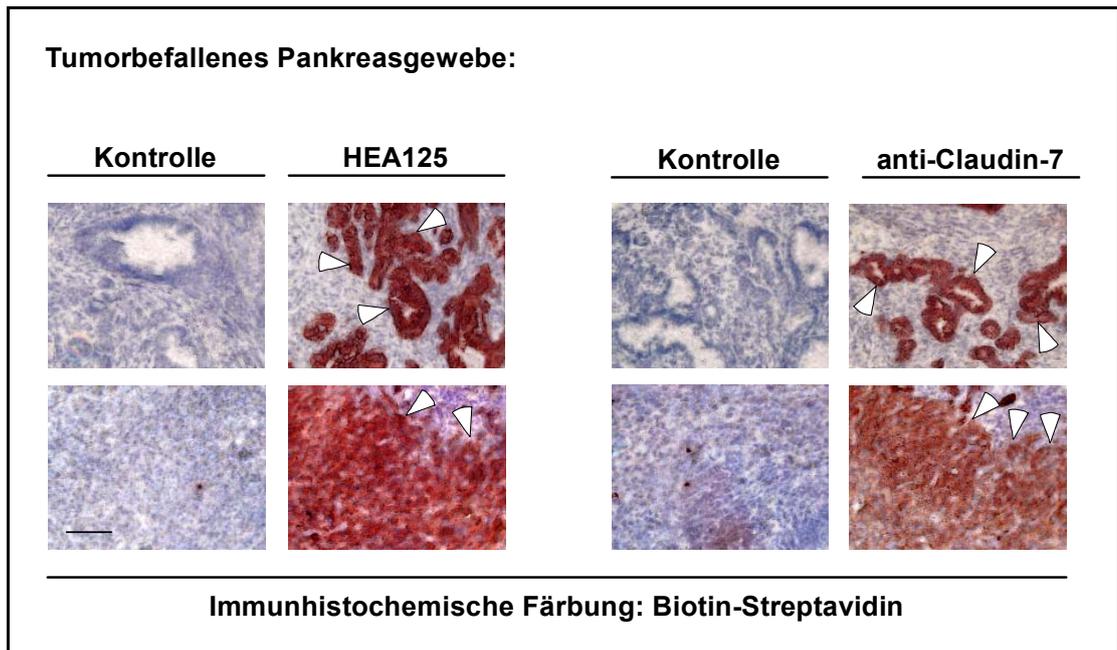


Abb. 3.9: Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in humanem Pankreastumorgewebe. Gewebeschnitte (5 µm Schnittdicke) von **A)** normalem und **B)** transformiertem Pankreasgewebe wurden auf Objektträgern fixiert und entweder mit HEA125 (Maus anti-human EpCAM) oder anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Nach einer Behandlung mit den Sekundärantikörpern Ziege anti-Maus-Biotin bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-Biotin wurden die Schnitte einer AEC-Färbung (vgl. Material und Methoden 2.2.2.5) unterzogen. Die Expression von EpCAM bzw. Claudin-7 ist an der rost-braunen Färbung der Zellen zu erkennen. **B)** Angefärbtes Tumorgewebe ist mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Das umliegende Stroma-gewebe ist nicht gefärbt. Die Länge des schwarzen Maßstabalkens beträgt 100 µm.

Die Färbungen von gesundem bzw. Tumorgewebe zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke von EpCAM und Claudin-7. Im Vergleich zum nicht-transformierten Gewebe (Abb. 3.9 A) ist auf dem Tumorgewebe (Abb. 3.9 B) eine sichtbar erhöhte Expression von EpCAM und auch von Claudin-7 zu finden. Die miteinander assoziierenden Adhäsionsmoleküle sind also in den untersuchten Pankreastumorgeweben verstärkt exprimiert, wobei die Färbung von Claudin-7 im Vergleich zu der von EpCAM ähnlich intensiv ist. Nach der Bestätigung der Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in den untersuchten Geweben galt es zu klären, ob die Assoziation beider Transmembranproteine eine Eigenheit der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73ASML darstellt, oder ob dieses Phänomen auch auf anderen Zelllinien beobachtet werden kann. In den PROb Lysaten konnte bereits eine 55 kDa Bande nach DSP-Quervernetzung detektiert werden (vgl. Abb. 3.2), was auf die Interaktion von EpCAM und Claudin-7 in dieser Zelllinie hindeutet.

3.4 Nachweis der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 in diversen Karzinomzelllinien und einer nicht-tumorigenen Epithelzelllinie

3.4.1 Nachweis der Interaktion in Karzinomzelllinien der Ratte

Um die Frage der Interaktion in weiteren Karzinomzelllinien zu beantworten, wurden zunächst Immunpräzipitationen mit Lysaten von vier verschiedenen Rattenkarzinom-Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden die Kolonkarzinom-Zelllinie PROb, die Blasenkarzinom-Zelllinie 804G, die schwach metastasierende Pankreasadenokarzinom-Zelllinie BSp73AS sowie BSp73ASML hinsichtlich der Expression und Interaktion beider Proteine miteinander verglichen. Es ist bereits bekannt, dass BSp73ASML und PROb das Transmembranprotein EpCAM deutlich überexprimieren, während die Zelllinie 804G eine sehr schwache EpCAM Expression aufweist (Daten nicht gezeigt). Dagegen synthetisieren BSp73AS Zellen kein EpCAM und konnten somit als Negativkontrolle eingesetzt werden. Alle vier Zelllinien wurden zunächst auf ihre Claudin-7 Expression überprüft und anschließend einer Immunpräzipitation mit D5.7 Antikörper unterzogen (Abb. 3.10):

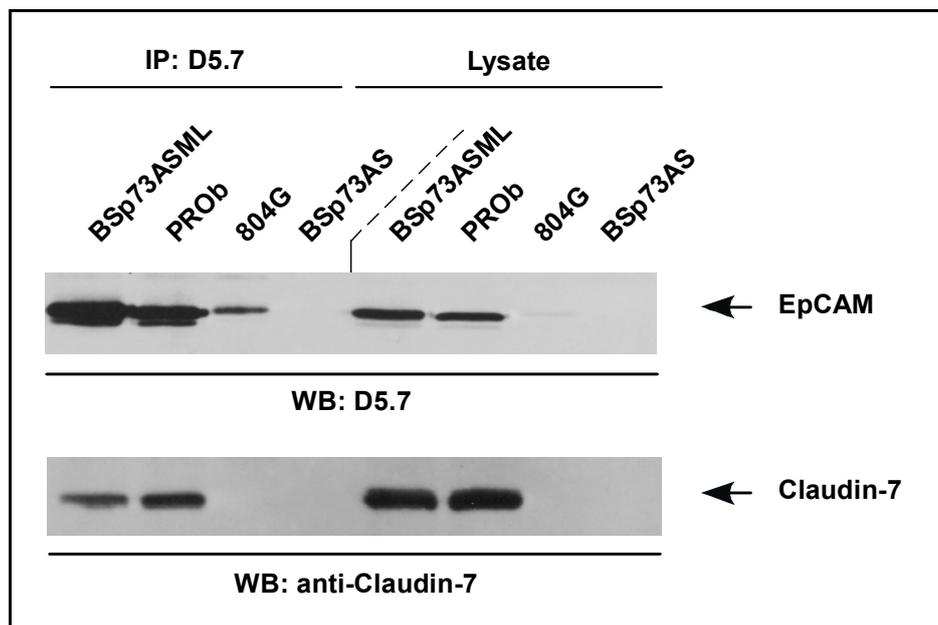


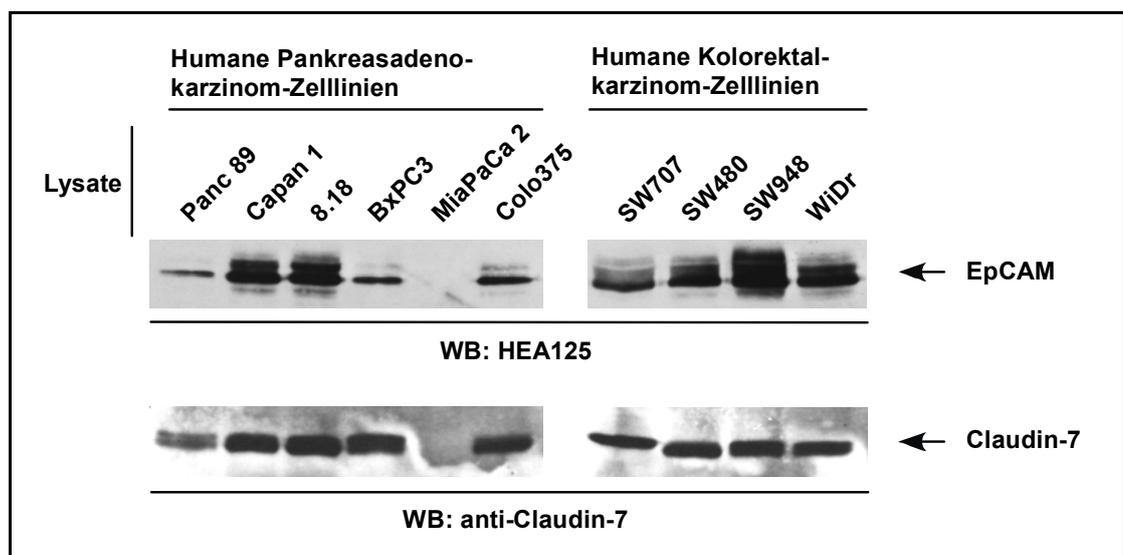
Abb. 3.10: Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM in BSp73ASML und PROb Zellen. Je 1×10^6 BSp73ASML, BSp73AS, PROb und 804G Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Pro IP wurden gleiche Mengen des Lysats eingesetzt, mit D5.7 inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben, einschließlich der unbehandelten Lysate, erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Im WB wurden die Nitrozellulosemembranen mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Aufgrund der fehlenden Claudin-7 Expression der Zelllinien 804G und BSp73AS (Abb. 3.10, Spur 7 und 8, unten) konnte in der Immunpräzipitation mit D5.7 auch kein EpCAM-assoziiertes Claudin-7 detektiert werden (Abb. 3.10, Spur 3 und 4, unten). Die Zelllinien BSp73ASML und PROb hingegen wiesen eine deutliche Kopräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM auf (Abb. 3.10, Spur 1 und 2, unten). Das vorliegende Resultat unterstützt damit die Hypothese, dass EpCAM und Claudin-7 in Zelllinien, die beide Transmembranproteine exprimieren, eine Assoziation miteinander eingehen. Weiterhin blieb die Frage zu beantworten, ob die Interaktion auf Karzinomzelllinien der Ratte zu beschränken ist, oder ob es sich um ein grundsätzliches, speziesübergreifendes Phänomen von Karzinomzelllinien handelt.

3.4.2 Nachweis der Interaktion in humanen Karzinomzelllinien

Um ein Ratten-spezifisches Phänomen hinsichtlich der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 auszuschließen, wurden zehn humane Karzinomzelllinien analysiert, und zwar die Pankreasadenokarzinom-Zelllinien Panc 89, Capan 1, 8.18, BxPC3, MiaPaCa 2 und Colo 375 sowie die Kolorektalkarzinom-Zelllinien SW707, SW480, SW948 und WiDr. Zunächst wurden wiederum die Lysate der Zelllinien auf ihre Eigenschaft getestet, EpCAM bzw. Claudin-7 zu exprimieren. Die anschließenden Immunpräzipitationen, durchgeführt mit dem Antikörper HEA125 (anti-human EpCAM), sollten Aufschluss über die Assoziation der Transmembranproteine in den zur Verfügung stehenden Zelllinien geben. Abbildung 3.11 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen der Lysate sowie der IPs zusammen:

A



B

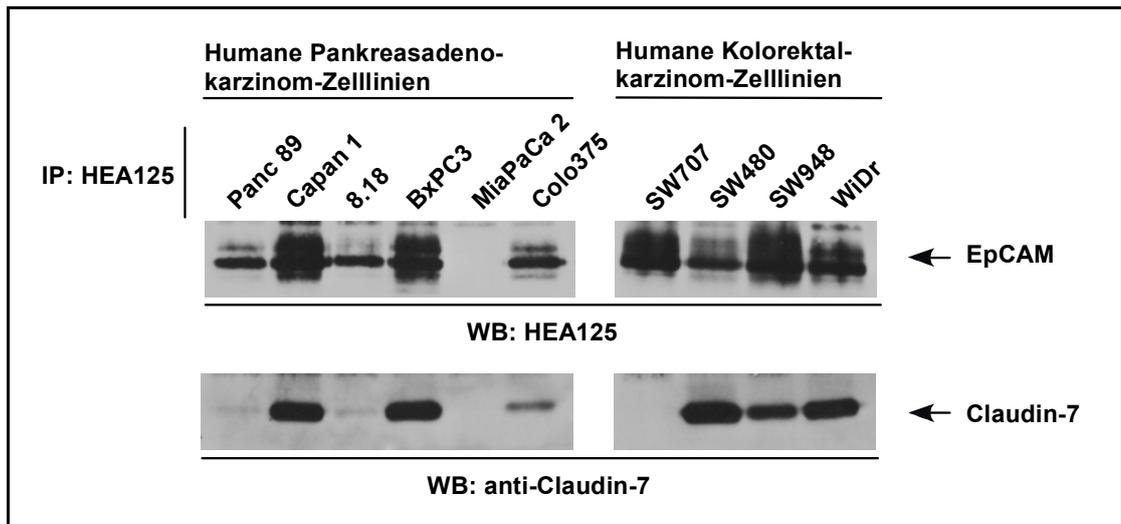


Abb. 3.11: Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM in diversen humanen Karzinom-Zelllinien. Je 2×10^6 Panc 89, Capan 1, 8.18, BxPC3, MiaPaCa 2, Colo375, SW707, SW480, SW948, WiDr Zellen wurden in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. **A)** Die Lysate wurden in einer 12%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese mit HEA125 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. **B)** In der IP wurden gleiche Mengen an Lysat mit HEA125 inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben, sowie der Transfer der Proteine und die Inkubation mit Primär- bzw. Sekundärantikörpern erfolgte wie unter **A)** beschrieben. Die Detektion wurde wie unter Abbildung 3.1 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 3.11 A liefert den Nachweis, dass die beiden Adhäsionsproteine EpCAM und Claudin-7, mit Ausnahme von MiaPaCa 2, von allen getesteten humanen Karzinomzelllinien exprimiert werden. Die Frage nach der Assoziation der untersuchten Moleküle in der jeweiligen Zelllinie konnte mittels Immunpräzipitationen unter Verwendung des humanen anti-EpCAM Antikörpers HEA125 geklärt werden (Abb. 3.11 B). Aufgrund der Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM konnte in den verwendeten Zelllinien bis auf MiaPaCa 2 und SW707 eine mehr oder weniger deutliche Assoziation beider Transmembranproteine nachgewiesen werden. Die Protein-Protein Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 ist also nicht auf Karzinomzelllinien der Ratte beschränkt. Eine Ausnahme bildet die Kolorektalkarzinom-Zelllinie SW707. Diese humanen Krebszellen exprimieren zwar beide Transmembranproteine (Abb. 3.11 A, Spur 7) - eine Koimmunpräzipitation von Claudin-7 mit EpCAM ist dennoch nicht zu beobachten (Abb. 3.11 B, Spur 7 und vgl. Diskussion, Abschnitt 4.2).

Die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 ist in humanen Karzinomzelllinien sowie Karzinomzelllinien der Ratte eingehend dokumentiert worden. Daher galt es zu klären, ob die Assoziation beider Transmembranmoleküle auch in nicht-tumorigenen Epithelzellen zu beobachten ist.

3.4.3 Nachweis der Interaktion in der immortalisierten Epithelzelllinie HaCaT

Zur Überprüfung der Interaktion von EpCAM und Claudin-7 in nicht-tumorigenen Epithelzellen wurde die immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCaT herangezogen. Trotz Immortalisierung sind diese Zellen in der Lage, normal strukturierte und differenzierte Epidermalgewebe nach einer Transplantation der Zellen auf Nacktmäuse auszubilden (Boukamp et al., 1988). Triton X-100 Lysate wurden Immunpräzipitationen mit den Antikörpern HEA125 bzw. anti-Claudin-7 unterzogen. Nach Auftrennung der Proben in einer SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die immobilisierten Proteine mit den in Abbildung 3.12 angegebenen Antikörpern detektiert:

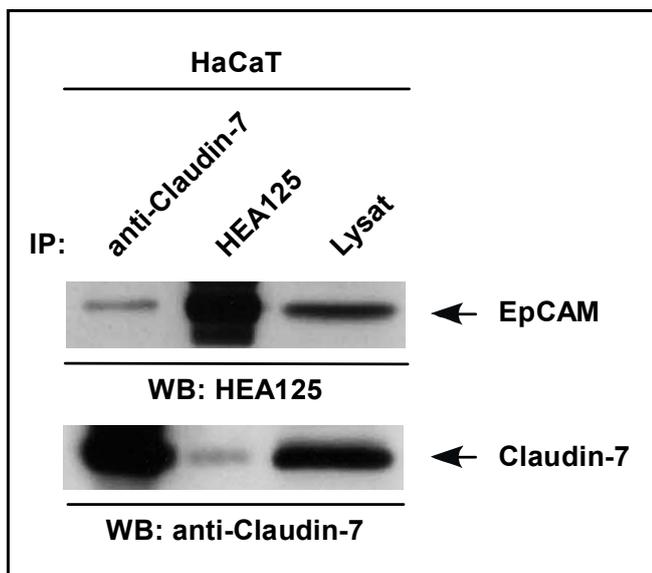


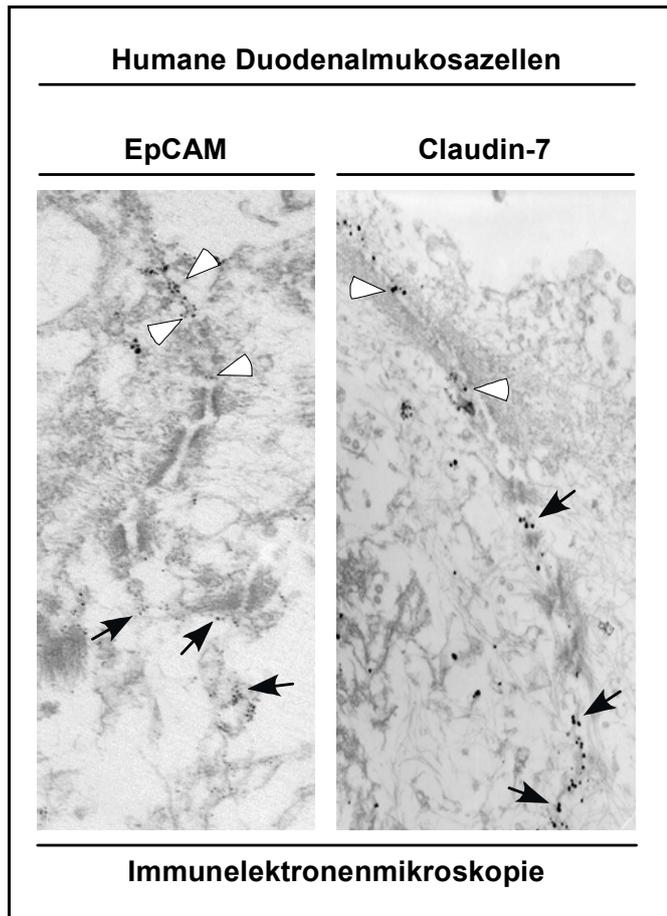
Abb. 3.12: Assoziation von EpCAM und Claudin-7 in HaCaT Zellen. 3×10^6 HaCaT Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Pro IP wurden gleiche Mengen des Lysats eingesetzt, mit HEA125 bzw. anti-Claudin-7 inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben einschließlich der unbehandelten Lysate erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Im WB wurden die Nitrozellulosemembranen mit HEA125 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Aus Abbildung 3.12 geht hervor, dass die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 nicht auf Karzinomzellen beschränkt ist, sondern auch in nicht-tumorigenen Epithelzellen zu beobachten ist. Beide Proteine sind in der Lage sich gegenseitig in Lysaten der HaCaT Zellen zu präzipitieren (Spuren 1 und 2).

3.5 Membranlokalisation von EpCAM und Claudin-7 in Zellen der Duodenalmukosa

Aufgrund der direkten Interaktion beider Transmembranproteine, aber einer publizierten unterschiedlichen Verteilung von EpCAM und Claudin-7 in der Zellmembran polarisierter Epithelzellen war eine Analyse der subzellulären Lokalisation beider Transmembranproteine notwendig. M. Balzar und Kollegen berichten von einer basolateralen Lokalisation von EpCAM Molekülen in Kolonkarzinomzellen, wobei eine Anordnung des Adhäsionsproteins in „TJs“ nicht beobachtet werden konnte (Balzar et al, 1999a). Claudin-7 lokalisiert hingegen innerhalb der „TJ“-Struktur, was von K. Morita und Mitarbeitern gezeigt werden konnte (Morita et al., 1999).

Zur Beurteilung der Lokalisation von EpCAM bzw. Claudin-7 in der Plasmamembran polarisierter Epithelzellen wurde eine immunelektronenmikroskopische Analyse von Duodenalmukosazellen durchgeführt. Diese Epithelzellen eignen sich aufgrund ihrer ausgeprägten polarisierten Struktur und der hohen Claudin-7 Expression besonders gut für diese Anwendung. Die Antikörper HEA125 bzw. anti-Claudin-7 wurden zur Inkubation der für die Elektronenmikroskopie aufbereiteten Gewebeschnitte verwendet. Als Sekundärantikörper dienten an Goldpartikel gekoppelte anti-Maus und anti-Meerschweinchen IgGs. Das Resultat der elektronenmikroskopischen Untersuchung der entsprechend behandelten Gewebeschnitte ist in Abbildung 3.13 dargestellt:



Mit freundlicher Genehmigung von:

Dr. Ulrich-Frank Pape

Abteilung Zellbiologie A010
Deutsches Krebsforschungs-
zentrum, Heidelberg

Abb. 3.13: EpCAM und Claudin-7 sind in Epithelzellen des Zwölffingerdarms sowohl in „tight junctions“ als auch basolateral lokalisiert. Die Kryostatschnitte wurden zunächst in 2% Formaldehyd in PBS fixiert, mit den Primärantikörpern HEA125 bzw. anti-Claudin-7 und anschließend mit den an 1,4 nm kolloidale Goldpartikel (Nanogold, Biotrend, Köln) gekoppelten Sekundärantikörpern Esel anti-Maus bzw. Ziege anti-Meerschweinchen IgG inkubiert. Nach einer Nachfixierung mit Glutaraldehydlösung erfolgte eine Silberverstärkung (Silver Enhancement Kit, Nanoprobes, Stony Brooks, New York, USA) und eine weitere Nachfixierung mit 0,2% OsO₄. Die Entwässerung und Einbettung wurde nach der von L. Langbein und Kollegen beschriebenen Methode durchgeführt (Langbein et al., 2004). Nach dem Absprengen der Deckgläser durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden mit einem Reichert Ultracut Schneidegerät (Leica, Bensheim) 50 nm Ultradünnschnitte angefertigt und auf mit 1% Piloform beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen. Die Schnitte wurden anschließend in 2% Uranylacetat-Lösung und in Bleicitrat-Lösung (Reynolds, 1963) kontrastiert. Die Elektronenmikroskopie wurde mit einem EM900 Elektronenmikroskop (LEO, Oberkochen) durchgeführt (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.2.6). Weiße Pfeilköpfe deuten die Lokalisation der Proteine in „TJs“, schwarze Pfeile ihre Anordnung in der basolateralen Zellmembran an.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab ein differenziertes Bild von der Membranverteilung der Adhäsionsproteine EpCAM und Claudin-7 (Abb. 3.13). So

konnte EpCAM nicht nur im basolateralen Abschnitt der Zellmembranen detektiert werden (schwarze Pfeile), sondern auch in den Strukturen der „tight junctions“ (weiße Pfeilköpfe). Die Lokalisation von EpCAM im Bereich der „TJs“ konnte somit erstmalig demonstriert werden (Ladwein et al., 2005). Eine ähnliche Verteilung ist für Claudin-7 zu beobachten. Das Tetraspanmolekül lokalisiert nicht nur in den „TJs“ (weiße Pfeilköpfe), sondern auch im basolateralen Abschnitt der Zellmembran (schwarze Pfeile). Aufgrund der Anordnung beider Transmembranproteine in den Strukturen der „tight junctions“ als auch in der basolateralen Membrandomäne ist eine Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 in beiden beschriebenen Zellmembranbereichen möglich.

3.6 EpCAM interagiert nicht mit Claudin-1 und Claudin-3

Da die Familie der Claudine mindestens 24 Mitglieder zählt (Tsukita et al., 2001), galt es zu klären, ob EpCAM spezifisch mit Claudin-7 interagiert, oder ob EpCAM eine generelle Tendenz aufweist, eine Assoziation mit unterschiedlichen Claudinen einzugehen. Daher wurden neben Claudin-7 auch Claudin-1 und Claudin-3 auf ihre potentielle Eigenschaft, mit EpCAM zu interagieren, analysiert. Zu diesem Zweck wurden Lysate der BSp73ASML Zellen, der humanen Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Capan 1 sowie der humanen Kolorektalkarzinom-Zelllinie WiDr parallel untersucht. Diese wurden einer Immunpräzipitation mit D5.7 bzw. HEA125 unterzogen und anschließend in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die durch elektrischen Transfer auf einer Membran immobilisierten Proteine wurden daraufhin im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Resultate des Western Blots sind in Abbildung 3.14 dargestellt:

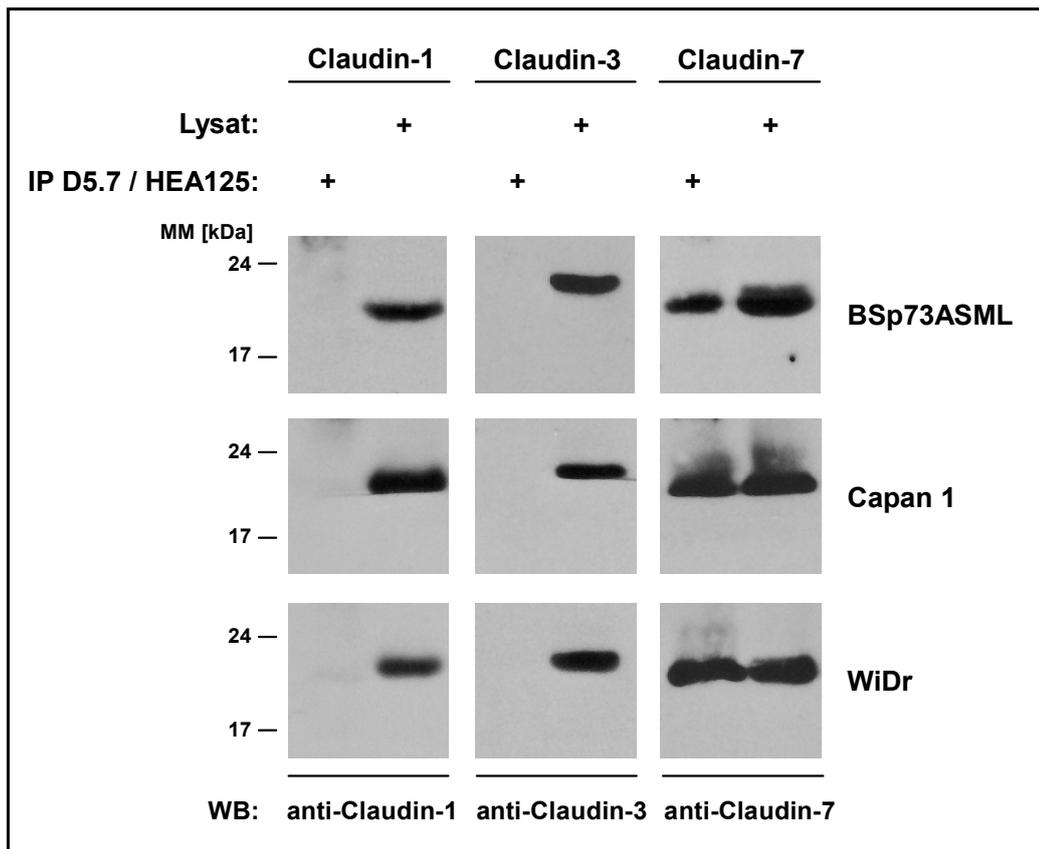


Abb. 3.14: Nur Claudin-7 kopräzipitiert mit EpCAM. Je 1×10^6 BSp73ASML, Capan 1 und WiDr Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Gleiche Mengen der Lysate wurden einer IP mit D5.7 (BSp73ASML) bzw. HEA125 (Capan 1, WiDr) unterzogen. Die Auftrennung der Proben einschließlich der Lysate erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Im WB wurden die Nitrozellulosemembranen mit anti-Claudin-1, anti-Claudin-3 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Ziege anti-Kaninchen-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass EpCAM spezifisch mit Claudin-7 assoziiert ist. Zwar sind alle drei analysierten Claudine in der Rattenkarzinom-Zelllinie und in den beiden humanen Karzinomzelllinien exprimiert (Abb. 3.14, Spuren 2, 4 und 6), jedoch kann weder Claudin-1 noch -3 mit EpCAM kopräzipitiert werden (Abb. 3.14, Spuren 1 und 3). Dagegen konnte Claudin-7 in allen getesteten Zelllinien mittels EpCAM präzipitiert werden. Claudin-1 und -3 weisen somit unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine Interaktion mit EpCAM auf.

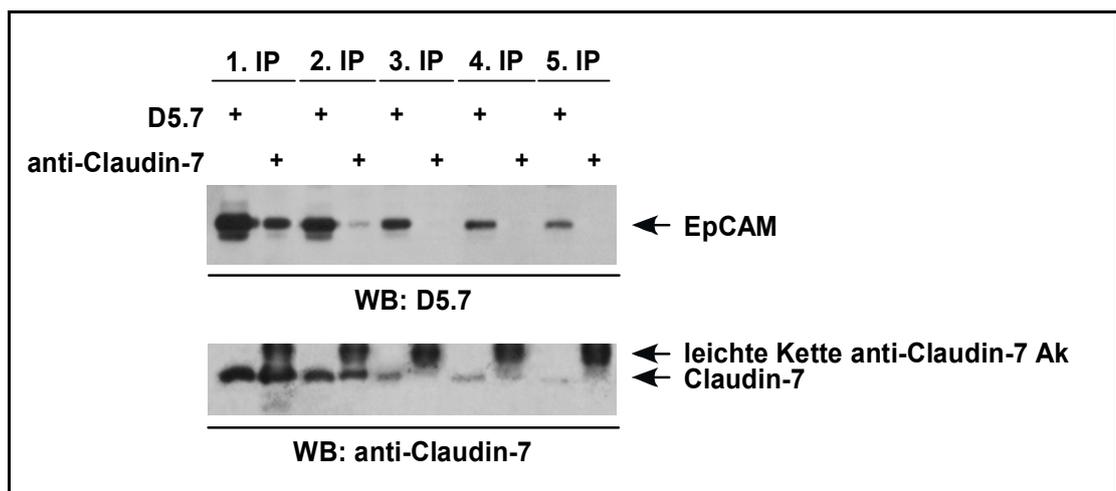
3.7 Stöchiometrie der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7

3.7.1 Geringer Anteil an kopräzipitierenden EpCAM bzw. Claudin-7 Molekülen

Nach dem Beweis der direkten Protein-Protein Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7, der Unabhängigkeit der Interaktion von bestimmten Zelllinien bzw. Spezies sowie der Ermittlung der subzellulären Lokalisation beider Transmembranproteine stellte sich die Frage nach der Stöchiometrie der Assoziation. Ist davon auszugehen, dass alle EpCAM und Claudin-7 Proteine einer Zelle miteinander in Kontakt stehen, oder ist nur ein Teil der jeweiligen Proteinfraktion an der Interaktion beteiligt?

Zur Bestimmung der interagierenden Proteinmengen von EpCAM und Claudin-7 wurde ein Depletions-Experiment durchgeführt (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.8). Dabei wurden BSp73ASML Lysate fünf aufeinander folgenden Immunpräzipitationen unterzogen. Durch diesen Vorgang wurde dem Lysat sukzessive das Antigen entzogen, gegen das der jeweilige Antikörper gerichtet war. Zusätzlich wurde dem Lysat auch das mit dem Antigen kopräzipitierende Protein entzogen. Immunpräzipitationen unter Verwendung des Antikörpers Ox26 bzw. Zugabe des Zellkulturmediums RPMI 1640 stellten die Negativkontrollen dar. Die gesammelten Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit den Antikörpern D5.7 bzw. anti-Claudin-7 inkubiert. Die Resultate des Depletions-Experiments sind in Abbildung 3.15 dargestellt:

A



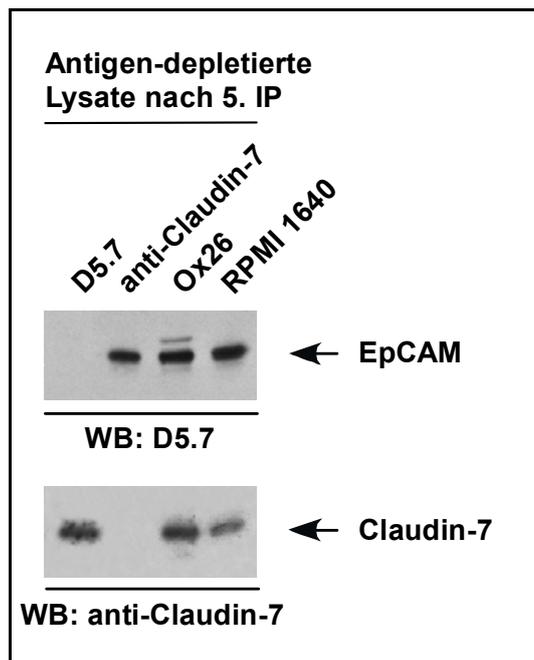
B

Abb. 3.15: Nur eine kleine Fraktion der jeweiligen Gesamtmenge von EpCAM und Claudin-7 interagiert miteinander in BSp73ASML Zellen. **A)** 4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer, der 1% Triton X-100 enthielt, lysiert. Vier gleiche Lysatanteile wurden anschließend fünf aufeinander folgenden IPs unterzogen. Durch die fünf hintereinander durchgeführten IPs pro Probe wurde sichergestellt, dass den Lysaten das entsprechende Antigen (EpCAM bzw. Claudin-7) komplett entzogen wurde. Die Proben wurden mit D5.7, anti-Claudin-7, **B)** Ox26 bzw. RPMI 1640 Medium inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Im WB wurden die Nitrozellulosemembranen mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. **B)** Die Antigen-depletierten Lysate nach der 5. Immunpräzipitation wurden ebenfalls in einer 12%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Im anschließenden WB wurden die Nitrozellulosemembranen mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten die unter **A)** beschriebenen Antikörper. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben. Fünf aufeinander folgende Immunpräzipitationen mit Ox26 dienten als Kontrolle für die spezifische Antigen-Depletion von EpCAM und Claudin-7. Pro IP und Probe wurden 200 μ l Hybridomüberstand (D5.7 bzw. Ox26) zugesetzt und jedes Lysat somit pro IP um 200 μ l verdünnt. Daher wurde eine Lysat-Probe statt mit Antikörper in jeder der fünf IP-Runden mit 200 μ l RPMI 1640 Medium inkubiert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.8).

In Abbildung 3.15 A ist die sukzessive Abnahme an EpCAM mit steigender Anzahl der Immunpräzipitationen zu beobachten. Ebenso verhält es sich mit Claudin-7. Dabei ist zu beachten, dass nach der vierten Immunpräzipitation mit D5.7 (Spur 7) ein nur noch sehr ge-

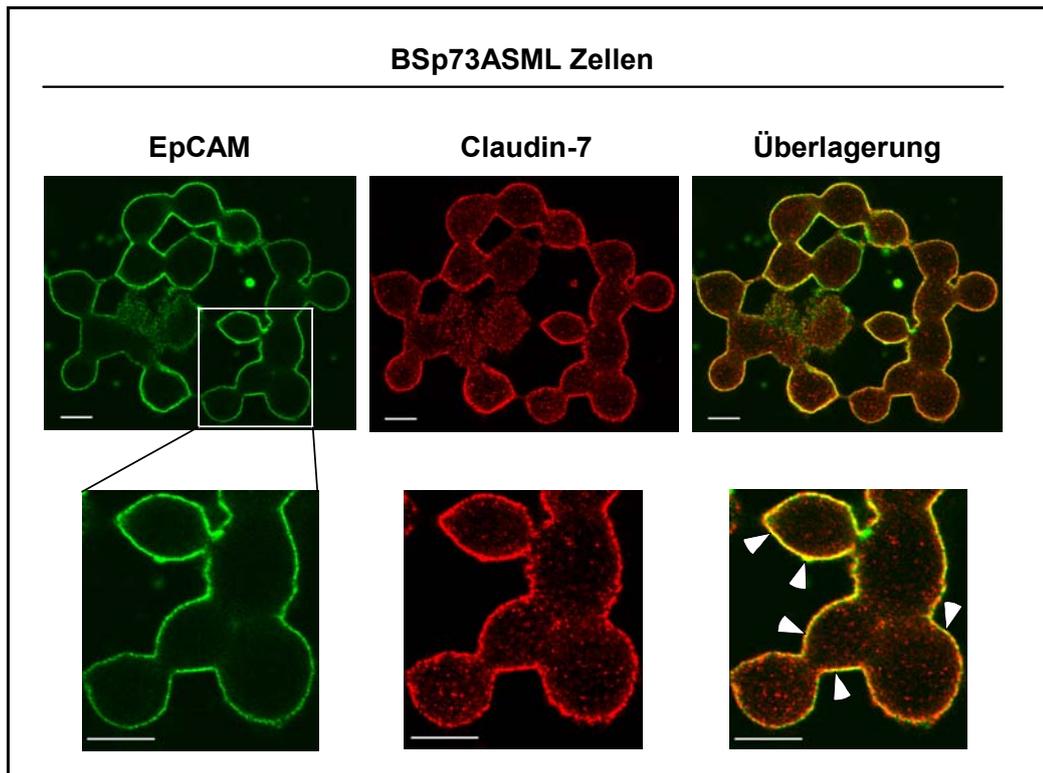
ringer Anteil an Claudin-7 kopräzipitiert. Das heißt, dass zwar noch eine größere Menge an EpCAM Molekülen im Lysat vorliegt, welche jedoch nicht mit Claudin-7 assoziiert sind. Das gleiche Phänomen ergibt sich für die Immunpräzipitationen mit anti-Claudin-7. Bereits nach Vollendung der zweiten Immunpräzipitation ist nahezu kein kopräzipitierendes EpCAM mehr zu detektieren. Es ist jedoch noch genügend „freies“ Claudin-7 vorhanden, wie im anti-Claudin-7 Western Blot nach IP mit dem gleichen Antikörper deutlich zu erkennen ist (Spur 4). Abbildung 3.15 B zeigt den Proteingehalt der Lysate nach der jeweils fünften Immunpräzipitation hinsichtlich der beiden Transmembranproteine EpCAM und Claudin-7. Es bleibt festzuhalten, dass nach der fünften Immunpräzipitation beider Proteine sowohl EpCAM als auch Claudin-7 dem Lysat komplett entzogen wurden. Im Gegensatz dazu sind die Proteinmengen an EpCAM im Claudin-7 depletierten Lysat bzw. an Claudin-7 im EpCAM depletierten Lysat wenig verändert. Danach ergeben sich im Vergleich zu den aufgetragenen Kontrollen Ox26 und RPMI 1640 kaum sichtbare Unterschiede.

Aus diesem Experiment lässt sich daher ableiten, dass nur geringe Mengen an EpCAM und Claudin-7 Molekülen an der Interaktion beteiligt sind. Die jeweils sehr viel größere Fraktion beider Proteine geht keine Assoziation mit dem jeweils anderen Molekül ein. Mit Hilfe dieser Methode konnte veranschaulicht werden, dass es sich bei der Interaktion von EpCAM und Claudin-7 zwar um eine sehr starke, jedoch stöchiometrisch niedrige Interaktion handelt. Das Ergebnis der Auswertung des folgenden Experiments unterstützt diese Einschätzung.

3.7.2 Unvollständige Kollokalisierung von EpCAM und Claudin-7

Zur Bestätigung der Ergebnisse in Abschnitt 3.7.1 wurden BSp73ASML Zellen und PROb Zellen einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Unter anderem wurde bereits in Abschnitt 3.4.1 gezeigt, dass EpCAM und Claudin-7 in diesen Zelllinien miteinander interagieren. Wenn die ermittelten Resultate aus Abschnitt 3.7.1 korrekt sind, dürfte ein nur geringer Anteil an EpCAM und Claudin-7 Molekülen koloalisieren. Die BSp73ASML Zellen wurden dazu einer Methanol-Aceton Fixierung unterzogen und mit den in Abbildung 3.16 angegebenen Antikörpern inkubiert. Die auf Objektträger aufgebraachten Proben wurden anschließend mit Hilfe des konfokalen „Laser Scanning“ Mikroskops LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert:

A



B

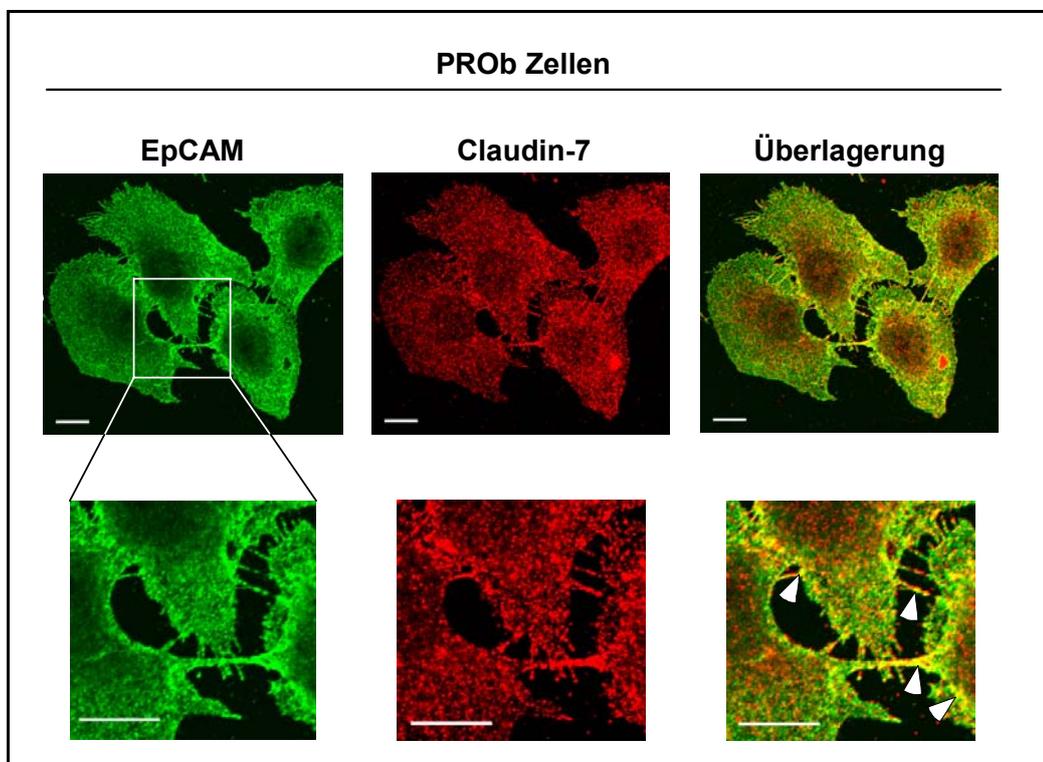


Abb. 3.16: Kolokalisation von EpCAM und Claudin-7. A) 3×10^4 BSp73ASML bzw. B) 3×10^4 PROb Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesät und 2 Tage kultiviert.

viert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 1 h inkubiert. Nach intensivem Waschen folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern Esel anti-Maus-Cy2 (Emission bei 506 nm, grün) und Esel anti-Meerschweinchen-Cy3 (Emission bei 562 nm, rot) für 45 min. Danach wurden die Zellen ausgiebig gewaschen und die Glasplättchen mit Hilfe von Elvanol auf Objektträger aufgebracht. Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden anschließend mit dem konfokalen „Laser Scanning“ Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena) ausgewertet (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.2.4). Die Länge des weißen Maßstabbalkens beträgt 10 μm . Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit der Software „LSM Image Browser“ (Zeiss, Jena) ausgewertet.

Die Immunfluoreszenz der BSp73ASML Zellen in Abbildung 3.16 A zeigt die typische Färbung der EpCAM Moleküle (grün) in der Membran dieser Zellen. Eine Ausschnittsvergrößerung ist in der unteren Reihe zu sehen. Der Nachweis von Claudin-7 (rot) zeigt ebenfalls eine deutliche Färbung der Zellmembran jedoch auch des Zytoplasmas. Es ist bereits bekannt, dass Claudin-7 und andere Claudine in vesikulären Strukturen im Zytoplasma vorkommen (Matsuda et al., 2004; Blackman et al., 2005). Werden beide Abbildungen digital übereinander gelegt, so ist zu erkennen, dass lediglich einige wenige Membranpunkte überlappen (weiße Pfeilköpfe), die auf eine Kolo-kalisation von EpCAM und Claudin-7 Molekülen in der Zellmembran hinweisen. Der Großteil der EpCAM und Claudin-7 Moleküle kolo-kalisiert jedoch erwartungsgemäß nicht.

In einer zweiten Färbung wurden PROb Zellen verwendet (Abb. 3.16 B). Durch die extreme Spreizung dieser Zellen ist eine klare Membranfärbung, wie sie bei BSp73ASML Zellen zu sehen ist, nicht zu erreichen. Dennoch wird auch hier der Unterschied in der Färbung der beiden Transmembranproteine sichtbar. Während EpCAM (grün) wiederum ausschließlich auf der Zellmembran angefärbt ist, sind bei Claudin-7 neben der Membranfärbung wieder vesikuläre Formationen im intrazellulären Bereich zu beobachten. Die Überlagerung beider Bilder zeigt erneut, dass ein nur sehr geringer Teil der jeweiligen Proteinfraction kolo-kalisiert (weiße Pfeilköpfe).

Damit konnten die Ergebnisse aus Abschnitt 3.7.1 durch die Methode der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Außerdem ist zu bemerken, dass im Inneren der Zellen eine Markierung von EpCAM Molekülen fehlt. Offensichtlich ist EpCAM nicht zusammen mit Claudin-7 in den vesikulären Strukturen im Zytoplasma vertreten. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Überlappungen ebenfalls in Membranbereichen der BSp73ASML und PROb Zellen vorkommen, welche nicht an eine Nachbarzelle grenzen. Das bedeutet, dass die Assoziation von EpCAM und Claudin-7 Molekülen in diesen transformierten Zelllinien nicht notwendigerweise auf Zell-Zell Kontakte zu beschränken ist. Dieser Befund konnte durch ein weiteres Experiment verifiziert werden. Eine Immunpräzipitation wurde mit Lysaten von dicht ausgesäten BSp73ASML Zellen (hoher Zell-Zell Kontakt) und vereinzelt ausgesäten

BSp73ASML Zellen (niedriger bis kein Zell-Zell Kontakt) durchgeführt. Beide Proben zeigten hinsichtlich der Bandenintensitäten der kopräzipitierenden Proteine im Western Blot keinen Unterschied. EpCAM und Claudin-7 waren stets in der Lage, das jeweils andere Protein zu präzipitieren, unabhängig davon, ob Zellen aneinander grenzten oder nicht (Daten nicht gezeigt). Der Kontakt zwischen einzelnen Zellen der untersuchten Zelllinien ist offensichtlich nicht notwendig zur Formierung der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7. Die Beobachtung weist darüber hinaus darauf hin, dass die EpCAM-Claudin-7 Assoziation auch von einer EpCAM-vermittelten Zell-Zell Adhäsion unabhängig ist.

3.8 Identifizierung der für die Interaktion relevanten Aminosäuresequenzen von EpCAM

In der Literatur ist die Vorstellung von EpCAM als homotypischem Zell-Zell Adhäsionsmolekül weitestgehend akzeptiert. M. Balzar und Kollegen präsentierten ein Modell, in dem sie postulieren, dass Tetramere von EpCAM Molekülen auf einer epithelialen Zelle mit EpCAM-Tetrameren einer angrenzenden Zelle interagieren (Balzar et al., 2001). Der einzige Hinweis auf eine Assoziation von EpCAM mit einem weiteren Protein kam wiederum von M. Balzar und Mitarbeitern. Sie beschreiben eine Bindung des zytoplasmatischen Teils von EpCAM mit α -Aktinin und erklärten damit die Verbindung zwischen EpCAM und dem Aktin-Zytoskelett (Balzar et al., 1998). Berichte darüber, dass EpCAM über seine extrazelluläre bzw. membran-durchspannende Domäne mit anderen Proteinen in direktem Kontakt steht, gab es bisher nicht. Daher war die nähere Charakterisierung der Assoziation zwischen EpCAM und Claudin-7 und die damit verbundene Identifizierung der für die Interaktion relevanten Aminosäuresequenz des EpCAM von zentraler Bedeutung.

3.8.1 Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM ist nicht an der Interaktion mit Claudin-7 beteiligt

Zunächst musste geklärt werden, welche der drei Molekülabschnitte, die extrazelluläre, die Transmembran- oder die intrazelluläre Domäne des Typ 1 Transmembranproteins in die Assoziation mit Claudin-7 involviert ist. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine zytoplasmatische Deletionsmutante mittels PCR generiert, die als EpCAM Δ ZPD bezeichnet wurde. Aufgrund der bereits erwähnten Resultate von M. Balzar und Kollegen ist die zytoplasmatische Region des EpCAM die bisher einzige, für die eine Interaktion mit einem anderen Protein beschrieben wurde. Zur Abschätzung, ob die intrazelluläre Aminosäuresequenz von EpCAM

auch in die Interaktion mit Claudin-7 involviert ist, wurde die cDNA, welche für die Mutante EpCAM Δ ZPD kodiert, parallel mit der für den Claudin-7 Wildtyp kodierenden Sequenz in Zellen der embryonalen humanen Nierenkarzinom-Zelllinie HEK293T transfiziert. Zuvor war bereits demonstriert worden, dass HEK293T Zellen weder EpCAM noch Claudin-7 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle der Formierung eines EpCAM-Claudin-7 Proteinkomplexes in HEK293T Zellen wurden beide Wildtyp cDNAs in diese Zellen kotransfiziert. Triton X-100 Lysate der Transfektanten wurden Immunpräzipitationen mit folgender SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die folgende Abbildung zeigt Schemata des Wildtyp-EpCAM und der zytoplasmatischen Deletionsmutante sowie eine Analyse der Interaktion von EpCAM Δ ZPD und Claudin-7 in HEK293T Zellen:

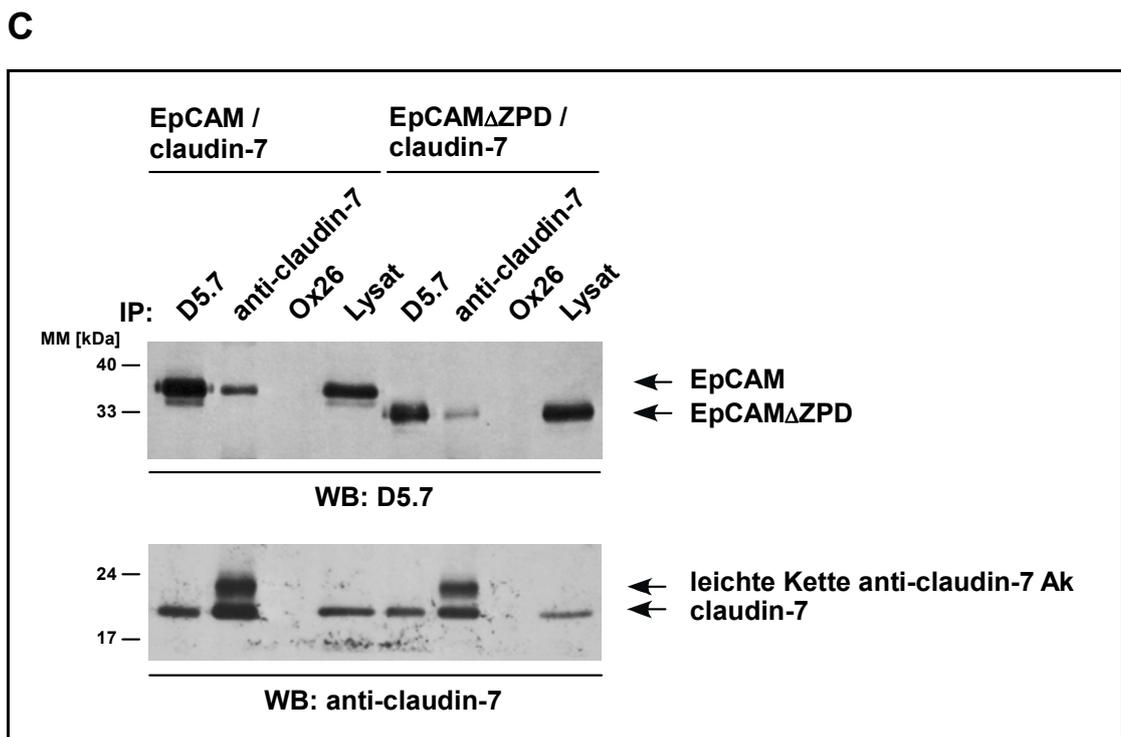
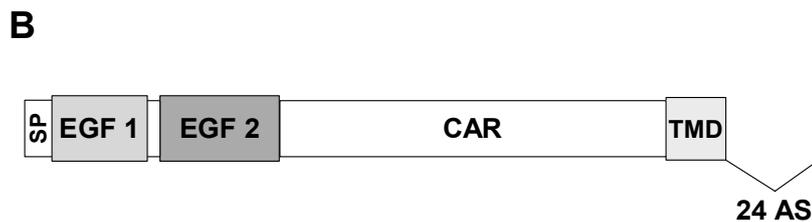
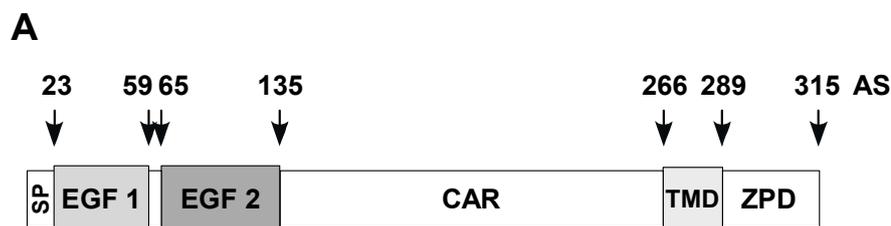


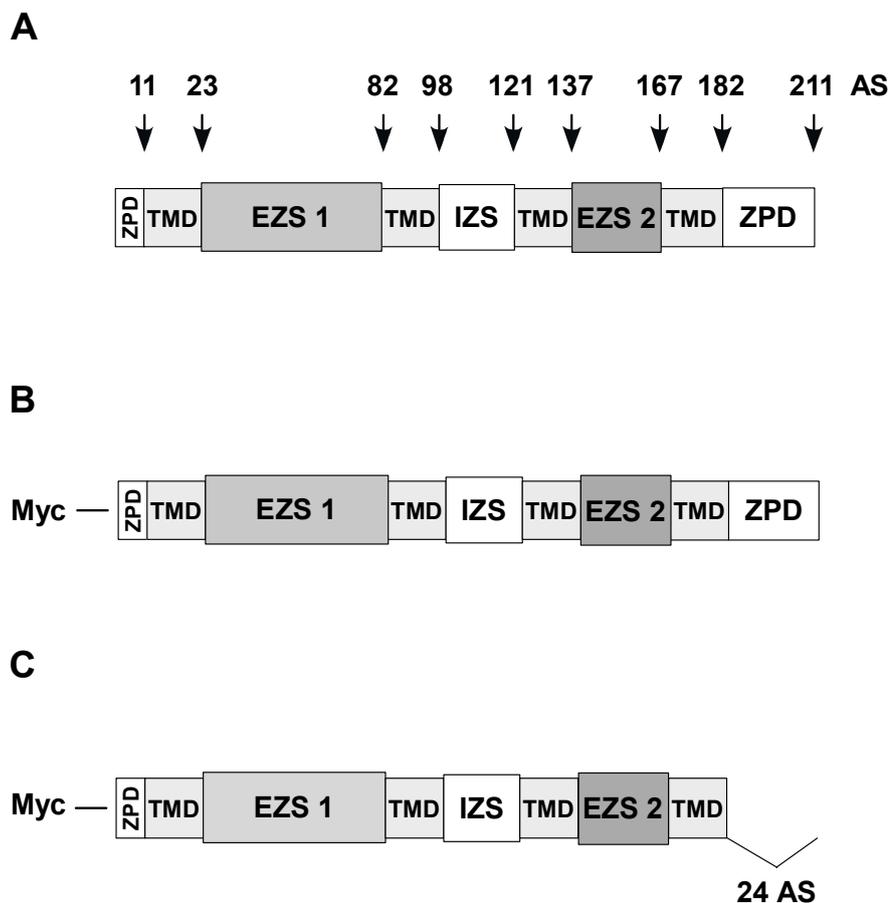
Abb. 3.17: Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM ist für die Interaktion mit Claudin-7 nicht notwendig. Schematische Darstellung von **A)** Wildtyp-EpCAM, **B)** EpCAM Δ ZPD. Abkürzungen bedeuten: AS: Aminosäure, SP: Signalpeptid, EGF: „epidermal growth factor“-ähnliche Domäne, CAR: Cystein-arme Region, TMD: Transmembrandomäne, ZPD: zytoplasmatische Domäne. **C)** HEK293T Zellen wurden entweder mit EpCAM und Claudin-7 cDNA oder mit EpCAM Δ ZPD und Claudin-7 cDNA transient transfiziert. 1×10^7 HEK293T Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysis-puffer aufgeschlossen. Gleiche Mengen des jeweiligen Lysats wurden mit D5.7, anti-Claudin-7 oder Ox26 Antikörpern inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12%igen Polyacrylamidgelen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese im WB mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meer-schweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Der Abbildung 3.17 ist zu entnehmen, dass EpCAM und Claudin-7 in dieser epithelialen Zelllinie ebenfalls assoziieren (Abb. 3.17, Spur 1 und 2). Der Antikörper Ox26 dient im dargestellten Experiment als Negativkontrolle. Im rechten Teil der Abbildung 3.17 wird deutlich, dass das um den zytoplasmatischen Teil verkürzte EpCAM Molekül von den HEK293T Zellen exprimiert wird (Spur 8) und in der Lage ist, eine Assoziation mit Claudin-7 einzugehen (Spur 5, unterer Blot). Die Gegenprobe zeigt das gleiche Ergebnis: EpCAM Δ ZPD kopräzipitiert mit Claudin-7 (Spur 6, oberer Blot). Somit konnte nachgewiesen werden, dass beide Transmembranproteine in einer sie nicht endogen exprimierenden Zelllinie miteinander interagieren, und dass diese Assoziation nicht vom intrazellulären C-Terminus des EpCAM Moleküls abhängig ist.

Unterstützend kommt hinzu, dass die Durchführung eines GST-„pull down assays“ (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.11), unter Verwendung eines GST-Fusionsproteins, welches nur die zytoplasmatische Domäne von EpCAM (GST-ZPD-EpCAM) enthielt, kein positives Resultat erbrachte. Hätte das intrazelluläre Polypeptid von EpCAM eine Funktion hinsichtlich der Interaktion mit Claudin-7 gehabt, wäre im GST-„pull down assay“ eine kopräzipitierende 20 kDa Bande zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Bestätigung dieser Beobachtung wurde eine Claudin-7 Mutante erzeugt, deren C-terminale, zytoplasmatische Domäne deletiert war. Da der polyklonale anti-Claudin-7 Antikörper gegen die letzten 16 Aminosäuren (AS 196-211) des C-Terminus generiert worden war, musste eine N-terminale Myc-Epitop-Markierung zur Erkennung des Proteins durch den Antikörper MycL-9E10 angefügt werden. Die Deletionsmutante wurde als Myc-

Claudin-7 Δ ZPD bezeichnet. Außerdem war zu beweisen, dass der zusätzliche Myc-Anhang keine Konsequenzen für die Interaktion von Claudin-7 mit EpCAM hat. Deshalb war es notwendig das N-terminale Myc-Peptid auch an das Wildtyp-Claudin-7 anzuhängen, um mit diesem Konstrukt die unveränderte Assoziation mit EpCAM zu demonstrieren. Das Konstrukt wurde als Myc-Claudin-7 bezeichnet. Hierzu wurden die beiden Claudin-7 Konstrukte jeweils zusammen mit dem Wildtyp-EpCAM transient in HEK293T Zellen transfiziert. Nach Lyse der Transfektanten in Triton X-100 enthaltendem Puffer und Immunpräzipitationen mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Proben in einer SDS-PAGE separiert. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert und im Western Blot mit den Antikörpern 9E10 bzw. anti-Claudin-7 detektiert. In Abbildung 3.18 sind die Schemata des Wildtyp-Claudin-7, des Myc-gekoppelten Wildtyp-Claudin-7 und der zytoplasmatischen Deletionsmutante sowie die Analyse der Interaktion zwischen Wildtyp-EpCAM und den beiden Claudin-7 Konstrukten dargestellt:



D

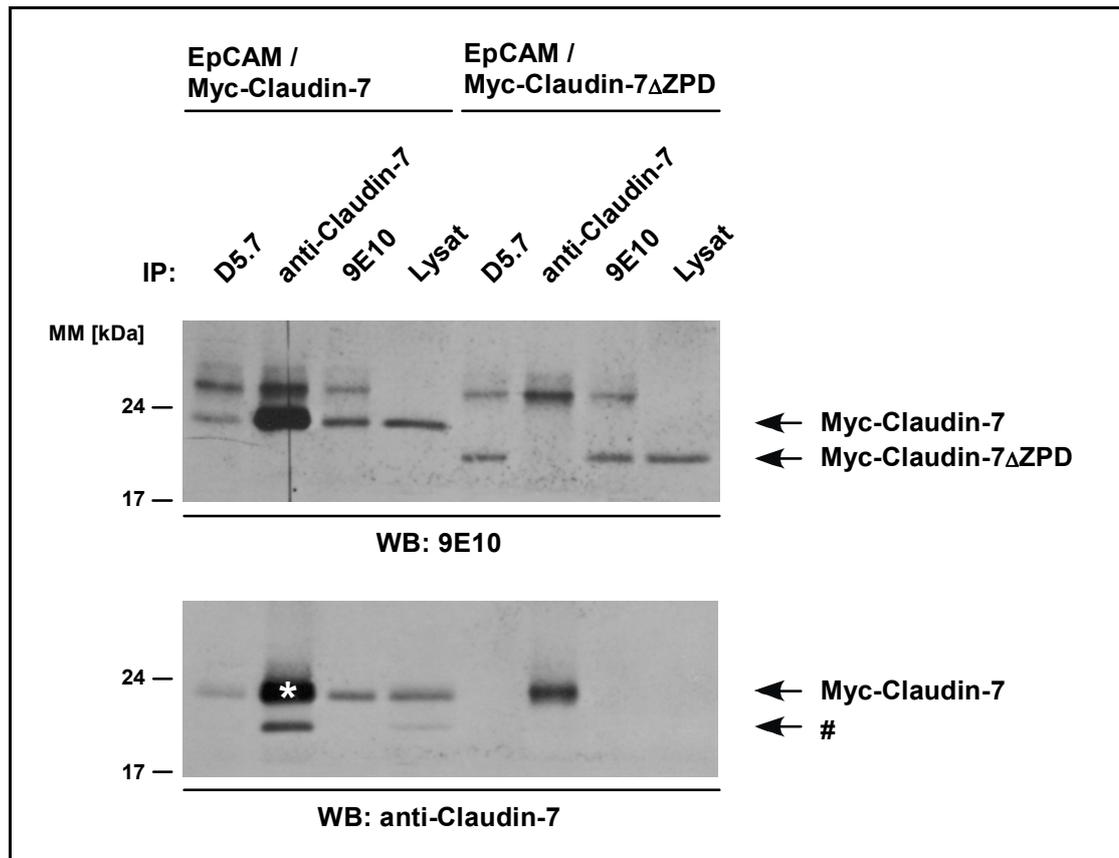


Abb. 3.18: Die C-terminale, zytoplasmatische Domäne von Claudin-7 ist für die Interaktion mit EpCAM nicht relevant. Schematische Darstellung von **A)** Wildtyp-Claudin-7, **B)** Myc-Claudin-7, **C)** Myc-Claudin-7 Δ ZPD. Die Abkürzungen bedeuten: AS: Aminosäure, ZPD: zytoplasmatische Domäne, TMD: Transmembrandomäne, EZS: extrazelluläre Schleife, IZS: intrazelluläre Schleife, Myc: Myc-Anhang. **D)** HEK293T Zellen wurden entweder mit EpCAM und Myc-Claudin-7 cDNA oder mit EpCAM und Myc-Claudin-7 Δ ZPD cDNA transient transfiziert. 1×10^7 HEK293T Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysisbuffer aufgeschlossen. Gleiche Mengen des jeweiligen Lysats wurden mit D5.7, anti-Claudin-7 oder 9E10 (anti-Myc) Antikörper inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12%igen Polyacrylamidgelen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese im WB mit 9E10 (anti-Myc) bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. anti-Ziege Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben. Die Markierung (*) der Bande in Spur 2 im unteren Blot weist darauf hin, dass das Myc-Claudin-7 Konstrukt sowie die leichte Kette des anti-Claudin-7 Antikörpers die gleiche relative Molekülmasse aufweisen und sich daher überlagern. Die Raute (#) kennzeichnet ein mögliches Degradationsprodukt des Myc-Claudin-7 Konstrukts. Alternativ könnte diese Bande auch Wildtyp-Claudin-7 darstellen, welches als Nebenprodukt translatiert wird.

Wie zu erwarten war, spielte der C-Terminus von Claudin-7 ebenfalls keine Rolle bei der Interaktion mit EpCAM. Im linken Teil der Abbildung 3.18 ist zunächst gezeigt, dass die Myc-Epitop-Markierung des Myc-Claudin-7 Moleküls keine Auswirkungen auf die Assoziation mit EpCAM hat (Spur 1). Außerdem konnte bewiesen werden, dass der anti-Myc Antikörper in der Immunpräzipitation das Myc-Claudin-7 Protein präzipitieren konnte (Spur 3). Bei der Betrachtung der Spuren 1-4 ist darauf zu achten, dass das angehängte Myc-Peptid eine Massenerhöhung von 2 kDa für Claudin-7 bedeutet. Das Myc-Claudin-7 Protein ergab im Western Blot nach 12%iger SDS-PAGE somit eine Bande bei etwa 22 kDa. Da die Bande der leichten Kette des anti-Claudin-7 Antikörpers auf gleicher Höhe läuft, überlagerten sich diese beiden Banden in der Claudin-7 IP, was in der Abbildung 3.18 durch einen weißen Stern (✱) im unteren Western Blot markiert ist. Das Lysat (Spur 4) diente zur Expressionskontrolle des Myc-Claudin-7 Konstrukts in der verwendeten Transfektante. Zusätzlich zur 22 kDa Bande des Myc-Claudin-7 Proteins ist in der Claudin-7 IP (Spur 2) und im Lysat (Spur 4) eine 20 kDa Bande zu beobachten, die mit einer Raute (#) gekennzeichnet wurde. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Wildtyp-Claudin-7, welches als Nebenprodukt bei der Translation des Myc-Claudin-7 entsteht. Alternativ könnte diese Bande auch ein Degradationsprodukt des Myc-Claudin-7 darstellen.

Die im rechten Teil der Abbildung 3.18 dargestellten Signale zeigen, dass die C-terminale, zytoplasmatische Domäne von Claudin-7 keinen Einfluss auf die Interaktion mit EpCAM hat (Spur 5). Trotz Deletion eines Peptids von 24 Aminosäuren, kopräzipitiert die Mutante Myc-Claudin-7 Δ ZPD noch mit EpCAM. Die IP mit 9E10 (Spur 7) wiederum bestätigt die Existenz der Mutante, welche mittels anti-Claudin-7 Antikörper aufgrund der Deletion des Epitops nicht zu präzipitieren war (Spur 6). Daher konnten auch im unteren Western Blot keine Banden der Mutante Myc-Claudin-7 Δ ZPD detektiert werden. Das Lysat in Spur 8 bestätigte die Expression der Myc-Claudin-7 Δ ZPD Mutante in der transfizierten Zelllinie.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente demonstrieren, dass die Interaktion der Adhäsionsmoleküle EpCAM und Claudin-7 nicht im intrazellulären Bereich der Zellen stattfindet. Es ist gelungen, durch die Deletion der C-terminalen, zytoplasmatischen Domänen beider Proteine eine Beteiligung dieser Aminosäuresequenzen an der direkten Assoziation der Transmembranproteine EpCAM und Claudin-7 auszuschließen.

3.8.2 Keine Beteiligung der EGF-1 bzw. -2 Domäne von EpCAM an der Interaktion mit Claudin-7

Aufgrund der in Abschnitt 3.8.1 erhaltenen Resultate kamen noch die extrazelluläre Domäne sowie die Transmembranregion von EpCAM für eine Beteiligung an der Interaktion mit

Claudin-7 in Frage. Der außerhalb der Zelle gelegene Aminosäureabschnitt von EpCAM kann in folgende Peptidsequenzen untergliedert werden: EGF-1 (AS 27-59), EGF-2 (AS 66-135) und Cystein-arme Region (AS 136-266). M. Balzar und Kollegen beschreiben, dass die beiden EGF-Domänen funktionell aktiv sind und sowohl für die laterale als auch für die reziproke, homotypische Adhäsion von EpCAM Molekülen verantwortlich sind (Balzar et al., 2001). Zunächst wurde untersucht, ob die N-Glykosylierung von EpCAM, welche innerhalb der EGF-2 Domäne lokalisiert ist, einen Einfluss auf die Interaktion beider Transmembranproteine hat. Dass Protein-Protein Interaktionen z. B. zwischen Integrin-Untereinheiten oder zwischen Integrinen und Tetraspaninen von einer vollständigen N-Glykosylierung der beteiligten Moleküle abhängen, ist in mehreren Publikationen gezeigt worden (Akiyama et al., 1987; Zheng et al., 1994; Kawakami et al., 2002).

Jean M. Chong und David W. Speicher konnten nachweisen, dass humanes EpCAM am Asparagin 88 (Asn⁸⁸) glykosyliert ist. Ein geringer Anteil der EpCAM Moleküle ist zusätzlich am Asparagin 51 (Asn⁵¹) glykosyliert (Chong und Speicher, 2001). Dabei ist zu beachten, dass die numerische Bezeichnung der Aminosäuren bei Chong und Speicher erst nach dem 23 Aminosäuren umfassenden Signalpeptid startet. Im Rattenhomolog des EpCAM befindet sich am Asn⁸⁸ (ohne Signalpeptid gerechnet) ebenfalls eine Bindungsstelle für eine N-Glykosylierung. Das charakteristische Motiv für eine solche Bindungsstelle sind drei aufeinander folgende Aminosäuren: N (Asparagin) - X (austauschbar) - S/T (Serin oder Threonin). Allerdings weist das EpCAM Protein der Ratte kein N-Glykosylierungsmotiv am Asn⁵¹ auf.

Um herauszufinden, ob die N-Glykosylierung von EpCAM Einfluss auf die Interaktion mit Claudin-7 hat, wurden adhärente BSp73ASML Zellen über Nacht mit dem Antibiotikum Tunicamycin behandelt. Tunicamycin verhindert die N-Glykosylierung von Proteinen durch die Blockierung des ersten Schrittes im Syntheseweg der „Core“-Oligosaccharide am Endoplasmatischen Retikulum (Heifetz et al., 1979). Die mit Tunicamycin inkubierten BSp73ASML Zellen wurden in Triton X-100 Puffer lysiert, den in Abbildung 3.2 angegebenen Immunpräzipitationen unterzogen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proben auf Nitrozellulosemembranen konnten die Proteine mit Hilfe der entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden BSp73ASML Zellen mit der entsprechenden Menge des unpolaren, organischen Lösungsmittels DMSO über Nacht inkubiert:

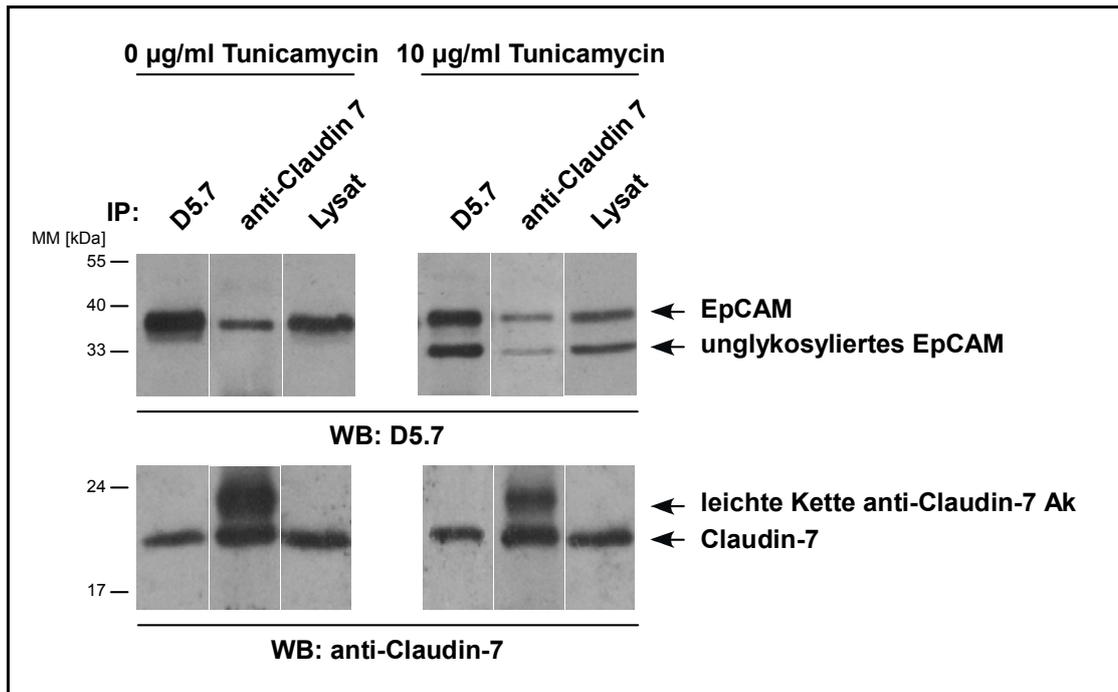


Abb. 3.19: Tunicamycin-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von EpCAM mit Claudin-7. Konfluente BSp73ASML Zellen in einer T75 Kulturflasche wurden über Nacht mit 10 µg/ml Tunicamycin behandelt (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.2). Parallel dazu wurden konfluente BSp73ASML Zellen in einer zweiten T75 Kulturflasche über Nacht als Kontrolle mit entsprechender Menge an DMSO inkubiert, um einen Effekt des Lösungsmittels auf die Interaktion auszuschließen. Anschließend wurden die Zellen in Triton X-100 enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. Gleiche Mengen des jeweiligen Lysats wurden für die Immunpräzipitation mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 Antikörper eingesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE, wobei die Nitrozellulosemembranen im anschließenden WB mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert wurden. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Es zeigte sich, dass die mit Tunicamycin behandelten Proben (Abb. 3.19, rechter Teil), neben der Bande für vollständig glykosyliertes EpCAM (38 kDa), auch ein Signal bei etwa 33 kDa im D5.7 Western Blot ergaben (Spur 4 und 6, oberer Blot). Die Inkubation der Zellen mit Tunicamycin bewirkt also eine Blockierung der N-Glykosylierung bei neu synthetisiertem EpCAM in BSp73ASML Zellen. Trotz dieser unvollständigen posttranslationalen Modifikation präzipitierte das EpCAM Molekül zusammen mit Claudin-7 (Spur 5, oberer Blot) - ein Beweis dafür, dass die Glykosylierung für die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 nicht relevant ist. Im Claudin-7 Western Blot zeigte sich dagegen keine Verschiebung der Banden hin zu niedrigeren Molekülmassen. Dieser Sachverhalt gibt Aufschluss über die posttranslationalen Modifikationen des Tetraspans: Claudin-7 ist nicht N-glykosyliert.

Um herauszufinden, ob die Aminosäuresequenz der beiden EGF-Domänen eine entscheidende Bedeutung für die Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 hat, wurde eine weitere Mutante mittels zweistufiger PCR generiert. Da das Epitop des D5.7 Antikörpers im Bereich der EGF-Domänen lokalisiert ist, musste notwendigerweise eine Myc-Epitop-Markierung am C-terminalen Ende der EpCAM-Sequenz zur Detektion der EpCAM-Mutante angefügt werden. Die cDNA, welche für EpCAM Δ EGF1+2-Myc kodiert, wurde mit dem Wildtyp-Claudin-7 in die Zelllinie HEK293T kotransfiziert. Die EpCAM Δ EGF1+2-Myc Mutante sowie die Analyse der Proben nach Immunpräzipitation und Western Blot sind in Abbildung 3.20 dargestellt:

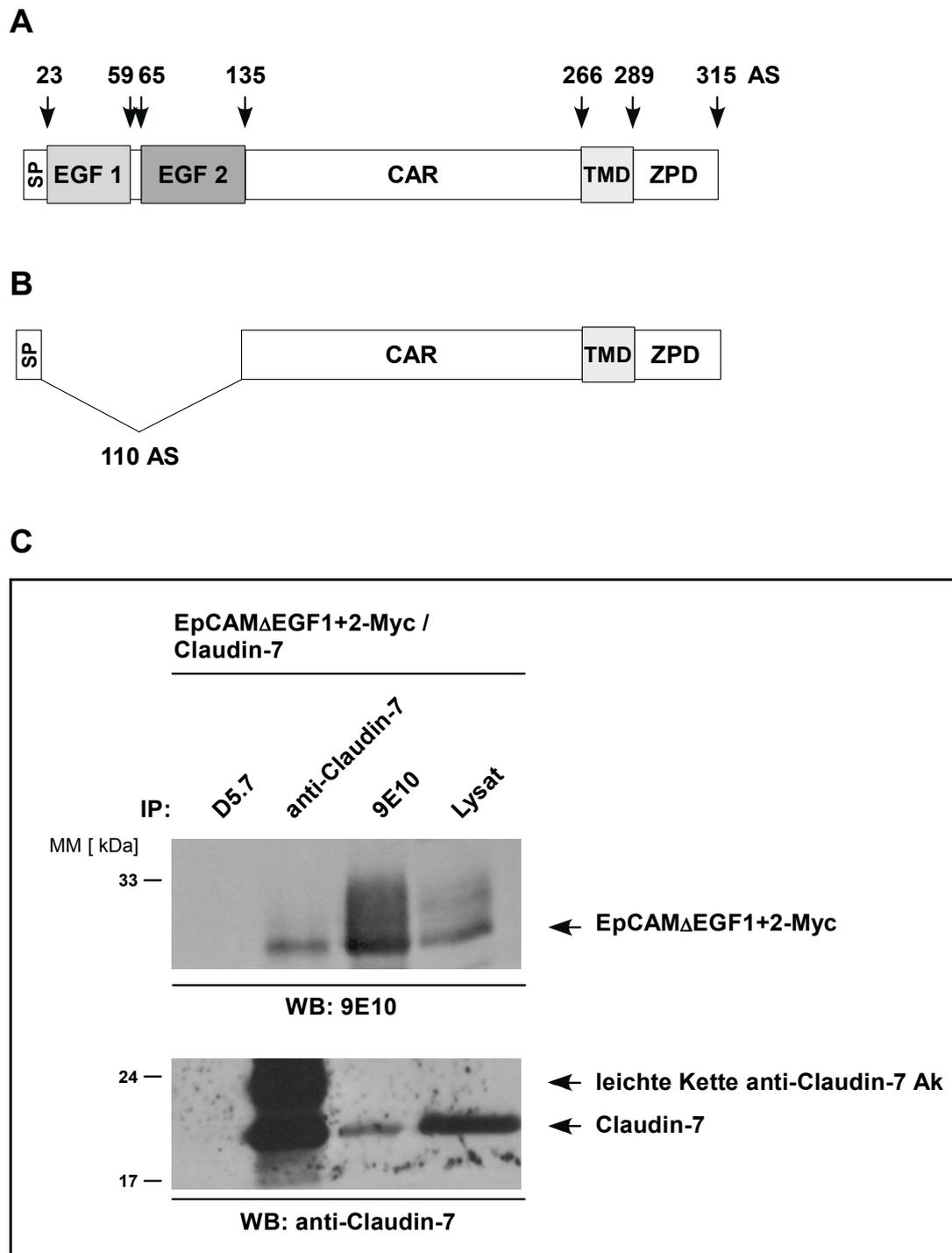


Abb. 3.20: Beide EGF-Domänen sind nicht an der Interaktion beteiligt. Schematische Darstellung von **A)** Wildtyp-EpCAM, **B)** EpCAM Δ EGF1+2-Myc. Die Abkürzungen bedeuten: siehe Abbildung 3.17. **C)** HEK293T Zellen wurden mit EpCAM Δ EGF1+2-Myc und Claudin-7 cDNA transient transfiziert. 1×10^7 HEK293T Zellen wurden in 1% Triton X-100 enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. Gleiche Mengen des Lysats wurden mit D5.7, anti-Claudin-7 oder 9E10 inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12%igen Acrylamidgelen. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese im WB mit 9E10 bzw. anti-Claudin-7 als Primärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meerschweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Dieses Experiment zeigt, dass Claudin-7 in der Lage ist, an die EpCAM-Mutante (ca. 24 kDa), deren EGF-Domänen entfernt wurden, zu binden (Abb. 3.20). Das Signal in Spur 2 (oberer Blot) bestätigt, dass die Mutante in einer IP mit anti-Claudin-7 kopräzipitiert werden kann. Außerdem ist im anti-Claudin-7 Western Blot mit der EpCAM-Mutante kopräzipitierenden Claudin-7 nachzuweisen (Spur 3). Beide Beobachtungen sprechen für eine intakte Assoziation zwischen den beiden Transmembranproteinen EpCAM und Claudin-7.

In Spur 1 beider Western Blots der Abbildung 3.20 ist weder eine 24 kDa Bande (EpCAM Δ EGF1+2-Myc) noch eine kopräzipitierende 20 kDa Bande zu entdecken. Der Grund für dieses Phänomen liegt bei dem Antikörper D5.7, der, wie bereits in diesem Abschnitt erwähnt, das mutierte EpCAM Protein nicht detektieren kann. Zusätzlich wurde in Spur 3 des oberen Blots demonstriert, dass der Antikörper 9E10 das mutierte EpCAM Protein erkennt, wobei die letzte Spur beider Western Blot Darstellungen die Expression von EpCAM Δ EGF1+2-Myc und Claudin-7 in der HEK293T Transfektante beweist.

Die direkte Protein-Protein Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 hängt also entweder von der Cystein-armen Region des extrazellulären Aminosäureabschnitts oder von der Transmembrandomäne des Zelladhäsionsproteins ab. Eine nähere Betrachtung dieser beiden Teilbereiche erfolgt im Rahmen der Diskussion (vgl. Diskussion, Abschnitt 4.4).

3.9 Phosphorylierung von Claudin-7

Phosphorylierungsreaktionen dienen zur Regulierung von Proteinaktivitäten, wobei Protein-kinasen den (γ)-Phosphorylrest des ATP auf einen Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest übertragen oder Phosphatasen einen kovalent gebundenen Phosphorylrest abspalten können. Der Prozess der Phosphorylierung und Dephosphorylierung spielt in der Weiterleitung zellulärer Signale eine zentrale Rolle. Viele Signalkaskaden innerhalb einer Zelle werden durch ständige kovalente Bindung eines Phosphorylrests an Proteine durch Kinasen und die erneu-

te Abspaltung durch Phosphatasen kontrolliert. Eine Methode zum Nachweis phosphorylierbarer Proteine stellt der „*in-vitro* kinase assay“ dar. Bei dieser Methode werden der Probe entweder aufgereinigte Proteinkinasen zugesetzt, oder die in einer Immunpräzipitation mit dem Zielprotein kopräzipitierenden Kinasen übernehmen die Aufgabe der Übertragung eines radioaktiven Phosphorylrests (^{32}P) vom $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ auf das jeweilige Protein. Die entsprechend behandelten Proteine können nach Auftrennung in einer SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembranen mittels Autoradiografie visualisiert werden.

In einer früheren Arbeit unseres Labors wurde ein mit EpCAM unter milden Lysisbedingungen kopräzipitierendes, phosphoryliertes 20 kDa Protein mittels „*in-vitro* kinase assay“ detektiert (Experiment durchgeführt von D. S. Schmidt, publiziert in Ladwein et al., 2005). Die Identität dieses phosphorylierten Proteins war jedoch unbekannt.

3.9.1 Das phosphorylierte 20 kDa Protein ist Claudin-7

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem in einer früheren Arbeit beschriebenen phosphorylierten 20 kDa Protein um Claudin-7 handelt, wurde ein Depletions-Experiment mit anschließendem „*in-vitro* kinase assay“ durchgeführt. Dazu wurden BSp73ASML Zellen in einem Puffer, der das relativ milde Detergens Lubrol WX enthielt (vgl. Tab. 3.1), lysiert. Die Lyse durch ein mildes Detergens war für die erfolgreiche Durchführung dieses Versuchs besonders wichtig, da experimentell nachgewiesen wurde, dass unter stringenteren, Triton X-100 Bedingungen, in der Autoradiografie nach einem „*in-vitro* kinase assay“ keine 20 kDa Bande mehr zu detektieren ist (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung lässt sich dahingehend interpretieren, dass die Kinase, welche die Phosphorylierungsreaktion des 20 kDa Proteins katalysiert, nach der Lyse der Zellen nicht mehr in einem Membrankomplex zusammen mit Claudin-7 lokalisiert ist.

Das Lubrol WX Lysat wurde vier aufeinander folgenden Immunpräzipitationen mit entweder D5.7 oder anti-Claudin-7 Antikörper unterzogen, wodurch dem Lysat sukzessive EpCAM bzw. Claudin-7 entzogen wurde. Schließlich wurde eine fünfte Immunpräzipitation mit D5.7 Antikörper auf dem Claudin-7-depletierten Lysat durchgeführt und umgekehrt. Zweck dieser invers durchgeführten IP war die eindeutige Identifizierung des phosphorylierten 20 kDa Proteins als Claudin-7. Sollte ein 20 kDa Molekül weiterhin, nach vollständigem Entzug von Claudin-7 mit EpCAM kopräzipitieren, würde es sich bei diesem Molekül nicht um das „tight junction“ Protein Claudin-7 handeln. Als Kontrollansatz wurden vier „Immunpräzipitationen“ ohne Antikörper mit dem gleichen Lysat unter Verwendung von entsprechenden Volumina RPMI 1640 Medium als Antikörperersatz durchgeführt. Die fünfte und letzte

Immunpräzipitation erfolgte wiederum unter Verwendung der Antikörper D5.7 bzw. anti-Claudin-7. Das Resultat des „*in-vitro* kinase assays“ ist in Abbildung 3.21 dargestellt:

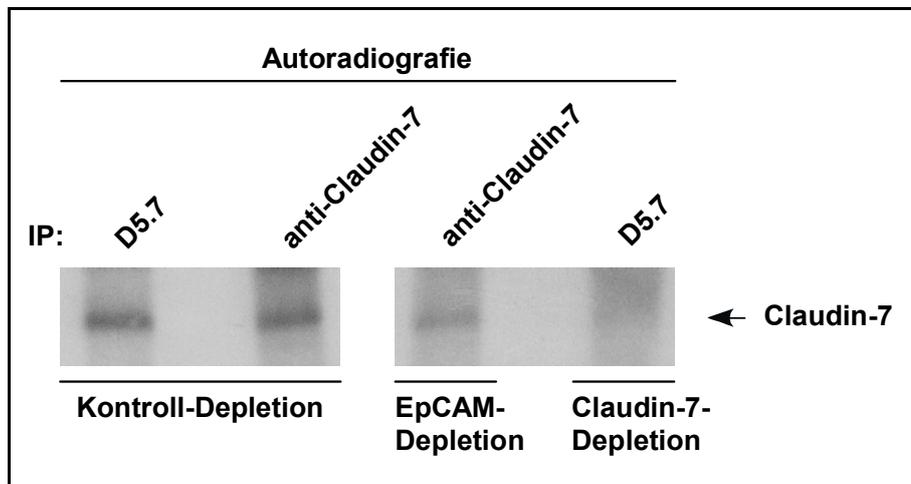


Abb. 3.21: Claudin-7 wird im „*in-vitro* kinase assay“ phosphoryliert. 4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM Natrium-orthovanadat, 10 mM Natriumfluorid, 2 mM PMSF, 1 x Protease Inhibitor Mix, 1% Lubrol WX) lysiert. Anschließend wurden gleiche Mengen Lysat fünf aufeinander folgenden IPs unterzogen. Eine Probe (Spur 3, EpCAM-Depletion) wurde in vier aufeinander folgenden Runden mit D5.7 und in der fünften mit anti-Claudin-7 inkubiert. Eine zweite Probe (Spur 4, Claudin-7-Depletion) wurde in vier aufeinander folgenden Runden mit anti-Claudin-7 und in der fünften mit D5.7 inkubiert. Dabei wurden die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe pro Runde mittels Protein G Sepharose präzipitiert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.8). Durch die nacheinander durchgeführten IPs pro Probe wurde diesen Lysaten sukzessive das entsprechende Antigen (EpCAM bzw. Claudin-7) entzogen. Die beiden Proben in Spur 1 und 2 wurden ebenfalls fünf aufeinander folgenden IPs unterzogen, wobei während der ersten vier IPs keine Antikörper sondern RPMI 1640 Medium als Antikörper-Ersatz verwendet wurde. In der fünften IP hingegen wurde das Lysat in Spur 1 mittels D5.7 und das Lysat in Spur 2 mittels anti-Claudin-7 unter Zugabe von Protein G Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend einem „*in-vitro* kinase assay“ unterzogen (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.15). Dabei wurden die Proben mit je $10 \mu Ci$ [γ - ^{32}P] ATP 20 min bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumenteile (VT) 6 x Laemmli-Puffer gestoppt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die phosphorylierten Proteine mittels Autoradiografie detektiert.

Im linken Teil der Abbildung 3.21 sind die Kontroll-Depletionen (Spuren 1 und 2) abgebildet. In beiden Spuren ist eine 20 kDa Bande in der Autoradiografie zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte in der Claudin-7 depletierten Probe (Spur 4) keine 20 kDa Bande detektiert wer-

den. Dieses Resultat belegt, dass das phosphorylierte 20 kDa Protein tatsächlich Claudin-7 entspricht. Durch die Depletion von EpCAM wird die Intensität der 20 kDa Bande zwar stark abgeschwächt (Spur 3), jedoch nicht vollständig entfernt. Das bedeutet, dass noch eine geringe Menge an nicht mit EpCAM assoziiertem Claudin-7 phosphoryliert ist. Es bleibt festzustellen, dass die phosphorylierte 20 kDa Bande dem „tight junction“ Protein Claudin-7 entspricht, und dass ein Großteil des phosphorylierten Tetraspans mit EpCAM interagiert.

3.9.2 Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wird die Aktivität vieler Proteine durch Phosphorylierung reguliert. Dieser Vorgang erfordert oftmals ein ganz bestimmte Protein- und Lipidformationen, die für eine funktionell wirksame Aktivierung von Proteinen notwendig sind. In jüngerer Zeit gibt es Hinweise, dass als „lipid rafts“ bezeichnete Membranmikrodomänen einen wichtigen Platz in der Weiterleitung von Signalen einnehmen (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Hoessli et al., 2000; Simons und Toomre, 2000; Pike, 2003). „Lipid rafts“ zeichnen sich durch ihren hohen Anteil an Glykosphingolipiden mit langen und gesättigten Kohlenwasserstoffseitenketten und Cholesterin aus und bilden daher besonders dicht gepackte, stabile Subdomänen innerhalb der Zellmembran (Pike, 2004). Dass EpCAM unter milden Lysisbedingungen in „raft“-ähnlichen Membranmikrodomänen lokalisiert ist wurde bereits beschrieben (Schmidt et al., 2004). Es gibt jedoch keine Anhaltspunkte dafür, dass auch Claudin-7 in diesen speziellen Membranregionen vorkommt.

Die molekulare Zusammensetzung dieser Glykosphingolipidreichen Membranmikrodomänen bewirkt, dass sie für bestimmte Detergenzien unlöslich sind. Das ist immer dann der Fall, wenn Lipid-Lipid-Wechselwirkungen stabiler sind als die Lipid-Detergens-Wechselwirkungen. Diese Unlöslichkeit führt zur Entstehung von Vesikeln mit hohem Lipid/Protein-Verhältnis, die durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von den im Detergens löslichen Bestandteilen getrennt werden können. So sind die unlöslichen Membranbestandteile in der Interphase zweier unterschiedlich dichter Saccharoselösungen durch Ultrazentrifugation anzureichern. In den folgenden Experimenten wurden auf Saccharose basierende Dichtegradienten analysiert, in denen die Lysate in 40%iger Saccharose vorlagen und mit einer 30%igen und einer 5%igen Saccharoselösung überschichtet wurden. Nach der Zentrifugation befinden sich die unlöslichen Membranbestandteile zwischen der 30%igen und der 5%igen Saccharosephase, was nach Aliquotierung der Gradienten etwa den Fraktionen 2-4 entspricht. Dazu wurden BSp73ASML Zellen in Brij98 enthaltendem Puffer lysiert und einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Für die folgenden Versuchsansätze

wurde das relativ milde Detergens Brij98 verwendet, da das zuvor verwendete Detergens Lubrol WX (vgl. Abschnitt 3.9.1) zu diesem Zeitpunkt der Arbeit nicht mehr kommerziell erhältlich war. In diversen Experimenten konnte jedoch demonstriert werden, dass Brij98 in Bezug auf die analysierten Proteine einen mit Lubrol WX vergleichbaren Effekt erzielt (Daten nicht gezeigt). Nach der Ultrazentrifugation wurden die Gradienten in zwölf Fraktionen aliquotiert und einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen. Zur korrekten Einschätzung der Gradienten wurden zusätzlich Kontrollproteine analysiert, deren Lokalisation innerhalb bzw. außerhalb von Membranmikrodomänen dokumentiert ist. Caveolin, ein 21 kDa Molekül, das in hoher Stöchiometrie an Cholesterin bindet, diente zur Markierung der detergensunlöslichen Membranmikrodomänen (Brown, 1992; Rothberg et al., 1992; Gagnoux-Palacios et al., 2003). Der Transferrin-Rezeptor lokalisiert dagegen nicht in „lipid rafts“ und ist damit im verwendeten Detergens vollständig löslich (Harder et al., 1998; Gagnoux-Palacios et al., 2003; Shogomori und Brown, 2003). In der folgenden Darstellung ist das Ergebnis des Gradienten abgebildet (Abb. 3.22):

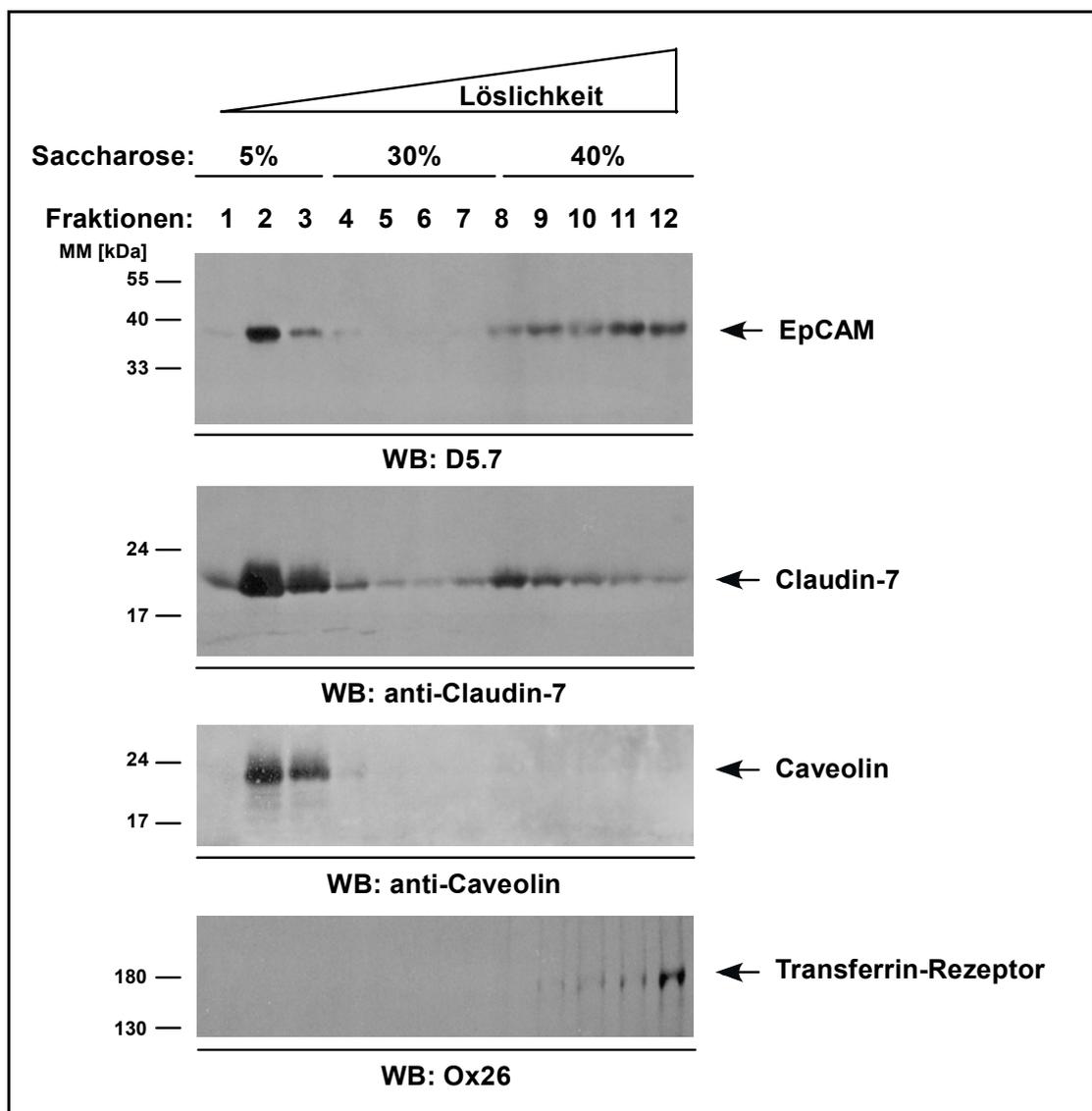


Abb. 3.22: EpCAM und Claudin-7 lokalisieren nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation teilweise in detergensresistenten Fraktionen. 5×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer (1% Brij98) aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend auf einen 40%igen Saccharosegehalt eingestellt und vorsichtig mit 30%iger und 5%iger Saccharoselösung überschichtet. Nach der folgenden Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.4.17) wurde die Probe in 12 x 1 ml Aliquots unterteilt. Die Auftrennung der Proteine zur Detektion von EpCAM, Claudin-7 und Caveolin erfolgte in einer 12%igen und für den Transferrin-Rezeptor in einer 8%igen SDS-PAGE. Im anschließenden WB wurden die auf Nitrozellulosemembranen immobilisierten Proteine mit den Primärantikörpern D5.7, anti-Claudin-7 und Ox26 inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Esel anti-Maus-HRP, Ziege anti-Meerschweinchen-HRP bzw. Ziege anti-Kaninchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben. Je größer die Löslichkeit der Proteine im verwendeten Detergens Brij98, desto höher die Fraktion in der sie zu detektieren sind.

Wie sich in Abbildung 3.22 zeigt, konnten Caveolin und der Transferrin-Rezeptor den Erwartungen entsprechend detektiert werden. Caveolin findet sich in den detergensunlöslichen Fraktionen 2-4 des Saccharose-Dichtegradienten wieder. Die Transferrin-Rezeptor Moleküle hingegen sind komplett gelöst und verbleiben somit in den Fraktionen 9-12. Im Gegensatz zu den beiden Kontrollproteinen weisen EpCAM und Claudin-7 jedoch eine differenziertere Verteilung auf. Ein beträchtlicher Anteil beider Transmembranproteine findet sich in den Fraktionen 2-4 wieder, welche die unlöslichen Membranmikrodomänen enthalten. Ein Vergleich mit den von Caveolin erhaltenen Signalen bestätigt diese Interpretation der Daten. Zusätzlich sind jedoch auch Banden in den Fraktionen vollständig gelöster Proteine zu erkennen.

Um herauszufinden, ob Unterschiede in Bezug auf die Interaktion von EpCAM und Claudin-7 in detergensunlöslichen bzw. -löslichen Proteinfractionen vorliegen, wurden die Fraktionen 2-4 sowie 8-11 jeweils vereinigt. Die beiden Fraktionsgemische enthielten somit einen repräsentativen Querschnitt der detergensresistenten Fraktionen einerseits und der vollständig löslichen Fraktionen andererseits. Diese beiden Proben wurden anschließend Immunpräzipitationen mit D5.7 und anti-Claudin-7 Antikörper unterzogen. Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine im Western Blot analysiert. Beide Proteine kopräzipitierten mit dem jeweils anderen im Fraktionsgemisch 2-4 und 8-11. Dieser Befund beweist, dass eine Lokalisation in cholesterinreichen Membranmikrodomänen für die Integrität der Assoziation zwischen EpCAM und Claudin-7 keine notwendige Voraussetzung ist (Daten nicht gezeigt).

Zur Verifizierung der Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in Membranmikrodomänen wurde das Cholesterin-extrahierende Reagenz Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) eingesetzt. Eine partielle Cholesterindepletion mittels M β CD destabilisiert die dicht gepackte Lipid-doppelschicht und löst dadurch die vorhandenen Membranmikrodomänen einer Zellmembran auf (Pralle et al., 2000; Simons und Toomre, 2000). Mit Hilfe einer Cyclodextrin-Behandlung werden etwa 40-60% des Gesamtcholesterins einer Zelle entfernt (Oliferenko et al., 1999; Claas et al., 2001). Aufgrund der Cholesterin-Depletion ist zu erwarten, dass beide Transmembranproteine statt in die oberen Fraktionen zu flutieren in den unteren Fraktionen des Gradienten verbleiben, was ein weiterer Beleg für die Existenz von EpCAM und Claudin-7 in den speziellen Subdomänen der Zellmembran wäre. Zu diesem Zweck wurde das Experiment wie unter Abbildung 3.22 beschrieben durchgeführt, wobei eine Hälfte des Lysats vor Beginn der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mit M β CD behandelt wurde. Die zweite Hälfte diente als Negativkontrolle. In Abbildung 3.23 ist das Ergebnis dieser Gradienten veranschaulicht:

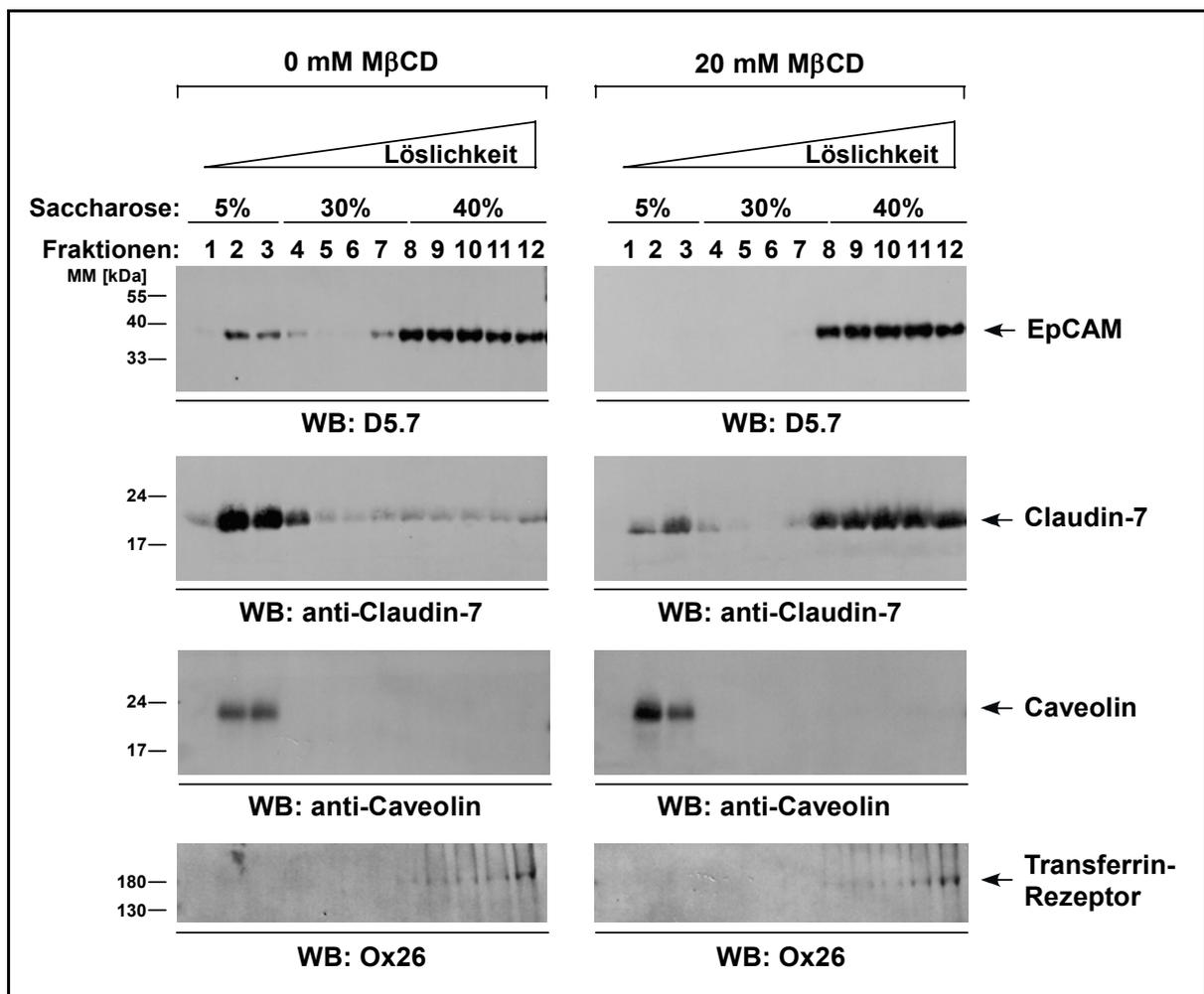
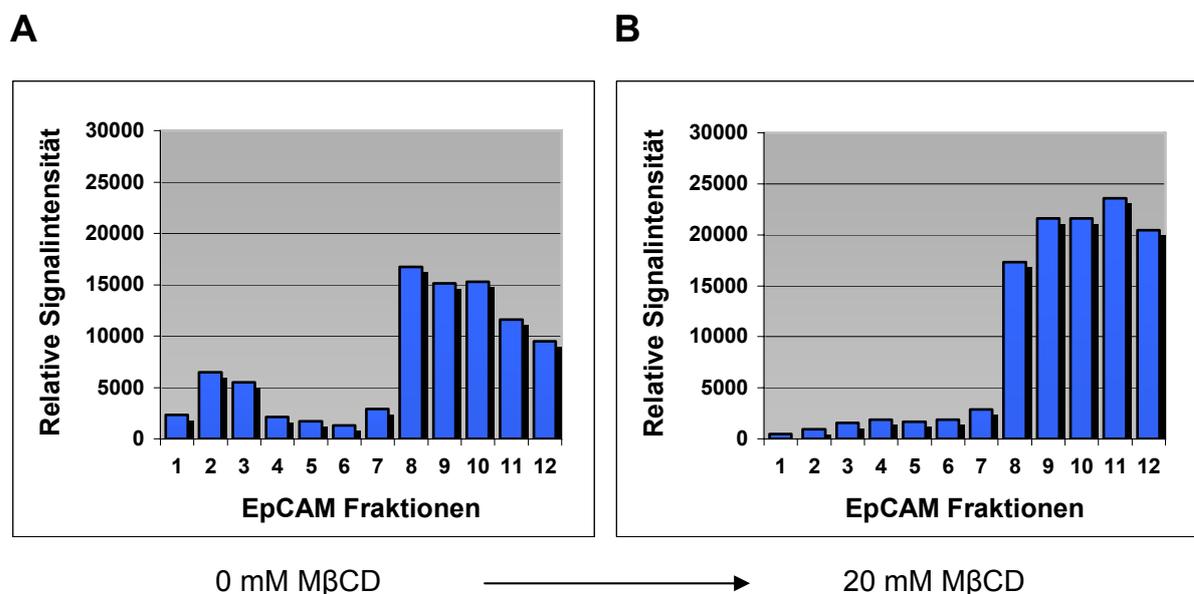


Abb. 3.23: Die Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in den detergentunlöslichen Fraktionen ist M β CD-sensitiv. 1×10^7 BSp73ASML Zellen wurden in Lysispuffer (1% Brij98) aufgeschlossen. Die eine Hälfte des Lysats wurde 30 min bei 37 °C mit einer Endkonzentration von 20 mM M β CD behandelt (rechte Seite). Die zweite Hälfte wurde ebenfalls 30 min bei 37 °C, jedoch ohne Zugabe von M β CD, behandelt (linke Seite). Die folgende Probenbehandlung, Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, Auftrennung und Detektion der Proteine erfolgte wie unter Abbildung 3.22 beschrieben. Je größer die Löslichkeit der Proteine im verwendeten Detergens Brij98, desto höher die Fraktion in der sie zu detektieren sind.

In Abbildung 3.23 (rechte Seite) ist zu erkennen, dass nach Behandlung der Lysate mit M β CD EpCAM von dem Detergens Brij98 vollständig in Lösung gebracht wurde und nicht mehr in den unlöslichen Membrananteilen (vgl. linke Seite) lokalisiert ist. Claudin-7 verhält sich tendenziell identisch zu EpCAM. Eine nahezu komplette Verlagerung der Proteinanteile in die löslichen Fraktionen des Gradienten ist die Folge des Cholesterinzugs (rechte Seite). Es bleibt anzumerken, dass die partielle Extraktion des Cholesterins nicht ausreicht, um die Lipidinteraktionen der Caveolin enthaltenden Subdomänen aufzubrechen. Diese Beobachtung stimmt überein mit Befunden aus dem Labor von W. B. Huttner (Roper et al., 2000). Die Methyl- β -Cyclodextrin Behandlung hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Verteilung des Transferrin-Rezeptors. Densitometrische Auswertungen der im Western Blot erhaltenen Signale der M β CD-behandelten sowie der unbehandelten Probe sind in folgenden Diagrammen gegenübergestellt:



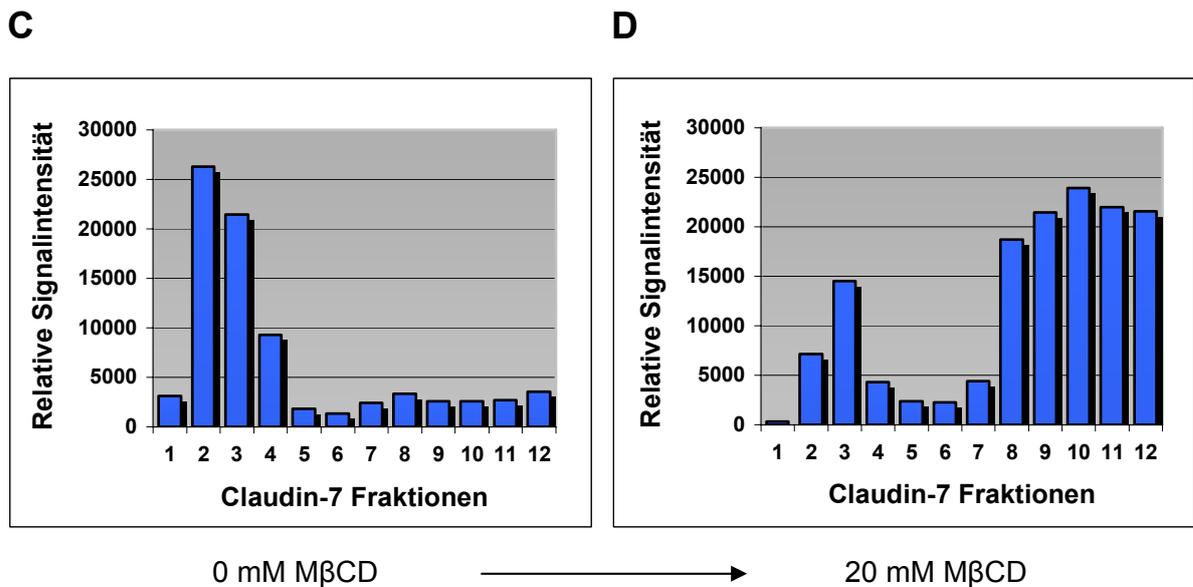


Abb. 3.24: Densitometrische Analyse der in Abbildung 3.23 dargestellten Banden von EpCAM und Claudin-7. Auf der x-Achse der Diagramme sind die einzelnen Fraktionen dargestellt, während die y-Achse die relative Signalintensität der einzelnen Banden angibt. **A)** EpCAM Verteilung ohne Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)-Behandlung, **B)** EpCAM Verteilung nach M β CD-Behandlung, **C)** Claudin-7 Verteilung ohne M β CD-Behandlung, **D)** Claudin-7 Verteilung nach M β CD-Behandlung. Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit dem Softwareprogramm „ImageJ“, Version 1.32j (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Die vorliegenden Diagramme zeigen die relativen Bandenintensitäten der EpCAM (Abb. 3.24 A und B) sowie Claudin-7 (Abb. 3.24 C und D) Signale nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aus der Abbildung 3.23. Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass EpCAM (Abb. 3.24 A) stärker in den unteren Fraktionen 8-12 vertreten ist, während Claudin-7 (Abb. 3.24 C) eher zu den Regionen geringerer Löslichkeit tendiert (Fraktionen 1-4). Trotz der ungleichen Verteilung ist festzustellen, dass ein bestimmter Anteil beider Proteine in cholesterinreichen Membranmikrodomänen vorliegt, wie die einzelnen Intensitäten der Bandensignale in den Fraktionen 2-4 verdeutlichen. Nach M β CD-Behandlung ist jedoch eine signifikante Abnahme der unlöslichen Membrananteile für beide Proteine zu erkennen. Besonders EpCAM wird vollständig aus den oberen Fraktionen verdrängt (Abb. 3.24 B), Claudin-7 ist dagegen noch in den Fraktionen 2-4 mit einer relativ geringen Proteinmenge vertreten (Abb. 3.24 D).

Die vorliegenden Experimente lassen den Schluss zu, dass das Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM und das „tight junction“ Protein Claudin-7 unter Brij98 Lysisbedingungen in cholesterinreichen Membranmikrodomänen der BSp73ASML Zellen lokalisiert sind.

B

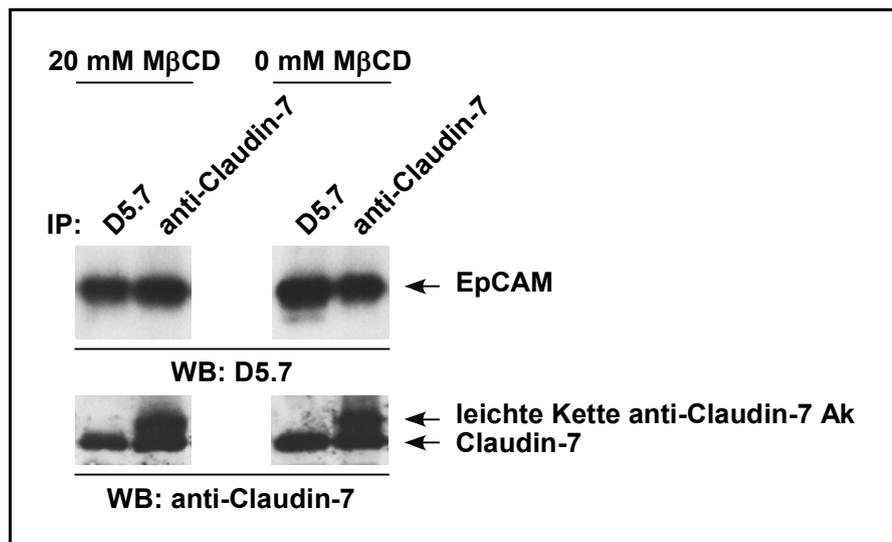


Abb. 3.25: Die Phosphorylierung von Claudin-7 ist abhängig von der Lokalisation in cholesterinreichen Membranmikrodomänen. **A)** 4×10^6 BSp73ASML Zellen wurden in 1% Lubrol WX enthaltendem Lysispuffer aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend mit 20 mM Methyl- β -Cyclodextrin 30 min bei 37 °C inkubiert. In der folgenden IP wurden gleiche Mengen des Lysats mit D5.7 bzw. anti-Claudin-7 inkubiert und mittels Protein G Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend einem „*in-vitro* kinase assay“ unterzogen. Dabei wurden die Proben mit je 10 μ Ci [γ - 32 P] ATP 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 VT 6 x Laemmli-Puffer gestoppt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proben mittels Autoradiografie detektiert. **B)** Die Lysate in diesem Experiment wurden bis einschließlich der IP wie unter **A)** beschrieben behandelt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben in einer 12%igen SDS-PAGE und die Inkubation der Membranen mit den HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern Esel anti-Maus-HRP bzw. Ziege anti-Meer-schweinchen-HRP. Die Detektion erfolgte wie unter Abbildung 3.1 beschrieben.

Der Abbildung 3.25 A ist zu entnehmen, dass der Entzug von Cholesterin eine Phosphorylierung von Claudin-7 im „*in-vitro* kinase assay“ verhindert: Die Phosphorylierungsreaktion ist M β CD-sensitiv. Offensichtlich ist die Struktur von Membranmikrodomänen durch den Einsatz von Methyl- β -Cyclodextrin so stark modifiziert bzw. zerstört worden, dass sich die Kinase nicht mehr in einem Membrankomplex mit Claudin-7 befindet. Die Kinase ist somit nicht mehr in der Lage die Übertragung des radioaktiven Phosphorylrests zu katalysieren. Die Kontrollen im rechten Teil der Abbildung 3.25 A zeigen hingegen eindeutig, dass die Kinasierungsreaktion ohne vorherige M β CD-Behandlung effizient funktionierte.

D5.7- und anti-Claudin-7-Immunpräzipitate wurden ohne nachfolgenden „*in-vitro* kinase assay“ einer SDS-PAGE unterzogen und im Western Blot analysiert (Abb. 3.25 B). Im Ge-

gensatz zur Autoradiografie fällt auf, dass hier kein sichtbarer Unterschied zwischen den M β CD-behandelten und den unbehandelten Proben zu erkennen ist. Die Interaktion beider Moleküle wird durch die Inkubation mit M β CD und die damit verbundene partielle Auflösung der cholesterinreichen Lipidformationen nicht beeinträchtigt.

Mit Hilfe der vorliegenden Experimente konnte der Beweis erbracht werden, dass die Lokalisation von Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen für eine erfolgreiche Phosphorylierung, und daher für eine mögliche Initiierung von Signalkaskaden, unbedingt notwendig ist.

4 DISKUSSION

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist involviert in Prozesse wie Zellproliferation, Zellmigration, Tumorprogression und Metastasierung (vgl. Abschnitt 1.3). Der Wirkmechanismus, über den EpCAM Einfluss auf diese zellulären Vorgänge nimmt, ist jedoch weithin unbekannt. Um einen Beitrag zur Aufklärung dieses Mechanismus' zu leisten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, mögliche EpCAM-assoziierte Moleküle zu detektieren. Dabei gelang es, das „tight junction“ Protein Claudin-7 als ein direkt und spezifisch mit EpCAM interagierendes Protein zu identifizieren. Es konnte außerdem dargelegt werden, dass die äußerst stabile Interaktion bei Zellen unterschiedlicher Histologie und speziesübergreifend beobachtet wird, und dass die Cystein-arme Region oder die Transmembrandomäne des EpCAM für die Assoziation mit Claudin-7 verantwortlich ist. Weiterhin wurde demonstriert, dass beide Transmembranproteine in cholesterinreichen Membranmikrodomänen lokalisiert sind. Die Anordnung in diesen Subdomänen der Zellmembran ist für die Phosphorylierung von Claudin-7 und damit für seine potentielle Funktion in der Transduktion zellulärer Signale essentiell.

4.1 Das Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM interagiert direkt mit dem „tight junction“ Protein Claudin-7

Untersuchungen mittels Immunpräzipitation nach Biotinylierung und DSP-Quervernetzung ergaben Hinweise auf ein direkt mit EpCAM interagierendes 20 kDa Protein (vgl. Abb. 3.1, 3.2 und 3.3). Eine Publikation von M. Trebak und Kollegen lieferte zusätzliche Indizien für ein EpCAM-assoziiertes 20 kDa Protein. Nach Behandlung der Zelllysate der humanen Karzinomzelllinien Caco 2 und Colo 205 mit einem chemischen Quervernetzungsreagenz konnten die Autoren im Western Blot mittels anti-EpCAM Antikörper eine Bande bei etwa 55 kDa detektieren. Trebak formuliert drei mögliche Erklärungsversuche für das Auftreten dieser Bande: (1.) Eine Entstehung der Bande verursacht durch interne Quervernetzungen von EpCAM-Molekülen; (2.) Eine zufällige und ungerichtete Quervernetzung von EpCAM mit anderen Proteinen aufgrund der hohen Anzahl von EpCAM-Molekülen auf der Oberfläche der verwendeten Karzinomzelllinien; Oder (3.) eine spezifische Interaktion zwischen EpCAM (38 kDa) und einem unbekanntem Protein (etwa 20 kDa) (Trebak et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung des unbekanntem 20 kDa Proteins eine massenspektrometrische Analyse mit Hilfe der MALDI-TOF/PSD Technik durchgeführt. Es gelang, das 20 kDa Molekül als das „tight junction“ Protein Claudin-7 zu identifizieren. Durch Koimmunpräzipitation mit einem Claudin-7-spezifischen Antikörper konnte bestätigt

werden, dass es sich bei dem über eine direkte Protein-Protein Interaktion mit EpCAM assoziierten Molekül tatsächlich um Claudin-7 handelt (vgl. Abb. 3.7 und 3.8). Es steht zu vermuten, dass auch die von Trebak und Mitarbeitern nach chemischer Quervernetzung gefundene 55 kDa Bande auf die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 zurückzuführen ist.

4.1.1 Das „tight junction“ Protein Claudin-7

Aufgrund seiner direkten Protein-Protein Interaktion mit EpCAM verdient das Tetraspanmolekül Claudin-7 eine kurze Einführung. Generell gilt, dass der überwiegende Anteil der Claudine noch nicht eingehend charakterisiert ist. K. Morita und Mitarbeiter entdeckten im Jahr 1999, dass außer den bis dahin bekannten Claudinen 1 und 2 (Furuse et al., 1998) weitere Mitglieder der Claudin-Familie existieren. Aufgrund von Datenbankrecherchen und PCR-Analysen konnten die Claudine 3-8 identifiziert werden. Claudin-7 wurde dabei mittels PCR aus Hepatozyten isoliert (Morita et al., 1999). Strukturell zeichnet sich das Protein mit einer molekularen Masse von 20 kDa im Menschen wie in der Ratte durch eine Sequenzlänge von 211 Aminosäuren aus. Intrazellulär ist Claudin-7 über ZO-1 mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Itoh et al., 1999). Allerdings sind die gewebsspezifischen Analysen der Molekülfamilie der Claudine noch fragmentarisch - so auch für Claudin-7. L. Mitic und Mitarbeiter beschreiben z. B. eine starke Claudin-7 Expression in der Lunge und der Niere, eine schwache Expression in der Leber und den Hoden, wobei keine Expression im Herzgewebe detektiert werden konnte (Mitic et al., 2000). Die Untersuchungen von S. Tsukita und Kollegen entsprechen im Wesentlichen den Analysen von L. Mitic, wobei S. Tsukita keine Expression von Claudin-7 in Lebergewebe nachweisen konnte (Tsukita et al., 2001). Außerdem wurde die Expression von Claudin-7 in verhornenden Epithelien (Ban et al., 2003), Brustdrüsengewebe (Kominsky et al., 2003; Nichols et al., 2004) und dem Nephron (Muller et al., 2003; Li et al., 2004) beobachtet. In der Einleitung Abschnitt 1.2 wird erwähnt, dass Claudine das Rückgrat der „tight junctions“ bilden. So ist auch die Lokalisation von Claudin-7 in diesen Membranstrukturen polarisierter Epithelzellen bestätigt worden (Li et al., 2004; Soini, 2005; Blackman et al., 2005; Ladwein et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um M. D. Alexandre beschreibt eine Ionen-Transportfunktion für Claudin-7. Durch eine Überexpression dieses Tetraspans in der epithelialen Schweinenieren-Zelllinie LLC-PK1 konnte ein gesteigerter, parazellulärer Na^+ -Transport nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass Claudin-7 als interzellulärer Na^+ -Kanal agieren könnte (Alexandre et al., 2005).

4.1.2 Hohe Stabilität und Spezifität der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7

Der Proteinkomplex bestehend aus EpCAM und Claudin-7 ist selbst nach einer Lyse der BSp73ASML Zellen im denaturierenden RIPA-Puffer noch stabil (vgl. Abb. 3.3). Obwohl dieser Lysispuffer aufgrund seiner Bestandteile - er enthält die Detergenzien Triton X-100, Natriumdeoxycholat und SDS - eine hohe Stringenz aufweist, ist er nicht in der Lage, die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 aufzulösen. Dieses Experiment demonstriert die äußerst hohe Stabilität des Proteinkomplexes.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass EpCAM in Ratten und humanen Karzinomzelllinien spezifisch mit Claudin-7 interagiert. K. Morita und Mitarbeiter konnten durch Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums der Claudine 1-8 ermitteln, dass Claudin-7 den höchsten Verwandtschaftsgrad zu Claudin-1 aufweist (Morita et al., 1999). Vergleichend wurde die Fähigkeit der Claudine 1, 3 und 7 analysiert, mit EpCAM eine Assoziation eingehen zu können. Lediglich Claudin-7 zeigt eine Interaktion mit EpCAM in den getesteten Zelllinien. Claudin-1 und -3 hingegen weisen keine Assoziation mit dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül auf. Obwohl die Aminosäuresequenz von Ratten Claudin-1 zu 60,7% mit der von Ratten Claudin-7 identisch und zu 68,4% ähnlich ist (errechnet mit der Software „BestFit“, HUSAR, DKFZ, Heidelberg), besitzt dieses Tetraspan nicht die Eigenschaft, mit EpCAM zu interagieren. Gleiches gilt für das Ratten Claudin-3, welches eine Identität von 50,8% und eine Ähnlichkeit von 59,5% zu der von Ratten Claudin-7 aufweist. Damit ist die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 als spezifisch zu betrachten, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass noch andere Claudine mit EpCAM assoziiert sind. Um die an der Interaktion beteiligten Aminosäuresequenzen zu präzisieren, bietet es sich an, Claudin-7 Deletionsmutanten und chimäre Moleküle bestehend aus Aminosäureabschnitten von Claudin-7 und -1 zu generieren. Diese Untersuchungen werden zur Zeit durchgeführt.

4.2 Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 in Karzinomzelllinien und einer immortalisierten Keratinozytenlinie

Vier Karzinomzelllinien der Ratte, zehn humane Karzinomzelllinien sowie die nicht-tumorigene Keratinozytenlinie HaCaT sind auf die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 überprüft worden. Dabei konnte in allen getesteten Zelllinien, welche beide Proteine koexprimieren eine Assoziation von EpCAM und Claudin-7 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.10, 3.11 und 3.12). Eine Ausnahme stellt die humane Kolorektalkarzinom-Zelllinie SW707 dar. Zwar konnte eindeutig demonstriert werden, dass sowohl EpCAM als auch Claudin-7 von dieser

Zelllinie synthetisiert werden, jedoch konnte keine Interaktion beider Moleküle nachgewiesen werden. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: (1.) Eines der beiden Gene, die für die Transmembranproteine kodieren, bzw. beide Gene weisen eine oder mehrere Mutationen auf, so dass eine direkte Interaktion der synthetisierten Proteine verhindert wird; (2.) Ein für die Assoziation beider Moleküle notwendiger Mechanismus der Signalübertragung ist in dieser Zelllinie nicht vorhanden oder gehemmt; Oder (3.) bestimmte, für die Assoziation von EpCAM und Claudin-7 potentiell bedeutsame „raft“-ähnliche Membranmikrodomänen (vgl. Abschnitte 3.9.2 und 4.5) sind in dieser Zelllinie nicht vorhanden.

Die beschriebenen Experimente belegen, dass die direkte Assoziation von EpCAM und Claudin-7 keine Eigenheit der Zelllinie BSp73ASML darstellt. Vielmehr wurde das Phänomen dieser Interaktion sowohl zelllinienunabhängig als auch speziesunabhängig beobachtet.

Eine niedrige Stöchiometrie der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 in der Ratten Karzinomzelllinie BSp73ASML konnte aufgrund eines Deletionsexperiments ermittelt werden. Dieser Befund wurde durch die Beobachtung der nur geringen Kolo-kalisation beider Transmembranproteine in BSp73ASML und PROb Zellen bestätigt. Offensichtlich sind nur geringe Anteile der jeweiligen Proteinfractionen in den untersuchten Zelllinien miteinander assoziiert. Zur Aufklärung, ob es sich dabei um kurzfristige oder dauerhafte Protein-Protein Interaktionen der beiden beteiligten Transmembranproteine handelt, sind weitere Experimente notwendig. Zu diesem Zweck sind Analyse von Zellen, die zuvor mit radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert wurden mittels der „Pulse-Chase“-Methode geplant. Auf diese Weise könnte durch das Ernten der radioaktiv markierten Zellen in bestimmten Zeitabständen der Zeitpunkt sowie das Zellkompartiment der Assoziation der beiden Transmembranmoleküle genauer bestimmt werden.

4.3 Subzelluläre Lokalisation von EpCAM und Claudin-7

Mittels Immunelektronenmikroskopie konnte festgestellt werden, dass beide Transmembranproteine sowohl basolateral als auch in den Strukturen der „tight junctions“ lokalisiert sind. Die Beobachtung einer basolateralen Verteilung des EpCAM wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen dokumentiert. Bei allen Untersuchungen konnte EpCAM jedoch keiner der drei vorherrschenden Zell-Zell Adhäsionsstrukturen einer polarisierten Zelle, den „tight junctions“, den „adherens junctions“ bzw. den Desmosomen, zugeordnet werden (vgl. Abschnitt 1.3.1). M. Balzar und Kollegen beschreiben sogar den expliziten Ausschluss von EpCAM aus den „TJs“ von Zellen des humanen Kolongewebes (Balzar et al., 1999a). Dieser Befund steht im Widerspruch zu den hier vorliegenden Daten, bei denen EpCAM, genau wie Claudin-7, eindeutig in den „TJs“ von humanen Duodenalmukosazellen detektiert werden

konnte. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Möglichkeit für EpCAM innerhalb der „TJs“ mit Claudin-7 zu interagieren. Wenngleich experimentell noch nicht untersucht, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass EpCAM aufgrund seiner starken Assoziation mit Claudin-7 einen destabilisierenden Effekt auf die „TJs“ ausübt, da EpCAM-assoziiertes Claudin-7 in seiner potentiellen Eigenschaft homo- bzw. heterotypische Bindungen mit anderen Claudinen einzugehen, wie sie z. B. für die Claudine 1, 2 und 3 gezeigt ist (Furuse et al., 1999), gestört sein könnte. Andererseits ist bereits bekannt, dass Claudine nicht ausschließlich in „TJs“ lokalisiert sind, so dass weitere Funktionen dieser Tetraspane als wahrscheinlich zu erachten sind. So ist Claudin-7 in polarisiertem Epithelgewebe des Zwölffingerdarms nicht auf seine Anordnung in „TJs“ beschränkt, sondern konnte auch entlang der basolateralen Zellmembrandomäne beobachtet werden (Ladwein et al., 2005). Für einige Claudine, darunter die Claudine 1, 2, 3, 4 und 5, ist diese basolaterale Lokalisation in der Plasmamembran, außerhalb der „TJ“-Stränge, bereits bekannt (Gregory et al., 2001; Rahner et al., 2001; Tokes et al., 2005). Auch Claudin-7 wurde in der basolateralen Membran humaner Epithelzellen der Luftröhre sowie in murinem Epithelgewebe der Brustdrüse, der Luftröhre und der Niere beobachtet (Coyne et al., 2003; Li et al., 2004; Blackman et al., 2005). Möglicherweise spricht diese Membranverteilung für eine Funktion der Tetraspanmoleküle hinsichtlich einer parazellulären Weiterleitung von Ionen, ohne dabei Zell-Zell Kontakte zu formen. Alternativ könnten diese Claudine eine Reserve repräsentieren, die aufgrund eines physiologischen Stimulus in die „TJs“ rekrutiert wird. Denkbar sind auch Zell-Zell oder Zell-Matrix Adhäsionsfunktionen in diesen Bereichen der Plasmamembran oder eine Funktion in der Signalübertragung (Rahner et al., 2001; Li et al., 2004; Blackman et al., 2005). Man könnte außerdem vermuten, dass Claudin-7 durch seine starke Interaktion mit EpCAM aus den „TJs“ in basolaterale Membranbereiche transportiert würde. In diesem Fall würde dem Proteinkomplex bestehend aus EpCAM und Claudin-7 eine „TJ“-regulierende Funktion zukommen.

Außer der membranassoziierten Lokalisation von Claudin-7 konnte auch eine Präsenz des Tetraspans in intrazellulären vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.16). Die Publikationen von B. Blackman und Kollegen sowie von Y. Soini belegen, dass Claudin-7 auf Vesikeln im Zytoplasma unterschiedlicher Mausepithelgewebe respektive diverser humaner Karzinome vertreten ist (Soini, 2005; Blackman et al., 2005). Möglicherweise befinden sich diese Vesikel auf einem transzellulären Weg von der bzw. zur basolateralen Plasmamembran, wo Claudin-7 mit Komponenten der extrazellulären Matrix in Kontakt treten könnte. Alternativ könnte Claudin-7 durch seine Extraktion aus den „TJs“ unter Generierung vesikulärer Formationen zur Regulierung der Permeabilität von „TJs“ beitragen. Schließlich ist eine stabilisierende Funktion spezialisierter Vesikel-Kompartimente im Zytoplasma durch Claudin-7 möglich (Blackman et al., 2005). Auch für andere Claudine, darunter z. B. Claudin-1 und -3, wurde eine Anordnung in zytoplasmatischen Vesikeln beobachtet

(Matsuda et al., 2004; Tan et al., 2004; Tokes et al., 2005). Dagegen konnte EpCAM nicht in diesen Claudin-positiven Vesikeln detektiert werden (vgl. Abb. 3.16). Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion beider Transmembranproteine in der basolateralen Membrandomäne, den „tight junctions“ oder in beiden genannten Bereichen der Zellmembran stattfinden könnte. Aus dem Immunfluoreszenz-Experiment geht außerdem hervor, dass die Interaktion zwischen beiden Adhäsionsmolekülen unabhängig von Zell-Zell Kontakten in BSp73ASML und PROb Zellen auftritt. Diese Beobachtung wird durch die Analyse der Interaktion in dicht ausgesäten (hoher Zell-Zell Kontakt) bzw. vereinzelt ausgesäter BSp73ASML Zellen (niedriger bis kein Zell-Zell Kontakt) bestätigt.

Die ermittelten Daten stehen im Einklang mit der Hypothese, dass durch die Assoziation dieser beiden Adhäsionsproteine das Funktionsspektrum der Einzelmoleküle erweitert wird, zum Beispiel durch Zell-Matrix Adhäsion, welche für Claudin-7 bereits vermutet wird (Blackman et al., 2005).

4.4 Die interaktionsrelevanten Aminosäureabschnitte von EpCAM

Die beiden EGF-Domänen sowie der zytoplasmatische Teil von EpCAM sind die bisher einzigen Aminosäureabschnitte des Transmembranmoleküls, denen Interaktionseigenschaften zugewiesen werden konnten (vgl. Abschnitt 1.3.1). Mit Hilfe von Deletionsmutanten gelang der Nachweis, dass die zytoplasmatische Domäne nicht relevant für die direkte Assoziation mit Claudin-7 ist. Daraus lässt sich ableiten, dass die Interaktion zwischen beiden Transmembranproteinen nicht intrazellulär stattfindet. Untersuchungen mit einer zytoplasmatische Deletionsmutante von Claudin-7 unterstützen diese Hypothese. Außerdem konnte durch Tunicamycin-Behandlung sowie Entfernung der beiden EGF-Regionen ermittelt werden, dass weder N-Glykosylierung noch die Aminosäuren dieses Molekülabschnitts einen Einfluss auf die Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 haben. M. Zheng und Kollegen konnten belegen, dass eine vollständige N-Glykosylierung für die funktionell aktive Assoziation der beiden Integrin-Untereinheiten α_5 und β_1 notwendig ist (Zheng et al., 1994). Außerdem gelang der gleichen Arbeitsgruppe der Nachweis, dass die Interaktion zwischen dem Tetraspanin CD9 und der Integrin-Untereinheit α_3 von der vollständigen N-Glykosylierung des α_3 -Proteins abhängt (Kawakami et al., 2002). Die postulierte N-Glykosylierung des Asn⁸⁸ in der EGF-2 Domäne des Ratten EpCAM spielt aufgrund der mittels Tunicamycin-Behandlung erhaltenen Resultate jedoch keine Rolle für die Assoziation von EpCAM und Claudin-7.

Da eine intrazelluläre Assoziation beider Transmembranmoleküle ausgeschlossen werden kann, und die beiden EGF-Domänen ebenfalls keinen Einfluss haben, kommen für eine Interaktion mit Claudin-7 lediglich die Transmembrandomäne (TMD) bzw. die Cystein-arme

Region (CAR) von EpCAM in Frage. Zur Analyse der Relevanz dieser beiden Aminosäuresequenzen für die Assoziation wurden zwei EpCAM-CD44 Chimäre generiert. Beim ersten chimären Konstrukt wurde die Transmembran- bzw. die zytoplasmatische Domäne von EpCAM durch die entsprechenden Bereiche von CD44v4-7 ersetzt (Ep-ED/CD44-TMD-ZPD), wobei beim zweiten Konstrukt die extrazelluläre Domäne (ED) von EpCAM gegen die von CD44v4-7 ausgetauscht wurde (CD44-ED/Ep-TMD-ZPD). Durch diese Maßnahme wurde eine Trennung der beiden fraglichen Aminosäuresequenzen erreicht, die somit unabhängig voneinander auf ihre Interaktionsrelevanz überprüft werden konnten. Die chimären Konstrukte wurden jeweils zusammen mit dem Wildtyp-Claudin-7 in HEK293T Zellen transfiziert. Die nach Immunpräzipitationen gewonnenen Erkenntnisse ließen bisher jedoch keinen eindeutigen Schluss bezüglich der Beteiligung der Transmembrandomäne oder der Cysteinarmen Region an der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 zu. Die Synthese der chimären Proteine in den transfizierten HEK293T Zellen konnte zwar nachgewiesen werden, dennoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche der beiden untersuchten Domänen für die Interaktion von EpCAM mit Claudin-7 verantwortlich ist. Die Bandenintensitäten kopräzipitierter Moleküle waren entweder äußerst schwach oder es konnten gar keine Banden kopräzipitierender Moleküle detektiert werden. Ursachen für diese negativen Resultate können in der Faltung sowie in dem Membrantransport der Fusionsproteine liegen. Deshalb empfiehlt es sich, weitere Experimente mit gezielten Mutationen in der Transmembrandomäne oder der Cysteinarmen Region durchzuführen.

Belege für eine Beteiligung von Transmembrandomänen an Protein-Protein Interaktionen lieferte die Arbeitsgruppe von D. M. Engelman. Sie konnten nachweisen, dass das Aminosäuremotiv GxxxG für eine starke Interaktion von helikalen, membrandurchspannenden Proteindomänen verantwortlich ist (Russ und Engelman, 2000). Die Motive SxxxG und AxxxG können ebenfalls zur Assoziation von Transmembranhelices beitragen (Schneider und Engelman, 2004a). Auffällig ist, dass die Transmembrandomäne von EpCAM (human und Ratte) sowie die von Claudin-7 (human und Ratte) solche Aminosäuremotive enthalten. Die Transmembrandomäne von EpCAM beinhaltet das AxxxG-Motiv: AGIIAVIVVVVLAVIAGI VVLVI. Die zweite Transmembrandomäne von Claudin-7 enthält das SxxxG-Motiv. In Abschnitt 3.14 wurde gezeigt, dass Claudin-1 und Claudin-3 nicht in der Lage sind, eine Interaktion mit EpCAM einzugehen. Daher wurden die Aminosäuresequenzen von Claudin-1, -3 bzw. -7 miteinander verglichen (Abb. 4.1):

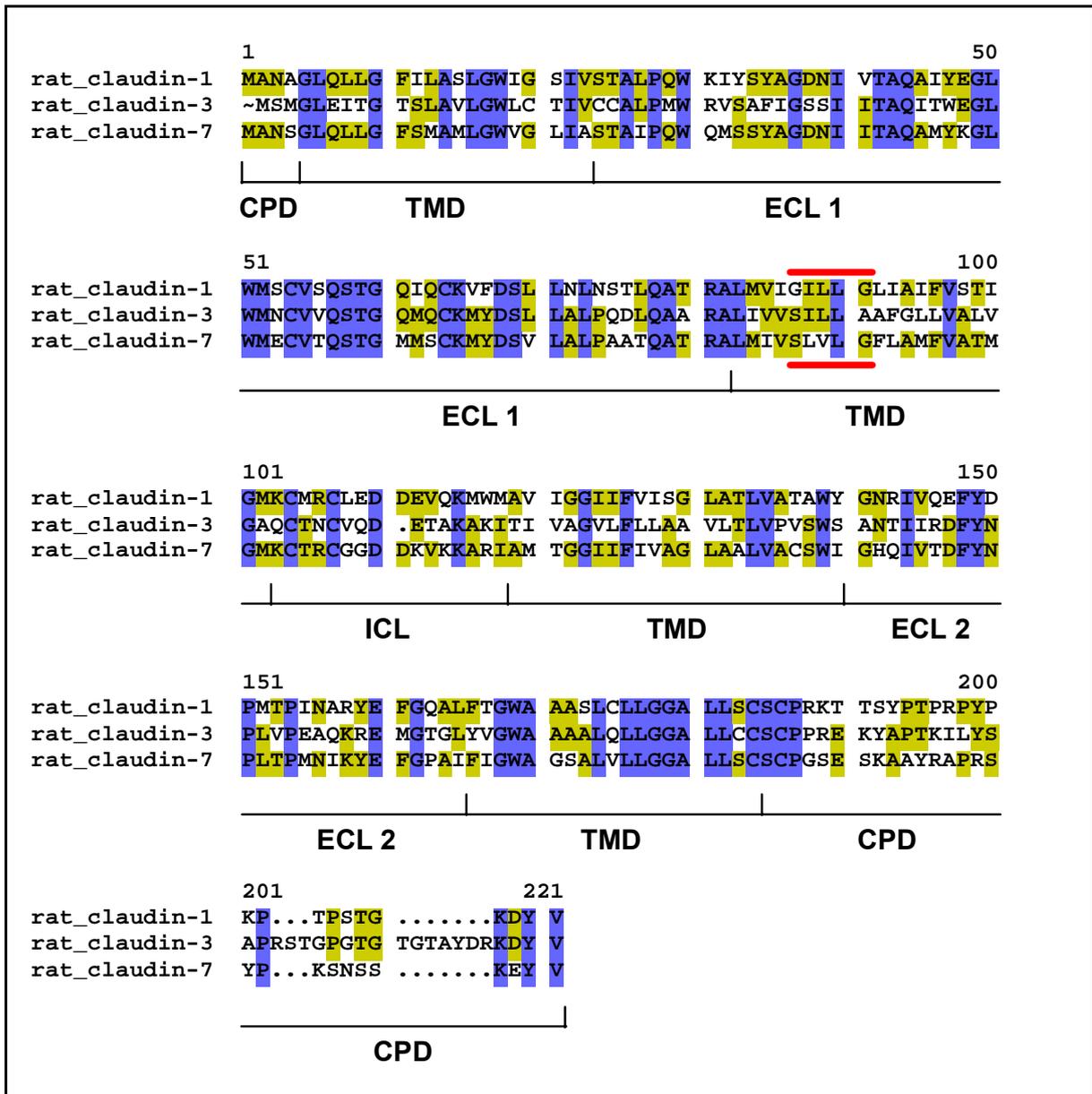


Abb. 4.1: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von Claudin-1, -3 und -7. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Ratten Claudin-1, -3 und -7. Dabei bedeutet blau eine Übereinstimmung von Aminosäuren aller drei Sequenzen, während grün die Übereinstimmung von Aminosäuren zwischen zwei der dargestellten Sequenzen anzeigt. Unterhalb der Sequenzen ist die jeweilige Membrandomäne von Claudin-7 angegeben. Die Abkürzungen bedeuten: ZPD: zytoplasmatische Domäne, TMD: Transmembrandomäne, EZS 1, 2: extrazelluläre Schleife 1 bzw. 2, IZS: intrazelluläre Schleife. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software „Clustal“ (HUSAR, DKFZ, Heidelberg) erstellt.

Die Abbildung 4.1 zeigt, dass auch die Sequenz von Claudin-1 ein Interaktionsmotiv (GxxxG) in der zweiten Transmembrandomäne enthält. Möglicherweise wirken die benachbarten Aminosäuren jedoch nicht bindungsunterstützend, so dass keine Assoziation mit EpCAM zustande kommt. Dass eine spezielle Anordnung anderer Aminosäuren in unmittelbarer Um-

gebung des Kernmotivs ([kleine AS] xxx [kleine AS]) essentiell für eine stabile Interaktion von Transmembranhelices ist, postulieren D. Schneider und D. M. Engelman. Darüber hinaus empfehlen die Autoren, im individuellen Fall eine gezielte Mutationsanalyse durchzuführen (Schneider und Engelman, 2004b).

Hinweise für eine Relevanz der Cystein-armen Region von EpCAM für die Assoziation mit Claudin-7 liefert u. a. folgende Publikation. Yauch und Kollegen konnten zeigen, dass die extrazellulär lokalisierte, membrannahe, Cystein-arme Region der Integrin-Untereinheit α_3 für die direkte Protein-Protein Interaktion mit dem Tetraspaninmolekül CD151 verantwortlich ist (Yauch et al., 2000). Wie bei EpCAM handelt es sich bei der α_3 Integrin-Untereinheit um ein Typ 1 Transmembranprotein. Das Tetraspanin CD151 besitzt durch seine vier Transmembrandomänen und die beiden extrazellulären Schleifen, wobei die zweite signifikant länger ist als die erste, eine relativ große strukturelle Ähnlichkeit zu Claudin-7. Welche Aminosäureabschnitte von Claudin-7 jedoch effektiv für die Interaktion mit EpCAM verantwortlich sind, wird in weiteren Experimenten mit Hilfe von Deletionsmutanten und zielgerichtetem Austausch einzelner Aminosäuren ermittelt.

4.5 Lokalisation von EpCAM und phosphoryliertem Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen

In weiterführenden Experimenten zur Assoziation von EpCAM und Claudin-7 wurde untersucht, ob ein zuvor von D. S. Schmidt detektiertes, mit EpCAM kopräzipitierendes, phosphoryliertes 20 kDa Protein Claudin-7 entspricht (Ladwein et al., 2005). Mit Hilfe eines Depletions-Experiments konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem phosphorylierten 20 kDa Molekül tatsächlich um Claudin-7 handelt. Des Weiteren konnte belegt werden, dass EpCAM und Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen lokalisiert sind, und dass die Phosphorylierung von Claudin-7 von der Präsenz des Tetraspans in diesen „raft“-ähnlichen Membransubdomänen abhängt.

4.5.1 Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in Membranmikrodomänen

Wie bereits in Abschnitt 3.9.2 erwähnt, dienen bestimmte Membranmikrodomänen als Plattformen, die Proteine zur Übertragung von Signalen nutzen. Im Gegensatz zum reinen „fluid mosaic“-Modell (Singer und Nichols, 1972) unterscheiden sich die auch als „lipid rafts“ bezeichneten Membranmikrodomänen in ihrer molekularen Komposition deutlich von der

restlichen Zellmembran. Die Stabilisierung der Membran, die durch den Begriff „liquid-ordered phase“ (l_o) zum Ausdruck kommt, wird durch eine starke Anreicherung an Glykosphingolipiden und Cholesterin erreicht, die jedoch die Mobilität der enthaltenen Proteine und Lipide innerhalb der „rafts“ nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wird der Zustand der übrigen Zellmembran als „liquid-disordered phase“ (l_d) angegeben (Brown und London, 2000). Ein Hauptmerkmal der Membranmikrodomänen ist die hohe Moleküldichte, welche zum einen durch die langen, gesättigten Seitenketten der Sphingolipide hervorgerufen wird. Zum anderen trägt das zwischen die Fettsäureketten interkalierte Cholesterin zur Stabilisierung der Lipid-Lipid Wechselwirkungen und zur Erhaltung der Fluidität der Plasmamembran bei (Simons und Toomre, 2000).

Die Analyse der Verteilung von EpCAM bzw. Claudin-7 Molekülen in der Zellmembran durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen ergab, dass unter milden Lysisbedingungen ein Teil beider Proteinfractionen in distinkten Membransubdomänen vorliegt. Zu dem lieferte der partielle Entzug von Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin einen weiteren Beleg für die Anordnung beider Transmembranproteine in cholesterinreichen Membranmikrodomänen.

Bezüglich der Natur der Membrandomänen, in denen EpCAM und Claudin-7 lokalisieren, ist jedoch zu beachten, dass es sich hierbei nicht um klassische „lipid rafts“ handelt. Die klassische Variante der „lipid rafts“ ist dadurch gekennzeichnet, dass die Protein-Lipid-Wechselwirkungen nicht durch das Detergens Triton X-100 aufgebrochen werden können und somit in einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation in den detergensresistenten Fraktionen zu finden sind (Rothberg et al., 1992; Hope et al., 1996; Roper et al., 2000). Bei den untersuchten Proteinen EpCAM und Claudin-7 ist das nicht der Fall. Nach der Lyse der BSp73ASML Zellen in milden Detergenzien wie Lubrol WX oder Brij98 (vgl. Tab. 3.1) sind beide Oberflächenmoleküle zwar in den detergensresistenten Fraktionen des Gradienten vertreten (vgl. Abb. 3.22 und 3.24), jedoch ist eine Detektion der Transmembranproteine nach Triton X-100 Lyse in den Fraktionen niedriger Saccharosekonzentration nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Vollständige Löslichkeit der Claudine 1, 3 und 4 nach Triton X-100 Lyse der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco 2 wurde ebenfalls von D. Lambert und Kollegen beobachtet (Lambert et al., 2005). Das bedeutet, dass es sich hier um spezielle, weniger stabile „raft“-ähnliche Membranmikrodomänen handelt, die jedoch aufgrund der verwendeten Kontrollen, Caveolin und Transferrin-Rezeptor, als distinkte Subdomänen der Plasmamembran der BSp73ASML Zellen bezeichnet werden können. In der Literatur finden sich Hinweise auf die Präsenz unterschiedlicher Membranmikrodomänen auf der selben Zellmembran, die in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung differieren (Ilangumaran et al., 1999; Roper et al., 2000; Slimane et al., 2003; Pike, 2003). Aufgrund dieser Heterogenität, insbesondere hinsichtlich des Grads der Anreicherung von Glykosphingolipiden und Cho-

lesterin, ist die Isolierung der EpCAM bzw. Claudin-7 enthaltenden Membranmikrodomänen mit Hilfe der Detergenzien Brij98 und Lubrol WX zu verstehen.

Die Cholesterin-Extraktion durch M β CD lieferte einen weiteren Hinweis auf die Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in den beschriebenen Membranmikrodomänen. Die Depletion des Cholesterins bewirkt eine Auflösung der „raft“-ähnlichen Membranstrukturen, wodurch EpCAM und der größte Anteil des Claudin-7 vom verwendeten Detergens Brij98 vollständig in Lösung gebracht wurden (vgl. Abb. 3.23 und 3.24). Da der Einsatz von M β CD auf intakten Zellen als kritisch zu beurteilen ist (Simons und Ikonen, 2000; Munro, 2003), wurde dieses Agens Zelllysaten zugesetzt. Diese Vorgehensweise schließt aus, dass die M β CD-Behandlung zelluläre Mechanismen betrifft, die in irgendeiner Art und Weise Einfluss auf die Lokalisation von EpCAM und Claudin-7 in den Membranmikrodomänen haben.

Die Interaktion der beiden Adhäsionsmoleküle ist jedoch nicht auf die speziellen Membranregionen beschränkt. Der Komplex bestehend aus EpCAM und Claudin-7 ist sowohl in den detergensresistenten als auch in den detergenslöslichen Fraktionen nachweisbar. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Interaktion einer hohen Stabilität unterliegt und nach einer Lyse der BSp73ASML Zellen in Triton X-100 enthaltendem Puffer bzw. in RIPA-Puffer noch intakt ist. Die Lokalisation von EpCAM bzw. Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen konnte jedoch nach der Lyse unter den genannten stringenten Bedingungen ausgeschlossen werden. Für diese Befunde gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: (1.) Zur Formierung der Interaktion ist die Lokalisation beider Proteine in cholesterinreichen Membranmikrodomänen nicht notwendig; Oder (2.) die Entstehung des Komplexes wird innerhalb der cholesterinreichen Membransubdomänen vermittelt, wonach die assoziierten Proteine diese dicht gepackte Membranregion, evtl. veranlasst durch entsprechende Stimuli, wieder verlassen.

Typische Merkmale „raft“-assoziierter Proteine sind Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, Palmitoylierungen oder Myristoylierungen. So ist z. B. die „raft“-Lokalisierung der Protein-Tyrosin-Kinasen Lck und Fyn oder der α -Untereinheiten heteromerer G-Proteine von ihrer Palmitoylierung abhängig. (Brown und Rose, 1992; Shenoy-Scaria et al., 1993; Zurzolo et al., 1994; Melkonian et al., 1999; Resh, 1999; Saslowsky et al., 2002; Zacharias et al., 2002). Bis auf wenige Ausnahmen kommen Transmembranproteine ohne die beschriebenen hydrophoben Modifikationen nicht in „lipid rafts“ vor (Scheiffele et al., 1997; Lin et al., 1999; Simons und Toomre, 2000; Brown und London, 1998). Mehrere Arbeitsgruppen postulieren, dass mindestens zwei Acylgruppen, also entweder eine Palmitoyl- und eine Myristoylgruppe (Shaul et al., 1996; Moffet et al., 2000) oder zwei Palmitoylgruppen (Arni et al., 1998; Zhang

et al., 1998) für eine Lokalisation in den sphingolipidreichen Membranmikrodomänen notwendig sind. Als Transmembranprotein besitzt EpCAM jedoch keinen GPI-Anker und ist aufgrund fehlender Cysteine in der Nähe der Transmembranregion auch nicht palmitoyliert. Ein einzelnes Glycin, welches extrazellulär in nächster Nähe zur Transmembrandomäne angeordnet ist und potentiell myristoylierbar wäre, reicht aufgrund der erwähnten Beobachtungen nicht aus, um EpCAM in „lipid rafts“ zu verankern.

Dagegen beschreibt ein aktuell publizierter Artikel, dass Claudine an Cysteinen in der intrazellulären Schleife sowie in der C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, die jeweils nahe an einer Transmembranregion lokalisieren, palmitoyliert sind. Experimentell belegt wurde die Palmitoylierung der Claudine 2, 4 und 14 (Van Itallie et al., 2005). Die vier relevanten Cysteine sind in der Claudin-Familie weitgehend konserviert, und so finden sich auch drei dieser Cysteine in der Aminosäuresequenz des Ratten Claudin-7 bzw. -1 (Cys¹⁰⁴, Cys¹⁰⁷ und Cys¹⁸⁶), wobei Claudin-3 alle vier (Cys¹⁰⁴, Cys¹⁰⁷, Cys¹⁸³ und Cys¹⁸⁶) besitzt (vgl. Abb. 4.1). Die „raft“-Assoziation von Claudin-14 wurde von Van Itallie und Kollegen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation belegt (Van Itallie et al., 2005). Möglicherweise ist auch Claudin-7 über die Cysteinreste an die 18 Kohlenstoff langen Acylketten gebunden. Für die Lokalisation von EpCAM in den „raft“-ähnlichen Mikrodomänen könnte dies bedeuten, dass das homotypische Zelladhäsionsmolekül erst durch seine direkte Interaktion mit dem Tetraspan in die cholesterinreichen Membranmikrodomänen gelangt. Dadurch könnte der Zugang für EpCAM zu Signaltransduktionswegen gewährleistet sein.

4.5.2 Die Relevanz von Membranmikrodomänen für die Phosphorylierung von Claudin-7

Mit Hilfe eines „*in-vitro* kinase assays“ konnte demonstriert werden, dass Claudin-7 phosphorylierbar ist. Vermutlich handelt es sich um eine Serin-Phosphorylierung, da eine erfahrungsgemäß effizient funktionierende Detektion durch Phospho-Tyrosin-spezifische Antikörper keine positiven Resultate erbrachte, und Threonin aufgrund der Abwesenheit in beiden zytoplasmatischen Aminosäureabschnitten als potentielle Phosphorylierungsstelle ausscheidet. Für eine Serin-Phosphorylierung kommen mehrere Aminosäurereste im C-terminalen, zytoplasmatischen Schwanz von Claudin-7 in Frage. Die Detektion von Serin-Phosphorylierungen mittels phosphospezifischer Antikörper gestaltet sich in den meisten Fällen als sehr schwierig, da diese Antikörper die vom Hersteller garantierte Spezifität oft nicht leisten (vgl. auch Current Protocols In Protein Science, 1997). So war es auch im Fall von Claudin-7 nicht möglich mit Hilfe diverser Phospho-Serin-spezifischer Antikörper eine Phosphorylierung des Tetraspans zu detektieren.

Aus der Untersuchung der Phosphorylierung von Claudin-7 nach M β CD-Behandlung geht hervor, dass die Phosphorylierung von der Lokalisation des Tetraspans in cholesterinreichen Membranmikrodomänen abhängt. Dagegen ist die Assoziation von EpCAM und Claudin-7 nicht von der Cholesterin-Depletion betroffen. Das Ausbleiben der Phosphorylierung des Tetraspans deutet darauf hin, dass die Kinase nach der M β CD-Behandlung nicht mehr in einem Membrankomplex mit Claudin-7 vorliegt. Es ist bereits bekannt, dass einige Proteine, wie z. B. EGFR, der T-Zell-Rezeptor oder Integrine cholesterinreiche Membranmikrodomänen als Plattform zum Austausch von Aktivierungs- bzw. Deaktivierungssignalen nutzen (Couet et al., 1997; Wary et al., 1998; Krauss und Altevogt, 1999; Waugh et al., 1999; Janes et al., 2000; Langlet et al., 2000; Simons und Toomre, 2000). So ist die Lokalisation der Kinasen der Src-Familie wie Lck und Fyn in den mit Cholesterin und Sphingolipiden angereicherten Membranbereichen für eine erfolgreiche Phosphorylierung des T-Zell-Rezeptor-CD3 Komplexes essentiell (Janes et al., 2000; Langlet et al., 2000).

Einige Arbeitsgruppen berichten vom Einfluss verschiedener Isoformen der Protein Kinase C oder der MAP-Kinase auf die Rekrutierung von Claudin-1 in die „tight junctions“ und auf die Erhaltung der Permeabilität und „Barrierenfunktion“ von „TJs“ in verschiedenen Zelllinien (Stuart und Nigam, 1995; Yoo et al., 2003; Fujibe et al., 2004). V. Nunbhakdi-Craig und Mitarbeitern gelang der Nachweis, dass die Aktivität der atypischen Protein Kinase C (aPKC) in „TJs“ von der Serin/Threonin - Protein Phosphatase PP2A reguliert wird. Dabei induziert eine verstärkte Aktivität der PP2A eine Dephosphorylierung von Claudin-1, Occludin und ZO-1, was zu einer gesteigerten Permeabilität der „TJs“ in MDCK Zellen führt (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Die Beteiligung der Protein Kinase A (PKA) an der Phosphorylierung von Claudinen wird in zwei weiteren Berichten postuliert. T. Ishizaki und Kollegen berichten über eine Phosphorylierung von Claudin-5 an Thr²⁰⁷ in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch PKA. Gleichzeitig konnten die Autoren PKA für die verminderte Expression von Claudin-1 in diesen Zellen verantwortlich machen (Ishizaki et al., 2003). Die Autoren einer weiteren Veröffentlichung spekulieren, dass die Überexpression sowie die Phosphorylierung von Claudin-3 durch PKA die Bildung und Erhaltung von „tight junctions“ in der ovariellen Karzinomzelllinie OVCA433 negativ beeinflusst. Dies wiederum könnte zur Verringerung der Polarität und zur Verstärkung der invasiven Eigenschaften dieser ovariellen Krebszellen führen (D'Souza et al., 2005).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass verschiedene Isoformen der Protein Kinase C sowie die Protein Kinase A an der Etablierung und Regulierung der „tight junctions“ sowie an der Verteilung und Expression von Claudinen beteiligt sind. Gerade der letztgenannte Befund von T. D'Souza und Kollegen deutet darauf hin, dass eine gesteigerte Expression von Claudinen sowie die PKA-regulierte Phosphorylierung eine Rolle in der Tumprogression spielen könnte. PKA und PKC wären also vielversprechende Ansatzpunkte zur

Identifizierung relevanter Kinasen, die zur Phosphorylierung von Claudin-7 und damit zur Initiierung von Signalkaskaden führen könnten. Eine Identifizierung der relevanten Kinase könnte durch Experimente mit spezifischen Kinaseinhibitoren bzw. Antikörpern vorgenommen werden.

4.6 Claudin-7 und Tumorprogression

Die Relevanz von Claudinen für die Tumorprogression wurde bereits in der Einleitung dargestellt (vgl. Abschnitt 1.2). Die geschilderten Beobachtungen zeigen, dass diese Tetraspane eine kritische Komponente bei der invasiven Promotion maligner Tumore unterschiedlicher histologischer Herkunft darstellen. Im Hinblick auf Claudin-7 gibt es ebenfalls einige Hinweise, dass das Tetraspan eine Bedeutung in der Progression bösartiger Geschwülste hat. S. Kominsky und Kollegen konnten zeigen, dass der Verlust von Claudin-7 mit der Differenzierung von *in-situ* und invasiven ductalen Mammakarzinomen korreliert. Außerdem konnten die Autoren nachweisen, dass HGF („hepatocyte growth factor“) offensichtlich einen negativen Einfluss auf die Expression von Claudin-7 in den beiden humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und T47D hat (Kominsky et al., 2003). HGF ist für seine Fähigkeit bekannt, die Zell-Zell Adhäsion zu verringern und stimulierend auf die Zellmigration zu wirken (Jiang et al., 1999). Des weiteren ergaben sich Hinweise darauf, dass die Hypermethylierung des Claudin-7 Promotors in humanen Brustkrebszelllinien zu einer stark reduzierten Expression des *claudin-7* Gens führt (Kominsky et al., 2003). Hypermethylierung von Promotoren wird als potentieller Mechanismus angesehen, die Expression betroffener Gene zu hemmen (Ferguson et al., 2000; Evron et al., 2001a, b; Loeb et al., 2001; Jones und Baylin et al., 2002). Dass die verminderte Expression bzw. der Verlust von Claudin-7 mit einem metastatischen Phänotyp von Karzinomzellen in Verbindung gebracht werden kann, bestätigen die Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen (Al Moustafa et al., 2002; Sauer et al., 2005).

Die hier vorgelegten Befunde weisen nicht auf eine metastasierungshemmende Funktion von Claudin-7 hin. Die bisher erwähnten Regulationsmechanismen scheinen daher auf die Expression von Claudin-7 in transformiertem Pankreasgewebe keinen Einfluss zu haben. Mittels immunhistochemischer Analysen konnte ermittelt werden, dass EpCAM sowie Claudin-7 eine deutlich intensivere Färbung auf transformiertem humanem Pankreasgewebe als im Normalgewebe aufwiesen (Ladwein et al., 2005 und vgl. Abb. 3.9). Diese Färbungen belegen nicht nur die bereits bekannte Überexpression von EpCAM, sondern auch die gesteigerte Expression von Claudin-7 in transformiertem humanem Pankreasgewebe, und stehen daher im Widerspruch zu den bisher dargestellten Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Allerdings werden die hier vorgestellten Daten auch durch mehrere Studien unterstützt,

die einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von Claudin-7 und der Tumorgenese bzw. Metastasierung bestimmter Karzinomtypen vermuten lassen. M. Nacht und Mitarbeiter gelang der Nachweis, dass die Expression von Claudin-7 in primären und metastatischen humanen Brusttumoren im Gegensatz zu normalem epithelalem Brustgewebe deutlich erhöht ist. Dem Artikel zu Folge ist Claudin-7 nahezu undetektierbar in normalem Epithelgewebe der Brust. Die Autoren spekulieren, dass die Überexpression von Claudin-7 möglicherweise die Adhäsionseigenschaften der Krebszellen modifizieren oder eine Veränderung der Kontrolle des parazellulären Flusses von Molekülen bewirken könnte, die dann zur Förderung der Tumorgenese bzw. Tumorprogression des befallenen Brustgewebes führen könnte (Nacht et al., 1999). Weitere Studien schildern die Überexpression von Claudin-7 in Brusttumoren der Maus im Vergleich mit normalem Milchdrüsengewebe und in murinen Adenokarzinomen des Magens im Vergleich mit gesundem Magenepithelgewebe (Blackman et al., 2005; Johnson et al., 2005). Die veröffentlichten Daten von Y. Soini zeigen eine Überexpression von Claudin-7 in 10 von 12 immunhistologisch analysierten humanen Karzinomtypen. Darunter befinden sich auch 15 Brustkarzinome, 12 Kolorektalkarzinome und acht Pankreasadenokarzinome. Der Autor beschreibt eine durchgängig starke immunhistochemische Färbung von Claudin-7 in allen 116 untersuchten Karzinomen (Soini, 2005). Ein Bericht von J.-Y. Zheng und Kollegen postuliert strukturelle sowie regulatorische Funktionen von Claudin-7 und die mögliche Bedeutung des Tetraspans für die Zelldifferenzierung. Claudin-7 soll außerdem in der Lage sein, die Expression des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) in der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP positiv zu beeinflussen (Zheng et al., 2003). PSA ist ein wichtiges Protein zur Diagnose von Prostatakrebs. Außerdem liefert die Expression von PSA Hinweise zum Grad der Erkrankung sowie zur Malignität von Krebszellen (Muschenheim et al., 1991; Zietman et al., 1994; Nash und Melezinek, 2000).

Die genannten Literaturbeispiele zeigen, dass Claudin-7 offensichtlich eine Relevanz für Karzinogenese und Tumorprogression besitzt. Dennoch wird die Funktion des Tetraspans hinsichtlich seiner tumorfördernden Eigenschaften kontrovers diskutiert. Zum einen gilt der Expressionsverlust von Claudin-7 als Signal für Tumorbildung und -invasion, zum anderen weist die Überexpression des Transmembranmoleküls auf eine Relevanz in der Tumorprogression hin. Letzteres trifft auf die in dieser Arbeit untersuchten humanen Pankreasgewebe zu. Daher darf an dieser Stelle spekuliert werden, dass die Überexpression des „tight junction“ Proteins, evtl. kombiniert mit der gesteigerten Expression von EpCAM, einen fördernden Effekt auf die Progression von humanen Pankreasadenokarzinomen ausüben könnte.

Aufgrund der vielfach dokumentierten Überexpression von EpCAM und Claudin-7 in zahlreichen Karzinomtypen und der daraus resultierenden Hinweise auf potentielle funktionelle Eigenschaften der beiden Transmembranproteine, bleibt die Frage nach der konkreten

Relevanz des äußerst stabilen Proteinkomplexes hinsichtlich der betrachteten molekularen Prozesse offen. Es ist festzuhalten, dass die direkte und spezifische Protein-Protein Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 ein Charakteristikum in nahezu allen analysierten Zelllinien der Ratte und des Menschen darstellt. Die Lokalisation des EpCAM-Claudin-7 Komplexes in cholesterinreichen Membranmikrodomänen eröffnet beiden Transmembranproteinen die Möglichkeit, „raft“-ähnliche Membranstrukturen als Plattformen zum Austausch zellulärer Signale zu nutzen.

4.7 Modell der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7

Zusammenfassend ist in Abbildung 4.2 ein mögliches Modell der Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 dargestellt:

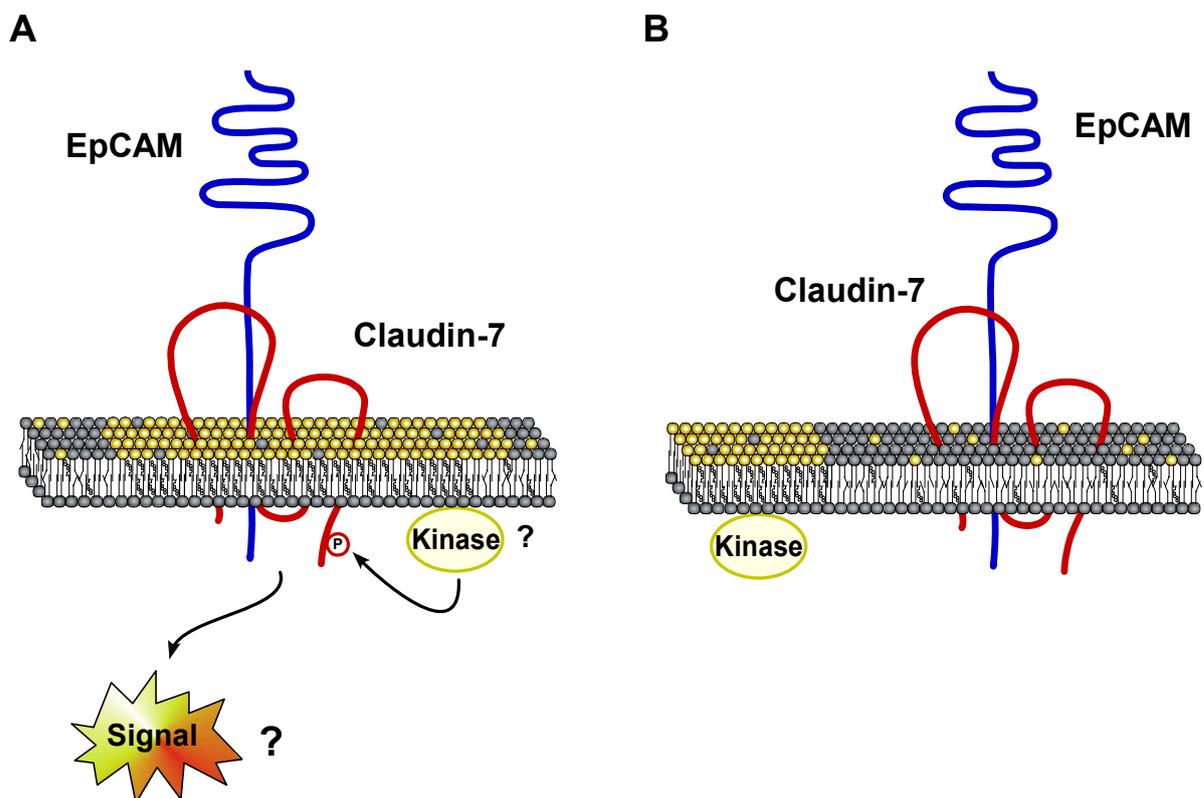


Abb. 4.2: Interaktionsmodell von EpCAM mit Claudin-7. **A)** Dargestellt ist eine mögliche Interaktionsvariante zwischen EpCAM und Claudin-7 über die Transmembrandomänen. Die Lokalisation beider Moleküle in cholesterinreichen Membranmikrodomänen ist durch die Anreicherung von Sphingolipiden (gelb) und Cholesterin symbolisiert. Durch die Anordnung von Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen ist seine Phosphorylierung durch eine noch nicht identifizierte Kinase möglich. **B)** Die Interaktion besteht auch außerhalb „raft“-ähnlicher Mikrodomänen, wobei hier keine Phosphorylierung von Claudin-7 möglich ist.

Die Abbildung 4.2 zeigt die direkte Protein-Protein Interaktion zwischen dem Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM und dem „tight junction“ Protein Claudin-7 in einer cholesterinreichen Membranmikrodomäne (Abb. 4.2 A). Die Assoziation beider Transmembranmoleküle ist jedoch auch außerhalb dieser speziellen Membranregion möglich (Abb. 4.2 B). In diesem Schaubild wird die Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 über die Transmembrandomäne von EpCAM bzw. über die zweite Transmembrandomäne von Claudin-7 vermittelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Assoziation der beiden Proteine extrazellulär stattfindet und über die Cystein-arme Region von EpCAM reguliert wird. Zu dem wäre eine Involvierung beider fraglichen Aminosäuresequenzen in die Assoziation der Adhäsionsmoleküle denkbar. Für eine effiziente Phosphorylierung ist die Lokalisation von Claudin-7 in cholesterinreichen Membranmikrodomänen unbedingt notwendig, da die aktivierende Kinase ebenfalls in diesen Subdomänen der Zellmembran vorliegt. Bisher bleibt jedoch ungeklärt ob eine Anordnung von EpCAM und Claudin-7 in den „raft“-ähnlichen Membranstrukturen zur Initiierung der direkten Protein-Protein Interaktion notwendig ist. Weiterhin ist unklar, ob der Proteinkomplex und seine Lokalisation in den beschriebenen Membrandomänen eine Rolle bei der Transduktion zellulärer Signale (Abb.4.2 A) spielt und ob die Interaktion beider Moleküle zu Phänomenen wie Steigerung der Permeabilität von „TJs“, einer erhöhten Expression von c-Myc oder der Störung E-Cadherin-vermittelter Adhäsion in Karzinomzellen führen kann.

4.8 Perspektiven

Ausgehend von dem Befund der direkten Protein-Protein Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7 ergeben sich eine Reihe notwendiger, weiterführender Studien, deren Resultate Aufschluss über eine potentielle Involvierung des Proteinkomplexes in die Tumorprogression versprechen. Zum einen sollten die für eine Interaktion essentiellen Aminosäuren von EpCAM und Claudin-7 bestimmt werden sowie eine eingehende Analyse der Phosphorylierung von Claudin-7 durchgeführt werden. Der zweite und im Hinblick auf die mögliche Funktion des Proteinkomplexes bei Tumorprogression und Metastasierung wesentliche Fragenkomplex befasst sich mit der über die Assoziation induzierten Signaltransduktion. Hier steht die Klärung der Bedeutung von cholesterinreichen Membranmikrodomänen für die Initiierung der Interaktion im Vordergrund. Sowohl die Relevanz der Phosphorylierung von Claudin-7 für die Bildung des Proteinkomplexes als auch die Identifizierung der verantwortlichen Kinase sind hier von besonderem Interesse. Durch die Generierung und Transplantation EpCAM- bzw. Claudin-7-defizienter „knockdown“ Karzinomzelllinien könnten im tierexperimentellen Modell wertvolle Erkenntnisse über den Einfluss des Proteinkomplexes bestehend aus dem Zell-Zell Adhäsionsmolekül EpCAM und dem „tight junction“ Protein Claudin-7 auf die Promotion maligner Tumore gesammelt werden. Diese Experimente könnten einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis des elementaren Mechanismus leisten, durch welchen EpCAM und Claudin-7 Tumorprogression und Metastasierung fördern.

LITERATURVERZEICHNIS

Akiyama, F., Stevens, R. L., Hayashi, S., Swann, D. A., Binette, J. P., Caterson, B., Schmid, K., Van Halbeek, H., Mutsaers, J. H., Gerwig, G. J., and et al. (1987). The structures of N- and O-glycosidic carbohydrate chains of a chondroitin sulfate proteoglycan isolated from the media of the human aorta. *Arch Biochem Biophys* 252, 574-590.

Alexandre, M. D., Lu, Q., Chen, Y.-H. (2005). Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl^- conductance and increases the paracellular Na^+ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 118, 2683-2693.

Al Moustafa, A. E., Alaoui-Jamali, M. A., Batist, G., Hernandez-Perez, M., Serruya, C., Alpert, L., Black, M. J., Sladek, R., and Foulkes, W. D. (2002). Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2634-2640.

Amati, B., Alevizopoulos, K., and Vlach, J. (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3, 250-268.

American Cancer Society (2000). *Cancer Facts and Figures*. 1-7 (American Cancer Society, 2000).

Anderson, R., Schaible, K., Heasman, J., and Wylie, C. (1999). Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil* 116, 379-384.

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50, 197-263.

Arni, S., Keilbaugh, S. A., Ostermeyer, A. G., and Brown, D. A. (1998). Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem* 273, 28478-28485.

Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., and Litvinov, S. V. (1998). Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 18, 4833-4843.

Balzar, M., Prins, F. A., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., and Litvinov, S. V. (1999a). The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* 246, 108-121.

Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., and Litvinov, S. V. (1999b). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712.

Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I. H., Rees-Bakker, H. A., Prins, F. A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S. O., Fleuren, G. J., and Litvinov, S. V. (2001). Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 21, 2570-2580.

Ban, Y., Dota, A., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Mochida, C., and Kinoshita, S. (2003). Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Exp Eye Res* 76, 663-669.

- Beavon, I. R. (2000). The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 36, 1607-1620.
- Ben-Ze'ev, A., Zoller, M., and Raz, A. (1986). Differential expression of intermediate filament proteins in metastatic and nonmetastatic variants of the BSp73 tumor. *Cancer Res* 46, 785-790.
- Bergsagel, P. L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C. R., Trepel, J., and Kuehl, W. M. (1992). A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol* 148, 590-596.
- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26.
- Bishop, J. M. & Weinberg, R. A. (1996). *Molecular Oncology*. Scientific American, Scientific American, New York.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bjork, P., Jonsson, U., Svedberg, H., Larsson, K., Lind, P., Dillner, J., Hedlund, G., Dohlsten, M., and Kalland, T. (1993). Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody. *J Biol Chem* 268, 24232-24241.
- Blackman, B., Russell, T., Nordeen, S. K., Medina, D., and Neville, M. C. (2005). Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res* 7, R248-255.
- Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22, 6524-6536.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69, 135-174.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
- Brown, D. A. (1992). Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol* 2, 338-343.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-17224.
- Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.

- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* 14, 4240-4248.
- Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11, 318-324.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552, 39-45.
- Cereijido, M., Contreras, R. G., and Gonzalez-Mariscal, L. (1989). Development and alteration of polarity. *Annu Rev Physiol* 51, 785-795.
- Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260-1270.
- Chaubal, S., Wollenberg, B., Kastenbauer, E., and Zeidler, R. (1999). Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res* 19, 2237-2242.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 4961-4965.
- Chong, J. M., and Speicher, D. W. (2001). Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem* 276, 5804-5813.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Cirulli, V., Ricordi, C., and Hayek, A. (1995). E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc* 27, 3335.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G. M., Mally, M. I., Lopez, A. D., Fannon, A., Ptasznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., *et al.* (1998). KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140, 1519-1534.
- Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M., and Zoller, M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol* 141, 267-280.
- Claas, C., Stipp, C. S., and Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem* 276, 7974-7984.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39, 219-232.

- Couet, J., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P. (1997). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272, 30429-30438.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11, 1921-1929.
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 3, 895-904.
- Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., and Johnson, L. G. (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1166-1178.
- Current Protocols In Protein Science (1997). Posttranslational Modifications: Phosphorylation and Phosphatases. Chapter 13.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584.
- Dang, C. V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1-11.
- Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E., Wonsey, D., and Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 253, 63-77.
- Datto, M. B., Hu, P. P., Kowalik, T. F., Yingling, J., and Wang, X. F. (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 17, 2030-2037.
- de Boer, C. J., van Krieken, J. H., Janssen-van Rhijn, C. M., and Litvinov, S. V. (1999). Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 188, 201-206.
- Dhawan, P., Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K., and Beauchamp, R. D. (2005). Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115, 1765-1776.
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., and Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149, 3166-3173.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., and Aaronson, S. A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- D'Souza, T., Agarwal, R., and Morin, P. J. (2005). Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 280, 26233-26240.
- Eliceiri, B. P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 89, 1104-1110.

- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.
- Evron, E., Dooley, W. C., Umbricht, C. B., Rosenthal, D., Sacchi, N., Gabrielson, E., Soito, A. B., Hung, D. T., Ljung, B., Davidson, N. E., and Sukumar, S. (2001a). Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 357, 1335-1336.
- Evron, E., Umbricht, C. B., Korz, D., Raman, V., Loeb, D. M., Niranjana, B., Buluwela, L., Weitzman, S. A., Marks, J., and Sukumar, S. (2001b). Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 61, 2782-2787.
- Falcioni, R., Antonini, A., Nistico, P., Di Stefano, S., Crescenzi, M., Natali, P. G., and Sacchi, A. (1997). Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 236, 76-85.
- Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.
- Fedi, P., Tronick, S. R., and Aaronson, S. A. (1997). Growth factors. In *Cancer Medicine*, Holland, J. F., Bast, R. C., Morton, D. L., Frei, E., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R., eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 41-64.
- Ferguson, A. T., Evron, E., Umbricht, C. B., Pandita, T. K., Chan, T. A., Hermeking, H., Marks, J. R., Lambers, A. R., Futreal, P. A., Stampfer, M. R., and Sukumar, S. (2000). High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6049-6054.
- Fogar, P., Basso, D., Pasquali, C., De Paoli, M., Sperti, C., Roveroni, G., Pedrazzoli, S., and Plebani, M. (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 17, 1227-1230.
- Fogh, J., Wright, W. C., and Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Folkman, J. (1997). Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, Holland, J. F., Bast, R. C., Morton, D. L., Frei, E., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R., eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 181-204.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339.
- Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T., and Sawada, N. (2004). Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* 295, 36-47.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147, 891-903.
- Fynan, T. M., and Reiss, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 4, 493-540.

- Gagnoux-Palacios, L., Dans, M., van't Hof, W., Mariotti, A., Pepe, A., Meneguzzi, G., Resh, M. D., and Giancotti, F. G. (2003). Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. *J Cell Biol* 162, 1189-1196.
- Gambaletta, D., Marchetti, A., Benedetti, L., Mercurio, A. M., Sacchi, A., and Falcioni, R. (2000). Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 275, 10604-10610.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 1-44.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., and Cyr, D. (2001). Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142, 854-863.
- Gronau, S. S., Schmitt, M., Thess, B., Reinhardt, P., Wiesneth, M., Schmitt, A., and Riechelmann, H. (2005). Trifunctional bispecific antibody-induced tumor cell lysis of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Head Neck* 27, 376-382.
- Gruber, R., Holz, E., and Riethmuller, G. (1996). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Springer Semin Immunopathol* 18, 243-251.
- Gumbiner, B. M. (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 123, 1631-1633.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148, 399-404.
- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277, 455-461.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141, 929-942.
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3, 435-439.

- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180-1190.
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., and Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148, 779-790.
- Heifetz, A., Keenan, R. W., and Elbein, A. D. (1979). Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 18, 2186-2192.
- Heinzelmann-Schwarz, V. A., Gardiner-Garden, M., Henshall, S. M., Scurry, J., Scolyer, R. A., Davies, M. J., Heinzelmann, M., Kalish, L. H., Bali, A., Kench, J. G., *et al.* (2004). Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10, 4427-4436.
- Heiss, M. M., Strohle, M. A., Jager, M., Kimmig, R., Burges, A., Schoberth, A., Jauch, K. W., Schildberg, F. W., and Lindhofer, H. (2005). Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer* 117, 435-443.
- Herlevsen, M., Schmidt, D. S., Miyazaki, K., and Zoller, M. (2003). The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *J Cell Sci* 116, 4373-4390.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1438-1442.
- Herlyn, D., Sears, H. F., Ernst, C. S., Iliopoulos, D., Steplewski, Z., and Koprowski, H. (1991). Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol* 14, 371-378.
- Herrlich, P., Sleeman, J., Wainwright, D., Konig, H., Sherman, L., Hilberg, F., and Ponta, H. (1998). How tumor cells make use of CD44. *Cell Adhes Commun* 6, 141-147.
- Hoessli, D. C., Ilangumaran, S., Soltermann, A., Robinson, P. J., Borisch, B., and Nasir Ud, D. (2000). Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconj J* 17, 191-197.
- Hope, H. R., and Pike, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7, 843-851.
- Horwitz, A. F., and Hunter, T. (1996). Cell adhesion: integrating circuitry. *Trends Cell Biol* 6, 460-461.
- Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F. J., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J., and Morin, P. J. (2000). Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 60, 6281-6287.
- Hsu, M. Y., Meier, F. E., Nesbit, M., Hsu, J. Y., Van Belle, P., Elder, D. E., and Herlyn, M. (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156, 1515-1525.

- Hsu, M. Y., Meier, F., and Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70, 522-536.
- Huelsken, J., and Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115, 3977-3978.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B., and Hoessli, D. C. (1999). Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell* 10, 891-905.
- Ishizaki, T., Chiba, H., Kojima, T., Fujibe, M., Soma, T., Miyajima, H., Nagasawa, K., Wada, I., and Sawada, N. (2003). Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res* 290, 275-288.
- Islam, S., Carey, T. E., Wolf, G. T., Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (1996). Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135, 1643-1654.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147, 1351-1363.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154, 491-497.
- Izumi, K., Hirao, Y., Hopp, L., and Oyasu, R. (1981). In vitro induction of ornithine decarboxylase in urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 41, 405-409.
- Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12, 23-34.
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C., and Mason, D. Y. (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312, 162-163.
- Jiang, W. G. (1996). E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 83, 437-446.
- Jiang, W., Hiscox, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1999). Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 29, 209-248.
- Johnson, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 10, 11-22.
- Johnson, J. P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18, 345-357.
- Johnson, A. H., Frierson, H. F., Zaika, A., Powell, S. M., Roche, J., Crowe, S., Moskaluk, C. A., and El-Rifai, W. (2005). Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol* 167, 577-584.

- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Joo, M., Kim, H., Kim, M. K., Yu, H. J., and Kim, J. P. (2005). Expression of Ep-CAM in intestinal metaplasia, gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 1039-1045.
- Kaiser, U., Auerbach, B., and Oldenburg, M. (1996). The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 20, 389-395.
- Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D., and Muller, M. (1995). Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol* 103, 281-286.
- Kawakami, Y., Kawakami, K., Steelant, W. F., Ono, M., Baek, R. C., Handa, K., Withers, D. A., and Hakomori, S. (2002). Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem* 277, 34349-34358.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kominsky, S. L., Argani, P., Korz, D., Evron, E., Raman, V., Garrett, E., Rein, A., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., and Sukumar, S. (2003). Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22, 2021-2033.
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., and Fuhrer, P. (1979). Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 5, 957-971.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Korswagen, H. C., Herman, M. A., and Clevers, H. C. (2000). Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in *C. elegans*. *Nature* 406, 527-532.
- Krauss, K., and Altevogt, P. (1999). Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* 274, 36921-36927.
- Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, Ausgabe 4, Berlin, 2004.
- Ladwein, M., Pape, U. F., Schmidt, D. S., Schnolzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W. W., Moldenhauer, G., and Zoller, M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 309, 345-357.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, D., O'Neill, C. A., and Padfield, P. J. (2005). Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem J* 387, 553-560.

- Langbein, L., Spring, H., Rogers, M. A., Praetzel, S., and Schweizer, J. (2004). Hair keratins and hair follicle-specific epithelial keratins. *Methods Cell Biol* 78, 413-451.
- Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., and He, H. T. (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 12, 250-255.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.
- Li, G., and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6, 163-169.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 61, 3819-3825.
- Li, W. Y., Huey, C. L., and Yu, A. S. (2004). Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F1063-1071.
- Liljefors, M., Nilsson, B., Fagerberg, J., Ragnhammar, P., Mellstedt, H., and Frodin, J. E. (2005). Clinical effects of a chimeric anti-EpCAM monoclonal antibody in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 26, 1581-1589.
- Lin, J., Weiss, A., and Finco, T. S. (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* 274, 28861-28864.
- Linnenbach, A. J., Seng, B. A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyrc, J. J., Druck, T., and Huebner, K. (1993). Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 13, 1507-1515.
- Liotta, L. A., Kleinerman, J., Catanzaro, P., and Rynbrandt, D. (1977). Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 58, 1427-1431.
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., and Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67-68.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1994a). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125, 437-446.
- Litvinov, S. V., Bakker, H. A., Gourevitch, M. M., Velders, M. P., and Warnaar, S. O. (1994b). Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2, 417-428.
- Litvinov SV. (1995) Ep-CAM: a homophilic cell-cell adhesion molecule with EGF-like domains. *Trends Glycosci Glycotechnol* 7, 375-384.
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 148, 865-875.

- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139, 1337-1348.
- Loeb, D. M., Evron, E., Patel, C. B., Sharma, P. M., Niranjana, B., Buluwela, L., Weitzman, S. A., Korz, D., and Sukumar, S. (2001). Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 61, 921-925.
- Lukashev, M. E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8, 437-441.
- Luo, J., Lubaroff, D. M., and Hendrix, M. J. (1999). Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res* 59, 3552-3556.
- Marhaba, R., and Zoller, M. (2004). CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35, 211-231.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336-1338.
- Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 117, 1247-1257.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildenerger, M., and Zoller, M. (1983). Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3, 109-123.
- Matzku, S., Wenzel, A., Liu, S., and Zoller, M. (1989). Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 49, 1294-1299.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., and Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 274, 3910-3917.
- Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G250-254.
- Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2000). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 12, 469-476.

- Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M., and Sato, H. (2001). Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 276, 28204-28211.
- Moffett, S., Brown, D. A., and Linder, M. E. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* 275, 2191-2198.
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R., and Hammerling, G. J. (1987). Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* 56, 714-721.
- Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Moller, P. (1987). Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 47, 2883-2891.
- Morgan, R. T., Woods, L. K., Moore, G. E., Quinn, L. A., McGavran, L., and Gordon, S. G. (1980). Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 25, 591-598.
- Mori, M., Sawada, N., Kokai, Y., and Satoh, M. (1999). Role of tight junctions in the occurrence of cancer invasion and metastasis. *Med Electron Microsc* 32, 193-198.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 511-516.
- Muller, D., Kausalya, P. J., Claverie-Martin, F., Meij, I. C., Eggert, P., Garcia-Nieto, V., and Hunziker, W. (2003). A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet* 73, 1293-1301.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., and Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23, 5748-5758.
- Muschenheim, F., Omarbasha, B., Kardjian, P. M., and Mondou, E. N. (1991). Screening for carcinoma of the prostate with prostate specific antigen. *Ann Clin Lab Sci* 21, 371-380.
- Nacht, M., Ferguson, A. T., Zhang, W., Petroziello, J. M., Cook, B. P., Gao, Y. H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G. M., *et al.* (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* 59, 5464-5470.
- Nash, A. F., and Melezinek, I. (2000). The role of prostate specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 37-51.
- Naundorf, S., Preithner, S., Mayer, P., Lippold, S., Wolf, A., Hanakam, F., Fichtner, I., Kufer, P., Raum, T., Riethmuller, G., *et al.* (2002). In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. *Int J Cancer* 100, 101-110.

- Nestl, A., Von Stein, O. D., Zatloukal, K., Thies, W. G., Herrlich, P., Hofmann, M., and Sleeman, J. P. (2001). Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 61, 1569-1577.
- Nichols, L. S., Ashfaq, R., and Iacobuzio-Donahue, C. A. (2004). Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am J Clin Pathol* 121, 226-230.
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Earley, E. M., O'Brien, S., Ferrone, S., Pellegrino, M. A., Milstien, J., Needy, C., Browne, W., and Petricciani, J. (1979). Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line. *In Vitro* 15, 401-408.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nunbhakdi-Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C. L., 3rd, and Sontag, E. (2002). Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* 158, 967-978.
- Okabe, T., Yamaguchi, N., and Ohsawa, N. (1983). Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer* 51, 662-668.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U., and Huber, L. A. (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 146, 843-854.
- Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y. A., Cole, D. J., and Gillanders, W. E. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64, 5818-5824.
- Pape, U. F., Hofmann, I., Langbein, L., Prätzel, S., Schlüter, H., Vobis, D., Wolf, S., Franke, W. W. (2004). Claudins form homo- and heterooligomeric complexes in tight junctions in Vivo. *Cell Struct Funct* 29, 1-139.
- Paterson, D. J., Green, J. R., Jefferies, W. A., Puklavec, M., and Williams, A. F. (1987). The MRC OX-44 antigen marks a functionally relevant subset among rat thymocytes. *J Exp Med* 165, 1-13.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44, 655-667.
- Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 378, 281-292.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., *et al.* (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.
- Ponta, H., Wainwright, D., and Herrlich, P. (1998). The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 299-305.

- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33-45.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148, 997-1008.
- Prang, N., Preithner, S., Brischwein, K., Goster, P., Woppel, A., Muller, J., Steiger, C., Peters, M., Baeuerle, P. A., and da Silva, A. J. (2005). Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 92, 342-349.
- Rahner, C., Mitic, L. L., and Anderson, J. M. (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120, 411-422.
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., and Kerbel, R. S. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 14, 263-277.
- Rangel, L. B., Agarwal, R., D'Souza, T., Pizer, E. S., Alo, P. L., Lancaster, W. D., Gregoire, L., Schwartz, D. R., Cho, K. R., and Morin, P. J. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 9, 2567-2575.
- Rao, C. G., Chianese, D., Doyle, G. V., Miller, M. C., Russell, T., Sanders, R. A., Jr., and Terstappen, L. W. (2005). Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol* 27, 49-57.
- Raz, A., Zoller, M., and Ben, Z. e. (1986). Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 162, 127-141.
- Reisser, D., Olsson, N. O., and Martin, F. (1993). In vivo and in vitro reactivity of rat spleen cells against regressor and progressor colon-cancer cell variants. *Int J Cancer* 53, 651-656.
- Renan, M. J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7, 139-146.
- Ren-Heidenreich, L., Davol, P. A., Kouttab, N. M., Elfenbein, G. J., and Lum, L. G. (2004). Redirected T-cell cytotoxicity to epithelial cell adhesion molecule-overexpressing adenocarcinomas by a novel recombinant antibody, E3Bi, in vitro and in an animal model. *Cancer* 100, 1095-1103.
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451, 1-16.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H., and Lindhofer, H. (2001). Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem* 49, 911-917.

- Riethmuller, G., Schneider-Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., and et al. (1994). Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343, 1177-1183.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., et al. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16, 1788-1794.
- Roesler, J., Srivatsan, E., Moatamed, F., Peters, J., and Livingston, E. H. (1997). Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma. *Am J Surg* 174, 251-257.
- Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2, 582-592.
- Rosel, M., Claas, C., Seiter, S., Herlevsen, M., and Zoller, M. (1998). Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* 17, 1989-2002.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Russ, W. P., and Engelman, D. M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296, 911-919.
- Salo, T., Liotta, L. A., Keski-Oja, J., Turpeenniemi-Hujanen, T., and Tryggvason, K. (1982). Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells--role in metastasis. *Int J Cancer* 30, 669-673.
- Saslowsky, D. E., Lawrence, J., Ren, X., Brown, D. A., Henderson, R. M., and Edwardson, J. M. (2002). Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *J Biol Chem* 277, 26966-26970.
- Sauer, T., Pedersen, M. K., Ebeltoft, K., and Naess, O. (2005). Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology* 16, 193-198.
- Sawada, N., Murata, M., Kikuchi, K., Osanai, M., Tobioka, H., Kojima, T., and Chiba, H. (2003). Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 36, 147-156.
- Scheiffele, P., Roth, M. G., and Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J* 16, 5501-5508.
- Schiechl, H., and Dohr, G. (1987). Immunohistochemical studies of the distribution of a basolateral-membrane protein in intestinal epithelial cells (GZ1-Ag) in rats using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87, 491-498.
- Schlereth, B., Fichtner, I., Lorenczewski, G., Kleindienst, P., Brischwein, K., da Silva, A., Kufer, P., Lutterbuese, R., Junghahn, I., Kasimir-Bauer, S., et al. (2005). Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Res* 65, 2882-2889.

- Schmidt, D. S., Klingbeil, P., Schnolzer, M., and Zoller, M. (2004). CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 297, 329-347.
- Schmitt, M., Schmitt, A., Reinhardt, P., Thess, B., Manfras, B., Lindhofer, H., Riechelmann, H., Wiesneth, M., and Gronau, S. (2004). Opsonization with a trifunctional bispecific (alphaCD3 x alphaEpCAM) antibody results in efficient lysis in vitro and in vivo of EpCAM positive tumor cells by cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol* 25, 841-848.
- Schneeberger, E. E., and Lynch, R. D. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262, L647-661.
- Schneider, D., and Engelman, D. M. (2004a). Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J Biol Chem* 279, 9840-9846.
- Schneider, D., and Engelman, D. M. (2004b). Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J Mol Biol* 343, 799-804.
- Schon, M. P., Schon, M., Mattes, M. J., Stein, R., Weber, L., Alberti, S., and Klein, C. E. (1993). Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4. *Int J Cancer* 55, 988-995.
- Schon, M. P., Schon, M., Klein, C. E., Blume, U., Bisson, S., and Orfanos, C. E. (1994). Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol* 102, 987-991.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5795-5800.
- Schwartzberg, L. S. (2001). Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 40, 17-24.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., and Zoller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 177, 443-455.
- Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G., and Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271, 6518-6522.
- Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S., and Lublin, D. M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 13, 6385-6392.
- Shogomori, H., and Brown, D. A. (2003). Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 384, 1259-1263.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-1726.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.

- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Singh, R. K., Gutman, M., Bucana, C. D., Sanchez, R., Llansa, N., and Fidler, I. J. (1995). Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4562-4566.
- Skobe, M., and Fusenig, N. E. (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1050-1055.
- Slimane, T. A., Trugnan, G., Van, I. S. C., and Hoekstra, D. (2003). Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell* 14, 611-624.
- Soini, Y. (2005). Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* 46, 551-560.
- Songun, I., Litvinov, S. V., van de Velde, C. J., Pals, S. T., Hermans, J., and van Krieken, J. H. (2005). Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 92, 1767-1772.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., von Castelberg, B., Bart, R., *et al.* (2004). High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86, 207-213.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
- Sternlicht, M. D. and Bergers, G. (2000) Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 4, 609-633.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103, 1237-1241.
- Stuart, R. O., and Nigam, S. K. (1995). Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6072-6076.
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., and Linnenbach, A. J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3542-3546.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 619-627.
- Takes, R. P., Baatenburg de Jong, R. J., Schuurung, E., Hermans, J., Vis, A. A., Litvinov, S. V., and van Krieken, J. H. (1997). Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123, 412-419.
- Takes, R. P., Baatenburg de Jong, R. J., Wjffels, K., Schuurung, E., Litvinov, S. V., Hermans, J., and van Krieken, J. H. (2001). Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* 194, 298-302.
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H. O., Jr., and Chu, T. M. (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* 4, 15-23.

- Tan, X., Egami, H., Ishikawa, S., Kurizaki, T., Nakagawa, M., Hirota, M., and Ogawa, M. (2004). Arrangement of expression and distribution of tight junction protein claudin-1 in cell dissociation of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 25, 1567-1574.
- Tanaka, F., Hori, N., and Sato, K. (2002). Identification of differentially expressed genes in rat hepatoma cell lines using subtraction and microarray. *J Biochem (Tokyo)* 131, 39-44.
- Tandon, A. K., Clark, G. M., Chamness, G. C., and McGuire, W. L. (1990). Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res* 50, 3317-3321.
- Tarbe, N., Losch, S., Burtscher, H., Jarsch, M., and Weidle, U. H. (2002). Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. *Anticancer Res* 22, 2015-2027.
- Tarmann, T., Dohr, G., Schiechl, H., Barth, S., and Hartmann, M. (1990). Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel)* 137, 141-145.
- Tezel, E., Kawase, Y., Takeda, S., Oshima, K., and Nakao, A. (2001). Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. *Pancreas* 22, 122-125.
- Thampoe, I. J., Ng, J. S., and Lloyd, K. O. (1988). Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys* 267, 342-352.
- Tokes, A. M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Paska, C., Novak, P. K., Szilak, L., Kiss, A., Bogi, K., and Schaff, Z. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7, R296-305.
- Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G. J., Ruijter, E. T., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J., and Schalken, J. A. (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60, 3650-3654.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trainer, D. L., Kline, T., McCabe, F. L., Faucette, L. F., Feild, J., Chaikin, M., Anzano, M., Rieman, D., Hoffstein, S., Li, D. J., and et al. (1988). Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 41, 287-296.
- Tran, N. L., Nagle, R. B., Cress, A. E., and Heimark, R. L. (1999). N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells. *Am J Pathol* 155, 787-798.
- Trebak, M., Begg, G. E., Chong, J. M., Kanazireva, E. V., Herlyn, D., and Speicher, D. W. (2001). Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 276, 2299-2309.
- Tsubura, A., Senzaki, H., Sasaki, M., Hilgers, J., and Morii, S. (1992). Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 19, 73-79.

- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-293.
- Van Itallie, C. M., Gambling, T. M., Carson, J. L., and Anderson, J. M. (2005). Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci* 118, 1427-1436.
- Varki, N. M., Reisfeld, R. A., and Walker, L. E. (1984). Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 44, 681-687.
- Varner, J. A., and Cheresh, D. A. (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8, 724-730.
- Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 211-220.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.
- Volpert, O. V., Dameron, K. M., and Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 14, 1495-1502.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625-634.
- Waugh, M. G., Lawson, D., and Hsuan, J. J. (1999). Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *Biochem J* 337 (Pt 3), 591-597.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Went, P. T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., and Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35, 122-128.
- Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.
- White, C. A., Weaver, R. L., and Grillo-Lopez, A. J. (2001). Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu Rev Med* 52, 125-145.
- Wimberger, P., Xiang, W., Mayr, D., Diebold, J., Dreier, T., Baeuerle, P. A., and Kimmig, R. (2003). Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody. *Int J Cancer* 105, 241-248.
- Winter, M. J., Nagelkerken, B., Mertens, A. E., Rees-Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., and Litvinov, S. V. (2003a). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285, 50-58.
- Winter, M. J., Nagtegaal, I. D., van Krieken, J. H., and Litvinov, S. V. (2003b). The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163, 2139-2148.

- Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9, 3088-3092.
- Wurfel, J., Rosel, M., Seiter, S., Claas, C., Herlevsen, M., Weth, R., and Zoller, M. (1999). Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314. *Oncogene* 18, 2323-2334.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xiang, W., Wimberger, P., Dreier, T., Diebold, J., Mayr, D., Baeuerle, P. A., and Kimmig, R. (2003). Cytotoxic activity of novel human monoclonal antibody MT201 against primary ovarian tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 341-348.
- Yauch, R. L., Kazarov, A. R., Desai, B., Lee, R. T., and Hemler, M. E. (2000). Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 275, 9230-9238.
- Yoo, J., Nichols, A., Mammen, J., Calvo, I., Song, J. C., Worrell, R. T., Matlin, K., and Matthews, J. B. (2003). Bryostatin-1 enhances barrier function in T84 epithelia through PKC-dependent regulation of tight junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C300-309.
- Yunis, A. A., Arimura, G. K., and Russin, D. J. (1977). Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19, 218-235.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.
- Zhang, W., Triple, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.
- Zheng, J. Y., Yu, D., Foroohar, M., Ko, E., Chan, J., Kim, N., Chiu, R., and Pang, S. (2003). Regulation of the expression of the prostate-specific antigen by claudin-7. *J Membr Biol* 194, 187-197.
- Zheng, M., Fang, H., and Hakomori, S. (1994). Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* 269, 12325-12331.
- Zietman, A. L., Coen, J. J., Shipley, W. U., Willett, C. G., and Efid, J. T. (1994). Radical radiation therapy in the management of prostatic adenocarcinoma: the initial prostate specific antigen value as a predictor of treatment outcome. *J Urol* 151, 640-645.
- Zoller, M., Matzku, S., and Goerttler, K. (1978). High incidence of spontaneous transplantable tumours in BDX rats. *Br J Cancer* 37, 61-66.
- Zorzos, J., Zizi, A., Bakiras, A., Pectasidis, D., Skarlos, D. V., Zorzos, H., Elemenoglou, J., and Likourinas, M. (1995). Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol* 28, 251-254.

Zurzolo, C., van't Hof, W., van Meer, G., and Rodriguez-Boulan, E. (1994). VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *Embo J* 13, 42-53.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Margot Zöller für meine Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas sehr herzlich danken. Es ist keine Selbstverständlichkeit eine derart offene, stets diskussionsbereite und immer Rat wissende Wissenschaftlerin zur Chefin zu haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Christoph Claas, dessen wissenschaftliche und moralische Unterstützung sowie seine fachlich kompetenten Ratschläge großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. W. W. Franke und seine Mitarbeiter Dr. Ulrich-Frank Pape, Dr. Lutz Langbein und Silke Prätzel für die fruchtbare und konstruktive Kooperation. Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. Martina Schnölzer und Herrn Dr. Tore Kempf für eine hervorragende Arbeit bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Claudin-7 zu danken und Herrn Dr. Herbert Spring für seine Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie.

Danken möchte ich außerdem Pamela, Joachim und Sebastian, nicht nur für die ständige Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, sondern auch für die meist äußerst intensiven und hart umkämpften Debatten über das beste Bier der Welt, den Katholizismus, Glück, Fußball und andere lebenswichtige Themen. Ich habe unsere Pausen sehr genossen! Frank möchte ich danken für anstrengende und spannende Squash Matches und Gerard für die immer neuen, hochwissenschaftlichen Versuchsansätze zur Ergründung des Geheimnisses von Trockeneis. Pooja möchte ich danken für die unnachahmliche Aussprache von „Alopecia areata“. Weiterhin möchte ich Dirk, Claudia, Rachid, Eberhard, „Schenkelbürstchen“, Mehdi, Sonja, Sabine, Cosima, Susanne, Mario, Dagmar, Anja und Waltraud für ihre stets kollegiale Unterstützung danken - nicht zu vergessen Entenpulli und Frau Ziegenbart („zwei für eins“).

Ein besonderer Dank geht an unsere Sekretärin Angelika, die durch ihren unermüdlichen Einsatz und ihr Engagement Großes in dieser Arbeitsgruppe leistet.

Allen, die ich vergessen habe und allen, die während der vier Jahre gekommen und gegangen sind, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten, sei ebenfalls gedankt. Ich hatte eine tolle und unvergessliche Zeit mit euch. Danke!

Am Schluss will ich der Person danke sagen, die mich durch all die Jahre, durch schöne und schwere Zeiten begleitet hat. Dein Zuspruch, Deine Ehrlichkeit und Dein Vertrauen haben mir immer wieder aufs Neue die Kraft gegeben die entbehrungsreiche Zeit durchzustehen. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke Birgit!

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

Ladwein, M., Pape, U. F., Schmidt, D. S., Schnolzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W. W., Moldenhauer, G., Zoller, M. (2005).
The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 309, 345-357.

Publizierte Abstracts:

Markus Ladwein, Dirk-Steffen Schmidt, Ulrich-Frank Pape, Martina Schnölzer, Herbert Spring, Werner W. Franke and Margot Zöller.

Direct Interaction of the Cell Adhesion Molecule EpCAM and the Tight Junction Protein Claudin-7 on Non-Transformed Tissues and Metastasizing Tumors.

Eur J Cell Biol 84S1, Suppl. 55.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, März 2005, Heidelberg (Posterpräsentation).

Markus Ladwein, Ulrich-Frank Pape, Martina Schnölzer, Herbert Spring, Werner W. Franke and Margot Zöller.

Direct Interaction of EpCAM and the Tight Junction Protein Claudin-7 on Metastasizing Tumor Lines: A Role in Tumor Progression?

Int J Cancer Res Treat 28, Suppl. 2.

13th International AEK/AIO Congress of the German Cancer Society, March 2005, Würzburg (Posterpräsentation).

Nicht publizierte Abstracts:

Markus Ladwein, Ulrich-Frank Pape, Martina Schnölzer, Herbert Spring, Werner W. Franke and Margot Zöller.

Direct Interaction of EpCAM and the Tight Junction Protein Claudin-7 on Metastasizing Tumor Lines: A Role in Tumor Progression?

2nd International PhD Student Symposium, Decoding Nature: Hierarchy of Interactions, March 2005, Max Planck Institutes for Biophysical Chemistry, Göttingen (Vortrag).

Markus Ladwein, Ulrich-Frank Pape, Martina Schnölzer, Herbert Spring, Werner W. Franke and Margot Zöller.

Direct Interaction of EpCAM and the Tight Junction Protein Claudin-7 on Metastasizing Tumor Lines: A Role in Tumor Progression?

DKFZ PhD Poster Competition, November 2004, DKFZ, Heidelberg (Posterpräsentation).

LEBENS LAUFPersönliche Daten

Name: Markus Ladwein
 Adresse: Saarstr. 6
 64625 Bensheim
 Tel.: +49 (0) 6251 / 85 64 44
 Mobil: +49 (0) 16092723003
 E-Mail: m.ladwein@dkfz.de

Geburtsdatum: 08/07/75
 Geburtsort: Dillingen/Saar
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Praktische Erfahrung

Seit 01/02 Promotion, Abteilung Tumorprogression und Immunabwehr am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg

07/00 - 12/01 Research Technician in der Abteilung „Development and New Products“ im Bereich Diagnostics der Abbott GmbH, Wiesbaden-Delkenheim

10/99 - 07/00 Diplomarbeit an der Hautklinik der Universitätskliniken Mainz im Sonderforschungsbereich für Tumorummunologie

Ausbildungsdaten

07/00 Erlangung des Diplomgrades Diplom-Ingenieur (FH)

10/96 - 07/00 Studium der Biotechnologie, Fachhochschule Bingen

08/95 - 08/96 Zivildienst: Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz, Bitburg

06/95 Abitur

08/88 - 06/95 St. Willibrord Gymnasium, Bitburg

08/86 - 07/88 St. Matthias Realschule, Bitburg

09/82 - 06/86 Grundschule Nord, Bitburg