



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7324

**Der Ko-Rezeptor CD44 v6:
Ein Beitrag zur
Signaltransduktion und
Etablierung einer
CD44-negativen Maus**

T. Kastilan

Institut für Toxikologie und Genetik

Juni 2007

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7324

**Der Ko-Rezeptor CD44 v6:
Ein Beitrag zur Signaltransduktion und
Etablierung einer CD44-negativen Maus**

Thor Kastilan

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-073243

**Der Ko-Rezeptor CD44 v6:
Ein Beitrag zur Signaltransduktion und
Etablierung einer CD44-negativen Maus**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Thor Kastilan
aus Offenburg

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta

Referent: Prof. Dr. H. Ponta

Korreferent: Prof. Dr. M. Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2007

Zusammenfassung

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das in einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist. Neben seiner Funktion in der Zell-Matrix-Adhäsion ist es in einigen Zelltypen an der Bildung eines Signalkomplexes, bestehend aus der Isoform CD44 v6, der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met und dem ERM-Protein Ezrin, beteiligt.

Um die Rolle von Ezrin sowie der zytoplasmatischen Domäne von CD44 v6 bei der Signaltransduktion von c-Met zu untersuchen, wurden Fusionsproteine generiert, in denen Ezrin direkt an die Transmembran-Domäne von CD44 v6 gekoppelt wurde. Bei der Untersuchung der Funktionalität des Fusionsproteins bezüglich der Weiterleitung der c-Met Signalkaskade zeigte sich, dass die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von CD44 v6 keine Auswirkung auf die Weitergabe des Signals hat. Sie scheint dafür verantwortlich zu sein, Ezrin in einen Komplex mit c-Met zu bringen. Um die Funktion von Ezrin im Signalkomplex zu bestimmen, wurde es verschiedentlich modifiziert. Durch die Deletion der F-Aktin-Bindedomäne kam es zu einem Abbruch der Weiterleitung des HGF/SF-induzierten Signals, was der Aktin-Bindung in diesem Prozess eine essentielle Rolle zuweist.

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation sollte ein konditioneller Knockout von CD44 in der Maus etabliert werden. Aus Knockouts, die auf einer Zerstörung der Gen-Struktur basieren, konnte keine eindeutige Funktion von CD44 in der Entwicklung abgeleitet werden, während es bei einem transgenen *antisense*-Knockout zu einem drastischen Phänotyp kam. Um die Rolle von CD44 in der Embryogenese zu bestimmen und eine mögliche Substitution zu untersuchen, sollte daher ein induzierbarer konditioneller Knockout generiert werden.

Als Strategie wurde für die Inaktivierung von CD44 die Exzision von Exon 3 durch das *Cre-LoxP*-System gewählt. Die beiden Exon 3 flankierenden LoxP-Rekombinationsstellen wurden über homologe Rekombination mit den endogenen Sequenzen in die genomische DNA von ES-Zellen inseriert. Dafür wurde ein Knockout-Vektor kloniert, welcher alle für die Inaktivierung notwendigen Komponenten, flankiert von homologen Sequenzen, enthält. ES-Zell-Klone mit einer homologen Integration der LoxP-Sequenzen wurden in Blastozysten injiziert, welche in Leihmütter transferiert wurden. Fünf chimäre Mäuse wurden geboren, von denen ein stark chimäres Weibchen nach kurzer Zeit starb. Die übrigen wurden für die Etablierung einer homozygoten CD44-Knockout Mauslinie mit BL/6 Mäusen verpaart.

Der nächste Schritt wäre die Aktivierung des Knockouts durch die Verpaarung einer homozygoten Knockout-Maus mit einer *Cre-Rekombinase*-exprimierenden Maus. Die resultierende Deletion von Exon 3 hat die Bildung einer *nonsense*-mRNA und deren Abbau vor Beginn der Translation von

CD44 zur Folge. Dabei sollte die Expression der *Cre-Rekombinase* unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors stehen, welcher so gewählt wird, dass die Inaktivierung zur Aufklärung der Funktionen von CD44 in der Embryogenese beitragen kann.

The co-receptor CD44 v6: Its contribution to signal transduction and the establishment of a CD44 null mouse

Abstract

The cell adhesion molecule CD44 is involved in many cellular processes. Beside its function in cell-matrix adhesion CD44 is involved in the formation of a signaling complex involving the isoform CD44 v6, the receptor tyrosin kinase (RTK) c-Met and the ERM-protein ezrin in many cell types. Indeed, the CD44 tail recruits ERM proteins as well as the cytoskeleton in order to promote signaling from the c-Met RTK.

In order to test whether the CD44 tail is there to bring ERM proteins to the membrane, fusion proteins were generated in which ezrin was fused directly to the transmembrane domain of CD44 v6. These fusion proteins were able to promote signaling indicating that ERM proteins have to be maintained at the membrane to fulfill their function. The cytoplasmic domain of CD44 seems to be responsible to bring ezrin into a complex with c-Met. To determine the role of ezrin in the signaling complex, this protein was modified in different ways in the fusion protein. Deletion of the F-actin binding domain in ezrin blocked HGF/SF induced signaling pointing towards an essential role of actin in this process.

The aim of the second part of my PhD work was to establish a conditional knockout of CD44 in mice. The classical CD44 knockout mouse showed no overt phenotype, whereas a transgenic *antisense* knockout resulted in a drastic phenotype. To determine the role of CD44 in embryogenesis and to test whether a substitution had occurred in the classical knockout mouse, a conditional knockout mouse should be generated. A construct containing exon 3 flanked by LoxP sites included in genomic DNA was transfected into ES cells. ES cell clones harboring homologous integration of the LoxP sites containing sequences were injected into blastocytes and transferred into surrogate mothers. Five chimeric mice were born, the strongest chimera, a female, died after three weeks. The remaining mice were crossed with BL/6 mice to establish a homozygote CD44 knockout mouse line.

The next step is the inactivation of CD44 by crossing the homozygote knockout mouse with a *Cre*

recombinase expressing mouse. The deletion of exon 3 results in the production of a *nonsense-mRNA* which is degraded by NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*). The expression of the *Cre recombinase* should be under the control of a time specific inducible or tissue specific promoter. These crossings will help to explain the functions of CD44 in embryogenesis.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die CD44 Klasse I Protein-Familie	2
1.1.1 Gen-und Protein-Struktur von CD44	2
1.1.2 Post-translationale Modifikationen von CD44	4
1.2 Interaktionspartner von CD44	4
1.2.1 Extrazelluläre Bindepartner von CD44	4
1.2.2 Intrazelluläre Bindepartner von CD44	5
1.3 Der Signalkomplex aus CD44 v6, c-Met und einem Protein der ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Familie	6
1.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met	8
1.4.1 Die Struktur von c-Met	8
1.4.2 HGF/SF – Der Ligand von c-Met	9
1.4.3 Mechanismus der Aktivierung von c-Met	9
1.4.4 Funktionen von HGF/SF und c-Met	10
1.4.5 Interaktionen von c-Met mit Proteinen an der Plasmamembran	11
1.5 Die ERM (Ezrin-Radixin-Moesin)-Protein-Familie	11
1.5.1 Bindung der ERM-Proteine an CD44	11
1.5.2 Die Aktivitätszustände der ERM-Proteine	13
1.6 Expressionsmuster von CD44	14
1.7 Die Funktionen von CD44	15
1.7.1 Die Rolle von CD44 in der Embryogenese	15
1.7.2 Die Rolle von CD44 bei der Krebsentstehung / Metastasierung	16
1.8 CD44 Inaktivierungen	17
1.8.1 Die "klassischen" Knockouts - Eine Inaktivierung durch Zerstörung der Gen-Struktur	17
1.8.1.1 Inaktivierung durch Substitution von Exon 2 und 3 (SCHMITS <i>et al.</i> , 1997)	17

1.8.1.2 Inaktivierung durch Insertion einer <i>LacZ/Neo</i> -Kassette in das Leader-Peptid (PROTIN <i>et al.</i> , 1999)	18
1.8.1.3 Zusammenfassung der "klassischen" Inaktivierungen	19
1.8.2 Transgener Knockout durch <i>antisense</i> -RNA (KAYA <i>et al.</i> , 1997)	19
1.8.3 Vergleich der Knockouts	22
1.9 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Bezugsquellen für Reagenzien und Chemikalien	26
2.1.2 Bezugsquellen für Enzyme	27
2.1.3 Bezugsquellen für Antikörper	28
2.1.4 Bezugsquellen für Kits	29
2.1.5 Bezugsquellen für Geräte	29
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.7 Lösungen, Medien und Puffer	31
2.1.8 Verwendete Zelllinien	32
2.1.8.1 Embryonale Stammzelllinien	32
2.1.8.2 Weitere eukaryotische Zelllinien	33
2.1.9 Plasmide	33
2.1.10 Bakterienstämme	34
2.1.11 Hybridisierungs-Sonden	35
2.1.12 PCR Primer	35
2.1.13 Mutagenese-Primer	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1 Präparation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> TOP 10 Bakterien	37
2.2.1.2 Transformation von Bakterien	37
2.2.1.3 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA	38
2.2.1.4 Phenol/Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren	39
2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.1.6 Analytische Agarosegel-Elektrophorese	40

2.2.1.7 Präparative Agarosegel-Elektrophorese	40
2.2.1.8 Restriktionsanalyse von DNA	41
2.2.1.9 Dephosphorylierung von 5' Überhängen	41
2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.1.12 <i>Nested</i> PCR	43
2.2.1.13 Mutagenese von DNA-Sequenzen	44
2.2.1.14 <i>In vitro</i> Rekombination von LoxP-Sequenzen	44
2.2.1.15 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	44
2.2.1.16 Southern Blot Analyse	46
2.2.2 Zellbiologische Methoden	49
2.2.2.1 Zellkultur und Subkultivierung von ES-Zellen	49
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	50
2.2.2.3 Kultivierung und Inaktivierung von Maus-Fibroblasten (MEK, <i>Feeder</i>).....	51
2.2.2.4 Zellkultur und Subkultivierung von Bsp73AS, HT-29 und 293 Zellen	51
2.2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Bsp73AS, HT-29 und 293 Zellen	51
2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl	52
2.2.2.7 Aktivierung von HGF	52
2.2.2.8 Induzierung mit HGF	52
2.2.2.9 Transfektion von ES-Zellen durch Elektroporation	53
2.2.2.10 Selektion von transfizierten ES-Zellen	53
2.2.2.11 Isolierung einzelner ES-Zell-Klone	53
2.2.2.12 Deletion der <i>Neo</i> -Kassette	54
2.2.2.13 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion	54
2.2.2.14 Transfektion von AS10-, HT-29- und 293- Zellen	55
2.2.2.15 Scattering assay mit HT-29 -Zellen	55
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	56
2.2.3.1 <i>In vitro</i> Translation	56
2.2.3.2 Proteinextraktion und Zellyse	56

2.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.2.3.4 Western Blot Analyse	58
2.2.3.5 Immunopräzipitation (IP)	59
2.2.3.6 Immunopräzipitation von Met und Hämagglutinin (HA)-getaggtter ERK	59
3. Ergebnisse	61
3.1 Die Rolle des ERM-Proteins Ezrin und der zytoplasmatischen Domäne von CD44v6 im Signalkomplex CD44v6 - c-Met - Ezrin	61
3.1.1 Klonierung des CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Fusionskonstruktes	61
3.1.2 Test des Fusionskonstruktes aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin auf Funktionalität	64
3.1.3 Untersuchung der Rolle der zytoplasmatischen Domäne von CD44 und der N-terminalen Domäne in Ezrin bei der Signaltransduktion von c-Met	66
3.1.4 Untersuchung der Aktin-Bindedomäne von Ezrin hinsichtlich ihrer Rolle bei der Signaltransduktion von c-Met	68
3.1.5 Aufgabe der Bindung von Ezrin an das Zytoskelett bei der Aktivierung der c-Met-Signalkaskade	69
3.1.6 HGF/SF-induzierte Dissoziation von Zellen erfordert die Assoziation des ERM-Proteins Ezrin an das Zytoskelett	71
3.2 Etablierung eines konditionellen Knockout von CD44 in Mäusen	73
3.2.1 Klonierung des Konstruktes für die konditionelle Inaktivierung von CD44	75
3.2.2 Test des Knockout-Konstruktes pCD44-cko	78
3.2.2.1 Test der LoxP-Rekombinationsstellen <i>in vitro</i>	78
3.2.2.2 Test des Knockout-Konstruktes pCD44-cko auf Funktionalität in CCE ES-Zellen	79
3.2.2.3 Deletion der <i>Neomycin</i> -Resistenz-Kassette in CCE ES-Zellen	82
3.2.3 Etablierung einer homozygoten Mauslinie für einen konditionellen Knockout von CD44	85
3.2.3.1 Homologe Rekombination in HM-1- und E14.1 ES-Zellen	85
3.2.3.2 Deletion der <i>Neomycin</i> -Resistenz-Kassette in HM-1 und E14.1 ES-Zellen	87
3.2.4 Blastozysteninjektionen und Kreuzungen	91

4. Diskussion	93
4.1 Der Signalkomplex c-Met, CD44 v6 und Ezrin	93
4.2 Der konditionelle Knockout von CD44	96
5. Literaturverzeichnis	100
6. Abkürzungsverzeichnis	109
7. Anhang	111

1. Einleitung

Bei der Tumorgenese kommt es zur Anhäufung von genetischen Veränderungen, die zur Überaktivierung von Onkogenen, wie beispielsweise bei der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) c-Met, bzw. zur Funktionsverlust-Mutation von Tumorsuppressorgenen führen wie z.B. bei p53. Die Ausbreitung von Tumorzellen ist Voraussetzung für die Metastasierung. Dabei fördern Veränderungen in der Expression von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle die maligne Tumorentwicklung. Zudem können Zell-Adhäsionsmoleküle mit RTKs interagieren und so deren Signaltransduktion modulieren, dass es zu einer Veränderung zellulärer Prozesse kommt, die zur Entstehung von Krebs führen können.

In einigen Zelltypen ist die Aktivierung und die nachfolgende Signaltransduktion der RTK c-Met abhängig von einer Exon v6-enthaltenden Isoform des Adhäsionsmoleküls CD44 (CD44v6). CD44v6 wird als Ko-Rezeptor für die Aktivierung von c-Met durch HGF/SF (Hepatozyten-Wachstumsfaktor, *scatter factor*) benötigt (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002). Werden epitheliale Zellen durch HGF/SF stimuliert, so kommt es zu einer Vereinzelnung (*scattering*) der Zellen, die sich aus dem Zellverband lösen. In der Embryogenese wird die Motilität von Zellen ebenfalls durch HGF/SF und c-Met reguliert (BLADT *et al.*, 1995 und DIETRICH *et al.*, 1999), wie auch die Auswanderung von Zellen aus primären Tumoren und die Bildung von Metastasen (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003).

Daher ist es von besonderem Interesse Adhäsionsmoleküle wie CD44 und RTKs wie c-Met und ihre Interaktionen zu untersuchen, da sie auf molekularer Ebene einen Einblick in die Krebsentstehung und die Bildung von Metastasen geben können.

1.1 Die CD44 Klasse I Protein-Familie

1.1.1 Gen-und Protein-Struktur von CD44

CD44 Proteine werden durch ein einziges, konserviertes Gen kodiert (SCREATON *et al.*, 1992). Beim Menschen befindet es sich auf Chromosom 11 im Locus p13 (GOODFELLOW *et al.*, 1982), bei der Maus auf Chromosom 2 im Locus E2 (Quelle: Ensembl release 42 - Dec 2006). Das Gen besteht aus 20 Exons von denen die mittleren 10 (Exon 6-15) alternativ gespleißt werden können (HOFFMANN *et al.*, 1991) (**Abb. 1-1**). Die kürzeste Isoform von CD44, bei der keines dieser Exons eingebaut ist, wird allgemein als CD44s (Standard) bezeichnet, Isoformen mit integrierten alternativ gespleißten varianten Exons nennt man CD44v (variabel).

Die CD44-Proteine sind transmembrane Glykoproteine und bestehen aus einer extrazellulären Amino-terminalen Domäne, einer variablen Domäne, einer kurzen membran-proximalen Domäne, einer transmembranen Domäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne (**Abb. 1-2**).

Die ersten fünf nicht-variablen Exons kodieren für die 270 Aminosäuren große extrazelluläre amino-terminale Domäne (**Abb. 1-1 und 1-2**). Die tertiäre Struktur der Protein-Domäne wird durch Disulfid-Brücken unterstützt, die sich jeweils zwischen Cystein-Resten ausbilden. Die amino-terminale Domäne enthält Motive, die Bindestellen für verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix repräsentieren (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003).

Die extrazelluläre variable Region (**Abb. 1-2**) wird durch 10 alternativ gespleißte Exons kodiert (**Abb. 1-1**). Theoretisch sind so über 700 unterschiedliche CD44-Isoformen denkbar. Der Einbau der varianten Exons ist zumindest teilweise abhängig von mitogenen Signalen, die alternatives Spleißen regulieren (KÖNIG *et al.*, 1998 und WEG-REMERS *et al.*, 2001). Beim Menschen kodiert das Triplet 17 von Exon 6 (=v1) für ein STOP-Kodon, so dass dieses Exon nicht exprimiert wird. Bei Mäusen ist das STOP-Kodon nicht vorhanden. Werden alle 10 Exon integriert (in CD44v1-10), so umfasst die variable Region 381 Aminosäuren (Übersichtsartikel GOODISON *et al.*, 1999).

Der Membran-proximale Teil der extrazellulären Domäne wird durch Exon 16 und 17 kodiert (**Abb. 1-1**) und ist innerhalb der Säugetiere zu 35 % konserviert (Übersichtsartikel GOODISON *et al.*, 1999).

Die hydrophobe transmembrane Domäne (**Abb. 1-2**) wird durch einen Teil des Exons 18 kodiert (**Abb. 1-1**) und ist innerhalb der Säugetiere zu 100 % konserviert (KOHDA *et al.*, 1996). In der 23

Aminosäuren umfassenden Domäne findet sich auch ein Cystein-Rest, der an der Bildung von CD44-Oligomeren beteiligt ist (LIU *et al.*, 1997).

Die hoch konservierte zytoplasmatische Domäne (**Abb. 1-2**) wird durch den verbleibenden Teil des Exons 18 und durch die Exons 19 und 20 kodiert (**Abb. 1-1**).

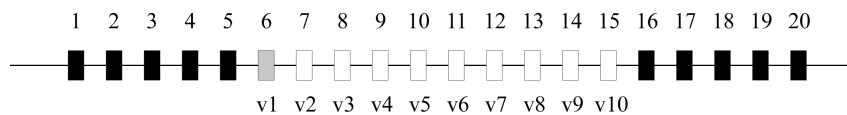


Abbildung 1-1: Struktur des Gens CD44. CD44 besteht aus 20 Exons, von denen 10 (Exon 6-15) alternativ integriert werden können. Die ersten 5 Exons kodieren für die Amino-terminale Domäne. Die Exons 6-15 (v1-10) kodieren für die variable Domäne. Beim Menschen enthält Exon 6 (v1) ein STOP-Kodon, so dass es nicht eingebaut wird. Exon 16 und 17 kodieren für die Membran-proximale extrazelluläre Domäne. Die transmembrane Domäne wird durch einen Teil von Exon 18, die zytoplasmatische Domäne durch Exon 18, 19 und 20 kodiert.

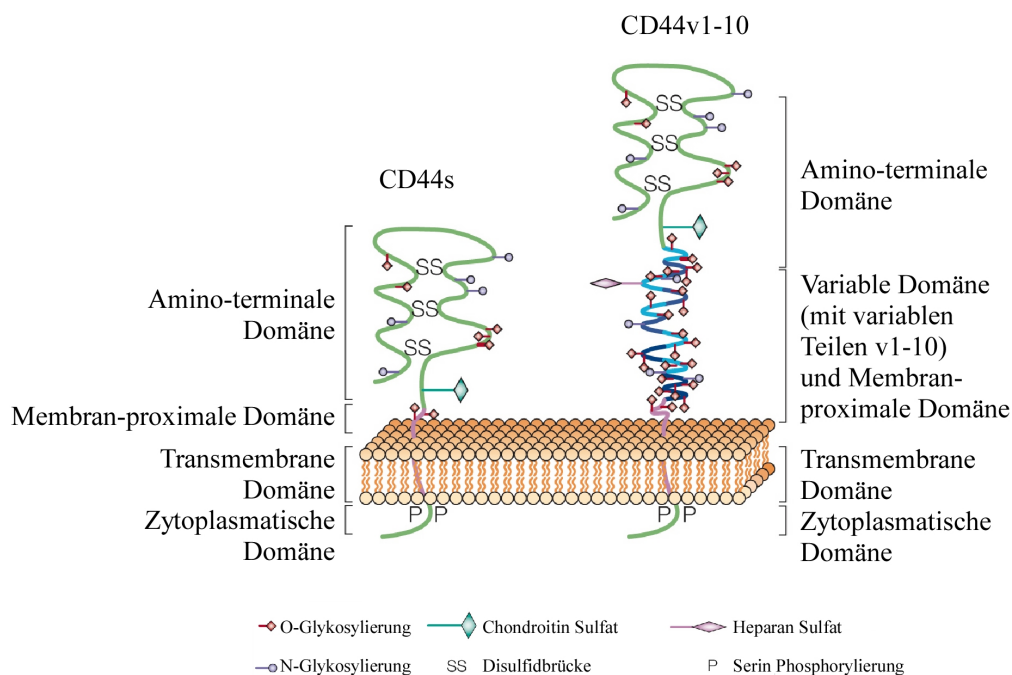


Abbildung 1-2: Proteinstruktur und Lokalisation der post-translationalen Modifikationen von CD44. (Verändert nach PONTA *et al.*, 2003).

1.1.2 Post-translationale Modifikationen von CD44

Bei CD44 kommt es häufig zu post-translationalen Modifikationen, deren Ausprägung sowohl vom Zelltyp als auch von Wachstumsbedingungen abhängig sind. Am häufigsten sind O- und N-Glykosylierungen in der N-terminalen und der variablen Domäne. Ferner findet sich eine Chondroitin-Sulfat Bindestelle in Exon 5 und eine Heparan-Sulfat Bindestelle in Exon v3 (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003) (**Abb. 1-2**). Daher können CD44-Proteine je nach Modifizierung und Größe der variablen Region molekulare Massen von ~80 kDa bis >200 kDa erreichen (Übersichtsartikel GOODISON *et al.*, 1999).

1.2 Interaktionspartner von CD44

1.2.1 Extrazelluläre Bindepartner von CD44

Der Hauptligand von CD44 ist die Hyaluronsäure (HA), ein lineares polymeres Glykosaminglykan, welches eine Komponente der extrazellulären Matrix (ECM) ist. In der extrazellulären Domäne von CD44 finden sich drei HA-Bindestellen, eine in der sogenannten "link" Domäne (Aminosäure 32-123), die durch Exon 2 kodiert wird (YANG *et al.*, 1994) und zwei sich überlappende HA-Bindestellen, die durch Exon 5 kodiert werden (BAJORATH *et al.*, 1998). Die Struktur der "link"-Domäne ist zwischen HA-bindenden Proteinen konserviert (KOHDA *et al.*, 1996). Inzwischen ist der Komplex aus CD44 und HA kristallisiert und analysiert worden. Dabei zeigte sich, dass HA fast ausschließlich in der "link"-Domäne bindet. Außerdem konnten zwei verschiedene Konformationen von CD44 beobachtet werden, welche sich durch die Orientierung des für die Bindung von HA essentiellen Arginin 45 voneinander unterscheiden. Ein Wechsel zwischen den beiden Konformationen kann anscheinend durch Bindung von HA induziert werden (BANERJI *et al.*, 2007). Außer HA können hier auch andere Glykosaminoglykane (GAGs) binden (TOYAMA-SORIMACHI *et al.*, 1994). Im Hinblick auf seine Fähigkeit HA oder andere GAGs zu binden, kann CD44 in einer aktiven, induzierbaren oder inaktiven Form vorliegen. Der Aktivierungszustand ist abhängig von Zelltyp und von den post-translationalen Modifikationen des Proteins. Beispielsweise fördert eine Inhibierung der N-Glykosylierung die Bindung von HA (LESLEY *et al.*, 1995). Zudem wurde durch eine Behandlung mit Neuroaminidase herausgefunden, dass die Sialylierung von

CD44 auf Monozyten die Bindung von HA verhindert (KATOH *et al.*, 1995).

Auch Osteopontin ist fähig CD44 zu binden (WEBER *et al.*, 1997). Osteopontin ist ein Zytokin, welches von verschiedenen Zellen sezerniert wird und zelluläre Chemotaxis induziert. HA sowie anti-CD44-Antikörper sind in der Lage eine Bindung von Osteopontin an CD44 zu blockieren. Interaktionen zwischen Osteopontin und CD44 gehen mit lymphogener Metastasierung einher (UE *et al.*, 1998).

Neben HA können auch andere Komponenten der extrazellulären Matrix an CD44 binden.

CD44 kann in der N-terminalen Domäne (Exon 5) durch Chondroitin-Sulfat modifiziert werden (**Abb. 1-2**). Die Bindung von Kollagen (FAASSEN *et al.*, 1992 und KNUTSON *et al.*, 1996), Laminin und Fibronektin (JALKANEN *et al.*, 1992) an CD44 ist von dieser Modifikation abhängig. Auch das Chondroitin-Sulfat-modifizierte Serglyzin, welches durch hämatopoetischen Zellen sezerniert wird, kann mit CD44 interagieren. Diese Interaktion führt zur Aggregation, Adhäsion und Aktivierung lymphoider Zellen (TOYAMA-SORIMACHI *et al.*, 1994, 1995 und 1997).

Das Aminosäure-Motif Ser-Gly-X-Gly, welches durch das alternativ gespleißte Exon v3 kodiert wird, kann Heparan-Sulfat modifiziert werden (**Abb. 1-2**). Verschiedene Heparan-Sulfat-bindende Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (b-FGF) oder der Heparin-bindende epidermale Wachstumsfaktor (HB-EGF), können über Heparan-Sulfat mit CD44 interagieren (BENNETT *et al.*, 1995).

Wie auch bei anderen Zelloberflächenmolekülen kann die Ligandenbindung durch Bildung von Multimeren verstärkt werden. Ein solches Clustering von CD44 wird für die Bindung von HA benötigt (LESLEY *et al.*, 1993).

1.2.2 Intrazelluläre Bindepartner von CD44

Über die zytoplasmatische Domäne ist CD44 in der Lage Stimuli aus dem extrazellulären Raum in das Innere der Zelle weiterzuleiten (BOURGUIGNON *et al.*, 1998). Das Protein Ankyrin wurde als erster intrazellulärer Partner von CD44 identifiziert. Die Ankyrin-Bindestelle von CD44 wird von den Aminosäuren 304-318 gebildet und befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne. Ankyrin vermittelt auch den Kontakt von CD44 zu Spectrin, einer Komponente des Zytoskeletts (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003). In hämatopoetischen Zellen konnte gezeigt werden, dass das Protein 4.1 ebenfalls direkt an CD44 bindet und auf diese Weise die Interaktion mit Ankyrin

blockiert (NUNOMURA *et al.*, 1997).

Durch die Verbindung zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum ist CD44 in der Lage dynamische Interaktionen in das Zellinnere zu vermitteln. So wurde in einer metastasierenden Brustkrebs-Zelllinie die CD44v3,8-10 Isoform beschrieben, welche über die zytoplasmatische Domäne mit Ankyrin interagieren kann. Während der Zellmigration findet sich diese Isoform in Pseudopodien-artigen Strukturen, wo sie eng assoziiert mit einer aktiven Matrix-Metalloproteinase (MMP) vorliegt (BOURGUIGNON *et al.*, 1998). MMPs sind eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, welche Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren (MURPHY *et al.*, 1999).

1.3 Der Signalkomplex aus CD44 v6, c-Met und einem Protein der ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Familie

Die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Met ist unter anderem in metastasierenden Krebszellen der Ratte (BSp73ASML; Pankreaskarzinomzelllinie) und des Menschen (HT-29; Darmkrebszelllinie) sowie in primären humanen Keratinozyten von einer v6- enthaltenden Isoform von CD44 abhängig (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002) (**Abb. 1-3**). Für die Aktivierung von c-Met ist der extrazelluläre Teil mitsamt der von Exon v6 kodierten Aminosäuren und die transmembrane Domäne ausreichend. Entfernt man den zytoplasmatischen Teil, so ist eine Aktivierung von c-Met noch immer möglich, die Signaltransduktion zu ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, MAP-Kinase) wird hingegen blockiert (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002). Eine Aktivierung anderer Komponenten der Signalkaskade, die c-Met auf direktem Wege binden, wie z.B. das Adapter-Protein Gab1, ist weiterhin möglich. Transfiziert man die zytoplasmatische Domäne als Kompetitor für das endogene CD44 in 293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen), so wird in diesen Zellen die Signaltransduktion ebenfalls blockiert (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002). Offensichtlich müssen für eine Übermittlung des Signals Proteine an den zytoplasmatischen Teil von CD44 binden. Potentielle Kandidaten sind die Proteine der ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Familie. Alle Proteine dieser Familie sind in der Lage über ihren N-Terminus an die zytoplasmatische Domäne von CD44 und über ihren C-Terminus an F-Aktin zu binden (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003). Einen weiteren Hinweis auf die potentielle Beteiligung der ERM-Proteine an der Signalübertragung erhielt man aus einem Konkurrenzexperiment. Wird die zytoplasmatischen Domäne von CD44

mit einer Punktmutation in der ERM-Bindestelle in 293 Zellen überexprimiert, so ist die Weiterleitung des durch HGF/SF-induzierten Signals nicht mehr beeinträchtigt (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002).

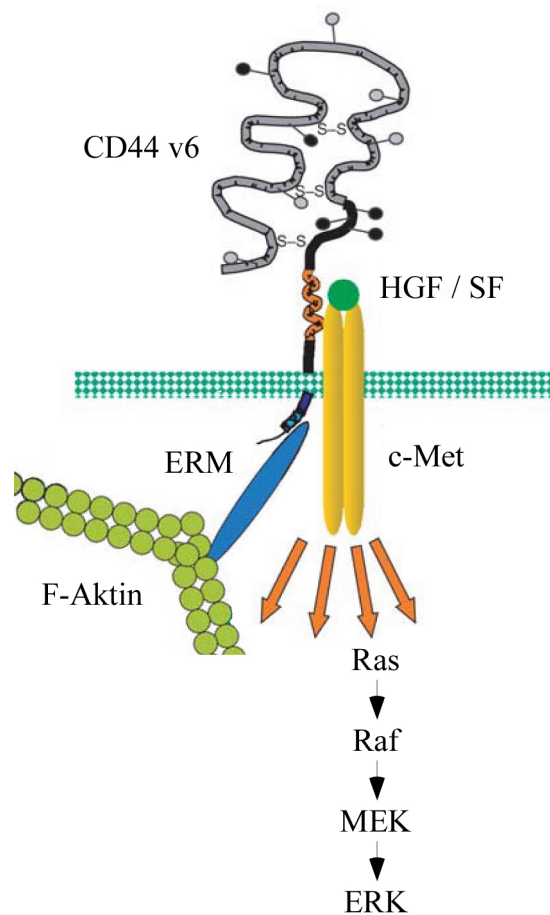


Abbildung 1-3: Modell eines Signalkomplexes, der sich aus c-Met, CD44 v6 und einem ERM-Protein zusammensetzt. CD44 v6 dient c-Met als Ko-Rezeptor für die Aktivierung durch HGF/SF. Für die Weiterleitung des von c-Met ausgehenden Signals bis ERK ist vermutlich eine Bindung des ERM-Proteins an die zytoplasmatische Domäne von CD44 und an F-Aktin erforderlich. (Verändert nach MARHABA *et al.*, 2004)

Die Abfolge von Aminosäuren in v6, die für die Aktivierung von c-Met benötigt werden, wurde mit Hilfe der *linker-scan*-Methode als EWQ bei der Ratte und RWH beim Menschen identifiziert. Peptide mit diesen Aminosäuresequenzen blockieren eine Aktivierung von c-Met und der nachfolgenden Signalkaskade (MATZKE *et al.*, 2005).

1.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) c-Met

1.4.1 Struktur von c-Met

Die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) c-Met, wird zunächst als Vorläufer-Form synthetisiert und muss durch Furin zwischen Aminosäure 307 und 308 proteolytisch gespalten werden. In seiner aktiven Form besteht c-Met aus einer kurzen extrazellulären α -Kette und einer langen β -Kette, die eine helikale transmembrane Domäne beinhaltet (**Abb. 1-4A und B**). Die α - und β -Aminosäureketten werden durch eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden. Der zytoplasmatische Teil des Proteins besteht aus der membranständigen Domäne, der Kinase-Domäne und der karboxy-terminalen Region, welche für die Signalübertragung verantwortlich ist (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003). Die α -Kette und die ersten 212 Aminosäure-Reste der β -Kette sind für die Bindung des Liganden HGF/SF (*hepatocyte-growth factor/scatter factor*) ausreichend (GHERARDI *et al.*, 2003). Diese Region wird auch als Sema-Domäne bezeichnet, da sie Homologien zur Sema-Domäne der Semaphorine aufweist (**Abb. 1-4A**). Der übrige Teil der Ektodomäne besteht aus einer kleinen Cystein-reichen Domäne gefolgt von vier Immunoglobulin-Domänen (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003) (**Abb. 1-4A**).

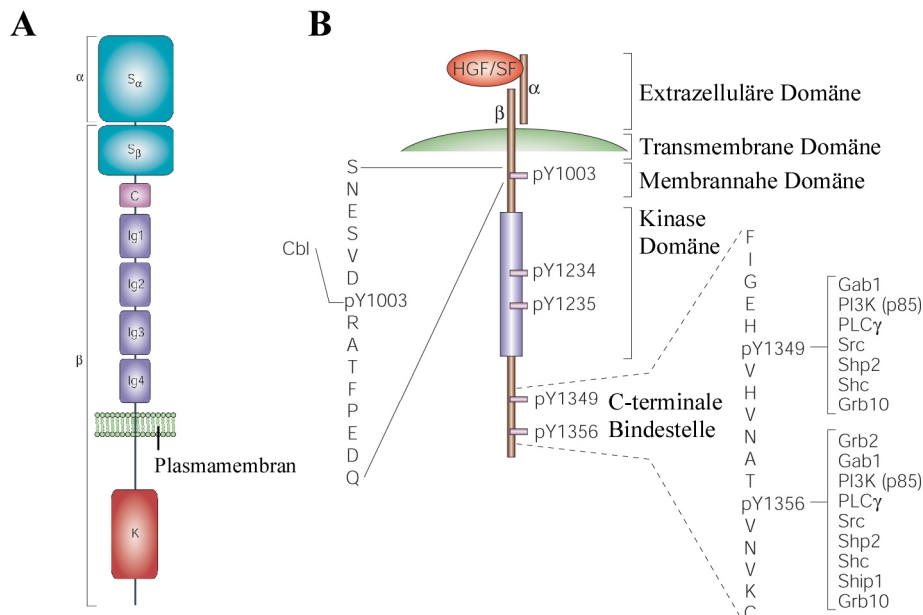


Abbildung 1-4: **A:** Die Domänen des c-Met-Proteins. S, Sema-Domäne. C, Cystein-reiche Domäne. Ig, Immunoglobulin Domänen. K, Kinase-Domäne. α und β bezeichnen die Aminosäure-Ketten, welche nach der proteolytischen Spaltung der einzelkettigen Vorläufer-Form entstehen. **B:** Proteinstruktur und Substrat-Bindestellen von c-Met. (Verändert nach BIRCHMEIER *et al.*, 2003)

1.4.2 HGF/SF - Der Ligand von c-Met

Der Ligand der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Met ist HGF/SF (*hepatocyte-growth factor/scatter factor*) (BOTTARO *et al.*, 1991), der aus sechs Domänen besteht (**Abb. 1-5**). Die aktive Form enthält zwei Aminosäureketten (α und β), die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Die lange α -Kette setzt sich aus einer amino-terminalen Domäne und vier Kringle-Domänen zusammen (**Abb. 1-5**). Die Rezeptorbindestelle befindet sich im Bereich der amino-terminalen Domäne und der ersten Kringle-Domäne und wird kurz als NK1-Domäne bezeichnet (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003). Die kurze β -Kette besteht aus einer Serine-Protease-Homologie-Domäne (SPH) (**Abb. 1-5**), welcher, aufgrund von Mutationen in essentiellen Aminosäurereste, die enzymatische Aktivität fehlt (SCHMIDT *et al.*, 1997). HGF/SF wird als einzelkettige inaktive Vorläufer-Form (pro-HGF/SF) synthetisiert, welche proteolytisch in ein aktives Dimer gespalten wird. Die Konvertierung des pro-HGF/SF erfolgt durch verschiedene Serin-Proteinasen, wie beispielsweise den Plasminogen Aktivatoren uPA (*urokinase plasminogen activator*) und tPA (*tissue-type plasminogen activator*). Weitere bekannte HGF/SF-Aktivatoren sind die *coagulation factors X, XI und XII* (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003).

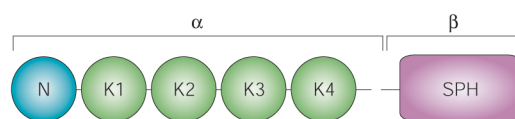


Abbildung 1-5: Struktur von HGF/SF (*hepatocyte growth factor/scatter factor*). N, amino-terminale Domäne. K1-K4 stellen die Kringle-Domänen 1-4 dar. SPH, Serin-Proteinase-Homologie Domäne. α und β bezeichnen die Aminosäure-Ketten, welche nach der proteolytischen Spaltung des einzelkettigen pro-HGF/SF entstehen. (aus Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003)

1.4.3 Mechanismus der Aktivierung von c-Met

Bei der Aktivierung des c-Met-Rezeptors durch Bindung von HGF/SF kommt es zur Phosphorylierung mehrerer Aminosäurereste in der intrazellulären Domäne von c-Met. Durch die Bindung des Liganden kommt es zunächst zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste Y1234 und Y1235 in der Kinase-Domäne. Dies führt zur Aktivierung der intrinsischen Kinase-Aktivität des

Moleküls und es folgen weitere Phosphorylierungsereignisse. Dabei werden die Tyrosin-Reste Y1349 und Y1356 nahe dem C-terminalen Ende und Y1003, welches sich in der membrannahen Domäne von c-Met befindet, phosphoryliert. Y1349 und Y1356 dienen mit den umgebenden Aminosäuren als Andockstation für weitere Proteine (PONZETTO *et al.*, 1994) und können im phosphorylierten Zustand beispielsweise Gab1, Grb2 oder PI3K aber auch andere Moleküle binden (PONZETTO *et al.*, 1994, WEIDNER *et al.*, 1996 und LOCK *et al.*, 2000) (**Abb. 1-4B**).

Das Y1003 in der membrannahen Domäne von c-Met spielt bei der negativen Regulation eine Rolle (STOKER *et al.*, 1987) (**Abb. 1-4B**). Die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl bindet an das phosphorylierte Y1003 und führt zur Ubiquitinierung, Endozytose, Transport zu den Endosomen und schließlich zur Degradation des c-Met-Rezeptors (JEFFERS *et al.*, 1997, PESCHARD *et al.*, 2001 und HAMMOND *et al.*, 2001). Cbl kann auch über das Adapter-Protein Grb2 indirekt an c-Met binden (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003).

1.4.4 Die Funktionen von HGF/SF und c-Met

In verschiedenen Zelltypen können Signale von HGF/SF und c-Met Proliferation und anti-apoptotische Antworten induzieren (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003). Bei epithelialen Zellen lässt sich auf die Aktivierung von c-Met ein sogenanntes "*scattering*" beobachten. Dabei kommt es durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zur Vereinzelung der Zellen und zu erhöhter Motilität (Übersichtsartikel THIERY *et al.*, 2002). Auch in der Embryogenese wird die Motilität von Zellen durch HGF/SF und c-Met reguliert. In Mäusen führt der Verlust von HGF/SF oder c-Met zum Fehlen der Muskelgruppen, welche aus Skelettmuskel-Vorläuferzellen entstehen (BLADT *et al.*, 1995). Die Ursache dafür ist, dass aufgrund des Ausbleibens der EMT die Zellen im Dermomyotome verbleiben (DIETRICH *et al.*, 1999). Bei der Auswanderung von Zellen aus primären Tumoren und der Bildung von Metastasen kommt es zur Aktivierung derselben Mechanismen (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003).

Der beim "*scattering*" beobachtete Abbau von Adhäsions-Verbindungen, die Ausbreitung der Zellen und ihre erhöhte Motilität, sind abhängig vom ERK/MAPK- und dem PI3K-Signalweg (POTEMPA *et al.*, 1998). Die Gab1-Shp2-ERK/MAPK Signalkaskade reguliert ETS/AP1 Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmoleküle, welche die Zellproliferation, Zellverbindungen und die Motilität kontrollieren (WEIDNER *et al.*, 1996, LOCK *et al.*, 2000, MAROUN *et al.*, 1999, SCHAEFER *et*

al., 2000, HARTMANN *et al.*, 1994, RIDLEY *et al.*, 1995, KHWAJA *et al.*, 1998 und PAUMELLE *et al.*, 2002). c-Met ist ebenso in der Lage einen Signalweg mit den Komponenten Ras, Rac1 und PAK zu aktivieren, welcher für die Umorganisation des Zytoskeletts und von Zell-Adhäsionsverbindungen verantwortlich ist (RIDLEY *et al.*, 1995 und, ROYAL *et al.*, 2000).

1.4.5 Interaktionen von c-Met mit Proteinen an der Plasmamembran

An der Plasmamembran ist c-Met auch in der Lage mit CD44, β_4 -Integrin, Ezrin, dem Fas-Rezeptor, Semaphorin-Rezeptoren oder E-Cadherin zu interagieren und Signalplattformen zu bilden (CREPALDI *et al.*, 1997, TRUSOLINO *et al.*, 2001, GIORDANO *et al.*, 2002, ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002, und WANG *et al.*, 2002). Die Bildung solcher Signalplattformen soll eine Lokalisation von c-Met an bestimmten Orten der Membran oder eine Clusterbildung mit spezifischen Substraten ermöglichen (Übersichtsartikel BIRCHMEIER *et al.*, 2003).

1.5 Die ERM (Ezrin-Radixin-Moesin)-Protein Familie

1.5.1 Bindung der ERM-Proteine an CD44

Die ERM (Ezrin-Radixin-Moesin)-Proteine sind ebenso wie Ankyrin in der Lage CD44 mit dem Zytoskelett zu verbinden. Eine Komplexbildung und Koloalisation der ERM-Proteine mit CD44 wurde nachgewiesen. CD44 war das erste ERM-bindende Membran-Protein (ERMBMP, *ERM binding membrane protein*), das identifiziert wurde (TSUKITA *et al.*, 1994). Die Bindestelle für ERM-Proteine befindet sich zwischen der Ankyrin-Bindestelle und der Transmembranregion und besteht aus einer Sequenz (Aminosäure 292-300) basischer Aminosäuren (LEGG *et al.*, 1998). Die Proteine der ERM-Familie setzen sich aus der hoch konservierten N-terminalen FERM (*four.one Protein, Ezrin, Radixin, Moesin*)-Domäne (auch N-ERMAD für **N-ERM associated domain**), einer α -helikalen Domäne und der C-terminalen C-ERMAD (**C-ERM associated domain**) zusammen (**Abb. 1-6**). In Ezrin und Radixin findet sich zwischen der α -helikalen Domäne und der C-ERMAD eine Abfolge mehrerer Prolin-Reste (**Abb. 1-6**) (Übersichtsartikel LOUVET-VALLÉE *et al.*, 2000). Während die ERM-Proteine mit ihrer N-terminalen Domäne mit CD44 interagieren, bindet die C-

Einleitung

terminalen Domäne an Aktinfilamente (YONEMURA *et al.*, 1998). Die F-Aktin-Bindestelle von Ezrin wurde innerhalb der letzten 34 Aminosäuren der C-terminalen Domäne identifiziert (TURUNEN *et al.*, 1994).

Ein naher Verwandter der ERM-Proteine ist der Tumor-Suppressor Merlin (für *moesin-ezrin-radixin-like-protein* / *Neurofibromatosis Type 2* / Schwannomin). In der FERM-Domäne von Merlin beträgt die Sequenz-Homologie mit Ezrin 62% (TAKEUCHI *et al.*, 1994) (Abb. 1-6). Merlin bindet mit seiner N-terminalen Domäne an die ERM-Protein-Bindestelle in CD44, besitzt aber keine Aktin-Bindestelle in der C-terminalen Domäne.

Aufgrund von Sequenzhomologien mit der N-terminalen FERM -Domäne des Erythrozyten-Membran-Protein Band 4.1 (Abb. 1-6), zählt man die ERM-Proteine und auch Merlin zur der Band 4.1 Superfamilie (CHISHTI *et al.*, 1998). Neben den bereits erwähnten, zählt man auch Talin, die PTPH (Protein Tyrosin Phosphatase)-Familie, NLB4 und NLB5 zur Band 4.1 Superfamilie. Die Klassifizierung dieser Proteine erfolgte durch Sequenzvergleiche (TAKEUCHI *et al.*, 1994).

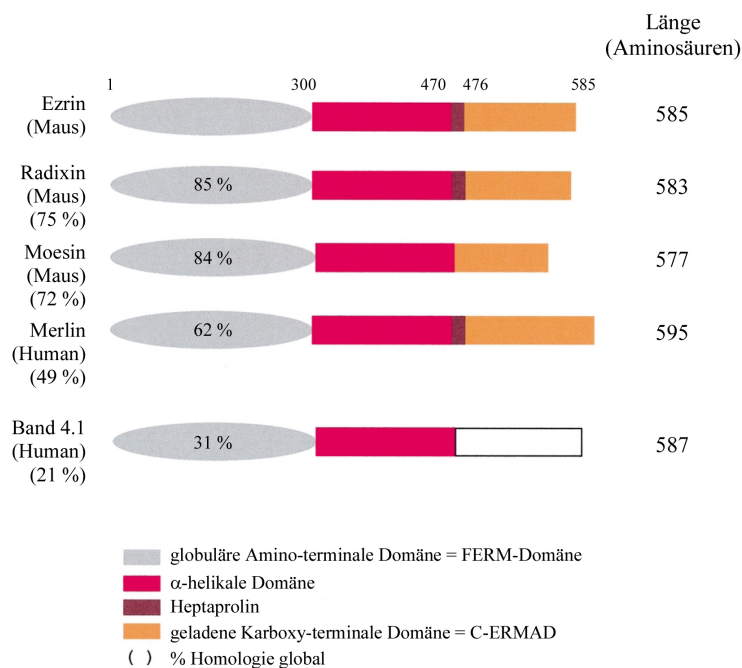


Abbildung 1-6: Vergleich der Proteinstruktur von Ezrin, Radixin, Moesin, Merlin und Band 4.1. (Verändert nach LOUVET-VALLÉE *et al.*, 2000)

1.5.2 Die Aktivitätszustände der ERM-Proteine

In Zellen ist nur ein Teil der ERM-Proteine an der Membran lokalisiert und an Interaktionen zwischen Zytoskelett und Plasmamembran beteiligt. Die restlichen Proteine befinden sich frei im Zytoplasma der Zelle. ERM-Proteine kommen in einer inaktiven und einer aktiven Form vor. Der Aktivitätszustand des Proteins ist abhängig von seiner Konformation. Dabei spielen zwei Domänen eine Rolle, die sowohl an den inter- wie auch an intramolekularen Wechselwirkungen beteiligt sind. Die N-ERMAD, auch FERM Domäne genannt, kann intramolekular mit der C-terminalen C-ERMAD interagieren (BRETSCHER *et al.*, 1995) (**Abb. 1-7**). Dadurch werden die Bindestellen für die Membranproteine und für das Zytoskelett maskiert. Durch Phosphorylierung kommt es zur Auflösung der intramolekularen Bindung und das Protein wird in den aktiven Zustand versetzt, in welchem beide Bindestellen für Interaktionspartner frei zugänglich sind (Übersichtsartikel LOUVET-VALLÉE *et al.*, 2000).

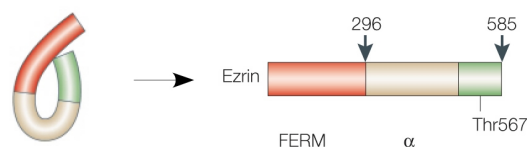


Abbildung 1-7: Proteinstruktur und Aktivierungszustände von Ezrin. Die FERM-Domäne und die C-terminale Domäne, welche die F-Aktin-Bindestelle enthält, werden durch die α -Domäne voneinander getrennt. Die Phosphorylierung von T567 führt zu einer Aufhebung der Interaktion zwischen FERM- und C-terminaler Domäne und konvertiert das inaktive Protein (links) in den aktiven Zustand (rechts). (Verändert nach PONTA *et al.*, 2003).

Bei Ezrin führt die Phosphorylierung des Threonin T567 zur Dissoziation der C-ERMAD von der FERM-Domäne und zur Konvertierung des Proteins in seinen aktiven Zustand (MATSUI *et al.*, 1998) (**Abb. 1-7**). Es sind drei Kinasen bekannt, die T567 *in vivo* und *in vitro* phosphorylieren können: Rho Kinase (MATSUI *et al.*, 1998, und TRAN QUANG *et al.*, 2000), Protein Kinase C α (PKC α) (NG *et al.*, 2001) und PKC θ (PIETROMONACO *et al.*, 1998 und SIMONS *et al.*, 1998).

Zudem werden Lipide, wie das Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂), offensichtlich dafür benötigt, die Aktin-Bindestelle *in vitro* zu demaskieren (YONEMURA *et al.*, 1998), während sie für die Bindung an CD44 nicht notwendig sind (NAKAMURA *et al.*, 1999).

Eine N-terminale Phosphorylierung der Tyrosin-Reste Y145 und Y353 kann durch EGFR

(*epidermal growth factor receptor*) erfolgen (KRIEG *et al.*, 1992). Die Phosphorylierung dieser Tyrosin-Reste ist auch für die HGF/SF-induzierte Bildung tubulärer Strukturen durch LLC-PK1-Zellen erforderlich, welche unter bestimmten Kulturbedingungen stattfindet (CREPALDI *et al.*, 1997). Die PKC ist nicht nur in der Lage die ERM-Proteine zu aktivieren, sondern kann ebenso eine Phosphatgruppe von S325 auf S291 innerhalb des CD44-Proteins übertragen. Dadurch wird die Bindung zwischen CD44 und Ezrin *in vivo* moduliert. Die Phosphorylierung von S291 führt zur Dissoziation von Ezrin. Für die CD44-vermittelte gerichtete Zellbewegung ist die Phosphorylierung von S291 essentiell (LEGG *et al.*, 2002).

1.6 Expressionsmuster von CD44

CD44s wird in Vertebraten während der Entwicklung und im adulten Organismus ubiquitär exprimiert. Dagegen konnten variante Isoformen nur in einigen epithelialen Geweben, hauptsächlich in proliferierenden Zellen, und in Krebszellen nachgewiesen werden. In Keratinozyten finden sich beispielsweise die Isoformen CD44v3-10 und CD44v1-10. In Zellen eines Pankreas-Karzinoms der Ratte wurde unter anderem die Variante CD44v4-7 isoliert. Die kürzere Isoform CD44v5 wird in aktivierten T-Zellen exprimiert (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003).

Ab Tag 9,5 der Embryogenese ist die Standard-Isoform CD44s ubiquitär vorherrschend. Es sind aber auch längere Varianten aktiv, welche offenbar an der normalen Entwicklung beteiligt sind. Da variante Isoformen ein differenzierteres hoch-organisiertes Expressionsmuster aufweisen, geht man von einer wichtigen Rolle der varianten Isoformen in der Embryogenese, der Musterbildung und der Hämatopoese aus (Übersichtsartikel RUIZ *et al.*, 1995). Beispielsweise werden v6-enthaltende Isoformen in neugeborenen Ratten nur in proliferierenden motilen Zellen exprimiert (WIRTH *et al.*, 1993). Eine Expression wurde in der basalen Schicht der Epidermis, den Haarfollikeln und in der unteren Region der Darmmukosa-Krypten detektiert. An diesen Orten bleibt die Expression auch im Erwachsenenalter bestehen, während sie in den duktalem Epithelien der Pankreasdrüsen auf Neugeborenen beschränkt ist (WIRTH *et al.*, 1993). In 10 Wochen alten menschlichen Föten ist die Expression von v6-enthaltende Isoformen auf Epidermis und Trachea beschränkt. v9-enthaltenden Isoformen wurden hingegen in der Epidermis, der Trachea, der Schilddrüse und den Drüsen des Meso- und Paranephros detektiert (TERPE *et al.*, 1994). Die Expression von varianten Isoformen

konnte bereits an Tag 6,5 der Embryogenese im Eizylinder nachgewiesen werden (Übersichtsartikel RUIZ *et al.*, 1995).

Während kritischer Phasen der Organogenese konnte eine deutlich erhöhte Expression von CD44 im Herzen, in den Somiten und im kondensierenden Mesenchym der Extremitätenknospen beobachtet werden. Es ist bekannt, dass der Hauptligand von CD44, Hyaluronsäure (HA), in diesen Regionen morphogene Ereignisse vermittelt. Man fand aber auch Orte mit hoher Expression von CD44, in denen HA keine bekannte Aufgabe erfüllt. Daher scheint die Expression von CD44 nicht notwendigerweise mit der Lokalisation von HA zu korrelieren (WHEATLEY *et al.*, 1993).

1.7 Die Funktionen von CD44

Die meisten Informationen über die Funktionen der CD44-Proteine erhielt man aus Hemm-Experimenten. Dabei kamen sowohl pan-CD44 Antikörper, die sämtliche Isoformen erkennen, als auch Varianten-spezifische Antikörper zum Einsatz. CD44 spielt in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle, wie etwa der Organogenese, der Steuerung neuraler Axone, der Hämatopoese und bei verschiedenen Funktionen des Immunsystems (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003). Weitere Informationen über die Funktion der CD44-Proteine erhielt man aus Inaktivierungsstudien in Mäusen, deren Ergebnisse in Kapitel 1.8 ausführlich dargestellt werden.

1.7.1 Die Rolle von CD44 in der Embryogenese

Eine Funktion von CD44 betrifft die korrekte Entstehung des Chiasma opticum (Sehnervkreuzung). Die ersten retinalen Ganglien, welche das embryonale ventrale Diencephalon der Maus erreichen, treffen auf eine neuronale, invertiert-V-förmige Struktur, welche die Mittellinie sowie die posteriore Grenze des zukünftigen Chiasma opticum definiert. Diese Neurone exprimieren das Adhäsionsmolekül L1, welches das Auswachsen retinaler Axone fördert, sowie CD44, welches *in vitro* das Wachstum embryonaler retinaler Axone inhibiert. Die retinalen Axone dringen nicht in diese L1/CD44-exprimierende neuronale Struktur ein, sondern bilden das charakteristische X-förmige Chiasma opticum entlang deren anterioren Grenze aus. Durch ihre Wachstums-fördernde

bzw. Wachstums-inhibierende Wirkung auf die retinalen Axone, scheint die Ko-Expression von L1 und CD44 den weiteren Weg des Axon-Auswuchses zu definieren (SRETAVAN *et al.*, 1994).

Einen wichtigen Hinweis auf die Funktion von CD44-Isoformen während der Embryogenese fand man bei der Entwicklung der Extremitäten. So wurde gezeigt, dass ein Antikörper gegen die v3-Variante den Auswuchs der Extremitäten verhindert. Während der Entwicklung der Extremitäten wird CD44 in Randleistenzellen (*apical ectodermal ridge*) exprimiert, wo es als Ko-Rezeptor für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (FGFR) dient, die auf den darunterliegenden mesenchymalen Zellen lokalisiert sind. Die Ko-Rezeptor-Funktion ist dabei von der Heparan-Sulfat-Bindestelle von CD44 abhängig, die durch Exon v3 kodiert wird (SHERMAN *et al.*, 1998).

1.7.2 Die Rolle von CD44 bei der Krebsentstehung / Metastasierung

CD44-Proteine spielen bei unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie der Regulation von Wachstum, Überleben von Zellen, Differenzierung und Motilität eine wichtige Rolle. Eine Veränderung der Expression oder eine Fehlfunktion kann zu verschiedenen pathologischen Situationen führen, die letztendlich in Krebs und Metastasierung münden können (Übersichtsartikel NAOR *et al.*, 1997 und PONTA *et al.*, 2003).

Beim Streuen von Tumor-Zellen ist unter anderem die Spleiß-Variante CD44v4-7 involviert. CD44-Varianten werden auch in vielen humanen Tumoren exprimiert. Abhängig von der Art des Tumors kann eine Expression von CD44-Varianten oder deren Verlust mit einer schlechten Prognose korrelieren. CD44 ist aber auch in der Lage die Metastasierung zu supprimieren (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003). Bei einer Expression der Standard-Isoform CD44s in hochmetastatischen AT3.1 Prostatazellen der Ratte, wurde die Bildung von Metastasen in der Lunge supprimiert, wobei das Zellwachstum oder das Potenzial zur Tumorgenese *in vivo* nicht beeinflusst waren. CD44 ist daher ein Suppressor für die Metastasierung beim Prostatakarzinom (GAO *et al.*, 1997).

In den meisten Krebsarten ist die veränderte CD44-Expression nicht auf Mutationen im CD44-Gen zurückzuführen. Vielmehr wird die Expression von CD44 in Krebszellen durch Gene kontrolliert, die auch an der Tumorgenese beteiligt sind. Beispielsweise wird alternatives Spleißen durch mitogene Signale ausgelöst, an denen auch die Ras-MAPK Signalkaskade beteiligt sein kann. Zusätzlich kommt es in zahlreichen Krebsarten zu Mutationen, die den Verlust verschiedener

Untergruppen des SWI/SNF Chromatin-Umformungskomplexes zu Folge haben, was wiederum zum Verlust der Expression von CD44 führt. Daher ist die Expression von CD44 auf äußerst komplexe Art und Weise mit genetischen Veränderungen verbunden, die zu Tumorwachstum und Metastasierung führen (Übersichtsartikel PONTA *et al.*, 2003).

1.8 CD44 Inaktivierungen

Aufgrund der offenbar essentiellen Funktion von CD44-Isoformen während der Entwicklung, könnte man folgern, dass eine Inaktivierung von CD44, durch blockierende Antikörper oder einen Gen-Knockout, einen Abbruch der Embryogenese in einer frühen Phase oder ähnlich drastische Auswirkung zur Folge haben könnte. Die Phänotypen von drei wichtigen CD44-Knockouts sollen deshalb im Folgenden beschrieben und verglichen werden.

1.8.1 Die "klassischen" Knockouts - Ein Inaktivierung durch Zerstörung der Gen-Struktur

1.8.1.1 Inaktivierung durch Substitution von Exon 2 und 3 (SCHMITS *et al.*, 1997)

Zur Inaktivierung des CD44-Gens wurde ein Teil von Exon 2 und das komplette Exon 3 durch ein *Neomycin*-Restistenzgen ersetzt. Das *Neomycin*-Restistenzgen wurde als *antisense* Sequenz eingesetzt, so dass in allen Leserastern des CD44-Gens STOP-Kodons entstanden, welche die Translation vorzeitig terminieren.

Phänotyp:

Homozygote CD44^{-/-} Mäuse wurden in mendelschem Verhältnis geboren, zeigten normale Überlebensraten sowie normales Wachstum. Die Fortpflanzungsfähigkeit war ebenfalls nicht beeinflusst.

Veränderungen fand man im hämatopoetischen System der Tiere. In Milz und peripherem Blut war die Gesamtzahl der pluripotenten Blutstammzellen (CFU, *Colony forming units*) niedriger als beim Wildtyp. In der Milz war die Anzahl der CFU-GM (Granulozyten- und Makrophagen-bildende

Stammzellen) und der CFU-M (Makrophagen-bildende Stammzellen) erniedrigt. Interessanterweise war hingegen im Knochenmark die Gesamtzahl der Kolonien und die Anzahl der CFU-GM erhöht. Dies weist darauf hin, dass CD44 eine wichtige Rolle beim Auswandern der CFU-GM aus dem Knochenmark zukommt.

Einen Hinweis auf einen Defekt in der Immunantwort erhielt man aus einem Experiment, bei dem Mäuse mit dem intrazellulären Parasiten *Cryptosporidium parvum* infiziert wurden. Auf eine Infektion mit *C. parvum* kommt es im infizierten Gewebe zur Bildung von Granulomen. Bei CD44^{-/-} war die Anzahl der gebildeten Granulomen um das 1,71-fache höher als bei Wildtyp-Mäusen. Zudem waren die Granulome größer.

Einen interessanten Aspekt fand man, als man die potenzielle Rolle von CD44 bei der malignen Entartung von Zellen untersuchte. Primäre Fibroblasten wurden mit dem großen SV40-T-Antigen transformiert und subkutan in Mäuse injiziert. Das große SV40-T-Antigen stammt aus dem Genom des *simian virus 40* (SV40), einem Tumor-induzierenden Papovavirus. Auf die Injektion der transformierten Fibroblasten bildeten sich in CD44^{-/-} Mäusen große subkutane Tumore. Tumore in CD44^{+/+} Mäusen waren kleiner. Nach einer Transfektion der CD44^{-/-} Fibroblasten mit CD44s cDNA und anschließender subkutaner Injektion wurde eine deutlichen Reduktion im Tumorwachstum beobachtet.

Interessanterweise konnte in denselben CD44-Knockout-Mäusen ebenfalls eine Tumor-fördernde Rolle von CD44 abgeleitet werden: Wurden dieselben CD44^{-/-} Mäuse mit Mäusen gekreuzt, welche die gezielte Mutation 1 (*targeted mutation 1, tm1*) von *p53* (*p53^{+/tm1}*) trugen, so entwickelten sich gutartige Osteosarkome, während die Kontrolltiere bösartige Tumore ausbildeten (WEBER *et al.*, 2002).

1.8.1.2 Inaktivierung durch Insertion einer *LacZ/Neo*-Kassette in das Leader-Peptid (PROTIN *et al.*, 1999)

Bei dieser Inaktivierung wurde das *Leader*-Peptid durch eine im Leseraster direkt nach dem ATG eingefügten *LacZ/Neo*-Kassette zerstört.

Phänotyp:

Homozygote CD44^{-/-} Mäuse waren gesund, fortpflanzungsfähig und wurden in mendelschem Verhältnis geboren.

Umfangreiche Untersuchungen der Rolle von CD44 in der Entwicklung, der Differenzierung und bei der Ausbildung spezifischer Zelltypen und Geweben während der Embryogenese wurden durchgeführt.

Die Analyse des Phänotyps brachte eine fehlende CD25⁺ Population bei CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aus dem Thymus von E16.5 - E17.5 Föten hervor. Zudem wurde beobachtet, dass 10-20 mal weniger CD44^{-/-} Lymphozyten in den Thymus zurückwanderten als CD44^{+/+} Lymphozyten. Dieses Ergebnis bestätigte die wichtige Rolle von CD44 bei der Wanderung von Lymphozyten.

1.8.1.3 Zusammenfassung der "klassischen" Inaktivierungen

Fasst man die beiden "klassischen" Knockouts zusammen, so stellt man fest, dass der Verlust der Expression von CD44 nur geringe Auswirkungen auf den Organismus hat. Das ist insoweit erstaunlich, als CD44 an der Entwicklung wichtiger Organe und der Extremitäten beteiligt zu sein scheint.

Neben den Inaktivierungen, die auf der Zerstörung der CD44-Genstruktur basieren, existiert auch ein transgener "konditioneller" CD44-Knockout. Eine Beschreibung erfolgt im folgenden Kapitel.

1.8.2 Transgener Knockout durch *antisense*-RNA (KAYA *et al.*, 1997)

Bei diesem Knockout sollte die Rolle von CD44 bei der Entwicklung der Haut sowie bei verschiedenen anderen Vorgängen in der Haut untersucht werden. Manche Prozesse, wie Wundheilung, Neugestaltung von Geweben und Entzündungsreaktionen sind möglicherweise mit der Produktion von HA assoziiert und schließen Interaktionen zwischen CD44 und HA ein. Um die physiologische Rolle von CD44 in der Haut zu bestimmen, wurden transgene Mäuse mit einer Keratinozyten-spezifischen Inaktivierung von CD44 generiert.

Das verwendete Transgen K5p-mCD44AS bestand aus einer *antisense* mCD44s + poly A, welche sich unter der Kontrolle des bovinen Keratin 5 (K5) Promotors befand. Eine Expression der CD44-

antisense-RNA führt zur Bildung von RNA-Hybriden mit der komplementären CD44-mRNA, welche durch einen zelleigenen Kontrollmechanismus abgebaut werden. Diese Inaktivierung ist auf Keratinozyten beschränkt, da die Expression der *antisense*-RNA unter der Kontrolle des Keratinozyten-spezifischen K5-Promotors steht. Der K5-Promotor ist ab Tag 10,5 der Embryonalentwicklung in den basalen Zellräumen der geschichteten Squamosa-Epithelien und in Zellen der äußeren epithelialen Haarwurzelscheide (*outer root sheath*, ORS) aktiv.

Bei einem Knockout, der auf einer transgen induzierten *antisense*-RNA basiert, findet man selten eine komplette Unterdrückung der Gen-Expression. Die Ursache dafür liegt in der ektopischen Insertion des Transgens und in dem Mechanismus, welcher der Inaktivierung zugrunde liegt. Um in einem Tier eine komplette Unterdrückung der CD44-Expression ausfindig zu machen, müssen daher zahlreiche transgene Mäuse untersucht werden.

Zunächst war es notwendig nach Tieren mit inseriertem Transgen zu suchen. Durch eine Southern Blot-Analyse der Schwanz-DNA wurde bei insgesamt fünf Mäusen bis zu 40 Kopien des Transgens nachgewiesen. Mittels einer RT-PCR konnte bei allen fünf die Expression der *antisense*-RNA nachgewiesen werden. Bei zwei der fünf Mäuse wurden mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in Schnitten durch die dorsale Haut der Verlust der CD44-Expression in Epidermis und ORS bestätigt. Nach Kreuzungen der transgenen Mäuse mit C57BL/6 Mäusen wurde bei 24 der 36 Nachkommen der F1-Generation durch Southern Blot-Analyse das Transgen nachgewiesen.

Bei der Analyse des Knockouts wurden phänotypische Veränderungen beobachtet, wie sie bei den "klassischen" Inaktivierung nicht vorkamen.

Phänotyp:

Die Mäuse wurden im mendelschem Verhältnis geboren und waren fortpflanzungsfähig.

Der beobachtete Phänotyp war abhängig vom Alter der Tiere. Bei Neugeborenen fand man keine Veränderungen. Nach drei Wochen wiesen die Keratinozyten der Basalmembran erste Veränderungen auf. Das gesamte Ausmaß des Phänotyps wurde erst nach Ablauf von 6 Wochen sichtbar. Die Ausprägung verstärkte sich im Laufe der Entwicklung und wurde bei Tieren älter als 18 Monate am deutlichsten sichtbar.

Bei adulten Mäusen wurde auf eine mechanische Reizung starker Haarausfall beobachtet. Die Regeneration des Fells verzögerte sich deutlich. In der Epidermis und Dermis wurden strukturelle Veränderungen sichtbar. Die Zellen in der basalen Schicht der Dermis waren nicht rund, sondern länglich und die superfaciale Dermis bestand aus einer Ansammlung aus losem Gewebe statt aus

einer dichten Schicht von Kollagen. Die Kollagen-Fasern der Dermis waren unorganisiert und es war eine Ansammlung großer Vakuolen vorhanden. Unterhalb der Basalmembran konnten umfangreiche lückenhafte Bereiche dokumentiert werden. Auch die superficialen Fibroblasten zeigten einen abnormalen Phänotyp. Dabei wurden vergrößerte und konvolute Nuklei, ein stark ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, welches häufig auffallende Erweiterungen aufwies oder von scheinbar leeren Vakuolen begleitet wurde und abnormal lange zytoplasmatische Fortsätze beobachtet.

In der superficialen Dermis und unterhalb des cornealen Epitheliums konnte eine Ansammlung von Hyaluronsäure (HA) nachgewiesen werden. Diese resultierte aus einem Defekt in der Internalisierung von HA durch die Keratinozyten der antisense-CD44 transgenen Mäusen. Die HA-Synthese *per se* war nicht betroffen.

Die transgenen Knockout Mäuse wiesen eine abnormale Haut-Elastizität und Wundheilung auf. Wurde der Haut von Wildtyp-Mäusen Einschnitte zugefügt, blieben diese immer linear, beim Knockout nahmen sie hingegen eine rundliche Form an. Die abnormale Haut-Elastizität resultiert wahrscheinlich aus der beobachteten Ansammlung von HA in der superficialen Dermis (siehe oben). Die Wundheilung war bei den transgenen CD44 Knockout Mäusen deutlich verzögert. Ursache hierfür war die verzögerte Rückbildung der Epithelien, während der normale Ablauf aller anderen Phasen der Wundheilung nicht betroffen war. Nach einer Verwundung war die Proliferationsrate der Keratinozyten geringer als beim Wildtyp.

Auf eine Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-tetradekanoylphorbol-13-Acetat), welcher u.a. die Expression von CD44 induziert, konnte in Keratinozyten auch *in vivo* eine Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. Daraus resultierend war die Fähigkeit der Haut, eine Entzündungsreaktion zu initialisieren, vermindert. Durch eine verringerte Proliferationsrate der Haarfollikel-Keratinozyten verzögerte sich das Wachstum der Haare. Die einzelnen Phasen der Haarentwicklung blieben aber unbeeinflusst.

Um die Auswirkungen des Verlusts der CD44-Expression in der Epidermis auf eine Induktion der Proliferation zu untersuchen, wurde die dorsale Haut von Kontroll- und transgenen Mäusen, bei denen sich der Haar-Zyklus in der Ruhephase befand, mit dem karzinogenen Hydrokarbon DMBA (Dimethylbenz[a]anthracene) behandelt. Diese Behandlung führte bei Wildtyp-Mäusen zu schwerwiegenden Flüssigkeits-absonderenden Läsionen mit Bildung von Geschwüren und zu Haarausfall. In histologischen Untersuchungen wurde eine chronischer Bildung von Geschwüren mit mäßiger bis starker Infiltrierung des betroffenen Gewebes durch Lymphozyten und

Granulozyten sichtbar. Am äußeren Rand des Geschwürs wies die Epidermis eine hyperplastische Veränderung mit vergrößerten Haarfollikeln auf. Bei transgenen Mäusen wurden nur leichtere Wunden beobachtet, welche zudem viel schneller abheilten. Chronische Veränderungen der Haut blieben ganz aus. Auch konnte keine Bildung von Geschwüren oder hyperplastische Veränderungen beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob das beobachtete Ausbleiben der Proliferation in den transgenen Keratinozyten als Antwort auf eine Verletzung, auf TPA und möglicherweise auch auf ein Karzinogen, mit einer Akkumulation von HA in der superficialen Dermis assoziiert ist oder einen primären Defekt widerspiegelt, wurden transgene oder Wildtyp-Keratinozyten mit TPA und HA behandelt. Während bei Wildtyp-Keratinozyten durch TPA und HA eine erhöhte Proliferation induziert werden konnte, veränderte sich die Proliferation der transgenen Keratinozyten durch keiner der beiden Substanzen. Da b-FGF (*basic fibroblast growth factor*) und HB-EGF (*heparan binding epidermal growth factor*) durch Bindung an eine Heparan-Sulfat modifizierte v3-enthaltende Isoform von CD44 ebenfalls Proliferation induzieren, wurden Kontroll- und transgene Keratinozyten mit beiden Wachstumsfaktoren behandelt. Auch hier wurde bei Wildtyp-Keratinozyten eine erhöhte Proliferation registriert, während bei transgenen Keratinozyten keine Proliferation induziert wurde.

1.8.3 Vergleich der Knockouts

Als Folge einer totalen Inaktivierung von CD44 auf genomischer Ebene ("klassische" Knockouts) zeigten sich Veränderungen, die im Wesentlichen das Immunsystem und das hämatopoetische System der Tiere betrafen. Diese waren aber so schwach ausgeprägt, dass die Tiere davon kaum beeinflusst wurden.

Im Keratinozyten-spezifischen transgenen Knockout wurde ein drastischer Haut-Phänotyp beobachtet, dessen Lokalisation sich aus der Spezifität der Inaktivierung ergibt. Dieser Phänotyp konnte in den "klassischen" Inaktivierungen erstaunlicherweise nicht beobachtet werden. Da es sich bei den "klassischen" Knockouts um eine totale Inaktivierung von CD44 handelt, hätte man erwartet diesen Haut-spezifischen Phänotyp ebenfalls zu registrieren.

Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären?

Im Wesentlichen unterscheiden sich der "transgene" von den beiden anderen Knockout-Typen in den

folgenden drei Punkten:

- 1) Die Inaktivierung basiert auf einem anderen Mechanismus (*antisense*-RNA). Die *antisense*-RNA wurde als Transgen inseriert, das endogene CD44-Gen bleibt dabei unverändert.
- 2) Der Knockout ist auf einen Zelltyp, die Keratinozyten, beschränkt.
- 3) Die Inaktivierung wird durch die Aktivierung des K5-Promotors, d.h. an Tag 10.5 der Embryogenese, initiiert. Vor der Aktivierung findet eine normale Entwicklung statt.

Trotz der mechanistischen Unterschiede führten beide Knockout-Arten zu einem Verlust der Expression von CD44. Ein Knockout, der auf einer Zerstörung der Genstruktur basiert, sollte zu einem Verlust der Expression in jeder Zelle, einschließlich Keratinozyten, führen. Eine Inaktivierung von CD44 wurde nicht explizit für Keratinozyten nachgewiesen, kann aber als sicher angenommen werden.

Der Unterschied im Zeitpunkt der Inaktivierung legt nahe, dass es im Fall des "klassischen" Knockouts zur einer Substitution von CD44 gekommen ist. Diese Substitution wäre nur zu einer frühen Phase der Embryogenese möglich und könnte erklären, warum die Auswirkungen bei den "klassischen" Knockouts im Vergleich zum transgenen Knockout so viel milder ausfallen. Ein potentielles Substitutionsmolekül von CD44 müsste in der Lage sein dessen Funktionen in der frühen Embryogenese zu übernehmen. Da in den "klassischen" Knockouts trotzdem ein schwacher Phänotyp registriert wurde, der sich im Immunsystem und im hämatopoetischen System manifestiert (siehe Kapitel **1.8.1.1** und **1.8.1.2**), scheint das potentielle Substitutionsmolekül nicht in der Lage zu sein, CD44 gänzlich zu ersetzen. Zu einer späteren Phase der Embryogenese scheint eine Substitution nicht mehr möglich zu sein, was sich am drastisch ausgeprägten Haut-Phänotyp aus dem Keratinozyten-spezifischen transgenen Knockout zeigt.

Auch aus anderen Experimenten lässt sich auf eine Substitution im Falle der "klassischen" Knockouts schließen. Aus Hemm-Experimenten ergeben sich eindeutige Hinweisen auf eine essentielle Rolle von CD44 während der Embryogenese, die sich im Knockout in ausgeprägten Phänotypen widerspiegeln sollten. Entsprechende phänotypische Ausprägungen konnten aber nicht beobachtet werden.

Für eine Analyse der Funktionen der CD44-Proteine scheinen Inaktivierungen durch eine Keimbahn-Deletion nicht das geeignete Modell darzustellen. Offensichtlich spielt bei der Inaktivierung der Zeitpunkt eine große Rolle. Eine variable induzierbare Inaktivierung sollte daher neuen Aufschluss über die Aufgaben von CD44 und eine mögliche Substitution in einer frühen Phase der Embryogenese geben.

1.9 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation gliedert sich in zwei Teile.

Zum einen soll die Rolle der zyttoplasmatischen Domäne von CD44 v6 und des ERM-Proteins Ezrin bei der Kooperation der Proteine CD44 v6, c-Met und Ezrin bezüglich der Weiterleitung der HGF/SF-induzierten c-Met-Signalkaskade untersucht werden. Hierfür soll ein Fusionsprotein bestehend aus CD44 v6 Δ cyt und Ezrin hergestellt werden, in dem Ezrin direkt an die Transmembran-Domäne von CD44 v6 gekoppelt ist. Um die Funktion von Ezrin im Signalkomplex zu bestimmen soll es auf verschiedene Weise modifiziert werden.

Zum anderen soll eine konditionelle Inaktivierung von CD44 in der Maus etabliert werden, da die existierenden "klassischen" Inaktivierungen nur wenig zur Aufklärung der Funktionen von CD44 in der Embryogenese beitragen konnten. Ziel dieser Dissertation ist es, die endogenen Sequenzen des Gens von CD44 durch solche zu ersetzen, die eine induzierbare, konditionelle Inaktivierung ermöglichen. Die Inaktivierung von CD44 soll durch Deletion von Exon 3 erreicht werden. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung im Leseraster und, daraus resultierend, zu einem frühzeitigen Stopp-Kodon. Die *nonsense*-mRNA wird durch einen Kontrollmechanismus (NMD, *nonsense mediated RNA decay*) noch vor Beginn der Translation abgebaut. Für die Deletion von Exon 3 soll das *Cre-LoxP*-System genutzt werden. Dieses System erlaubt die Deletion eines von LoxP-Sequenzen flankierten DNA-Abschnitts durch die induzierbare Expression des Enzyms *Cre-Rekombinase*.

Der Austausch der endogenen Sequenzen durch mutierte soll über gezielte Mutagenese (Gen-Zielschießen, *gene targeting*) durch homologe Rekombination stattfinden. Dieser Gen-Ersatz soll in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus etabliert werden, da nur diese das Potenzial haben Keimbahnzellen zu bilden, welche für die Etablierung einer stabilen Mauslinie essentiell sind. Man erreicht dies, indem man die veränderten ES-Zellen wieder in einen Embryo transferiert, wo sie dann an der Entwicklung des Tieres teilnehmen. Bei einer Keimbahntransmission kann eine CD44 cko/cko (*conditional knock out*) Mauslinie etabliert werden. Zur Aktivierung des Knockouts werden CD44 cko/cko mit *Cre-Rekombinase*-exprimierenden Mäusen verpaart werden. Bei diesen transgenen Mäusen ist die Expression des Enzyms unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors. Mauslinien mit den passenden Promotoren können aus einem großen Fundus je nach

Anforderung ausgewählt werden. Durch die Kreuzung wird die Inaktivierung von CD44, abhängig von der Aktivität des *Cre-Rekombinase* kontrollierenden Promotors, zeit- und ortsspezifisch induziert. Der resultierende Phänotyp soll anschließend bestimmt werden.

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1. Bezugsquellen für Reagenzien und Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
[α - ³² P] dCTP Tips		GE Healthcare, Piscataway, USA
³⁵ S- Methionin		GE Healthcare, Piscataway, USA
Agarose		PeqLab, Erlangen
Ampicillin	Amp	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
β -Mercaptoethanol		Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau		Serva, Hamburg
bovine serum albimin	BSA	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagle Medium	D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos Modified Eagles Medium - high glucose (Best.-Nr. D6171)	D-MEM-hg	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Desoxyadenosintriphosphat	dATP	Promega, Madison, USA
Desoxycytosintriphosphat	dCTP	Promega, Madison, USA
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP	Promega, Madison, USA
Desoxythymidintriphosphat	dTTP	Promega, Madison, USA
DNA-Längenmarker: 1 kb-Leiter, 100 bp Leiter und Leiter Mix		PeqLab, Erlangen
Esgro® (LIF)	LIF	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA
Fetal Bovine Serum (F7524)	FBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Bovine Serum GOLD	FBS	PAA, Pasching, Österreich
G-418-Sulfat		PAA, Pasching, Österreich
Ganciclovir		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine Typ B, aus Rinderhaut, Pulver, Zellkultur getestet		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine Typ A, aus Schweinehaut, Pulver, Zellkultur getestet		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

HGF, rekombinant human	HGF	R&D Systems, Wiesbaden und von G. VANDE WOUDE, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, Michigan, USA
KnockOut™ D-MEM	KO-D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin		Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine		Invitrogen, Karlsruhe
Mineral-Öl, mouse embryo tested, light oil		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>		Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat Lösung, 100 mM, sterile-filtered, cell culture tested		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
nicht-essentielle Aminosäuren (Best.-Nr. 11140-035)		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Oligonukleotide		MWG-Biotech, Ebersberg und Sigma-Genosys St. Louis, USA, und Metabion, Planegg / Martinsried
Penicillin - Streptomycin		Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Marker: SeeBluePlus 2 prestained protein ladder (4-250 kDa), BenchMark prestained protein ladder (8-180 kDa)		Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserum-Albumin	BSA	Promega, Madison, USA und New England Biolabs, Ipswich, USA
Triton X-100		Sigma, Saint Louis, USA
Trypsin/EDTA 0,05/0,02% solved in PBS		PAN Biotech, Aidenbach

Alle weiteren Chemikalien wurden bei der Firma Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

2.1.2 Bezugsquellen für Enzyme

<i>Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity		Invitrogen, Karlsruhe
Cre-Rekombinase	Cre	New England Biolabs, Ipswich, USA

GoTaq-Polymerase	GoTaq	Promega, Madison, USA
Lysozym		Boehringer, Mannheim
Proteinase K		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Quick-Stick™ Ligase		Bioline, Luckenwalde
Restriktionsendonukleasen		Promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen <i>AccI</i> , <i>BsaI</i> , <i>ApaI</i>		New England Biolabs, Ipswich, USA
Ribonuklease	RNase	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP	Promega, Madison, USA
T4 DNA-Ligase		Promega, Madison, USA

Die meisten Enzyme wurden mit Reaktionspuffern und anderen für die Enzymaktivität benötigten Komponenten geliefert.

2.1.3 Bezugsquellen für Antikörper

<i>Primärantikörper</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Epitop</i>	<i>Firma</i>
Anti-HA (12CA5)	IgG _{2bk} ; monoclonal aus der Maus	Hämagglutinin	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	IgG _{2bk} ; monoklonal aus der Maus	Tyrosin phosphorylierte Proteine	Biomol, Hamburg, Deutschland
Erk1 (K-23): sc-94	IgG ₁ ; polyklonal aus dem Kaninchen	Erk1/2 bei Ratte, Mensch, Maus,	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
hMet (C-12): sc-161	IgG _{2a} ; monoklonal aus der Maus	humanes cMet	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204)	IgG ₁ ; polyklonal aus dem Kaninchen	phosphoryliertes Erk1/2 bei Ratte, Mensch, Maus,	Cell signaling, Beverly, Großbritannien

Sekundärantikörper:

HRP-Mouse IgG	Dako, Hamburg
HRP-Rat IgG	Dako, Hamburg
HRP-Rabbit IgG	Dako, Hamburg

Die Sekundärantikörper wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

2.1.4 Bezugsquellen für Kits

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>
ECL-Detection Kit	GE Healthcare, Piscataway, USA
Prime-It® II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare, Piscataway, USA
TOPO TA Cloning® Kit mit pCRII-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Bezugsquellen für Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Digitaler Fotoapparat	Powershot A620	Canon, Tokio, Japan
Elektroporator für prokaryotische Zellen	<i>E.coli</i> pulser	Biorad, Hemel Hempstead, UK
Elektroporator für eukaryotische Zellen	Gene pulser	Biorad, Hemel Hempstead, UK
Film Imaging Prozessor	M35 X-omat Processor	Kodak GmbH, Stuttgart
Gelelektrophorese-Kammern	OWL	Owl, Portsmouth, USA
Heizblock	1202	Peqlab, Erlangen

Material und Methode

Heizblock mit Schüttler	ThermoMixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungs- ofen, -schüttler	Hybridization Oven/Shaker	GE Healthcare, Piscataway, USA
Inkubator, Zellkultur	Stri-cult 200 Incubator	Labotect, Göttingen
Mehrkanalpipette	Transferpette - 12	Brand, Wertheim
Netzgerät für Elektrophorese	BluePowerPlus	Serva, Heidelberg
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Pipetten	Pipetman	Gilson (Deutschland), Langenfeld
Pipetten	HT	Abimed, Langenfeld
Polyacrylamid- Elektrophorese- (PAGE) -Kammer		Hoefler, San Fransisco/USA
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ-Research	Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
UV-Detektion	Eagle Eye	Stratagene, La Jolla, USA
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Scientific waterbath	Fisher Bioblock scientific, Illkirch, Frankreich
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Wasserbad	T Lauda	Lauda, Lauda-Königshofen
Westernblot Transferkammer		Biorad, Hemel Hempstead, UK
Zentrifuge	Avanti J-20	Beckman, Fullerton, USA
Zentrifuge	HS 18	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Zentrifuge	Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

<i>Name</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten 1 mm	Peqlab, Erlangen
Elektroporationsküvetten 4 mm	Peqlab, Erlangen
Hybond N+, ECL, MP	GE Healthcare, Piscataway, USA
Ilustra MicroSpin S-300 HR Columns	GE Healthcare, Piscataway, USA
Mikrozentrifugenreaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
Plastikpipetten für ES-Zellkultur	TPP, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter	Millipore, Bradford, USA
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturplatten	Corning, Corning, USA

2.1.7 Lösungen, Medien und Puffer

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Denaturierungspuffer (1 Liter)	87,66 g NaCl, 20 g NaOH, H ₂ O _{dest}
Depurinierungspuffer	0,125 M HCl
DNA-Ladepuffer (10 x)	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF
ES-Zell-Medium für CCE ES-Zellen	D-MEM-hg (Fa. Sigma), 15 % FBS (Fa. PAA), 1 % Penicillin-Streptomycin, 3 % L-Glutamin, 1 % Natrium Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
ES-Zell-Medium für E14.1 ES-Zellen	KO-D-MEM (Fa. Invitrogen), 15 % FBS (Fa. Sigma), 1 % Penicillin-Streptomycin, 3 % L-Glutamin, 1 % Natrium Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
ES-Zell-Medium für HM-1 ES-Zellen	DMEM, 15 % FBS (Fa. Sigma), 1 % Penicillin-Streptomycin, 3 % L-Glutamin, 1 % Natrium Pyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

Material und Methode

LB-Medium (Luria Bertani Medium)	171 mM NaCl, 1 % (w/v) Pepton 140, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
LB-Selektivmedium	171 mM NaCl, 1 % (w/v) Pepton 140, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin
Lysispuffer zur Isolation genomischer DNA aus Zellen	50 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K
Mini-Southern Blot Lysis-Puffer	10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 Vol.-% N-Laurylsarcosin
Modifizierter Church und Gilbert Puffer	7% (w/v) SDS, 0.5 M Phosphat-Puffer, pH 7.2, 10 mM EDTA
<i>nested</i> -PCR Lysis-Puffer	1x PCR-Puffer, 1,7 µM SDS, 50 µg/ml Proteinase K, H ₂ O _{dest}
Neutralisationspuffer (1 Liter)	87,66 g NaCl, 60,5 g Tris Base, H ₂ O _{dest}
Restriktionsverdau-Gemisch für Mini-Southern Blot	1x Restriktions-Puffer, 1 mM Spermidine, 100 µg/ml BSA, 10 units Enzym
SOC-Medium	2 % Bakterien-Trypton, 0,5 % Bakterien-Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
SSC (20 x)	3 M NaCl, 300 mM Na ₃ Citrat, pH 7,0
TAE (50 x) pH 7,9	2 M Tris, 100 mM EDTA, 2 M Essigsäure
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA
TELT	50 mM Tris, pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % (v/v) Triton X-100

2.1.8 Verwendete Zelllinien

2.1.8.1 Embryonale Stammzelllinien

<i>Linienbezeichnung</i>	<i>Zelllinienstamm</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CCE	129/SV	Prof. E. WAGNER, IMP, Wien, Österreich
E14.1	129P2/OlaHsd	Dr. A. NEEB, ITG, FZK, Karlsruhe
HM-1	129P2/OlaHsd	Prof. E. WAGNER, IMP, Wien, Österreich

Zur Zusammensetzung der Medien siehe Kapitel **2.1.7 Lösungen und Medien**.

2.1.8.2 Weitere eukaryotische Zelllinien

<i>Linienbezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Kulturmedium</i>	<i>Bezugsquelle</i>
293	humane Nierenzellen	DMEM, 10%FCS	American Tissue Culture Collection, ATCC, Wesel; Deutschland
BSp73AS10 (AS)	Ratten Pankreas-Karzinom	RPMI1640, 10%FCS	
HT29	humanes Colon-Karzinom	DMEM, 10%FCS	erhalten von A. ZWEIBAUM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Frankreich
MEK (<i>Feeder</i>)	Maus Fibroblasten	DMEM, 15 % FBS (Fa. PAA)	Y. PETERSEN, ITG, FZK, Karlsruhe

2.1.9 Plasmide

<i>Name</i>	<i>Klonierungsmethode oder Bezugsquelle</i>
pCD44-cko	CD44 Konstrukt für konditionelle Inaktivierung; pTVFlox-0 mit kurzem CD44 Homologie-Arm (1820 bp) und langem CD44 Homologie-Arm (6624 bp), geflochte <i>Neo</i> -Kassette, LoxP-Sequenz 3' von Exon 3 und <i>TK</i>
pCD44-KO	13,5 kb großes Konstrukt mit 10,7 kb genomischer CD44 Sequenzen und LoxP-Sequenz 3' von Exon 3 (unveröffentlicht, Thérèse TOUCHY, Beaverton, USA)
pCD44v4-7 Δ cyt - Ezrin	pLPCX -Vektor mit der cDNA Sequenz der Fusion CD44 v4-7 Δ cyt - Ezrin (Ratte) VSV-G
pCD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA	pLPCX -Vektor mit der cDNA Sequenz der Fusion CD44 v4-7 Δ cyt - Ezrin (Ratte) VSV-G mit Mutation T567D in Ezrin (dominant aktiv)
pCD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD	pLPCX -Vektor mit der cDNA Sequenz der Fusion CD44 v4-7 Δ cyt - Ezrin (Ratte) VSV-G mit Deletion der letzten 34 Aminosäuren von Ezrin (incl. Aktinbindestelle)
pCDNA 3.1	Klonierungs- und Expressionsvektor der Firma Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA 3.1- Ezrin	Ezrin cDNA aus der Ratte (1,7 kb) in pCDNA 3.1
pCMV- <i>Cre</i>	Unter dem CMV-Promotor <i>Cre-Rekombinase</i> -exprimierender Vektor. Zur Verfügung gestellt von Prof. E. WAGNER, IMP, Wien, Österreich.
pCR II -TOPO	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit der Firma

Invitrogen, Karlsruhe.

pCR II -TOPO CD44 v4-7 Δcyt	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit der cDNA Sequenz von CD44 v4-7 ohne zytoplasmatische Domäne (Δcyt)
pCR II -TOPO CD44 v4-7 Δcyt - Ezrin	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit der cDNA Sequenz der Fusion CD44 v4-7 Δcyt - Ezrin (Ratte) VSV-G
pCR II -TOPO Ezrin	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit der cDNA Sequenz von Ezrin (Ratte) VSV-G
pCR II -TOPO CD44 SB1	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit Sequenz der Southern Blot Sonde SB1 (<i>AccI</i>)
pCR II -TOPO CD44 SB2	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit Sequenz der Southern Blot Sonde SB2 (<i>ApaI</i>)
pCR II -TOPO CD44 SB3	pCR®II-TOPO-Vektor aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit mit Sequenz der Southern Blot Sonde SB3 (<i>HindIII</i>)
pGKs6 - CD44 v4-7 cDNA	pGKs6-Vektor mit CD44 v4-7 cDNA. Das Plasmidkonstrukt pGKs6 wurde von Dr. Jonathan SLEEMAN zur Verfügung gestellt. pGKs6 enthält den Phosphoglycerat Kinase Promoter und die CD44 standard type cDNA einschließlich dem varianten Exon v6. Das Konstrukt wurde angefertigt durch Schneiden der pGKvKassette mit <i>AvaI</i> und <i>BglII</i> und anschließender Ligation mit einem kleinen Fragment der pSVKassette, das durch Schneiden mit <i>AvaI</i> und <i>BglII</i> erhalten wurde.
pHA-ERK	Hämagglutinin-getaggetes Erk1 exprimierendes Plasmid. Das Konstrukt wurde von Dr. A. ULRICH, Martinsried zur Verfügung gestellt.
pTVFlox-0	5480 bp großer Basis-KO-Vektor mit <i>TK</i> und gefloxter <i>Neo</i> -Kassette
pTVFlox-s.a.	pTVFlox-0 mit kurzem CD44 Homologie-Arm (3623 bp, später gekürzt vergl. pCD44-cko) kloniert in <i>PspOMI</i> und <i>NheI</i> Schnittstellen

2.1.10 Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
<i>E.coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
Electromax DH10B (<i>E.coli</i>)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ- rpsL nupG</i>

Beide Bakterienstämme wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die benutzten *E. coli* TOP10 wurden jedoch neu kultiviert und mit Hilfe der CaCl₂-Methode chemisch-kompetent gemacht.

2.1.11 Hybridisierungs-Sonden

<i>Name</i>	<i>Ursprung und Anwendung</i>	<i>Enzym für den Verdau der genomische DNA</i>
CD44 SB1	725 bp PCR-Fragment aus genomischer DNA im pCR II-TOPO	<i>AccI</i>
CD44 SB2	610 bp PCR-Fragment aus genomischer DNA im pCR II-TOPO	<i>ApaI</i>
CD44 SB3	725 bp PCR-Fragment aus genomischer DNA im pCR II-TOPO	<i>HindIII</i>

2.1.12 PCR Primer

<i>Probe</i>	<i>Primerpaar</i>	<i>Produktgröße</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Annealing-Temperatur</i>
CD44 v4-7 Δ cyt	CD44 for / CD44 for	1,4 kb	30	57 °C
CD44 SB1	CD44 SB1 for / CD44 SB1 rev	725 bp	30	57 °C
CD44 SB2	CD44 SB2 for / CD44 SB2 rev	610 bp	30	57 °C
CD44 SB3 loop out	CD44 SB3 for / CD44 SB3 rev	725 bp	30	57 °C
Ezrin VSV-G	Ezrin for / Ezrin rev	1,75 kb	30	65 °C
loop out PCR	CD44 intern for / CD44 extern rev	4,5 kb	30	58 °C
Neo-PCR	LoxP1 for / LoxP 2 rev	1,3 kb	30	58 °C
<i>nested</i> PCR extern	CD44 extern for / CD44 extern rev	5,5 kb	35	54 °C
<i>nested</i> PCR intern	CD44 intern for / CD44 intern rev	1,8 kb	35	54 °C
targeted PCR CD44	CD44 intern for / CD44 extern rev 2	5,4 kb	30	54 °C

Die Sequenzen der Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.1.13 Mutagenese-Primer

<i>Probe</i>	<i>Primerpaar</i>	<i>Mutation</i>
Muta DA	Muta DA sense / Muta DA antisense	Einfügen der Mutation T567D in Ezrin
Muta <i>MluI</i> Start ABD	Muta <i>MluI</i> Start sense / Muta <i>MluI</i> Start antisense	Einfügen von <i>MluI</i> -Schnittstelle in Ezrin zur Deletion der letzten 34 Aminosäuren
Muta <i>MluI</i> Ende ABD	Muta <i>MluI</i> Ende sense / Muta <i>MluI</i> Ende antisense	
Muta <i>MluI</i> N-term Start	Muta <i>MluI</i> N-term Start sense / Muta <i>MluI</i> N-term Start antisense	Einfügen von N-terminalen <i>MluI</i> -Schnittstelle zur Deletion des N-Terminus (258 Aminosäuren) von Ezrin
Muta <i>MluI</i> N-term Ende	Muta <i>MluI</i> N-term Ende sense / Muta <i>MluI</i> N-term Ende antisense	

Die Sequenzen der Mutagenese-Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation CaCl₂-kompetenter *E. coli* TOP 10 Bakterien

E. coli werden durch die Behandlung mit CaCl₂ kompetent gemacht. Dabei wird die Zellwand poröser und es kommt zu einer gesteigerten Enzymaktivität. Durch Zugabe des Plasmids und anschließender Hitzeschockbehandlung kommt es zur Aufnahme der Plasmid-DNA.

300 ml SOB-Medium werden mit 1 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* TOP 10 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Die Bakteriensuspension wird dann in ein 50 ml Falcon überführt und 10 min. in Eiswasser gekühlt. Anschließend werden die Bakterien 10 min. bei 3500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Medium wird verworfen und die Bakterien in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung gewaschen. Danach werden die resuspendierten Bakterien nach Zugabe von 10 ml CaCl₂-Lösung für 30 min. auf Eis inkubiert und im Anschluss erneut 10 min. bei 1500 x g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterien vorsichtig auf Eis in 100 mM CaCl₂/ 20 % Glycerol resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Für Transformationen wurden entweder chemisch kompetente *E. coli* TOP 10 aus dem TOPO™ TA Cloning® Kit oder elektrisch kompetente Electromax *E. coli* DH10B verwendet, die bei -80 °C aufbewahrt wurden.

Für die Transformation der *E. coli* TOP 10 wird pro Volumen Plasmid-DNA (5-10 ng/µl) das 20- bis 40-fache Volumen an kompetenten Bakterien verwendet. Der Ansatz wird 20 min. auf Eis inkubiert, 1,5 min. einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium werden die Zellen 45 min. bei 37 °C leicht geschüttelt, bevor sie

auf einer Selektionsplatte ausgestrichen und bei 37 °C 12 bis 16 Stunden bebrütet werden. Die LB-Agar-Platten werden vorher mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt. Für eine Blau-Weiß Selektion beim TOPO-Cloning werden die Platten zusätzlich mit 4 % X-Gal-DMSO-Lösung bestrichen. Einzelne Klone können gepickt und damit Schüttelkulturen für Plasmidpräparationen im Kleinmaßstab angeimpft werden.

Für eine Transformation in hocheffiziente elektrokompente *E. coli* DH10B werden 2-5 µl der Plasmid-DNA bzw. der Ligation mit 20 µl der Zellen auf Eis vorsichtig gemischt, in eine 1 mm Elektroporationsküvette überführt und bei 1,8 kV elektroporiert. Anschließend wird 1 ml SOC-Medium hinzugegeben, die Bakterien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umpipettiert und eine Stunde bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Schließlich werden die Zellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA

Plasmid-DNA kann abhängig von der weiteren Verwendung durch Mini-Präparation (TELT-Methode) oder Maxi-Präparation (*Qiagen Plasmid Maxi Kit*) aus Bakterien isoliert werden.

TELT Plasmid-DNA Präparation im Kleinmaßstab (Mini-Präparation)

Für die erste Überprüfung von Bakterienklonen nach erfolgter Ligation wurde eine Mini-Präparation durchgeführt. Die gewünschten Bakterienkolonien werden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Ampicillin 100 µg / ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml der Übernacht-Kultur werden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 30-40 s bei 10000 rpm pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Nach Zugabe von 200 µl TELT sowie 20 µl Lysozym-Lösung wird das Pellet durch Vortexen resuspendiert. Anschließend werden die Zellen 3 min. bei 96 °C gekocht und sofort für 5 min. auf Eis gestellt. Nach achtminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wird das Pellet mit einer gelben Pipettenspitze entfernt und zum Überstand 100 µl Isopropanol zugegeben und gemischt. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 100 µl Isopropanol und anschließendem Vortexen. Die gefällte Plasmid-DNA wird bei 13000 rpm für 10 min. abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird 10 min. bei RT getrocknet und in 50 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20 °C. 10 µl dieser Mini-Präparation-DNA werden für Restriktionsanalysen eingesetzt.

Maxi Plasmid-DNA Präparationen

Wurden für spezielle Applikationen größere Mengen oder eine höhere Reinheit der Plasmid-DNA benötigt, so wurde eine Maxi-Präparation mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA, nach selektiver Fällung chromosomaler DNA, denaturierter Proteine sowie von Zelltrümmern, an einer Anionenaustauschsäule immobilisiert und schließlich eluiert.

Bei der Maxi Präparation wird von einer 200 ml Bakterienkultur ausgegangen, die in selektivem LB-Medium mit dem gewünschten Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt wird. Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgt nach Angaben des Herstellers (*QIAGEN Plasmid Purification Handbook: Qiagen Maxi Protocol*).

2.2.1.4 Phenol/Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren von Kontaminationen zu reinigen, wird eine Mischung von Phenol/Chloroform und Isopropanol (2-Propanol) im Verhältnis 25:24:1 auf die DNA-Lösung gegeben und gut gemischt.

Die Phasen werden durch fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm getrennt. Die obere Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wird vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut eine Extraktion mit Chloroform/Isopropanol im Verhältnis 24:1 durchgeführt. Nach wiederholter Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min. wird die wässrige Phase abgenommen und die DNA mit 100% Ethanol ausgefällt.

Dieses Verfahren wurde insbesondere zur Aufreinigung des mit *BsaI*-linearisierten Vektors pCD44-cko für die Transfektion in ES-Zellen verwendet.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt werden. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ nm von 1 nach dem Lambert-Beerschen Gesetz einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Verunreinigungen mit Proteinen, die ebenfalls im ultravioletten Bereich, jedoch mit einem Maximum bei OD₂₈₀ nm

absorbieren, können das Ergebnis verfälschen.

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Für reine Nukleinsäuren liegt der Wert zwischen 1,6 und 2. Nukleinsäuren besitzen typische Absorptionsmaxima im UV-Licht.

2.2.1.6 Analytische Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele werden zur Auftrennung verschieden großer Nukleinsäurefragmente, zur Größenbestimmung und zur Abschätzung der Konzentration der eingesetzten Probe verwendet. In einem elektrischen Feld bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Agarosegel von der Kathode in Richtung der Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit abhängig von Größe und Form der Fragmente, wobei das kleinste am schnellsten wandert. Die DNA kann durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert, bei $\lambda=302$ nm sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wird ein DNA-Größenstandard parallel aufgetragen und die Laufstrecken anschließend miteinander verglichen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente beträgt die Agarosekonzentration 1,0 % bis 1,5 % (w/v). Die Agarose wird in 0,5 x TBE durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf etwa 60 °C mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach Erhärten der Agarose wird das Gel mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet, die aufzutragenden Proben mit DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:10 versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Lauf erfolgt bei 10 V pro 1 cm TAE-Agarosegel. Anschließend werden die DNA-Fragmente mittels eines Gel-Dokumentations-System durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.1.7 Präparative Agarosegel-Elektrophorese

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren, werden die gewünschten Fragmente nach der Auftrennung unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgt nach Angaben des Herstellers mit folgenden Kits:

- EasyPure DNA Purification Kit (Biozym),

- mi-Gel Extraction Kit (mi-GE100) (Metabion),
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

2.2.1.8 Restriktionsanalyse von DNA

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren, meist Palindrome, in denen sie das Phosphatzuckerrückgrat der DNA schneiden. Abhängig vom Enzym entstehen dabei entweder 5' bzw. 3' überhängende (*sticky*) oder glatte (*blunt*) Enden.

Abhängig vom jeweiligen Enzym werden für den Verdau von 1 µg DNA 3 bis 10 Enzymeinheiten (Units = eine Unit entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde 1 µg DNA des Phagen Lambda bei optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen vollständig verdaut) verwendet. Das Reaktionsvolumen entspricht dabei mindestens dem 20fachen des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung, die Inkubationszeit mindestens eine Stunde bei optimaler Reaktionstemperatur (meist 37 °C) und idealen Pufferbedingungen (eingestellt mit dem Puffersystem des jeweiligen Anbieters). Nach Zugabe von DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1 x) wird die Restriktionsanalyse auf einem analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei Plasmid-DNA aus Minipräparationen wird dem DNA-Ladepuffer 1 µg/µl RNaseA zugesetzt, da bei der Isolierung und Aufreinigung der DNA mit Hilfe der TELT-Methode kein RNase-Verdau stattfindet.

2.2.1.9 Dephosphorylierung von 5' Überhängen

Um während einer Ligation die Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors zu verhindern, wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende durch eine Phosphatase abgespalten.

Dazu werden 1 U *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) pro µg Vektor und der entsprechende Puffer (Herstellerangaben) entweder direkt in den Restriktionsansatz oder zu dem aufgereinigten Vektor hinzugegeben und 15 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms 15 min. bei 65 °C erhitzt und dann entweder direkt in die Ligationsreaktion eingesetzt oder zuvor auf einem Agarosegel aufgereinigt.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren werden freie DNA-Enden über Phosphodiester-Bindungen in einem energiegebenden Vorgang verknüpft.

Das zu ligierende DNA-Fragment wird im drei- bis fünffachen molaren Überschuss zum linearisierten Vektor gegeben. Weiter werden 1/10 Ligasepuffer, der bereits ATP enthält, sowie 10 bis 20 U T4 DNA Ligase zugegeben und entweder über Nacht bei 14 °C oder drei Stunden bei Raumtemperatur ligiert.

Für die Klonierung des langen Homologie Arms in den Vektor pTVFlox-s.a. wurde die Quick-Stick™ Ligase von Bioline nach Angaben des Herstellers verwendet. Statt der im Protokoll angegebenen Zeit wird für 40 min. ligiert.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt eine selektive Replikation einer DNA-Sequenz. Doppelsträngige DNA mit der Zielsequenz wird durch Erhitzen in Einzelstränge aufgetrennt. Zwei spezifische Primer binden an jeweils einen der Stränge, wobei die Zielsequenz von beiden flankiert wird. Je nach Bedarf kann an das 5'-Ende der Primer andere Sequenzen, wie z.B. eine Restriktionsschnittstelle angefügt werden. Das Enzym *Taq*-DNA-Polymerase synthetisiert den ersten Satz komplementärer Stränge. Es bindet dabei an den 5'-Primer und verlängert ihn in 3'-Richtung. Bei der zweiten Verlängerung kann die DNA nicht über den anderen Primer hinaus verlängert werden, der sich am Ende des zuvor gebildeten Strangs befindet. Auf diese Weise wird nur die benötigte Sequenz amplifiziert. Je nach der vorhandenen Ausgangsmenge an DNA oder auch der benötigten Menge, kann eine PCR unterschiedlich viele Zyklen haben.

Die Sequenzen der Southern Blot -Sonden wurden durch eine PCR aus genomischer DNA von *wildtyp* HM-1 ES-Zellen isoliert und gemäß dem Protokoll in den TOPO-pCRII-Vektor kloniert. Die Primer und die Bedingungen der PCR sind unter **2.1.11** aufgeführt.

Eine PCR lief nach folgendem Schema ab, wobei sich die exakten Bedingungen aus den verwendeten Primern und der Polymerase ergaben.

Zunächst wird das Reaktionsgemisch mit einem Endvolumen von 25 µl nach Herstellerangaben angesetzt. Für jedes Primerpaar wird als Test auf mögliche Kontamination mit Fremd-DNA jeweils ein Ansatz ohne Template-DNA (H₂O-Kontrolle) angesetzt. Die PCR-Temperaturprofile werden

entsprechend der Primerpaarung und PCR-Produktgröße festgelegt. Nach einer zweiminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C folgen je nach zu amplifizierendem Fragment 30 bis 38 Zyklen, die jeweils aus den drei folgenden Einzelschritten bestehen: 30 s bei 94 °C (DNA-Denaturierung), 30 s bei Annealingtemperatur (5 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer) und pro 1 kb PCR-Produktgröße 1 min. bei 68 °C bzw. 72 °C (optimale Temperatur für die Polymerase-Aktivität). Abschließend erfolgt ein letzter Syntheseschritt bei 72 °C, der abhängig von der Produktgröße 5 bis 15 min. dauert (dieser Schritt entfällt bei Verwendung der AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity). Schließlich werden die Proben auf 4 °C abgekühlt und können auf einem Agarosegel analysiert werden.

2.2.1.12 *Nested PCR*

Für das Auffinden von Klonen mit einer homologen Rekombination der transfizierten Sequenzen, wurde eine *nested PCR* (verschachtelte PCR) angewendet.

Für sehr geringe Ausgangsmengen reicht eine PCR nicht aus, um gelelektrophoretisch darstellbare Mengen an Produkt zu gewinnen. Deshalb wird eine *nested PCR* durchgeführt, das heißt das Produkt der ersten PCR wird in verdünnter Form als Template für die zweite PCR verwendet. Zudem werden so genannte *nested primers* eingesetzt, das bedeutet, dass das zweite Primerpaar zwischen dem ersten liegt. Die Primer und die Bedingungen der PCR sind in Kapitel 2.1.11 aufgeführt.

5 µl des Zelllyse-Überstands werden als Template in die PCR eingesetzt. Für die *nested-PCR* wird ausschließlich die AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity benutzt. Das Reaktionsgemisch wird nach Angaben des Herstellers pipettiert, wobei allerdings die vierfache Menge an Primern eingesetzt wird. Für die erste PCR wird Puffer II für genomische DNA benutzt, für die zweite PCR Puffer I für Plasmide/lineare DNA-Fragmente. Das Endvolumen der PCR beträgt 25 µl. Weitere Bedingungen sind unter 2.1.11 aufgelistet.

2.2.1.13 Mutagenese von DNA-Sequenzen

Um in einer DNA-Sequenz das für eine Aminosäure kodierende Basentriplett gezielt zu verändern oder um eine Restriktionsschnittstelle einzufügen oder zu entfernen, wird eine Mutagenese durchgeführt.

Dazu werden zwei komplementäre Primer entworfen, die in ihrer Mitte die veränderte Sequenz enthalten. In einer PCR wird dann das komplette Plasmid mittels spezifischer Primer sowie einer DNA-Polymerase mit proof-reading Funktion amplifiziert, wodurch die gewünschte Mutation eingefügt wird. Das unveränderte Ausgangsplasmid wird anschließend mit *DpnI* verdaut. *DpnI* schneidet gezielt die methylierte und hemi-methylierte DNA, welche durch die Replikation in Bakterien entsteht. Der Ansatz wird in Bakterien transformiert. Über eine Restriktionsanalyse sowie einer Sequenzierung wird die Richtigkeit der Mutagenese überprüft.

Für die Mutagenese der CD44-Ezrin-Konstrukte wurde das QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.14 *In vitro* Rekombination von LoxP-Sequenzen

100 ng des Vektors werden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1 U *Cre-Rekombinase* und 1x Reaktionspuffer bei 37 °C für 30 min. inkubiert. Anschließend erfolgt die Denaturierung des Enzyms bei einer 10 minütigen Inkubation bei 70 °C. 5 µl des Ansatzes werden in *E.coli* TOP 10-Zellen transformiert, auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Einzelne Klone können gepickt und damit Schüttelkulturen für Mini-Plasmid Präparationen angeimpft werden. Die möglichen Rekombinationsvarianten werden in einem Testverdau mit *HindIII* getestet.

2.2.1.15 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Isolierung genomischer DNA für die *nested* PCR

Die Zellen werden in einer 96-well-PCR-Platte 8 min. bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in 12 µl *nested*-PCR Lysis-Puffer resuspendiert und in einer PCR-Maschine bei 37 °C für eine Stunde gefolgt von 10 min. bei 85 °C inkubiert. Nach einer

Zentrifugation bei 2000 rpm für 8 min. werden 5 µl des Überstands direkt in die *nested* PCR eingesetzt und der Rest bei -20 °C eingefroren.

Isolierung genomischer DNA für den Southern Blot

Bei einem Mini-Southern Blot wird nach einem anderen Protokoll verfahren (siehe nächster Abschnitt).

Die Zellen werden trypsiniert und nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min. mit PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend in 750 µl Lysispuffer mit Proteinase K aufgenommen und über Nacht (12-16 Stunden) bei 55 °C inkubiert. Nach dem Zellaufschluss wird für 5 min. auf dem Eppendorf-Mixer auf höchster Stufe gemischt, 250 µl 5-6 M NaCl hinzugegeben und wiederum 5 min. gemischt. Das entstandene Pellet wird 5-10 min. mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und 750 µl vom Überstand in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wird die enthaltene genomische DNA gefällt. Das Reaktionsgefäß wird zwei Minuten gemischt und für eine Minuten abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert, der Überstand komplett abgenommen und das Pellet 5-10 min. luftgetrocknet. Zuletzt wird die DNA, je nach Größe des Pellets und der gewünschten Konzentration, in 50-200 µl TE-Puffer aufgenommen.

Isolierung genomischer DNA für den Mini-Southern Blot (im 96-well-Format)

Die Zellen werden zunächst sehr dicht wachsen gelassen, bis sich das Medium von einem Tag auf den anderen gelb färbt (i. d. R. 4-5 Tage). Dann werden sie zweimal mit PBS gewaschen und pro well 50 µl Mini-Southern Blot Lysis-Puffer hinzu gegeben. Die Zellen werden über Nacht in einem verschlossenen Behälter mit feuchten Tüchern bei 60 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird 100 µl eines Gemisches aus NaCl und Ethanol (75 mM NaCl in eiskaltem 100 % (v/v) Ethanol) zugegeben und gemischt. Die Platte wird anschließend 30 min. bei RT inkubiert. In dieser Zeit präzipitieren die Nukleinsäuren als filamentöses Netzwerk. Damit diese besser am Boden haften bleiben, wird die Platte kurz anzentrifugiert. Durch vorsichtiges Invertieren wird anschließend der Überstand dekantiert und die restliche Flüssigkeit mit einem Saugpapier entfernt. Die Nukleinsäuren werden dreimal mit je 150 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich bei RT getrocknet. Die DNA kann direkt in einer Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

2.2.1.16 Southern Blot Analyse

Restriktionsverdau für einen Southern Blot

Bei einem Mini-Southern Blot wird nach einem anderen Protokoll verfahren (siehe nächster Abschnitt).

10-20 µg der genomischen DNA werden über Nacht (12-16 Stunden) unter den jeweiligen optimalen Bedingungen der verwendeten Restriktionsenzyme komplett verdaut. Dabei werden 3-5 Units des Enzyms pro µg DNA verwendet.

Restriktionsverdau für einen Mini-Southern Blot

Zur frisch isolierten DNA gibt man 30 µl des Restriktionsverdau-Gemischs für Mini-Southern Blot (1x Restriktions-Puffer, 1 mM Spermidine, 100 µg/ml BSA, 10 U Enzym) hinzu und inkubiert über Nacht bei der für das Enzym optimalen Temperatur in feuchter Umgebung (verschlossener Behälter mit feuchten Tüchern).

Gelelektrophorese und Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran

Die geschnittene DNA wird auf ein 0,8 % (w/v) Agarosegel geladen und zunächst bei 40 V, später bei 60-70 V aufgetrennt. Die gesamte Gelapparatur wird zuvor für mindestens 10 min. in 5 % Zitronensäure gelegt. Nach erfolgter Auftrennung der DNA, wird das Gel zunächst für 20 min. in 0,125 M HCl inkubiert, dann für 30 min. in Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend in Neutralisationspuffer leicht schüttelnd inkubiert. Der Blot wird, wie in **Abb. 2-1** dargestellt, zusammengesetzt. Für den Blot wird die Nylon-Membran Hybond N+ (GE Healthcare) verwendet. Geblottet wird mit 20xSSC als Transferpuffer über Nacht (12-16 Stunden).

Nach dem Transfer der DNA auf die Membran, wird diese für zwei Stunden im Ofen getrocknet und in Folie eingeschweißt oder direkt in einer Hybridisierung eingesetzt.

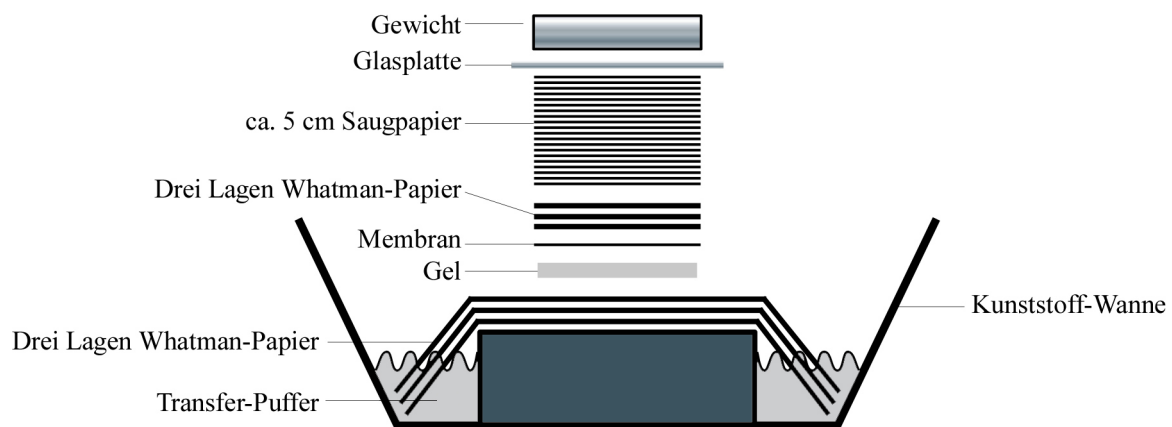


Abbildung 2-1: Zusammenbau eines Southern Blots. Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran. Das Gel wird mit der Oberseite nach unten auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt, die über ein Reservoir aus Transferpuffer gespeist werden. Auf das Gel wird die Membran, drei Lagen feuchtes (Transferpuffer) Whatman-Papier, ein ca. 5 cm dicker Stapel aus Saugpapier sowie eine Glasplatte und ein ca. 300-350 g schweres Gewicht gelegt.

Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Die DNA-Sonde für den Southern Blot wurde wie zuvor beschrieben mit Hilfe der PCR aus der genomischen DNA von HM-1 Zellen isoliert und in den TOPO-pCRII Vektor kloniert. Für die radioaktive Markierung wurde die Sequenz durch Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor ausgeschnitten, über Gelelektrophorese aufgereinigt und isoliert.

25 ng dieser DNA-Sonde werden in die Markierungsreaktion eingesetzt. Dafür wurden im Laufe dieser Arbeit zwei unterschiedliche Kits benutzt: 1. Prime-It® II Random Primer Labeling Kit von Stratagene und 2. Rediprime II DNA Labeling System von GE Healthcare. Beim Rediprime II DNA Labeling System von GE Healthcare wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet.

Zunächst werden die radioaktiven ^{32}P -dCTPs zusammen mit dem Reaktionsgemisch aus dem Kit in 15 μl TE gelöst. Anschließend wird die denaturierte DNA hinzugegeben. Der weitere Ablauf erfolgt nach Protokoll des Herstellers. Die markierte Sonde wird hinterher über eine Säule (Illustra MicroSpin S-300 HR Columns, GE-Healthcare) aufgereinigt und komplett in die Hybridisierung eingesetzt.

Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wird die geblottete Membran ca. eine Stunde mit Church-Puffer (modifizierter Church und Gilbert Puffer) in einem Hybridisierungsröhrchen bei Hybridisierungstemperatur (65 °C) prähybridisiert. Die Sonde wird 5 min. bei 100 °C denaturiert und 5 min. auf Eis abgekühlt. Anschließend wird sie direkt zur Membran in den

Hybridisierungspuffer gegeben. Der Blot wird über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert.

Waschen des Blots

Das Waschen des Blot erfolgt grundsätzlich bei Hybridisierungstemperatur (65 °C).

Nach der Hybridisierung wird der Blot im Hybridisierungsröhrchen kurz mit 2x SSC, 0,1 % SDS gespült und anschließend mit demselben Puffer dreimal jeweils 5 Minuten drehend gewaschen. Danach folgen weitere drei Waschschrte von je 5 min. mit 1x SSC, 0,1 % SDS für 10 min. und fünf mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS. Die Detektion der Radioaktivität erfolgt durch Autoradiographie mit Hilfe eines aufgelegten MP-Films.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur und Subkultivierung von ES-Zellen

Abhängig von der ES-Zelllinie wurde ein spezielles Komplett-Medium mit 15 % FBS eingesetzt. Das Medium enthält u. a. LIF (*leukaemia inhibitory factor*), das die Differenzierung der Zellen verhindert. Die E14.1 werden zusätzlich auf einer Schicht *Feeder*-Zellen (Maus Fibroblasten) kultiviert.

CCE und HM-1 ES-Zelllinien

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ gezogen. Für die Kultur der HM-1 und CCE ES-Zellen wird die Zellkulturplatte zunächst mit 0,1 % Gelatine für mindestens 10 min. bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wird die Gelatine von der Platte abgezogen, durch 8 ml Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen darauf ausgesät. Nach Ablauf von 2-4 Tagen, währenddessen darauf geachtet wird, dass die Zellen nicht ineinander wachsen, wird das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Trypsin (3-5 min. bei 37 °C) von der Platte gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wird anschließend Kulturmedium hinzu gegeben. Die Zellen werden abzentrifugiert und im Verhältnis 1:10 frisch auf Gewebekulturplatten ausgesät.

E14.1 ES-Zelllinie

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ gezogen. Im Gegensatz zu den ES-Zelllinien CCE und HM-1 werden die E14.1 nicht direkt auf Gelatine beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, sondern auf einer Schicht inaktivierter Maus-Fibroblasten (*Feeder*). Nach dem Lösen der Zellen von der Zellkulturplatte werden sie in 8 ml Komplett-Medium auf den *Feeder* ausgesät. Routinemäßig werden die E14.1 alle 3-4 Tage in einer Verdünnung von 1:10 aufgeteilt und auf neue Gewebekulturplatten ausgesät.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

Die ES-Zellen werden trypsiniert, bei 1200 rpm abzentrifugiert, das Zellsediment mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 DMSO) aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Für ein schonendes Einfrieren werden die Zellen zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox mindestens 4 Stunden bei -80 °C langsam abgekühlt. Eine längerfristige Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, werden sie in einem 37 °C Wasserbad rasch aufgetaut und sofort in einem Reaktionsgefäß mit 10 ml Komplett-Medium aufgenommen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm zur Entfernung des DMSO, werden die ES-Zellen in Komplett-Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf einer Zellkulturplatte im entsprechenden Medium ausgesät.

Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen im 96-well Format

Die Zellen werden so lange in Kultur gehalten, bis sie konfluent sind. 4 Stunden vor dem Einfrieren wird das Medium ausgetauscht. Dann werden die Zellen mit D-PBS gewaschen, pro well 45 µl Trypsin hinzugeben und bei 37 °C bis zu 10 min. inkubiert (oder bis sich die Zellen von der Platte lösen). Zum Abstoppen des Trypsins werden 45 µl Komplett-Medium hinzupipettiert und die Suspension 10-15 mal auf- und abpipettiert. Die trypsinierten Zellen werden für 10 min. bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Anschließend werden 90 µl eiskaltes 2x Einfriermedium (20 % DMSO, 20 % Serum, 60 % DMEM) hinzugeben, gemischt und mit je 70 µl Mineralöl überschichten um ein Aufschwemmen der Zellen zu verhindern. Die Platte wird daraufhin mit Parafilm verschlossen und in einer Styropor-Box bei -80 °C eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung können die Zellen bei Bedarf in flüssigen Stickstoff umgesetzt werden.

Zum Auftauen einzelner Klone wird die gefrorene Zellkulturplatte für 10-15 min. bei 37 °C inkubiert. Die Klone werden dann mit 2 ml Komplett-Medium in eine 24-well Platte überführt. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt um DMSO und Mineralöl zu entfernen.

2.2.2.3 Kultivierung und Inaktivierung von Maus-Fibroblasten (MEK, Feeder)

Die ES-Zelllinie E14.1 benötigt eine Schicht Maus-Fibroblasten (*Feeder*) als Wachstums-Substrat. Routinemäßig werden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ gezogen und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3-1:5 weiter kultiviert. Hierfür werden die Zellkulturplatten für eine Stunde mit 0,1 % Gelatine bei RT beschichtet. Zuvor werden die *Feeder* mit 0,01 mg/ml Mitomycin (verdünnt im Medium) für zwei Stunden bei 37 °C behandelt, um eine weitere Proliferation zu verhindern. Nach der Behandlung wird das Mitomycin-haltige Medium abgesogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgt wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.2.4 Zellkultur und Subkultivierung von Bsp73AS, HT-29 und 293 Zellen

Alle Zelllinien werden in einem Brutschrank bei 37 °C, 6% CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jegliche Behandlung der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen. Die kultivierten Zellen werden ab 80 %iger Konfluenz in neue Zellkulturschalen passagiert. Hierfür werden die Zellen nach Entfernen des Mediums 5 min. mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung/EDTA bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden dann in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min.). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Kulturplatten oder -flaschen ausgesät.

2.2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Bsp73AS, HT-29 und 293 Zellen

Das Einfrieren erfolgt in einer Konzentration von 3×10^6 pro ml. Dazu werden die Zellen für 5 min. trypsiniert und in Kulturmedium überführt um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (3 min., bei 1200 rpm) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in eiskaltem Kryomedium (90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und die Suspension auf Einfrierröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgt langsam in speziellen Behältnissen, die Isopropanol enthalten. Die Zellen werden nach einigen Tagen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgt möglichst schnell. Die im Wasserbad bei 37 °C aufgetaute Zellsuspension

wird in 10 ml Medium aufgenommen und für 3 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in frischem Medium resuspendiert und zur Kultivierung ausgesät.

2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Trypsinierte Zellen werden in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und bei 1200 rpm drei Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Komplettmedium resuspendiert und davon ca. 100 µl in den Kapillarspalt einer Neubauer Zählkammer pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden mindestens vier Großquadrate unter dem Mikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung ausgezählt. Der Mittelwert multipliziert mit 10^4 ergibt die Zellzahl pro ml.

2.2.2.7 Aktivierung von HGF

HGF liegt als monomere Proform vor. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung einer Disulfidbrücke durch Proteasen. Nach der Aktivierung liegt eine α -Untereinheit von 60 kDa und eine β - Untereinheit von 30 kDa vor. Um eine Aktivierung der Proform zu bewirken, werden 50 µl der HGF-Proform (10 µl/ml in PBS + 0,3 % BSA) mit 25 µl FCS und 425 µl PBS über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Aktivierung kann durch Western Blot mit Antikörper gegen die α -Untereinheit von HGF nachgewiesen werden. Hierdurch kann die aktivierte Form (60 kDa) von der Proform (90 kDa) unterschieden werden.

2.2.2.8 Induzierung mit HGF

Vor der Behandlung mit Wachstumsfaktoren müssen die Zellen 20-24 Stunden gehungert werden. Dabei wird das Kulturmedium gegen serumfreies Medium ausgetauscht, da im Serum Wachstumsfaktoren enthalten sind. Die Induzierung mit HGF erfolgt in der Regel, wenn nicht anders vermerkt, 5 min. in serumfreien Medium bei 37 °C mit 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml für HGF.

2.2.2.9 Transfektion von ES-Zellen durch Elektroporation

Die Transfektion von DNA in Zellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Elektroporation. Hier wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls kurzfristig permeabilisiert, so dass DNA aus der Lösung in die Zelle passieren kann. Die Aufnahme von Plasmiden ist reversibel und somit verlieren die meisten Zellen diese innerhalb weniger Tage (transiente Transfektion). Kommt es zum Einbau der DNA in das Genom spricht man von stabiler Transfektion. Durch zusätzliche Zugabe eines Resistenzmarkers, können stabile Klone durch Zugabe eines Antibiotikums selektiert werden. Werden mehrere Klone weiterkultiviert, spricht man von Massenkultur (*mass culture*).

Zu 8×10^6 Zellen in PBS werden bei den CCE-ES-Zellen 25 µg des zu transfizierenden und mit *Bsa*I linearisierten Vektor zugegeben, bei den HM-1-Zellen 30 µg und bei den E14.1-Zellen 130 µg des Vektors. Die ES-Zellen werden bei 250 V (230 V bei E14.1) und 500 µF transfiziert. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten bei RT inkubiert, in Medium aufgenommen und auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät (bei CCE- und HM-1-Zellen acht Platten, bei E14.1-Zellen zwei Platten).

2.2.2.10 Selektion von transfizierten ES-Zellen

24 Stunden nach der Transfektion wird mit der Selektion mit 190 µg/ml (bei E14.1) bzw. 300 µg/ml (bei HM-1 und CCE) G418 begonnen. Von Tag drei bis fünf wird zusätzlich mit 2 mM Ganciclovir selektioniert (nicht bei den CCE). Die Zugabe von G418 wird für 7-10 Tage beibehalten, bis alle nicht-transfizierten Kontrollzellen alle gestorben sind. Während der Selektion wird das Medium täglich gewechselt.

2.2.2.11 Isolierung einzelner ES-Zell-Klone

Um einzelne ES-Zell-Klone analysieren zu können, werden die Zellen mit PBS gewaschen und überschichtet. Anschließend werden sie unter dem Binokular mit einer 10 µl Pipettenspitze von der Zellkulturplatte abgeschabt, eingesogen und in eine 96-well Zellkulturplatte mit je 15 µl PBS

überführt. Zu den isolierten Klonen in PBS wird dann 25 µl Trypsin hinzugegeben und für 3 min. bei 37 °C inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren werden die Zellen vereinzelt. Anschließend werden hinzugegeben und die Zellen auf zwei 96-well-Platten mit je 100 µl Zellkulturmedium und eine 96-well PCR-Platte verteilt. Die beiden Platten werden weiter kultiviert, während die Zellen auf der PCR-Platte sofort in einer *nested*-PCR getestet werden.

2.2.2.12 Deletion der *Neo*-Kassette

Für die Deletion der *Neo*-Kassette durch gezielte Rekombination zwischen den beiden flankierenden LoxP-Stellen, werden Zellen eines Klons mit homologer Rekombination mit einem *Cre*-Rekombinase-exprimierenden Vektor transfiziert. Dazu werden 1×10^7 Zellen trypsiniert, abzentrifugiert, in 800 µl PBS aufgenommen und bei 260 V und 500 µF elektroporiert. Nach der Transfektion werden die Zellen 10 Minuten bei RT inkubiert, bevor sie auf drei 10 cm Zellkulturschalen ausgesät werden. Nach 48 Stunden werden die Zellen von der Platte gelöst und je zwei Platten mit 1×10^3 und 1×10^4 ausgesät. Die restlichen Zellen werden für eine mögliche spätere Verwendung eingefroren. Nach 8-10 Tagen werden 200 der gewachsenen Klone isoliert und auf 96-well-Platten überführt. Dabei wird jeder einzelne Klon dupliziert. Zu einer der beiden Platten wird nach 48 Stunden G418 hinzu gegeben und nach 7-10 Tagen G418-sensitiven Klone isoliert, die in einer PCR auf den Verlust der *Neo*-Kassette und das Vorhandensein von Exon 3 analysiert werden. Positiv getestete Klone werden in einem Southern Blot bestätigt.

2.2.2.13 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion

Klone mit konditioneller und totaler Inaktivierung von CD44 werden in Blastozysten E3,5 injiziert und in Leihmütter transferiert. Hierfür werden sowohl E14.1 als auch HM-1 auf *Feeder* im jeweiligen Medium kultiviert. Um die *Feeder* zu entfernen werden die Zellen am Tag der Injektion trypsiniert und abzentrifugiert. Die Zellsuspension wird auf einer Zellkulturplatte ausgesät und 20-30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei adhären die größeren *Feeder* auf dem Boden der Platte, während die kleineren ES-Zellen in Suspension verbleiben. Der Überstand mit den ES-Zellen wird dann abgenommen, wiederum zentrifugiert, anschließend in ca. 500 µl Medium aufgenommen und

bis zur Injektion auf Eis gestellt. Die Injektion und der Transfer der Blastozysten wurden im Injektionslabor und im Tierstall des ITG ausgeführt.

2.2.2.14 Transfektion von Bsp73AS-, HT-29- und 293- Zellen

Transfektion von Bsp73AS mit AMAXA

Alle Konstrukte wurden mit HA-Erk ko-transfiziert. Dazu werden 1,5 µg HA-Erk und 2,5 µg der jeweiligen Konstrukte eingesetzt. Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation (AMAXA, Programm T-020, laut Protokoll des Herstellers) mit Lösung L (AMAXA). Einen Tag nach der Transfektion werden die Zellen in Serum-freies Medium überführt.

Transfektion von HT-29 mit AMAXA

3 µg des jeweiligen Konstrukts wird transfiziert. Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation (AMAXA, Programm S4, laut Protokoll des Herstellers) mit Lösung R (AMAXA). Einen Tag nach der Transfektion werden die Zellen in Serum-freies Medium überführt.

Transfektion von 293-Zellen mit Lipofectamin

Eine weitere Möglichkeit ist mittels Transportreagenzien, die Komplexe mit der DNA bilden und letztendlich eine Durchlässigkeit der Membran verursachen. Hier komplexieren positiv geladene Liposomen mit der DNA. Dieser Komplex aus Liposomen und DNA fusioniert mit der Zellmembran, wodurch die DNA in den Zellkern gelangt.

Alle Konstrukte wurden mit HA-Erk ko-transfiziert. Hierfür werden 1,5 µg HA-Erk und 2,5 µg der jeweiligen Konstrukte eingesetzt. 293-Zellen werden mit Lipofectamin (Firma Invitrogen, Karlsruhe) transient transfiziert. Die Transfektion erfolgt nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.15 *Scattering assay* mit HT-29 -Zellen

Nach der Transfektion mit dem jeweiligen Konstrukt werden die HT-29 Zellen für 24 Stunden gehungert. Am nächsten Tag wird HGF/SF in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben. Die Zellen werden nach 48 Stunden auf das Migrationsverhalten unter dem Phasenkontrastmikroskop

untersucht.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 *In vitro* Translation

Um zu überprüfen, ob eine in einen Expressionsvektor klonierte cDNA korrekt *in vivo* translatiert werden kann, führt man eine *in vitro* Translation durch. Das *in vitro* translatierte Protein wird mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert und kann so durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Der Expressionsvektor muss eine RNA-Polymerase-Promotorsequenz enthalten und die cDNA ein Stopp-Kodon. Von diesem Template wird zunächst mittels *in vitro* Transkription RNA erzeugt, die schließlich translatiert wird. Die *in vitro* Translation wurde mit dem TNT® Reticulocyte Lysate System (Firma Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.2 Proteinextraktion und Zellyse

Die Lyse der Zellen erfolgt nach Absaugen des Mediums durch Aufnahme der Zellen in Laemmli Lyse Puffer. Die Denaturierung der Proteine erfolgt mittels reduzierender Reagenzien wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (1M DTT, Verdünnung 1:10), die zur Spaltung der Disulfidbrücken führen. Die DNA wird durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle geschert, um die Viskosität herabzusetzen. Damit wird die Möglichkeit der Auftrennung der Proteine verbessert. Die Proben werden schließlich zur Denaturierung für 5 min. unter Schütteln bei 99 °C erhitzt. Abschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min. dient der Sedimentation von unlöslichen Bestandteilen. Der Überstand kann nach diesem Schritt bei -20 °C gelagert werden.

Probenpuffer: 100 mM Tris HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau

2.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung. Die meisten Proteine binden das Detergens SDS zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Gleichzeitig denaturiert SDS die Proteine. Somit wandern alle Proteine bei Anlegen einer Spannung zur positiven Elektrode. Die Größe der negativ geladenen Proteine korreliert mit ihrer Masse, welche anhand eines mitlaufenden Markers ermittelt werden kann. Das diskontinuierliche Puffersystem dient der Erhöhung der Trennschärfe der Proteinbanden, die in einem niedrigvernetzenden Sammelgel bei niedrigerem pH aufkonzentriert werden. TEMED und APS leiten die Polymerisation ein und werden deshalb erst kurz vor dem Gießen des entsprechenden Gels zugegeben.

Die Trenngel-Lösung wird nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche durch mm dicke Abstandhalter voneinander werden. Nach Überschichten mit Isopropanol lässt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach der Polymerisation wird das Isopropanol entfernt, mit Wasser gewaschen und dann das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen. Nach Einsetzen des Kammes lässt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wird das Gel in eine speziell dafür vorgesehene Gelkammer eingespannt, deren Reservoirs mit Elektrophoresepuffer gefüllt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Regel bei einer Spannung von 100-120 V.

Trenngel: 6-12 % Acrylamid, 0,16-0,32 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % Temed

Sammelgel: 4 % Acrylamid, 0,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1% Temed

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% SDS

2.2.3.4 Western Blot Analyse

Beim Blotten werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Proteine, die über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, werden in einer Naßtransferkammer (Transblot, BioRad) auf eine Nitrocellulose-Membran (PVDF) transferiert. Dazu wird das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen Whatman- Papier, das zuvor mit Transferpuffer befeuchtet wurde, gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Kammer wird mit Laufpuffer gefüllt. Die durch SDS negativ geladenen Proteine werden in Richtung der Anode auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 30 V und 4 °C, kann aber auch in kürzerer Zeit (2-3 Stunden) bei bis zu 1,5 A transferiert werden. Nach erfolgtem Transfer wird die Immunodetektion vorgenommen. Dabei wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde mit 5 % BSA in TBS-Tween blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder empirisch ermittelten Verdünnung). Danach wird die Membran dreimal 10 min. in TBS-Tween gewaschen und mit dem entsprechend verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen in TBS-Tween werden die Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtet sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Hier wurden Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Konjugate verwendet. Die Detektion erfolgt mittels eines Chemilumineszenzsystems, ECL (enhanced chemoluminescence kit), das aus zwei Detektionsreagenzien, Wasserstoffperoxid und Luciferase, besteht. Bei der Zersetzung des Wasserstoffperoxids entsteht aktivierter Sauerstoff, der die Luciferase aktiviert. Mit der abgegebenen UV-Strahlung wird ein Röntgenfilm belichtet. Um den Blot mit einem zweiten Primär-Antikörper inkubieren zu können, muss der erste entfernt werden. Dies erfolgt durch Schütteln bei 55 °C im Wasserbad für 40 min. in „*stripping*-Lösung“.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glycin, 10 % Methanol

TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,6

TBS-Tween: TBS + 0,05% Tween 20

Stripping-Lösung: 62,5 mM Tris pH 6,8; 2 % SDS; 50 mM DTT

2.2.3.5 Immunopräzipitation (IP)

Bei der Immunopräzipitation (IP) wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe von hochaffinen Antikörpern aus dem Zelllysate komplexiert. Zur Affinitätsreinigung wird Sepharose-gekoppeltes Protein A/G/A+G zugegeben. Somit können die gebildeten Komplexe der Lösung entzogen und sedimentiert werden. Protein A (aus Staphylokokken) ist gegen Maus IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgA, Kaninchen pAKs, humanes IgG₁, IgG₂ und IgG₄ gerichtet, Protein G (aus Streptokokken) gegen Maus IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃, gegen Ratte IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG_{2c}, gegen Kaninchen und Ziege pAKs und gegen humanes IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ gerichtet. Während des Präzipitationsvorganges müssen die Zellen und Lysate unbedingt auf Eis, $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, gehalten werden, damit die Proteinkomplexe eine möglichst große Stabilität erhalten und um die Aktivität von Proteasen, Kinasen und Phosphatasen zu minimieren.

2.2.3.6 Immunopräzipitation von Met und Hämagglutinin (HA)-getaggtter ERK

Im Anschluss an die Induzierung mit HGF werden die Zellen mit eiskalten PBS gewaschen; mit 500 μl Lysepuffer versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. Im Lysepuffer befindet sich NaF und Na-Orthovanadate, die als Breitbandinhibitoren für Serin-/Threonin Phosphatasen und Tyrosin-Phosphatasen eingesetzt werden. Die Lysate werden in Reaktionsgefäße überführt und die DNA geschert. Anschließend wird für 20 min. bei 12000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 12,3 μl humanem Met-Antikörper bzw. 6,3 μl HA-Antikörper werden die Proben über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotiert. Zu jeder Probe werden 50 μl „*bead*“-Suspension (bei C-Met-IP: Protein A+G-gekoppelte Agarose-beads; bei HA-IP: Protein G-gekoppelte Agarose-beads) gegeben, welche zuvor mit Lysepuffer gewaschen wurden. Die Lysate lässt man weitere 4 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotieren. Danach werden die Proben abzentrifugiert und mit Lysepuffer gewaschen. Der Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Zum Schluss wird jegliche überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die „*beads*“ mit 25 μl SDS-Ladepuffer versetzt.

Lysepuffer für c-Met-IP (Zhe Zhang-Puffer): 25 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0,5 % Triton, 0,1 % SDS

Lysepuffer für HA-IP: 30 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,5% Na-

Material und Methode

deoxycholat, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na-Orthovanadate, 1 mM Aprotinin und 1 mM Leupeptin

Die proteinbiochemischen Experimente, die Transfektion der Bsp73AS-, HT-29- und 293- Zellen sowie die Expressionsanalyse, wurden in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Alexandra Matzke, Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle des ERM-Proteins Ezrin und der zytoplasmatischen Domäne von CD44v6 im Signalkomplex CD44v6 - c-Met - Ezrin

Für die Aktivierung von c-Met durch HGF/SF und die folgende Signaltransduktion wird CD44v6 als Ko-Rezeptor benötigt. Dabei spielt die zytoplasmatische Domäne von CD44 eine essentielle Rolle. Für die Aktivierung von c-Met wird sie hingegen nicht benötigt (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002). Für die Weiterleitung des Signals ist weiterhin die Bindung eines Proteins der ERM-Familie an die zytoplasmatische Domäne von CD44 erforderlich. In den untersuchten Zelllinien (BSp73AS, 293 und HT-29) ist Ezrin deren Hauptvertreter.

Um zu bestimmen ob eine Bindung von Ezrin an die zytoplasmatische Domäne von CD44v6 für die c-Met -Signaltransduktion ausreichend ist oder der zytoplasmatischen Domäne noch andere Aufgaben zukommen, wurde Ezrin in einem Fusionskonstrukt direkt an den C-Terminus der transmembranen Domäne von CD44v6 gekoppelt. Außerdem sollte in dem Fusionsprotein die Aufgabe der N-terminalen Domäne und der Aktin-Bindestelle von Ezrin bei der c-Met-Signaltransduktion untersucht werden.

3.1.1 Klonierung des CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Fusionskonstruktes

Die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) c-Met durch HGF/SF erfordert eine v6-enthaltende Isoform von CD44, die als Ko-Rezeptor fungiert. Für das Fusionskonstrukt aus CD44 und Ezrin wurde die CD44v4-7 Isoform gewählt, welche v6 enthält und bereits in dem Vektor pGKS6-CD44v4-7 (Ratte) (SLEEMAN *et al.*, 1997) als cDNA vorlag.

CD44v4-7 Δ cyt wurde mit Hilfe einer PCR aus dem Vektor pGKS6-CD44v4-7 amplifiziert (**Abb. 3-1A**). Der Rückwärts-Primer bindet am 3' Ende der transmembranen Domäne, sodass die zytoplasmatische Domäne in der PCR nicht mit eingeschlossen wurde. Für die Sub-Klonierung wurde zusätzlich eine *Hind*III-Schnittstelle in den Rückwärts-Primer eingefügt. Die verwendete *Taq*-Polymerase hinterließ A-Überhänge am 3' Ende des PCR-Produkts, sodass eine Insertion über

die im Vektor pCRII-TOPO (Fa. Invitrogen) enthaltenen T-Überhänge möglich war (TA-Klonierung) (**Abb. 3-1B**). Die Einbaurichtung des PCR-Produkts war von einer zusätzlich vorhandenen *HindIII*-Schnittstelle im Vektor pCRII-TOPO abhängig. Da Ezrin über *HindIII* an das C-terminale Ende von CD44v4-7 Δ cyt eingefügt werden sollte, mussten sich sowohl die durch den Rückwärts-Primer eingefügte als auch die Vektor-eigene *HindIII*-Schnittstelle 3' bezüglich CD44v4-7 Δ cyt befinden (**Abb. 3-1B**).

Ezrin wurde aus einem pCDNA 3.1-Vektor mit der kompletten cDNA von Ezrin (aus der Ratte) (unveröffentlicht, Olivier von STEIN) amplifiziert (**Abb. 3-1C**). In den Vorwärts-Primer wurde eine *HindIII*-Schnittstelle eingefügt, der Rückwärts-Primer enthielt die Sequenz des VSV-G (Vesikular Stomatitis Viral G-Protein) Tags, gefolgt von einer *EcoRI*- und einer *HindIII*- Schnittstelle. Der VSV-G Tag wurde angefügt um eine unabhängige und effiziente Detektion des Fusionsproteins zu ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls über TA-Klonierung in den Vektor pCRII-TOPO eingefügt (**Abb. 3-1D**).

Anschließend wurde Ezrin über die beiden inserierten *HindIII*-Schnittstellen aus dem Vektor pCRII-TOPO - Ezrin ausgeschnitten und 3' von CD44v4-7 Δ cyt in den pCRII-TOPO eingefügt (**Abb. 3-1E**). Die *HindIII*-Schnittstellen waren so aufeinander abgestimmt, dass eine Ligation von Ezrin im Leseraster von CD44v4-7 Δ cyt stattfand, was durch eine Sequenzierung bestätigt wurde. Die korrekte Orientierung der Insertion wurde durch einen Kontrollverdau überprüft.

Das Fusionskonstrukt bestehend aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin wurde dann über die beiden *EcoRI* Schnittstellen 5' und 3' des Konstrukts in die *EcoRI*-Schnittstelle der *multiple cloning site* des Vektors pLPCX (Fa. Clontech) eingefügt (**Abb. 3-1F**). Eine der beiden verwendeten *EcoRI*-Schnittstellen stammte aus dem pCRII-TOPO Vektor, die andere wurde über den verwendeten Rückwärts-Primer 3' von Ezrin inseriert. Die Fusion aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin wurde so eingefügt, dass sich ihre Expression unter der Kontrolle des Promotors $P_{CMV IE}$ befindet (**Abb. 3-1G**). Die korrekte Ligation wurde über einen Kontrollverdau bestätigt.

Der Vektor pPLCX wurde gewählt, um gegebenenfalls ein Transfer mit Hilfe von Retroviren durchführen zu können. In den durchgeführten Experimenten wurde allerdings auf das Transfektionssystem der Firma Amaxa Biosystems zurückgegriffen, da bei geringerem Aufwand die Transfektions-Effizienz ausreichend war.

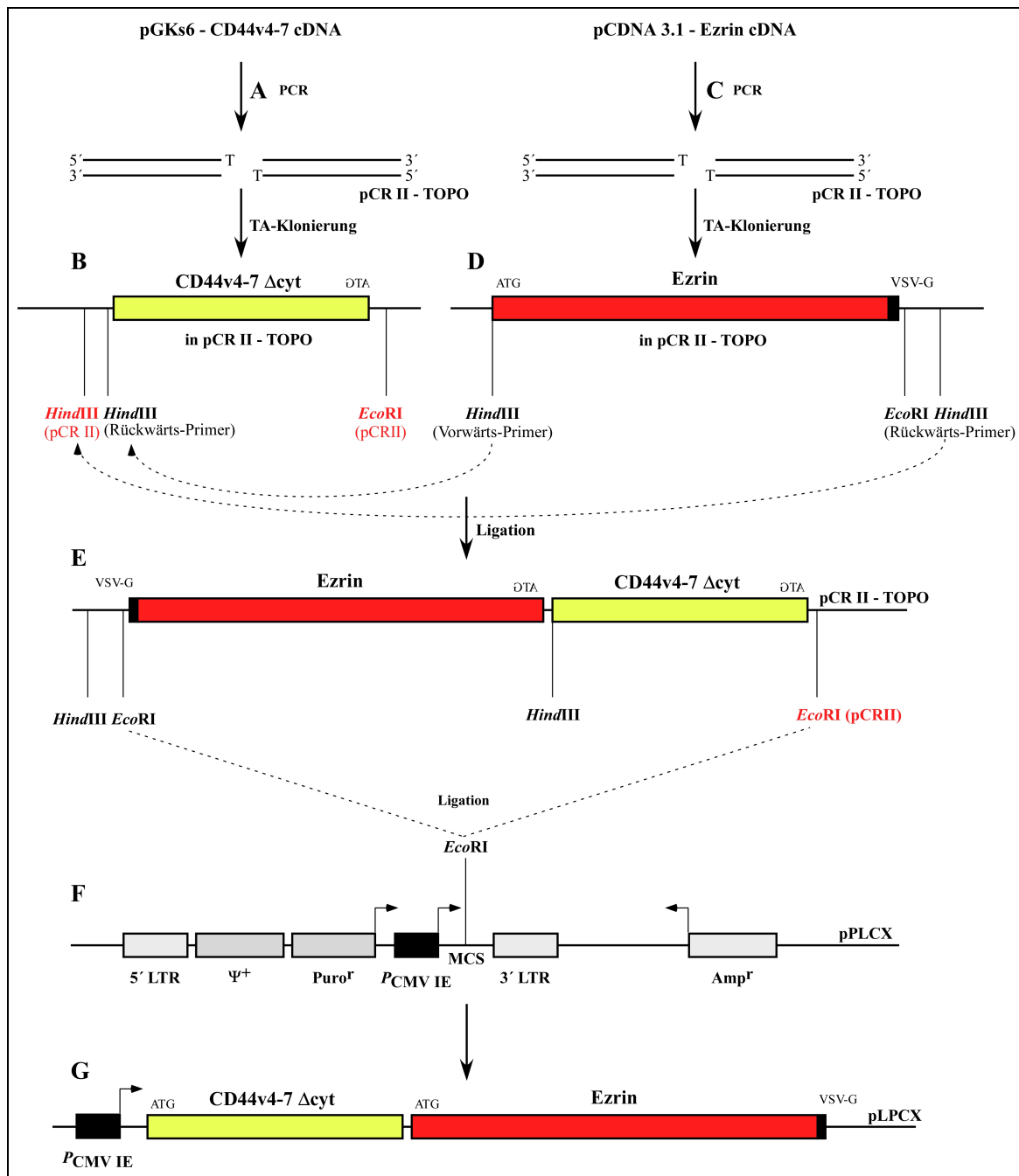


Abbildung 3-1: Schema der Klonierung des Fusionskonstruktes CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin -VSV-G. CD44v4-7 Δ cyt wurde aus dem Vektor pGKs6, der die CD44v4-7 cDNA aus der Ratte enthält, amplifiziert (A) und in einen pCRII-TOPO-Vektor eingefügt (B). Ezrin wurde aus einem pCDNA3.1-Ezrin cDNA-Vektor isoliert (C) und ebenfalls in einen pCRII-TOPO-Vektor inseriert (D). Über den Rückwärts-Primer wurde zusätzlich ein VSV-G Tag an das 3' Ende von Ezrin eingefügt. Ezrin wurde dann über die in Vorwärts- und Rückwärts-Primer eingefügten HindIII-Schnittstellen im Anschluss an CD44v4-7 Δ cyt ligiert (E). Das komplette Fusionskonstrukt wurde anschließend über zwei EcoRI-Schnittstellen in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pLPCX ligiert (F), wo es unter der Kontrolle des $P_{CMV IE}$ -Promotors steht. Zur besseren Orientierung sind die aus dem Vektor pCRII-TOPO stammenden Restriktionsschnittstellen in Rot dargestellt.

3.1.2 Test des Fusionskonstrukts aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin auf Funktionalität

Zunächst wurde eine *in vitro*-Translation durchgeführt, um zu testen, ob das Fusionsprotein translatiert werden kann, was bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde überprüft, ob die Fusion aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin (**Abb. 3-2A**) in Zellen in der Lage ist, das durch HGF/SF induzierte Signal weiterzuleiten. Es war nicht auszuschließen, dass die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von CD44 Auswirkungen auf die Weitergabe der durch HGF/SF-induzierten Signaltransduktion haben könnte. Zudem war es ebenfalls möglich, dass durch die direkte Fusion an die transmembrane Domäne von CD44 eine Aktivierung von Ezrin aus sterischen Gründen nicht erfolgen kann. Um diesem Problem zu umgehen, wurde ein Fusionskonstrukt mit einer dominant aktiven Mutation von Ezrin hergestellt (CD44v4-7 Δ cyt-Ezrin DA, **Abb. 3-2B**). Die Mutation von T567D in Ezrin führt zu einer Pseudo-Phosphorylierung und konvertiert das Protein in einen dominant aktiven Zustand (BRETSCHER *et al.*, 2002). Im inaktiven Protein kommt es durch eine Phosphorylierung von T567, welche durch unterschiedliche Kinasen erfolgen kann, zu einer Auflösung der intramolekularen Interaktion zwischen der FERM (*four.one protein, ezrin, radixin, moesin*, auch N-ERMAD)-Domäne und der C-ERMAD (*C-ERM associated domain*), wodurch die N-terminalen Membranprotein-Bindestellen und die C-terminale Aktin-Bindestelle (ABD) frei zugänglich werden (Übersichtsartikel LOUVET-VALLÉE *et al.*, 2000).

Diese Mutation wurde mittels einer Mutagenese eingefügt. Die verwendeten Primer enthielten Sequenzen, die zu einer Mutation des für Threonin (T) kodierenden Triplets ACG zu GAC führen, welches stattdessen für Asparagin (D) kodiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt.

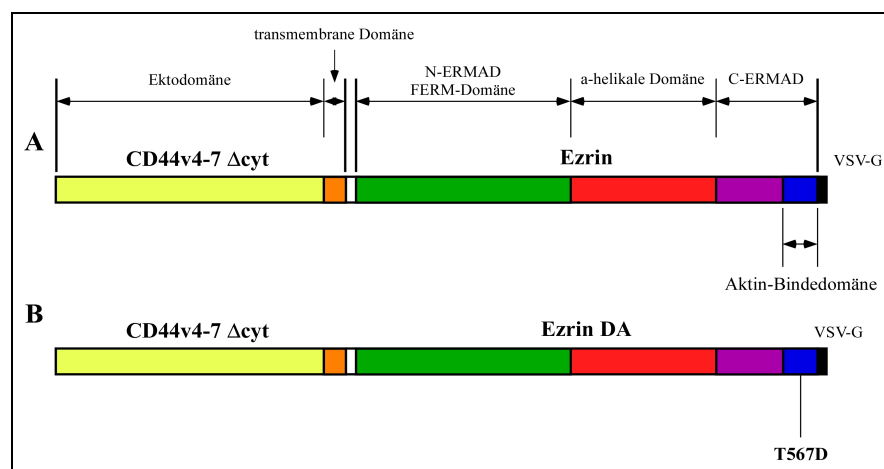


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Fusionsproteine. **A:** CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin. **B:** CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA. Durch die Mutation T567D ist Ezrin dominant aktiv.

Für den Test der Fusionskonstrukte wurden BSp73AS Zellen mit CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin, CD44v4-7 Δ cyt-Ezrin DA und dem pLPCX-Leervektor transfiziert. Die Transfektionen und Expressionsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Alexandra Matzke durchgeführt. BSp73AS Zellen sind nicht-metastasierende Zellen aus einem Adenokarzinom der Ratte (GÜNTHERT *et al.*, 1991), exprimieren kein CD44v6 und sind durch HGF/SF nicht induzierbar (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002). Nach erfolgter Transfektion der Konstrukte wurde c-Met durch die Stimulation mit HGF/SF aktiviert. Als Nachweis einer Weiterleitung des von c-Met ausgehenden Signals, wurde die Aktivierung von ERK (*extracellular signal-related kinase*, MAP-Kinase) bestimmt, welche sich in der Signalkaskade unterhalb von c-Met befindet. Zusätzlich zu den Fusionskonstrukten und dem pLPCX-Leervektor wurde ein Vektor ko-transfiziert, welcher Hämagglutinin-getaggtetes ERK (HA-ERK) exprimiert (Dr. A. ULRICH, Martinsried). Da die Transfektionseffizienz für BSp73AS Zellen gering ist, wurde durch eine Immunopräzipitation (IP) mit HA gezielt das HA-ERK angereichert, welches sich nur in transfizierten Zellen befindet.

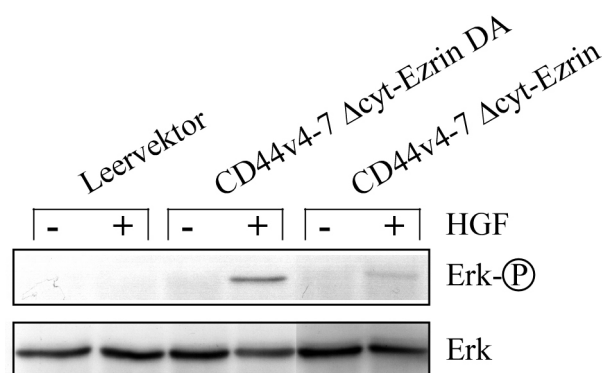


Abbildung 3-3: Test der Fusionskonstrukte CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin und CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA in BSp73AS Zellen mittels eines Western Blots. Die Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt bzw. dem pLPCX-Leervektor transient transfiziert. Ein HA-ERK exprimierender Vektor wurde zur Selektion nach transfizierten Zellen ko-transfiziert. Nach einer Immunopräzipitation mit HA wurde ein Western Blot angefertigt und phosphoryliertes ERK bzw. ERK als Ladekontrolle mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Aus **Abb. 3-3** wird ersichtlich, dass beide Fusionsproteine in der Lage sind das durch HGF/SF induzierte Signal an ERK weiterzuleiten. Die Stärke des Signals scheint bei dominant aktivem Ezrin höher auszufallen, als bei Ezrin Wildtyp, was durch dem dominant aktiven Status von Ezrin begründet werden kann. Damit wurde die Funktionsfähigkeit der Fusionskonstrukts aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin bestätigt. Zudem lässt sich aus dem Experiment schließen, dass im Fusionsprotein

Ezrin aktiviert werden kann und eine Fusion an die transmembrane Domäne von CD44 für die Weiterleitung des durch HGF/SF-induzierten Signals ausreichend ist.

3.1.3 Untersuchung der Rolle der zytoplasmatische Domäne von CD44 und der N-terminalen Domäne in Ezrin bei der Signaltransduktion von c-Met

Da sich ein Fehlen der zytoplasmatischen Domäne von CD44 nicht negativ auf die Weiterleitung des durch HGF/SF-induzierten Signals auswirkt, sollte durch eine Deletion zusätzlich die N-terminale Domäne von Ezrin entfernt werden, welche die CD44-Bindestelle enthält.

Für die Deletion des N-Terminus von Ezrin wurden im Fusionskonstrukt die ersten 258 Aminosäuren entfernt (Abb. 3-4B). Damit wurde der größte Teil der 296 Aminosäuren großen FERM-Domäne (siehe Einleitung Kapitel 1.5) samt der CD44-Bindestelle deletiert.

Um die Deletion des N-Terminus durchführen zu können, wurden mit Hilfe einer Mutagenese zwei *MluI*-Schnittstellen eingefügt. Die Positionierung erfolgte so, dass bei einem Restriktionsverdau mit *MluI* und einer anschließenden Ligation, die ersten 774 bp (entspricht 258 Aminosäuren) von Ezrin aus der Fusion entfernt wurden. Bei der Insertion der Schnittstellen wurde darauf geachtet, dass bei der anschließenden Ligation das Leseraster beibehalten wurde. Der Erfolg der Mutagenese konnte jeweils durch einen Testverdau mit *MluI* bestätigt werden. Das Konstrukt wurde durch eine Sequenzierung verifiziert.

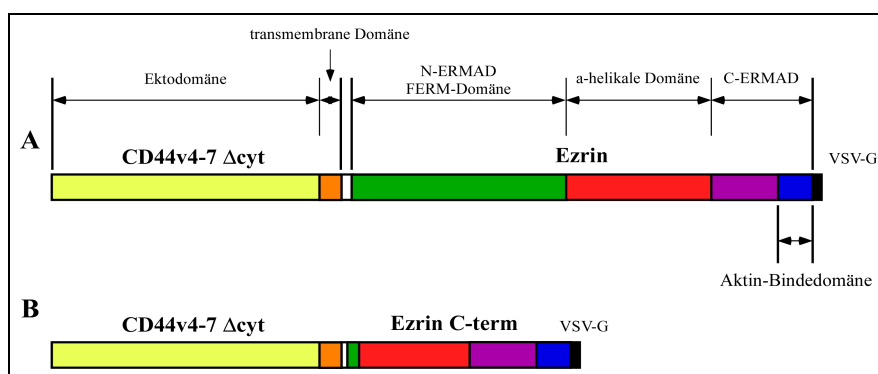


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Fusionsproteine aus CD44v4-7 Δcyt und Ezrin. **A:** Fusionsprotein aus CD44v4-7 Δcyt und unverändertem Ezrin. **B:** CD44v4-7 Δcyt - Ezrin C-term. In diesem Fusionsprotein wurden die ersten 258 Aminosäuren von Ezrin entfernt, welche die CD44-Bindestelle enthalten.

Die Fusionskonstrukte CD44v4-7 Δcyt - Ezrin C-term und CD44v4-7 Δcyt - Ezrin DA als positiv-Kontrolle sowie der pLPCX-Leervektor als negativ-Kontrolle wurden transient in die Zelllinie

BSp73AS transfiziert. Ein Vektor mit HA-ERK wurde jeweils ko-transfiziert.

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit HGF/SF stimuliert und anschließend lysiert. Für die Detektion der von c-Met ausgehenden Signalkaskade nach Induktion durch HGF/SF, wurde eine Immunopräzipitation (IP) mit einem anti-HA-Antikörper durchgeführt und aktiviertes ERK in einem Western Blot mittels eines Anti-Phospho-ERK Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an ERK durch einen ERK-spezifischen Antikörper bestimmt.

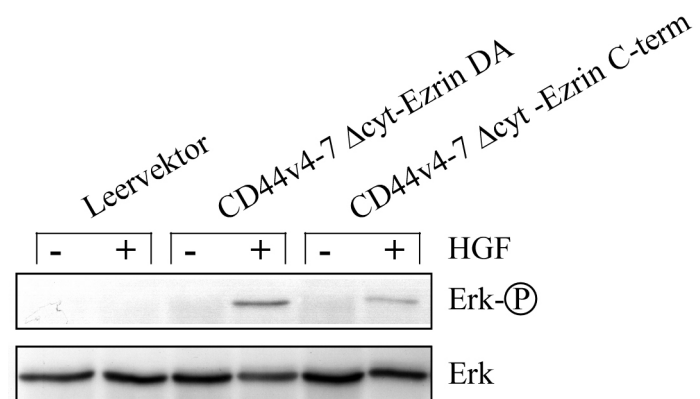


Abbildung 3-5: Western Blot-Analyse der mit Fusionskonstrukten transfizierten BSp73AS-Zellen. Das Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δcyt - Ezrin C-term, CD44v4-7 Δcyt - Ezrin DA bzw. der leere pLPCX Vektor wurden transient transfiziert. Ein Vektor mit HA-ERK wurde jeweils ko-transfiziert. Die Aktivierung von c-Met erfolgte durch HGF/SF. Ebenso wie CD44v4-7 Δcyt - Ezrin DA erlaubt CD44v4-7 Δcyt - Ezrin C-term eine HGF/SF abhängige Aktivierung der c-Met-Signaltransduktion. Aus der Menge an ERK lässt sich schließen, dass die geladenen Protein-Mengen vergleichbar sind.

Auch durch ein Fusionsprotein mit deletiertem N-Terminus von Ezrin wird das von c-Met ausgehende Signal weitergeleitet (**Abb. 3-5**). Die Stärke des Signals bei dominant aktivem Ezrin scheint höher auszufallen (**Abb. 3-5**). Wie zuvor waren Zellen mit transfiziertem Leervektor pLPCX nicht induzierbar (**Abb. 3-5**).

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die Deletion der CD44-bindenden Domäne von Ezrin im Fusionsprotein auf die Weiterleitung des durch HGF/SF-induzierten Signals nicht negativ auswirkt. Das legt nahe, dass es die Rolle der N-terminale Domäne von Ezrin ist, für die Übertragung des durch HGF/SF-induzierten Signals, die zytoplasmatische Domäne von CD44 zu binden.

3.1.4 Untersuchung der Aktin-Bindedomäne von Ezrin hinsichtlich ihrer Rolle bei der Signaltransduktion von c-Met

Nachdem in der Fusion aus CD44v4-7 und Ezrin die Weiterleitung des durch HGF/SF-induzierten Signals weder durch das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne von CD44, noch durch die Deletion der N-terminalen Domäne mit der CD44-Bindestelle von Ezrin beeinflusst war, sollte die Rolle der C-terminalen Aktin-Bindestelle von Ezrin bei der Weiterleitung der c-Met-Signaltransduktion untersucht werden. Wie alle Mitglieder der ERM-Protein-Familie besitzt Ezrin eine Aktin-Bindestelle in der C-terminalen Domäne C-ERMAD. Durch Aktivierung von Ezrin wird diese Bindestelle frei und das filamentöse (F-) Aktin kann binden. Die Aktin-Bindestelle befindet sich innerhalb der letzten 34 Aminosäuren des Proteins (TURUNEN *et al.*, 1994).

Um festzustellen, ob eine Bindung von Ezrin an das Zytoskelett für die von c-Met ausgehende Signaltransduktion notwendig ist, wurde die Aktin-Bindestelle im Fusionskonstrukt aus CD44v4-7 Δ cyt und Ezrin deletiert.

Durch das Einfügen zweier *MluI*-Schnittstellen, anschließendem Restriktionsverdau und Ligation wurden die letzten 102 bp von Ezrin entfernt, was den 34 Aminosäuren der ABD entspricht. Bei der Insertion der *MluI*-Schnittstellen wurde darauf geachtet, dass es zu einer Ligation innerhalb des Leserasters kam. Die erfolgreiche Insertion der ersten *MluI*-Schnittstelle wurde durch einen Kontrollverdau mit *MluI* nachgewiesen. Der Erfolg der zweiten Insertion einer *MluI*-Schnittstelle wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Nach dem Verdau mit *MluI* und anschließender Ligation, wurde das fertige Konstrukt CD44v4-7 Δ cyt-Ezrin Δ ABD (**Abb. 3-6B**) durch eine Sequenzierung verifiziert.

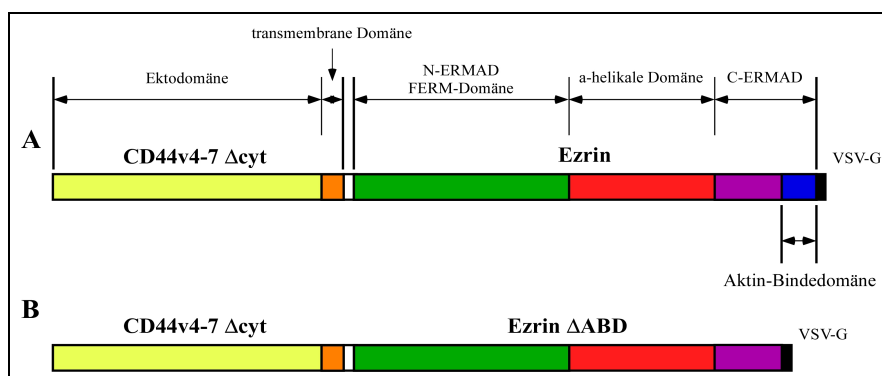


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Fusionsproteine. **A:** Fusionsprotein CD44v4-7 Δ cyt mit unverändertem Ezrin. **B:** Fusionsprotein CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin mit Deletion der Aktin-Bindedomäne von Ezrin (CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD).

Das Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD (**Abb. 3-6B**) wurde transient in BSp73AS Zellen transfiziert. Als Kontrollen wurden das Konstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA, der Vektor pGKs6 mit vollständigem CD44v4-7 und der pLPCX-Leervektor transient transfiziert. Zudem wurde wie zuvor, jeweils ein HA-ERK exprimierender Vektor ko-transfiziert. Die von c-Met ausgehende Signaltransduktion wurde durch HGF/SF induziert. Nach einer IP mit HA-spezifischem Antikörper wurden aktiviertes ERK und gesamtes ERK wie zuvor bestimmt.

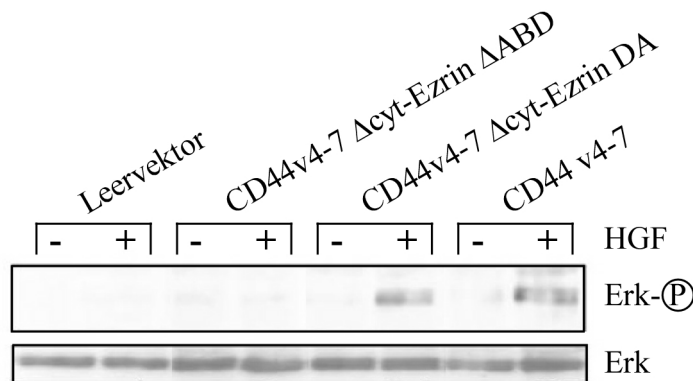


Abbildung 3-7: Western Blot-Analyse der mit Fusionskonstrukten transfizierten BSp73AS-Zellen. Transfiziert wurden die Fusionskonstrukte CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD und CD44v4-7 Ezrin DA sowie der Vektor pGKs6 mit vollständigem CD44v4-7 und der Leervektor pLPCX. Ein Vektor mit HA-ERK wurde jeweils ko-transfiziert. Die Aktivierung von c-Met erfolgte durch HGF/SF. Bei deletierter ABD von Ezrin ist die Aktivierung von ERK nicht mehr detektierbar. Ladekontrolle: ERK.

Zellen mit transient transfiziertem Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA und mit pGKs6 CD44v4-7 sind durch HGF/SF induzierbar. Wurde die ABD von Ezrin deletiert, lassen sich die Zellen nicht mehr stimulieren (**Abb. 3-7**).

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die Expression aller Fusionsproteine in BSp73AS Zellen vergleichbar ist (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Aufgabe der Bindung von Ezrin an das Zytoskelett bei der Aktivierung der c-Met-Signalkaskade

Als nächstes sollte festgestellt werden, ob das Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD aufgrund der fehlenden Aktin-Bindedomäne einen dominant-negativen Effekt auf die c-Met-

Signaltransduktion hat. Hierfür wurde auf die Zelllinie 293 (humane embryonale Nierenzellen) zurückgegriffen. In diesen Zellen ist eine endogene v6-enthaltende Isoform von CD44 als Ko-Rezeptor für die Aktivierung von c-Met notwendig (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2002).

Die 293-Zellen wurden mit den Fusionskonstrukten CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA und CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD transient transfiziert. Als Kontrolle wurde der pLPCX-Leervektor in die Zellen eingebracht. Mit jedem Vektor wurde HA-ERK ko-transfiziert. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit HGF/SF stimuliert. Die Detektion von phosphorylierter und gesamter ERK nach IP mit einem anti-HA-Antikörper erfolgte wie zuvor beschrieben. Zur Dokumentation einer Aktivierung von c-Met wurde zunächst eine IP mit c-Met-spezifischen Antikörper durchgeführt. Phosphoryliertes c-Met wurde anschließend mittels eines anti-phospho-Tyrosin-Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Die gesamte Menge an c-Met wurde nach der Immunopräzipitation durch einen c-Met-spezifischen Antikörper bestimmt.

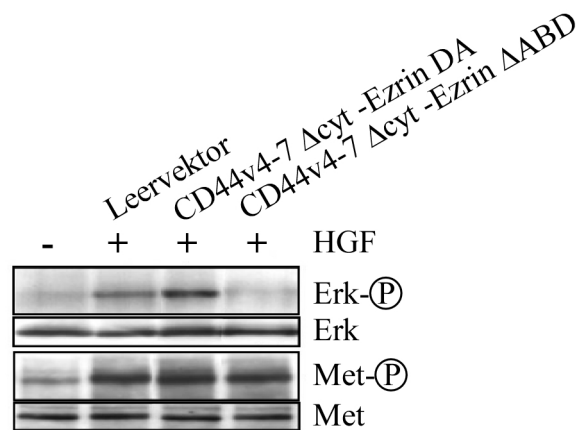


Abbildung 3-8: Western Blot-Analyse der mit Fusionskonstrukten transfizierten 293-Zellen. Transfiziert wurden die Fusionskonstrukte CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA und CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD sowie der Leervektor pLPCX. Ein Vektor mit HA-ERK wurde jeweils ko-transfiziert. Die Aktivierung von c-Met erfolgte durch HGF/SF. Wurde die ABD von Ezrin in der Fusion mit CD44v4-7 Δ cyt deletiert, so ist eine Phosphorylierung von ERK nicht mehr detektierbar. Eine Aktivierung von c-Met kann hingegen detektiert werden. Die geladenen Proteinmengen sind vergleichbar. Ladekontrolle: HA-ERK und endogenes c-Met.

Nach Transfektion des pLPCX-Leervektors sind die 293-Zellen wie erwartet durch HGF/SF induzierbar. Dabei kann auch die Aktivierung von c-Met detektiert werden (**Abb. 3-8**). Nach einer Transfektion des Fusionskonstrukts mit dominant aktivem Ezrin (CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA) kommt es nach einer Stimulation durch HGF/SF zu einer stärkeren Aktivierung von ERK. Auch

hier kann die Aktivierung von c-Met detektiert werden (**Abb. 3-8**). Nachdem das Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD in die Zellen eingebracht wurde, ist eine Phosphorylierung von ERK nicht nachweisbar. Die Aktivierung von c-Met ist hingegen weiterhin detektierbar (**Abb. 3-8**). Dies weist darauf hin, dass es durch das Fehlen der Aktin-Bindedomäne von Ezrin zu einer Blockierung der Signalkaskade zu ERK kommt. Daher scheint eine Bindung von Ezrin an das Zytoskeletts über F-Aktin für die c-Met Signaltransduktion essentiell zu sein.

3.1.6 HGF/SF-induzierte Dissoziation von Zellen erfordert die Assoziation des ERM-Proteins Ezrin an das Zytoskelett

Als Reaktion auf die Aktivierung von c-Met durch HGF/SF lässt sich bei epithelialen Zellen das sogenannte "*scattering*" beobachten. Dabei lösen sich die Zellen aus dem Verband und vereinzeln sich.

In diesem Zusammenhang sollten die Auswirkungen einer Deletion der Aktin-Bindedomäne von Ezrin durch Überexpression des Fusionsproteins CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD auf das HGF/SF-induzierte "*scattering*" untersucht werden. Durch die Blockierung der c-Met-Signaltransduktion würde man ebenfalls eine Blockierung des "*scattering*" erwarten.

Die humanen HT29 Zellen stammen aus einem Karzinom des Dickdarms und wachsen in der Abwesenheit von HGF/SF in Klumpen. Auf eine Stimulation durch HGF/SF kann das "*scattering*" der Zellen beobachtet werden.

HT29-Zellen wurden mit den Fusionskonstrukten CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA, CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD und dem pLPCX-Leervektor transient transfiziert und mit HGF/SF das Streuen der Zellen induziert.

Bei Zellen, die mit dem Fusionskonstrukt CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA oder mit dem pLPCX-Leervektor transfiziert wurden, konnte ein HGF/SF-induziertes Streuen beobachtet werden. Wurde hingegen CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD in die Zellen eingebracht, konnte auf Stimulation mit HGF/SF kein Vereinzeln mehr dokumentiert werden (**Abb. 3-9**).

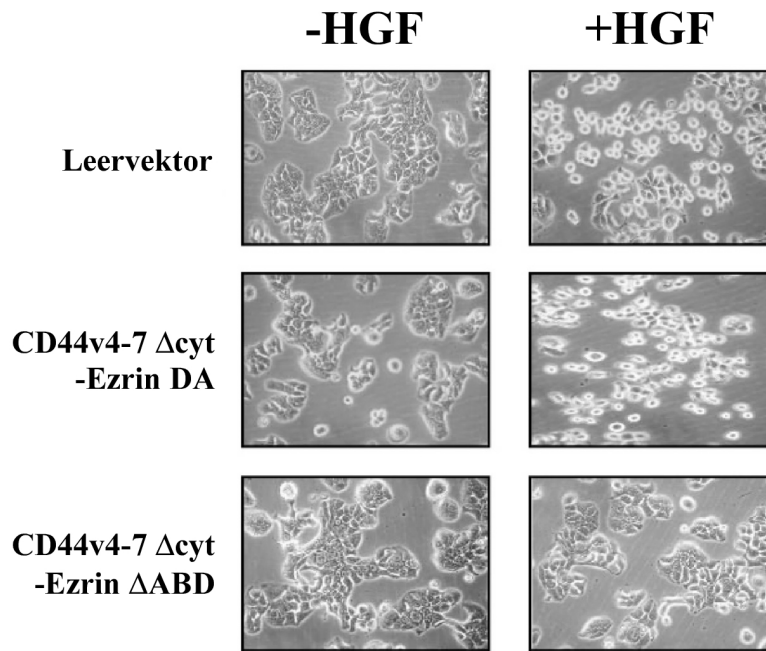


Abbildung 3-9: "scattering assay". Durch HGF/SF-induziertes Streuen von HT-29-Zellen. Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen von Lebendkulturen. Die Zellen wurden mit den Fusionskonstrukten CD44v4-7 Δcyt - Ezrin DA, CD44v4-7 Δcyt -Ezrin ΔABD sowie dem Leervektor pLPCX transfiziert. Nach Transfektion des Fusionskonstrukts CD44v4-7 Δcyt -Ezrin ΔABD, bei der die Aktin-Bindedomäne von Ezrin entfernt wurde, kann ein HGF/SF-induziertes Streuen der HT29-Zellen nicht mehr beobachtet werden. Vergrößerung 40x.

Im "scattering assay" lässt sich die Blockierung der c-Met-Signaltransduktion durch Überexpression eines Fusionsproteins aus CD44v4-7 Δcyt und Ezrin mit einer Deletion in der ABD bestätigen. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von Ezrin an das Zytoskelett für die Weiterleitung des Signals nach einer Stimulation von c-Met durch HGF/SF essentiell ist.

3.2 Etablierung eines konditionellen Knockout von CD44 in Mäusen

Eine Möglichkeit einer konditionellen Inaktivierung eines Gens basiert auf der induzierbaren Deletion (Exzision) einer durch LoxP-Rekombinationsstellen flankierten DNA-Sequenz durch das Enzym *Cre-Rekombinase*. Die DNA-Sequenz wird so gewählt, dass ihre Deletion zu einer Inaktivierung des Gens führt. Diese Inaktivierung wird durch die Expression der *Cre-Rekombinase* kontrolliert und kann direkt in der Maus aktiviert werden.

Die Insertion der für die Inaktivierung notwendigen LoxP-Rekombinationsstellen in die endogenen Sequenzen geschieht über homologe Rekombination. Dazu müssen zunächst die endogene Sequenzen des Gens isoliert werden. *In vitro* werden dann die LoxP-Sequenzen und alle anderen notwendigen Komponenten eingefügt und in einen Knockout-Vektor kloniert. Der Gen-Ersatz der endogenen Sequenzen durch die mutierten Sequenzen des Knockout-Vektors geschieht in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus. Da homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen sehr selten stattfindet und DNA stattdessen mit einer viel größeren Wahrscheinlichkeit nicht-homolog inseriert wird, werden Selektionsmarker eingesetzt, welche eine Selektion nach Zellen mit homologer Integration erleichtern. Das *Neomycin*-Resistenzgen fungiert als positiver Selektionsmarker für die Transfektion der Vektorsequenzen, während das Gen für das Enzym *Thymidin-Kinase* (TK) als negativer Selektionsmarker verwendet wird, der nur aktiv sein sollte, wenn es zu einer nicht-homologen Insertion kam.

Zellen mit einer homologen Integration der mutierten Sequenzen werden dann in Blastozysten transferiert, wo sie in die innere Zellmasse integrieren und an der Entwicklung teilnehmen. Aufgrund ihrer Totipotenz kann es dabei zu einer Keimbahntransmission der veränderten ES-Zellen kommen, wodurch es möglich wird eine homozygote Mauslinie mit der Mutation zu etablieren. Homozygote Mäuse, welche LoxP-Rekombinationsstellen enthalten, die eine essentielle Sequenz des Zielgens flankieren, durch dessen Deletion es zur Inaktivierung des Gens kommt, bezeichnet man als "gefloxt". Zur Aktivierung des Knockouts werden diese "gefloxten" Mäuse mit anderen Mäusen gekreuzt, die das Enzym *Cre-Rekombinase* unter einem spezifischen Promotor exprimieren. In den Nachkommen kommt es, katalysiert durch das Enzym *Cre-Rekombinase*, deren Expression abhängig von der Aktivität des gewählten Promotors ist, zur Inaktivierung des Zielgens. Für die konditionelle Inaktivierung des Gens CD44 wurde die Exzision von Exon 3 durch das *Cre-LoxP*-System gewählt (**Abb. 3-10**). Für die Inaktivierung sind zwei LoxP-Rekombinationsstellen notwendig, welche Exon 3 flankieren. Exon 3 ist eines der konstanten Exons des CD44-Gens und

wird in jeder Isoform von CD44 integriert. Bei der Transkription des CD44-Gens kommt es durch das Fehlen von Exon 3 (137 bp) zu einer Verschiebung im Leseraster, aus der ein vorzeitiges Stopp-Kodon resultiert. Die gebildete *nonsense*-mRNA wird durch einen zelleigenen Kontrollmechanismus (*nonsense mediated RNA decay*, NMD) vor Beginn der Translation abgebaut (Abb. 3-10).

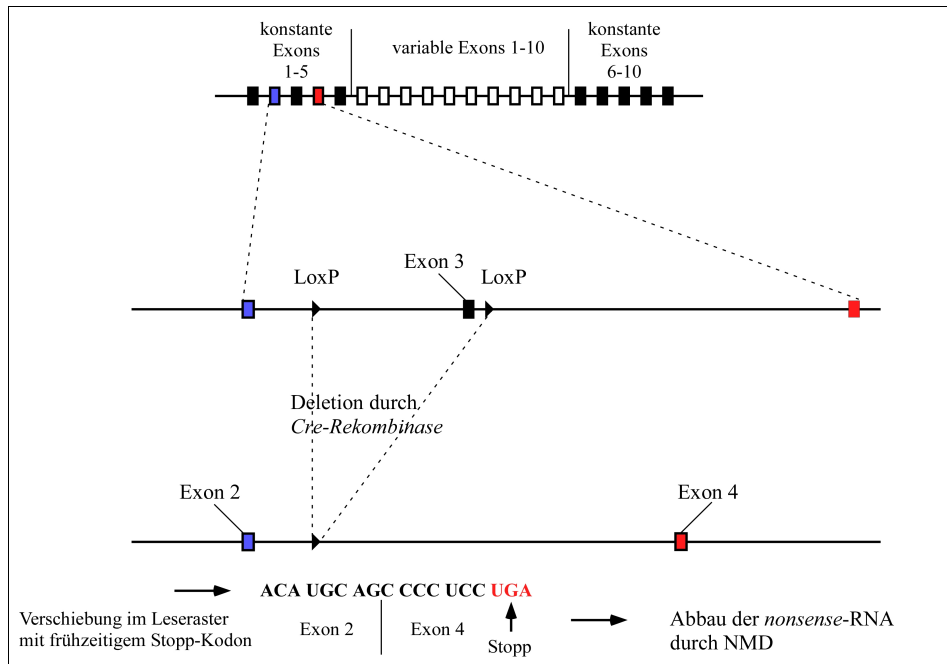


Abbildung 3-10: Strategie für den konditionellen Knockout von CD44. Die Deletion von Exon 3 durch Rekombination zwischen den beiden flankierenden LoxP-Stellen führt zu einer Verschiebung im Leseraster, die ein vorzeitiges Stopp-Kodon zur Folge hat. Die gebildete *nonsense*-RNA wird durch NMD abgebaut.

3.2.1 Klonierung des Konstrukts für die konditionelle Inaktivierung von CD44

Um die LoxP-Rekombinationsstellen in die genomische DNA von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus einzufügen, muss zunächst ein Vektor kloniert werden, in dem diese von homologen Sequenzen umgeben sind, welche in ES-Zellen die endogenen Sequenzen durch homologe Rekombination ersetzen können (siehe **Abb. 3-10**). Da homologe Rekombination bei eukaryotischen Zellen sehr selten vorkommt, werden zusätzlich Selektionsmarker eingefügt, welche die Selektion nach homologer Rekombination erleichtern.

Als Basis für den Knockout-Vektor wurde in der vorliegenden Arbeit der Vektor pTVFlox-0 verwendet (**Abb. 3-11**). Dieser beinhaltet das *Neomycin*-Resistenzgen als positiven Selektionsmarker, welches von zwei LoxP-Sequenzen flankiert wird, sowie das *Thymidin Kinase*-Gen, welches als negativer Selektionsmarker fungiert. In diesen Vektor wurden nun die homologen Sequenzen eingefügt, die unter anderem Exon 3 von CD44 enthielten. Zusätzlich musste eine LoxP-Rekombinationsstelle 3' von Exon 3 inseriert werden. Alle diese genomischen DNA-Fragmente stammen aus einem Vektor mit genomischen Sequenzen des Gens CD44, in dem auch die zusätzlich benötigte LoxP-Sequenz bereits 3' von Exon 3 eingefügt war. Dieser Vektor wird im Folgenden als pCD44-KO bezeichnet und enthält 10,7 kb genomischer Sequenzen des CD44-Gens (Mauslinie 129/Ola), die Exon 2 und 3 beinhalten (unveröffentlicht, Thérèse TOUCHY, Beaverton, USA).

Für eine konditionelle Inaktivierung müssen die LoxP-Rekombinationsstellen durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingefügt werden. Im Knockout-Vektor werden sie daher von einer kurzen und einer langen homologen DNA-Sequenz flankiert, welche die endogenen Sequenzen ersetzen sollen und so den Einbau der LoxP-Rekombinationsstellen ermöglichen. Diese homologen DNA-Abschnitte werden im Folgenden als kurzer und langer homologer Arm bezeichnet (**Abb. 3-11**).

Für die Klonierung des Knockout-Vektors wurde der kurze homologe Arm von CD44 aus dem Vektor pCD44-KO über die Restriktionsschnittstellen *PspOMI* und *NheI* ausgeschnitten und über die beiden Schnittstellen von *NotI* und *XbaI* in den Vektor pTVFlox-0 5' der *Neo*-Kassette ligiert (**Abb. 3-11**). Zu Beginn der Arbeit lag dieser Vektor (pTVFlox-s.a.) bereits vor.

Der lange homologe Arm wurde mit *HpaI* und *BamHI* aus dem Vektor pCD44-KO herausgeschnitten (**Abb. 3-11**). Für die Insertion in pTVFlox-s.a über die Restriktionsschnittstellen *HpaI* und *BglII*, die 3' der *Neo*-Kassette lokalisiert waren, musste der Vektor durch einen partiellen

Verdau mit *Bgl*III zunächst linearisiert werden, da im vorhandenen kurzen homologen Arm ebenfalls eine *Bgl*III-Schnittstelle vorhanden war. Die für eine Linearisierung optimale Inkubationszeit des Enzyms wurde bestimmt, und der Vektor unter den ermittelten Konditionen verdaut. Die *Bgl*III-verdaute lineare Vektor-DNA wurde aus dem Agarosegel isoliert und mit *Hpa*I geschnitten. Über die Größe der Fragmente ließ sich feststellen, an welcher der beiden *Bgl*III-Schnittstelle das Enzym geschnitten hatte, und das richtige Fragment wurde aufgrund seiner Größe identifiziert. Der *Hpa*I und *Bam*HI-geschnittene lange homologe Arm wurde daraufhin in den *Bgl*III und *Hpa*I verdauten Vektor pTVFlox-s.a. ligiert (**Abb. 3-11**).

Eine Möglichkeit zur Detektion einer homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist die *nested* PCR. Dabei wird üblicherweise eine Sequenz amplifiziert, die sich über den kurzen homologen Arm erstreckt. Deshalb wurde zur Steigerung der Effizienz der PCR der kurze homologe Arm nachträglich von seiner ursprünglichen Größe von 3638 bp auf 1820 bp gekürzt (**Abb. 3-11**). Die neue Größe entspricht der eines kurzen homologen Arms in einem üblichen Knockout-Konstrukt. Das Kürzen wurde durch Herausschneiden des 5' Endes des kurzen homologen Arms mit den Enzymen *Cla*I und *Sfi*I erreicht. *Cla*I schneidet 20 bp 5' des kurzen homologen Arms in den Vektorsequenzen des pTVFlox-s.a., während *Sfi*I in den genomischen Sequenzen des kurzen Homologie-Arms schneidet.

Nach der Ligation wurde über zahlreiche Testverdau mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und anschließender Sequenzierung der LoxP-Sequenzen, der *Neo*-Kassette, Exon 3 und der Übergänge vom pTVFlox in die genomische Sequenzen, der Erfolg der Klonierung bestätigt. Das so erhaltene Konstrukt wird im Folgenden als pCD44-cko bezeichnet (**Abb. 3-11**).

Im Knockout Vektor wird das *Neomycin*-Resistenzgen, welches als positiver Selektionsmarker fungiert, von homologen Sequenzen flankiert (**Abb. 3-11**). Daher wird es sowohl bei einer nicht-homologen, als auch bei einer homologen Integration, in die genomische DNA inseriert. Durch Zugabe des *Neomycin*-Analoges G418 wird daher nach Zellen mit einer Integration des Vektors selektioniert. Als negativer Selektionsmarker wird das Gen *TK* im Vektor außerhalb der homologen Sequenzen platziert (**Abb. 3-11**), sodass es nur bei einer nicht-homologen Integration inseriert wird, da hier immer eine Rekombination der gesamten Vektor-DNA stattfindet. Durch die Zugabe von Ganciclovir (GCV) kommt es nur bei einer Integration des aktiven *TK*-Gens zu einem vorzeitigen Abbruch der DNA-Synthese und damit zum Tod der Zelle. Daher kann durch die Addition von GCV eine gezielte Selektion nach Zellen mit einer homologer Integration stattfinden.

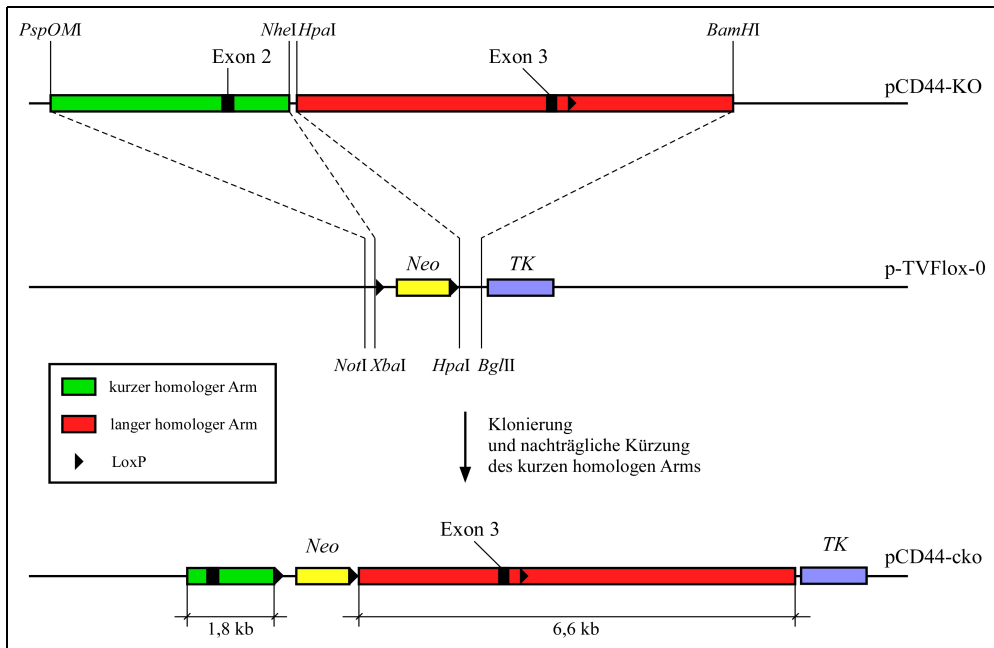


Abbildung 3-11: Schema für die Klonierung des Vektors pCD44-cko. Beschreibung im Text.

3.2.2 Test des Knockout-Konstrukts pCD44-cko

3.2.2.1 Test der LoxP-Rekombinationsstellen *in vitro*

Vor der Transfektion des Konstruktes pCD44-cko in ES-Zellen wurde die Funktionsfähigkeit der LoxP-Rekombinationsstellen *in vitro* getestet. Bei einer Anordnung von drei LoxP-Rekombinationsstellen kann es, katalysiert durch das Enzym *Cre-Rekombinase*, zu drei unterschiedlichen Rekombinationsereignissen kommen (**Abb. 3-12**).

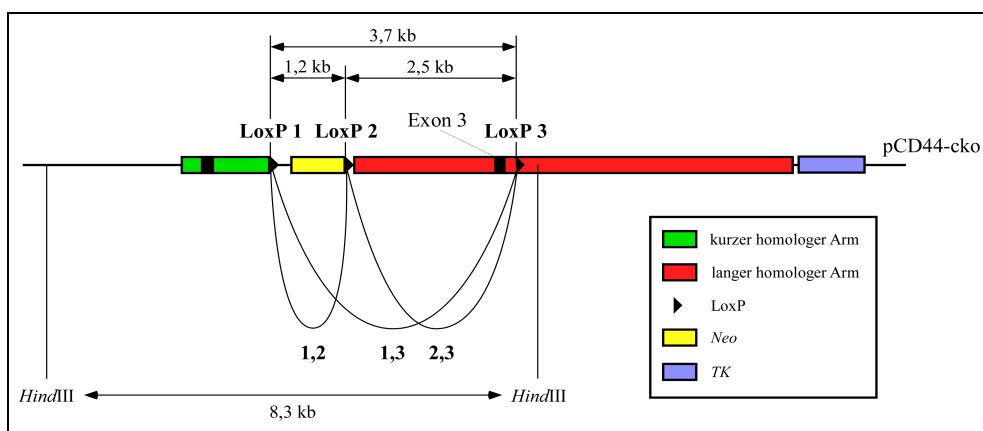


Abbildung 3-12: Rekombinationsmöglichkeiten bei pCD44-cko. Die verschiedenen Rekombinationsereignisse lassen sich durch einen Verdau mit dem Enzym *HindIII* aufgrund unterschiedlicher Fragmentgrößen voneinander unterscheiden.

Für den *in vitro*-Test der LoxP-Sequenzen im pCD44-cko wurde die Rekombination direkt durch Zugabe des Enzyms *Cre-Rekombinase* induziert. Da der Vektor nach einer Rekombination weiterhin zirkulär bleibt, konnten die Plasmide direkt in Bakterien transformiert und Bakterienklone isoliert werden. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurden die Orte der Rekombination mittels eines Testverdaus mit *HindIII* bestimmt (**Abb. 3-12 und 3-13**). Findet keine Rekombination statt, hat das indikative Fragment eine Größe von 8,3 kb (**Abb. 3-12**). Dies konnte in Spur 1, 3, 6, 7, 9, 11 und 18 beobachtet werden (siehe **Abb. 3-13**). Die Fragmentgröße beträgt bei einer Rekombination zwischen den LoxP-Sequenzen 1 und 2 7,1 kb (Spur 10, siehe **Abb. 3-13**), zwischen LoxP 2 und 3 5,7 kb (Spur 5, 8 und 12, siehe **Abb. 3-13**) sowie zwischen LoxP 1 und 3 4,6 kb (Spur 13 und 16, siehe **Abb. 3-13**).

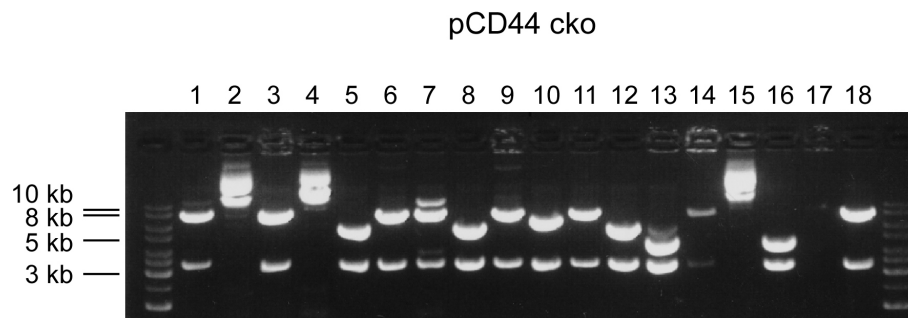


Abbildung 3-13: Testverdau von 18 Plasmid-DNAs (pCD44-cko) mit *Hind*III nach erfolgter Rekombination. Aus den Fragmentgrößen lässt sich das Rekombinationsereignis identifizieren. **Keine Rekombination** (Fragmentgröße 8,3 kb): Spur 1, 3, 6, 7, 9, 11, 18. **Rekombination zwischen LoxP1 und 2** (Fragmentgröße 7,1 kb): Spur 10. **Rekombination zwischen LoxP2 und 3** (Fragmentgröße 5,7 kb): Spur 5, 8, 12. **Rekombination zwischen LoxP1 und 3** (Fragmentgröße 4,6 kb): Spur 13, 16. Vergleiche Abb. 3-9.

Mit diesen Tests ließen sich sämtliche erwarteten Kombinationsmöglichkeiten detektieren. Somit konnte die volle Funktionsfähigkeit der LoxP-Sequenzen *in vitro* bestätigt werden.

3.2.2.2 Test des Knockout-Konstruktes pCD44-cko auf Funktionalität in CCE ES-Zellen

Die erfolgreiche homologe Rekombination einer veränderten DNA-Sequenz in endogene DNA hängt hauptsächlich von der Rekombinationsfähigkeit der homologen Sequenzen des Konstruktes ab.

Das Konstrukt pCD44-cko wurden zunächst in CCE ES-Zellen getestet. Diese Zellen sind einfach zu handhaben, besitzen aber nicht die Fähigkeit Keimbahnzellen zu bilden, d.h. sie sind für die Etablierung einer transgenen Mauslinie nicht geeignet (Quelle: E. WAGNER, IMP, Wien). Allerdings können sie zur Bestimmung der Rekombinationsrate des Konstrukts und zum Testen der Funktionsfähigkeit der LoxP-Rekombinationsstellen in ES-Zellen genutzt werden.

Für eine homologe Integration wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Bsa*I linearisiert und anschließend aufgereinigt. 25 µg des linearisierten Vektors wurden daraufhin in CCE ES-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle der Selektion wurden Zellen ohne Vektor-DNA elektroporiert. Nach 24 h wurde die Selektion mit G418 begonnen. Auf eine negativ-Selektion mit Ganciclovir gegen eine zufällige Insertion des Vektors wurde in diesem Fall verzichtet. Nachdem alle nicht-transfizierten Zellen auf der Kontrollplatte abgestorben waren, wurden 384 der selektionierten Klone von den Platten isoliert. Jeder einzelne Klon wurde halbiert und auf zwei 96-well Platten aufgeteilt. Die eine

Ergebnisse

Hälfte wurde kultiviert und zur Erhaltung der Klone eingefroren. Die andere Hälfte wurden hochgezogen und mittels eines Mini-Southern Blot auf homologe Integration der homologen Sequenzen des Konstrukts getestet. Für den Southern Blot wurde eine *AccI*-Restriktionsschnittstelle genutzt, die zusammen mit der *Neo*-Kassette eingefügt wurde (**Abb. 3-14**). Bei einer homologen Integration wird daher ein Fragment von 7,0 kb statt eines von 12,5 kb erwartet (**Abb. 3-14**).

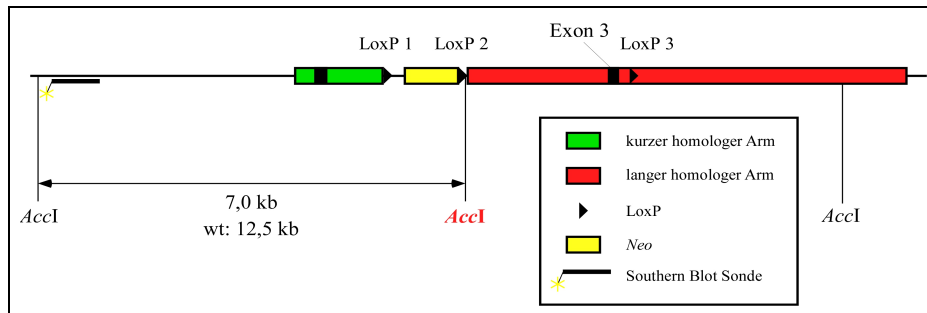


Abbildung 3-14: Schema für den Nachweis einer homologen Rekombination mittels eines 5' Southern Blots. Durch die Insertion der *Neo*-Kassette ist eine zusätzliche *AccI*-Schnittstelle vorhanden. Die Sonde SB1 bindet 5' der Insertion.

Die genomische DNA wurde isoliert, mit *AccI*-verdaut und im Southern Blot auf homologe Rekombination getestet. In der folgenden Abbildung (**Abb. 3-15**) ist das Ergebnis der Analyse gezeigt.

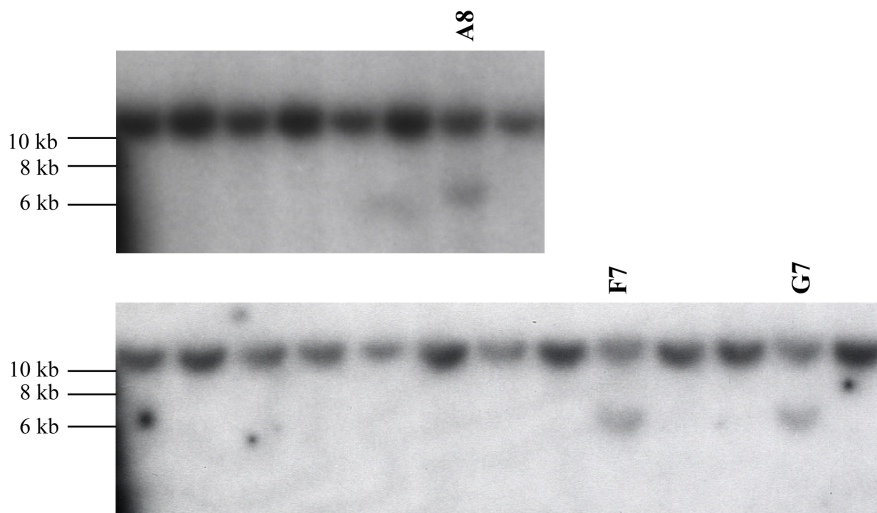


Abbildung 3-15: Nachweis der homologen Rekombination mittels eines Mini-Southern Blots. Isolierte genomische DNA wurde über ein 0,8 % -iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mit der [α - 32 P]-markierten Sonde SB1. Erwartete Banden: 12,5 kb Wildtyp Allel, 7,0 kb verändertes Allel.

Homologe Rekombination findet nur in einem Allel statt. Daher wird im Southern Blot, bei einer homologen Integration, neben der Banden für das veränderte Allel (7,0 kb) auch eine Bande für das Wildtyp-Allel (12,5 kb) detektierbar sein. Drei Klone (A8, F7 und G7) zeigen neben der Wildtyp-

Bande auch die zweite kleinere Bande von 7,0 kb, die bei einer homologen Integration auf einem Allel erwartet wird (**Abb. 3-15**).

Um das Ergebnis dieses 5' Southern Blots zu verifizieren, wurde ein weiterer Southern Blot durchgeführt, bei dem die radioaktiv markierte DNA-Sonde 3' der Insertionsstelle bindet (**Abb. 3-16**). Hierfür wurde eine *ApaI*-Schnittstelle verwendet, die durch die Integration der dritten LoxP-Sequenz mit eingefügt wurde (**Abb. 3-16**). Statt einer Bande von 15,5 kb (Wildtyp Allel) ergibt sich bei einem Verdau mit *ApaI* im Falle einer homologen Rekombination ein Fragment der Größe 9,3 kb (**Abb. 3-16**).

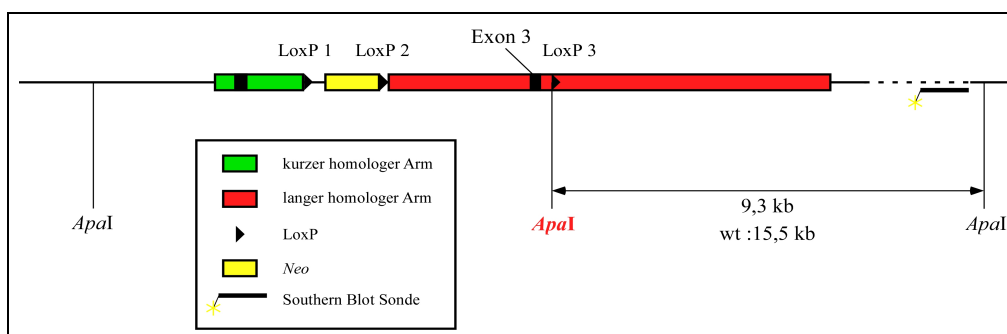


Abbildung 3-16: Schema für den Nachweis einer homologen Rekombination mittels eines 3' Southern Blots. Durch die Insertion der dritten LoxP-Sequenz entsteht eine zusätzliche *ApaI*-Schnittstelle. Durch diese erwartet man bei einer homologen Integration ein Fragment von 9,3 kb anstatt 15,5 kb Größe beim Wildtyp. Die Sonde SB2 bindet 3' der Insertion.

Für den Southern Blot wurden jeweils 15 µg genomischer DNA der Klone A8, F7 und G7 sowie als Kontrolle die DNA des negativ getesteten Klons G6 und der untransfizierten ES-Zelllinie (wt) verwendet. Die genomische DNA wurde mit *ApaI*-verdaut und im Southern Blot mit der 3' Sonde SB2 auf homologe Integration getestet (**Abb. 3-17**).

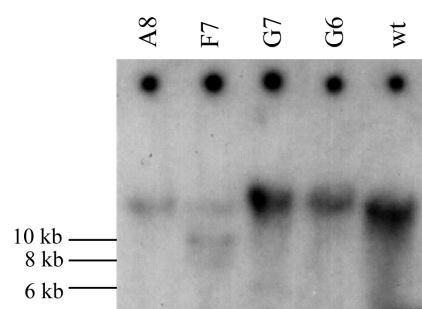


Abbildung 3-17: Nachweis der homologen Rekombination mittels eines Southern Blots. Isolierte genomische DNA wurde über ein 0,8 % -iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mit der [α - 32 P]-markierten Sonde SB2. Erwartete Banden: 15,5 kb Wildtyp Allel, 9,3 kb verändertes Allel.

Nur einer der drei zuvor mit der 5' Sonde SB1 positiv getesteten Klone (F7) zeigt die für die homologe Rekombination erwartete Bande von 9,3 kb. Sowohl die negativ-Kontrollen (G6 und wt) als auch die beiden anderen positiven Klone (A8 und G7) aus dem 5' Mini-Southern Blot weisen nur die Bande für das Wildtyp-Allel auf. Dies bedeutet, dass nur bei Klon F7 eine homologe Rekombination stattgefunden hat.

Damit konnte die Rekombinationsfähigkeit der homologen Sequenzen des Knockout-Konstrukts pCD44-cko nachgewiesen werden. Unter etwa 200 getesteten Klonen fand sich einer mit homologer Integration, die über zwei unabhängige Southern Blots nachgewiesen wurde. Damit befindet sich die Rekombinationsfrequenz von pCD44-cko in einem üblichen Bereich.

3.2.2.3 Deletion der *Neomycin*-Resistenz-Kassette in CCE ES-Zellen

Nach der homologen Integration muss der Selektionsmarker *Neo* wieder entfernt werden, da seine Expression in der Maus zu einer verminderten Aktivität des Ziel-Gens führen kann. Eine Deletion der *Neo*-Kassette wird in den ES-Zellen mit Hilfe des *Cre-LoxP*-Systems durchgeführt. Eine Rekombination zwischen den LoxP-Rekombinationstellen 1 und 2, welche durch *Cre-Rekombinase* katalysiert wird, führt zur Exzision der *Neo*-Kassette aus dem Genom der ES-Zellen (**Abb. 3-18**). Zuvor war *in vitro* die Funktionsfähigkeit der LoxP-Rekombinationstellen bestätigt worden (Kapitel 3.2.2.1).

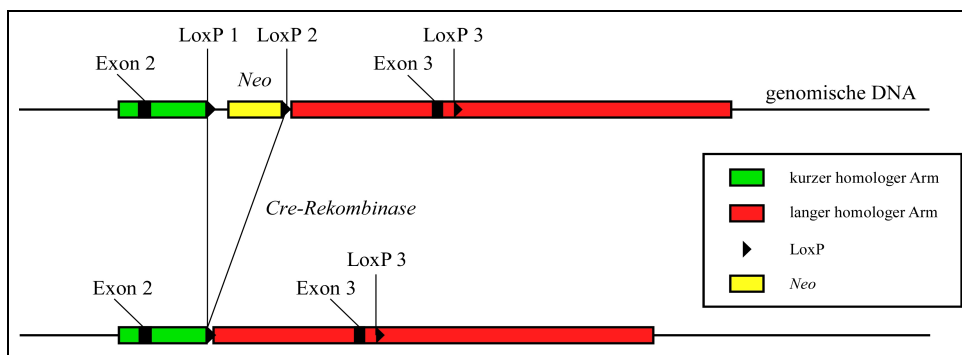


Abbildung 3-18: Schema der Deletion der *Neo*-Kassette mittels Rekombination zwischen den ersten beiden LoxP-Rekombinationsstellen (1 und 2) durch das Enzym *Cre-Rekombinase*.

Der Klon CCE F7, bei dem eine homologe Integration nachgewiesen worden war (siehe Kapitel 3.2.2.2), wurde mit dem Vektor pCMV-*Cre* transient transfiziert, von welchem das Enzym *Cre-Rekombinase* unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert werden kann. 192 Klone wurde

von den Platten isoliert, dupliziert und die Hälfte der Klone durch Zugabe von G418 auf den Verlust der *Neomycin*-Resistenz getestet. Die Duplikate der *Neomycin*-sensitiven Zellen wurden anschließend mittels einer PCR mit LoxP 1- und LoxP 2- spezifischen Primern nochmals auf den Verlust der *Neo*-Kassette analysiert. In einer zweiten PCR wurde daraufhin überprüft, ob die Sequenz zwischen LoxP 2 und 3 noch vorhanden war (**Abb. 3-19**). Der verwendete Rückwärts-Primer bindet außerhalb der inserierten Sequenzen, während der Vorwärts-Primer spezifisch an einer Sequenz 5' der LoxP-Rekombinationsstelle 3 bindet. Bei dieser Sequenz handelt es sich um nicht-genomische DNA, welche die LoxP 3-Rekombinationsstelle flankiert und bei der Klonierung der LoxP-Rekombinationsstelle in den Vektor pCD44-KO eingefügt wurde.

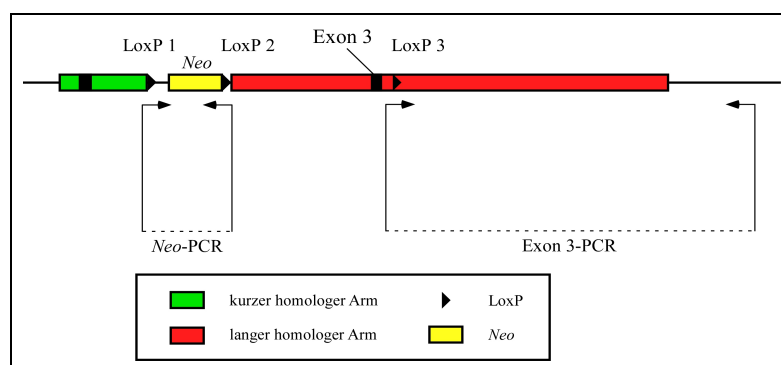


Abbildung 3-19: Detektion der spezifischen Deletion der *Neo*-Kassette mittels PCR. In der ersten PCR (*Neo*-PCR) wird bestätigt, dass die *Neo*-Kassette entfernt wurde. In einer zweiten PCR (*Exon 3*-PCR) wird analysiert, ob die *Exon 3*-enthaltende Sequenz zwischen LoxP 2 und 3 noch vorhanden ist. Der Vorwärts-Primer der zweiten PCR bindet 5' der LoxP-Stelle in der nicht-genomischen Sequenz.

Es wurden drei *Neomycin*-sensitive Zellklone (B12, F7 und H5) gefunden, die in PCRs getestet wurden. Bei dem Ausgangsklon F7 CCE und dem Knockout-Vektor pCD44-cko war die *Neo*-Kassette (1,3 kb) detektierbar, während es bei allen drei *Neomycin*-sensitiven Klonen wie erwartet zum Verlust der *Neo*-Kassette gekommen war (siehe **Abb. 3-20A**). In der zweiten PCR konnte eine spezifische Rekombination zwischen LoxP 1 und 2 hingegen nur bei Klon H5 nachgewiesen werden (siehe **Abb. 3-20B**). Hier trat die erwartete Bande von 5,4 kb auf. Bei den Klonen B12 und F7 fand stattdessen offensichtlich eine Deletion der von LoxP 1 und 3 flankierten Sequenz statt.

Zusammenfassend konnte mittels einer Southern Blot-Analyse von beiden Seiten der Integration bestätigt werden, dass die homologen Sequenzen des Konstrukts in der Lage sind mit den endogenen Sequenzen homolog zu rekombinieren. Außerdem wurde durch PCR-Analyse gezeigt, dass es möglich ist die *Neo*-Kassette gezielt zu deletieren.

Ergebnisse

Da die CCE-ES-Zellen jedoch nicht zur Etablierung einer transgenen Mauslinie geeignet sind, musste das Konstrukt in andere ES-Zellen eingebracht werden.

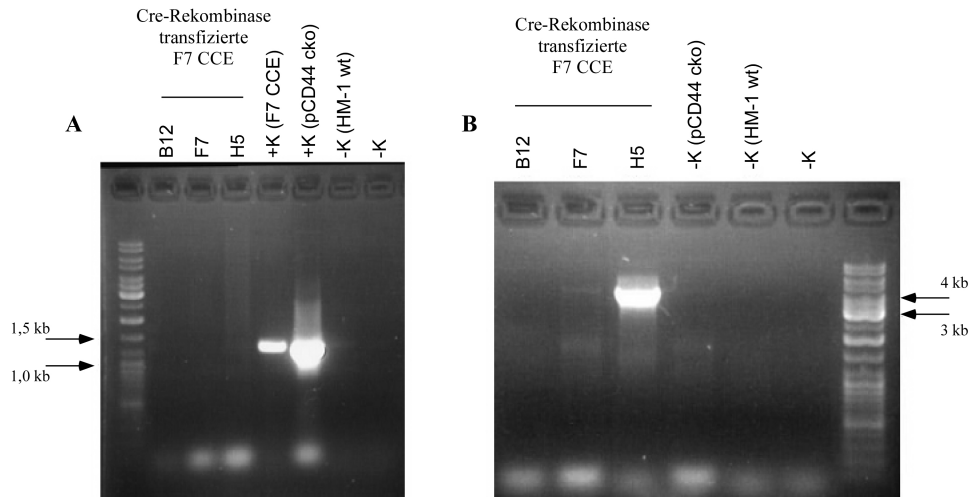


Abbildung 3-20: PCR zur Bestimmung des Rekombinationsereignisses. **A:** PCR zur Detektion der *Neo*-Kassette. Bei allen drei isolierten Klonen wurde die *Neo*-Kassette entfernt. Bandengröße der *Neo*-Kassette: 1,3 kb. **B:** PCR zur Detektion der Exon 3-enhaltenden Sequenz. Nur bei Klon H5 ist Exon 3 noch vorhanden. Erwartete Bande: 5,4 kb.

3.2.3 Etablierung einer homozygoten Mauslinie für einen konditionellen Knockout von CD44

3.2.3.1 Homologe Rekombination in HM-1- und E14.1 ES-Zellen

Für die Generierung des konditionellen Knockouts von CD44, wurde auf die etablierten ES-Zelllinien HM-1 und E14.1 (**Abb. 3-21**) zurückgegriffen. Beide ES-Zelllinien stammen von derselben Mauslinie 129P2/OlaHsd ab, unterscheiden sich aber in ihren Kulturbedingungen.

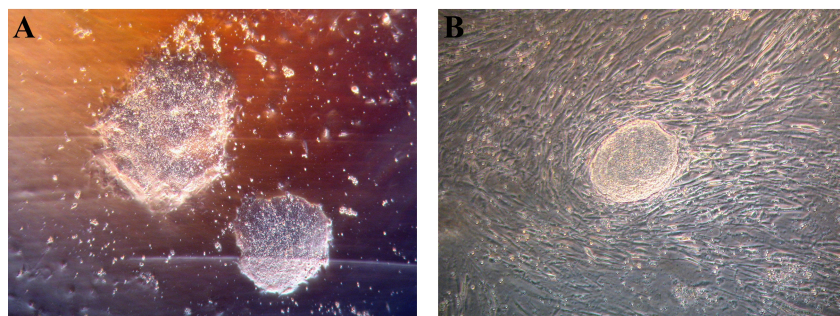


Abbildung 3-21: Phasenkontrast-Aufnahmen von ES-Zell-Klonen. Gezeigt sind Lebendkultur-Aufnahmen **A:** Die HM-1 ES-Zellen werden direkt auf 0,1 % Gelatine kultiviert. **B:** Die E14.1 ES-Zellen wachsen auf einer Schicht Feederzellen. Vergrößerung 100x.

Während die HM-1 auf 0,1 % Gelatine kultiviert werden können, wachsen E14.1 auf einer Schicht von inaktivierten Mäuse-Fibroblasten (Feeder) (**Abb. 3-21**). Diese sollen zusätzlich zu LIF (*leukaemia inhibitory factor*), welches in beiden Fällen dem Kulturmedium beigemischt wird, die Differenzierung der Zellen verhindern. Dadurch ist die Kultivierung der E14.1 aufwendiger. Da beide ES-Zelllinien im Institut für Toxikologie und Genetik der Universität Karlsruhe bislang nicht etabliert waren, wurde ihre Kultur so weit wie möglich optimiert und beide für die Etablierung des konditionellen Knockout von CD44 herangezogen.

Der mit *BsaI* linearisierte und anschließend aufgereinigte Vektor wurde in beide Zelllinien transfiziert (vergl. Kapitel 3.2.2.2). Zur Kontrolle der Selektion wurden Zellen ohne Vektor-DNA elektroporiert. Die positiv-Selektion erfolgte mit G418. Zusätzlich wurde mit Ganciclovir nach homologer Rekombination selektioniert. Durch die Zugabe von Ganciclovir sterben alle Zellen, die das Gen HSV-tk enthalten, welches nur bei einer nicht-homologen Insertion inseriert wird.

Von den E14.1 ES-Zellen wurden 288, von den HM-1 ES-Zellen 384 Klone isoliert und in einer *nested* PCR auf homologe Rekombination getestet. In der ersten PCR wird ein Fragment amplifiziert, welches bei einer homologen Rekombination die dritte LoxP-Rekombinationsstelle

enthält (**Abb. 3-22**). Für die zweite PCR wird eine Verdünnung der ersten PCR als Template eingesetzt. Der Vorwärts-Primer der zweiten PCR bindet an eine Sequenz, die für diese LoXP-Rekombinationsstelle spezifisch ist. Daher wird in der zweiten PCR nur dann ein Produkt erwartet, wenn es zu einer homologen Insertion der LoXP-enthaltenden Sequenzen gekommen ist.

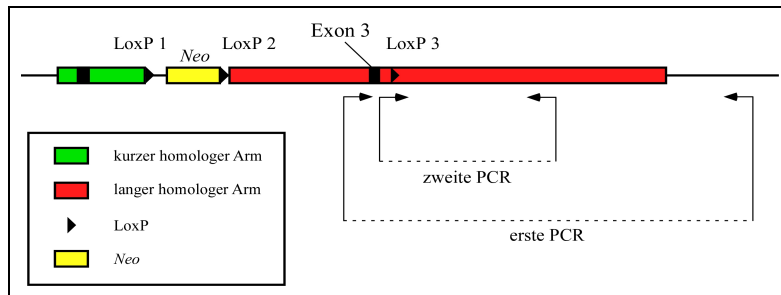


Abbildung 3-22: Schema der *nested* PCR zur Detektion einer homologen Rekombination. Die erste PCR amplifiziert eine Sequenz, welche die dritte LoXP-Rekombinationsstelle enthält. Die zweite PCR ist spezifisch für das veränderte Allel, da der Vorwärts-Primer in den inserierten Sequenzen der LoXP 3 bindet.

Mit Hilfe der *nested* PCR wurde bei beiden Zelllinien je ein positiver Klon (E12 (HM-1) und F6 (E14.1)) identifiziert. Dabei wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, dessen Größe (1,8 kb) exakt der der positiv-Kontrolle (Klon F7 CCE) entspricht, bei welcher eine homologe Rekombination bereits nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.2.2.2) (**Abb. 3-23**).

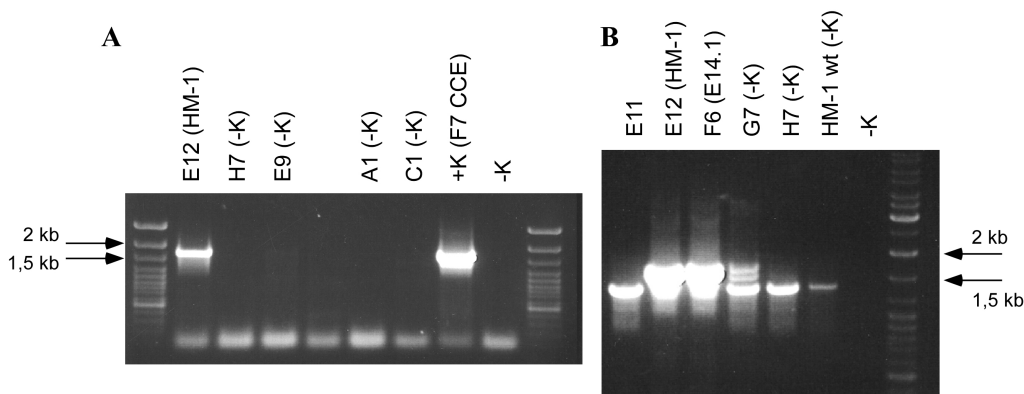


Abbildung 3-23: Test auf homologe Rekombination mittels einer 3' *nested* PCR mit positiv- und negativ-Kontrollen. Gezeigt sind die Ergebnisse der zweiten PCR. **A:** HM-1. Als positiv-Kontrolle wurde Klon F7 CCE verwendet. **B:** E14.1. Als positiv-Kontrolle wurde Klon E12 (HM-1) eingesetzt. Die erwartete Bande besitzt eine Größe von 1,8 kb.

Um das Ergebnis der *nested* PCR zu verifizieren wurde ein 5' Southern Blot mit der Sonde SB1 durchgeführt (Strategie siehe **Abb. 3-14**, Kapitel 3.2.2.2). Genomische DNA der positiv getesteten Klone (F6 E14.1 und E12 HM-1) sowie von untransfizierten HM-1 Zellen wurden mit *AccI* verdaut.

Aus der zusätzlichen *AccI*-Schnittstelle in der *Neo*-Kassette resultiert bei einer homologen Rekombination ein weiteres Fragment der Größe 7,0 kb (vergleiche **Abb. 3-14**, Kapitel 3.2.2.2), das auch tatsächlich in den beiden Klonen nachweisbar war (**Abb. 3-24**).

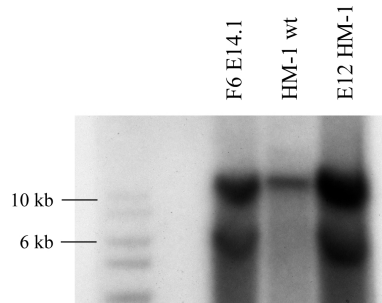


Abbildung 3-24: Nachweis der homologen Rekombination mittels eines 5' Southern Blots. Isolierte genomische DNA wurde über ein 0,8 % -iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mit der [α - 32 P]-markierten Sonde SB1. Erwartete Banden: 12,5 kb Wildtyp Allel, 7,0 kb verändertes Allel. Vergl. **Abb. 3-14**, Kapitel 3.2.2.2

Somit konnte durch eine *nested* PCR 3' und ein Southern Blot 5' der Insertionsstelle die homologe Rekombination bei jeweils einem Klon der beiden verwendeten Zelllinien (F6 E14.1 und E12 HM-1) nachgewiesen werden.

3.2.3.2 Deletion der *Neomycin*-Resistenz-Kassette in HM-1 und E14.1 ES-Zellen

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.3 erwähnt ist es notwendig vor der Blastozysteninjektion die *Neo*-Kassette zu entfernen. Für die Deletion der *Neo*-Kassette in den ES-Zell-Klonen F6 E14.1 und E12 HM-1 wurde dasselbe Protokoll wie für die CCE verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.3). Nach der Transfektion des pCMV-*Cre* Vektors und der Isolation einzelner Klone wurden 11 HM-1 und sechs E14.1 Klone als G418-sensitiv identifiziert. Die PCR bestätigte, dass bei allen HM-1 Klonen die *Neo*-Kassette nicht mehr vorhanden war (**Abb. 3-25A**). Beim Test auf die Exon 3-enthaltenden Sequenzen zeigten nur sechs der 11 HM-1-Klone die erwartete Bande von 4,4 kb, wie sie auch bei der positiv-Kontrolle, dem Ausgangsklon E12 HM-1 (**Abb. 3-25B**), zu sehen ist. Damit kam es bei

sechs von 11 isolierten *Neomycin*-sensitiven HM-1 Klonen zu einer selektiven Deletion der *Neo*-Kassette.

Bei Klon 1D6 der E14.1 ES-Zellen konnte durch die *Neo*-spezifische PCR ein Verlust der *Neo*-Kassette nachgewiesen werden (**Abb. 3-25C**). Die Analyse auf die Exon 3 enthaltenden Sequenzen zeigte, dass es bei diesem Klon zu einer Rekombination zwischen den *LoxP*-Rekombinationsstellen 1 und 2 kam, da in der PCR die Sequenz zwischen *LoxP* 2 und 3 nachgewiesen konnte (Bande der Größe 4,4 kb ist zu sehen) (**Abb. 3-25D**). Daher deutet das Ergebnis der PCRs darauf hin, dass es bei diesem Klon (1D6) der ES-Zelllinie E14.1 zu einer selektiven Deletion der *Neo*-Kassette kam.

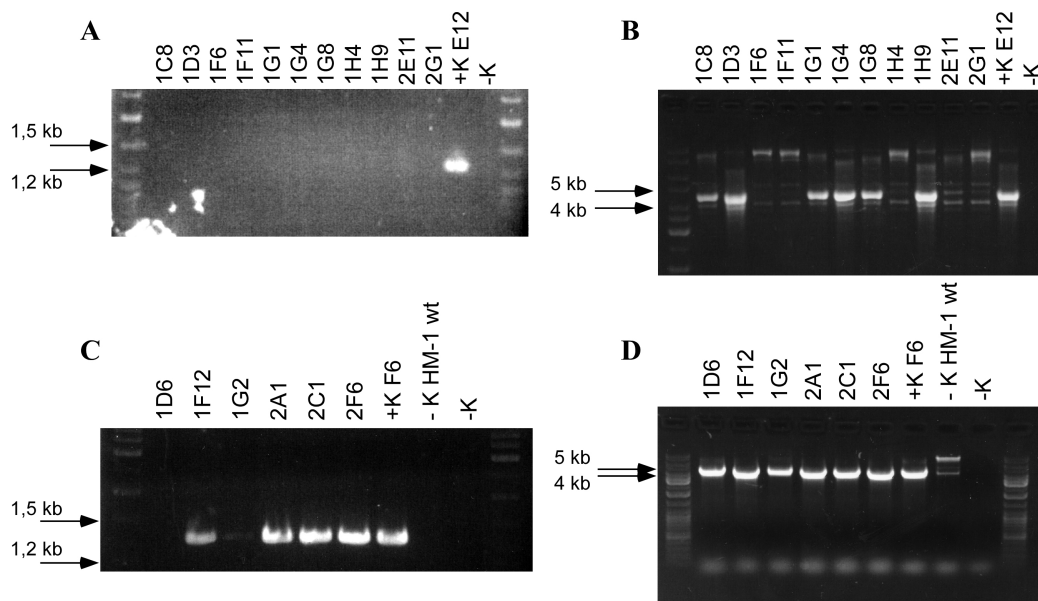


Abbildung 3-25: 3' PCR zur Bestimmung des Rekombinationsereignisses. **A:** PCR zu Detektion der *Neo*-Kassette bei HM-1-Klonen. Bei allen isolierten Klonen wurde die *Neo*-Kassette entfernt. Bandengröße der *Neo*-Kassette:1,3 kb. **B:** PCR zu Detektion der Exon3-enthaltenden Sequenz bei HM-1-Klonen. Bei sechs der 11 Klone wurden die Sequenzen detektiert. Erwartete Bande: 4,4 kb. **C:** PCR zu Detektion der *Neo*-Kassette bei E14.1-Klonen. Nur bei Klon 1D6 wurde die *Neo*-Kassette entfernt. Bandengröße der *Neo*-Kassette:1,3 kb. **D:** PCR zu Detektion der Exon 3-enthaltenden Sequenz bei E14.1-Klonen. Bei allen Klonen konnten die Sequenz zwischen *LoxP* 2 und 3 detektiert werden. Erwartete Bande: 4,4 kb

Um das Ergebnis der 3' PCR zu verifizieren wurde ein Southern Blot 5' der Integrationsstelle zur Bestimmung des Rekombinationsereignisses durchgeführt. Die Strategie des Southern Blots basiert darauf, dass ein *HindIII*-ausgeschnittenes Fragment der Größe 6,4 kb, welches die *Neo*-Kassette mit einschließt, durch die unterschiedlichen Rekombinationsereignisse entsprechend verkürzt wird. Eine Rekombination zwischen den *LoxP*-Rekombinationsstellen 1 und 3 oder 2 und 3 entspricht einem vollständigen Knockout, da Exon 3 deletiert wird (**Abb. 3-26**). Kommt es zu der gewünschten Rekombination zwischen *LoxP* 1 und 2, so entsteht ein Fragment der Größe 5,2 kb (**Abb. 3-26**). Da die Wildtyp-Bande eine Größe von 5,1 kb hat, ist es nicht möglich die beiden

Banden im Southern Blot voneinander zu unterscheiden. In diesem Fall ist aber der Verlust der 6,4 kb Bande (hier fand keine Rekombination statt) und das Fehlen der 2,7 kb Bande (Rekombination zwischen LoxP 1 und 3) ein Indiz dafür, dass es zu einer spezifischen Deletion der *Neo*-Kassette kam. Zudem kann durch den Vergleich mit den Ergebnissen der PCR-Analyse eine eindeutige Beurteilung stattfinden.

Für den Southern Blot wurde die genomische DNA aller in der PCR getesteten Klone mit *Hind*III verdaut. Die radioaktiv markierte Sonde SB3 bindet an eine Sequenz im kurzen homologen Arm (siehe **Abb. 3-26**).

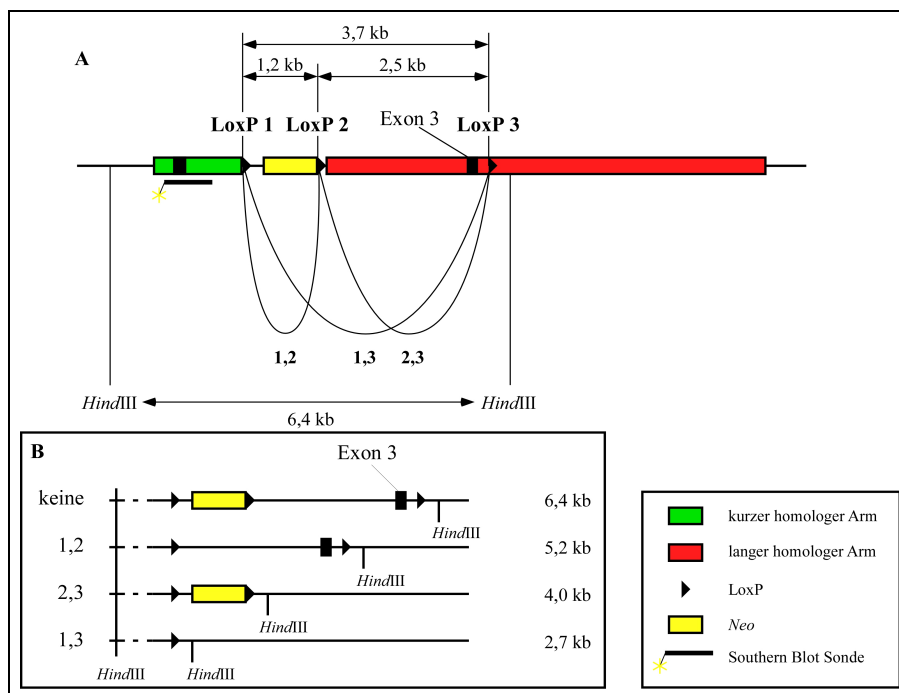


Abbildung 3-26: Strategie des Southern Blots zur Bestimmung der Rekombinationsereignisse. **A:** Schema der Southern Blot Strategie. Die Sonde SB3 bindet innerhalb des kurzen homologen Arms. Je nach Rekombinationsereignis verkürzt sich das durch *Hind*III ausgeschnittene Fragment. **B:** Erwartete Fragmentgrößen, abhängig vom Rekombinationsereignis. Die Rekombination zwischen LoxP-Rekombinationsstelle 1 und 3 oder 2 und 3 entspricht einem vollständigen Knockout von CD44, da Exon 3 entfernt wird. Bei der gewünschten Rekombination zwischen LoxP 1 und 2 wird nur die *Neo*-Kassette deletiert und Exon3 bleibt erhalten.

In der PCR zur Detektion der *Neo*-Kassette konnte bei allen 11 Klonen der ES-Zelllinie HM-1 gezeigt werden, dass die *Neo*-Kassette entfernt wurde (vergl. **Abb. 3-25A**). Bei fünf der Klone (1F6, 1F11, 1H4, 2E11 und 2G1) konnte in einer weiteren PCR zur Detektion der Exon 3 enthaltenden Sequenzen kein Fragment amplifiziert werden (vergl. **Abb. 3-25B**). Bei diesen Klonen war davon auszugehen, dass es zu einem Rekombinationsereignis zwischen LoxP-Rekombinationsstelle 1 und 3 gekommen war, bei dem die Exon 3 -enthaltende Sequenz deletiert wurde. In einem solchen Fall wird im Southern Blot eine Bande von 2,7 kb erwartet (siehe **Abb. 3-**

26B). Eine Bande dieser Größe konnte im Southern Blot detektiert werden (**Abb. 3-27A**). Für die anderen sechs HM-1 Klone (1C8, 1D3, 1G1, 1G4, 1G8 und 1H9) wurde nur eine Bande der Wildtyp-Größe nachgewiesen (**Abb. 3-27A**). In beiden Fällen konnte die erwartete Bande detektiert werden und das Ergebnis deckt sich zudem mit dem der PCR-Analyse (siehe **Abb. 3-25B**). Aus PCR und Southern Blot kann daher geschlossen werden, dass es bei den Klonen 1C8, 1D3, 1G1, 1G4, 1G8 und 1H9 der ES-Zelllinie HM-1 zu einer spezifischen Deletion der *Neo*-Kassette kam. Diese Klone können für die Etablierung einer Mauslinie mit einem induzierbaren CD44-Knockout eingesetzt werden.

Für die Zelllinie E14.1 konnte mittels der PCR nur bei Klon 1D6 die erfolgreiche Deletion der *Neo*-Kassette festgestellt werden (siehe **Abb. 3-25C**). Durch eine weitere PCR wurde zudem belegt, dass dabei die Exon 3-enthaltende Sequenz erhalten blieb (siehe **Abb. 3-25D**). Für diesen Klon konnte im Southern Blot nur eine Bande der Wildtyp-Größe identifiziert werden (**Abb. 3-27B**). Damit konnte das Ergebnis der PCR-Analyse bestätigt werden. Somit kann auch dieser Klon zur Etablierung einer Mauslinie für einem induzierbaren CD44-Knockout verwendet werden.

Aus der Analyse der PCRs lässt sich ferner schließen, dass bei den Klonen 1F12, 2A1, 2C1 und 2F6 der ES-Zelllinie E14.1 kein Rekombinationsereignis stattgefunden hat (siehe **Abb. 3-25C und D**). Auch dieses Resultat wurde im Southern Blot verifiziert. Neben der Wildtyp-Bande ist auch eine Bande der Größe 6,4 kb zu sehen, die bei Vorhandensein der *Neo*-Kassette erwartet wird (**Abb. 3-27B**). Klon 1G2 lieferte kein eindeutiges Ergebnis und wurde aus diesem Grund nicht weiter berücksichtigt.

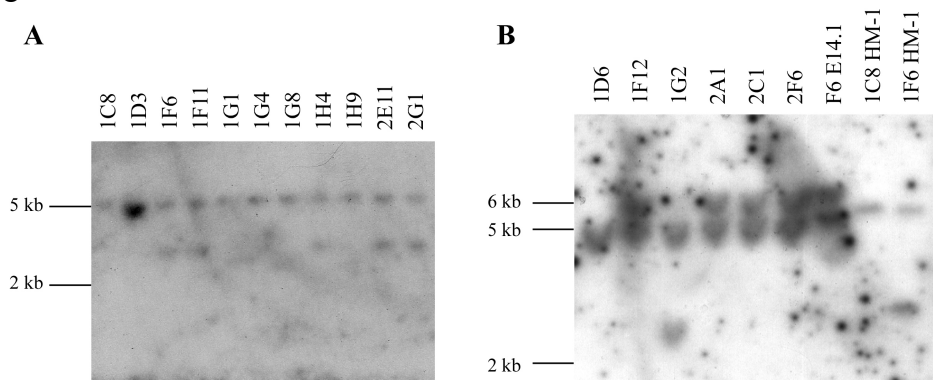


Abbildung 3-27: Southern Blot zur Bestimmung des Rekombinationsereignisses. Isolierte genomische DNA wurde über ein 0,8 % -iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mit der [α - 32 P]-markierten Sonde SB3. **A:** Cre-transfizierte HM-1 Klone. Die spezifische Deletion der *Neo*-Kassette konnte für die Klone 1C8, 1D3, 1G1, 1G4, 1G8 und 1H9 bestätigt werden. Bei allen anderen handelt es sich um eine vollständige Inaktivierung von CD44. **B:** Cre-transfizierte E14.1 Klone. Für den Klon 1D6 wurde die Deletion der *Neo*-Kassette und das Vorhandensein von Exon 3 verifiziert. Als Kontrollen wurden der Ausgangsklon F6 E14.1, der Klon 1C8 HM-1 mit spezifischer Deletion der *Neo*-Kassette (vergl. Abb. 3-27A) und Klon 1F6 HM-1 mit Deletion der *Neo*-Kassette und der Exon 3 -enthaltenden Sequenzen (entspricht einem totalen Knockout; vergl. Abb. 3-27A) eingesetzt. Erwartete Banden: siehe Abb. 3-20.

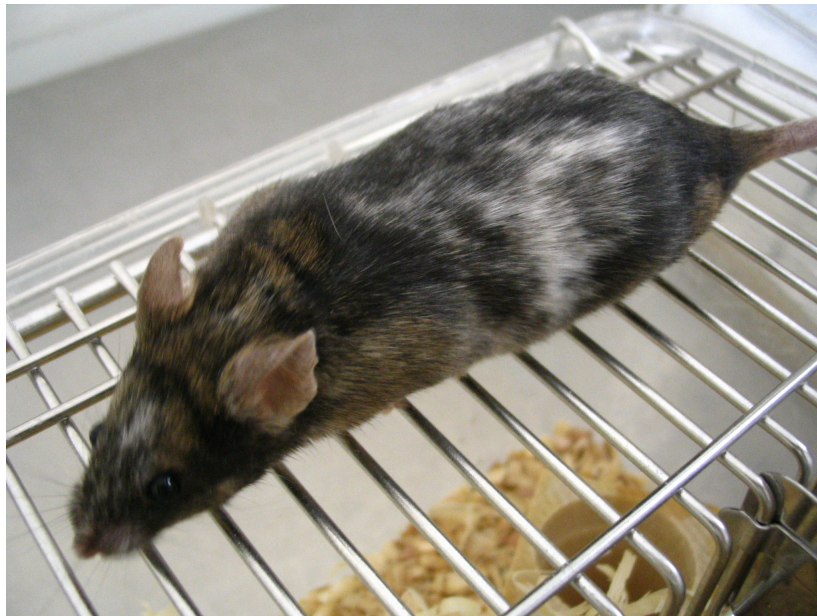
Somit standen für die Blastozysten-Injektion insgesamt sieben Klone mit konditioneller Inaktivierung von CD44 aus zwei verschiedenen ES-Zelllinien zur Verfügung. Zudem wurden bei der Deletion der *Neo*-Kassette auch fünf Klone mit einer vollständigen Inaktivierung generiert, die für die Etablierung einer Mauslinie mit einer totalen Inaktivierung von CD44 genutzt werden konnten.

3.2.4 Blastozysteninjektionen und Kreuzungen

Die Klone 1F11, 1C8 und 1G1 der ES-Zelllinie HM-1 und der Klon 1D6 der ES-Zelllinie E14.1 wurden in E3,5 BL/6 Blastozysten injiziert, die anschließend in BL/6 Leihmütter transplantiert wurden. Bei Klon 1F11 findet sich eine vollständige Inaktivierung von CD44, da Exon 3 bei der Deletion der *Neo*-Kassette ebenfalls entfernt wurde (vergl. **Abb. 3-25A, B** und **3-27A**). Bei allen anderen Klonen handelt es sich um eine konditionelle Inaktivierung von CD44, da die *Neo*-Kassette deletiert wurde und Exon 3 von zwei LoxP-Rekombinationsstellen flankiert wird (vergl. **Abb. 3-25A, B** und **3-27A, B**). Außer 1G1 wurde jeder Klon zweimal injiziert, was sieben Injektionen entspricht. Insgesamt wurden acht Nachkommen geboren (1D6: 2, 1C8: 1, 1G1: 5), fünf der Leihmütter wurden nicht schwanger. BL/6 Mäuse besitzen normalerweise ein schwarzes Fell. Die verwendeten ES-Zellen tragen Gene, die zu einer anderen Fellfarbe führen. Die Transmission der ES-Zellen lässt sich daher am Chimärismus der Tiere erkennen. Nur die fünf Nachkommen (zwei Weibchen und drei Männchen), die aus den Blastozysteninjektionen des Klones 1G1 HM-1 hervorgingen, waren Chimären. Eines der beiden Weibchen zeigte einen besonders stark ausgeprägten Chimärismus (**Abb. 3-28**), war aber schon bei der Geburt sehr klein und wies weiterhin eine verzögerte Entwicklung auf. Sie verweigerte das Futter und starb nach 22 Tagen.



Die überlebenden vier chimären Mäuse wurden im Alter von 15 Wochen mit BL/6 Mäusen verpaart. Von diesen zeigt ein Männchen den am stärksten ausgebildeten Chimärismus (**Abb. 3-29**). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich eine Keimbahn-Transmission der ES-Zellen nachzuweisen. Auch fortführende Kreuzungen zur Etablierung einer homozygoten Mauslinie mit konditioneller Inaktivierung von CD44, sowie die nachfolgende Aktivierung des Knockouts konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.



4. Diskussion

4.1 Der Signalkomplex c-Met, CD44 v6 und Ezrin

Aus den Daten von Experimenten mit der Fusion aus CD44v4-7 ohne zytoplasmatische Domäne (Δ cyt) und Ezrin lässt sich folgern, dass für eine Weiterleitung der durch HGF/SF-induzierten Signaltransduktion von c-Met eine Kopplung von Ezrin an die Transmembran-Domäne von CD44v4-7 ausreichend ist. Da die zytoplasmatische Domäne von CD44v4-7 in der Fusion mit Ezrin für die Weiterleitung des Signals nicht vorhanden sein muss, scheint sie Ezrin an die Plasmamembran zu dirigieren und in einen Komplex mit c-Met zu bringen.

Da es nach einer Deletion der N-terminalen Domäne von Ezrin im Fusionsprotein weiterhin zur Aktivierung der durch HGF/SF-induzierten Signaltransduktion von c-Met kam, lässt sich schließen, dass nur die C-terminale Domäne für die Weitergabe des Signals benötigt wird. Die N-terminale Domäne des endogenen Ezrin vermittelt die Bindung an CD44 und bringt damit Ezrin in den Signalkomplex mit c-Met.

Trotz der direkten Kopplung an die Transmembran-Domäne von CD44 liegt Ezrin im Fusionsprotein im aktiven Zustand vor, was durch eine Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) nach Induktion mit HGF/SF beobachtet wurde. Beim Fusionsprotein mit der dominant aktiven Mutante von Ezrin (DA, T567D) kommt es im Vergleich zu der Fusion mit Ezrin Wildtyp zu einer stärkeren Aktivierung von ERK. Das deutet darauf hin, dass Ezrin in der Fusion in einer inaktiven Form vorliegen kann und aktiviert werden muss. Dabei kommt es nicht zur Phosphorylierung des gesamten Pools an Ezrin Molekülen, was zu einer vergleichsweise niedrigen Aktivierung von ERK bei transfiziertem CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin DA nach Stimulation mit HGF/SF führt. Welche Kinase an der Aktivierung von Ezrin durch HGF/SF-Stimulation von c-Met beteiligt ist und wie sie aktiviert wird, ist nicht bekannt.

Einen Beleg dafür, dass die Proteine Kinase C (PKC) an der Aktivierung von Ezrin auf eine Stimulation durch einen Wachstumsfaktor beteiligt ist, liefert die EGF-stimulierte Kollokalisierung von CD44 und Ezrin in Lamellipodien und Mikrovilli von A431 Zellen (STAPLETON *et al.*, 2002). Dabei wurde festgestellt, dass PKC allein für eine korrekte Lokalisation von CD44 und Ezrin nicht ausreicht, sondern noch weitere Proteine benötigt werden, deren Expression von der EGF-

stimulierten Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 abhängig ist (STAPLETON *et al.*, 2002).

Ein weiteres Beispiel, dass die PKC durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann, zeigten SHARMA *et al.* (2005). In Epithelzellen der humanen Cornea konnte eine EGF- und HGF-induzierte Translokation der PKC α zur Plasmamembran beobachtet werden. Die Stimulation mit EGF bzw. HGF/SF führt zu einer Aktivierung von ERK, welche wiederum die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) aktiviert. Die aktivierte cPLA₂ transloziert zur Kern- und Plasmamembran, was vermutlich zu einer erhöhten Freisetzung von Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden führt. Arachidonsäure wird in 15(S)-HETE (15(S)-Hydroperoxyeicosatetraenol-Säure) umgewandelt. 15(S)-HETE vermittelt vermutlich als *second messenger* die Translokation der PKC α an die Plasmamembran, sowie deren anschließende Aktivierung (SHARMA *et al.*, 2005).

Dieses Beispiel der Aktivierung von PKC α findet im zellulären Kontext von humanen cornealen Epithelzellen statt. Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist dieser Mechanismus nicht anwendbar, da hier die Aktivierung von Ezrin durch eine Kinase vor Weitergabe des HGF/SF-induzierten Signals zu ERK stattfinden muss.

Hier wäre ein mögliches Modell für die Aktivierung der Proteinkinase ein vom Ras / MAPK-Signalweg und Ezrin unabhängiger Signalweg. Dieser könnte durch eine HGF/SF-induzierte Stimulation der Phospholipase C γ (PLC γ) zur Aktivierung der PKC über DAG (Diacylglycerin) führen, was schließlich in einer Phosphorylierung von Ezrin resultieren könnte.

Die Mechanismen der ERM-Aktivierung sind bislang ungelöst und möglicherweise abhängig vom Zelltyp sowie vom biologischen Kontext.

Um die an der Phosphorylierung von Ezrin beteiligten Protein Kinasen zu identifizieren, kann man spezifische Inhibitoren gegen die bekannten Kinasen einsetzen. Das Experiment könnte folgendermaßen aussehen: Auf eine Stimulation der c-Met-Signalkaskade durch HGF/SF, wird nach Zugabe des spezifischen Inhibitors, auf eine Reduktion oder ein Ausbleiben der Threonin-Phosphorylierung von Ezrin bzw. der Aktivierung von ERK hin untersucht.

Nach der Deletion der F-Aktin-Bindedomäne (ABD) von Ezrin im Fusionsprotein mit CD44v4-7 Δ cyt kam es interessanterweise zu keiner HGF/SF-induzierten Aktivierung von ERK. Daraus lässt sich schließen, dass eine Bindung von Ezrin an das F-Aktin für die c-Met-Signaltransduktion essentiell ist.

Der Abbruch der Signalkaskade erfolgte bei der Übertragung des HGF/SF-induzierten Signals auf

Ras (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2007). In Zellen, die eine CD44 v6-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne überexprimierten, war Ras die erste Komponente der Signalkaskade, die nicht durch HGF/SF aktiviert wurde. Ferner konnte Ras in HGF/SF-induzierten Komplexen, welche durch einen Grb2-Pulldown oder durch Präzipitation des Zytoskeletts isoliert wurden, nicht detektiert werden. Es kam hingegen zu einer Aktivierung aller Komponenten der Signalkaskade oberhalb von Ras, einschließlich c-Met, welche auch in den jeweiligen Komplexen identifiziert werden konnten (ORIAN-ROUSSEAU *et al.*, 2007). Daraus lässt sich folgern, dass die Weiterleitung des HGF/SF-induzierten Signals von Sos nach Ras von der zytoplasmatischen Domäne von CD44 v6 beeinflusst wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Assoziation von Ezrin an die zytoplasmatische Domäne von CD44 sowie an das F-Aktin für die Übertragung des Signals von Sos nach Ras notwendig ist. Dafür wird möglicherweise eine Interaktion von Ras und F-Aktin benötigt.

In murinen 32D myeloiden Vorläufer-Zellen konnte eine Kolo-kalisation von R-Ras und F-Aktin in dynamischen Regionen der Plasmamembran nachgewiesen werden (HOLLY *et al.*, 2005). Dabei wurde auch festgestellt, dass R-Ras für die Aktivierung der Signalkaskade ein intaktes Aktin-Zytoskelett benötigt (HOLLY *et al.*, 2005).

Auch PLOWMAN *et al.* (2005) konnten eine Abhängigkeit vom Zytoskelett bei der von Ras aktivierten Signalkaskade nachweisen. Sie zeigten, dass die Bildung von onkogenem K-Ras (K-RasG12V) Nanoclustern vom Aktin-Zytoskelett abhängig ist und die Signaltransduktion durch Zerstörung des Zytoskeletts unterbunden wird (PLOWMAN *et al.*, 2005).

Aus diesen Daten lässt sich für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass offenbar die Aktivierung der Ras-Signalkaskade direkt von einer Kolo-kalisation des Aktin-Zytoskeletts abhängig ist. Dabei scheint Ezrin für die Vermittlung zwischen F-Aktin und Ras verantwortlich zu sein.

Daher sollte durch die Deletion der Aktin-Bindestelle von Ezrin im Fusionsprotein CD44v4-7 Δ cyt - Ezrin Δ ABD eine Bindung von Ras ebenfalls nicht stattfinden können, was durch Ezrin-Pulldown-Experimente nach einer Stimulation durch HGF/SF nachgewiesen werden könnte.

4.2 Der konditionelle Knockout von CD44

Aufgrund der Diskrepanzen, die sich beim Vergleich der Knockout-Phänotypen ergaben, wurde zur Aufklärung der Rolle von CD44 in der Embryogenese der experimentelle Ansatz eines konditionellen Knockouts gewählt, wodurch es möglich ist CD44 gewebespezifisch und zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu inaktivieren.

Als Kontrolle für die Funktionalität des Knockout, wäre es sinnvoll die Inaktivierung zunächst unter dem Keratinozyten-spezifischen K5-Promotor zu testen. Dieser Promotor fand bei der transgenen Inaktivierung von CD44 durch eine Expression von *antisense*-RNA Verwendung (KAYA *et al.*, 1997). Der drastische Haut-Phänotyp sollte bei der Keratinozyten-spezifischen Inaktivierung im Falle der konditionellen Inaktivierung ebenfalls beobachtet werden können.

Um die Rolle von CD44 bei der Embryogenese der Maus zu bestimmen, kann die konditionelle Inaktivierung in bestimmten Geweben bzw. Systemen des Organismus eingesetzt werden. Dabei können spezifischen Promotoren verwendet werden, welche die Expression der *Cre-Rekombinase* zeit- und gewebespezifisch aktivieren. Die Promotoren können so gewählt werden, dass sich ihr Expressionsmuster mit dem von CD44 überschneidet, sodass es nur dort zum Verlust von CD44 kommt, wo der Promotor aktiv ist. Am interessantesten wäre eine Inaktivierung in Regionen mit einer hohen Expressionsrate von CD44, wie beispielsweise im Herzen, im Notochord (WHEATLEY *et al.*, 1993) und Thymozyten (DALCHAU *et al.*, 1980). Durch den Einsatz des Myh6 (Myosin, *heavy polypeptide* 6) -Promotors kann CD44 spezifisch im Herzgewebe (Quelle: Jax Mice, The Jackson Laboratory) ausgeschaltet werden. Ein Einsatz des Promotors Col2a1 (Procollagen, Typ II, Alpha 1) kann zu einer Inaktivierung von CD44 im Notochord (Quelle: Jax Mice, The Jackson Laboratory) führen. Um die Rolle von CD44 im Immunsystem zu untersuchen, kann der Lck (*lymphocyte protein tyrosine kinase*) -Promotor verwendet werden, welcher in den Thymozyten aktiv ist (Quelle: Jax Mice, The Jackson Laboratory).

Aus dem Vergleich der "klassischen Inaktivierung" mit dem Keratinozyten-spezifischen transgenen Knockout geht hervor, dass eine Substitution von CD44 offensichtlich vom Zeitpunkt der Inaktivierung des Gens abhängt. Deshalb würde es sich anbieten ein System mit einer zu jedem Zeitpunkt induzierbaren Aktivierung der *Cre-Rekombinase*-Expression zu etablieren, was einer Aktivierung des Knockouts entspricht. Hierfür müsste eine Maus generiert werden, bei welcher die

Expression der *Cre-Rekombinase* von einem ubiquitär aktiven Promotor (z.B. CMV-Promotor) kontrolliert wird, welcher zudem noch induzierbar ist. Dafür bietet sich das Tetracyclin/Doxyzyklin-System an, bei welchem die Expression des Enzyms *Cre-Rekombinase* durch die Fütterung von Doxyzyklin induziert werden kann (Quelle: Jax Mice, The Jackson Laboratory).

Mit diesem System wäre eine ubiquitäre Inaktivierung CD44 zu jedem beliebigen Zeitpunkt möglich. Sinnvoll wäre es mit einer Inaktivierung von CD44 an Tag 10,5 der Embryogenese zu beginnen, da hier eine Substitution von CD44 in Keratinozyten nicht mehr möglich zu sein scheint (siehe KAYA *et al.*, 1997). Daher sollte überprüft werden, ob neben dem Keratinozyten-spezifischen Phänotyp weitere Defekte durch den Verlust der Expression von CD44 auftreten. Daraus könnte man schließen, ob zu diesem Zeitpunkt in anderen Geweben ebenfalls keine Substitution von CD44 mehr stattfinden kann.

Am Tag 10,5 der Embryogenese wird CD44s ubiquitär exprimiert (RUIZ *et al.*, 1995), wobei eine besonders hohe Expression im sich entwickelnden Herz, dem arteriellen System und im Notochord festgestellt wurde (WHEATLEY *et al.*, 1993). Zu diesem Zeitpunkt wird CD44 bei der Entwicklung der Extremitäten im Ektoderm, welches das Mesoderm der Extremitäten Knospen umgibt, exprimiert (WHEATLEY *et al.*, 1993). Hier konnte durch Hemm-Experimente mit Antikörpern gezeigt werden, dass CD44 v3 für den Auswuchs der Extremitäten essentiell ist (SHERMAN *et al.*, 1998). Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass eine Inaktivierung von CD44 an Tag 10,5 nicht nur zu dem beobachteten Haut-Phänotyp aus dem transgenen Knockout (KAYA *et al.*, 1997) führt, sondern weitere drastische Auswirkungen, wie einen Abbruch der Extremitätenentwicklung, haben kann.

Unter der Annahme, dass es in anderen Geweben ab E10,5 zu keiner Substitution von CD44 kommt, könnte zur Bestimmung des exakten Zeitpunkts des Ausbleibens der Substitution die Inaktivierung von CD44 schrittweise zeitlich vorverlegt werden.

Molekulare Redundanz ist unter der Familie der Cytokine und Cytokin-Rezeptoren ein weit verbreitetes Phänomen, wie beispielsweise bei IL-2 und IL-15 Rezeptoren, welche beide Signale für das T-Zell-Wachstum transduzieren (OZAKI *et al.*, 2002).

Bei der Analyse des CD44-Knockouts (SCHMITS *et al.*, 1997), konnte auch für CD44 ein Substitutionsmolekül identifiziert werden. Bei CD44^{-/-}-Mäusen kompensiert RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*) bei einer Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) den Verlust von CD44 (NEDVETZKI *et al.*, 2004). Im CD44-Knockout war ursprünglich eine Reduktion der Kollagen-induzierten Arthritis erwartet worden, da monoklonale Antikörper gegen CD44 sowie

Hyaluronidase eine aufhebende Wirkung hatten (MIKECZ, *et al.*, 1995 und NEDVETZKI *et al.*, 1999). Stattdessen kommt es bei Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp zu einer stärkeren Entzündung der Gelenke (CD44-Knockout von SCHMITS *et al.*, 1997). Der Einsatz von Hyaluronidase führte in homozygoten und heterozygoten CD44-Knockout sowie Wildtyp-Mäusen zu einer Reduktion der CIA. Damit konnte gezeigt werden, dass CIA von HA abhängig ist und dass das Substitutionsmolekül ebenfalls den CD44-Liganden HA bindet. Durch Literaturrecherche wurde RHAMM als möglicher Kandidat identifiziert, da es HA bindet (HOFMANN *et al.*, 1998, ASSMANN *et al.*, 1998, YANG *et al.*, 1994), die Leukozyten-Wanderung vermittelt (TURLEY *et al.*, 2002) und die Expression von *jun* und *fos* auf eine Induktion mit HA hin fördert (CHEUNG *et al.*, 1999). Der Einsatz spezifischer Antikörper gegen RHAMM sowie von löslichem rekombinantem GST-rRHAMM (blockiert die Ras-vermittelten Zellfunktionen *in vivo* (MOHAPATRA *et al.*, 1996)), führten im CD44-Knockout zu einer Reduktion der CIA (NEDVETZKI *et al.*, 2004).

Interessanterweise führt der Verlust von CD44 nicht zu einer Änderung in der Expression des Substitutionsmoleküls RHAMM. Vielmehr führt der Verlust von CD44 zu einer Akkumulation des gemeinsamen Liganden HA. Dadurch kommt es vermehrt zu Wechselwirkungen zwischen RHAMM und HA. Die Interaktion zwischen RHAMM und HA führten zu einer erhöhten Zell-Motilität und Expression von Genen, die in Entzündungsreaktionen involviert sind (NEDVETZKI *et al.*, 2004).

Es ist unwahrscheinlich das RHAMM allein für die Substitution von CD44 in der Embryogenese verantwortlich ist, da außer den bereits erwähnten funktionellen Gemeinsamkeiten keine weiteren vorhanden sind. Eine grundsätzliche Beteiligung von RHAMM am Substitutionsprozess ist hingegen nicht auszuschließen und sogar wahrscheinlich. Bei der Analyse des RHAMM-Knockout in Mäusen konnten keine Abnormalitäten festgestellt werden.

Ein Doppel-Knockout von CD44 und RHAMM sollte Aufschluss darüber geben, ob RHAMM in der Lage ist weitere Funktionen von CD44 zu übernehmen. Durch den zusätzlichen Verlust von RHAMM sollte es möglich sein, eine Reduktion der CIA zu beobachten.

Diese Substitution von CD44 durch RHAMM zeigt, dass es nicht notwendigerweise zu einer veränderten Expression des Substitutionsmoleküls kommen muss, um den Verlust von CD44 zu kompensieren. Dies erschwert zusätzlich die Identifizierung eines redundanten Moleküls, da der erste Schritt meist die vergleichende Analyse der Expressionsprofile von Knockout und Wildtyp ist. Da CD44 so vielfältige Funktionen in der Entwicklung erfüllt, ist es wahrscheinlich, dass mehrere Proteine existieren, welche jeweils für einen bestimmten Teil der Funktionen, den Verlust von

CD44 substituieren können.

Einen weiteren Beweis für eine Substitution von CD44 in der Embryogenese bei CD44-defizienten Mäusen, ergab sich bei Kreuzungen von c-Met^{+/-} / CD44^{+/-} mit c-Met^{+/+} / CD44^{-/-}-Mäusen.

Der c-Met Knockout ist aufgrund eines Defekts der Plazenta letal. Heterozygote c-Met Mäuse hingegen entwickelten sich auch bei Verlust eines CD44 Allels (c-Met^{+/-} / CD44^{+/-}) normal. Wurden allerdings durch die erwähnte Kreuzung c-Met^{+/-} / CD44^{-/-}-Mäuse generiert, so starb ein Teil der Nachkommen kurz nach der Geburt aufgrund einer fehlerhaften Kontrolle der Lungenfunktion (MATZKE, ORIAN-ROUSSEAU, unveröffentlichte Daten). Hieraus lässt sich auf eine Haploinsuffizienz von c-Met im Hintergrund der CD44-Defizienz schließen.

Nach dem Verlust eines Allels von c-Met im Hintergrund einer CD44-Defizienz, kann vermutlich das Substitutionsmolekül die Ko-Rezeptor-Funktion von CD44 bei der Interaktion mit c-Met nicht ausreichend übernehmen. Das deutet darauf hin, dass in heterozygoten c-Met-Mäusen ein Allel von CD44 effektiver ist als zwei Allele des Substitutionsmoleküls.

Hieraus lässt sich einerseits folgern, dass ein Zusammenspiel zwischen c-Met und CD44 während der Embryogenese essentielle Funktionen erfüllt, andererseits kann das mit c-Met interagierende Substitutionsmolekül die Funktion von CD44 nur unzureichend ersetzen.

5. Literaturverzeichnis

- ASSMANN, V., MARSHALL, JF., FIEBER, C., HOFMANN, M., HART, IR. (1998). The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J. Cell Sci.*, **111**: 1685–1694
- BAJORATH, J., GREENFIELD, B., MUNRO, SB., *et al.* (1998). Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J. Biol. Chem.*, **273**: 338–343
- BANERJI, S., WRIGHT, AJ., NOBLE, M., MAHONEY, DJ., CAMPBELL, ID., DAY, AJ., JACKSON, DG.(2007). Structures of the Cd44–hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate protein interaction. *Nature Structural & Molecular Biology*, published online 11 February 2007
- BENNETT, KL., JACKSON, DG., SIMON, JC., *et al.* (1995). CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell Biol.*, **128**: 687–698
- BIRCHMEIER, C., BIRCHMEIER, W., GHERARDI, E., VANDE WOUDE, GF. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**: 915–925
- BLADT, F., RIETHMACHER, D., ISENMANN, S., AGUZZI, A., BIRCHMEIER, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, **376**: 768–771
- BOTTARO, DP., *et al.* (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, **251**: 802–804
- BOURGUIGNON, LY., GUNJA-SMITH, Z., IIDA, N., *et al.* (1998). CD44v (3,8–10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J. Cell Physiol.*, **176**: 206–215
- BRETSCHER, A., GARY, R., BERRYMAN, M., (1995). Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry*, **34**: 16830–16837
- CHEUNG, WF., CRUZ, TF., TURLEY, EA. (1999). Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors. *Biochem. Soc. Trans.*, **27**: 135–142

- CREPALDI, T., GAUTREAU, A., COMOGGIO, PM., LOUVARD, D., ARPIN, M. (1997). Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **138**: 423–434
- DALCHAU, R., KIRKLEY, J., FABRE, JW. (1980). Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 737-744
- DIETRICH, S. *et al.* (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development*, **126**: 1621–1629
- FAASSEN, AE., SCHRAGER, JA., KLEIN, DJ., *et al.* (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J. Cell Biol.*, **116**: 521–531
- GAO, AC., LOU, W., DONG, JT., ISAACS, JT. (1997). CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.*, **57**: 846–849
- GHERARDI, E. *et al.* (2003). Functional map and domain structure of the MET (HGF/SF) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 12039–12044
- GIORDANO, S., *et al.* (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nature Cell Biol.*, **4**: 720–724
- GOODFELLOW, PN., BANTING, G., WILES, MV., *et al.* (1982). The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.*, **12**: 659–663
- GOODISON, S., URQUIDI, V., TARIN, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.*, **52** (4): 189-196
- GÜNTHERT, U., HOFMANN, M., RUDY, W., REBER, S., ZÖLLER, 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
- HAMMOND, DE., URBE, S., VANDE WOUDE, GF. CLAGUE, MJ. (2001). Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene*, **20**: 2761–2770
- HARTMANN, G., WEIDNER, KM., SCHWARZ, H., BIRCHMEIER, W. (1994). The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21936–21939
- signaling pathway. *J. Cell Biol.*, **135**: 37–51

- HOFMANN, M., FIEBER, C., ASSMANN, V., GOTTLICHER, M., SLEEMAN, J., PLUG, R., HOWEL VON STEIN, O., PONTA, H., HERRLICH, P. (1998). Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J. Cell Sci.*, **111**: 1673–1684.
- HOFMANN, M., RUDY, W., ZÖLLER, M., *et al.* (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.*, **51**: 5292–5297
- HOLLY, SP., LARSON, MK., PARISE, LV. (2005). The Unique N-Terminus of R-Ras Is Required for Rac Activation and Precise Regulation of Cell Migration. *Mol. Biol. Cell*, **16**: 2458–2469
- JALKANEN, S., JALKANEN, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.*, **116**: 817–825
- JEFFERS, M., TAYLOR, GA., WEIDNER, KM., OMURA, S., VANDE WOUDE, GF. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 799–808
- KATOH, S., ZHENG, Z., ORITANI, K., SHIMOZATO, T., KINCADE, PW. (1995). Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J. Exp. Med.*, **182**: 419–429
- KAYA, G., RODRIGUEZ, I., JORCANO, JL., VASSALLI, P. STAMENKOVIC, I. (1997). Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense *CD44* transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev.*, **11**: 996–1007
- KHWAJA, A., LEHMANN, K., MARTE, BM., DOWNWARD, J. (1998). Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**: 18793–18801
- KNUTSON, JR., IIDA, J., FIELDS, GB., *et al.* (1996). CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol. Biol. Cell*, **7**: 383–396
- KOHDA, D., MORTON, CJ., PARKAR, AA., *et al.* (1996). Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell*, **86**: 767–775
- KÖNIG, H., PONTA, H., HERRLICH, P. (1998). Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator. *EMBO J.*, **10**: 2904–2913

- KRIEG, J., HUNTER, T. (1992). Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J. Biol. Chem.*, **267**: 19258–19265
- LEGG, J. W., ISACKE, CM. (1998). Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr. Biol.* **8**: 705–708
- LEGG, JW., LEWIS, CA., PARSONS, M., NG, T., SACKE, CM. (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nature Cell Biol.*, **4**: 399–407
- LESLEY, J., ENGLISH, N., PERSCHL, A., *et al.* (1995). Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J. Exp. Med.*, **182**: 431–437
- LESLEY, J., KINCADE, PW., HYMAN, R. (1993). Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur. J. Immunol.*, **23**:1902–1909
- LIU, D., SY, MS. (1997). Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J. Immunol.*, **159**: 2702–2711
- LOCK, LS., ROYAL, I., NAUJOKAS, MA., PARK, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2- dependent and-independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **275**: 31536–31545
- LOUVET-VALLÉE, S. (2000). ERM proteins: From cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell*, **92**: 305-316
- MAROUN, CR., *et al.* (1999). The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell–cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 1784–1799
- MARHABA, R., ZÖLLER, M. (2004). CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. *J. Mol. Histology*, **35**: 211–231
- MATSUI, T., *et al.* (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their tail association. *J. Cell. Biol.*, **140**: 647-657
- MATZKE, A., HERRLICH, P., PONTA, H., ORIAN-ROUSSEAU, V. (2005). A 5-amino-acid peptide blocks Met and Ron dependent cell migration. *Cancer Res.*, **65**: 6105–6110
- MIKECZ, K., BRENNAN, FR., KIM, JH., GLANT, TT. (1995). Anti-CD44 treatment abrogates tissue edema and leukocyte infiltration in murine arthritis. *Nature Me.*, **1**: 558–63

- MOHAPATRA, S., YANG, X., WRIGHT, JA., TURLEY, EA., GREENBERG, AH. (1996). Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J. Exp. Med.*, **183**: 1663–1668
- NAKAMURA, F., HUANG, L., PESTONJAMASP, K., LUNA, EJ., FURTHMAYR, H. (1999). Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol. Biol. Cell*, **10**: 2669-26685
- NAKAMURA, T., MIZUNO, S., MATSUMOTO, K., SAWA, Y., MATSUDA, H. (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.*, **106**: 1511–1519
- NAOR, D., SIONOV, RV., ISH-SHALOM, D. (1997). CD44, structure, function and association with the malignant process. In: *Advances in Cancer Research*, Vol. 71, ed. G. F. Vande Woude and G. Klein, San Diego, CA: Elsevier, Academic Press, 243–318
- NEDVETZKI, S., *et al.* (1999). CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA). *J. Autoimmun.*, **13**: 39–47
- NEDVETZKI, S., GONEN, E., ASSAYAG, N., REICH, R., WILLIAMS, RO., THURMOND, RL., HUANG, JF., NEUDECKER, BA., WANG, FS., TURLEY, EA., NAOR, D. (2004). RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *PNAS*, **101** (52): 18081–18086
- NG, T., PARSONS, M., HUGHES, WE., MONYPENNY, J., ZICHA, D., GAUTREAU, A., ARPIN, M., GSCHMEISSNER, S., VERVEER, PJ., BASTIAENS, PIH., PARKER, PJ. (2001). Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.*, **20**: 2723–2741
- NUNOMURA, W., TAKAKUWA, Y., TOKIMITSU, R., *et al.* (1997). Regulation of CD44–protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44–ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.*, **272**: 30322–30328
- ORIAN-ROUSSEAU, V., CHEN, L., SLEEMAN, JP., HERRLICH, P., PONTA, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.*, **16**(23): 3074-86
- ORIAN-ROUSSEAU, V., MORRISON, H., MATZKE, A., KASTILAN, T., PACE, G., HERRLICH, P., PONTA, H. (2007). Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to both CD44v6 and F-Actin. *Mol. Biol. Cell*, **18**: 76-83
- OZAKI, K., LEONARD, WJ. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.*, **277**: 29355–29358

- PAUMELLE, R., *et al.* (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*, **21**: 2309–2319
- PESCHARD, P., *et al.* (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell*, **8**: 995–1004
- PIETROMONACO, SF., SIMONS, PC., ALTMAN, A., ELIAS, L. (1998). Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J. Biol. Chem.*, **273**: 7594–7603
- PLOWMAN, SJ., MUNCKE, C., PARTON, RG., HANCOCK, JF. (2005). H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *PNAS*, **25** (102): 15500-15505
- PONTA, H., SHERMAN, L., HERRLICH, PA. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4** (1): 33-45
- PONZETTO, C., *et al.* (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, **77**: 261–271
- POTEMPA, S., RIDLEY, AJ. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol. Biol. Cell*, **9**: 2185–2200
- PROTIN, U., SCHWEIGHOFFER, T., JOCHUM, W., HILBERG, F. (1999). CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J. Immunol.*, **163**: 4917–4923
- RIDLEY, AJ., COMOGLIO, PM., HALL, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 1110–1122 stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**: 4731–4735
- ROYAL, I., LAMARCHE-VANE, N., LAMORTE, L., KAIBUCHI, K., PARK, M. (2000). Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell*, **11**: 1709–1725
- RUIZ, P., SCHWÄRZLER, C., GÜNTHERT, U. (1995). CD44 isoforms during differentiation and development. *Biol. Essays*, **17**:17
- SCHAEPER, U., *et al.* (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.*, **149**: 1419–1432
- SCHMIDT, L., *et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genet.*, **16**: 68–73

- SCHMITS, R., FILMUS, J., GERWIN, N., SENALDI, G., KIEFER, F., KUNDIG, T., WAKEHAM, A., SHAHINIAN, A., CATZAVELOS, C., RAK, J., FURLONGER, C., ZAKARIAN, A., SIMARD, JJ., OHASHI, PS., PAIGE, CJ., GUTIERREZ-RAMOS, JC., MAK, TW. (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood*, **90**: 2217–2233
- SCREATON, GR., *et al.* (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 12160–12164
- SHARMA, GD., OTTINO, P., BAZAN, NG., BAZAN, HEP. (2005). Epidermal and Hepatocyte Growth Factors, but Not Keratinocyte Growth Factor, Modulate Protein Kinase C Translocation to the Plasma Membrane through 15(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Synthesis. *JBC*, **280** (9): 7917-7924
- SHERMAN, L., SLEEMAN, J., DALL, P., *et al.* (1996). The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **213**: 249–269
- SIMONS, PC., PIETROMONACO, SF., RECZEK, D., BRETSCHER, A., ELIAS, L. (1998). Cterminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**: 561–565
- SLEEMAN, J., KONDO, K., MOLL, J., PONTA, H., HERRLICH, P. (1997). Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J. Biol. Chem.*, **272**: 31837–31844
- STAPLETON, G., MALLIRI, A., OZANNE, BW. (2002). Downregulated AP-1 activity is associated with inhibition of Protein-Kinase-C-dependent CD44 and ezrin localisation and upregulation of PKC theta in A431 cells. *J. Cell Sci.*, **115**: 2713-2724
- STOKER, M., GHERARDI, E., PERRYMAN, M., GRAY, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, **327**: 239–242
- TAKEUCHI, K., KAWASHIMA, A., NAGAFUCHI, A., TSUKITA, S. (1994). Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J. Cell Sci.*, **107**: 1921–1928
- TERPE, HJ., STARK, H., PREHM, P., GÜNTHER, U. (1994). CD44 variant isoforms are expressed preferentially in basal epithelia of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry*, **101**: 79-89
- THIERY, JP. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer* **2**: 442–454

- TOYAMA-SORIMACHI, N., MIYASAKA, M. (1994) A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int. Immunol.*, **6**: 655–660
- TOYAMA-SORIMACHI, N., SORIMACHI, H., TOBITA, Y., *et al.* (1995). A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineagespecific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J. Biol. Chem.*, **270**: 7437–7444
- TOYAMA-SORIMACHI, N., KITAMURA, F., HABUCHI, H., *et al.* (1997). Widespread expression of chondroitin sulfate-type serglycins with CD44 binding ability in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26714–26719
- TRAN QUANG, C., GAUTREAU, A., ARPIN, M., TREISMAN, R. (2000). Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the *Net* and *Dbl* oncogenes. *EMBO J.*, **19**: 4565–4576
- TRUSOLINO, L., BERTOTTI, A., COMOGLIO, PM. (2001). A signaling adapter function for $\alpha 6\beta 4$ integrin in the control of HGFdependent invasive growth. *Cell*, **107**: 643–654
- TSUKITA, S., OISHI, K., SATO, N., *et al.* (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.*, **126**: 391–401
- TURLEY, EA., NOBLE, PW., BOURGUIGNON, LYW. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**: 4589–4592
- TURUNEN, O., WAHLSTROM, T., VAHERI, A. (1994). Ezrin has a COOHterminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J. Cell Biol.*, **126**: 1445–1453
- UE, T., YOKOZAKI, H., KITADAI, Y., *et al.* (1998). Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int. J. Cancer*, **79**: 127–132
- WANG, X., *et al.* (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol. Cell*, **9**: 411–421
- WEBER, GF., ASHKAR, S., CANTOR, H. (1997). Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, **109**: 1–9
- WEG-REMERS, S., PONTA, H., HERRLICH, P., KÖNIG, H. (2001). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAPkinase pathway. *EMBO J.*, **20**: 4194–4203
- WEIDNER, KM., *et al.* (1996). Interaction between gab1 and the c met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, **384**: 173–176

- WHEATLEY, SC., ISACKE, CM., CROSSLEY, PH. (1993). Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44. during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development*, **119**: 295-306
- WIRTH, K., *et al.* (1993). Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats. *Eur. J. Cancer*, **29A**: 1172-1177
- YANG, B., HALL, CL., YANG, BL., SAVANI, RC., TURLEY, EA. (1994). Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells. *J. Cell Biochem.*, **56**: 455–468
- YANG, B., YANG, BL., SAVANI, RC., *et al.* (1994). Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.*, **13**: 286–96
- YONEMURA, S., HIRAO, M., DOI, Y., *et al.* (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.*, **140**: 885–895
- YONEMURA, S., MATSUI, T., TSUKITA, S., TSUKITA, S. (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides *in vivo*. *J. Cell Sci.*, **115** (12): 2569-2580

6. Abkürzungsverzeichnis

ABD	Aktin-Bindedomäne
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C-ERMAD	<i>C-ERM associated domain</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CD44s	Standardisoform von CD44
CD44v	variante Isoform von CD44
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	Fötales Kälberserum
FERM	<i>four.one protein, ezrin, radixin, moesin</i>
HA	Hyaluronsäure
HA-ERK	Hämagglutinin getaggte ERK
HB-EGF	<i>heparin binding epidermal growth factor</i>
HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor/ scatter factor</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEK	MAPK/ ERK kinase
N-ERMAD	<i>N-ERM associated domain</i>
Neo	Neomycin
NMD	<i>nonsense mediated RNA decay</i>
OD	optische Dichte
ORS	<i>outer root sheath</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-Phosphat Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TK	Thymin Kinase
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
U	Unit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

7. Anhang

Sequenzen der PCR-Primer (vergl. Kapitel 2.1.12)

<i>Primername</i>	<i>Sequenz</i>
CD44 extern for	AGC CTG TGT TCA TGG TAC TAA TGT
CD44 extern rev	TAC TGC CTG ATA CCA TCA GAA GC
CD44 extern rev 2	GGT AAC CGG TCC ATC GAA GG
CD44 for	GAC CCT TTT CCA GAG GCT AC
CD44 intern for	TCG AGG TCG ACA TAA CTT CGT AT
CD44 intern rev	ACA GGA AGG ACA GGA AGA ATA GC
CD44 rev	CAA AAG CTT CCT CCT ACT GTT G
CD44 SB1 for	CAT ACT CGA AGC TTG GTC CAT
CD44 SB1 rev	CAG TCT TCA CCT TGC TAC CTT AGC
CD44 SB2 for	CAT AGC GAA AGA ATC GGG GTA G
CD44 SB2 rev	CAT TCT AGG TCA GGT CAT TCT AGG TCA GGT
CD44 SB3 for	AAG CAC TTC ACT GGC TGA GC
CD44 SB3 rev	TCT GCA CAG TCA AGA CTC TGC
Ezrin for	CTC GGA AGC TTA GCC ACC AAC CAG CCA AGA TGC C
Ezrin rev VSV-G	CAA AGC TTG AAT TCC TAC TTG CCC AGC CGG TTC ATC TCG ATG TCG GTG TAC ATG GCC TCA AAC
LoxP 2 rev	GCG CCC ACG TGT CGA CAT AAC TT
LoxP1 for	CTT GAG TAG CGC TAG ACC TCG AG

Sequenzen der Mutagenese-Primer (vergl. Kapitel 2.1.13)

<i>Primername</i>	<i>Sequenz</i>
Ezrin T567D s Ezrin T567D as	GAC AAG TAC AAG GAC CTG CGG CAG ATC CGG CAG G CCT GCC GGA TCT GCC GCA GGT CCT TGT ACT TGT C
EzrinDelNtermStartS EzrinDelNtermStartAS	TGC CCA AGC CAA TCA ACA CGC GTG TGA CCA CCA TGG ATG C GCA TCC ATG GTG GTC ACA CGC GTG TTG ATT GGC TTG GGC A
EzrinDelNtermEndS EzrinDelNtermEndAS	CCT GAC TTC GTG TTC TAC ACG CGT CGC CTG AGA ATT AAC AAG CG CGC TTG TTA ATT CTC AGG CGA CGC GTG TAG AAC ACG AAG TCA GG
Muta <i>Mlu</i> I Start s Muta <i>Mlu</i> I Start as	CAC AAT GAC ATC ACG CGT AAT GAG AAC ATG CG CGC ATG TTC TCA TTA CGC GTG ATG TCA TTG TG
Muta <i>Mlu</i> I Ende s Muta <i>Mlu</i> I Ende as	GAC GAG TTT GAA ACG CGT TAC ACC GAC ATC G CGA TGT CGG TGT AAC GAG TTT CAA ACT CGT C

DNA-Sequenz der Fusion in pCD44v4-7 Δ cyt -Ezrin

Start CD44

ATG GAC AAG TTT TGG TGG CAC ACA GCT TGG GGA CTT TGC CTC TTG CAG TTG AGC CTG GCA
 1 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 60
 TAC CTG TTC AAA ACC ACC GTG TGT CGA ACC CCT GAA ACG GAG AAC GTC AAC TCG GAC CGT
Met Asp Lys Phe Trp Trp His Thr Ala Trp Gly Leu Cys Leu Leu Gln Leu Ser Leu Ala

CAT CCA CAT CAG CAG ATC GAT TTG AAT GTA ACC TGC CGC TAC GCA GGT GTA TTC CAT GTG
 61 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 120
 GTA GGT GTA GTC GTC TAG CTA AAC TTA CAT TGG ACG GCG ATG CGT CCA CAT AAG GTA CAC
 His Pro His Gln Gln Ile Asp Leu Asn Val Thr Cys Arg Tyr Ala Gly Val Phe His Val

GAG AAA AAT GGC CGC TAC AGT ATC TCC CGG ACT GAG GCA GCT GAC CTC TGC CAG GCT TTC
 121 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 180
 CTC TTT TTA CCG GCG ATG TCA TAG AGG GCC TGA CTC CGT CGA CTG GAG ACG GTC CGA AAG
 Glu Lys Asn Gly Arg Tyr Ser Ile Ser Arg Thr Glu Ala Ala Asp Leu Cys Gln Ala Phe

AAC AGT ACC TTA CCC ACC ATG GAC CAA ATG AAG TTG GCC CTG AGC AAG GGT TTT GAA ACA
 181 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 240
 TTG TCA TGG AAT GGG TGG TAC CTG GTT TAC TTC AAC CGG GAC TCG TTC CCA AAA CTT TGT
 Asn Ser Thr Leu Pro Thr Met Asp Gln Met Lys Leu Ala Leu Ser Lys Gly Phe Glu Thr

TGC AGG TAT GGG TTC ATA GAA GGA AAT GTG GTA ATT CCG AGG ATT CAT CCC AAC GCT ATC
 241 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 300
 ACG TCC ATA CCC AAG TAT CTT CCT TTA CAC CAT TAA GGC TCC TAA GTA GGG TTG CGA TAG
 Cys Arg Tyr Gly Phe Ile Glu Gly Asn Val Val Ile Pro Arg Ile His Pro Asn Ala Ile

TGT GCA GCC AAC CAC ACA GGA GTA TAT ATC CTC GTC ACG TCC AAC ACC TCC CAC TAT GAC
 301 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 360
 ACA CGT CGG TTG GTG TGT CCT CAT ATA TAG GAG CAG TGC AGG TTG TGG AGG GTG ATA CTG
 Cys Ala Ala Asn His Thr Gly Val Tyr Ile Leu Val Thr Ser Asn Thr Ser His Tyr Asp

ACA TAT TGC TTC AAT GCC TCA GCC CCT CCT GAA GAA GAC TGT ACA TCA GTC ACA GAC CTA
 361 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 420
 TGT ATA ACG AAG TTA CGG AGT CGG GGA GGA CTT CTT CTG ACA TGT AGT CAG TGT CTG GAT
 Thr Tyr Cys Phe Asn Ala Ser Ala Pro Pro Glu Glu Asp Cys Thr Ser Val Thr Asp Leu

Anhang

```
CCC AAT TCC TTC GAT GGA CCG GTT ACC ATA ACT ATT GTC AAC CGT GAT GGT ACT CGC TAC
421 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 480
GGG TTA AGG AAG CTA CCT GGC CAA TGG TAT TGA TAA CAG TTG GCA CTA CCA TGA GCG ATG
Pro Asn Ser Phe Asp Gly Pro Val Thr Ile Thr Ile Val Asn Arg Asp Gly Thr Arg Tyr

AGC AAG AAG GGC GAG TAT AGA ACA CAC CAA GAA GAC ATC GAT GCT TCA AAC ATT ATA GAT
481 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 540
TCG TTC TTC CCG CTC ATA TCT TGT GTG GTT CTT CTG TAG CTA CGA AGT TTG TAA TAT CTA
Ser Lys Lys Gly Glu Tyr Arg Thr His Gln Glu Asp Ile Asp Ala Ser Asn Ile Ile Asp

GAC GAT GTC AGC AGC GGC TCC ACC ATC GAG AAG AGC ACC CCA GAA AGC TAC ATT TTG CAC
541 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 600
CTG CTA CAG TCG TCG CCG AGG TGG TAG CTC TTC TCG TGG GGT CTT TCG ATG TAA AAC GTG
Asp Asp Val Ser Ser Gly Ser Thr Ile Glu Lys Ser Thr Pro Glu Ser Tyr Ile Leu His

ACC TAC CTT CCT ACT GAA CAG CCT ACT GGA GAT CAG GAT GAC TCC TTC TTT ATC CGG AGC
601 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 660
TGG ATG GAA GGA TGA CTT GTC GGA TGA CCT CTA GTC CTA CTG AGG AAG AAA TAG GCC TCG
Thr Tyr Leu Pro Thr Glu Gln Pro Thr Gly Asp Gln Asp Asp Ser Phe Phe Ile Arg Ser

ACC TTG GCC ACC ATT GCA AGT ACT CCA CGG GTT TCT GCC CGC ACA GAA GAC AAC CAG GAC
661 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 720
TGG AAC CGG TGG TAA CGT TCA TGA GGT GCC CAA AGA CGG GCG TGT CTT CTG TTG GTC CTG
Thr Leu Ala Thr Ile Ala Ser Thr Pro Arg Val Ser Ala Arg Thr Glu Asp Asn Gln Asp

TGG ACC CAG TGG AAG CCA AAC CAT TCA AAC CCA GAA GTA CTA CTC CAG ACA ACC ACC AGG
721 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 780
ACC TGG GTC ACC TTC GGT TTG GTA AGT TTG GGT CTT CAT GAT GAG GTC TGT TGG TGG TCC
Trp Thr Gln Trp Lys Pro Asn His Ser Asn Pro Glu Val Leu Leu Gln Thr Thr Thr Arg

ATG GCT GAT ATA GAC AGA ATC AGC ACC AGT GCT CAT GGA GAA AAT TGG ACC CCG GAA CCA
781 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 840
TAC CGA CTA TAT CTG TCT TAG TCG TGG TCA CGA GTA CCT CTT TTA ACC TGG GGC CTT GGT
Met Ala Asp Ile Asp Arg Ile Ser Thr Ser Ala His Gly Glu Asn Trp Thr Pro Glu Pro
```

```

CAG CCT CCT TTC AAT AAC CAT GAG TAT CAG GAT GAA GAG GAG ACC CCA CAT GCT ACA AGC
841 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 900
GTC GGA GGA AAG TTA TTG GTA CTC ATA GTC CTA CTT CTC CTC TGG GGT GTA CGA TGT TCG
Gln Pro Pro Phe Asn Asn His Glu Tyr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Pro His Ala Thr Ser

ACA ACT CCT AAT AGT ACA GCA GAA GCA GCA GCT ACC CAG CAG GAG ACG TGG TTT CAG AAC
901 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 960
TGT TGA GGA TTA TCA TGT CGT CTT CGT CGT CGA TGG GTC GTC CTC TGC ACC AAA GTC TTG
Thr Thr Pro Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ala Ala Thr Gln Gln Glu Thr Trp Phe Gln Asn

GGA TGG CAG GGG AAG AAC CCC CCT ACC CCA AGT GAA GAC TCC CAT GTG ACA GAA GGG ACA
961 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1020
CCT ACC GTC CCC TTC TTG GGG GGA TGG GGT TCA CTT CTG AGG GTA CAC TGT CTT CCC TGT
Gly Trp Gln Gly Lys Asn Pro Pro Thr Pro Ser Glu Asp Ser His Val Thr Glu Gly Thr

ACT GCT TCG GCC CAC AAC AAC CAT CCA AGT CAA AGA ATA ACA ACA CAG AGT CAA GAG GAT
1021 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1080
TGA CGA AGC CGG GTG TTG TTG GTA GGT TCA GTT TCT TAT TGT TGT GTC TCA GTT CTC CTA
Thr Ala Ser Ala His Asn Asn His Pro Ser Gln Arg Ile Thr Thr Gln Ser Gln Glu Asp

GTT TCC TGG ACA GAT TTC TTC GAC CCA ATC TCA CAT CCA ATG GGA CAA GGT CAT CAA ACA
1081 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1140
CAA AGG ACC TGT CTA AAG AAG CTG GGT TAG AGT GTA GGT TAC CCT GTT CCA GTA GTT TGT
Val Ser Trp Thr Asp Phe Phe Asp Pro Ile Ser His Pro Met Gly Gln Gly His Gln Thr

GAA AGC AAG GGA GAT CGA GAC TCA TCC AAG GAC TCC AGG GGG AGT TCC CGC ACT GTG ACT
1141 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1200
CTT TCG TTC CCT CTA GCT CTG AGT AGG TTC CTG AGG TCC CCC TCA AGG GCG TGA CAC TGA
Glu Ser Lys Gly Asp Arg Asp Ser Ser Lys Asp Ser Arg Gly Ser Ser Arg Thr Val Thr

CAT GGA TCC GAA TTA GCT GGA CAC TCA AGT GCG AAC CAG GAC AGT GGA GTG ACC ACA ACT
1201 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1260
GTA CCT AGG CTT AAT CGA CCT GTG AGT TCA CGC TTG GTC CTG TCA CCT CAC TGG TGT TGA
His Gly Ser Glu Leu Ala Gly His Ser Ser Ala Asn Gln Asp Ser Gly Val Thr Thr Thr

```

TCT GGT CCT ATG AGG AGA CCT CAG ATT CCA GAA TGG CTC ATC ATC TTG GCA TCT CTC CTG
 1261 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1320
 AGA CCA GGA TAC TCC TCT GGA GTC TAA GGT CTT ACC GAG TAG TAG AAC CGT AGA GAG GAC
 Ser Gly Pro Met Arg Arg Pro Gln Ile Pro Glu Trp Leu Ile Ile Leu Ala Ser Leu Leu

Ende der Transmembran-Domäne von CD44v4-7

GCA CTG GCT CTG ATT CTT GCC GTC TGC ATC GCG GTC AAT AGT AGG **AGG** AAG CTT GGT ACC
 1321 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1380
 CGT GAC CGA GAC TAA GAA CGG CAG ACG TAG CGC CAG TTA TCA TCC TCC TTC GAA CCA TGG
 Ala Leu Ala Leu Ile Leu Ala Val Cys Ile Ala Val Asn Ser Arg **Arg** Lys Leu Gly Thr

GAG CTC GGA TCC ACT AGT AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA CTT CGG CTT AGC CAC CAA CCA
 1381 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1440
 CTC GAG CCT AGG TGA TCA TTG CCG GCG GTC ACA CGA CCT GAA GCC GAA TCG GTG GTT GGT
 Glu Leu Gly Ser Thr Ser Asn Gly Arg Gln Cys Ala Gly Leu Arg Leu Ser His Gln Pro

Mutation zu ACTCGT (MluI) für

Deletion von N-term Ezrin

Start Ezrin

GCC AAG ATG CCC AAG CCA ATC AAC **GTC CGC** GTG ACC ACC **ATG** GAT GCA GAG CTG GAG TTT
 1441 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1500
 CGG TTC TAC GGG TTC GGT TAG TTG CAG GCG CAC TGG TGG TAC CTA CGT CTC GAC CTC AAA
 Ala Lys Met Pro Lys Pro Ile Asn Val Arg Val Thr Thr **Met** Asp Ala Glu Leu Glu Phe

GCC ATC CAG CCA AAC ACC ACC GGG AAG CAG CTC TTT GAT CAG GTG GTA AAG ACC ATT GGC
 1501 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1560
 CGG TAG GTC GGT TTG TGG TGG CCC TTC GTC GAG AAA CTA GTC CAC CAT TTC TGG TAA CCG
 Ala Ile Gln Pro Asn Thr Thr Gly Lys Gln Leu Phe Asp Gln Val Val Lys Thr Ile Gly

CTC CGG GAA GTG TGG TAC TTC GGC CTC CAG TAT GTA GAC AAT AAA GGA TTT CCT ACC TGG
 1561 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1620
 GAG GCC CTT CAC ACC ATG AAG CCG GAG GTC ATA CAT CTG TTA TTT CCT AAA GGA TGG ACC
 Leu Arg Glu Val Trp Tyr Phe Gly Leu Gln Tyr Val Asp Asn Lys Gly Phe Pro Thr Trp

CTG AAA CTT GAT AAA AAG GTC TCT GCA CAG GAG GTT CGA AAG GAG AAC CCT GTC CAG TTC
 1621 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 1680
 GAC TTT GAA CTA TTT TTC CAG AGA CGT GTC CTC CAA GCT TTC CTC TTG GGA CAG GTC AAG
 Leu Lys Leu Asp Lys Lys Val Ser Ala Gln Glu Val Arg Lys Glu Asn Pro Val Gln Phe

```

AAA TTC CGG GCC AAG TTC TAC CCC GAG GAT GTG GCT GAT GAG CTC ATC CAG GAC ATC ACA
1681 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1740
TTT AAG GCC CGG TTC AAG ATG GGG CTC CTA CAC CGA CTA CTC GAG TAG GTC CTG TAG TGT
Lys Phe Arg Ala Lys Phe Tyr Pro Glu Asp Val Ala Asp Glu Leu Ile Gln Asp Ile Thr

CAG AAG CTC TTC TTC CTG CAA GTC AAG GAA GGG ATC CTC AGC GAT GAG ATC TAC TGC CCC
1741 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1800
GTC TTC GAG AAG AAG GAC GTT CAG TTC CTT CCC TAG GAG TCG CTA CTC TAG ATG ACG GGG
Gln Lys Leu Phe Phe Leu Gln Val Lys Glu Gly Ile Leu Ser Asp Glu Ile Tyr Cys Pro

CCA GAG ACA GCC GTG CTC CTG GGG TCC TAT GCC GTT CAG GCC AAG TTC GGA GAT TAT AAC
1801 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1860
GGT CTC TGT CGG CAC GAG GAC CCC AGG ATA CGG CAA GTC CGG TTC AAG CCT CTA ATA TTG
Pro Glu Thr Ala Val Leu Leu Gly Ser Tyr Ala Val Gln Ala Lys Phe Gly Asp Tyr Asn

AAG GAA ATG CAC AAG TCT GGG TAC CTC AGC TCC GAG GGA CTT ATC CCT CAG AGA GTC ATG
1861 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1920
TTC CTT TAC GTG TTC AGA CCC ATG GAG TCG AGG CTC CCT GAA TAG GGA GTC TCT CAG TAC
Lys Glu Met His Lys Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Glu Gly Leu Ile Pro Gln Arg Val Met

GAC CAG CAC AAG CTC AGC AGG GAC CAG TGG GAG GAC CGG ATC CAG GTG TGG CAC GCA GAA
1921 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 1980
CTG GTC GTG TTC GAG TCG TCC CTG GTC ACC CTC CTG GCC TAG GTC CAC ACC GTG CGT CTT
Asp Gln His Lys Leu Ser Arg Asp Gln Trp Glu Asp Arg Ile Gln Val Trp His Ala Glu

CAC CGA GGG ATG CTC AAG GAC AGT GCT ATG CTC GAA TAC CTG AAG ATT GCC CAG GAC CTG
1981 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2040
GTG GCT CCC TAC GAG TTC CTG TCA CGA TAC GAG CTT ATG GAC TTC TAA CGG GTC CTG GAC
His Arg Gly Met Leu Lys Asp Ser Ala Met Leu Glu Tyr Leu Lys Ile Ala Gln Asp Leu

GAA ATG TAT GGG ATC AAC TAT TTC GAG ATC AAA AAC AAG AAA GGA ACA GAT CTT TGG CTT
2041 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2100
CTT TAC ATA CCC TAG TTG ATA AAG CTC TAG TTT TTG TTC TTT CCT TGT CTA GAA ACC GAA
Glu Met Tyr Gly Ile Asn Tyr Phe Glu Ile Lys Asn Lys Lys Gly Thr Asp Leu Trp Leu

```

GGA GTG GAT GCC CTT GGA CTT AAC ATT TAT GAG AAA GAT GAC AAG TTG ACC CCG AAG ATC
 2101 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2160
 CCT CAC CTA CGG GAA CCT GAA TTG TAA ATA CTC TTT CTA CTG TTC AAC TGG GGC TTC TAG
 Gly Val Asp Ala Leu Gly Leu Asn Ile Tyr Glu Lys Asp Asp Lys Leu Thr Pro Lys Ile

GGC TTC CCT TGG AGT GAA ATC AGG AAC ATC TCT TTC AAC GAC AAG AAG TTT GTC ATC AAG
 2161 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2220
 CCG AAG GGA ACC TCA CTT TAG TCC TTG TAG AGA AAG TTG CTG TTC TTC AAA CAG TAG TTC
 Gly Phe Pro Trp Ser Glu Ile Arg Asn Ile Ser Phe Asn Asp Lys Lys Phe Val Ile Lys

**Mutation zu ACTCGT (MluI) für
 Deletion von N-term Ezrin**

CCC ATC GAC AAG AAG GCT CCT GAC TTC GTG TTC TAC **GCT CCC** CGC CTG AGA ATT AAC AAG
 2221 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2280
 GGG TAG CTG TTC TTC CGA GGA CTG AAG CAC AAG ATG CGA GGG GCG GAC TCT TAA TTG TTC
 Pro Ile Asp Lys Lys Ala Pro Asp Phe Val Phe Tyr Ala Pro Arg Leu Arg Ile Asn Lys

CGG ATT CTG CAG CTC TGC ATG GGG AAC CAC GAG CTG TAC ATG CGC CGC AGG AAG CCC GAC
 2281 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2340
 GCC TAA GAC GTC GAG ACG TAC CCC TTG GTG CTC GAC ATG TAC GCG GCG TCC TTC GGG CTG
 Arg Ile Leu Gln Leu Cys Met Gly Asn His Glu Leu Tyr Met Arg Arg Arg Lys Pro Asp

ACC ATC GAG GTG CAG CAG ATG AAG GCC CAG GCT CGG GAG GAG AAG CAC CAG AAG CAG CTG
 2341 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2400
 TGG TAG CTC CAC GTC GTC TAC TTC CGG GTC CGA GCC CTC CTC TTC GTG GTC TTC GTC GAC
 Thr Ile Glu Val Gln Gln Met Lys Ala Gln Ala Arg Glu Glu Lys His Gln Lys Gln Leu

GAG CGA CAA CAG TTG GAA ACC GAG AAG AAG AGG AGA GAA ACT GTA GAG AGA GAA AAG GAA
 2401 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2460
 CTC GCT GTT GTC AAC CTT TGG CTC TTC TTC TCC TCT CTT TGA CAT CTC TCT CTT TTC CTT
 Glu Arg Gln Gln Leu Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Glu Thr Val Glu Arg Glu Lys Glu

CAG ATG CTC CGG GAG AAG GAA GAG CTG ATG CTT CGG CTG CAG GAC TTT GAG CAG AAG ACC
 2461 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- + 2520
 GTC TAC GAG GCC CTC TTC CTT CTC GAC TAC GAA GCC GAC GTC CTG AAA CTC GTC TTC TGG
 Gln Met Leu Arg Glu Lys Glu Glu Leu Met Leu Arg Leu Gln Asp Phe Glu Gln Lys Thr

AAG AGG GCA GAG AAA GAG CTC TCC GAG CAG ATT GAG AAG GCC CTC CAG CTG GAG GAA GAG
 2521 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2580
 TTC TCC CGT CTC TTT CTC GAG AGG CTC GTC TAA CTC TTC CGG GAG GTC GAC CTC CTT CTC
 Lys Arg Ala Glu Lys Glu Leu Ser Glu Gln Ile Glu Lys Ala Leu Gln Leu Glu Glu Glu

AGG AGG CGA GCC CAG GAG GAG GCT GAA CGT CTG GAG GCC GAC CGC ATG GCC GCC CTG CGG
 2581 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2640
 TCC TCC GCT CGG GTC CTC CTC CGA CTT GCA GAC CTC CGG CTG GCG TAC CGG CGG GAC GCC
 Arg Arg Arg Ala Gln Glu Glu Ala Glu Arg Leu Glu Ala Asp Arg Met Ala Ala Leu Arg

GCC AAG GAA GAA CTG GAG AGA CAG GCA CAG GAT CAG ATA AAG AGC CAG GAG CAG CTG GCT
 2641 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2700
 CGG TTC CTT CTT GAC CTC TCT GTC CGT GTC CTA GTC TAT TTC TCG GTC CTC GTC GAC CGA
 Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Gln Ala Gln Asp Gln Ile Lys Ser Gln Glu Gln Leu Ala

GCA GAG CTG GCA GAG TAT ACT GCC AAG ATT GCC CTG CTG GAG GAG GCA CGG AGG CGC AAG
 2701 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2760
 CGT CTC GAC CGT CTC ATA TGA CGG TTC TAA CGG GAC GAC CTC CTC CGT GCC TCC GCG TTC
 Ala Glu Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Lys Ile Ala Leu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Arg Lys

GAG GAC GAG GTG GAG GAG TGG CAG CAC CGG GCT AAA GAG GCC CAG GAC GAC CTG GTG AAG
 2761 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2820
 CTC CTG CTC CAC CTC CTC ACC GTC GTG GCC CGA TTT CTC CGG GTC CTG CTG GAC CAC TTC
 Glu Asp Glu Val Glu Glu Trp Gln His Arg Ala Lys Glu Ala Gln Asp Asp Leu Val Lys

ACC AAA GAG GAG CTG CAC CTG GTG ATG ACG GCT CCC CCG CCC CCA CCC CCG CCC GTG TAC
 2821 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2880
 TGG TTT CTC CTC GAC GTG GAC CAC TAC TGC CGA GGG GGC GGG GGT GGG GGC GGG CAC ATG
 Thr Lys Glu Glu Leu His Leu Val Met Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Tyr

GAG CCC GTG AAT TAC CAC GTG CAG GAG GGG CTG CAG GAT GAG GGA GCA GAG CCC ATG GGC
 2881 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 2940
 CTC GGG CAC TTA ATG GTG CAC GTC CTC CCC GAC GTC CTA CTC CCT CGT CTC GGG TAC CCG
 Glu Pro Val Asn Tyr His Val Gln Glu Gly Leu Gln Asp Glu Gly Ala Glu Pro Met Gly

Anhang

TAC AGT GCC GAG CTC TCC AGC GAG GGC ATC CTG GAC GAC CGT AAC GAG GAG AAG CGG ATC
2941 --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- + 3000
ATG TCA CGG CTC GAG AGG TCG CTC CCG TAG GAC CTG CTG GCA TTG CTC CTC TTC GCC TAG
Tyr Ser Ala Glu Leu Ser Ser Glu Gly Ile Leu Asp Asp Arg Asn Glu Glu Lys Arg Ile

ACC GAG GCA GAG AAG AAC GAG CGC GTG CAG CGG CAG CTG CTG ACT CTG AGC AAT GAG TTG
3001 --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- + 3060
TGG CTC CGT CTC TTC TTG CTC GCG CAC GTC GCC GTC GAC GAC TGA GAC TCG TTA CTC AAC
Thr Glu Ala Glu Lys Asn Glu Arg Val Gln Arg Gln Leu Leu Thr Leu Ser Asn Glu Leu

TCC CAG GCC CGG GAT GAG AAT AAG AGG ACC CAC AAT GAC ATC ATC CAC AAT GAG AAC ATG
3061 --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- + 3120
AGG GTC CGG GCC CTA CTC TTA TTC TCC TGG GTG TTA CTG TAG TAG GTG TTA CTC TTG TAC
Ser Gln Ala Arg Asp Glu Asn Lys Arg Thr His Asn Asp Ile Ile His Asn Glu Asn Met

T567

CGG CAA GGC CGG GAC AAG TAT AAG **ACG** CTG CGG CAG ATC AGG CAG GGC AAC ACC AAG CAG
3121 --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- + 3180
GCC GTT CCG GCC CTG TTC ATA TTC TGC GAC GCC GTC TAG TCC GTC CCG TTG TGG TTC GTC
Arg Gln Gly Arg Asp Lys Tyr Lys **Thr** Leu Arg Gln Ile Arg Gln Gly Asn Thr Lys Gln

HindIII

VSV-G

CGC ATC GAC GAG TTT GAA *GCT* TTG **TAC ACC GAC ATC GAG ATG AAC CGG CTG GGC AAG** TAG
3181 --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- +--- --- --- +- --- --- --- + 3240
GCG TAG CTG CTC AAA *CTT* CGA AAC **ATG TGG CTG TAG CTC TAC TTG GCC GAC CCG TTC** ATC
Arg Ile Asp Glu Phe Glu Ala Leu **Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys** ***

pPLPCX CD44v4-7 Δcyt -Ezrin T567D VSV-G

T567D

CGG CAA GGC CGG GAC AAG TAT AAG **GAC** CTG CGG CAG ATC AGG CAG GGC AAC ACC AAG CAG
 3121 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 3180
 GCC GTT CCG GCC CTG TTC ATA TTC CTG GAC GCC GTC TAG TCC GTC CCG TTG TGG TTC GTC
 Arg Gln Gly Arg Asp Lys Tyr Lys **Asp** Leu Arg Gln Ile Arg Gln Gly Asn Thr Lys Gln

HindIII **VSV-G**

CGC ATC GAC GAG TTT GAA *GCT* TTG **TAC ACC GAC ATC GAG ATG AAC CGG CTG GGC AAG** TAG
 3181 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 3240
 GCG TAG CTG CTC AAA *CTT* CGA AAC **ATG TGG CTG TAG CTC TAC TTG GCC GAC CCG TTC** ATC
 Arg Ile Asp Glu Phe Glu Ala Leu **Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys** ***

pPLPCX CD44v4-7 Δcyt -Ezrin ΔABD VSV-G

MluI

TCC CAG GCC CGG GAT GAG AAT AAG AGG ACC CAC AAT GAC *ACG CGT* **TAC ACC GAC ATC GAG**
 3061 --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- --- +--- --- --- -+- --- --- ---+ 3120
 AGG GTC CGG GCC CTA CTC TTA TTC TCC TGG GTG TTA CTG *TGC GCA* **ATG TGG CTG TAG CTC**
 Ser Gln Ala Arg Asp Glu Asn Lys Arg Thr His Asn Asp Thr Arg **Tyr Thr Asp Ile Glu**

ATG AAC CGG CTG GGC AAG TAG
 3121 --- --- --- +--- --- --- -+- 3142
TAC TTG GCC GAC CCG TTC ATC
Met Asn Arg Leu Gly Lys ***