

**Der Einfluss der Palmitoylierung von Claudin-7 auf die
Lokalisation in Membranmikrodomänen und
metastasierungsfördernde Eigenschaften**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Sarah Heiler

aus

Bruchsal

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferenten: Prof. Dr. Margot Zöller

Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2015

Meiner Familie
In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Zelladhäsion	1
1.1.1 Zell-Matrix-Adhäsion	1
1.1.2 Zell-Zell-Adhäsion	2
1.2 Claudine	5
1.2.1 Struktur und Funktion.....	5
1.2.2 Subzelluläre Lokalisation	8
1.2.3 Claudine und Krebs.....	8
1.2.4 Claudin-7.....	11
1.2.5 Posttranslationale Modifikationen von Claudinen.....	12
1.3 Glycolipidreiche Membranmikrodomänen	14
1.4 EpCAM-Claudin-7-Assoziation	17
1.4.1 EpCAM.....	17
1.4.2 Der EpCAM-Claudin-7-Komplex	20
1.5 Modellsysteme	22
1.5.1 HEK-Modell.....	22
1.5.2 SW948- und HT29-Tumorzelllinien und Tumorstammzellen	23
1.6 Ziele der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Material	27
2.1.1 Technische Geräte.....	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	30
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	34
2.1.5 Enzyme	36
2.1.6 Nukleotid- und Proteinstandards.....	36

2.1.7 Kits	37
2.1.8 Oligos	37
2.1.9 Primer	37
2.1.10 Antikörper.....	40
2.1.11 Expressionsvektoren.....	43
2.1.12 Bakterienstämme	44
2.1.13 Zelllinien	44
2.1.14 Mäuse	46
2.2 Methoden	46
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	46
2.2.2 Zellbiologische Methoden	48
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	56
2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten	61
2.2.5 Statistik	62
3 Ergebnisse	63
3.1 Einfluss der Claudin-7-Palmitoylierung auf die Lokalisation in der Membran sowie die Assoziation mit EpCAM	63
3.2 Claudin-7-Palmitoylierung beeinträchtigt die Zell-Zell-Adhäsion	72
3.3 Palmitoylierung von Claudin-7 unterstützt die Motilität und trägt zur Bildung von EpIC bei	76
3.4 Palmitoyliertes Claudin-7 fördert die Invasivität.....	87
3.5 Einfluss von Claudin-7 auf Tumorstammzell-Eigenschaften kolorektaler Karzinomzelllinien	92
3.6 Claudin-7 fördert die Entstehung von Metastasen im kolorektalen Tumormodell	99
4 Diskussion	105
4.1 Palmitoylierung von Claudin-7 und Tight Junctions.....	105
4.1.1 Palmitoyliertes Claudin-7 ist in den GEM angereichert	105
4.1.2 Interaktion von Claudin-7 mit anderen TJ-Proteinen	108
4.2 Der Einfluss von palmitoyliertem Claudin-7 auf die Zell-Zell-Adhäsion	109
4.3 Palmitoyliertes Claudin-7 fördert die Motilität	111
4.4 Claudin-7 und Invasivität	113
4.5 Claudin-7, EMT und Metastasierung.....	116
4.5.1 Der Einfluss von Claudin-7 auf mesenchymale Proteine	117

4.5.2 Der Einfluss von Claudin-7 auf die Generierung des Kotranskriptionsfaktors EpIC	118
4.5.3 Der Einfluss von Claudin-7 auf kolorektale Tumorstammzellmarker und Stammzeleigenschaften	119
4.6 Ausblick	122
5 Zusammenfassung	124
6 Literatur	126
7 Anhang	146
Danksagung	156
Publikationsliste	157
Ehrenwörtliche Erklärung	158

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion.....	2
Abb. 2: E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion	3
Abb. 3: Hauptkomponenten von TJs und TJ-Stränge	4
Abb. 4: Struktur von Claudinen	7
Abb. 5: Die Rolle und Regulation von Claudinen bei der Tumorprogression ...	10
Abb. 6: Hierarchie der GEM-basierten Heterogenität in Zellmembranen.....	15
Abb. 7: Struktur von EpCAM	18
Abb. 8: EpCAM schwächt die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion	19
Abb. 9: EpCAM als Substrat für die regulierte, intramembranäre Proteolyse..	20
Abb. 10: Der EpCAM-cld7-Komplex in TEM	21
Abb. 11: Punktmutierte Serin-Phosphorylierungsstellen von cld7 und deren Einfluss auf die Assoziation mit EpCAM	65
Abb. 12: Der Einfluss punktmutierter S-Phosphorylierungsstellen von cld7 auf die Lokalisation in Membranmikrodomänen.....	66
Abb. 13: Expressionslevel von EpCAM und cld7 in transfizierten und nicht transfizierten HEK Zellen	67
Abb. 14: Claudin-7 Palmitoylierung: Einfluss auf die Lokalisation in der Membran und Assoziation mit EpCAM	68
Abb. 15: Lokalisation von EpCAM, Claudin-7 und CD81 in der Membran von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC ^{mAG} -cld7 und HEK-EpC-cld7 ^{mPalm} Zellen.....	69
Abb. 16: Einfluss der cld7-Palmitoylierung auf immunpräzipitierende Moleküle	71
Abb. 17: Cld7-Palmitoylierung und die Bildung von TJs	73
Abb. 18: Cld7-Palmitoylierung und die Assoziation mit TJ-Proteinen.....	74
Abb. 19: Cld7-Palmitoylierung und der Einfluss auf die Adhäsion	75
Abb. 20: Einfluss der Palmitoylierung von cld7 auf die TACE Lokalisation und Assoziation	76
Abb. 21: Wundheilungsversuch der untransfizierten und transfizierten HEK Zellen	77
Abb. 22: Palmitoyliertes cld7 fördert die Zellmotilität	79
Abb. 23: Färbung des Zytoskeletts mit Phalloidin.....	80
Abb. 24: Kooperation von palmitoyliertem cld7 mit Integrinen	81
Abb. 25: Assoziation von cld7 mit Integrinen, FAK , c-Src, Paxillin und Ezrin .	83
Abb. 26: Palmitoyliertes cld7 unterstützt die Abspaltung der intrazellulären Domäne von EpCAM	85
Abb. 27: Analyse von mesenchymalen Proteinen von transfizierten HEK Zellen	86
Abb. 28: Palmitoyliertes cld7 und die Invasivität.....	88
Abb. 29: Expression von MMPs und CD147 in transfizierten und nicht transfizierten HEK Zellen	89
Abb. 30: Einfluss von CD147 auf die Invasivität der HEK Zellen.....	91
Abb. 31: Expression von cld7 und EpCAM in cld7 kd und wt Zelllinien	93

Abb. 32: Expression von Tumorstammzellmarkern in wt und cld7^{kd} Zellen	94
Abb. 33: Koloniewachstum von HT29 und SW948 wt und cld7^{kd} Zellen in <i>soft agar</i>.....	95
Abb. 34: Wachstum von Sphäroiden und Holoklonen und der Einfluss von cld7	97
Abb. 35: Analyse der Expression mesenchymaler Proteine.....	98
Abb. 36: Tumorwachstum, Überlebensrate und -dauer von Mäusen nach der s.c. Injektion von HT29 Zellen	100
Abb. 37: Tumorzellen in den Organen von Mäusen nach subkutanem Wachstum von HT29 Zellen	101
Abb. 38: Überlebensrate und -dauer von Mäusen nach i.v. Injektion von HT29 Zellen	102
Abb. 39: HT29 Tumorzellen in den Organen von Mäusen nach Tötung und in <i>ex vivo</i> Kulturen.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers.....	27
Tabelle 2: Verwendete Materialien unter Angabe des Herstellers	29
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien unter Angabe des Herstellers	30
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen unter Angabe des Herstellers.....	34
Tabelle 5: Verwendete Enzyme unter Angabe des Herstellers.....	36
Tabelle 6: Verwendete Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers	36
Tabelle 7: Verwendete Kits unter Angabe des Herstellers.....	37
Tabelle 8: Verwendete Oligos unter Angabe der Sequenz	37
Tabelle 9: Verwendete Primer unter Angabe der Sequenz.....	37
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper	40
Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper und Streptavidin-Konjugate.....	42
Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps.....	44
Tabelle 13: Verwendete Zelllinien unter Angabe des Ursprungs	44
Tabelle 14: Aminosäuresequenzen von cld7 und EpCAM und deren Mutationsstellen.....	64
Tabelle 15: Massenspektrometrische Proteinanalyse von niedermolekularen Molekülen, die mit Claudin-7 ko-immunpräzipitieren	146

Abkürzungsverzeichnis

2-BP	2-Bromopalmitat
μCi	Mikrocurie
AA	Aminosäure
AK	Antikörper
Ala	Alanin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAM	Zelladhäsionsmolekül (<i>Cell Adhesion Molecule</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidinester
Cld	Claudin
c-Src	<i>cellular Sarcoma</i>
CTF	C-Terminales Fragment
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epitheliale - Mesenchymale Transition
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EpC	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> (EpCAM)
EpEx	Extrazelluläre Domäne von EpCAM
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EpIC	Intrazelluläre Domäne von EpCAM
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

FHL-2	<i>Four-and-Half-LIM-only-2</i>
FN	Fibronektin
GEM	Glycolipidreiche Membranmikrodomänen (<i>Glycolipid-Enriched Membrane Microdomains</i>)
HAM	Hydroxylamin
HEK	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
i.v.	intravenös
kd	<i>Knockdown</i>
KM	Knochenmark
ko	<i>Knockout</i>
KRK	Kolorektales Karzinom
LEF-1	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1</i>
LK	Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MW	<i>Molecular Weight</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NOD / SCID	<i>Non-Obese Diabetic, Severe Combined Immunodeficiency</i>
NTF	N-Terminales Fragment
p	phospho
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blut-Leukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEZ	Peritoneale Exsudat-Zellen
PFA	Paraformaldehyd
PS-2	Presenilin-2
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “, Zellkulturmedium
S	Serin
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)

siRNA	small interfering RNA
TEM	<i>Tetraspanin-enriched Membrane Microdomains</i>
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight Junction
TM	Transmembranregion
TSZ	Tumorstammzellen
U	unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot
ZO	<i>Zonula Occludens</i>

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Adhäsion ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung eines multizellulären Organismus, wobei zwischen der Adhäsion benachbarter Zellen und der Adhäsion von Zellen an die umgebende extrazelluläre Matrix (EZM) unterschieden wird. Innerhalb eines Gewebes vermitteln Adhäsionen zwischen benachbarten Zellen die Anordnung, Reorganisation und Polarisierung (Borghi and James Nelson, 2009). Die Regulation von Adhäsionen an die EZM ist für die Proliferation, Differenzierung und Migration von maßgeblicher Bedeutung (Rozario and DeSimone, 2010). Die Koordination von Zell-Zell-Adhäsion und Zell-EZM-Adhäsion ist ein hochdynamischer Prozess, der mit der Modulation von Adhäsionsmolekülen sowie des Zytoskeletts einhergeht (Maruthamuthu et al., 2010). Bei der Metastasierung und dem begleitenden Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen Transition machen sich insbesondere epitheliale Tumore diese Plastizität von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion zunutze. Es gibt vier Arten von interzellulären Verbindungen: die Desmosomen, *Gap Junctions*, *Adherens Junctions* und die *Tight Junctions*. In Epithelien werden Zell-Zell-Adhäsionen hauptsächlich über *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* aufrechterhalten, die am apikalen Ende der lateralen Membran asymmetrisch verteilt sind (Lampugnani, 2012).

1.1.1 Zell-Matrix-Adhäsion

Während der Migration reagieren die Zellen auf chemische und mechanische Signale, indem sie ihre Form, Dynamik und Adhäsion an die EZM anpassen. Die dynamische Umstrukturierung von F-Actin, d.h. die Bildung von Stressfasern, tritt in migrierenden Zellen auf und spielt bei der Migration eine wichtige Rolle. Actinfilamente sind polare helikale Strukturen. Stressfasern bestehen aus mehreren Actinfilamenten, die über α -Actinin miteinander verbunden sind, und Myosin. Diese kontraktile Actomyosinkomplexe sind häufig an fokalen Adhäsionen verankert. Fokale Adhäsionen sind Komplexe von Integrinen, welche die EZM mittels Actin-

bindenden Proteinen mit dem Actin-Zytoskelett verbinden (Tojkander et al., 2012). Integrine sind heterodimere Transmembrannglycoproteine, die Interaktionen zwischen den Zellen sowie den Zellen und der EZM vermitteln (Hynes, 2002). Diese Transmembranproteine bestehen aus zwei Untereinheiten, bezeichnet als α - und β -Untereinheiten. Integrine übermitteln mithilfe von Proteinkomplexen, die die Integrine mit dem Actin-Zytoskelett verbinden, Signale von außerhalb der Zelle in das Innere der Zelle. Für diese Verbindung sind intrazellulär die Zytoskelettproteine Talin Vinculin und Paxillin, die Zytoskelett-Linkerproteine Kindlins und das Actin-Linkerprotein α -Actinin von Bedeutung (Abb. 1) (Canel et al., 2013).

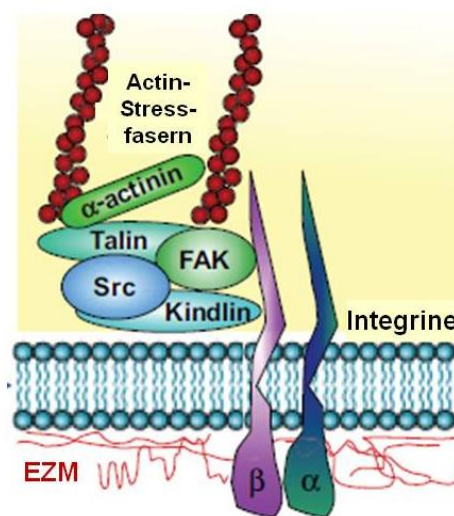


Abb. 1: Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion

Fokale Adhäsionen sind Proteinkomplexe, die Kontakte zwischen den Zellen und der EZM (rote Linien) vermitteln; die Membranrezeptoren für diese Art von Adhäsion sind die Heterodimere von α - und β -Integrinen. Sie bilden Proteinkomplexe, die mit dem Actin-Zytoskelett verbunden sind. Hauptverantwortlich hierfür sind Talin, Kindlin und α -Actinin. Zudem sind die Tyrosinkinasen, FAK (**F**okale **A**dhäsions**K**inase) und c-Src (**c**ellular **S**arcoma), Teil des Integrinkomplexes und wichtige Mediatoren nachgeschalteter Signalwege der Integrine. Modifiziert nach (Canel et al., 2013).

1.1.2 Zell-Zell-Adhäsion

Die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion ist für den Erhalt funktioneller Barrieren und der Integrität des Epithelgewebes essentiell. Benachbarte Zellen werden mittels Zell-Zell-Verbindungen, die aus Proteinkomplexen bestehen, zusammengehalten, wodurch die Struktur und Polarität aufrechterhalten werden. Die Zell-Zell-Kontakte werden fortwährend umgebaut, um tote oder geschädigte Zellen zu entfernen und hierfür neu

differenzierte Zellen zu integrieren, ohne dass die Integrität der Barriere verloren geht (Tervonen et al., 2011).

1.1.2.1 *Adherens Junctions*

Innerhalb der vier Familien von Zelladhäsionsmolekülen, den Cadherinen, Integrinen, der Immunoglobulin-Familie und den Selectinen, stellen die Cadherine die bedeutendsten Zelladhäsionsmoleküle dar. *Adherens Junctions* (AJs) sind Zell-Zell-Verbindungen von Epithel- und Endothelzellen und bestehen aus Cadherin-Catenin-Komplexen. Zu den klassischen Cadherinen gehören E-Cadherin (*Epithelial-Cadherin*) und N-Cadherin (*Neural-Cadherin*). E-Cadherin ist am häufigsten an der Bildung von AJs in Epithelzellen beteiligt. Um den Prozess der Adhäsion zu initiieren, binden die extrazellulären Domänen der Cadherine mittels einer Ca^{++} -abhängigen, homophilen *trans*-Interaktion an Cadherinmoleküle einer benachbarten Zelle (Abb. 2). Wohingegen das zyttoplasmatische Ende der Cadherine an die Proteine p120- und β -Catenin bindet. Im Gegenzug interagiert β -Catenin mit α -Catenin, welches eine Actin-Bindungsdomäne besitzt und die AJs-Komplexe mit dem Actin-Zytoskelett verbindet (Capaldo et al., 2014).

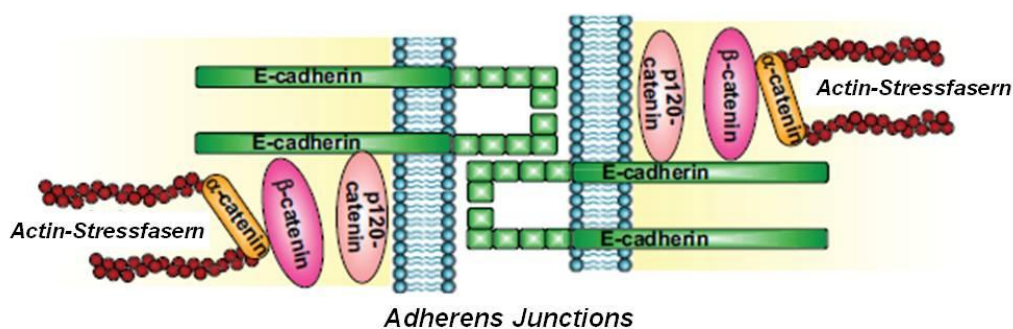


Abb. 2: E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion

E-Cadherin ist ein Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne spezifische homophile Interaktionen zwischen benachbarten Zellen vermittelt. Die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin assoziiert mit Cateninen, die diese Komplexe an das Actin-Zytoskelett binden, was zur Bildung stabiler *Adherens Junctions* führt. Modifiziert nach (Canel et al., 2013).

1.1.2.2 Tight Junctions

Die TJs bilden in Epithelzellen die wichtigste Barriere für die parazelluläre Permeabilität. Sie regulieren die transepitheliale Diffusion von Wasser und gelösten Stoffen (Anderson and Van Itallie, 2009). Am apikalen Ende der lateralen Membran stellen TJs ein Netzwerk aus parallelen Strängen dar (Abb. 3) und sind an der Erhaltung der Zellpolarität beteiligt. Der TJ-Komplex besteht aus mehreren Komponenten: den Transmembranproteinen, deren extrazelluläre Domänen in den parazellulären Bereich ragen, dazu gehören die Claudine, Occludin, Tricellulin, *Junctional Adhesion Molecules* (JAM) und der *Cosackie / Adenovirus-associated Receptor* (CAR), und die Plaqueproteine, wie *Zonula Occludens* (ZO)-1, ZO-2 und ZO-3. Zudem sind noch weitere zytosolische Proteine mit Signalfunktionen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen Teil des TJ-Komplexes (Angelow et al., 2008).

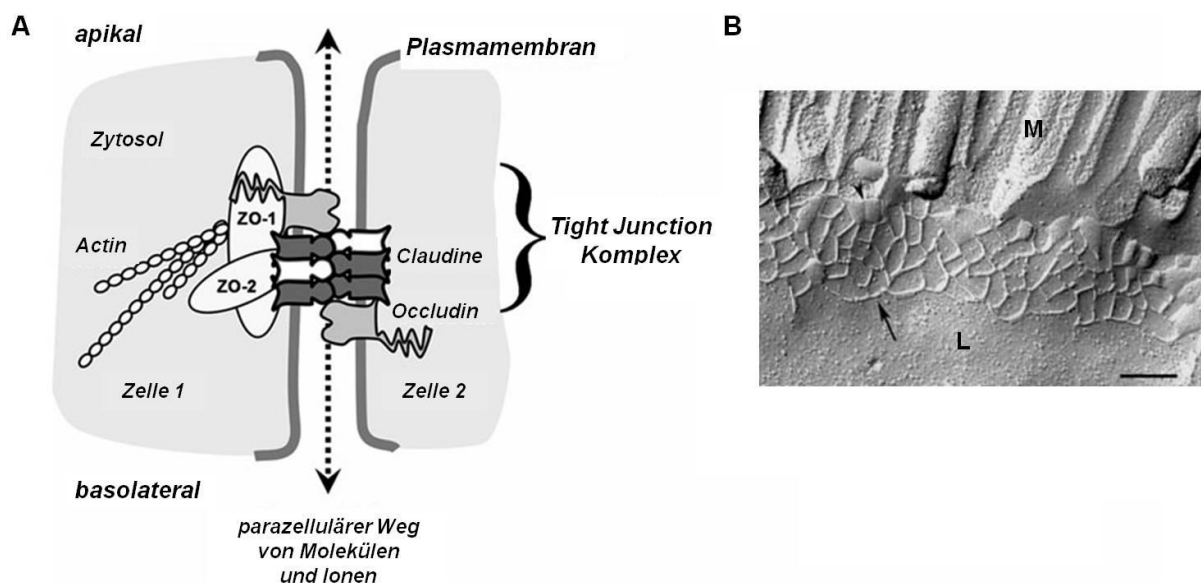


Abb. 3: Hauptkomponenten von TJs und TJ-Stränge

A. Dargestellt sind die Bereiche von Zell-Zell-Kontakten, an welchen die TJs die parazelluläre Permeabilität regulieren (unterbrochene Linien und Pfeile). TJs bestehen aus Transmembranproteinen (Claudine, Occludin) und Plaqueproteinen, wie ZO-1 und ZO-2, die die Claudine mit dem Actin-Zytoskelett verbinden. Zudem sind Claudin-Claudin-Interaktionen zwischen zwei benachbarten Zellen, welche die strukturelle Basis der parazellulären Permeabilitätsbarriere bilden, gezeigt. Modifiziert nach (Overgaard et al., 2011). B. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von TJs intestinaler Epithelzellen einer Maus zwischen der lateralen Membran (L) und den apikalen Mikrovilli (M). In den glutaraldehydfixierten Epithelzellen erscheinen die TJs als ein Netzwerk aus TJ-Strängen (Pfeil) an der protoplasmatischen Membranseite (P-face). An der exoplasmatischen Membranseite (E-face) erscheinen sie als komplementäre Furchen (Pfeilspitze), die die Zellen umgeben (Maßstab: 200 nm). Modifiziert nach (Furuse, 2010).

Die Claudine stellen die wichtigsten Komponenten der TJs dar. Sie bilden eine parazelluläre Barriere, die den Flux von Ionen und kleinen Molekülen im Interzellulärraum zwischen Epithelzellen kontrollieren. Claudine interagieren miteinander und polymerisieren in der Plasmamembran, um TJ-Stränge zu bilden. Die Proteine Occludin und Tricellulin sind Transmembranproteine mit vergleichbaren Aminosäuresequenzen. Sie werden in Claudin-basierte TJ-Stränge inkorporiert oder sind in der Nähe von diesen lokalisiert. Auf der zytoplasmatischen Seite der TJ-Stränge sind die Plaqueproteine, ZO-1, ZO-2 und ZO-3, lokalisiert, welche die zytoplasmatischen C-terminalen Enden von Claudinen, Occludin, Tricellulin und JAM-A mit dem Actin-Zytoskelett verbinden (Abb. 3). Von diesen TJ-assoziierten Proteinen sind die Claudine und ZO-Proteine direkt an der Bildung von TJ-Strängen epithelialer Zellen beteiligt (Furuse, 2010).

1.2 Claudine

Der Name Claudine leitet sich vom lateinischen "claudere" (schließen) ab (Furuse et al., 1998a). Zurzeit sind 27 Claudin-Gene im humanen Genom bekannt (Mineta et al., 2011). Claudine werden im gesunden Gewebe, in Adenomen, benignen Neoplasien und in verschiedenen Karzinomen exprimiert. Die Expressionsprofile von Claudinen sind gewebespezifisch, wobei die meisten Gewebearten mehrere Claudine exprimieren. Über homophile oder heterophile Assoziationen interagieren Claudine benachbarter Zellen miteinander, um TJs zu bilden (Ding et al., 2013). Seit Claudine 1998 zum ersten Mal beschrieben wurden (Furuse et al., 1998a), stehen sie im Fokus der TJ-Forschung und es gibt zunehmend Hinweise, dass sie Dreh- und Angelpunkt der TJ-Physiologie sind.

1.2.1 Struktur und Funktion

Claudine haben ein Molekulargewicht von 20 bis 27 kDa und besitzen vier Transmembrandomänen, wobei sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus im Zytoplasma befinden (Abb. 4). Es wird davon ausgegangen, dass die

Transmembrandomänen individuelle α -Helices bilden, welche die Lipiddoppelschicht durchspannen und dicht gepackt sind (Abb. 4B). Zudem besitzen sie zwei extrazelluläre Schleifen, die für interzelluläre Interaktionen und für die Kontrolle der parazellulären Permeabilität von Bedeutung sind (Overgaard et al., 2011; Tsukita and Furuse, 2000; Van Itallie and Anderson, 2006). Trotz ihrer Eigenschaft, die Plasmamembran viermal zu durchspannen, sind sie nicht homolog zu den Proteinen, die als Tetraspanine klassifiziert werden (Hemler, 2005). Das N-terminale Ende ist vergleichsweise kurz und besteht aus etwa vier bis zehn Aminosäuren. Wohingegen der C-Terminus deutlich variabler ist und aus 21 bis mehr als 63 Aminosäuren bestehen kann. Das C-terminale Ende ist für die Lokalisation der Claudine in TJs notwendig. Bei nahezu allen Claudinen kann das C-terminale Ende über das *Post-synaptic density 95, Discs large, ZO-1* (PDZ) Bindungsmotiv an die zytosolischen Plaqueproteine ZO-1 und ZO-2 binden (Van Itallie and Anderson, 2006). Die Bindung von ZO-1 und ZO-2 unterstützt die Anordnung von TJs, indem sie die Claudine mit dem Actin-Zytoskelett verbinden (Itoh et al., 1999).

Die erste extrazelluläre Schleife besteht aus etwa 53 Aminosäuren und ist für die selektive Permeabilität von TJs verantwortlich. Diese Schleife enthält ein hoch konserviertes Motiv, von dem angenommen wird, dass Cysteine in diesem Motiv intramolekulare oder intermolekulare Disulfid-Bindungen bilden, welche die Sekundärstruktur der ersten Schleife stabilisieren könnten (Abb. 4) (Angelow et al., 2008; Colegio et al., 2002; Ding et al., 2013; Wen et al., 2004). Die zweite extrazelluläre Schleife ist mit etwa 24 Aminosäuren deutlich kürzer als die erste und ist an der Bildung von TJ-Strängen beteiligt. Zudem fungiert sie als Rezeptor für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin. Beide Schleifen sind für die Regulation von Claudin-Claudin-Interaktionen von Bedeutung (Angelow et al., 2008; Koval, 2013; Krause et al., 2015).

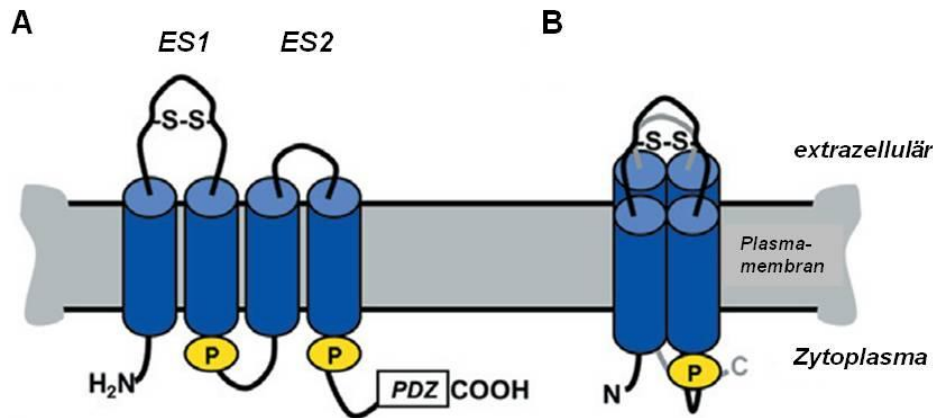


Abb. 4: Struktur von Claudinen

A., B. Darstellung der Domänen von Claudinen und deren Lokalisation in der Membran. Dargestellt sind die erste extrazelluläre Schleife (ES1), die zweite extrazelluläre Schleife (ES2) sowie eine potentielle Disulfidbindung (S-S) in der ersten extrazellulären Schleife (ES1). Die Zylinder stellen die vier α -helikalen Transmembrandomänen dar. Zudem sind die zwei Palmitoylierungsmotive (P) und das PDZ-Bindungsdomänen am äußersten C-terminalen Ende des Proteins hervorgehoben. B. Das Claudin Molekül ist als dicht gepackter Komplex von vier Transmembrandomänen in der Plasmamembran dargestellt. Modifiziert nach (Koval, 2013).

Es wurde gezeigt, dass die Expression von Claudinen die TJ-Permeabilität von Ionen und Wasser auf eine größen- und ladungsabhängige Weise reguliert (Colegio et al., 2002; Van Itallie et al., 2008). Die Bedeutung der Claudine für die Erhaltung der Barrierefunktion wird in Claudin Knockout (ko)-Versuchen mit Mäusen deutlich. $Cld7^{ko}$ Mäuse sterben aufgrund veränderter Barrierefunktionen und Darmschädigungen innerhalb der ersten Woche nach der Geburt (Ding et al., 2012). Eine gesteigerte Permeabilität gelöster Stoffe in der Lunge und Veränderungen der Expression Zytoskelett-assoziiierter Gene sowie eine Reorganisation des F-Actin-Zytoskeletts in alveolären Epithelzellen konnte bei $cld18^{ko}$ Mäusen festgestellt werden (Li et al., 2014). Bei $cld1$ -defizienten Mäusen war die epidermale Barriere stark beeinflusst, sodass die Tiere innerhalb einer Woche nach der Geburt an Dehydratation starben (Furuse et al., 2002).

Es wurde vielfach gezeigt, dass Claudine für die korrekte Bildung von TJ-Strukturen und ihrer Barrierefunktion essentiell sind. Aber die Expression von Claudinen ist im Kontext der Homöostase nicht immer gleich. In der Tat wurde die Heterogenität der Barrieren in unterschiedlichen epithelialen Geweben ebenso wie Veränderungen der Expression und Lokalisation von Claudinen bei verschiedenen Erkrankungen

einschließlich Krebs wiederholt beschrieben (Ding et al., 2013; Turksen and Troy, 2011).

1.2.2 Subzelluläre Lokalisation

Bestimmte Claudine werden auch außerhalb von TJs, insbesondere in der lateralen Membran, exprimiert. Eine Lokalisation außerhalb von TJs kann drei Funktionen haben: 1. die Bildung unkonventioneller adhäsiver Zell-Zell-Kontakte. Beispielsweise vermittelt cld1 die Kontakte zwischen dendritischen Zellen und der Epidermis (Kubo et al., 2009) und cld2 vermittelt Zell-Zell-Kontakte zwischen metastasierenden Brustkrebszellen und Hepatozyten (Tabaries et al., 2012). 2. Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren, wie anderen Zelladhäsionsmolekülen, Tetraspaninen, und Integrinen (Ding et al., 2012; Harris et al., 2010; Kovalenko et al., 2007; Kuhn et al., 2007). 3. Intrazelluläre Signaltransduktion: z.B. inhibiert cld18 in Osteoklasten Signalwege von ZO-2 und hemmt dadurch die Differenzierung von Osteoklasten und die Knochenresorption (Linares et al., 2012). Zudem wurde eine nukleäre Lokalisation von Claudinen beschrieben (Dhawan et al., 2005; French et al., 2009). Dies weist darauf hin, dass Claudine wie andere Zell-Zell-Adhäsionsproteine, darunter ZO-1, ZO-2 und β -Catenin, direkt an der Genexpression beteiligt sein können und somit auch an der Krebsentstehung (Günzel and Yu, 2013).

1.2.3 Claudine und Krebs

Die meisten Krebserkrankungen haben ihren Ursprung in epithelalem Gewebe (Karzinome) und sind für einen Großteil (~95 % der Fälle) der Krebs-assoziierten Todesfälle verantwortlich. Karzinomzellen sind durch anormales Wachstum sowie Verlust der Differenzierung und Gewebearchitektur gekennzeichnet. Trotz der vielfältigen Morphologie und der spezifischen Funktionen differenzierter Epithelzellen in unterschiedlichen Organen und Geweben teilen epitheliale Zellen einige wenige Merkmale einschließlich der polarisierten Architektur. Ein gemeinsamer entscheidender Faktor, der transformiertes Epithel in unterschiedlichen Krebsarten charakterisiert, ist der Verlust der Zellpolarität. Eine polarisierte Epithelzelle benötigt

das Zytoskelett und die Zell-Zell-Adhäsionsproteine zwischen benachbarten Zellen, um die polarisierte Architektur aufrechtzuerhalten. Für apikale Zell-Zell-Adhäsionen sind TJs eine wichtige Voraussetzung (Singh and Dhawan, 2015; Turksen and Troy, 2011), aber transformierte Zellen besitzen in der Regel keine funktionellen TJs (Gonzalez-Mariscal et al., 2007; Lal-Nag and Morin, 2009). Transformiertes Epithel zeichnet sich vielmehr durch Undichtigkeit aus, was auf eine Dysregulation der Barrierefunktion von TJs hindeutet. Zahlreiche Studien versuchen zu ergründen, ob und wie die Dysregulation von Claudinen die Zellpolarität und Barrieren bei unterschiedlichen Tumorarten stört und wie diese Veränderungen reguliert sind. Eine Übersicht möglicher Ursachen einer Dysregulation und deren Einfluss auf die Expression und Lokalisation von Claudinen sowie mögliche Folgen sind in Abbildung 5 dargestellt (Singh and Dhawan, 2015; Turksen and Troy, 2011).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Expression von Claudinen bei unterschiedlichen Tumorarten verändert ist. Dabei wurde klar, dass keine universellen Regeln erstellt werden konnten. Cld1 wird in allen Epithelien exprimiert und ist bei humanen Krebserkrankungen das am häufigsten dysregulierte Claudin. In Abhängigkeit von der Krebsart kann cld1 sowohl krebsfördernd sein als auch als Tumorsuppressorfaktor agieren (Kwon, 2013). Eine erhöhte Expression von cld1 korreliert beim Kolonkarzinom mit einem gesteigerten Tumorwachstum, Metastasierung und einer schlechten Prognose für die Patienten (Dhawan et al., 2005; Resnick et al., 2005b). In Brustkrebszellen vermindert ein Knockdown von cld1 die Zellmigration, indem die EMT-assoziierte Genexpression beeinflusst wird (Blanchard et al., 2013). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass cld3 und cld4 bei einigen Karzinomen häufig überexprimiert sind, dazu gehören Ovarial-, Prostata- und Pankreaskarzinome (Bartholow et al., 2011; Holczbauer et al., 2013; Lin et al., 2013). Übereinstimmend mit der Störung von TJs während der Tumorgenese ist die Expression von bestimmten Claudinen, wie cld1 und cld7, bei invasiven Mamma-, Prostata- und Ösophaguskarzinomen vermindert (Kominsky et al., 2003; Sheehan et al., 2007; Tokes et al., 2005; Usami et al., 2006).

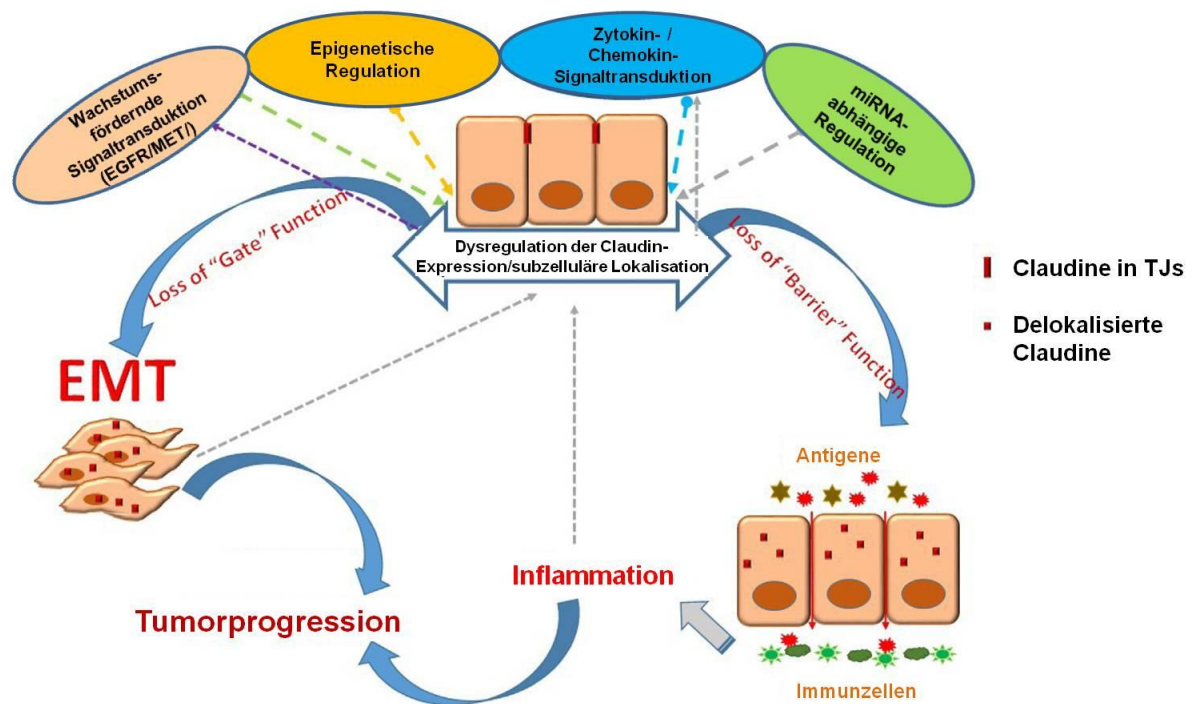


Abb. 5: Die Rolle und Regulation von Claudinen bei der Tumorentstehung

Die Expression und Lokalisation von Claudinen können aufgrund von Wachstumsfaktoren, epigenetischen Faktoren und Zytokinen fehlreguliert sein. Dies resultiert in einer Störung der Barrierefunktion, was im Gegenzug Inflammation, Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) und Tumorprogression fördern kann. Modifiziert nach (Singh and Dhawan, 2015).

Auch innerhalb derselben Krebsart können Unterschiede in der Expression von Claudinen auftreten. So ist die Expression von cld1, cld3 und cld4 beim intestinalen Typ des gastrischen Adenokarzinoms höher als beim Magenkarzinom vom diffusen Typ (Resnick et al., 2005a). Beim Grad I des duktales Mammakarzinoms ist die Expression von cld4 im Vergleich zu normalen Epithelzellen der Brust herunterreguliert (Tokes et al., 2005), wohingegen cld4 bei basalähnlichem Brustkrebs signifikant hochreguliert ist (Kulka et al., 2009). Die Datenlage zahlreicher Studien weist somit darauf hin, dass Veränderungen des Expressionsprofils von Claudinen bei verschiedenen Tumoren in einer phasen-, typen- und gradabhängigen Weise auftreten können (Turksen and Troy, 2011).

Bei verschiedenen Krebserkrankungen ist cld7 häufig dysreguliert und es ist das erste Claudin, von dem eine Lokalisation außerhalb von TJs beschrieben wurde.

1.2.4 Claudin-7

Cld7 wird in einer Reihe von epithelialen Geweben, wie der Lunge, Niere und im Gastrointestinaltrakt, exprimiert (Alexandre et al., 2005; Coyne et al., 2003; Fujita et al., 2006). *In vitro* Studien ergaben widersprüchliche Schlussfolgerungen zur Funktion von cld7. Während Alexandre et al. (2005) zeigten, dass cld7 für Cl⁻ eine parazelluläre Barriere und für Na⁺ einen parazellulären Kanal bildet (Alexandre et al., 2005), beschrieben Hou et al. das Gegenteil (Hou et al., 2006). Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Studien könnte in potentiellen Änderungen eines weiteren Claudins (cld17) begründet sein (Günzel and Yu, 2013).

Ein Teil der Claudine ist in subzellulären Bereichen lokalisiert, was zeigt, dass ihre Expression nicht nur auf interzelluläre Verbindungen beschränkt ist. So wird cld7 nicht nur in apikalen TJs, sondern auch basolateral, wie in Epithelien des distalen Nephrons sowie der Atemwege und des Darms exprimiert (Alexandre et al., 2005; Coyne et al., 2003; Fujita et al., 2006; Gonzalez-Mariscal et al., 2006; Mendoza-Rodriguez et al., 2005). Zudem wurde eine Expression in der basolateralen Membran von Epithelzellen des Gallengangs, jedoch nicht in Hepatozyten, festgestellt (Jakab et al., 2010). Cld7 wird auch in lateralen Membranen des Epithels der Nebenhoden exprimiert, aber eine Integration in TJ-Stränge konnte nicht festgestellt werden (Inai et al., 2007). Die Funktionen von Claudinen, die nicht in TJs integriert sind, sind noch weitestgehend unbekannt. Es wurde postuliert, dass diese als eine Art Reserve von Claudinen dienen und wenn nötig in TJs rekrutiert werden können oder dass sie bei der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsion eine Rolle spielen (Angelow et al., 2008; Inai et al., 2007).

Bei Untersuchungen mit cld7-defizienten Mäusen konnten schwere intestinale Defekte, wie mukosale Ulzerationen und Entzündungen, festgestellt werden (Ding et al., 2012). In einer anderen Studie konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Ein darmspezifischer cld7^{ko} bei Mäusen verursachte eine Kolonentzündung, obwohl die TJ-Strukturen aufgrund von anderen Claudinen immer noch vorhanden waren. Als Ursache für die Entzündung konnte ein erhöhter parazellulärer Flux eines Enterotoxins bei den cld7-defizienten Mäusen ermittelt werden (Tanaka et al., 2015). Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, gilt auch für cld7, dass in Abhängigkeit vom Tumortyp cld7 sowohl hoch als auch runterreguliert sein kann. Ein Knockdown von cld7 beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom induziert einen Verlust der Expression

von E-Cadherin und ist von einem gesteigerten Tumorwachstum und Invasivität der Tumorzellen begleitet (Lioni et al., 2007). In ähnlicher Weise hemmt cld7 die Migration und Invasion von Lungenkrebszellen (Lu et al., 2011). In Brustkrebszellen ist die Expression von cld7 deutlich reduziert und der Verlust der cld7-Expression geht mit einer schlechten Prognose für die Patienten einher (Kominsky et al., 2003). Im Gegensatz dazu haben andere Studien gezeigt, dass cld7 die Tumorprogression und Metastasierung fördert. Eine Überexpression von cld7 bei kolorektalen Karzinomzellen stört die Zellpolarität, erhöht die Aktivität von β -Catenin und die Zellproliferation. Zudem ist die Tumorbildung *in vivo* in Xenograft-Mäusen, denen cld7-überexprimierende kolorektale Tumorzellen injiziert wurden, gesteigert (Darido et al., 2008). Beim Ovarialkarzinom ist sowohl die Migration als auch die Invasion der Zellen erhöht, die cld7 überexprimieren (Dahiya et al., 2011).

Die diversen und gewebespezifischen Veränderungen der Expression von Claudinen heben das Potential der veränderten Protein-Interaktionen bei der Regulation von krebsfördernden Ereignissen hervor. Neben Protein-Interaktionen wird die Aktivität und die Lokalisation von Claudinen posttranslational über die Phosphorylierung und Palmitoylierung von Claudinen beeinflusst.

1.2.5 Posttranslationale Modifikationen von Claudinen

1.2.5.1 Phosphorylierung

Serin- oder Threoninreste in C-terminalen zytoplasmatischen Bereichen von einigen Claudinen, wie cld3, cld4, cld5 und cld16, können phosphoryliert sein, was unterschiedliche Effekte auf die Claudin-Aktivität sowie die Integration in TJs hat (Aono and Hirai, 2008; D'Souza et al., 2005; Ikari et al., 2008; Ikari et al., 2006; Ishizaki et al., 2003). Die Proteinkinase A phosphoryliert cld5 (Ishizaki et al., 2003) und cld16 (Ikari et al., 2008). Dies fördert die Umverteilung des intrazellulären Pools dieser Claudine und trägt zu ihrer Inkorporation in TJ-Stränge bei. Die Rekrutierung der Claudine in die TJs ist von einer gesteigerten Barrierefunktion begleitet. Die zuvor beschriebenen Effekte der Phosphorylierung haben jedoch keine Gültigkeit für andere Claudine. So resultiert die Phosphorylierung von cld5 mittels der Rho-Kinase (Yamamoto et al., 2008) und von cld3 durch die Proteinkinase A (D'Souza et al.,

2005) in einer verminderten Integration in TJs und einer reduzierten Barrierefunktion. Zudem wird nur cld7, das in glycolipidreichen Membrandomänen lokalisiert ist, phosphoryliert und trägt somit zur Migration von Pankreaskarzinomzellen bei (Ladwein et al., 2005; Thuma and Zöller, 2013). Die Phosphorylierung von Claudinen beeinflusst und reguliert deren Lokalisation und die Barrierefunktion von TJs, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitestgehend unbekannt (Furuse, 2010).

1.2.5.2 Palmitoylierung

Die Palmitoylierung von Proteinen stellt eine weitere Modifikation dar, die die Funktion eines Proteins erheblich beeinflussen kann. Die Anbindung der gesättigten Fettsäure, Palmitinsäure, an Cysteinreste eines Proteins über kovalente Thioesterbindungen wird als S-Palmitoylierung bezeichnet. Die Palmitoylierung unterscheidet sich in zweierlei Hinsicht von anderen Lipidmodifikationen: sie ist reversibel und modifiziert einige Proteine mit Transmembrandomänen (Levental et al., 2010b; Lorent and Levental, 2015). Zudem kann diese Modifikation eines Proteins auf eine Reihe von Funktionen, wie Signaltransduktion, Transport, Stabilität eines Proteins und Apoptose, Einfluss nehmen (Chakrabandhu et al., 2007; Diaz-Rohrer et al., 2014; Kummel et al., 2006; Linder and Deschenes, 2007; Song et al., 2013).

Zwei membrannahe Cystein-Palmitoylierungsmotive sind innerhalb der gesamten Proteinfamilie der Claudine konserviert (Abb. 4). Bei cld14 sind beide dieser Regionen palmitoyliert. Eine ortsspezifische Mutagenese zeigte, dass diese Lipidmodifikation von cld14 für die Lokalisation in TJs notwendig ist, aber nicht zur Stabilität des cld14 Proteins oder zur Bildung von TJ-Strängen beiträgt. Zudem reicherte sich palmitoyliertes cld14 im Vergleich zum mutierten, nicht palmitoylierten cld14 vermehrt in glycolipidreichen Membranmikrodomänen an (Van Itallie, 2005).

Obwohl bekannt ist, dass Claudine in glycolipidreichen Membranmikrodomänen lokalisiert sein können, ist die Bedeutung dieser Lokalisation für die Regulation des Transports und der Oligomerisierung von Claudinen noch weitestgehend unbekannt (Overgaard et al., 2011).

1.3 Glycolipidreiche Membranmikrodomänen

Untersuchungen zur Struktur von Zellmembranen haben gezeigt, dass diese nicht einheitlich aufgebaut sind. Vielmehr befinden sich innerhalb der Lipiddoppelschicht dynamische Gruppierungen von Sphingolipiden und Cholesterol, die sogenannte *Lipid Rafts* ("Lipidflöße") bilden (Simons and Ikonen, 1997). Sie sind kleine (10 bis 200 nm), heterogene, dynamische Domänen und stellen für die Plasmamembran ein wichtiges Ordnungsprinzip dar (Lingwood and Simons, 2010; Simons and Ikonen, 1997). Kleine Mikrodomänen können stabilisiert werden, indem mittels Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen größere Plattformen gebildet werden (Edidin, 2003; Jacobson et al., 2007). Sphingolipid- und cholesterinreiche Domänen sind in dem Detergenz Triton-X-100 bei 4°C unlöslich und bilden glycolipidreiche Komplexe (Brown and Rose, 1992; Parton and Simons, 1995). Aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes flotieren diese detergenzunlöslichen, glycolipidreichen Komplexe während einer Dichtegradientenzentrifugation bei geringer Dichte (Brown and Rose, 1992; Lisanti et al., 1994; Lisanti et al., 1995) und werden auch als glycolipidreiche Membranmikrodomänen (***Glycolipid-Enriched Membrane Microdomains***, GEM) bezeichnet (Hooper, 1999; Rodgers et al., 1994). Eine der wichtigsten Eigenschaften von GEM ist, dass sie eine Reihe von Proteinen rekrutieren und die Bildung von Proteinkomplexen unterstützen und diese auch wieder auflösen können (Simons and Ikonen, 1997). In GEM sind nicht nur Cholesterol und Glycosphingolipide angereichert, sondern auch Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, die Glycoproteine der Zelloberfläche in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran verankern (Brown and London, 1998; Hooper, 1999), sowie zweifach acylierte Proteine, wie Tyrosinkinasen der *cellular Sarcoma* (c-Src)-Familie oder α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen (Resh, 1999), des Weiteren Cholesterin-assoziierte und palmitoylierte Proteine, wie Hedgehog (Rietveld et al., 1999), und Transmembranproteine, insbesondere diejenigen, die palmitoyliert sind (Abb. 6) (Brown and London, 1998).

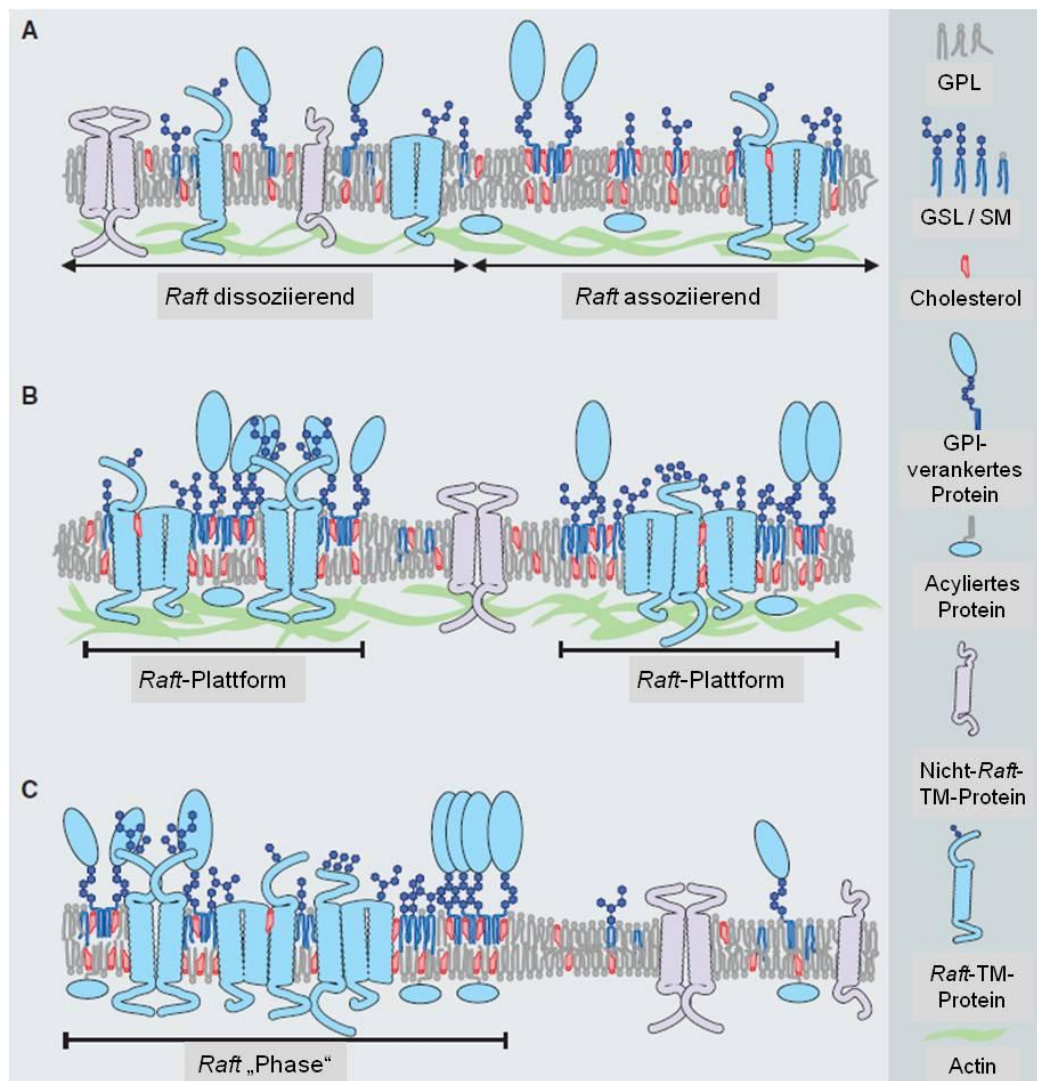


Abb. 6: Hierarchie der GEM-basierten Heterogenität in Zellmembranen

A. Dynamische Mikrodomänen bestehen aus Sterolen, Sphingolipiden sowie spezifischen Membranproteinen. Diese Ansammlung von Sphingolipiden und Sterolen unterstützt die Integration spezifischer Proteine, z.B. von GPI-verankerten Proteinen und wird durch den Einbau von Transmembranproteinen, acylierten, zytosolischen Effektoren und Actin, moduliert. Proteine, die nicht die chemische und physikalische Spezifität besitzen, um mit diesen Membranbereichen zu assoziieren, sind als graue Proteine (Nicht-Raft-Transmembranproteine) dargestellt. GPL: Glycerophospholipid; SM: Sphingomyelin. TM: Transmembranprotein. B. Die Heterogenität der Mikrodomänen kommt mittels Lipid- und / oder Protein-vermittelten Aktivierungen (z.B. Bindung multivalenter Liganden, Proteinoligomerisierung) zustande. Dies führt zur Verschmelzung von membranordnungsbildenden Lipiden, die selektive chemische und physikalische Spezifitäten für Proteine aufweisen. Der Grad der lateralen Sortierung kann auch durch Actin unterstützt werden. C. Getrennt vom Einfluss von Actin und ohne Membrantransport, kann eine Gruppierung von GEM-Lipiden zu einer mikroskopisch sichtbaren Membranphase erweitert werden. Die Membranbestandteile sind gemäß der Präferenzen für die Membranordnung und chemischen Interaktionen lateral sortiert. Modifiziert nach (Lingwood and Simons, 2010).

Die Palmitoylierung von Transmembranproteinen kann deren Anreicherung in GEM erhöhen, ist aber für eine GEM-Assoziation weder ausreichend noch unbedingt notwendig (Levental et al., 2010a; Levental et al., 2010b; Melkonian et al., 1999).

Einige Membranproteine befinden sich in GEM, werden aber kaum in GEM rekrutiert, wenn sie ohne Liganden sind. Nach der Bindung an einen Liganden, verändern sie ihre Konformation und / oder werden oligomerisiert (Simons and Ehehalt, 2002). Wenn Proteine oligomerisieren oder mit einem Protein assoziieren, kann ihre Affinität zu den GEM erhöht werden (Harder et al., 1998). Ein peripheres Membranprotein, wie eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, kann reversibel palmitoyliert werden und ihre GEM-Assoziation nach Abspaltung der Palmitinsäure wieder verlieren (Zacharias et al., 2002). Auf diese Weise kann die Verteilung von Proteinen innerhalb der Plasmamembran streng reguliert werden (Simons and Ehehalt, 2002).

GEM spielen nicht nur bei der Sortierung von Proteinen in Epithelzellen eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Signaltransduktion. In der Tat dienen GEM als Signalplattformen, sodass die Lokalisation spezifischer Proteine in diesen Mikrodomänen für bestimmte Signalwege von entscheidender Bedeutung ist. Die Palmitoylierung fördert die Rekrutierung von Proteinen in glycolipidreiche Membrandomänen (Levental et al., 2010b; Lorent and Levental, 2015). Dies wurde u.a. für die Tetraspanine gezeigt. Tetraspanine sind Transmembranproteine, die in der Regel Palmitoylierungsstellen aufweisen (Hemler, 2005; Yang et al., 2004). Die Palmitoylierung der Tetraspanine CD9 und CD81 geht mit der Organisation eines höheren Ordnungsgrades von Membrankomplexen einher (Hemler, 2005; Yang et al., 2004). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Verbindung zwischen Tetraspaninen und Claudinen. CD9 interagiert direkt mit cld1 in einer Cholesterin-abhängigen Weise (Kovalenko et al., 2007). Bisher ist nicht bekannt, ob CD81 eine Rolle bei der Rekrutierung von Claudinen spielt, aber CD81 fungiert als Co-Rezeptor von cld1, cld6 und cld9 und fördert damit die Bindung des Hepatitis-C-Virus und dessen Eintritt in die Zelle (Evans et al., 2007). Zudem wurde festgestellt, dass nur cld1, welches sich auf der basolateralen Oberfläche von HepG2 Zellen befindet, mit CD81 assoziiert, nicht jedoch der "TJ-Pool" von cld1. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Virusinfektion basolateral, aber nicht TJ-lokalisiert erfolgt (Harris et al., 2010). Ein weiteres Beispiel sind die tetraspaninreichen Mikrodomänen (*Tetraspanin-Enriched Membrane Microdomains*, TEM), die als Signalplattformen fungieren können. Sie stellen organisierte, makromolekulare Komplexe, welche aus Tetraspaninen, integralen Transmembranproteinen, die mit anderen Tetraspaninen interagieren können, bestimmten Lipiden und verschiedenen transmembranären und zytosolischen Proteinen, dar (Le Naour et al., 2006; Zöller, 2009).

Für die vorliegende Arbeit ist die Beobachtung von Bedeutung, dass cld7, das nicht in TJs lokalisiert ist, und das Zelladhäsionsmolekül, *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM), einen Komplex bilden. Cld7 rekrutiert EpCAM in die TEM. In diesen Mikrodomänen interagieren sie mit weiteren Proteinen, wie CD44v6 und Integrinen, was mit einem gesteigertem Tumorwachstum und erhöhter Metastasierungsfähigkeit in Kolorektal-, Schilddrüsen- und Pankreaskarzinomen einhergeht (Kuhn et al., 2007; Nübel et al., 2009; Okada et al., 2014; Thuma and Zöller, 2013). Ausschließlich zwischen cld7 und EpCAM wurde eine direkte Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen (Kuhn et al., 2007). Diese Beobachtung verwies auf eine spezielle Interaktion zwischen cld7 und EpCAM, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war. Da sie für die vorliegende Arbeit wichtig ist, wird diese im Folgenden näher beschrieben.

1.4 EpCAM-Claudin-7-Assoziation

1.4.1 EpCAM

EpCAM ist ein Typ I Transmembranglycoprotein, das die Plasmamembran ein Mal durchspannt und in Epithelzellen verschiedener Gewebe exprimiert wird. In Tumoren wird EpCAM häufig überexprimiert (Trzpis et al., 2007) und spielt bei der Signaltransduktion in Stammzellen eine bedeutende Rolle (Münz et al., 2009). Des Weiteren wurde EpCAM als ein humaner embryonaler Stammzellmarker identifiziert (Choo et al., 2008) und in mehreren Studien als adäquater Marker für Pluripotenz und Proliferation in murinen und humanen embryonalen Stammzellen bestätigt (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2010).

EpCAM besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, die die Domänen *Epidermal Growth Factor* (EGF)-ähnliche Domäne, Thyroglobulindomäne und eine cysteinarme Region umfasst. Auf die Transmembrandomäne folgt eine kurze zytoplasmatische Domäne (Abb. 7) (Litvinov et al., 1994a; Litvinov et al., 1994b; Trebak et al., 2001).

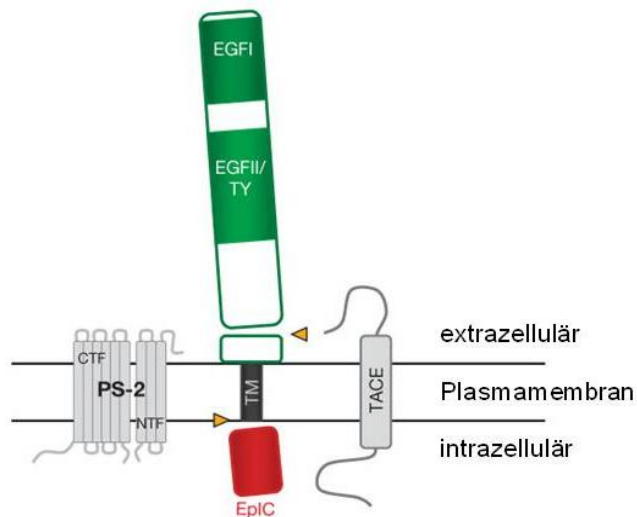


Abb. 7: Struktur von EpCAM

Schematische Darstellung des Transmembranglycoproteins EpCAM mit einer extrazellulären Domäne (in grün/weiß), einer Transmembranregion (TM) und einer intrazellulären Domäne (EpIC). Gezeigt sind die Enzyme, die EpCAM spalten, sowie deren Schnittstellen (gelbe Pfeile). TACE spaltet die extrazelluläre Domäne ab und PS-2/NTF (N-Terminales Fragment von Presenilin-2) führt zur zytoplasmatischen Freisetzung von EpIC. Modifiziert nach (Maetzel et al., 2009).

In Epithelzellen bildet EpCAM homophile Ca^{++} -unabhängige Verbindungen mit Partnern von benachbarten Zellen (Litvinov et al., 1994a). EpCAM vermittelt die Zell-Zell-Adhäsion mittels intra- und interzellulärer homophiler Interaktionen, für die die EGF-ähnliche Domäne und die Thyroglobulindomäne essentiell sind (Balzar et al., 2001). Darüber hinaus ist die zytoplasmatische Domäne von EpCAM (**EpCAM Intracellular Domain**, EpIC) über eine direkte Assoziation mit α -Actinin mit dem Zytoskelett verbunden. Diese Assoziation ist für die Bildung und Stabilisierung der EpCAM-vermittelten interzellulären Adhäsionen notwendig (Balzar et al., 1998). Aber EpCAM kann auch die E-Cadherin-vermittelte interzelluläre Zelladhäsion schwächen, indem es die Bindung zwischen α -Catenin und F-Actin stört. Dies deutet auf eine potentielle Rolle von EpCAM als Modulator von Zell-Zell-Adhäsionen hin (Abb. 8) (Litvinov et al., 1997; Osta et al., 2004; Schnell et al., 2013; Winter et al., 2003).

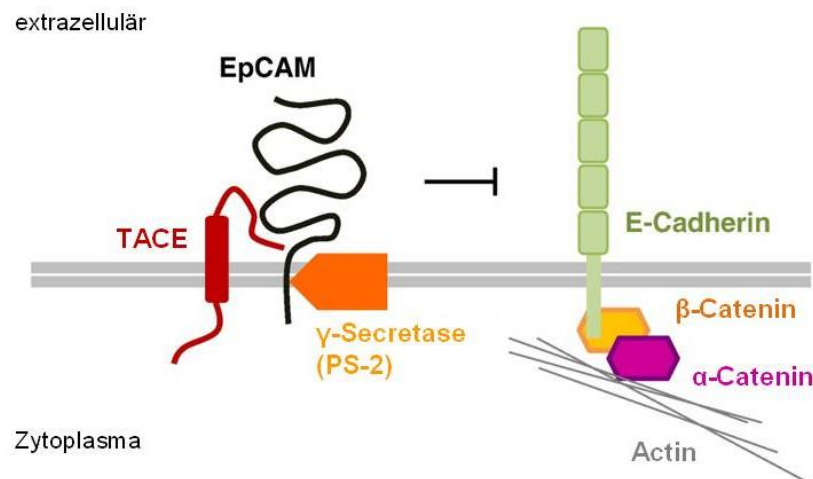


Abb. 8: EpCAM schwächt die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion

EpCAM schwächt die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion, indem die Bindung zwischen E-Cadherin und dem Actin-Zytoskelett unterbrochen wird. Dies resultiert in einer erhöhten Verfügbarkeit von ungebundenem β -Catenin. Modifiziert nach (Maetzel et al., 2009; Schnell et al., 2013).

In der Tat haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass EpCAM aufgrund einer regulierten, intramembranären Proteolyse an mehreren Stellen gespalten wird (Hachmeister et al., 2013; Maetzel et al., 2009; Schnell et al., 2013). Die Abspaltung von extrazellulärem EpCAM (EpEx) wird von einem *Shedding*-Enzym der **A Disintegrin And Metallopeptidase (ADAM)**-Familie, ADAM17, welches auch als **Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme (TACE)** bezeichnet wird, initiiert (Carpenter and Red Brewer, 2009; Maetzel et al., 2009). Anschließend erfolgt eine weitere Spaltung mittels der γ -Secretase mit Presenilin-2 als aktiver Untereinheit, was in der Freisetzung der intrazellulären Domäne (EpIC) resultiert. Im Anschluss transloziert das freigesetzte EpIC zusammen mit β -Catenin, **Four-and-Half-LIM-only (FHL-2)** und **Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1 (LEF-1)** in den Zellkern und aktiviert u.a. das Protoonkogen c-myc, die Zellzyklus-assoziierten Proteine, Cyclin A und E (Maetzel et al., 2009; Münz et al., 2004) sowie die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog (Chen et al., 2011a) (Abb. 9). Indem EpCAM die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion schwächt, kann die Menge von nicht membrangebundenem β -Catenin erhöht werden und aufgrund der Assoziation mit EpIC und FHL-2 stabilisiert und vor dem Abbau geschützt werden (Litvinov et al., 1997; Osta et al., 2004; Schnell et al., 2013; Winter et al., 2003).

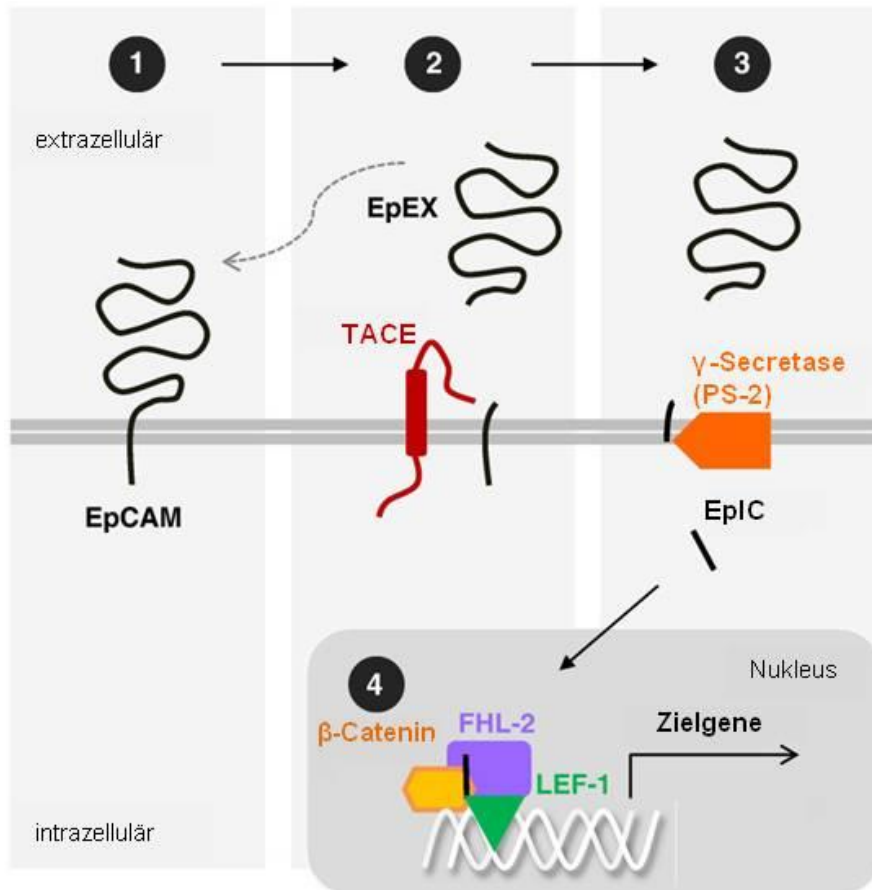


Abb. 9: EpCAM als Substrat für die regulierte, intramembranäre Proteolyse

Das Transmembrannglycoprotein, EpCAM, (1) wird von ADAM17/TACE gespalten, was zur Abspaltung von extrazellulärem EpCAM (EpEx) führt (2). EpEx kann als homophiler Ligand für nicht gespaltenes EpCAM fungieren, was zur regulierten, intramembranären Proteolyse führt (unterbrochener, grauer Pfeil). Nach der Abspaltung von EpEx wird das zytosolische Ende von EpCAM (EpIC) mittels der Spaltung durch Presenilin-2 (PS-2) freigesetzt (3). EpIC assoziiert mit FHL-2 (*Four-and-Half-LIM-only-2*) und β-Catenin und wandert in den Zellkern (4), was in der Transkription von EpCAM-Zielgenen mittels Bindung an LEF-1-Konsensussequenzen (*Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1*) resultiert. Modifiziert nach (Maetzel et al., 2009; Schnell et al., 2013).

1.4.2 Der EpCAM-Claudin-7-Komplex

Bei Untersuchungen zu Tetraspaninkomplexen in Pankreaskarzinomzellen wurde beobachtet, dass neben CD44v6 und EpCAM ein weiteres Molekül mit Tetraspanin 8 (Tspan8) assoziiert ist. Es zeigte sich, dass es sich hierbei um cld7 handelt und dieses direkt mit EpCAM assoziiert ist, wobei die Transmembrandomäne von EpCAM ein Motiv aufweist, welches für Protein-Protein-Assoziationen determiniert ist. Nach der Mutation des AlaxxxGly Motivs innerhalb der Transmembrandomäne konnte in der Tat keine Assoziation zwischen EpCAM und cld7 beobachtet werden. Des

Weiteren wurde gezeigt, dass cld7 die TACE-abhängige Spaltung von EpCAM unterstützt und hierdurch die Tetramerbildung von EpCAM verhindert wird. Dies vermindert die EpCAM-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und fördert gleichzeitig die Migration sowie die Metastasierungsfähigkeit in Kolorektal- und Pankreaskarzinomzelllinien (Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005; Thuma and Zöller, 2013). Die Expression von EpCAM, cld7, Tspan8 und CD44v6 wurde in kolorektalen Karzinomen, Lebermetastasen und tumorfreiem Kolon- und Lebergewebe untersucht und war sowohl in den Karzinomen als auch in den Lebermetastasen erhöht. Außerdem korrelierte die Koexpression invers mit dem krankheitsfreien Überleben der Patienten (Kuhn et al., 2007). Zudem rekrutiert cld7 EpCAM in die TEM, in welchen der EpCAM-cld7-Komplex mit weiteren Proteinen, wie Integrinen, den Tetraspaninen CD9 und Tspan8 sowie mit CD44v6, assoziiert (Abb. 10) (Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005). Auch im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom konnte eine Interaktion von EpCAM mit cld7 sowie CD44v6 nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten, dass diese Interaktion im Zusammenhang mit der Entstehung einer aggressiven Form des Schilddrüsenkarzinoms stehen könnte (Okada et al., 2014).

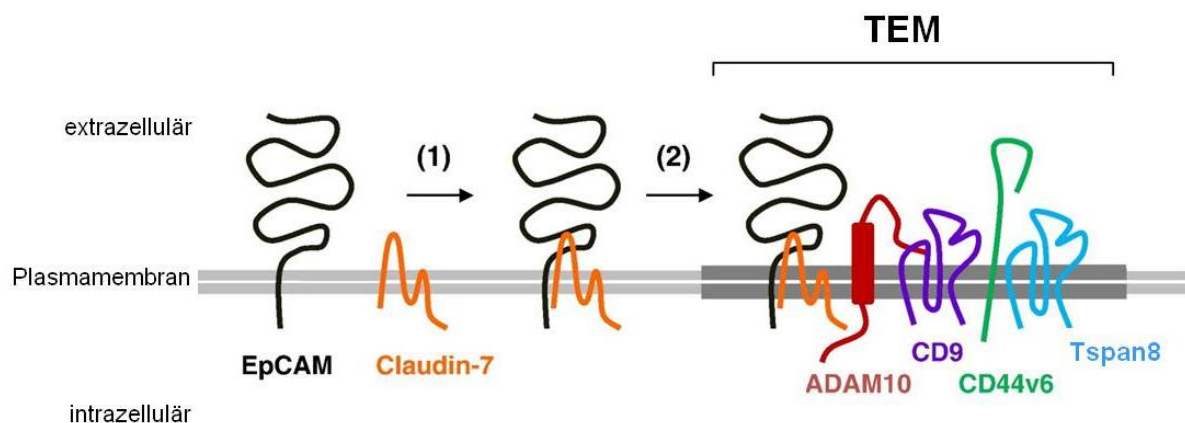


Abb. 10: Der EpCAM-cld7-Komplex in TEM

EpCAM assoziiert mit cld7 (1) und wird von cld7 in TEM rekrutiert (2), in den TEM bilden sie einen Komplex mit den Tetraspaninen, CD9 und Tspan8, sowie CD44v6 und ADAM10, die auch in TEM lokalisiert sind. Modifiziert nach (Maetzel et al., 2009; Schnell et al., 2013).

In einer *in vitro* Studie in kolorektalen Karzinomzelllinien assoziiert EpCAM direkt mit cld7 und ein Knockdown von EpCAM reduziert die Gesamtproteinmenge von cld1 und cld7. Aber es konnte beobachtet werden, dass diese Proteine vermehrt in TJs

akkumulieren. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Assoziation von EpCAM mit cld7 und cld1 die Stabilität von Claudinen unterstützt und deren Verteilung in den polarisierten Epithelzellen beeinflusst. Zudem war die beobachtete Assoziation von EpCAM und cld1 abhängig von cld7 (Wu et al., 2013).

Auch unter physiologischen Bedingungen wurde im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Interaktion von cld7 und EpCAM festgestellt. Lei et al. (2012) zeigten, dass im Darmepithel cld7 in Zell-Zell-Kontakten mit EpCAM kolokalisiert und die beiden Proteine direkt miteinander assoziieren. Darüber hinaus ist cld7 in EpCAM^{ko} Mäusen auf nicht nachweisbare Mengen reduziert. Die Autoren schlussfolgerten, dass EpCAM an der Bildung von funktionellen TJs im intestinalen Epithel beteiligt ist, indem es Claudine in Zell-Zell-Verbindungen rekrutiert (Lei et al., 2012). Zudem assoziiert cld7 auch in Progenitorzellen der Leber mit EpCAM (Yovchev et al., 2008). *In vitro* Untersuchungen in einer Reihe unterschiedlicher Modelle sowie Studien an Tumorgewebe und mit cld7^{ko} und EpCAM^{ko} Mäusen belegen die Assoziation dieser beiden Moleküle unter noch nicht klar definierten Bedingungen. Alle Studien weisen darauf hin, dass eine Störung dieser Interaktion mit erheblichen pathologischen Veränderungen einhergeht.

1.5 Modellsysteme

1.5.1 HEK-Modell

Human Embryonic Kidney Zellen sind durch die Transformation primärer embryonaler Nierenzellen mit humaner Adenovirus 5 DNA entstanden und werden auch als HEK293 (HEK) bezeichnet (Graham et al., 1977). Nachfolgende Analysen haben gezeigt, dass ein adenovirales Genomfragment von etwa 4 kbp in das humane Chromosom 19 integriert wurde und für die Proteine E1A / E1B kodiert, die Signalwege der Zellzykluskontrolle beeinflussen und der Apoptose entgegenwirken (Louis et al., 1997). Viele Jahre wurde davon ausgegangen, dass HEK Zellen durch die Transformation von Fibroblasten, Endothel- oder Epithelzellen, die in den Nieren vorhanden sind, entstanden sind. Aufgrund von Genom- und Transkriptomanalysen wird angenommen, dass HEK Zellen ihren Ursprung in embryonalen Vorläuferzellen der Nebennieren haben. Daher eignen sie sich nicht für *in vitro* Modelle typischer

Nierenzellen (Lin et al., 2014; Shaw et al., 2002). Vielmehr sind sie für Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen sehr gut geeignet und einfach zu transfizieren. Des Weiteren weisen sie keine TJs auf (Piontek et al., 2008) und exprimieren kein EpCAM und kaum cld7 (Nübel et al., 2009). Aufgrund dessen sind sie als Modellsystem für die vorliegende Arbeit sehr gut geeignet.

1.5.2 SW948- und HT29-Tumorzelllinien und Tumorstammzellen

Für die *in vitro* Untersuchungen des Einflusses von cld7 auf Tumorstammzelleigenschaften wurden die kolorektalen Karzinomzelllinien HT29 und SW948 verwendet. Die Fähigkeit des Tumorwachstums und der Metastasierung von HT29 Zellen wurde in *in vivo* Versuchen kontrolliert.

1.5.2.1 SW948- und HT29-Tumorzelllinien

Die humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien, HT29 (von Kleist et al., 1975) und SW948 (Leibovitz et al., 1976) wurden aus Primärtumoren isoliert. Es handelt sich dabei um adhärenzte Zelllinien mit epithelialer Morphologie. HT29 Zellen wachsen unter Standardbedingungen als nicht polarisierte, undifferenzierte Multilayer. HT29 Zellen sind als Xenograft-Tumormodell für Kolorektalkrebs geeignet. Um humane Krebserkrankungen zu untersuchen, wurden einige Mausmodelle entwickelt. Diese Modelle werden verwendet, um Faktoren, die an malignen Transformationen, der Invasion von Tumorzellen und Metastasierung beteiligt sind, sowie das Ansprechen auf bestimmte Therapien zu untersuchen. Das humane Tumor-Xenograft-Modell ist eines der am häufigsten genutzten Modelle. Hierbei werden humane Tumorzellen in immunsupprimierte Mäuse, die humane Zellen tolerieren können, injiziert. Dies erfolgt entweder subkutan, intravenös oder orthotopisch (Richmond and Su, 2008). NOD / SCID (**Non-Obese Diabetic, Severe Combined Immunodeficiency**) Mäuse zeigen Beeinträchtigungen bei der Bildung von T- und B-Lymphozyten und sind daher nicht in der Lage fremdes Gewebe abzustoßen (Shultz et al., 2005).

1.5.2.2 Tumorstammzellen

Heutzutage wird davon ausgegangen, dass nur eine kleine Subpopulation des gesamten Tumors in der Lage ist, den Tumorverband zu verlassen, im Gefäßsystem des Körpers zu überleben und anschließend in fremdes Gewebe einzudringen. Für die Bildung von Kolonien in fremdem Gewebe erscheint die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung essentiell zu sein. Die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung ist eines der charakteristischen Merkmale embryonaler und adulter Stammzellen. Daher werden Tumorzellen, die diese Eigenschaften besitzen als Tumorstammzellen (TSZ) bezeichnet (Scheel and Weinberg, 2012). TSZ können auch mithilfe von spezifischen TSZ-Oberflächenmarkern identifiziert und isoliert werden. CD133 ist einer der ersten TSZ-Marker, der im kolorektalen Karzinom (KRK) identifiziert wurde. CD133 ist ein Transmembranglycoprotein und wird selektiv auf tumorinitiierenden Zellen innerhalb der Gesamtmasse des humanen KRK exprimiert (O'Brien et al., 2007). Diese CD133⁺-Zellpopulation exprimiert weitere Stammzellproteine, wie die Zelladhäsionsmoleküle, EpCAM, CD44v6 und CD166 (Dalerba et al., 2007). Weitere potentielle Marker von KRK-Stammzellen sind das Integrin $\alpha 6$ (CD49f) / $\beta 1$ (CD29), das Zelladhäsionsmolekül CD24 und der *Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5* (Lgr5) (Barker and Clevers, 2010; Fujimoto et al., 2002; Haraguchi et al., 2013; Sagiv et al., 2006).

In vitro können TSZ mithilfe selektiver Wachstumseigenschaften angereichert werden. So können TSZ unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen Sphäroide bilden, wie dies auch von gewebespezifischen adulten Stammzellen bekannt ist (Liu et al., 2006; Smukler et al., 2011). Des Weiteren zeigen epitheliale Stammzellen ebenso wie Tumorstammzellen epithelialer Tumore, die Fähigkeit als Holoklone zu wachsen (Locke et al., 2005; Tang et al., 2007; Vollmers et al., 2012). Wenn Primärkulturen nicht transformierter Epithelzellen kloniert werden, wachsen drei Arten von Kolonien, die unterschiedliche proliferative Kapazitäten aufweisen und als Holoklone, Meroklone und Paraklone bezeichnet werden. Holoklone sind kompakte Kolonien mit glatten Rändern, wohingegen Paraklone lockere Kolonien bilden und von ausdifferenzierteren Tochterzellen stammen. Die Morphologie der Meroklone liegt dazwischen (Barrandon and Green, 1987). Diese Kolonien entstehen aus Stammzellen, Progenitorzellen und differenzierten Zellen. Holoklone bestehen aus

selbsterneuernden Stammzellen, wohingegen Mero- und Paraklone vorwiegend aus Progenitorzellen und differenzierten Zellen bestehen (Vollmers et al., 2012).

1.6 Ziele der Arbeit

Claudine sind die wesentlichen Komponenten von TJs, die für die Aufrechterhaltung der Integrität eines Epithelverbandes unerlässlich sind. Dies stellt eine Funktion dar, die mit der Metastasierung nicht vereinbar ist. Dennoch wird bei einigen metastasierenden Tumoren eine Überexpression von Claudinen beobachtet. In der Tat werden Claudine auch außerhalb von TJs detektiert. Die Mechanismen, die verhindern, dass Claudine in TJ-Komplexe integriert werden, sind weitgehend unbekannt. Auch die Lokalisation von Claudinen außerhalb von TJs konnte noch nicht nachhaltig geklärt werden. Untersuchungen zur Funktion von Claudinen außerhalb von TJs fehlen weitgehend. Vorarbeiten in diesem Labor zeigten, dass die Überexpression von cld7 mit einer schlechten Prognose bei gastrointestinalen Tumoren korreliert. Zudem ist cld7 häufig als Komplex mit den Tumorstammzellmarkern Tspan8, CD44v6 und insbesondere EpCAM in GEM angereichert. Darauf aufbauend entstand die Hypothese, dass cld7 außerhalb von TJs als Tumorstammzellmarker agiert. Um dies zu überprüfen, habe ich im Rahmen meiner Dissertation am Modell transfizierter HEK Zellen:

- den Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Lokalisation von cld7 und
- die Bildung von cld7-Proteinkomplexen unter besonderer Berücksichtigung von EpCAM in Abhängigkeit von der Integration in Membranmikrodomänen charakterisiert.
- Darauf aufbauend wurden im Hinblick auf die Beteiligung von cld7 am Metastasierungsprozess insbesondere Motilität und Invasivität in Abhängigkeit von cld7 / cld7-Komplexen außerhalb von TJs evaluiert.
- Im abschließenden Teil meiner Dissertation habe ich die Relevanz der erhobenen Befunde für die Metastasierung kolorektaler Tumore überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
Analysenwaage PT 3100	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Brutschrank	Labotect, Göttingen
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton-Dickinson, Heidelberg
DNA-Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
ELISA-Reader Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Entwickler Agfa Curix 60	Siemens, Erlangen
Feinwaage RC210D	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Leica DMRBE	Leica, Wetzlar
Fluoroskan Ascent Mikroplattenleser	Thermo Scientific, Langenselbold
Geldokumentationssystem (Mididoc)	Herolab, Wiesloch
Inkubator für Bakterienkulturen	Melag, Berlin
Inverslichtmikroskop DM-IL	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Heidolph, Keilheim
Mikrowelle	Phillips, Wiesbaden
Netzgerät PS 9009	GIBCO, Darmstadt
Netzgeräte	Consort, Turnhout, Belgien
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Ph-Meter-761 Calimatic	Knick, Berlin

Photokassette	Amersham, Freiburg
Photometer Ultraspec III	Amersham, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Präzisionswaage RC 210 D	Sartorius, Göttingen
Rotor GSA	Kendro, Langenselbold
Rotor SW34	Kendro, Langenselbold
Rotor SW41Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor SW60	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttelgerät Vortex Genie [®]	Scientific Industries, New York, USA
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-PAGE System Mini-PROTEAN [®]	Bio-Rad, München
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab UW 2070	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Optima Le-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Western Blot System Mini Trans-Blot [®]	Bio-Rad, München
Zählkammer Neubauer improved	Brand, Wertheim
Zell Harvester 96	Tomtec, Hamden, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J6-MC	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Megafuge 10 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC5B Plus	Kendro, Langenselbold

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
96-well-Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well-Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dako Stift	DakoCytomat., Glostrup, Denmark
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
ELISA-Platten, 96-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm ECL	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
Kanülen (20G, 23G, 27G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Migrationskammer AP48	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Nitrozellulosemembran Hybond [®] ECL [®]	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm [®] M	American Nat. Can., Greenwich, GB
PCR Reaktionsgefäße	Axon Kaiserslautern
Pipettenspitzen	Sarstedt, Numbrecht
Polycarbonatmembran (Poren 8 µm)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter 0,2 µm	Renner, Darmstadt
Vivaspin Centrifugal Concentrators (6 ml, 20 ml)	Vivascience, Hannover

Whatman™ 3MM Papier	Scleicher & Schull, Dassel
Zellkultur-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur-Multiwellplatten (6-well, 24-well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
2-Bromopalmitat (2-BP)	Sigma-Aldrich, München
³² P-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acetoacetat	Merck, Darmstadt
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin Sulfat	Calbiochem, Darmstadt
AnnexinV-APC	Becton Dickinson, Heidelberg
AnnexinV-FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Bactoagar	Fluka, Buchs, Switzerland
BMCC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biotin-X-NHS	Calbiochem, Darmstadt
Bradford Reagent	Bio-Rad, München

Brilliant Blau G-Colloidal Konzentrat	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Coomassieblau G250	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassieblau R250	Gerbu-Biotechnik, Gaiberg
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Entwicklerlösung	Agfa healthcare, Bonn
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, München
Ficoll-Paque	Sigma-Aldrich, München
Fixierlösung	Agfa healthcare, Bonn
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
G418 Sulfat (Neomycin)	PAA, Pasching, Österreich
Gelatine	Merck, Darmstadt

<i>Gelatine from cold water fish skin</i> (Fischgelatine)	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	GIBCO, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, München
Hyaluronsäure (Rooster Comb)	Sigma-Aldrich, München
Hydroxylamin (HAM)-Lösung 50 %	Sigma-Aldrich, München
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Darmstadt
Lubrol MX (17A17)	Serva, Heidelberg
Matrigel™	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumkarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe

Mowiol (4-88)	Calbiochem, Darmstadt
MTT (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, München
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Natriumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Carl Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich, München
Optifluor O	Perkin Elmer, Rodgau
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penizillin	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin	Becton Dickinson, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphataseinhibitor PhosSTOP [®]	Roche Diagnostik, Mannheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-S-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Calbiochem, Darmstadt

Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostik, Mannheim
Protein-G-Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	GIBCO, Darmstadt
Salzsäure	Sigma-Aldrich, München
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
TACE Inhibitor (TAPI)	Calbiochem, Darmstadt
TEMED (N,N,N'N'- Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, München
Tricin	Sigma-Aldrich, München
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	Serva, Heidelberg
Urea	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen unter Angabe des Herstellers

6x Laemmli Puffer	350 mM Tris, pH 6,8, 10 % SDS (w/v), 36 % Glycerol (w/v), 0,01 % Bromphenolblau (w/v)
Anodenpuffer (10x)	1 M Tris, 0,225 M HCl, pH 8,9

Bicarbonatpuffer	15 mM Na ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ , pH 9,6
Coomassieblau-Lösung	0,125 % Coomassie-Brilliantblue R250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure in ddH ₂ O
Diethanolaminpuffer (pH 9,8)	97 ml Diethanolamin, 100 mg MgCl ₂ ad 1 L dd H ₂ O
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
Elvanol	20 % Mowiol (w/v), pH 8 in zwei Teilen PBS und einem Teil Glycerol lösen
Entfärber-Lösung	7 % Essigsäure, 5 % Methanol in ddH ₂ O
Ethidiumbromid	0,01 % in Wasser (w/v)
Gelpuffer (3x)	3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS (w/v), pH 8,45
HEPES-Puffer	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, Protease-+ Phosphataseinhibitoren
Inkubationspuffer	50 mM CaCl ₂ , 1 µM ZnCl ₂ , 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
Kathodenpuffer (10x)	1 M Tris, 1 M Tricine, 1 % SDS (w/v), ~pH 8,25
Kinase-Assay-Puffer	25 mM HEPES pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5mM MnCl ₂ , Phosphatase- und Proteaseinhibitoren
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)	1 %SDS (w/v), 144 g Glyzin, 30 g Tris, ad 1 L dd H ₂ O
LB Medium	10 g Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 L dd H ₂ O. 15 g Agar für LB Agarplatten.
PBS	137 mM NaCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Stripping-Puffer für WB	50 mM Tris - HCl (pH 6,8), 2 % SDS (w/v), 0,1 M β-Mercaptoethanol
TAE Puffer	242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1 L dd H ₂ O, pH 8,5

Transferpuffer (WB)	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, 20 % Methanol
Tricine-Probenpuffer	150 mM Tris (pH 7,0), 3 % SDS (w/v), 30 % Glycerol (w/v), 0,01 % Bromphenolblau (w/v)
Waschpuffer (WB Membranen)	PBS, 0,1 % Tween-20 oder TBS, 0,1 % Tween-20

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
AccuPrime [®] Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse	Promega, Mannheim
T4 Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Nukleotid- und Proteinstandards

Tabelle 6: Verwendete Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
GeneRuler [™] 100bp DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler [™] 1Kb DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler [™] 1Kb DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pageruler [™] Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.7 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.8 Oligos

Tabelle 8: Verwendete Oligos unter Angabe der Sequenz

Name	Sequenz
human cld7 kd1 sense	5'-GATCCCCTCGGACCTACAGCCCAGGATATTC AAGAGATATCCTGGGCTGTAGGTCCGATTTTTTA-3'
human cld7 kd1 antisense	5'-AGCTTAAAAATCGGACCTACAGCCCAGGATATCTC TTGAATATCCTGGGCTGTAGGTCCGAGGG-3'
human cld7 kd2 sense	5'-GATCCCCCCTACCAACATTAAGTATGATTCAAGAGA TCATACTTAATGTTGGTAGGGTTTTTA-3'
human cld7 kd2 antisense	5'-AGCTTAAAAACCCTACCAACATTAAGTATGATCTCTT GAATCATACTTAATGTTGGTAGGGGGG-3'

2.1.9 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer unter Angabe der Sequenz

Name	Sequenz
cld7 (Nübel et al., 2009)	for: 5'-ATATAAAGCTTACCACCATGGCTAACTCG GGCCTGCAA-3'

rev:
 5'-TATATAGGATCCTCACACGTATTCCTTAGA
 GGA-3'
 cld7-S33A
 for:
 5'-CTATCCCACAGTGGCAGATGGGCTCCTA
 TGCAGGCGACAAC-3'
 rev:
 5'-GTTGTGCGCTGCATAGGAGCCCATCTGC
 CACTGTGGGATAG-3'
 cld7-S69A
 for:
 5'-GAGCTGCAAAATGTACGACGCGGTGCTT
 GCCCTGCCAGC-3'
 rev:
 5'-GCTGGCAGGGCAAGCACCGCGTCGTACA
 TTTTGCAGCTC-3'
 cld7-S87A
 for:
 5'-CGAGCCTTAATGATTGTGGCCTTGGTGT
 TGGGCTTCTTG-3'
 rev:
 5'-CAAGAAGCCCAACACCAAGGCCACAATC
 ATTAAGGCTCG-3'
 cld7-S172A
 for:
 5'-CTTTATCGGCTGGGCAGGGGCTGCTCTG
 GTCCTTCTGGG-3'
 rev:
 5'-CCCAGAAGGACCAGAGCAGCCCCTGCC
 CAGCCGATAAAG-3'
 cld7-S204A
 for:
 5'- CTCCTACCCTAAGGCCAACTCCTCTAAG-
 3'
 rev:
 5'-CTTAGAGGAGTTGGCCTTAGGGTAGGAG-
 3'
 cld7-S206A
 for:
 5'- CTACCCTAAGTCCAACGCCTCTAAGGAA
 TACG-3'
 rev:

cld7-S207A	5'-CGTATTCCTTAGAGGCGTTGGACTTAGG GTAG-3' for: 5'-CCTAAGTCCAACCTCCGCTAAGGAATACG TG-3' rev: 5'-CACGTATTCCTTAGCGGAGTTGGACTTA GG-3'
cld7-C184S/C186S	for: 5'-GGAGGGGCCCTGCTCTCTTTCCTCCTCC CCCGGCAGTGAAAGCAAAG-3' rev: 5'-CTTTGCTTTCACTGCCGGGGGAGGAGGA AGAGAGCAGGGCCCCTCC-3'
EpCAM (Nübel et al., 2009)	for: 5'-TATAAAGCTTGCCACCATGGCGCCCCCA AGGCCCTC-3' rev: 5'-TTGCTCCATGTCTTTCTGAGCTGCGGCCA G-3'
EpCAM-A279I (Nübel et al., 2009)	for: 5'-CGCCGTCATTGTCGTGGTGGTGTTAATA GTCATTGCG-3' rev: 5'-CGCAATGACTATTAACACCACCACGACAA TGACGGCG-3'
EpCAM-A283I (Nübel et al., 2009)	for: 5'-AGTCATTGCGGGGATTGTTGTCCTGGTTA TAT-3' rev: 5'-ATATAACCAGGACAACAATCCCCGCAATG ACT-3'

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primärantikörper

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Name	Hersteller
Actin	Becton Dickinson, Heidelberg
Asialo-GM1	Wako, Richmond, USA
β -Catenin	Becton Dickinson, Heidelberg
CD29	Becton Dickinson, Heidelberg
CD44 (25-32)	(Zuckermann et al., 1994)
CD44v6 (vFF18)	(Seiter et al., 1996)
CD49e	Becton Dickinson, Heidelberg
CD49f	Becton Dickinson, Heidelberg
CD81	Becton Dickinson, Heidelberg
CD104	Becton Dickinson, Heidelberg
CD133	Becton Dickinson, Heidelberg
CD147	Becton Dickinson, Heidelberg
CD166	Becton Dickinson, Heidelberg
CD184	Becton Dickinson, Heidelberg
cld3	Santa Cruz, Heidelberg
cld4	Santa Cruz, Heidelberg
cld7	(Ladwein et al., 2005)
c-src	Santa Cruz, Heidelberg
E-Cadherin	Becton Dickinson, Heidelberg
EGFR	AnaSpec, San Jose, USA

EpCAM (D5.7; α -rat)	(Matzku et al., 1989)
EpCAM (HEA; α -human)	(Momburg et al., 1987)
EpIC	hergestellt von Dr. F. Thuma, keine Referenz
Ezrin	Sigma-Aldrich, München
FAK	Becton Dickinson, Heidelberg
FGF	Becton Dickinson, Heidelberg
FN	Becton Dickinson, Heidelberg
Met	Cell Signaling, Frankfurt
MMP2	Dianova, Hamburg
MMP3	Santa Cruz, Heidelberg
MMP7	Santa Cruz, Heidelberg
MMP9	Dianova, Hamburg
MMP13	Dianova, Hamburg
MMP14	Santa Cruz, Heidelberg
N-Cadherin	Becton Dickinson, Heidelberg
Notch	Biolegend, San Diego, USA
Oct3/4	Santa Cruz, Heidelberg
Paxillin	Becton Dickinson, Heidelberg
phospho- β -Catenin	BioTrend, Köln
phospho-cld7	Sigma-Aldrich, München
phospho-Ezrin	Cell Signaling, Frankfurt
phospho-FAK	Cell Signaling, Frankfurt
Phosphotyrosin	Becton Dickinson, Heidelberg
Presenilin-2	Santa Cruz, Heidelberg
phospho-Src	Cell Signaling, Frankfurt

TACE	Santa Cruz, Heidelberg
TGFβ	Becton Dickinson, Heidelberg
Tspan8 (CO029)	(Sela et al., 1989)
Tubulin	Becton Dickinson, Heidelberg
Vimentin	Becton Dickinson, Heidelberg
ZO-1	Santa Cruz, Heidelberg

2.1.10.2 Sekundärantikörper

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper und Streptavidin-Konjugate

Name	Hersteller
anti-Hamster-IgG-APC	Dianova, Hamburg
anti-Hamster-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
anti-Hamster-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-Kaninchen-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Cy2	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-Maus-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Cy2	Dianova, Hamburg

Anti-Maus-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-HRP	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-APC	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-Cy2	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschweinchen-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-APC	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-Cy2	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Streptavidin-AP	Dianova, Hamburg
Streptavidin-APC	Dianova, Hamburg
Streptavidin-FITC	Dianova, Hamburg
Streptavidin-HRP	Dianova, Hamburg
Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg

2.1.11 Expressionsvektoren

Die humanen cld7-Knockdown-Konstrukte wurden in das pSUPER.gfp/neo Expressionsplasmid (Oligoengine, Seattle, USA) geklont.

Die Ratten cld7 cDNA sowie cld7mS33, cld7mS69, cld7mS87, cld7mS172, cld7mS204, cld7mS206, cld7mS207 und cld7mPalm cDNA waren in das

pcDNA3.1(+) Expressionsplasmid mit Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Darmstadt) geklont.

Die Ratten EpCAM cDNA sowie EpC^{mAG} cDNA waren in das pcDNA3.1(+) Expressionsplasmid mit Hygromycin-Resistenz (Invitrogen, Darmstadt) geklont.

2.1.12 Bakterienstämme

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps

Name	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>rel A1</i> , λ ⁻ (Invitrogen, Darmstadt)
<i>E.coli</i> oneShot [®] TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen, Darmstadt)

2.1.13 Zelllinien

Tabelle 13: Verwendete Zelllinien unter Angabe des Ursprungs

Name	Ursprung
HEK293 (HEK)	Menschliche embryonale Nierenzellen (<i>Human Embryonic Kidney</i>), American Type Culture Collection
HEK-cld7	HEK mit cld7-pcDNA3.1 (+) transfiziert, (Kuhn et al., 2007)
HEK-EpC	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) transfiziert, (Kuhn et al., 2007)
HEK-EpC-cld7	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7-pcDNA3.1 (+)

	transfiziert, (Kuhn et al., 2007)
HEK-EpC ^{mAG} -cld7	HEK mit EpCmAG-pcDNA3.1 (+) und cld7-pcDNA3.1 (+) transfiziert, (Nübel et al., 2009)
HEK-EpC-cld7 ^{mPalm}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mPalm-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS33}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS33-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS69}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS69-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS87}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS87-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS172}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS172-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS204}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS204-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS206}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS206-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HEK-EpC-cld7 ^{mS207}	HEK mit EpC-pcDNA3.1 (+) und cld7mS207-pcDNA3.1 (+) transfiziert
HT29	Humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, isoliert aus einem Primärtumor, American Type Culture Collection
HT29-cld7 ^{kd}	HT29 Zellen, bei denen die cld7-Expression stabil herunterreguliert wurde
SW948	Humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, Dukes' type C, grade III, American Type Culture Collection

SW948-cld7^{kd} SW948 Zellen, bei denen die cld7-Expression stabil herunterreguliert wurde

2.1.14 Mäuse

NOD / SCID-Mäuse Charles River, Sulzfeld, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkulturen

E.coli Bakterien wurden in LB (Luria Bertani) Medium mit Ampicillin (100 µg / ml) zur Selektion von transformierten Bakterien unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Zudem wurden *E.coli* Bakterien auf Agarplatten mit Ampicillin (60 µg / ml) bei 37°C kultiviert. Um Dauerkulturen herzustellen, wurden 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur abzentrifugiert (4.000 Upm, 5 min, RT) und das Zellpellet in LB-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerol gemischt. Anschließend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien wurde die Heat-Shock-Methode angewandt. Die bei -80°C gelagerte Bakteriensuspension (50 µl) wurde auf Eis aufgetaut und mit 20 µl PCR-Produkt oder Plasmid-DNA (50 µg) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 bis 60s und die Mischung wurde für 2 min auf Eis inkubiert. Der

Mischung wurden 300 µl LB-Medium hinzugefügt und unter Schütteln inkubiert (45 min - 1h, 37°C). Ein Teil des Transformationsansatzes (50 - 150 µl) wurde auf Agarplatten (mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien von der Platte gepickt, in LB-Medium überführt und unter Schütteln kultiviert (12 - 16h, 37°C).

2.2.1.3 Plasmid-DNA-Isolation aus Bakterienkulturen

Mithilfe von QIAGEN Kits (Miniprep oder Midiprep) wurden kleinere oder mittlere Mengen Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben gewonnen. Alternativ wurden kleinere Plasmid-DNA Mengen ohne die Verwendung eines Kits isoliert. Eine Über-Nacht-Bakterienkultur (mit dem gewünschten Plasmid) wurde bei 4000 Upm (5 min, RT) abzentrifugiert und das gewonnene Pellet in 200 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg / ml RNase A) resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 200 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugefügt, gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lyse mittels 200 µl eiskaltem Puffer P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) gestoppt, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 13.000 UpM (15 min, 4°C) wurde der Überstand mit einem Volumen von eiskaltem Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei 13.000 UpM für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend konnte das erhaltene DNA-Pellet mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in etwa 50 µl H₂O aufgenommen werden.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

In einem 20 µl Ansatz erfolgte der Restriktionsverdau. Hierfür wurden 5 - 10 Units des entsprechenden Enzyms mit 1 - 15 µg DNA sowie 2 µl Restriktionspuffer (10x) gemischt und anschließend mit dd H₂O auf 20 µl aufgefüllt. In Abhängigkeit von der DNA Menge wurde für 1 - 3 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Rezirkularisierung linearisierter Plasmid-DNA zu minimieren, wurden die 5'-Phosphatreste an den Enden der linearen Plasmid-DNA enzymatisch entfernt (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIAP) und die Reaktion wurde den Herstellerangaben entsprechend angesetzt (30 min, 37°C). Anschließend wurde das Enzym mittels Erhitzen auf 85°C für 15 min hitzeinaktiviert.

2.2.1.6 Plasmid Ligation

Die Ligation von cDNA Fragmenten in ein Plasmid erfolgte mithilfe der T4 Ligase und dem entsprechenden Ligasepuffer. Hierfür wurden 200 ng linearisierter, dephosphorylierter Plasmid-DNA eingesetzt. Das molare Verhältnis zwischen Fragment und Plasmid betrug 3 : 1. Die Inkubation erfolgte bei RT für 1 h und anschließend wurde das Enzym bei 70°C (15 min) inaktiviert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

HEK Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zur Selektion enthielt das Medium zur Kultivierung der Zellen, die mit cld7, cld7^{mS} oder cld7^{mPalm} cDNA transfiziert wurden, zusätzlich 500 ng / ml Neomycin. Dem Medium der Zellen, die mit EpC oder EpC^{mAG} cDNA transfiziert wurden, wurde 120 µg/ml Hygromycin zugesetzt, um zwischen transfizierten und nicht transfizierten zu selektionieren. Zur Selektion der HEK Doppeltransfektanten wurde dem Medium sowohl Neomycin als auch Hygromycin zugesetzt. Sobald die Zellen stabile Expressionslevel aufwiesen, wurden diese ohne Selektionsmedium kultiviert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 %, wurden sie passagiert.

HT29wt und SW948wt Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, dem FCS (10 %), 100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin zugesetzt wurde, kultiviert. Zur

Selektion von HT29-cld7^{kd} und SW948-cld7^{kd} Zellen wurde dem Medium zusätzlich 500 ng / ml Neomycin zugesetzt.

Nach erfolgreicher Selektion der Zellen wurden diese ohne Neomycin oder Hygromycin kultiviert und die Expressionslevel regelmäßig mittels Durchflusszytometrie und WB überprüft. Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Partialdruck kultiviert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 %, wurden sie mithilfe von PBS / 0,25 % (w/v) Trypsin / 5 mM EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und weiter passagiert.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zellsuspension mit Trypanblau, um tote Zellen anzufärben, im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurden vier Großquadrate gezählt und der Mittelwert aus den vier Großquadraten bestimmt. Der erhaltene Mittelwert wurde mit dem Kammerfaktor (10.000) und dem Verdünnungsfaktors multipliziert, um die Anzahl der lebenden Zellen je ml zu erhalten.

Mittelwert der Zellzahl (aus vier Großquadraten) x 10.000 x Verdünnungsfaktor =
Lebendzellzahl / ml

2.2.2.3 Kryokonservierung

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen trypsiniert, mit Medium gewaschen und abzentrifugiert (200 g, 4 min, 4°C). Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem FCS, dem 10 % DMSO zugesetzt wurde, resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Im -80°C Gefrierschrank wurden sie für 24 h eingefroren und zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um kryokonservierte Zellen wieder aufzutauen, wurden diese zunächst im Wasserbad (37°C) kurz aufgetaut und anschließend in Medium, das bereits im Wasserbad erwärmt war, gegeben. Diese Zellsuspension wurde bei 200 g , 4 min und 4°C ohne Bremsen abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

2.2.2.4 Transfektion

Die Klonierung der $cld7^{mS33-}$, $cld7^{mS69-}$, $cld7^{mS87-}$, $cld7^{mS204-}$, $cld7^{mS206-}$, $cld7^{mS207-}$, $cld7^{mPalm-}$ -pcDNA3.1 wurde von S. Kuhn und Dr. T. Johnson durchgeführt. Die Generierung des humanen $cld7$ -Knockdown-Konstrukts wurde von Dr. F. Thuma unter Verwendung des pSUPER RNAi System™ (Oligoengine, Seattle, USA) durchgeführt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden $2 - 4 \times 10^5$ Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Wenn die Zellen am nächsten Tag zu ~70 - 80% konfluent waren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 250 μ l Medium ohne FCS hinzugefügt. Für die Transfektion wurde zunächst Lipofectamin™ 2000 (2 - 4 μ l) mit Medium ohne FCS (50 μ l) verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde die Plasmid-DNA (0,5 - 1 μ g) mit Medium ohne FCS gemischt. Anschließend die verdünnte Plasmid-DNA zur Lipofectamin™ 2000 Mischung hinzugefügt und für 20 min bei RT inkubiert, so dass sich DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten. Danach wurde der DNA-Lipid-Komplex tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 - 8 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und nach 48 - 72 h wurde Selektionsmedium, d.h. Medium mit Hygromycin und / oder Neomycin, hinzugefügt. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie und WB untersucht. Für die Einzelzellklonierung wurden transfizierte Zellen in 96-well-Platten ausgesät, so dass sich in jedem well ein bis zwei Zellen befanden. Die Zellkolonien wurden nach vier bis sechs Wochen mittels Durchflusszytometrie und WB auf stabile Transfektion hin analysiert und weitere Einzelzellklonierungen angesetzt.

2.2.2.5 Kristallviolett-Färbung adhärenter Zellen

Zunächst wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Formalin fixiert (4 min, RT). Nach dem Absaugen des Formalins wurde eine 1 % Kristallviolett-Lösung hinzugefügt und für 4 min bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit ddH₂O wurden diese getrocknet und im Anschluss mit 10 % Essigsäure lysiert. Mittels eines ELISA-Mikroplattenleser (Anthos labtec, Wals, Austria) erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm.

2.2.2.6 Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidinester (CFSE) Markierung

CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der intrazellulär, kovalent an Proteine bindet. Vor der Markierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Medium ohne FCS und CFSE (Endkonzentration 45 μM) resuspendiert und im Brutschrank für 30 min inkubiert. Mit einem Volumen FCS für 15 min bei 4°C wurde ungebundener Farbstoff entfernt und die Zellen danach dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h in Medium mit FCS im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.7 Adhäsionsassay

In 96-well-Platten mit Zellmonolayern von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 oder HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden CFSE-markierte HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 oder HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen, die mit oder ohne TACE-Inhibitor (TAPI) behandelt wurden, ausgesät und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig mit PBS gewaschen und die adhärenen Zellen lysiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenz Mikroplattenleser (Fluoroskan Ascent Multiplate Reader, Erregung: 490 nm, Emission: 518 nm). Die Adhäsion wurde in Prozent der ausgesäten Zellen angegeben.

2.2.2.8 *In vitro* Wundheilungsversuch

Für den Wundheilungsversuch wurde ein Zellmonolayer (70 - 80 % Konfluenz) mit einer feinen Pipettenspitze "verletzt". Die Zellen wandern daraufhin aufeinander zu. Die Auswertung erfolgte zu Beginn des Versuchs und 24 h sowie 48 h nach der Verletzung des Monolayers mittels Lichtmikroskopie.

2.2.2.9 Transwell-Migrationsassay

In den unteren Teil einer Boyden-Kammer wurden 50 μl Medium mit 20 % FCS oder mit 1 % BSA pro well pipettiert. In die obere Kammer wurden 5×10^4 Zellen in

Medium ohne FCS / 0,1 % BSA (30 μ l / well) ausgesät. Die beiden Kammern wurden durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 μ m voneinander getrennt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h im Brutschrank konnten die migrierten Zellen an der unteren Membranseite mit eiskaltem Methanol fixiert werden. Anschließend wurde mit Kristallviolett gefärbt (s. 2.2.2.6) und die Migrationseffizienz wurde als Prozent der ausgesäten Zellen angegeben.

2.2.2.10 Videomikroskopie

Zunächst wurden 24-well-Platten mit Matrixproteinen (2 - 50 μ g / ml) in Bicarbonatpuffer (150 μ l, pH 9,6) für 16 h bei 4°C beschichtet. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen, die freien Bindungsstellen mit PBS / 2 % BSA blockiert (1 h, 37°C) und 1×10^4 Zellen ausgesät. Die Bewegungen der Zellen unter normalen Kulturbedingungen (37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) konnten an einem IX81-Inversmikroskop mit einer angeschlossenen CCD-Kamera analysiert werden. Über einen Zeitraum von 12 h wurden im Durchlicht-Modus alle 20 min zwei Bilder je well aufgenommen. Die Migration der Zellen wurde mittels der Software ImageJ mit dem *Manual Tracking Plugin* ausgewertet.

2.2.2.11 Invasionsassay

Beim Invasionsassay müssen die Zellen durch eine Schicht aus Matrigel, welche eine künstliche Basalmembran darstellt, wandern. Matrigel wurde bei 4°C aufgetaut und 1:1 mit Medium ohne FCS verdünnt. 100 μ l dieser Mischung wurde in einen Einsatz einer Transwell-Kammer vorsichtig pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2×10^4 Zellen in Medium ohne FCS resuspendiert und vorsichtig in den Transwell-Einsatz mit dem Matrigel pipettiert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen, die sich im Medium oder an der Oberfläche des Matrigels befanden, wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen, die durch das Matrigel gewandert sind (penetrierende Zellen) und diejenigen, die sich im Matrigel befanden (invadierende Zellen), wurden mit Kristallviolett gefärbt und mit dem Lichtmikroskop dokumentiert. Zudem wurden die penetrierenden Zellen,

die durch die Membran (8 μm) der Transwell-Kammer gewandert sind, mit dem Lichtmikroskop untersucht und anschließend die Anzahl der Zellen mithilfe der Software ImageJ (*Cell Counter Plugin*) gezählt.

2.2.2.12 Soft Agar Colony Formation Assay

6-well-Platten wurden mit 0,5 % Agar in Medium mit 10 % FCS beschichtet. 1×10^3 – 2×10^3 Zellen wurden in 0,25 % Agar in Medium mit 10 % FCS resuspendiert und auf die beschichteten Platten ausgesät. Nach drei Wochen konnten die Kolonien gezählt werden. Die Koloniewachstumseffizienz wurde in Prozent der ausgesäten Zellen angegeben.

2.2.2.13 Koloniewachstum zur Anreicherung von Tumorstammzellen

Um Sphäroide zu erhalten, wurden SW948 Zellen (1×10^3 / ml) in Medium ohne FCS auf 1 % Agar (Medium mit 10 % FCS)-beschichtete Platten ausgesät. Nach einer Woche wurde alle drei Tage die Hälfte des Mediums gewechselt. Das Wachstum der Sphäroide wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Nach drei Wochen wurden die Sphäroide gezählt, gepickt wieder vereinzelt und weiter passagiert.

Für das Holoklon-Wachstum wurden 50 HT29 Zellen / cm^2 in Medium mit 5 % FCS ausgesät. Nach zwei Wochen wurden die entstandenen Kolonien mit Kristallviolett gefärbt, um die Anzahl an gewachsenen Holoklonen, Meroklonen und Paraklonen zu ermitteln. Zudem wurden Holoklone für die Weiterkultivierung gepickt, wieder vereinzelt und wie oben beschrieben erneut ausgesät.

2.2.2.14 Durchflusszytometrie

Um Oberflächenantigene zu markieren, wurden $3 - 5 \times 10^5$ Zellen in Rundboden-96-well-Platen ausgesät und mit PBS / 1 % BSA gewaschen (200 μl , 4 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit unmarkierten Primärantikörpern in PBS / 1 % BSA (1 – 5 μg / ml) für 30 min bei 4°C inkubiert und zweimal mit PBS / 1 % BSA

gewaschen. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern (0,3 – 0,5 µg / ml) im Dunkeln für 30 min und bei 4°C inkubiert, erneut zweimal gewaschen und in 150 µl PBS / 1 % BSA resuspendiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer *FACS Calibur (Fluorescence Activated Cell Sorter)*.

Für die intrazelluläre Markierung wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS / 1 % BSA mit PBS / 1 % Formaledehyd für 30 min bei 4°C fixiert. Nach dem Fixieren wurde erneut gewaschen und mit PBS / 0,5 % Tween-20 permeabilisiert (30 min 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und es folgten die Antikörperinkubationen wie oben beschrieben.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem *FACS Calibur* und der Software *Cell Quest Pro*.

2.2.2.15 Immunfluoreszenzmikroskopie

Auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Nach etwa 48 h wurden die Zellen mit PBS / 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend mit PBS / 0,1 % Triton-X-100 für 4 min bei 4°C permeabilisiert. Mit PBS / 0,2 % Fischgelatine / 0,5 % BSA wurden die Proben geblockt (1 h bei RT) und mit Primärantikörpern (1-5 µg / ml) für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit PBS / 0,2 % Gelatine / 0,5 % BSA gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nochmals dreimal mit PBS / 0,2 % Gelatine / 0,5 % BSA gewaschen und im Anschluss in Elvanol auf Objektträgern eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit einem Carl Zeiss Konfokalmikroskop LSM70 und der Software *Axioview Rel. 4.6*.

2.2.2.16 Aufkonzentrierung von Medium

Konfluente Zellen wurden 24 bis 48 h in Medium ohne FCS kultiviert, um nach Aufkonzentrierung eine Analyse mittels WB, ELISA oder Zymographie zu ermöglichen. Zellkulturüberstände wurden 10 min bei 200 g, 20 min bei 2.000 g, 20 min bei 5.000 g und 30 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert, um die Überstände

von Zellen und Zelldebris zu befreien. Anschließend wurden die Überstände für 90 min bei 100.000 g und 4°C in einem SW41Ti-Rotor mit einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) zentrifugiert, um die Überstände von Vesikeln zu befreien. Die vesikelfreien Überstände wurden mittels *Vivaspin Centrifugal Concentrators* (Vivascience) mit einem cut-off von 10 kDa MW aufkonzentriert und die Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben auf 100 µg / ml angepasst. Für eine anschließende Analyse mittels SDS-PAGE und WB wurden die aufkonzentrierten Überstände mit 5x Laemmli-Puffer gemischt. Alternativ wurden die aufkonzentrierten Überstände mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert.

2.2.2.17 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Für den Nachweis von extrazellulärem EpCAM in Zellkulturüberständen wurde ein direkter ELISA durchgeführt. Die aufkonzentrierten Zellkulturüberstände (100 µg / ml je Probe) wurden mit Bicarbonatpuffer (pH 9,6) gemischt, in ELISA-Platten (96-wells) überführt und für 16h bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und Medium hinzugefügt, um freie Bindungsstellen zu blockieren (1h, 37°C). Anschließend wurde mit PBS gewaschen und der Antikörper gegen EpCAM (D5.7) hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS / 1 % BSA wurden die Proben mit dem Alkalische-Phosphatase-markierten Sekundärantikörper (0,2 µg / ml) in PBS / 1% BSA inkubiert (1 h, 37°C). Anschließend wurde dreimal gewaschen, 50 µl Substratlösung je well hinzugefügt und im Dunkeln bei 37°C bis zu einem Farbumschlag nach gelb inkubiert. P-Nitrophenylphosphat-Tabletten wurden in 5 ml Diethanolpuffer (pH 9,8) gelöst und dienten als Substrat. Die Messung des Substratumsatzes erfolgte photometrisch bei einer Absorption von 405 nm.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die abgelösten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (200 g, 4 min, 4°C). Anschließend wurde das Zellpellet in 500 bis 1000 µl Lysepuffer (HEPES-Puffer, 1 % Triton-X-100 oder 1 % Lubrol, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) resuspendiert und für 1 h bei 4°C lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 13.000 Upm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Proben wurden dabei die ganze Zeit auf Eis gehalten und im Anschluss bei -20°C gelagert.

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) ermittelt. In 99 µl der Bradford-Reagenz wurde 1 µl des Lysats pipettiert und die Absorption bei 595 nm (ELISA Mikroplattenleser Anthos labtec, Wals, Austria) gemessen. Die Proteinmenge wurde mithilfe einer BSA-Standardkurve definierter Konzentrationen von BSA-Verdünnungen (0 - 7,5 µg / µl) berechnet.

2.2.3.2 Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst wurden für die Herstellung eines diskontinuierlichen Dichtegradienten verschiedene Sucroslösungen in HEPES-Puffer (80 %, 30 %, 5%) angesetzt. 800 µl des Zellysats wurde mit 80 %iger Sucroslösung 1:1 gemischt und in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Diese Schicht (1,6 ml Lysat in 40 %iger Sucrose) wurde mit 1,6 ml einer 30 %igen Sucroslösung und 800 µl einer 5 %igen Sucroslösung sehr vorsichtig überschichtet. Die Proben wurden in einem Schwingrotor (SW60) in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 g für mindestens 15 h bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in zwölf Fraktionen (320 µl / Fraktion) pipettiert und teilweise gepoolt. Die Fraktionen wurden sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Zudem wurden sie für Immunpräzipitationen verwendet. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und WB.

2.2.3.3 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen (IP) wurden die Zellen unter milden Bedingungen lysiert (HEPES-Puffer, 1 % Lubrol). Die Zelllysate wurden mit Primärantikörpern (0,5 - 2 µg / ml) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde den Proben 5 % Protein-G-Sepharose hinzugefügt und für 1 - 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit kaltem Lysepuffer gewaschen (6000 rpm, 2 min, 4°C) und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach dem Aufkochen für 5 - 10 min bei 95°C wurden die Proben in einer SDS-PAGE / WB verwendet.

2.2.3.4 Palmitoylierungsassay

Die Palmitoylierung von cld7 wurde mithilfe der IP-ABE Methode untersucht (Brigidi and Bamji, 2013). Die Zellen wurden mit N-Ethylmaleimid (NEM)-Lysepuffer (HEPES-Puffer, 50 mM NEM, 1 % Triton-X-100) lysiert, um die unmodifizierten Cystein-Thiolgruppen irreversibel zu blockieren. Nach einer IP mit anti-cld7 wurden die an die Protein-G-Sepharose gekoppelten Präzipitate mit Hydroxylamin (HAM)-Puffer (Lysepuffer, pH 7,2, 1 M HAM) für 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem HAM-Puffer erfolgte, um die palmitoylierten Cystein-Thiolgruppen spezifisch zu spalten und aufzudecken. Zur selektiven Markierung der palmitoylierten Cysteine wurden die Proben mit einem Thiol-reaktiven Biotinylierungsreagenz (Biotin-BMCC, Lysepuffer, pH 6,2, 1 µM Biotin-BMCC) für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden im Lysepuffer (pH 7,5) eluiert. Nach einer SDS-PAGE wurden die Proben mittels WB mit Streptavidin-HRP und nach dem Strippen mit anti-cld7 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

2.2.3.5 *In vitro* Kinase Assay

Zunächst wurde eine IP mit anti-cld7 durchgeführt und dabei alle Puffer phosphatfrei gehalten. Nach dreimaligem Waschen der Protein-G-Sepharose mit Lysepuffer wurde diese mit Lysepuffer ohne Detergenz sowie einmal mit Kinase-Assay-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde mit 20 µl Kinase-Assay-Puffer mit 10 µCi [³²P]γ-

ATP gemischt und inkubiert (15 min, 37°C). Durch die Zugabe von Laemmli-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C gekocht und in einer SDS-PAGE verwendet. Das Gel wurde in Plastikfolie eingeschweißt und mittels Autoradiographie ausgewertet.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mittels der Laemmli-SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) oder der Tricine-SDS-PAGE wurden die Proteingemische nach dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine aufgetrennt. In einem großporigen Sammelgel erfolgte die Fokussierung der Proteine und in einem 8 - 16 %igen Trenngel die Auftrennung.

Laemmli-SDS-PAGE:

Trenngel: 375 mM Tris (pH 8,8), 8 – 12 % Bis-Acrylamid (30 %), 0,1 % SDS, 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % (v/v) TEMED

Sammelgel: 375 mM Tris (pH 6,8), 4 % Bis-Acrylamid 30 %, 0,1 % SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % TEMED (v/v)

In die Gelapparatur wurde das Trenngel gegossen und mit ddH₂O beschichtet, welches nach der Polymerisation abgesaugt wurde. Anschließend wurde das Sammelgel über das polymerisierte Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt und die Gelapparatur in die Elektrophoresenkammer eingesetzt und mit Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 5 min aufgekocht, abzentrifugiert (2000 rpm, 2 min) und neben einem Protein-größenmarker in das Gel geladen. Zu Beginn der Elektrophorese lag die Spannung bei 60 V, die nach Erreichen des Trenngels auf 100 - 120 V erhöht wurde.

Tricin-SDS-PAGE:

Trenngel (16 %): 10 ml Bis-Acrylamid (49,5 %), 10 ml Gelpuffer (3x), 3 g Glycerol, 100 µl APS (10%), 10 µl TEMED, ad 30 ml ddH₂O

Sammelgel (4 %): 1 ml Bis-Acrylamid (49,5 %), 3 ml Gelpuffer (3x), 90 µl APS (10 %), 9 µl TEMED, ad 12 ml ddH₂O

Aufgrund des geringen Molekulargewichts von EpIC (5 kDa) wurde für dessen Detektion eine Tricine-SDS-PAGE durchgeführt. Die Tricine-SDS-PAGE ist das bevorzugte elektrophoretische System für die Auftrennung von Proteinen, die kleiner als 30 kDa sind (Schägger, 2006). Die Proben wurden mit Tricine-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde ähnlich wie bei der Laemmli-SDS-PAGE durchgeführt, jedoch wurden Anoden- und Kathodenpuffer (1x) anstatt des Laufpuffers verwendet und die Spannung betrug zu Beginn 30 V und wurde danach auf 100 V erhöht.

2.2.3.7 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Gel, die Nitrozellulosemembran und Filterpapier (3MM Whatman) wurden für 10 min im Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurde der Blot aus einer Doppellage Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Gel, einer weiteren Doppellage Filterpapier aufgebaut und mit zwei angefeuchteten Schwämmen umgeben und im Gelhalter fixiert. Dieser wurde in die Transferkammer eingesetzt, so dass die Nitrozellulosemembran hin zur Anode orientiert war. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 60V (2 h, 4°C) oder von 30V für 16 h bei 4°C. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5 % Magermilch in PBST (PBS / 0,1 % Tween-20) oder 5 % BSA in PBST für 30 min bei RT geblockt und anschließend dreimal mit PBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit Primärantikörpern (1 - 5 µg / ml) oder Hybridomüberständen für 1 h bei RT. Anschließend wurde dreimal (je 5 min) mit PBST gewaschen mit *Horse Radish Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern in PBST für 1h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für je 5 min mit PBST gewaschen und mit Substrat für 1 min bei RT inkubiert. Als Substrat dienten *ECL Western Blotting Detection Reagents*. Beim Substratumsatz wird Chemilumineszenz freigesetzt, wodurch die Antikörper-markierten Proteine detektiert werden können. Hierfür wurden *Hyperfilm ECL*-Filme verwendet. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mithilfe der Software ImageJ.

2.2.3.8 Zymographie

Mithilfe der Zymographie kann die Aktivität der Gelatinasen, MMP2 und MMP9, untersucht werden. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Zellkulturüberstände, wie in Kap. 2.2.2.16 beschrieben, aufkonzentriert. Die Gele für die Zymographie sind SDS-Polyacrylamidgele, die Gelatine als Substrat enthalten. Aufgrund des Abbaus der Gelatine im Gel, welcher mittels einer Färbung mit Coomassieblau sichtbar wird, kann die Enzymaktivität ermittelt werden. Zur Herstellung der Gelatine-Lösung wurden 0,1 g Gelatine in 40 ml ddH₂O (2,85 mg / ml) gelöst und erwärmt bis sich die Gelatine vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen der Gelatine-Lösung, wurde ein 10 %iges Trenngel gegossen, bei welchem anstatt Wasser die Gelatine-Lösung hinzugefügt wurde. Nach der Polymerisation wurde wie bei einer normalen SDS-PAGE (s. Kap. 2.2.3.6) das Sammelgel gegossen. Die Proben (10 µg) wurden, ohne diese zu kochen, in das Sammelgel geladen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel dreimal für 30 min mit einer 2,5 % Triton-X-100-Lösung gewaschen, um das SDS zu entfernen. Danach wurde das Gel für 48 bis 72 h im Inkubationspuffer bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit Coomassieblau gefärbt.

2.2.3.9 Coomassieblau-Färbung

Nach der Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE konnten die Gele mittels Coomassieblau gefärbt werden. Hierfür wurden die Proteingele mit einer Coomassieblau-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit ddH₂O gewaschen und mit einer Entfärber-Lösung, die mehrmals gewechselt wurde, das Gel entfärbt. Die gefärbten Proteingele wurden in Plastikfolie eingeschweißt und eingescannt.

2.2.3.10 Funktionelle Proteinanalyse

Nach einer Immunpräzipitation von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten (Lubrol-Lysepuffer) mit anti-cld7 wurden die Proben in ein Tricin-SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit

Coomassieblau gefärbt. Der untere Abschnitt (kleiner als 55 kDa) des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels wurde analysiert. Die massenspektrometrische Analyse sowie die ersten bioinformatischen Auswertungen wurden in der Arbeitsgruppe Funktionelle Proteomanalyse (Dr. M. Schnölzer) am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Die massenspektrometrischen Daten wurden mit *Mascot* (Matrix Science, England) ausgewertet.

2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.

2.2.4.1 Haltung

Die NOD / SCID (**N**on-**O**bese **D**iabetic, **S**evere **C**ombined **I**mmunodeficiency) Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg gehalten und mit sterilem Futter *ad libitum* gefüttert. Für die Tierexperimente wurden acht bis zehn Wochen alte Mäuse eingesetzt.

2.2.4.2 Injektion von Tumorzellen

Einen Tag vor der Injektion von Tumorzellen wurde den Mäusen zur Depletion natürlicher Killerzellen anti-Asialo-GM1 (Wako, USA) den Herstellerangaben entsprechend gespritzt. Zur Untersuchung des Tumorwachstums und der Metastasierungsfähigkeit wurden 1×10^6 Tumorzellen entweder subkutan (s.c.) in die Flanke der Tiere oder intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der Mäuse injiziert.

2.2.4.3 Präparation von Organen

Die Mäuse wurden wöchentlich auf lokales Tumorwachstum und Gewichtsverlust untersucht. Die Tiere wurden getötet, wenn der lokale Tumor einen Durchmesser von 1,5 cm erreichte oder die Mäuse anfangen, Gewicht zu verlieren, spätestens jedoch nach 210 Tagen. Die Tiere wurden getötet, indem sie mit CO₂ betäubt und anschließend das Herz punktiert wurde, oder durch zervikale Dislokation. Drainierende Lymphknoten, Milz, Femur und Tibia, periphere Blut-Leukozyten, peritoneale Exsudatzellen, Leber und Lunge wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Um Knochenmarkszellen zu gewinnen, wurde das Knochenmark mit PBS mithilfe einer 27G-Kanüle aus Femur und Tibia gespült. Peritoneale Exsudatzellen wurden durch Spülen der Bauchhöhle mit PBS und periphere Blut-Leukozyten (PBL) mittels Herzpunktion gewonnen. Das Blut der Mäuse wurde 1:5 mit PBS verdünnt, mit 3 ml Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, München) unterschichtet und 20 min bei RT (200 g, ohne Bremse) zentrifugiert. Anschließend konnte über dem Ficoll eine Schicht mit den PBL abgenommen werden. Um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurden die Organe bzw. das Knochenmark in PBS auf einer sterilen Gaze zerrieben, gewaschen (200 g, 4 min, 4°C) und in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Einzelzellsuspensionen wurden in Kultur genommen sowie mittels Durchflusszytometrie und WB analysiert.

2.2.5 Statistik

Bei den *in vitro* Experimenten wurden signifikante Unterschiede mit dem Student's t-Test ausgewertet und bei P-Werten < 0,05 signifikante Unterschiede angenommen. Die Versuche wurden mit Triplikaten durchgeführt und stellen mindestens drei unabhängige Wiederholungen dar.

Bei den *in vivo* Experimenten wurden signifikante Unterschiede mit dem Wilcoxon-Rangsummentest evaluiert und bei dem kleinstmöglichen P-Wert von 0,1 ein signifikanter Unterschied angenommen.

3 Ergebnisse

Für die Aufrechterhaltung von funktionellen Barrieren innerhalb von Epithelien sind TJs unabdingbar. Die wichtigsten Komponenten von TJs sind die Claudine. Wider Erwarten werden Claudine, insbesondere cld7, nicht nur apikal in TJs, sondern auch außerhalb von TJs (basolateral) beobachtet. Die Frage welche Funktionen Claudine außerhalb von TJs erfüllen und unter welchen Bedingungen Claudine außerhalb von TJs lokalisiert sind, ist weitgehend ungeklärt. In meiner Dissertation habe ich versucht, einen Teil dieser Fragen für cld7 zu beantworten.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Malignomen cld7 und EpCAM assoziiert sein können und dieser Komplex in glycolipidreichen Membranmikrodomänen (GEM) beobachtet wird (Ladwein et al., 2005) Diese sind zur Induktion von Signaltransduktionen prädestiniert (Stepanek et al., 2014). Es wird auch diskutiert, dass die Phosphorylierung von cld7 die Funktionen des Moleküls beeinflusst (Ladwein et al., 2005) und die Palmitoylierung von cld7 die Lokalisation determinieren könnte (Van Itallie, 2005). Ich habe daher zu Beginn meiner Arbeit stabile Transfektanten von HEK Zellen etabliert, die mit EpCAM und cld7 mit mutierter Phosphorylierungsstelle oder mutierter Palmitoylierungsstelle transfiziert wurden.

3.1 Einfluss der Claudin-7-Palmitoylierung auf die Lokalisation in der Membran sowie die Assoziation mit EpCAM

Die Untersuchungen wurden mit stabil transfizierten HEK Zellen durchgeführt, die kaum cld7 und kein EpCAM exprimieren. Zur Transfektion wurde die cDNS von Ratten cld7 und EpCAM verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mithilfe von WB und Durchflusszytometrie ermittelt und lag zwischen 90% und 98%. Von den zehn Phosphorylierungsstellen wurden folgende Serin (S)-Phosphorylierungsstellen mutiert S33, S69, S87, S172, S204, S206, S207 (Tab. 14A). Für die Zerstörung der Phosphorylierungsstellen wurde Serin gegen Alanin ausgetauscht. Von den beiden

Palmitoylierungsstellen wurde Cystein 184 und Cystein 186 jeweils gegen Serin ausgetauscht (Tab. 14A). Um den potentiellen Einfluss von cld7 auf EpCAM zu untersuchen, wurde die Bindungsstelle Alanin 279 und Glycin 283 (EpC^{mAG}) jeweils durch Isoleucin ersetzt und HEK-cld7 Zellen mit wt EpCAM bzw. mutiertem EpCAM kotransfiziert (Tab. 14B). Dies verhindert eine Bindung von EpCAM an cld7 (Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005).

Tabelle 14: Aminosäuresequenzen von cld7 und EpCAM und deren Mutationsstellen

A

Aminosäuresequenz von cld7		
MANSGLQLLG	FSMAMLGWVG	LIASTAIPQW QMSSYAGDNI ITAQAMYKGL WMIECVTQSTG MMSCCKMYDSV LALPAATQAT RALMIVSLVL
		GFLAMFVATM GMKCTRCGGD DKVKKARIAM TGGIIFIVAG LAALVACSWI GHQIVTDFYN PLTPMNIKYE FGPAIFIGWA GSALVLLGGA
		LLSCSCPGSE SKAAYRAPRS YPKSNSKEY V

B

Aminosäuresequenz von EpCAM		
MAPPKALAFG	LLLAVVTATL	AAAQKDCVCN NYKLTSRCYE NENGEQCTS YGTQNTVICS KLASKCLVMK AEMTHSKSGR RMKPEGAIQN
NDGLYDPECD	EQGLFKAKQC	NGTATCWCVN TAGVRRTDKD TEITCSEVR TYWIIELKH KERAQYNFE SLHTALQDTF ASRYMLNPKF
IKSIMYENNV	ITIDLQNSS	QKTQDDVDIA DVAYYFEKDV KGESLFHSSK SMDLRVNGEL LDLDPGQTLI YYVDEKAPEF SMQGLTAGII
		AVIVVVVLAV IAGIVVLVIS TRKRSAYEK AEIKEMGEIH RELNA

Zunächst wurde der Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf die Lokalisation von cld7 in den GEM und dessen Assoziation mit EpCAM untersucht. Die Expressionslevel von wt und punktmutiertem cld7 der kotransfizierten HEK-EpC Zellen waren vergleichbar (Abb. 11A). Um zu untersuchen, ob die mutierten Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Assoziation mit EpCAM haben, wurden die Zellen zunächst unter milden Bedingungen lysiert, um Proteinkomplexe nicht zu zerstören. Die Immunkomplexe wurden mit Antikörpern gegen EpCAM oder cld7 präzipitiert und nach einer SDS-PAGE mittels WB mit anti-EpC und anti-cld7 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. Dies zeigte, dass EpCAM und cld7 direkt assoziieren und der Austausch der cld7 S-Phosphorylierungsstellen mit Alanin (cld7^{mS}) die Assoziation von EpCAM mit cld7 nicht beeinflusste (Abb. 11B).

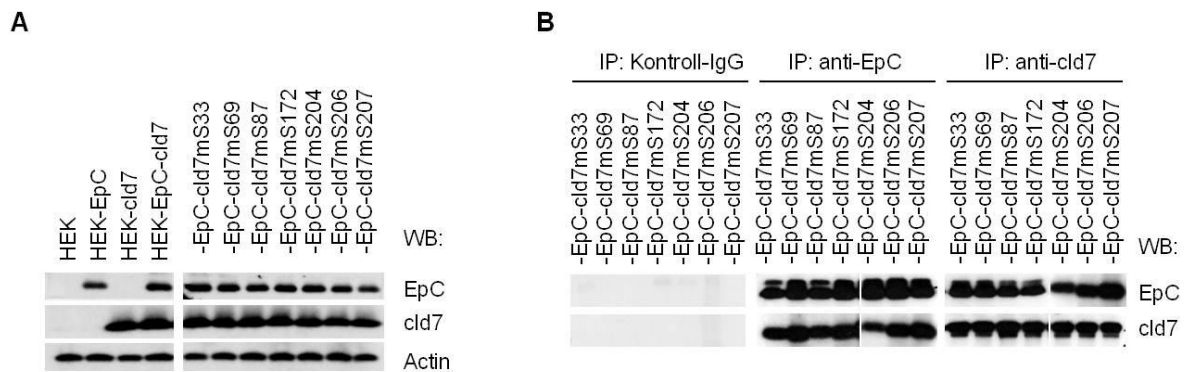


Abb. 11: Punktmutierte Serin-Phosphorylierungsstellen von cld7 und deren Einfluss auf die Assoziation mit EpCAM

A. HEK, HEK-EpC, HEK-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mS} an den genannten Positionen wurden mit Triton-X-100-Lysepuffer lysiert und in einem 12% Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit anti-EpC, anti-cld7 und anti-Actin als Ladekontrolle sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. B. Zellen wie oben wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert, immunpräzipitiert mit Kontroll-IgG, anti-EpC oder anti-cld7 und anschließend einer SDS-PAGE mit WB unterzogen. Mit Antikörpern gegen EpC und cld7 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern wurde detektiert.

Um die Lokalisation von EpCAM und cld7 in der Membran zu untersuchen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zellen wurden hierfür unter milden Bedingungen lysiert, um auch Proteinkomplexe, denen keine direkte Assoziation zugrunde liegt, nicht zu zerstören. GEM flotieren bei geringer Dichte (1,117-1,130 M), was den Fraktionen 2 bis 4 entspricht. Die GEM Lokalisation wurde mittels des Tetraspanins CD81 kontrolliert, da Tetraspanine als klassische GEM-Marker bekannt sind (Hogue et al., 2011). Ein WB von Fraktionen nach einer Dichtegradientenzentrifugation zeigte eine Anreicherung von cld7 sowohl in den GEM als auch in den schweren Fraktionen. EpCAM reichte sich ohne cld7 vorwiegend in den schweren Fraktionen an. Eine Koexpression von cld7 führte jedoch dazu, dass auch EpCAM in die leichten Fraktionen rekrutiert wurde (Abb. 12A). Die Anreicherung von EpCAM in den GEM-Fraktionen schwankte zwischen 55% und 72% und bei cld7 zwischen 57% und 73%. Folglich beeinflussten die singulären Mutationen der S-Phosphorylierungsstellen weder die Lokalisation von cld7 in den GEM noch die Anreicherung von EpCAM. Immunpräzipitationen bestätigten, dass anti-EpC cld7 präzipitiert und vice versa (Abb. 12B). Unabhängig von den cld7 Punktmutationen wurden ~60% bis 70% des EpCAM-cld7-Komplexes in GEM rekrutiert. Dies wurde für cld7^{mS33}, cld7^{mS69}, cld7^{mS87} und cld7^{mS204} Mutanten

gezeigt (Abb. 12A). Entsprechende Befunde wurden für $\text{cld7}^{\text{mS172}}$, $\text{cld7}^{\text{mS206}}$ und $\text{cld7}^{\text{mS207}}$ erhoben (Daten nicht gezeigt).

Cld7 ist somit bevorzugt in GEM lokalisiert und rekrutiert EpCAM in GEM. Mutationen von einzelnen Phosphorylierungsstellen von cld7 beeinflussten weder die EpCAM-cld7-Assoziation noch die Verteilung von cld7 in der Membran oder den EpCAM-cld7-Komplex in erheblichem Maße.

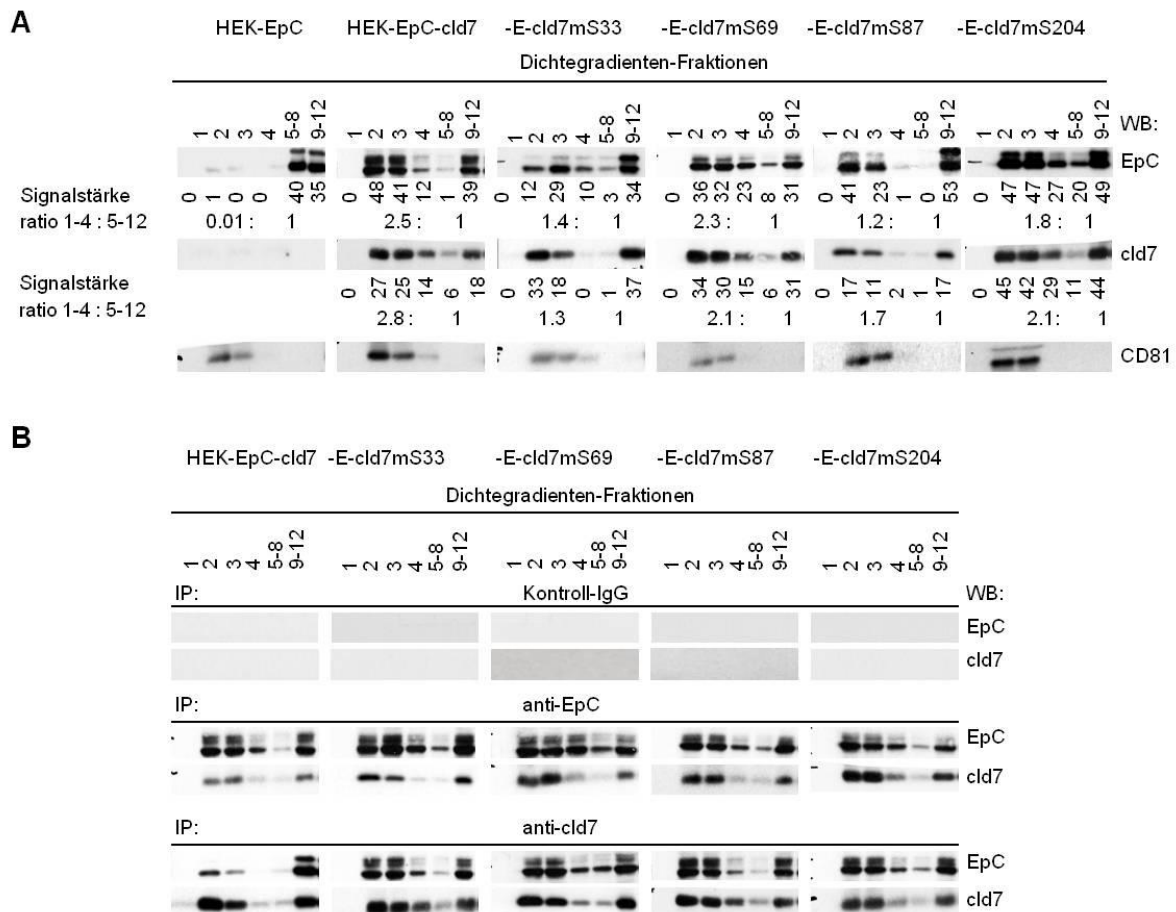


Abb. 12: Der Einfluss punktmutierter S-Phosphorylierungsstellen von cld7 auf die Lokalisation in Membranmikrodomänen

A. HEK-EpC, HEK-cld7 und HEK-EpC-cld7^{ms} an den genannten Positionen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert und anschließend mittels einer Dichtegradientenzentrifugation (40%, 30%, 5% Sucrose; 15h, 100.000g) separiert. Zwölf Fraktionen wurden gesammelt und die schweren Fraktionen 9 bis 12 sowie die mittelschweren Fraktionen 5 bis 8 gepoolt und anschließend in einem 12% Gel aufgetrennt und mittels WB mit Antikörpern gegen EpC, cld7 und CD81 sowie HRP-markierten Sekundäntikörpern detektiert. Die relative Intensität der Proteinbanden in den leichten und schweren Fraktionen sowie das Verhältnis der leichten zu den schweren Fraktionen sind angegeben.

B. Immunpräzipitate mit Kontroll-IgG, anti-EpC und anti-cld7 von Proben wie in A wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB mit anti-EpC und anti-cld7 sowie HRP-markierten Sekundäntikörpern detektiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mittels ImageJ.

Daher fokussierte ich meine Untersuchungen auf die Palmitoylierung von cld7. Die Palmitoylierung ist eine Modifikation, die dabei hilft, Proteine in den GEM zu verankern (Diaz-Rohrer et al., 2014; Stepanek et al., 2014). HEK-EpC Zellen wurden mit cld7 transfiziert, das an der Palmitoylierungsstelle am C-terminalen Ende mutiert war (HEK-EpC-cld7^{mPalm}). Um zusätzlich zu kontrollieren, ob nur cld7-assoziiertes EpC in die GEM rekrutiert wird, wurden HEK-cld7 Zellen mit EpC transfiziert, das an den Aminosäuren Alanin 279 und Glycin 283 mutiert war (HEK-EpC^{mAG}-cld7), was eine Assoziation von EpC mit cld7 verhindert (Kuhn et al., 2007). WB und Durchflusszytometrie bestätigten vergleichbare Expressionen von EpC, EpC^{mAG} und cld7, cld7^{mPalm} der transfizierten HEK Zellen (Abb. 13).

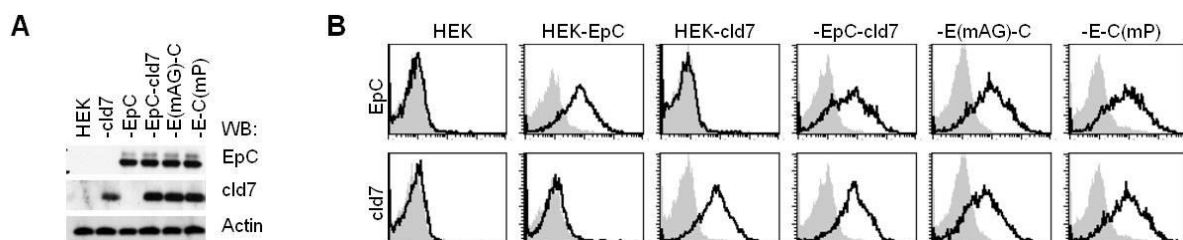


Abb. 13: Expressionslevel von EpCAM und cld7 in transfizierten und nicht transfizierten HEK Zellen

A. Zellen wurden mit Triton-X-100-Lysepuffer lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB mit anti-EpC, anti-cld7 und anti-Actin als Ladekontrolle sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. B. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von EpCAM und cld7; Zellen wurden hierfür mit anti-EpC und anti-cld7 sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Überlagerung der Negativkontrolle (graue Fläche) und der Antikörperfärbung (schwarze Linie) sowie exemplarische Färbungen sind gezeigt.

Die Effektivität der Hemmung der Palmitoylierung von cld7 durch den Austausch von Cystein 184 und 186 wurde mittels Immunpräzipitation und Acyl-Biotin-Austausch bei HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten mit und ohne einer Behandlung mit einem Palmitoylierungsinhibitor, 2-Bromopalmitat (2-BP) (Zheng et al., 2013) kontrolliert. Mit 2-BP-behandelte Zellen zeigten kein Palmitoylierungssignal, wohingegen bei den HEK-EpC-cld7 Zellen ohne Behandlung ein starkes Signal zu erkennen war. Das Strippen der Nitrocellulosemembran und eine anschließende Detektion mit einem Antikörper gegen cld7 bestätigte vergleichbare Lademengen. Damit konnte gezeigt werden, dass das Mutieren von Cystein 184 und Cystein 186 genügte, um eine Palmitoylierung von cld7 zu verhindern und dass die C-terminale Palmitoylierungsstelle größtenteils für die Palmitoylierung verantwortlich ist (Abb. 14A). Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der mutierten Palmitoylierungsstelle auf

die Rekrutierung von cld7 und EpCAM in die GEM sowie die Assoziation mit EpCAM untersucht und mithilfe des Palmitoylierungsinhibitors kontrolliert. Bei unbehandelten HEK-EpC-cld7 Zellen war sowohl EpCAM als auch cld7 in den GEM angereichert. Wohingegen die Verteilung von cld7 und EpCAM in der Membran bei den 2-BP-behandelten HEK-EpC-cld7 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich verändert war. Die Behandlung führte zu einer Verschiebung von cld7 und EpCAM in die schweren Fraktionen (>90%). Bei den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurde weder cld7 noch EpCAM in die GEM rekrutiert und eine 2-BP-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von cld7 und EpCAM in der Membran (Abb. 14B). Dies weist darauf hin, dass ein beträchtlicher Teil von cld7 palmitoyliert ist und dass die Palmitoylierung für die Rekrutierung von cld7 und EpCAM in die GEM verantwortlich ist. Zudem unterstützen diese Ergebnisse die Interpretation, dass cld7 EpCAM in die GEM rekrutiert. Weitere Untersuchungen wurden mit HEK-EpC-cld7^{mPalm} und HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen durchgeführt, bei welchen gezielt die Palmitoylierung von cld7 sowie die cld7-EpCAM-Assoziation verändert ist.

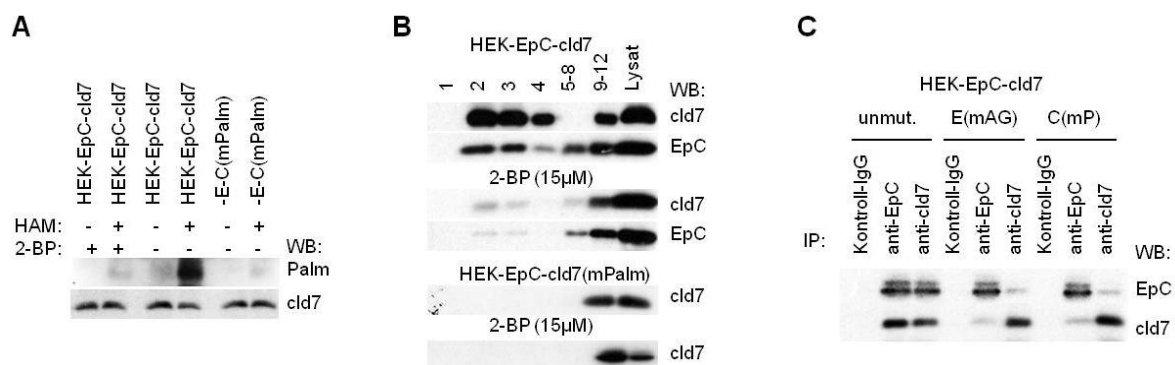


Abb. 14: Claudin-7 Palmitoylierung: Einfluss auf die Lokalisation in der Membran und Assoziation mit EpCAM

A. 2-BP-behandelte HEK-EpC-cld7, unbehandelte HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit N-Ethylmaleimid-Lysepuffer lysiert, um die unmodifizierten Cystein-Thiolgruppen irreversibel zu blockieren. Nach einer IP mit anti-cld7 wurden die an die Protein-G-Sepharose gekoppelten Präzipitate mit Hydroxylamin (HAM)-Puffer inkubiert, um die palmitoylierten Cystein-Thiolgruppen spezifisch zu spalten und aufzudecken. Anschließend wurden die Proben zur selektiven Markierung der palmitoylierten Cysteine mit einem Thiolreaktiven Biotinylierungsreagenz (Biotin-BMCC) inkubiert. Nach einer SDS-PAGE wurden die Proben mittels WB mit Streptavidin-HRP und nach dem Strippen mit anti-cld7 und HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. B. Lysate (Lubrol-Lysepuffer) von unbehandelten und 2-Bromopalmitat (2-BP, 15 µM)-behandelten HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, schwere (9-12) und mittelschwere (5-8) Fraktionen gepoolt, in einem 12% Gel aufgetrennt und im WB mit anti-cld7 und anti-EpC sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. D. Immunpräzipitation von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-

cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten mit Lubrol-Lysepuffer mit Kontroll-IgG, anti-EpC und anti-cld7 und anschließend WB mit anti-EpC und anti-cld7.

Die Ko-Immunpräzipitation von EpCAM und cld7 war sowohl bei HEK-EpC^{mAG}-cld7 als auch bei HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen im Vergleich zu wt Transfektanten stark reduziert (Abb. 14C). Darüber hinaus war EpCAM bei HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen nur in den schweren Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation vorhanden, aber cld7 konnte im Gegensatz zu den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen in den GEM detektiert werden. Die Anreicherung des in den GEM lokalisierten Tetraspanins CD81 war unabhängig von der cld7-Palmitoylierung (Abb. 15A). Eine Immunpräzipitation mit anti-cld7 der Dichtegradientenfraktionen des HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysats zeigte, dass cld7 in den schweren Fraktionen nur schwach mit EpCAM assoziierte. Beim HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zelllysate ko-immunpräzipitierte anti-EpC in den schweren Fraktionen schwach cld7. Erwartungsgemäß wurde cld7 in den leichten Fraktionen von anti-cld7 Präzipitaten angereichert (Abb. 15B).

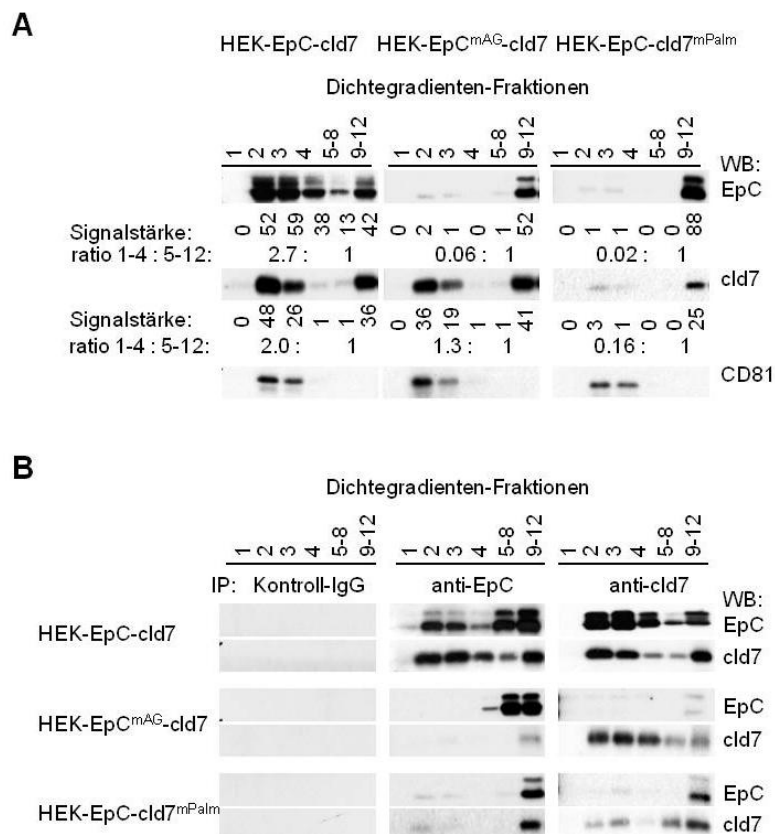


Abb. 15: Lokalisation von EpCAM, Claudin-7 und CD81 in der Membran von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen

A, B. HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert. A. Lysate wurden mit einer Dichtegradientenzentrifugation (40%, 30%, 5% Sucrose; 15h, 100.000g) aufgeteilt. Die

schweren (9 bis 12) und mittelschweren Fraktionen (5 bis 8) wurden gepoolt und anschließend in einem 12% Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den angegebenen Antikörpern sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. Die relative Intensität der Proteinbanden in den leichten und schweren Fraktionen sowie das Verhältnis der leichten zu den schweren Fraktionen sind angegeben. B. Immunpräzipitation mit Kontroll-IgG, anti-EpC und anti-cld7 der Proben wie in A wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB mit anti-EpC und anti-cld7 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mittels ImageJ.

Außerdem beeinflussten cld7^{mPalm} und EpC^{mAG} stark den Phosphorylierungsstatus von assoziierenden Molekülen. Zunächst zeigte eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassieblau-Färbung, dass die Proteinbanden der Lysate von HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} sich nicht vom HEK-EpC-cld7 Zelllysat unterschieden. Wohingegen bei anti-cld7 Präzipitaten die assoziierenden Moleküle von HEK-EpC^{mAG}-cld7 und noch ausgeprägter von HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten deutlich reduziert waren. Dies weist darauf hin, dass zum Teil gleiche Moleküle sowohl mit EpCAM als auch cld7 assoziieren (Abb. 16A). Im nächsten Schritt wurde ein Kinase Assay mit anti-cld7 Präzipitaten von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 sowie HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten durchgeführt. Bei diesem werden Immunpräzipitate mit [³²P]γ-ATP versetzt, um phosphorylierte Proteine zu markieren. Bei den HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten wurden im Vergleich zu wt Transfektanten deutlich weniger phosphorylierte Moleküle mit cld7 ko-immunpräzipitiert. Dieses Ergebnis konnte in einem Kinase Assay mit Lysaten von Membranfraktionen bestätigt werden. Zudem fanden sich phosphorylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von ~15 kDa und ~11 kDa, die im Gesamtlysat stark ko-immunpräzipitierten, nur schwach in der Immunpräzipitation der Membranfraktion. Dies könnte auf lose anhängende, zytosolische Proteine hinweisen (Abb. 16B).

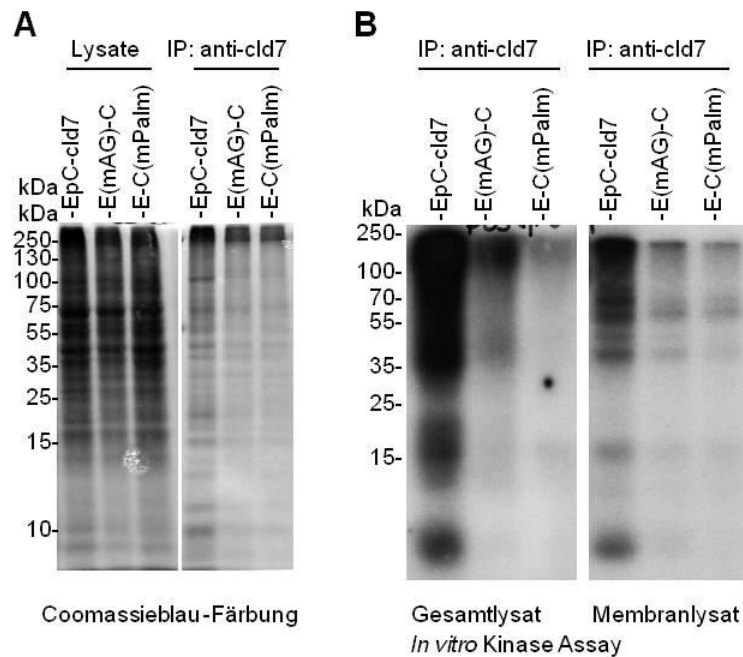


Abb. 16: Einfluss der cld7-Palmitoylierung auf immunpräzipitierende Moleküle

A-C. HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert. A. Nach einer SDS-PAGE mit Lysaten oder IP-Proben wurde das Gel mit Coomassieblau gefärbt. B. Anti-cld7 Präzipitate von Gesamt- und Membranlysaten wurden zur Markierung von phosphorylierten Proteinen mit 10 μ Ci [³²P]-ATP versetzt. Mit SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und die Auswertung erfolgte mittels Radiographie.

Zusätzlich wurde eine massenspektrometrische Proteinanalyse von niedermolekularen Proteinen von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten, die mit cld7 immunpräzipitierten, gemacht (Tab. 15, Anhang). Diese bestätigte, dass eine bedeutende Anzahl von Proteinen nur im HEK-EpC-cld7 Lysat im Vergleich zum HEK-EpC^{mAG}-cld7 und noch deutlicher zum HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysat mit cld7 assoziierten. Aufgrund von milden Lysebedingungen könnten viele immunpräzipitierende Moleküle lose angeheftet und Teil eines größeren Proteinkomplexes sein. Ein Großteil der Moleküle, die mit cld7 bei den drei Zelllinien immunpräzipitieren, sind am Metabolismus und Ionentransport beteiligt. Zudem ist eine unerwartet hohe Anzahl von Molekülen, welche mit cld7 nur beim HEK-EpC-cld7 Lysat immunpräzipitierten, am Vesikeltransport beteiligt.

Zusammengefasst zeigten diese Versuche, dass die Palmitoylierung von cld7 für die Stabilisierung in GEM sowie die Assoziation mit EpCAM und anderen Transmembranmolekülen und membranassoziierten Molekülen notwendig ist. Die Assoziation von Molekülen mit cld7 ohne Mutation der Palmitoylierungsstelle

beeinflusste den Aktivierungszustand von immunpräzipitierenden Molekülen sehr stark. Moleküle, die am Vesikeltransport beteiligt sind, assoziierten bevorzugt mit palmitoylierungsfähigem cld7. Dies bekräftigte meine Hypothese, dass sich die Funktionen von palmitoyliertem versus nicht palmitoyliertem cld7 unterscheiden.

3.2 Claudin-7-Palmitoylierung beeinträchtigt die Zell-Zell-Adhäsion

Die Bildung von TJs ist eine der zentralen Funktionen von Claudinen (Jordan et al., 2001). Claudine interagieren mit anderen Proteinen der Claudin-Familie, mit weiteren TJ-Komponenten und TJ-unabhängigen Membranmolekülen. Der TJ-Komplex wird von mehreren Komponenten gebildet: den Transmembranproteinen, wie Claudine, Occludin und Tricellulin; den Proteinen, die auf der zytoplasmatischen Seite von TJs vorkommen und Membranproteine mit dem Actin-Zytoskelett verbinden, z.B. *Zonula Occludens* (ZO)-1, ZO-2 und ZO-3; und weiteren zytosolischen Proteinen mit Signalfunktionen (Angelow et al., 2008). Da cld7 auch außerhalb von TJs gefunden wird und die Palmitoylierung die Lokalisation von cld7 stark beeinflusst (Jordan et al., 2001; Ladwein et al., 2005; Trebak et al., 2001), wurde zuerst untersucht, ob die Palmitoylierung die Integration von cld7 in die TJs direkt beeinflusst. Dazu wurde die Kolokalisation und Assoziation von cld7 mit anderen TJ-Proteinen untersucht. In untransfizierten HEK Zellen war die Expression von cld3 hoch, von ZO-1 und cld4 mittel und von cld7 sehr niedrig (Abb. 17A). Es war eine Tendenz zu beobachten, dass cld7^{mPalm} vermehrt mit cld3 und ZO-1 kolokalisierte, aber cld7 zeigte keine Kolokalisation mit cld3 oder ZO-1. Im Gegensatz zu cld7 kolokalisierte cld4 mit ZO-1 sowohl in HEK-EpC-cld7^{mPalm} als auch HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7 Zellen (Abb. 17B).

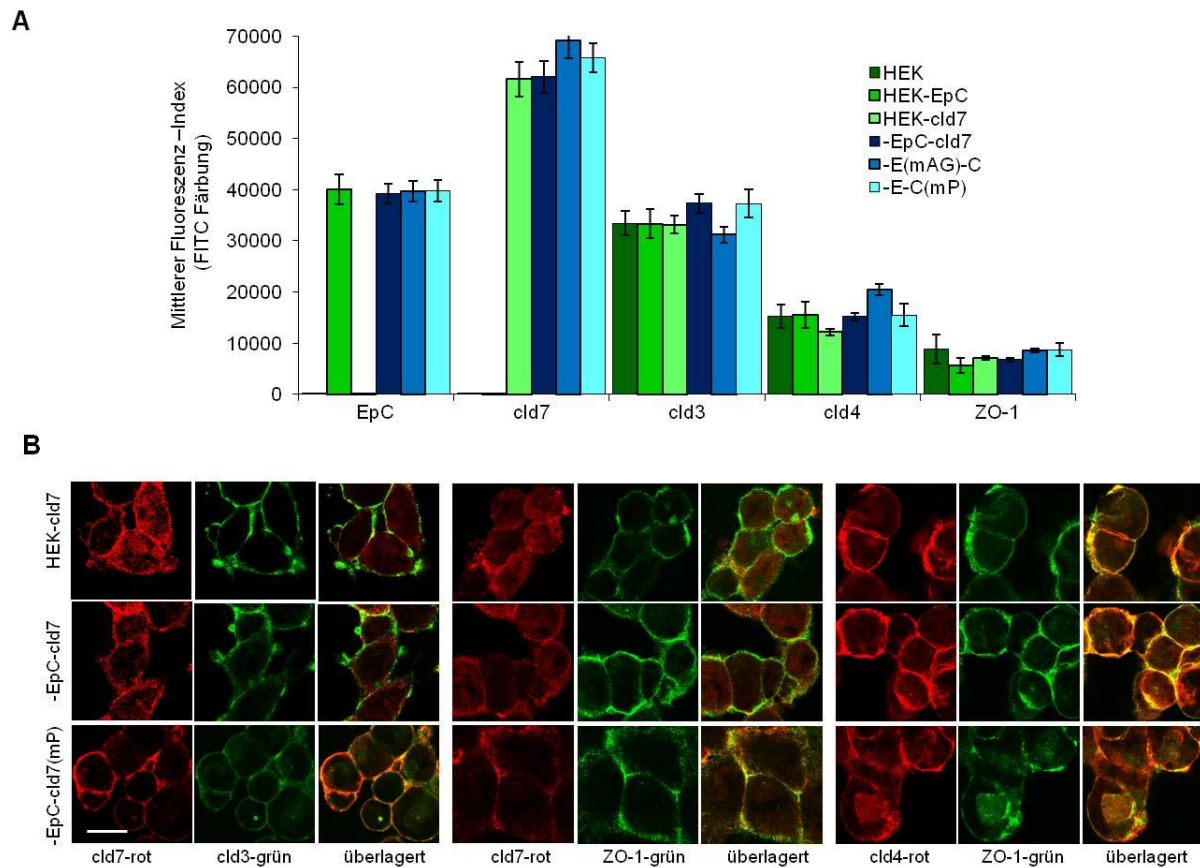


Abb. 17: Cld7-Palmitoylierung und die Bildung von TJs

A. Durchflusszytometrische Analyse transfizierter oder nicht transfizierter HEK Zellen, die mit Antikörpern gegen EpC, cld7, cld3, cld4 sowie ZO-1 und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt wurden; der mittlere Fluoreszenz-Index (% gefärbte Zellen x mittlere Intensität der Färbung \pm STAB; drei unabhängige Versuche) ist dargestellt; B. Kolokalisation von cld7 mit cld3 und ZO-1 sowie von cld4 mit ZO-1 bei HEK-cld7, HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen (Maßstab: 10 μ m). Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert, mit den angegebenen Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen sowie die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kolokalisation an.

Eine Ko-Immunpräzipitation bestätigte, dass cld3, cld4 und ZO-1 nur mit cld7^{mPalm} assoziierten, jedoch nicht mit palmitoylierungsfähigem cld7 der HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen. Zudem präzipitierte anti-ZO-1 bei allen drei Zelllinien mit cld3 und cld4, aber nur mit cld7^{mPalm} und kaum mit wt cld7 (Abb. 18). Dies weist darauf hin, dass nur palmitoylierungsdefizientes cld7 in TJs integriert werden kann.

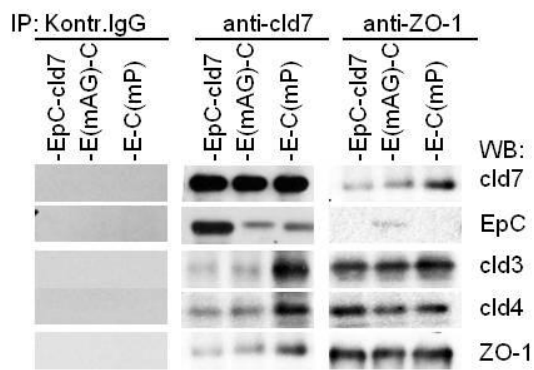


Abb. 18: Cld7-Palmitoylierung und die Assoziation mit TJ-Proteinen

HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert und anschließend mit Kontroll-IgG, anti-cld7 und anti-ZO-1 präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und im WB mit den angegebenen Antikörpern sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

Ähnlich wie cld7 ist auch EpCAM ein homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (Balzar et al., 1999). Für die EpCAM vermittelte homophile Zell-Zell-Adhäsion ist eine EpCAM-Tetramerbildung notwendig (Balzar et al., 2001). Um einen potentiellen Einfluss auf die Assoziation mit cld7 zu kontrollieren, wurden CFSE-markierte HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen auf einen Monolayer von HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 oder HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen ausgesät. Mehr HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} als HEK-EpC-cld7 Zellen adhärirten auf dem HEK-EpC-cld7 Monolayer (Abb. 19A). Die gesteigerte Zell-Zell-Adhäsion von HEK-EpC^{mAG}-cld7 wurde durch die EpCAM-EpCAM-Bindung verursacht, da sie mittels anti-EpC gehemmt werden konnte (Abb. 19B). Dieses Ergebnis unterstützt die Interpretation, dass GEM-lokalisiertes cld7 die EpCAM-Tetramerbildung beeinträchtigt und somit die Zell-Zell-Adhäsion vermindert.

Es ist bekannt, dass cld7 die EpCAM vermittelte Zell-Zell-Adhäsion hemmt, indem es die TACE-abhängige Spaltung von EpCAM unterstützt (Thuma and Zöller, 2013). Um eine Rolle von TACE zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem TACE-Inhibitor **TNF- α -Proteaseinhibitor (TAPI)** behandelt. In der Tat steigerte der Inhibitor die Zell-Zell-Adhäsion (Abb. 19B) und verringerte darüber hinaus die Bildung von extrazellulärem EpCAM (EpEx), was zu ähnlichen Mengen von EpEx im Zellkulturüberstand von allen drei Zelllinien führte. Zudem war die Menge von EpEx im Zellkulturüberstand von unbehandelten HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen im Vergleich zu HEK-EpC-cld7 Zellen deutlich reduziert (Abb. 19C).

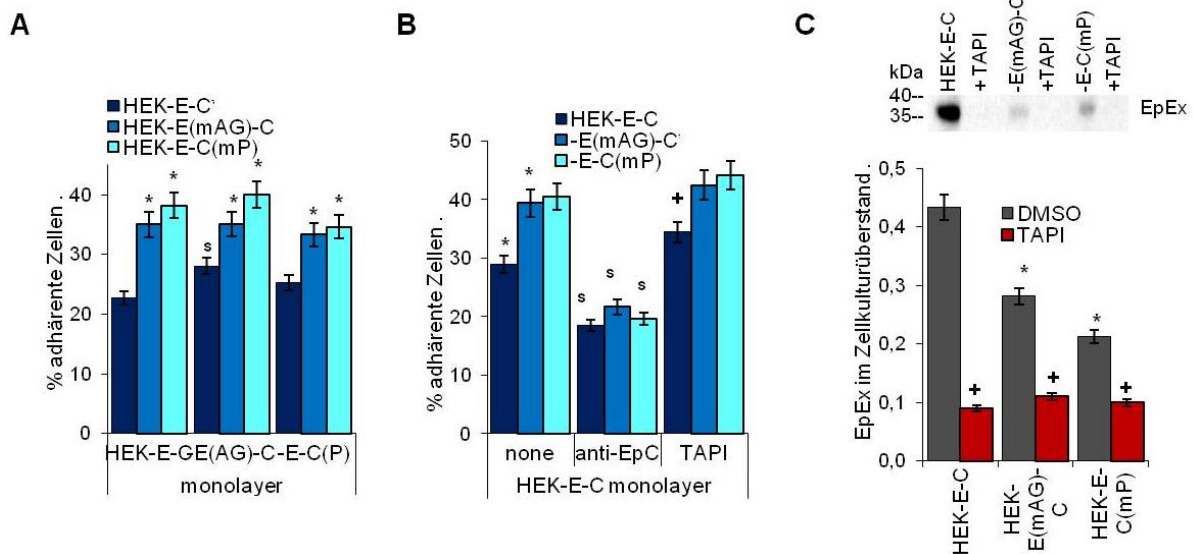


Abb. 19: Cld7-Palmitoylierung und der Einfluss auf die Adhäsion

A,B. CFSE-markierte transfizierte HEK Zellen wurden auf einem Monolayer von HEK-EpC-cld7 Zellen mit / ohne Mutationen von EpCAM und cld7 ausgesät. Zellen wurden wie angegeben mit anti-EpC (10 µg / ml) oder dem TACE-Inhibitor, TNF-α-Proteaseinhibitor (TAPI, 50 µM), behandelt. Der Prozentsatz der adherenten Zellen (Mittelwert ± STAB, drei unabhängige Versuche) ist dargestellt; signifikante Unterschiede zwischen HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7 oder HEK-EpC-cld7^{mPalm} sind mit * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede durch die Zugabe des anti-EpC Antikörpers mit s und signifikante Unterschiede durch die Behandlung mit TAPI sind mit + hervorgehoben. C. Konfluente HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden 48h lang mit PMA stimuliert und anschließend der Zellkulturüberstand gesammelt. Wo angegeben wurden die Zellen mit TAPI behandelt (50 µM). Anschließend wurde der Überstand von Zelldebris und Vesikeln befreit und die Proteinmenge der Proben auf 100 µg / ml angepasst. Die Proben wurden einer SDS-PAGE und WB unterzogen und mit anti-EpC und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. Zudem wurden ELISA-Platten mit aufkonzentriertem Überstand beschichtet, nach dem Blocken wurde EpEx mittels einer anti-EpC Bindung detektiert. Die OD bei 595 nm (Mittelwert ± STAB von drei Versuchen) ist angegeben; signifikante Unterschiede sind wie in A, B. gekennzeichnet.

Ein WB mit Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation zeigte, dass bei den HEK-EpC-cld7 und etwas weniger bei den HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen TACE teilweise in den GEM lokalisiert war. Im Gegensatz dazu war TACE in den GEM von HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen kaum vorhanden (Abb. 20A). Außerdem präzipitierte anti-TACE sowohl EpCAM als auch cld7 in den leichten Fraktionen des HEK-EpC-cld7 Lysats, jedoch nicht im HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysat (Abb. 20B).

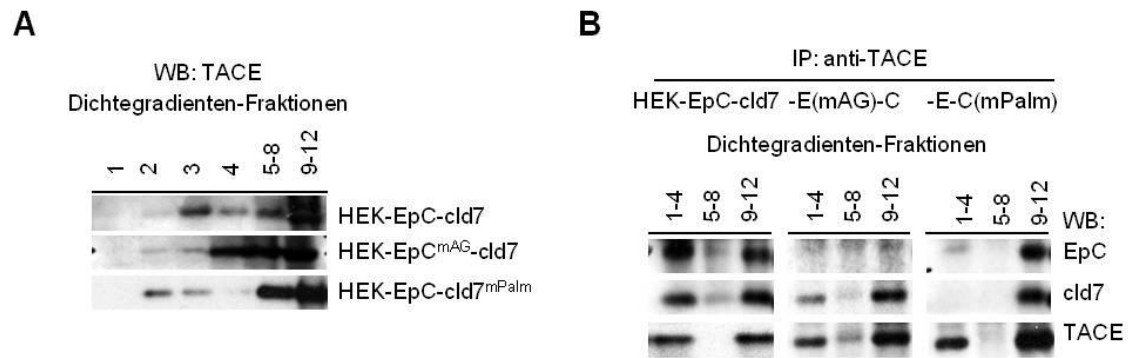


Abb. 20: Einfluss der Palmitoylierung von cld7 auf die TACE Lokalisation und Assoziation

A. HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert und nach einer Dichtegradientenzentrifugation die Fraktionen 9-12 und 5-8 gepoolt. Die Proben wurden in einem 12% Gel aufgetrennt und im WB mit anti-TACE und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. B. Proben und Lyse wie bei A. mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation, bei der neben den Fraktionen 9-12 und 5-8, auch die Fraktionen 1-4 gepoolt wurden. Diese wurden mit anti-TACE präzipitiert, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und danach mittels WB mit den angegebenen Antikörpern und HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass die Palmitoylierung von cld7 die Inkorporation in TJs verhinderte und die EpCAM-vermittelte homophile Zell-Zell-Adhäsion verminderte. Zudem assoziierte palmitoyliertes cld7 mit TACE in den GEM. Dies förderte die Spaltung von EpCAM.

3.3 Palmitoylierung von Claudin-7 unterstützt die Motilität und trägt zur Bildung von EpIC bei

Da die Palmitoylierung von cld7 die Zell-Zell-Adhäsion beeinträchtigte, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Palmitoylierung womöglich die Motilität fördert.

Der Einfluss der Palmitoylierung von cld7 auf die Motilität wurde mithilfe des Wundheilungsversuchs, der Transwell-Migration sowie der Videomikroskopie untersucht. Im Wundheilungsversuch wurde mit einer feinen Pipettenspitze ein Monolayer von HEK, HEK-EpC, HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen "verletzt". Die Zellen wandern daraufhin aufeinander zu und das Schließen des verletzten, konfluenten Monolayers ist ein Maß für die

Migrationsfähigkeit der Zellen. Die Schließung der Wunde war bei den HEK-cld7 und HEK-EpC-cld7 Zellen im Vergleich zu den HEK und HEK-EpC Zellen beschleunigt. Die HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen migrierten ähnlich wie die HEK-EpC-cld7 Zellen. Im Gegensatz dazu war die Migrationsfähigkeit der HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen vermindert und vergleichbar mit der der HEK und HEK-EpC Zellen (Abb. 21A, B).

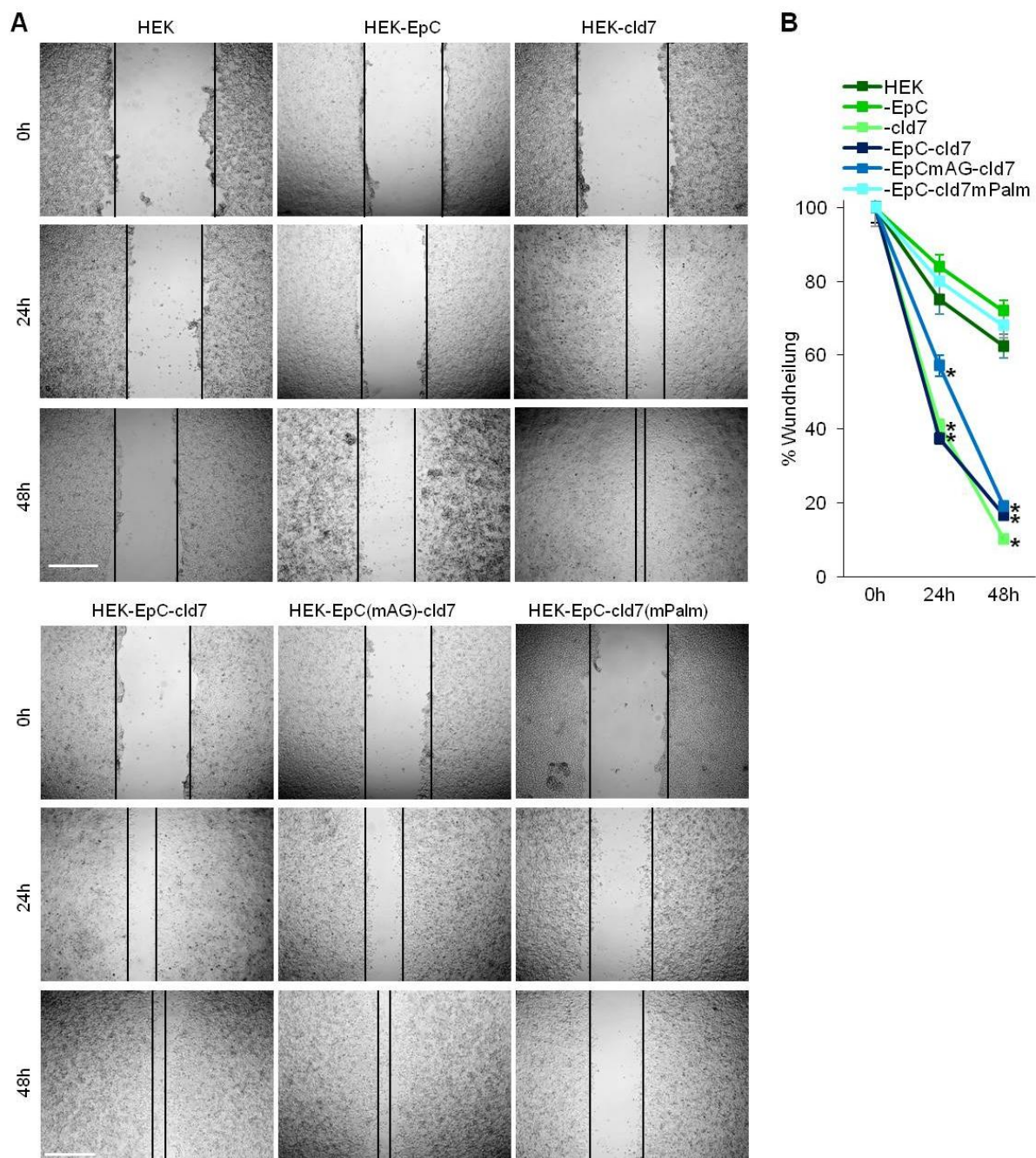


Abb. 21: Wundheilungsversuch der untransfizierten und transfizierten HEK Zellen

A., B. Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichtete 24-well Platten ausgesät. Eine Wunde wurde mit einer feinen Pipettenspitze in einen subkonfluenten Zellmonolayer gekratzt. Die schwarzen Linien markieren die Wundränder. Beispielhafte, lichtmikroskopische Bilder zu Beginn, nach 24h und 48h sowie die Wundheilung in Prozent (Mittelwerte \pm STAB von drei Versuchen; in B.) sind gezeigt (Maßstab: 250 μ m). Signifikante Unterschiede

zwischen HEK, HEK-EpC, HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

Außerdem wurde die Migrationsfähigkeit mittels des Transwell-Migrationsassays überprüft. Die Zellen wurden hierfür in Medium mit 1 % BSA resuspendiert und in den oberen Teil einer Migrationskammer ausgesät und für 16 Stunden inkubiert. Für eine erfolgreiche Migration mussten die Zellen durch eine Membran in den unteren Teil der Kammer wandern, welche Medium mit 20 % FCS enthielt. Nach der Inkubation konnte die Migrationseffizienz mittels einer Kristallviolett-Färbung der Membran bestimmt werden. Die Transwell-Migration (Abb. 22A) und die Videomikroskopie (Abb. 22B) bestätigten die Ergebnisse vom Wundheilungsversuch. Die Migrationsfähigkeit der HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen war im Vergleich zu HEK-EpC-cld7 und HEK-cld7 Zellen deutlich vermindert und die Anzahl migrierender HEK-cld7 Zellen im Vergleich zu parentalen HEK oder HEK-EpC Zellen erhöht (Abb. 22A). Bei der Videomikroskopie wurde die Zellmigration für 12 h verfolgt, wobei alle 20 min ein Bild gemacht wurde. Beispielhaft sind die Migrationswege einzelner, repräsentativer Zellen gezeigt (Abb. 22C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass palmitoyliertes cld7 aktiv die Motilität fördert, aber auch dass die Assoziation von EpCAM und cld7 eine Rolle spielt. Diese Vermutung rührt daher, dass HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen, bei welchen cld7 nicht mit EpCAM assoziieren kann, langsamer migrieren als HEK-EpC-cld7 Zellen.

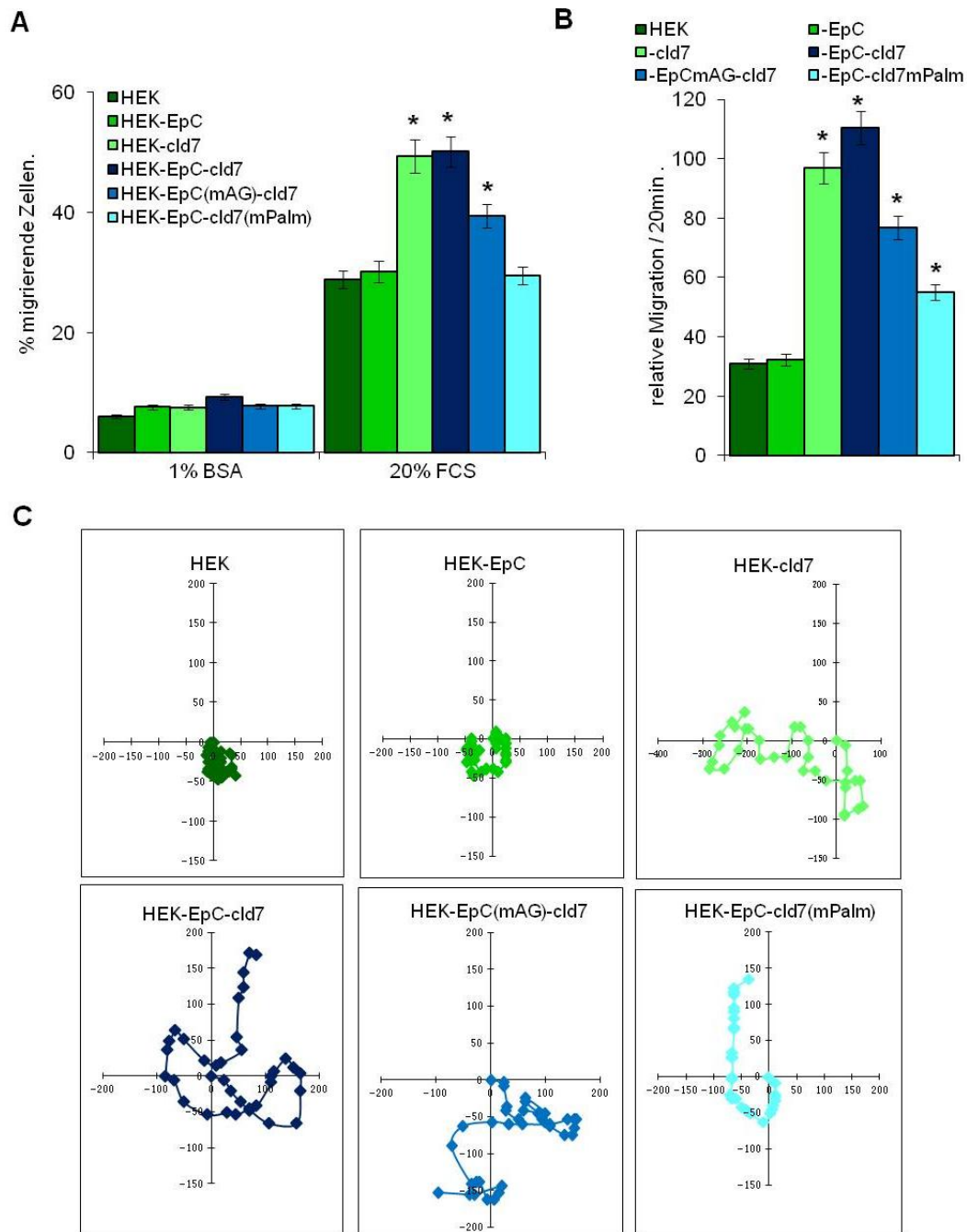


Abb. 22: Palmitoyliertes cld7 fördert die Zellmotilität

A. Zellen wurden in Medium / 1% BSA in den oberen Teil einer Boyden Kammer ausgesät. Der untere Teil beinhaltet Medium / 20% FCS und die Porengröße der Membran betrug 8 μm . Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen auf der unteren Membranseite mit Kristallviolett gefärbt und die OD bei 595nm gemessen. Die durch die Membran migrierten Zellen in Prozent der ausgesäten Zellen sind angegeben (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen \pm STAB). Signifikante Unterschiede zwischen HEK, HEK-EpC, HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen sind mit * gekennzeichnet. B, C. Zellen wurden auf BSA-beschichteten 24-well Platten ausgesät. Mittels Videomikroskopie wurde die Migration 12h lang verfolgt, wobei alle 20 min ein Bild gemacht wurde. Die Auswertung erfolgte mithilfe von ImageJ (*Manual Tracking Plugin*). B. Der Mittelwert \pm STAB von 20 einzelnen Zellen ist angegeben. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie in A. C. Beispiele der Bewegungen einzelner Zellen über einen Zeitraum von 12 h.

Aufgrund der beobachteten starken Effekte der HEK-Transfektanten auf die Migrationsfähigkeit wurden Assoziationen mit dem Zytoskelett untersucht. Zunächst wurde eine Färbung mit Phalloidin, welches an F-Actin bindet (Chazotte, 2010), genutzt, um das Zytoskelett anzufärben. Bei HEK Zellen wurde ein unorganisiertes Zytoskelett beobachtet (Auger-Messier et al., 2005). Aber bei HEK-cld7 und HEK-EpC-cld7 Zellen waren viele Actinstränge und submembranäre Actinbündel erkennbar. F-Actin war hingegen bei HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen weniger deutlich organisiert (Abb. 23).

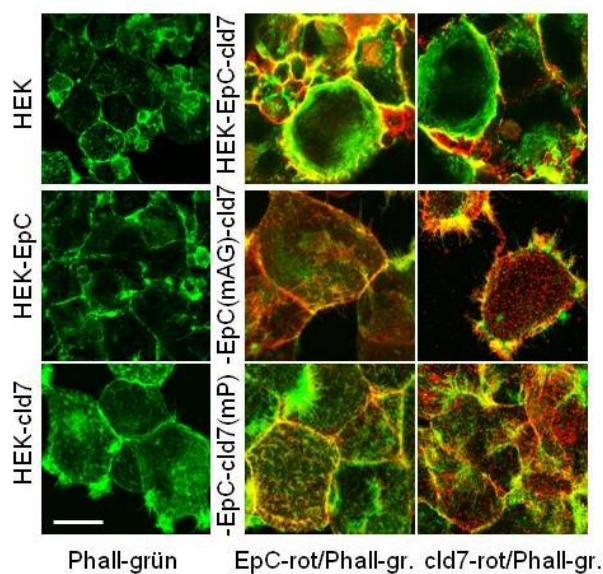


Abb. 23: Färbung des Zytoskeletts mit Phalloidin

Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin, anti-EpCAM und anti-cld7 sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen oder die Überlagerung von Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kolokalisation an (Maßstab: 10 μm).

Zudem wurde die Expression und Aktivierung von Molekülen, welche bei der Organisation des Zytoskeletts sowie der Migration und Adhäsion eine Rolle spielen, untersucht. Fokale Adhäsionen sind Komplexe von Integrinen, welche die extrazelluläre Matrix (EZM) mittels Actin-bindenden Proteinen mit dem Actin-Zytoskelett verbinden (Tojkander et al., 2012). Integrine sind heterodimere Transmembranglycoproteine, die aus α - und β - Untereinheiten bestehen. Sie vermitteln Interaktionen zwischen den Zellen sowie den Zellen und der EZM (Hynes, 2002; Weber et al., 2011). Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ist eines der wichtigsten Integrin-Signalmoleküle, welches nach dem Zell-EZM-Kontakt in die fokalen Adhäsionen rekrutiert und phosphoryliert wird. Dies führt zur Aktivierung von c-Src (*cellular Sarcoma*), welches im Gegenzug FAK in der Aktivierungsregion phosphoryliert und in einem vollständig aktivierten FAK-Enzym resultiert. Das fokale

Adhäsionsprotein Paxillin wird von FAK und c-Src phosphoryliert (Canel et al., 2013; Geiger et al., 2001; Sastry and Burridge, 2000). Zudem phosphoryliert c-Src Ezrin (Heiska and Carpen, 2005), welches als Bindeprotein zwischen Plasmamembran und Zytoskelett fungiert (Bretscher et al., 2002; Rozsnyay et al., 1996). Ezrin spielt bei der Organisation des Zytoskeletts und der Migration eine bedeutende Rolle (Crepaldi et al., 1997).

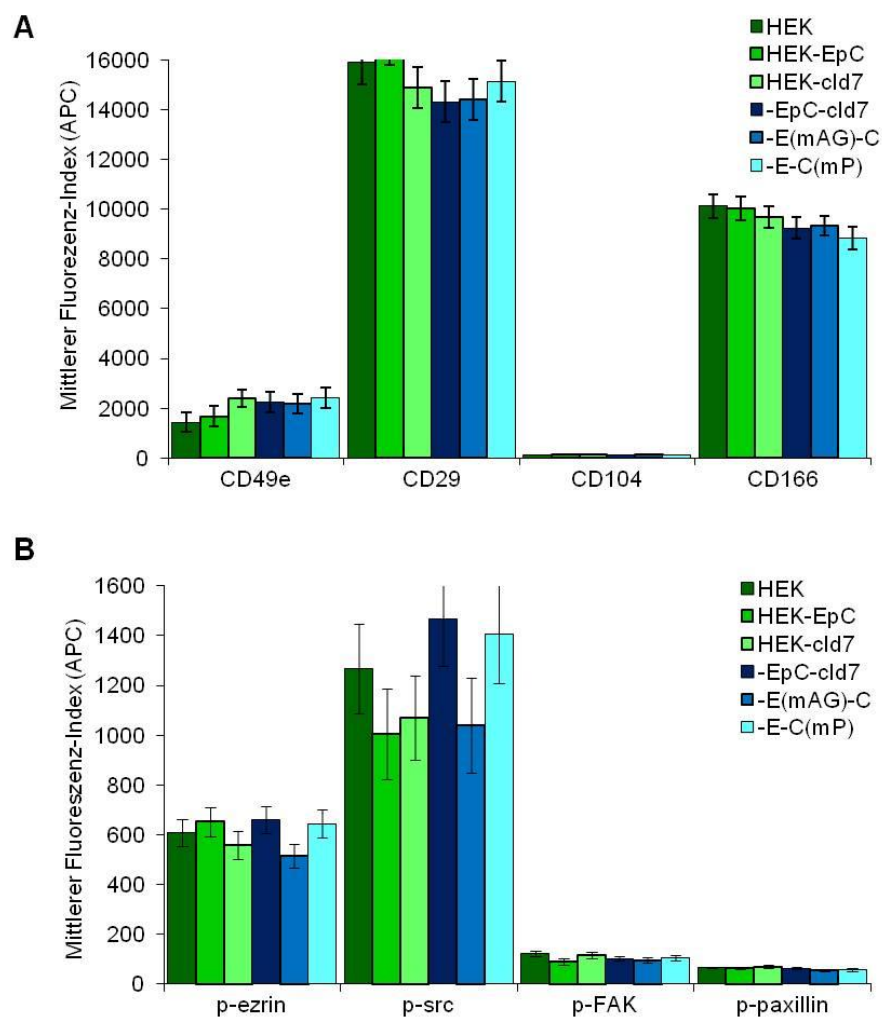


Abb. 24: Kooperation von palmitoyliertem cld7 mit Integrinen

A, B. Durchflusszytometrische Analyse transfizierter oder nicht transfizierter HEK Zellen, die mit Antikörpern gegen die Integrine CD49e, CD29, CD104 oder CD166 (A) oder gegen phospho-Ezrin, phospho-Src, phospho-FAK oder phospho-Paxillin (B) und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt wurden; der mittlere Fluoreszenz-Index (% gefärbte Zellen x mittlere Intensität der Färbung \pm STAB; drei unabhängige Versuche) ist dargestellt.

HEK Zellen exprimierten das Integrin $\alpha 5\beta 1$, das aus den Untereinheiten $\alpha 5$ (CD49e) und $\beta 1$ (CD29) besteht, und sehr schwach das Integrin $\beta 4$ (CD104) sowie das Zelladhäsionsmolekül CD166. Die Expression der zuvor genannten Moleküle blieb durch die cld7 Transfektion unverändert. Zudem war die Expression von phospho-Ezrin, -src, -FAK sowie -Paxillin bei HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen nicht signifikant verringert (Abb. 24A, B). Trotz der unveränderten Expression kolokalisierte cld7 in HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen weniger mit den Integrinen $\alpha 5\beta 1$ und dem Integrin $\beta 4$ als in HEK-EpC-cld7 Zellen. CD166 hingegen kolokalisierte mit cld7 in allen drei Zelllinien (Abb. 25A). Des Weiteren wurde die Assoziation von cld7 mit Ezrin und Integrinen mithilfe von Ko-Immunpräzipitationen untersucht. Im Gegensatz zu nicht mutiertem cld7 assoziierte cld7^{mPalm} nur schwach mit Ezrin und eine Behandlung mit einem Palmitoylierungsinhibitor hemmte die Assoziation nahezu komplett (Abb. 25B). Bei HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen war die Actin-Reorganisation nicht vollständig verhindert (Abb. 23). Dies liegt womöglich daran, dass die cld7-Ezrin-Assoziation keine direkte Interaktion ist, sondern von Molekülen unterstützt wird, die mit cld7 assoziieren. Cld7 ko-immunpräzipitierte im HEK-EpC-cld7 Lysat mit Integrinen wie CD104 und CD49e sowie dem Adhäsionsmolekül CD166. Bei HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysaten war die Assoziation mit CD49e und CD166 jedoch deutlich geringer als bei den wt Transfektanten. Eine Ko-Immunpräzipitation mit anti-Ezrin zeigte, dass die Assoziation von Ezrin mit EpCAM und cld7 im HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysat am stärksten vermindert war. Außerdem war bei Präzipitaten sowohl mit anti-CD49e als auch anti-CD166 die Assoziation mit Ezrin im HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysat deutlich reduziert (Abb. 25D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass palmitoyliertes cld7 die Integrinaktivierung unterstützt. Im Gegenzug assoziieren aktivierte Integrine über phosphoryliertes Ezrin mit dem Zytoskelett, was zur Organisation des F-Actin-Zytoskeletts beiträgt (Abb. 23). Zudem immunpräzipitierte die Tyrosinkinase c-Src im HEK-EpC-cld7^{mPalm} Lysat nicht mit cld7, was die Vermittlerrolle von palmitoyliertem cld7 stützt. Die Assoziation mit Paxillin und FAK wurde nicht verhindert, war jedoch verringert (Abb. 25C). Folglich fördert palmitoyliertes cld7, welches in den GEM lokalisiert ist, mittels der Assoziation mit Ezrin und Integrinen die Motilität.

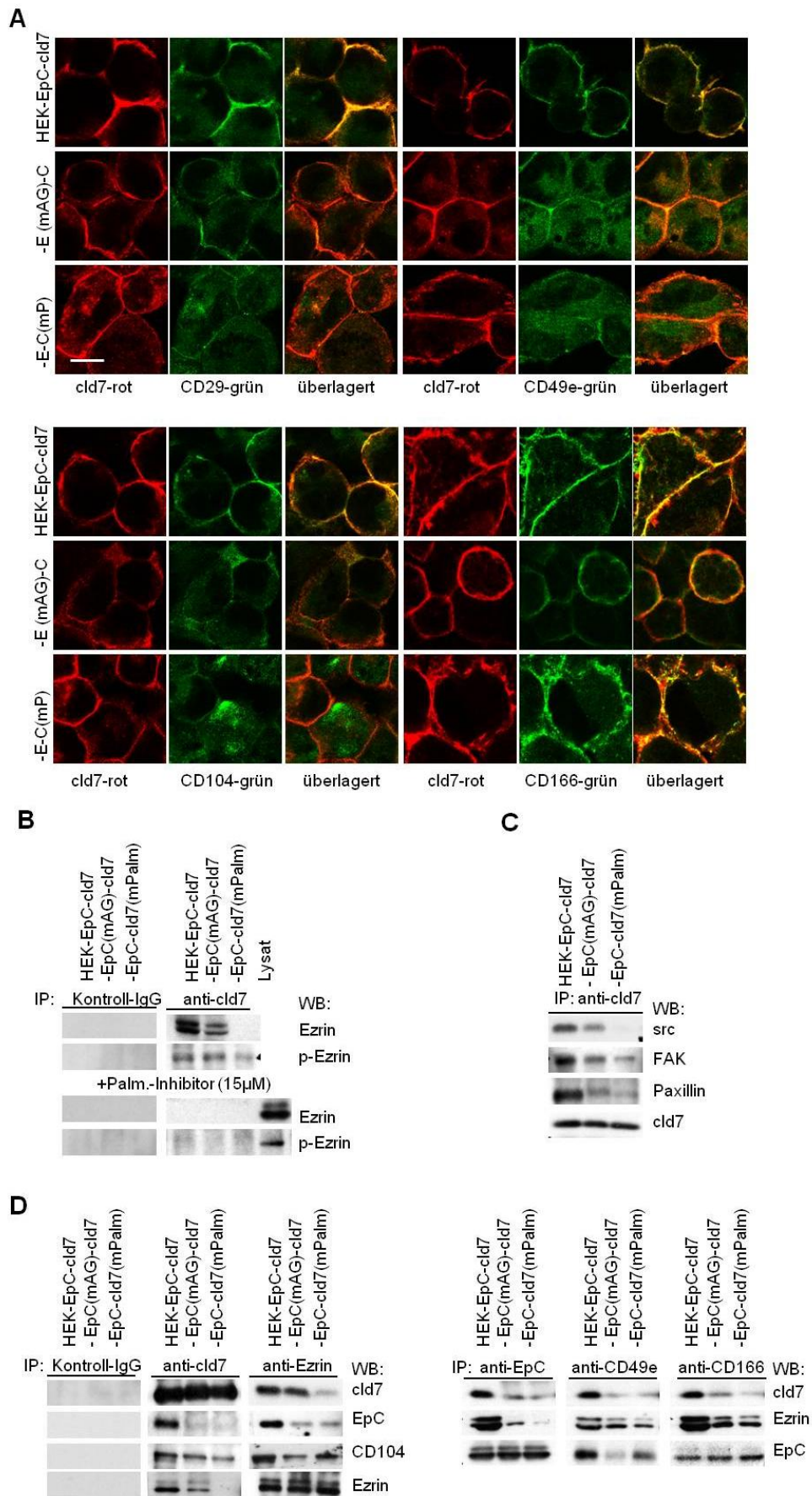


Abb. 25: Assoziation von cld7 mit Integrinen, FAK , c-Src, Paxillin und Ezrin

A. Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern wie angegeben sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen oder die Überlagerung von Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kolo-kalisation an (Maßstab: 10 µm). B.-D. Unbehandelte sowie wo angegeben mit 2-BP-(15 µM; A.) behandelte HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert und anschließend mit Kontroll-IgG und Antikörpern wie angegeben präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und im WB mit den angegebenen Antikörpern sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

Die Ergebnisse der Versuche zur Migrationsfähigkeit der transfizierten und nicht transfizierten HEK Zellen deuteten auf einen zusätzlichen Beitrag von EpCAM zu den motilitätsfördernden Eigenschaften von cld7 hin (Abb. 21, 22). Wie im Kapitel 3.2 beschrieben, wurde EpEx vermehrt im Zellkulturüberstand von HEK-EpC-cld7 Zellen im Vergleich zu HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} gebildet. TACE war außerdem innerhalb von GEM lokalisiert und assoziierte mit cld7, was zur Spaltung von EpCAM beitrug (Abb. 19, 20). Es wurde bereits gezeigt, dass nach der Abspaltung von EpEx durch TACE Presenilin-2 binden und EpIC intrazellulär freisetzen kann (Maetzel et al., 2009). Presenilin-2 ist eine Untereinheit der γ -Sekretase, ein Proteinkomplex in der Membran, der an der Spaltung von integralen Membranproteinen beteiligt ist. Da auch Presenilin-2 in den GEM lokalisiert ist (Runz et al., 2002), könnte die Assoziation von cld7 mit EpCAM die Abspaltung von EpIC fördern. Eine Färbung mit Antikörpern gegen cld7 und EpIC und anschließender Konfokalmikroskopie zeigte, dass cld7 in der Membran von HEK-EpC-cld7 stärker mit EpIC kolo-kalisierte als in HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen. Des Weiteren befand sich bei den wt Transfektanten mehr EpIC im Zytoplasma als bei HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen (Abb. 26A). Ein WB mit anti-EpIC zeigte zudem, dass in HEK-EpC-cld7 mehr EpIC gebildet wurde als bei HEK-EpC Zellen. EpIC konnte in HEK-EpC-cld7 Zellen, die mit einem Palmitoylierungsinhibitor behandelt wurden, sowie in HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen sehr schwach und in HEK-EpC^{mAG}-cld7 kaum detektiert werden (Abb. 26B). Dies hebt die Rolle von palmitoyliertem cld7 bei der Spaltung von EpCAM hervor und legt nahe, dass nur EpCAM, welches mit palmitoyliertem cld7 assoziiert und in den GEM lokalisiert ist, für Presenilin-2 zugänglich ist. Nichtsdestotrotz immunpräzipitierte Presenilin-2 mit cld7^{mPalm}, aber ausschließlich in den schweren Fraktionen (Abb. 26C).

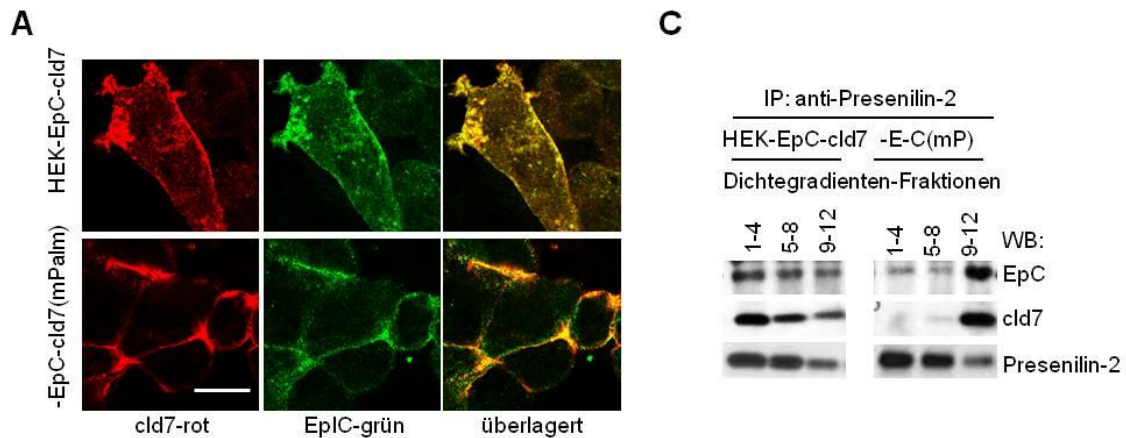


Abb. 26: Palmitoyliertes cld7 unterstützt die Abspaltung der intrazellulären Domäne von EpCAM

A. Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen EpIC sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen sowie die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kolokalisation an; (Maßstab: 10 µm). B. Zellen wurden mit 1% Triton-X-100 im Lysepuffer lysiert, in einem

16% Tricin-Gel aufgetrennt und im WB mit anti-EpC sowie einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. Gezeigt sind eine kurze und längere Expositionszeit derselben Membran. 2BP: 2-Bromopalmitat.

EpIC bindet nach der Freisetzung ins Zytoplasma an *Four and a Half LIM domain protein 2* (FHL2), den Transkriptionsfaktor LEF-1 sowie β -Catenin und induziert im Zellkern die Expression des Proto-Onkogens c-myc (Maetzel et al., 2009; Münz et al., 2009; Osta et al., 2004), Oct4 und Nanog (Chen et al., 2011a). Da in HEK-EpC-cld7 Zellen vermehrt EpIC freigesetzt wurde, wurde der Einfluss auf einige mesenchymale Proteine untersucht. In HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurde β -Catenin unverändert exprimiert und die Expression von Presenilin-2 war bei HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen kaum verringert (Abb. 27A). Die erhöhte Bildung von EpIC bei HEK-EpC-cld7 Zellen war von einer gesteigerten Expression von Vimentin, *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Transforming Growth Factor β* (TGF β) und N-Cadherin begleitet (Abb 27B). Zudem wurde eine verminderte Expression von E-Cadherin in HEK-EpC-cld7 Zellen festgestellt, die jedoch statistisch nicht signifikant war. FGF, N-Cadherin und Vimentin kolokalisierten

in HEK-EpC-cld7^{mPalm} weniger stark mit cld7 als in HEK-EpC-cld7 Zellen (Abb. 27C), bei welchen palmitoyliertes cld7 die Bildung von EpIC unterstützte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gesteigerte Freisetzung von EpIC aufgrund von palmitoyliertem cld7 die Expression von mesenchymalen Markern, die mit einem migratorischen Phänotyp assoziiert sind, erhöhen kann.

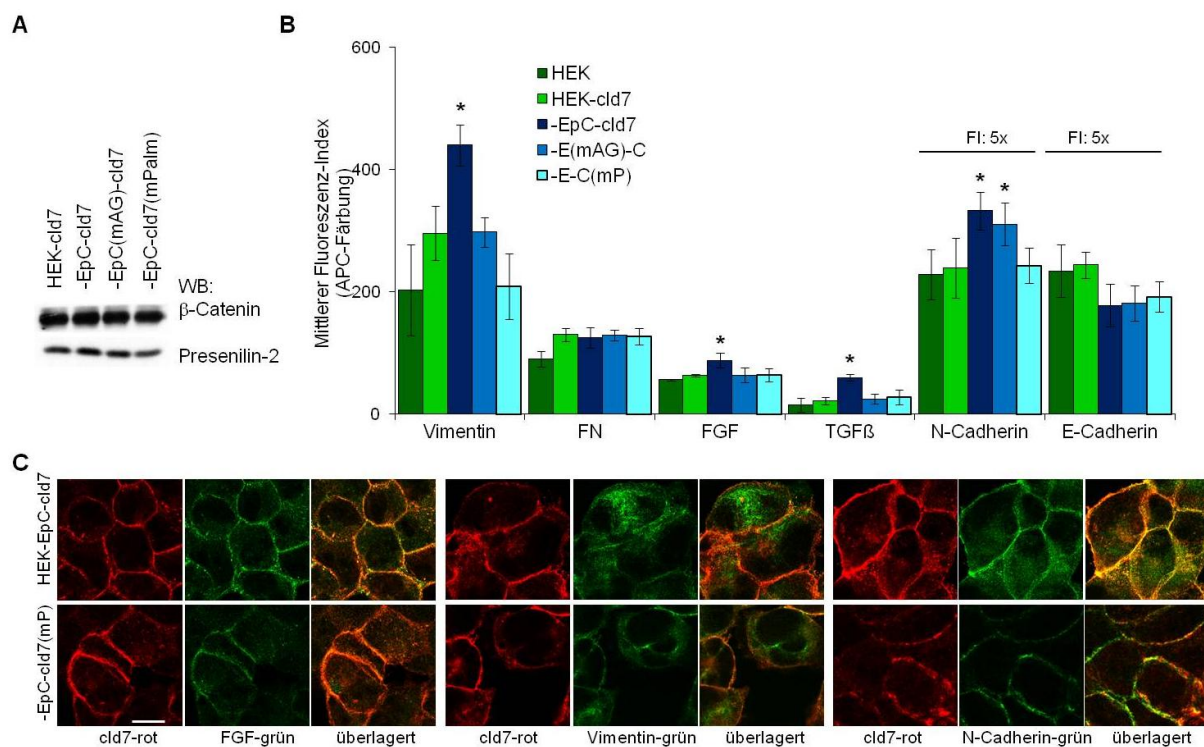


Abb. 27: Analyse von mesenchymalen Proteinen von transfizierten HEK Zellen

A. HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Triton-X-100-Lysepuffer lysiert, mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und im WB mit den angegebenen Antikörpern sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. B. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Proteinen wie angegeben; der mittlere Fluoreszenz-Index (% gefärbte Zellen x mittlere Intensität der Färbung ± STAB; drei unabhängige Versuche) ist dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen HEK und HEK-EpC-cld7 Zellen sind mit * gekennzeichnet. C. Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen sowie die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kolo-kalisation an; (Maßstab: 10 µm).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass cld7 die Motilität fördert, was zum einen in der Assoziation von palmitoyliertem cld7 mit aktiviertem Ezrin begründet ist. Zum anderen wird die Motilität durch die Assoziation mit Integrinen und CD166 unterstützt. Darüber hinaus förderte palmitoyliertes cld7 die Bildung von EpIC. Dies trug zur Motilität bei, indem es die Expression mesenchymaler Proteine steigerte.

3.4 Palmitoyliertes Claudin-7 fördert die Invasivität

MMPs sind an der Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen beteiligt und in Zellmembranen oder der extrazellulären Matrix lokalisiert. Im aktivierten Zustand bauen sie die extrazelluläre Matrix ab, was für die Invasivität von großer Bedeutung ist (Fillmore et al., 2001; Kessenbrock et al., 2010). Bei einer Studie mit cld7-defizienten Mäusen war die Expression von MMP3 hochreguliert (Ding et al., 2012). Dies warf die Frage auf, ob die Motilität der HEK-cld7 Zellen zwar gesteigert ist, aber gleichzeitig die Invasivität verloren geht.

Mithilfe des Transwell-Invasionsassays wurde das Invasionsverhalten der Zellen untersucht. Die Zellen müssen dabei durch eine dünne Schicht aus Matrigel, welche eine künstliche Basalmembran darstellt, wandern und werden im Anschluss gefärbt. Invadierende Zellen sind die Zellen, die sich im Matrigel befinden, und Zellen, die an der Unterseite des Transwell-Einsatzes haften, stellen penetrierende Zellen dar. Überraschenderweise zeigten HEK-cld7, HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen eine gesteigerte Invasivität. Die Invasionsrate von HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen ging jedoch fast auf das Level der nicht transfizierten HEK Zellen zurück (Abb. 28A, B).

Um die Ursachen für die gesteigerte Invasivität zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Aktivität von MMPs in HEK Zellen untersucht. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass wt HEK Zellen MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 und MMP13 gering, MMP14 mittel stark und CD147 stark exprimierten (Abb. 29A, B). Die Expression von MMP3, MMP7 und MMP9 war bei cld7 exprimierenden Zellen leicht vermindert, allerdings korrelierte diese Reduktion nicht mit der Palmitoylierung von cld7 (Abb. 29A). MMP3 kolokalisierte nicht mit cld7. Zudem kolokalisierte cld7 nur schwach mit MMP14 in HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7, aber nicht in HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen (Abb. 29D). In der Expression von Proteasen konnten keine Unterschiede zwischen palmitoyliertem und nicht palmitoyliertem cld7 festgestellt werden und somit blieb die Frage nach der Ursache für die gesteigerte Invasionsrate der HEK-EpC-cld7 Zellen offen. Daher wurden die Proteasen mithilfe der Zymographie auf eine gesteigerte Aktivität hin untersucht. Bei der Zymographie kann die Aktivität von MMP2 und MMP9 mithilfe des Abbaus von Gelatine, welche bei der SDS-PAGE als Substrat zum Gel hinzugefügt wird, und einer anschließenden

Coomassieblau-Färbung nachgewiesen werden. Diese zeigte eine geringere Aktivität von MMP2 und MMP9 bei HEK und HEK-EpC im Vergleich zu den HEK-EpC-cld7 Zellen. Außerdem war eine reduzierte Aktivität dieser MMPs bei HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen zu beobachten (Abb. 29C).

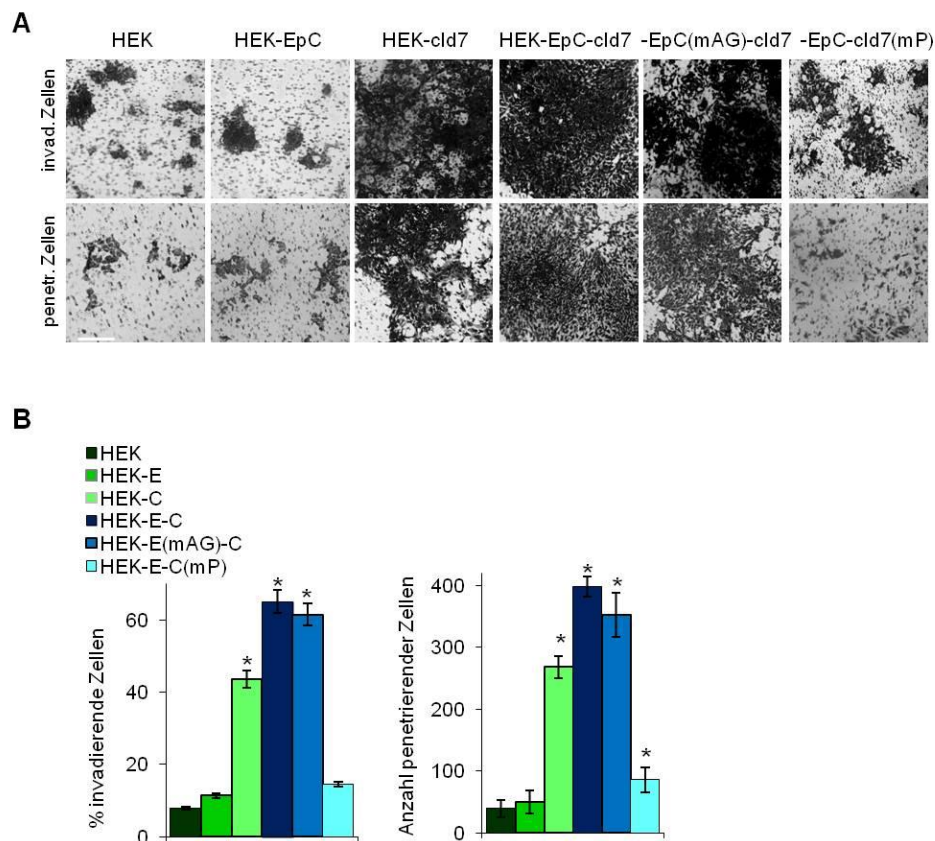


Abb. 28: Palmitoyliertes cld7 und die Invasivität

A, B. Zellen wurden in Medium mit 1 % FCS resuspendiert und in Matrigel beschichtete Transwell-Einsätze ausgesät. Die Kammer unterhalb der Transwell-Einsätze enthielt Medium mit 20 % FCS. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Invadierende Zellen: Zellen im Matrigel; penetrierende Zellen: Zellen an der Unterseite des Transwell-Einsatzes. A. Repräsentative Beispiele invadierender und penetrierender Zellen sind gezeigt (Maßstab: 250 µm); B. Der Prozentsatz der invadierenden Zellen ausgehend von der Gesamtzahl der ausgesäten Zellen sowie die Anzahl penetrierender Zellen (Mittelwerte ± STAB; drei unabhängiger Versuche) sind angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen HEK und HEK-EpC, HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 sowie HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

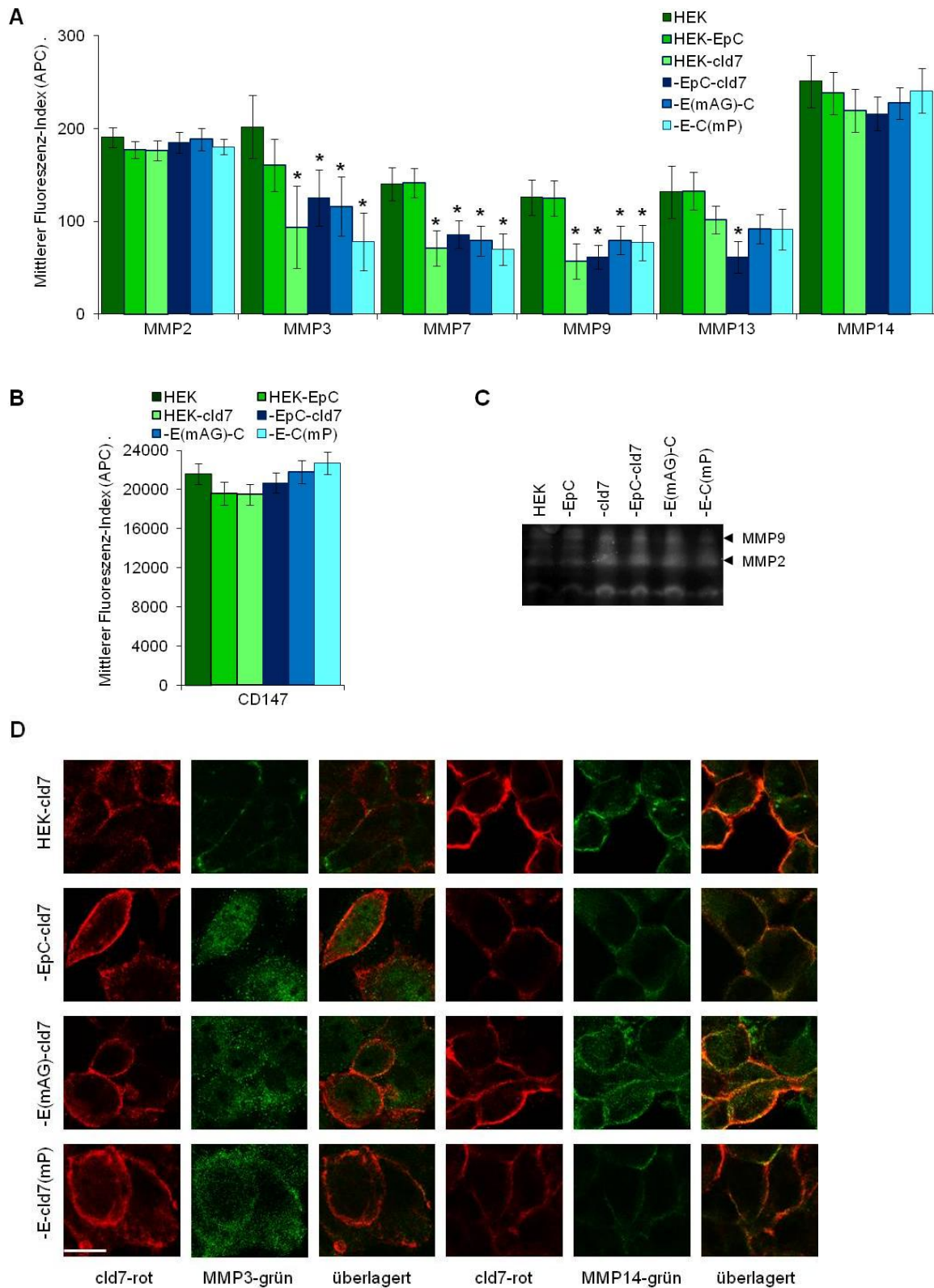


Abb. 29: Expression von MMPs und CD147 in transfizierten und nicht transfizierten HEK Zellen

A., B. Der mittlere Fluoreszenz-Index (% gefärbte Zellen x mittlere Intensität der Färbung \pm STAB; drei unabhängige Versuche) der Zellen, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit spezifischen Antikörpern gegen MMPs (A) und CD147 (B) sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt wurden, ist dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den transfizierten und parentalen HEK Zellen sind mit * gekennzeichnet. C. Aktivität von MMP2 und MMP9 anhand der Gelatine-Zymographie von

Zellkulturüberständen von HEK, HEK-EpC, HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen. Zellkulturüberstände wurden aufkonzentriert und die Proteingemische (5 µg) mittels SDS-PAGE, bei welcher das Gel Gelatine als Substrat enthielt, aufgetrennt. In darauffolgenden Inkubationsschritten wurde das SDS mithilfe einer Triton-X-100-Lösung aus dem Gel entfernt und anschließend bei 37°C inkubiert, um die enzymatische Aktivität zu erhöhen. Mithilfe einer Coomassieblau-Färbung wurde der Abbau der Gelatine aufgrund von aktiven MMPs erkennbar. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Einzelfärbungen sowie die Überlagerung der Einzelfärbungen sind dargestellt. Eine Gelbfärbung bei Überlagerung der Einzelfärbungen zeigt eine Kollokalisierung an; (Maßstab: 10 µm).

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Molekül CD147 von palmitoyliertem cld7 beeinflusst wird. CD147 wird auch als **Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer** (EMMPRIN) bezeichnet und induziert die Expression von MMPs (Jiang and Tang, 2007). CD147 ist aufgrund der Assoziation mit Monocarboxylat-Transportern (MCT), insbesondere mit MCT-1 und MCT-4, in der Lage, den Laktattransport und die Glykolyse zu beeinflussen (Philp et al., 2003). Des Weiteren ist CD147 für den Transport von MCT-1 und MCT-4 in die Plasmamembran essentiell (Kirk et al., 2000). Ein Invasionsassay zeigte, dass eine Behandlung der Zellen mit einem Antikörper gegen CD147 die Invasionsrate von HEK-cld7, HEK-EpC-cld7 sowie HEK-EpC^{mAG}-cld7 deutlich hemmte (Abb. 30A, B). Zudem immunpräzipitierte CD147 mit cld7 in HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7 Lysaten, aber in HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen war die Assoziation von CD147 und cld7 vermindert (Abb. 30C). Die massenspektrometrische Proteinanalyse der cld7-Immunpräzipitate bestätigte, dass cld7 nur in HEK-EpC-cld7 Zellen mit CD147 und MCT-1 assoziiert ist (Tab. 16, Anhang).

Die Invasivität von HEK-cld7, HEK-EpC-cld7 und HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen war im Vergleich zu nicht transfizierten HEK oder HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen signifikant erhöht. Die Expression von MMP3, MMP7 und MMP9 wurde durch cld7 nur geringfügig beeinflusst und korrelierte nicht mit der Palmitoylierung von cld7. Aber es konnte eine schwache Kollokalisierung von MMP14 mit palmitoyliertem cld7 sowie eine gesteigerte Aktivität von MMP2 und MMP9 beobachtet werden. Des Weiteren könnte eine hohe Expression und Assoziation von CD147 mit cld7 die MMP-Aktivierung unterstützt haben.

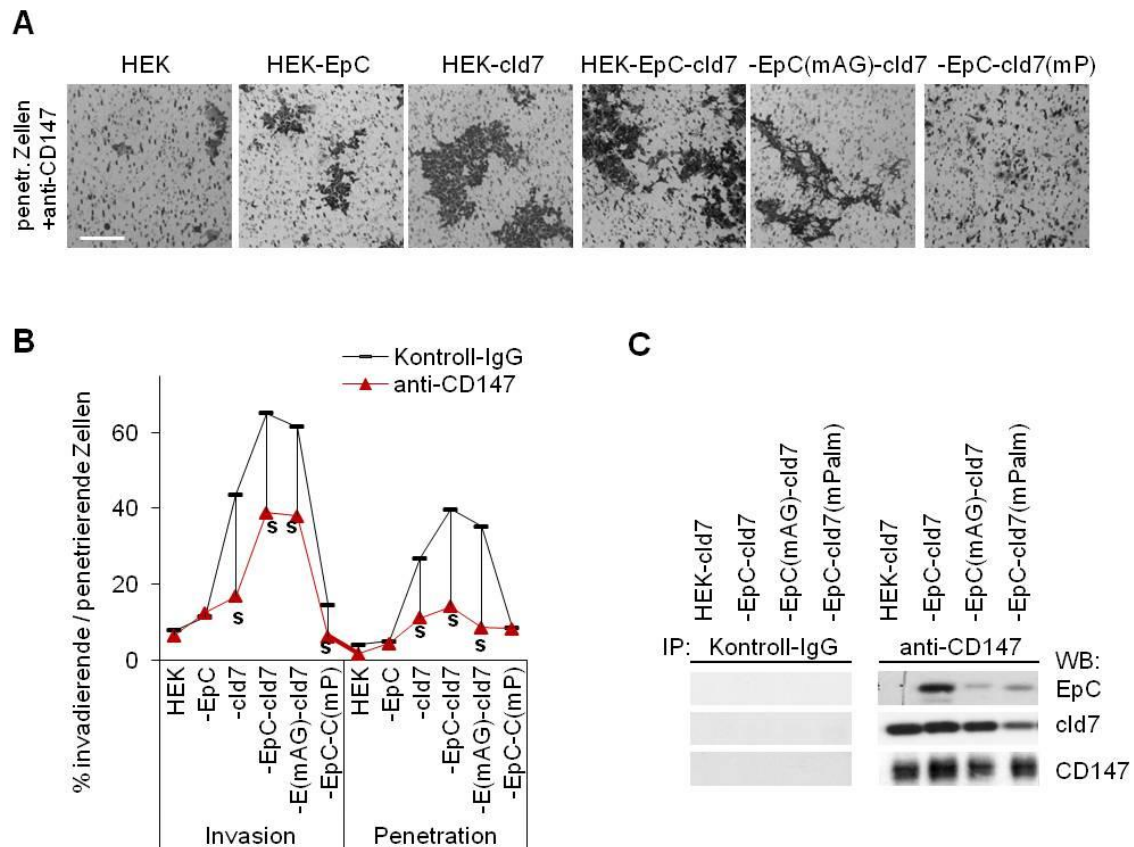


Abb. 30: Einfluss von CD147 auf die Invasivität der HEK Zellen

A., B. Zellen wurden in Medium, das anti-CD147 (10 µg / ml) oder Kontroll-IgG und 1 % FCS enthielt, resuspendiert und in Matrigel beschichtete Transwell-Platten ausgesät. Die Kammer unterhalb der Transwell-Einsätze enthielt Medium mit 20 % FCS. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Invasion: Zellen im Matrigel; Penetration: Zellen an der Unterseite des Transwell-Einsatzes. A. Repräsentative Beispiele penetrierender Zellen mit anti-CD147-Behandlung sind gezeigt (Maßstab: 250 µm). Beispiele für die Penetration ohne anti-CD147 Behandlung sind in Abb. 28A gezeigt. B. Der Prozentsatz der invadierenden / penetrierenden Zellen ausgehend von der Gesamtzahl der ausgesäten Zellen ist angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit anti-CD147 behandelten Zellen sind mit s gekennzeichnet. C. Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert. Immunkomplexe wurden mit Kontroll-IgG oder Antikörper gegen CD147 präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB mit Antikörpern gegen EpC, cld7 und CD147 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass palmitoyliertes cld7 nur schwach mit TJ-Proteinen assoziierte. Vielmehr wurde es in GEM rekrutiert, wo es mit dem Zytoskelett, Integrinen sowie Integrin-Signalpartnern, EpCAM und Proteasen assoziierte. Zudem trug palmitoyliertes cld7 zur Aktivierung von Integrinen und Proteasen sowie zur Spaltung von EpCAM bei, was sowohl die Motilität als auch die Invasivität förderte.

Verminderte Zell-Zell-Adhäsion, gesteigerte Motilität und Invasivität sind essentielle Komponenten bei der Metastasierung in den unterschiedlichsten Krebsarten. Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Kolonkarzinom EpCAM häufig mit cld7 assoziiert (Kuhn et al., 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass die Tumorfördernden Aktivitäten von EpCAM durch die Assoziation mit cld7 beeinflusst werden (Thuma and Zöller, 2013). Um die metastasenfördernden Aktivitäten von cld7 näher zu untersuchen, wurde ein Knockdown von cld7 in zwei humanen kolorektalen Karzinomzelllinien generiert.

3.5 Einfluss von Claudin-7 auf Tumorstammzell-Eigenschaften kolorektaler Karzinomzelllinien

Das Kolonkarzinom ist in der westlichen Welt eines der häufigsten Malignome und die 5-Jahresüberlebensrate beträgt im Stadium IV nur 3 bis 7 %. Wie bei den meisten Krebsarten wird davon ausgegangen, dass eine kleine Population von Tumorstammzellen (Chen et al., 2011b) für das Wachsen des Primärtumors sowie die Metastasierung verantwortlich ist (Scopelliti et al., 2009). Bisherige Untersuchungen haben EpCAM als Tumorstammzellmarker (TSZ) beim Kolonkarzinom beschrieben (Fanali et al., 2014). Unsere Gruppe hat gezeigt, dass die Koexpression von cld7 und EpC beim kolorektalen Karzinom mit einer schlechten Prognose korreliert (Kuhn et al., 2007). Untersuchungen im Pankreaskarzinom belegten, dass ein Knockdown von cld7 oder EpCAM die Metastasierungsfähigkeit deutlich reduziert. Zudem gab es Hinweise, dass EpCAM nur im Komplex mit cld7 für tumorstammzellspezifische Funktionen verantwortlich ist (Thuma and Zöller, 2013). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob ein Knockdown von cld7 (cld7^{kd}) zum Verlust von Stammzeleigenschaften humaner Kolonkarzinomzelllinien führt und ob die Metastasierungsfähigkeit beeinträchtigt ist.

Die Untersuchungen wurden mit den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29 und SW948 durchgeführt, die eine hohe Expression von EpCAM und cld7 aufweisen. Stabile cld7^{kd} Zelllinien wurden generiert, indem die Zellen mit cld7 shRNA unter Nutzung des pSuper / GFP / Neomycin-Vektors transfiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen, die eine effiziente Reduktion der cld7-Expression aufwiesen,

mittels Einzelklonierung selektioniert. Die Transfektionseffizienz sowie die Expression von EpCAM der wt und cld7^{kd} Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und WB untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der cld7^{kd} die Expression von EpCAM nicht beeinflusste (Abb. 31A, B). Jedoch konnten Unterschiede in der Morphologie der cld7^{kd} - und wt-Zelllinien insbesondere bei den SW948 Zellen beobachtet werden. So waren die Zell-Zell-Kontakte der SW948- cld7^{kd} Zellen im Vergleich zu den wt Zellen gelockert und einzelne Zellen waren deutlich sichtbar. HT29- cld7^{kd} Zellen hatten im Vergleich zu HT29^{wt} Zellen eine rundere Form und weniger Zellausläufer (Abb. 31C).

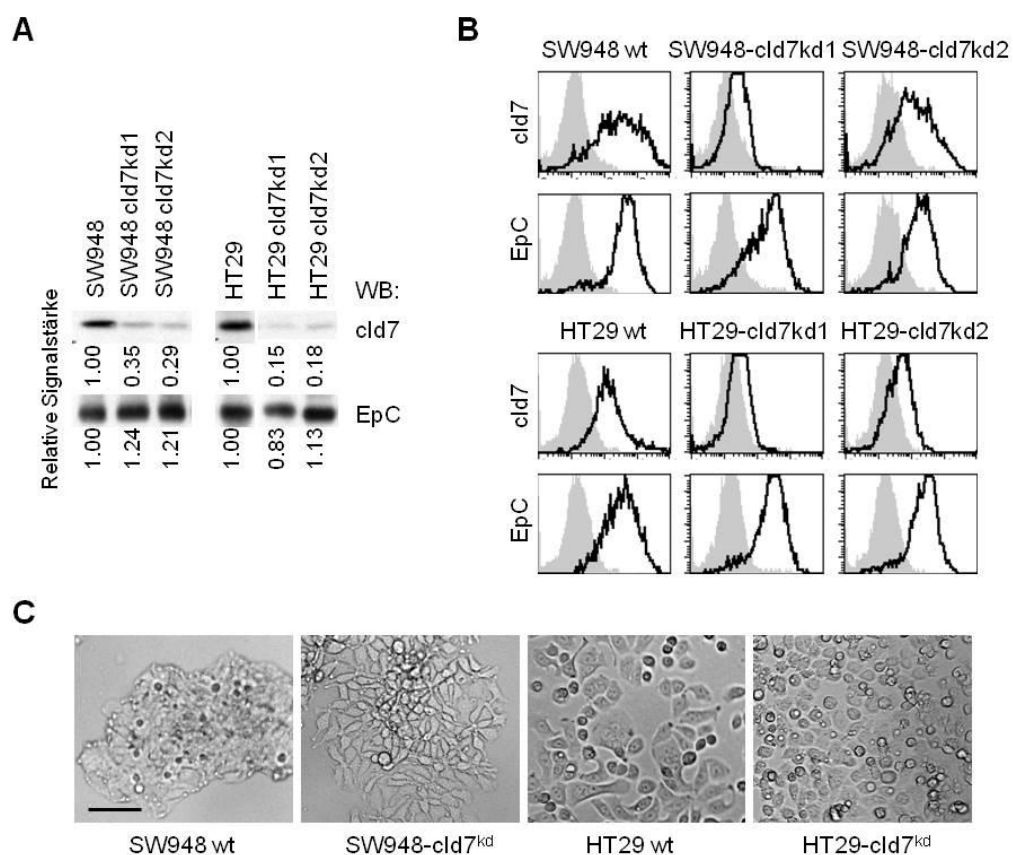


Abb. 31: Expression von cld7 und EpCAM in cld7 kd und wt Zelllinien

A. Zellen wurden mit Triton-X-100-Lysepuffer lysiert, in einem 12 % Gel aufgetrennt und im WB mit anti-EpC und anti-cld7 sowie HRP-markierten Sekundärantikörpern detektiert. B. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von EpCAM und cld7; Zellen wurden hierfür mit anti-EpC und anti-cld7 sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Überlagerung der Negativkontrolle (graue Fläche) und der Antikörperfärbung (schwarze Linie) exemplarischer Färbungen sind gezeigt. C. Repräsentative lichtmikroskopische Bilder der Morphologie von wt und cld7^{kd} Zellen (Maßstab: 25 μm).

TSZ sind durch eine Reihe von Markern definiert. Bei kolorektalen Tumorstammzellen umfassen diese CD44, CD44v6, EpC, Lgr5, CD133, CD166, Msi-1, CD29, CD24 (Fanali et al., 2014), Tspan8 und cld7 (Thuma and Zöller, 2013).

Die Expression von Tumorstammzellmarkern, wie CD44, CD44v6, CD49f, CD104, CD133, CD166, CD184, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) und Met, war bei beiden Zelllinien trotz des $cld7^{kd}$ unverändert (Abb. 32 A, B). Nur CD184, welches nur schwach exprimiert wurde, war geringfügig reduziert (Abb. 32A). Da der Knockdown von $cld7$ keinen Einfluss auf die Expression von Tumorstammzellmarkern hatte, wurde im nächsten Schritt kontrolliert, ob $cld7$ die Tumorstammzeleigenschaften von HT29 und SW948 Zellen beeinflusst.

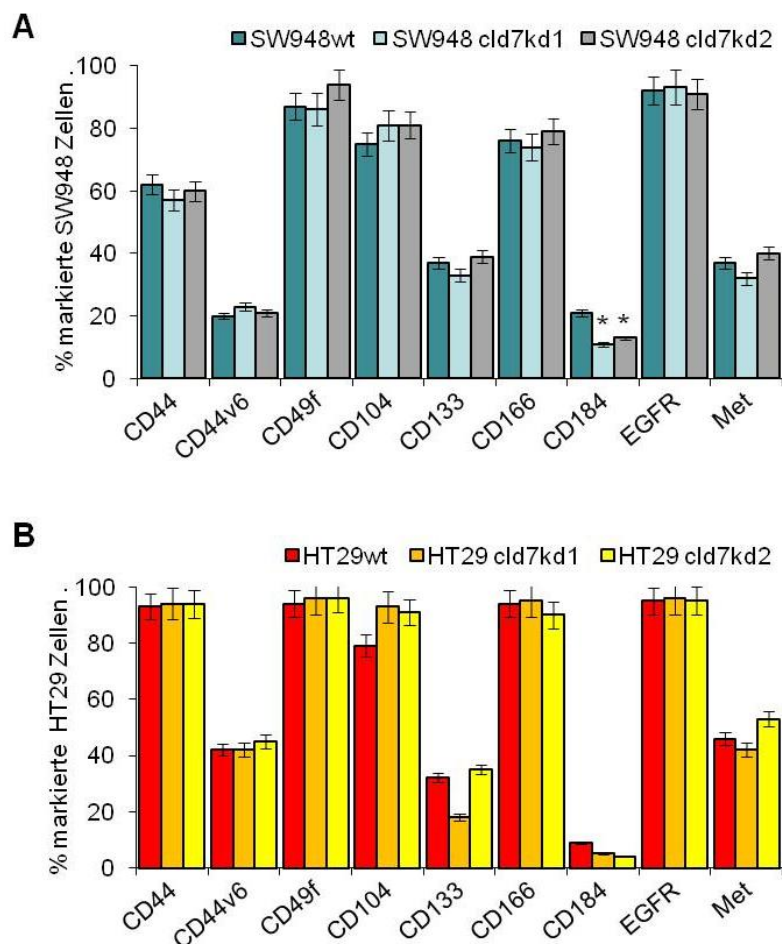


Abb. 32: Expression von Tumorstammzellmarkern in wt und $cld7^{kd}$ Zellen

A., B. Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Tumorstammzellmarkern wurden Zellen mit Antikörpern gegen Tumorstammzellmarker sowie Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Der prozentuale Anteil positiver SW948 (A) und positiver HT29 Zellen (B) (Mittelwerte \pm STAB; drei unabhängiger Versuche) ist angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen wt und $cld7^{kd}$ Zellen sind mit * gekennzeichnet.

Mithilfe des *soft agar colony formation assays* wurde das Koloniewachstum der Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen in 0,3 %igem Agar ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von drei Wochen konnte die Klonierungseffizienz, d. h. der Anteil der Zellen, die ausgehend von einer einzelnen Zelle eine Kolonie bilden können, ermittelt werden. Diese war bei HT29-cld7^{kd} um 50 % und um etwa 30 % bei SW948-cld7^{kd} Zellen reduziert (Abb. 33).

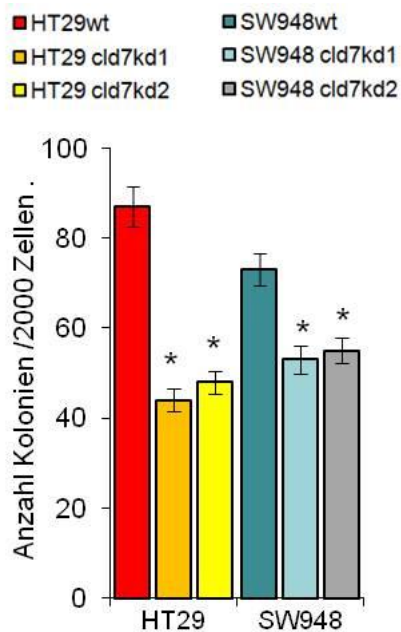


Abb. 33: Koloniewachstum von HT29 und SW948 wt und cld7^{kd} Zellen in *soft agar*

Koloniewachstum von HT29 und SW948 wt und jeweils zwei cld7^{kd} Zelllinien. Zellen wurden in 0,3 % Agar auf bereits mit 1% Agar beschichteten Platten ausgesät. Das Wachstum von Kolonien wurde nach drei Wochen ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm STAB von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen wt und cld7^{kd} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

TSZ können über sphäroides Wachstum oder die Bildung von Holoklonen angereichert werden (Tan et al., 2011; Vollmers et al., 2012; Wang et al., 2013). Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass Tumorzellen in Kultur verschiedene Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie bilden können (Locke et al., 2005; Tang et al., 2007; Vollmers et al., 2012). Holoklone sind kompakte Kolonien mit glatten Rändern, wohingegen Paraklone lockere Kolonien bilden und von ausdifferenzierteren Tochterzellen stammen. Die Morphologie der Meroklone liegt dazwischen (Barrandon and Green, 1987).

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass SW948 Zellen als Sphäroide und HT29 Zellen als Holoklone bzw. Mero- und Paraklone wachsen können (Abb. 34). Für das Sphäroidwachstum wurden SW948 Zellen in Medium ohne FCS auf Agarbeschichteten Platten ausgesät, sodass die Zellen nicht als Monolayer wachsen können. Die Kapazität der SW948-cld7^{kd} Zellen als Sphäroide zu wachsen, war im Vergleich zu den SW948^{wt} Zellen um das Zehnfache verringert. Nachdem die erste Passage von Sphäroiden erneut unter Sphäroid-Wachstumsbedingungen ausgesät wurde, stieg der Anteil von Sphäroiden, die aus der ersten Passage von SW948^{wt} Sphäroiden stammten, signifikant an. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Prozentsatz der Sphäroide aus der ersten Passage von SW948-cld7^{kd} Zellen nach wiederholtem Passagieren nicht (Abb. 34A).

Holoklone wurden kultiviert, indem 50 Zellen / cm² in Medium mit 5 % FCS ausgesät wurden. Mithilfe einer Kristallviolett-Färbung konnte die Anzahl an gebildeten Holoklonen, Meroklonen oder Paraklonen ermittelt werden. Für die Weiterkultivierung von Holoklonen wurden diese gepickt, passagiert und wie oben beschrieben kultiviert. Ähnliche Effekte der SW948-cld7^{kd} Zellen konnten auch bei HT29 Zellen beobachtet werden. Die Fähigkeit der HT29^{wt} Zellen als Holoklone zu wachsen, war bei den HT29-cld7^{kd} Klonen vermindert und wurde durch weiteres Passagieren nur geringfügig erhöht. Wohingegen sich die Anzahl von Holoklonen von HT29^{wt} Holoklonen nach der ersten Passage durch eine weitere Passage mehr als verdoppelte (Abb. 34B). Zudem zeigte eine durchflusszytometrische Analyse, dass die Expression von EpCAM und cld7 sowie der Tumorstammzellmarker, CD44v6 und Tspan8, in SW948 Sphäroiden und HT29 Holoklonen signifikant erhöht war (Abb. 34 E, F).

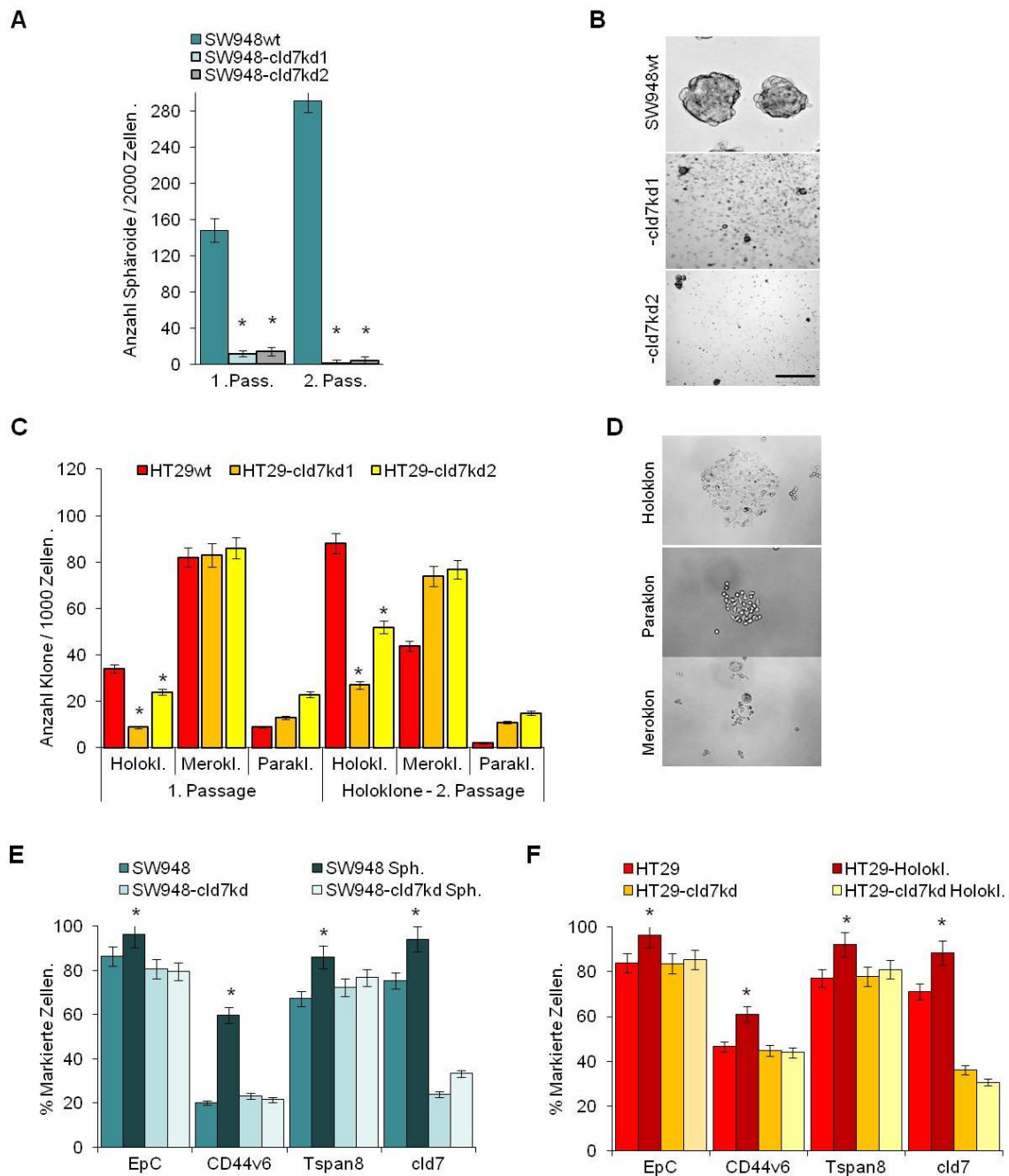


Abb. 34: Wachstum von Sphäroiden und Holoklonen und der Einfluss von cld7

A, B. SW948 Zellen (10^3 / ml) wurden in Medium ohne FCS in Agar beschichtete Platten ausgesät. Nach einer Woche wurde alle drei Tage die Hälfte des Mediums erneuert. Nach drei Wochen wurden die Sphäroide gezählt, gepickt wieder vereinzelt und weiter passagiert. Mittelwerte \pm STAB von drei unabhängigen Versuchen (A) sowie Beispiele (B) sind gezeigt. C, D. HT29 Zellen (50 Zellen / cm^2) wurden in Medium, das 5% FCS enthielt, ausgesät. Nach zwei Wochen wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt, um die Anzahl an gewachsenen Holoklonen, Meroklonen oder Paraklonen zu ermitteln. Zudem wurden Holoklone gepickt, vereinzelt und wie oben beschrieben erneut ausgesät. C. Signifikante Unterschiede zwischen wt und cld7^{kd} Zellen sind mit * gekennzeichnet. D. Beispiele für das Wachstum von Holoklonen, Meroklonen und Paraklonen von HT29^{wt} Zellen. E, F. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Tumorstammzellmarkern. SW948 (E) oder HT29 Zellen (F) wurden hierfür mit Antikörpern gegen EpCAM, CD44v6, Tspan8 oder cld7 sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Der prozentuale Anteil positiver Zellen \pm STAB von drei unabhängigen Versuchen

ist angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen wt Zellen und Sphäroiden bzw. Holoklonen sind mit * gekennzeichnet.

Zudem wurden die mesenchymalen Marker, die mit einem migratorischen Phänotyp assoziiert sind, untersucht. Sowohl bei den HT29- als auch bei den SW948-cld7^{kd} Zellen war E-Cadherin signifikant zu den wt Zellen erhöht, wohingegen E-Cadherin in Sphäroiden und Holoklonen signifikant verringert war (Abb. 35). Die Expression von N-Cadherin, FN und Vimentin war in den cld7^{kd} Zellen reduziert und in den Holoklonen sowie Sphäroiden erhöht, was auf einen mesenchymalen Phänotypen hindeutet.

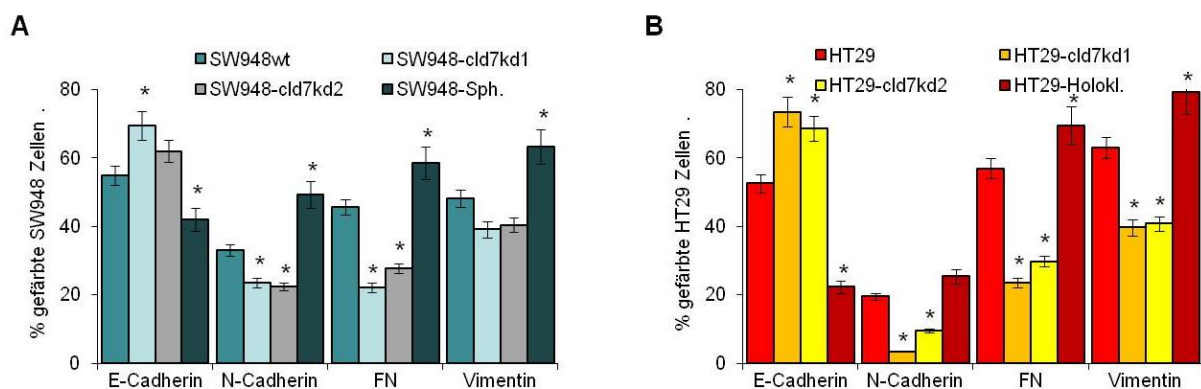


Abb. 35: Analyse der Expression mesenchymaler Proteine

A., B. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Proteinen in SW948^{wt}, -cld7^{kd}, Sphäroiden sowie in HT29^{wt}, -cld7^{kd} und Holoklonen wie angegeben; der mittlere Fluoreszenz-Index (% gefärbte Zellen x mittlere Intensität der Färbung ± STAB; drei unabhängige Versuche) ist dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen wt und cld7^{kd} Zellen, Sphäroiden bzw. Holoklonen sind mit * gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wachstumseigenschaften von Tumorstammzellen aufgrund eines cld7^{kd} in kolorektalen Karzinomzelllinien beeinflusst sind. Dies konnte sowohl anhand des Wachstums von Sphäroiden und Holoklonen als auch des Koloniewachstums beim *soft agar colony formation assay* gezeigt werden. Da in Sphäroiden und Holoklonen eine hohe cld7-Expression in mehr als 90 % der Zellen beobachtet wurde, waren Sphäroide und Holoklone der beiden Zelllinien als interne Kontrollen für den cld7^{kd} gut geeignet. Um zu überprüfen, ob der cld7^{kd} die Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen beeinflusst, wurden *in vivo* Experimente durchgeführt.

3.6 Claudin-7 fördert die Entstehung von Metastasen im kolorektalen Tumormodell

Die Metastasierung ist durch die Ausbreitung von malignen Zellen des Primärtumors in entfernt gelegene Gewebe gekennzeichnet. Die Bildung von Metastasen ist das größte Problem bei der Behandlung von Krebs und die Haupttodesursache von Krebspatienten (Geiger and Peeper, 2009). In einem Pankreaskarzinommodell der Ratte wurde eine deutlich reduzierte Metastasierungsfähigkeit von cld7^{kd} und EpC^{kd} Zellen festgestellt (Thuma and Zöller, 2013). Zudem gab es Hinweise, dass ausschließlich cld7 -assoziiertes EpCAM die Metastasierung bei gastrointestinalen Tumoren fördert (Kuhn et al., 2007; Nübel et al., 2009; Thuma and Zöller, 2013). Die in den vorherigen Kapiteln beobachteten metastasierungsfördernden Eigenschaften von cld7 im HEK Modell bekräftigen dies. Um den Einfluss von cld7 auf die Metastasierungsfähigkeit im humanen kolorektalen Karzinommodell zu untersuchen, wurden HT29^{wt} , zwei $\text{HT29-cld7}^{\text{kd}}$ Klone sowie HT29^{wt} -Holoklone entweder subkutan (s.c.) oder intravenös (i.v.) in NOD / SCID (*Non-Obese Diabetic, Severe Combined Immunodeficiency*) Mäuse injiziert.

Das Tumorwachstum von $\text{HT29-cld7}^{\text{kd}}$ Zellen begann im Vergleich zu den HT29^{wt} Zellen deutlich verzögert. Noch deutlicher war der Unterschied zu den Mäusen, denen HT29 Holoklone injiziert wurde. Bei diesen Tieren konnten bereits nach zehn Tagen kleine subkutane Tumore beobachtet werden, wohingegen bei den $\text{HT29-cld7}^{\text{kd}}$ -Gruppen erst nach etwa 24 Tagen kleine Tumore sichtbar waren. Der mittlere Tumordurchmesser war bei den Holoklon-Mäusen signifikant größer als bei den HT29^{wt} - oder $\text{HT29-cld7}^{\text{kd}}$ -Mäusen, deren Tumordurchmesser nach etwa 40 Tagen noch deutlich geringer war als der der HT29^{wt} -Gruppe (Abb. 36A). Wenn der subkutane Tumor einen Durchmesser von 1,5 cm erreichte oder die Mäuse Gewicht verloren, spätestens jedoch nach 210 Tagen, wurden die Tiere getötet. Die Mäuse, denen cld7^{kd} Zellen injiziert wurde, lebten deutlich länger als die Mäuse der HT29^{wt} - oder Holoklon-Gruppe (Abb. 36B, C).

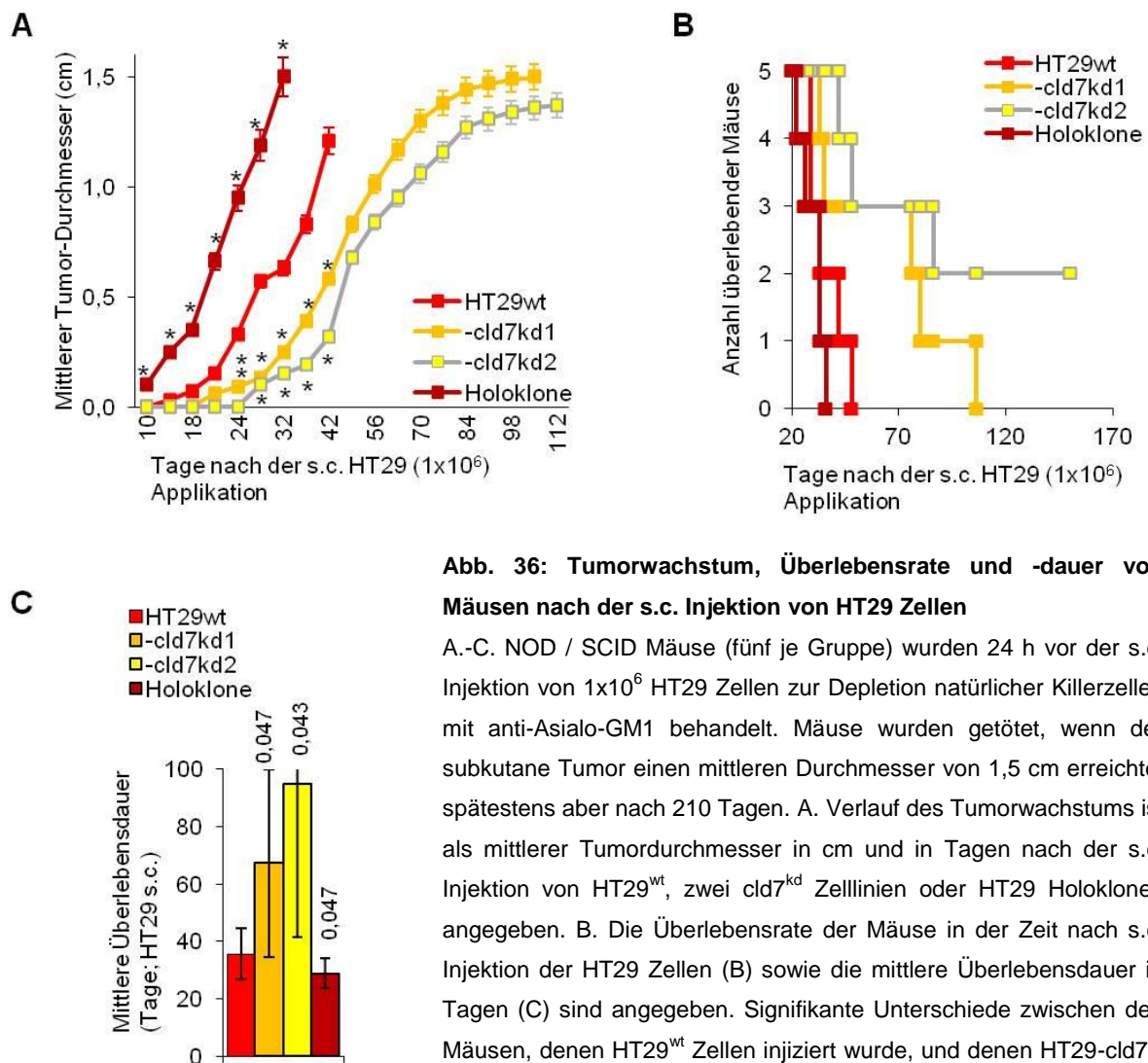


Abb. 36: Tumorwachstum, Überlebensrate und -dauer von Mäusen nach der s.c. Injektion von HT29 Zellen

A.-C. NOD / SCID Mäuse (fünf je Gruppe) wurden 24 h vor der s.c. Injektion von 1×10^6 HT29 Zellen zur Depletion natürlicher Killerzellen mit anti-Asialo-GM1 behandelt. Mäuse wurden getötet, wenn der subkutane Tumor einen mittleren Durchmesser von 1,5 cm erreichte, spätestens aber nach 210 Tagen. A. Verlauf des Tumorwachstums ist als mittlerer Tumordurchmesser in cm und in Tagen nach der s.c. Injektion von HT29^{wt}, zwei cld7^{kd} Zelllinien oder HT29 Holoklonen angegeben. B. Die Überlebensrate der Mäuse in der Zeit nach s.c. Injektion der HT29 Zellen (B) sowie die mittlere Überlebensdauer in Tagen (C) sind angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Mäusen, denen HT29^{wt} Zellen injiziert wurde, und denen HT29-cld7^{kd} oder HT29^{wt} Holoklon Zellen s.c. injiziert wurde, sind mit * gekennzeichnet (A) bzw. die P-Werte (C) angegeben.

In den drainierenden Lymphknoten (LK) von allen fünf Mäusen, denen Holoklone injiziert wurden, und bei drei von fünf Mäusen der HT29^{wt}-Gruppe konnten makroskopisch Metastasen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren die drainierenden LK der Mäuse, denen cld7^{kd} Zellen appliziert wurden, makroskopisch metastasenfrem. Zur weiteren Untersuchung der entnommenen Organe wurden Einzelzellsuspensionen von drainierenden LK, Milz, Knochenmark, periphere Blut-Leukozyten, peritoneale Exsudat-Zellen, Leber und Lunge durchflusszytometrisch analysiert sowie in Kultur genommen. Für die Analyse wurden die Zellen sowohl mit anti-EpC als auch mit anti-Tspan8 gefärbt, um vorhandene Tumorzellen in den jeweiligen Organen ermitteln zu können. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nur wenige Tumorzellen in den drainierenden LK von Mäusen, denen HT29-

cld7^{kd} Zellen injiziert wurde, waren. Zudem wurden nur wenige HT29-cld7^{kd} Zellen im peripheren Blut und sehr wenige in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark gefunden. Wohingegen all diese Organe eine signifikant höhere Anzahl von HT29^{wt} Zellen enthielten. Mit Ausnahme der Lunge war die Menge an Tumorzellen in den Organen der Mäuse, denen Holoklone appliziert wurden, noch höher als bei der HT29^{wt}-Gruppe (Abb. 37A). *Ex vivo* Kulturen zeigten, dass HT29^{wt} Zellen in drainierenden LK, im peripheren Blut und der Lunge von allen fünf Mäusen wuchsen. Wohingegen HT29-cld7^{kd} Zellen in drainierenden LK, Milz, Knochenmark und im peripheren Blut von nur einer bzw. zwei Mäusen wuchsen. In *ex vivo* Kulturen der Lunge wurden HT29-cld7^{kd} Zellen in drei von fünf Mäusen festgestellt. Tumorzellen in der Leber konnten bei drei von fünf Mäusen, denen Holoklone appliziert wurden, detektiert werden. Jedoch wurden in allen anderen Organen sowie im peripheren Blut aller fünf Mäuse der Holoklon-Gruppe Tumorzellen gefunden (Abb. 37B).

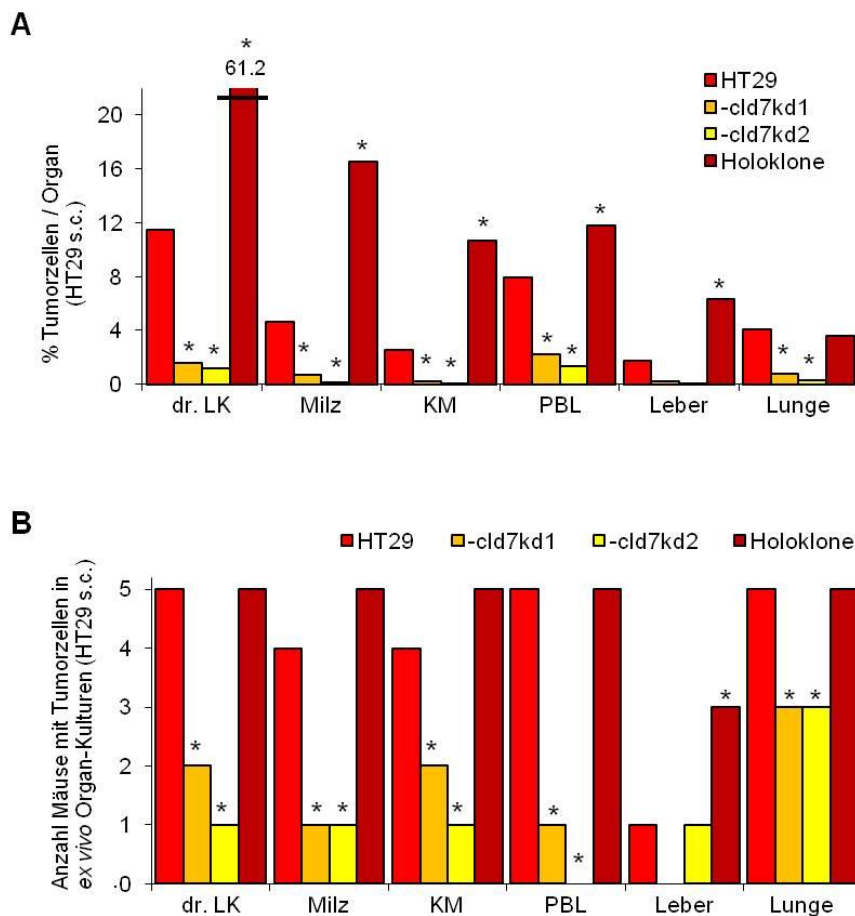


Abb. 37: Tumorzellen in den Organen von Mäusen nach subkutanem Wachstum von HT29 Zellen

A, B. Mäuse wurden behandelt wie in Abbildung 27 beschrieben. Alle Mäuse wurden ausgeblutet und Einzelzellsuspensionen von drainierenden Lymphknoten (dr. LK), Milz, Knochenmark (KM), peripheren Blut-Leukozyten (PBL), Leber und Lunge durchflusszytometrisch analysiert, um Tumorzellen in den Organen zu

detektieren. Hierfür wurden die Zellen mit anti-EpC und anti-Tspan8 sowie Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Zudem wurden die Zellsuspensionen der Organe bis zu vier Wochen lang kultiviert, um ein Wachstum von Tumorzellen zu ermitteln. Der mittlere Prozentsatz von Tumorzellen in Zellsuspensionen der Organe (A) sowie die Anzahl von Mäusen, bei welchen in *ex vivo* Kulturen Tumorzellen wuchsen (B), ist gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Mäusen, denen HT29^{wt}, HT29-cld7^{kd} oder HT29^{wt}-Holoklon Zellen s.c. injiziert wurde, sind mit * gekennzeichnet.

Neben der subkutanen Applikation wurden Tumorzellen auch i.v. in die Schwanzvene von NOD / SCID Mäusen injiziert. Sobald die Mäuse anfangen, Gewicht zu verlieren, spätestens jedoch nach 210 Tagen wurden die Tiere getötet. Ähnlich wie bei der s.c. Applikation führte auch die i.v. Injektion zu einer signifikant verlängerten Lebensdauer von Mäusen, denen HT29-cld7^{kd} Zellen injiziert wurden. Somit waren 210 Tage nach der Injektion immer noch fünf von zehn Tieren gesund (Abb. 38A, B). In den Lungen der Mäuse der HT29-cld7^{kd}-Gruppe konnten mit Ausnahme von einer Maus Metastasen gefunden werden. Mäuse, denen HT29^{wt} Zellen injiziert wurden, zeigten ungefähr achtzig Metastasen. Die fünf Mäuse der HT29-cld7^{kd}-Gruppe, die krank wurden, hatten hingegen null bis fünf Metastasen in der Lunge (Abb. 38C).

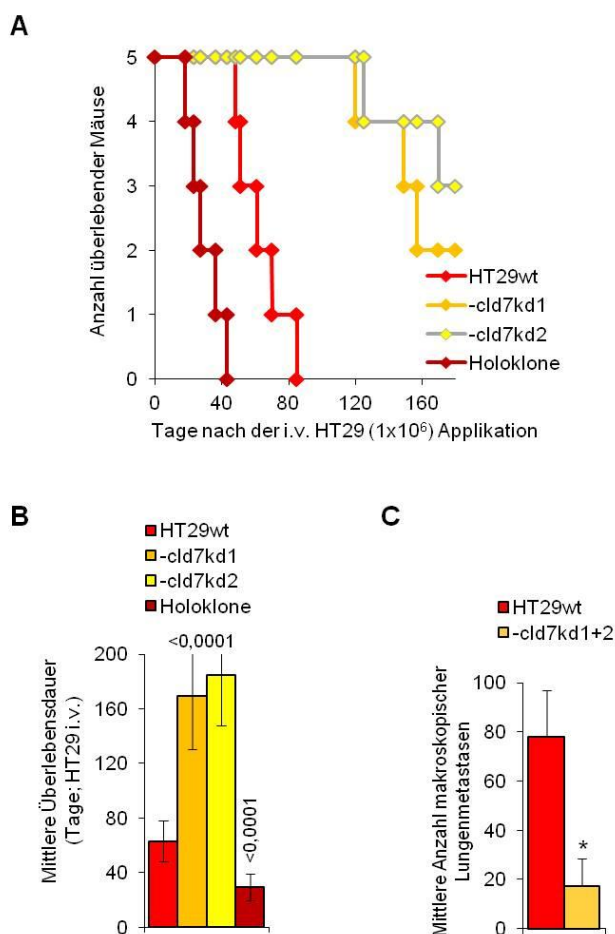


Abb. 38: Überlebensrate und -dauer von Mäusen nach i.v. Injektion von HT29 Zellen

A.-C. NOD / SCID Mäuse (fünf je Gruppe) wurden 24 h vor der i.v. Injektion von 1×10^6 HT29 Zellen zur Depletion natürlicher Killerzellen mit anti-Asialo-GM1 behandelt. Die Mäuse wurden getötet, sobald ein Gewichtsverlust festgestellt wurde, spätestens aber nach 210 Tagen. Die Überlebensrate der Mäuse in der Zeit nach der i.v. Injektion der HT29 Zellen (A) sowie die mittlere Überlebensdauer in Tagen nach der Injektion (B) sind angegeben. Die P-Werte der signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen, denen HT29^{wt} Zellen i.v. injiziert wurde, und Tieren, denen HT29-cld7^{kd} oder HT29^{wt}-Holoklone i.v. appliziert wurde, sind angegeben.

Die Zahl der Tumorzellen im Knochenmark von Mäusen, denen entweder HT29^{wt} oder HT29-cld7^{kd} Zellen appliziert wurde, unterschied sich nicht signifikant voneinander. Aber im Knochenmark und der Milz von Mäusen der Holoklon-Gruppe war die Anzahl an Tumorzellen signifikant erhöht. Im peripheren Blut, in der Milz und in der Lunge der Mäuse, denen cld7^{kd} Zellen injiziert wurde, befanden sich deutlich weniger Tumorzellen als bei der HT29^{wt}- oder Holoklon-Gruppe (Abb. 39A). Die *ex vivo* Kultur von Zellsuspensionen der Organe über einen längeren Zeitraum bestätigte, dass sich HT29-cld7^{kd} Zellen kaum in Lunge und Leber ansiedelten bzw. überleben konnten (Abb. 39B).

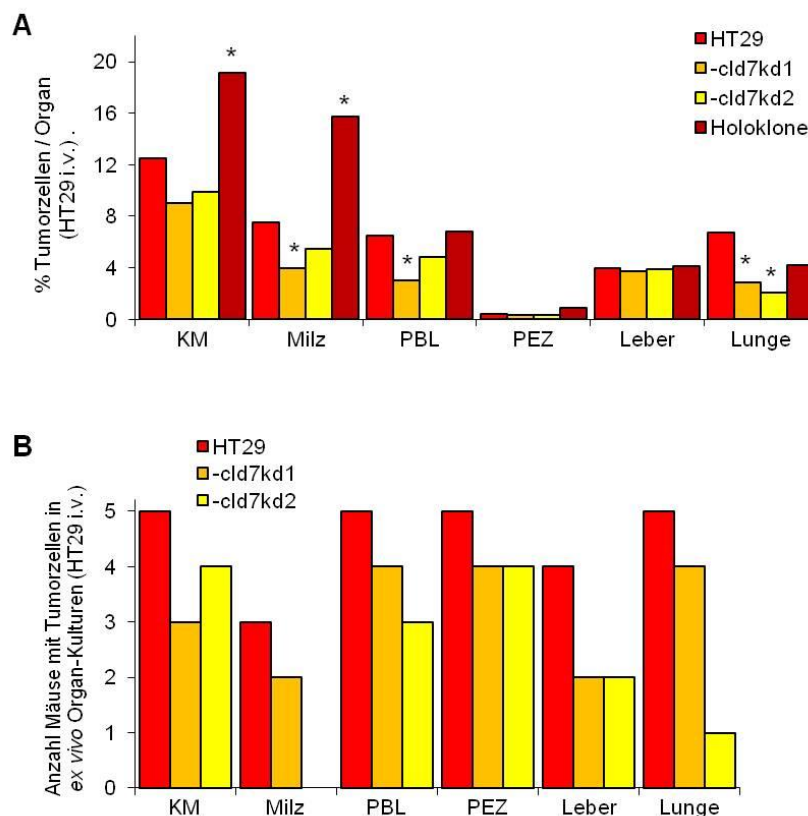


Abb. 39: HT29 Tumorzellen in den Organen von Mäusen nach Tötung und in *ex vivo* Kulturen

A, B. Mäuse wurden behandelt wie in Abbildung 36 beschrieben. Alle Mäuse wurden ausgeblutet und Einzelzellsuspensionen von drainierenden Lymphknoten (dr. LK), Milz, Knochenmark (KM), peripheren Blut-Leukozyten (PBL), Peritoneale-Exsudat-Zellen (PEZ), Leber und Lunge wurden durchflusszytometrisch analysiert, um Tumorzellen in den Organen zu detektieren. Hierfür wurden die Zellen mit anti-EpC und anti-Tspan8 sowie Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Zudem wurden die Zellsuspensionen der Organe bis zu vier Wochen lang kultiviert, um ein Wachstum von Tumorzellen zu ermitteln. Der mittlere Prozentsatz von Tumorzellen in Zellsuspensionen der Organe (A) sowie die Anzahl von Mäusen, bei welchen in *ex vivo* Kulturen Tumorzellen wuchsen (B), ist gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Mäusen, denen HT29^{wt}, HT29-cld7^{kd} oder HT29^{wt}-Holoklon Zellen i.v. injiziert wurde, sind mit * gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach einer s.c. oder i.v. Injektion von Tumorzellen cld7 die Ansiedlung in entfernt liegenden Organen unterstützt. Vorherige Beobachtungen der reduzierten Metastasierungsfähigkeit von cld7^{kd} Zelllinien im Pankreas-Tumormodell (Thuma and Zöller, 2013) konnten im humanen kolorektalen Tumormodell bestätigt werden.

4 Diskussion

Claudine sind für die Aufrechterhaltung epithelialer Barrieren unerlässlich. Dies gilt auch für cld7. So sterben cld7^{ko} Mäuse nur wenige Tage nach der Geburt aufgrund von Darmentzündungen (Ding et al., 2012). Dennoch kommt cld7 innerhalb der Claudin-Familie eine Sonderrolle zu, da es in vielen Epithelien, z.B. der Lunge, der Niere und des Gastrointestinaltrakts, auch außerhalb von TJs exprimiert wird (Coyne et al., 2003; Inai et al., 2007). Eine weitere Besonderheit stellt die Assoziation mit EpCAM dar. Diese Assoziation mit EpCAM, das keine Komponente von TJs ist, wurde in Vorläuferzellen der Leber, beim Schilddrüsenkarzinom und in gastrointestinalen Tumoren gezeigt. Des Weiteren wurde cld7 als metastasierungsfördernd beschrieben (Kuhn et al., 2007; Okada et al., 2014; Thuma and Zöller, 2013; Yovchev et al., 2008). Weder die Voraussetzung für eine Lokalisation von cld7 außerhalb von TJs noch die Funktionen von cld7 außerhalb von TJs waren hinlänglich bekannt. Ich konnte am Modell stabil transfizierter HEK Zellen nachweisen, dass die Nicht-TJ-Aktivitäten von cld7 maßgeblich durch die Palmitoylierung des Moleküls bestimmt werden. Diesen Befund und die funktionellen Konsequenzen der Palmitoylierung von cld7 möchte ich an erster Stelle diskutieren, um in der Folge auf die Relevanz der cld7-Palmitoylierung beim Metastasierungsprozess einzugehen.

4.1 Palmitoylierung von Claudin-7 und Tight Junctions

4.1.1 Palmitoyliertes Claudin-7 ist in den GEM angereichert

Als Modellsystem dienten HEK Zellen, die keine TJs haben und leicht zu transfizieren sind. Die HEK Zellen exprimierten stabil wt oder mutiertes cld7 und / oder EpCAM. Die Mutationen der Aminosäuren 184 und 186 am C-terminalen Ende von cld7 verhinderten effektiv die Palmitoylierung von cld7. Da beim Palmitoylierungsassay nur ein sehr schwaches Palmitoylierungssignal mit HEK-EpC-cld7^{mPalm} detektiert werden konnte, kann von einer Dominanz der Palmitoylierung am C-terminalen Ende von cld7 ausgegangen werden.

Die Palmitoylierung von Proteinen und auch andere Lipidmodifikationen, wie die Myristoylierung, sind für die Lokalisation von Proteinen in der Membran und für die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege von Bedeutung. So wird die Membranlokalisation und Aktivität vieler zytoplasmatischer Tyrosinkinasen der Src-Familie durch zweifache Acylierung reguliert (Resh, 1999). Die Anreicherung von Proteinen in den GEM kann insbesondere durch die Palmitoylierung von Proteinen gefördert werden (Levental et al., 2010b; Lorent and Levental, 2015). So führt die Palmitoylierung der Tetraspanine CD9 und CD81 zu einer Organisation eines höheren Ordnungsgrades von Membrankomplexen (Hemler, 2005; Yang et al., 2004). Für CD81 wurde beschrieben, dass es mit cld1 assoziiert. Die Interaktion fand ausschließlich an der basolateralen Oberfläche von HepG2 Zellen statt, wohingegen der "TJ-Pool" von cld1 nicht mit CD81 assoziierte (Harris et al., 2010).

Die Bedeutung der Palmitoylierung von Claudinen ist noch weitestgehend unbekannt. Van Itallie et al. (2005) zeigten, dass die Palmitoylierung von cld14 die Anreicherung dieses Proteins in den GEM fördert. Übereinstimmend damit konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass aufgrund der Mutation der Palmitoylierungsstelle am C-Terminus von cld7 kaum cld7 in die GEM rekrutiert wurde. Daher fokussierte ich meine Untersuchungen auf palmitoylierungsdefizientes cld7 und auf mutiertes EpCAM, das nicht mehr an cld7 binden kann (Nübel et al., 2009). Dadurch konnte zwischen eigenständigen cld7-Aktivitäten und den Funktionen, die eine Interaktion mit EpCAM erfordern, differenziert werden.

Die Palmitoylierung von Proteinen steigert deren hydrophobe Eigenschaften und fördert die Anreicherung in GEM (Diaz-Rohrer et al., 2014; Stepanek et al., 2014). GEM sind Signalplattformen, die die Anbindung zytoplasmatischer Kinasen unterstützen können (Claas et al., 2005; Ingley, 2008; Marhaba et al., 2006; Yanez-Mo et al., 2009). Des Weiteren sind GEM anfällig für Internalisierung (Marchese, 2014; Rana et al., 2012; Rodgers and Zavzavadjian, 2001; Stahl and Barbieri, 2002). Dies ist eine Folge der Anbindung von Komplexen, die die Abspaltung und den Transport von frühen Endosomen hin zu multivesikulären Körperchen, in denen die Proteine ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden, fördern (Piper and Katzmann, 2007). Alternativ können die multivesikulären Körperchen auch zurück in die Plasmamembran transportiert und die intraluminalen Vesikel als Exosomen abgegeben werden (Rana et al., 2012; Simpson et al., 2009). Interessanterweise wurden Claudine in Vesikeln detektiert und kolokalisierten mit Syntaxin4 (Ivanov et

al., 2004), aber diese Claudine wurden nicht wieder in TJs integriert. Da Syntaxin4 eine Komponente des Vesikeltransports ist (Ybe et al., 2000), gehe ich von unabhängigen Transportwegen von TJ- vs GEM-lokalisierter Claudine aus. In der Tat sezernieren Kolonkarzinomzellen zwei Populationen von Exosomen, wobei ausschließlich die Exosomen der basolateralen Region den EpCAM-cld7-Komplex enthalten (Tauro et al., 2013). Zudem hemmt die Assoziation von cld7 mit EpCAM die Integration von cld7 in TJs. Wu et al. (2013) zeigten, dass cld7 und cld1 fortwährend in Lysosomen transportiert und abgebaut werden. Wird jedoch EpCAM koexprimiert, sind einige Claudinmoleküle an der Zelloberfläche mit EpCAM assoziiert und dadurch vor dem lysosomalen Abbau geschützt und werden nicht in TJs integriert (Wu et al., 2013). Zudem hatte nicht palmitoyliertes cld7 signifikante Effekte auf assoziierende Moleküle und deren Aktivierung. So ko-immunpräzipitierten deutlich weniger Proteine mit cld7 in Lysaten von HEK-EpC-cld7^{mPalm}. Des Weiteren war die Phosphorylierung der ko-immunpräzipitierenden Proteine signifikant reduziert. Ähnliche Effekte wurden bei den HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen die direkte Assoziation von EpCAM mit cld7 (Ladwein et al., 2005) und weisen auf die bedeutende Rolle von palmitoyliertem cld7 bei der Aktivierung von assoziierenden Molekülen hin. Zudem assoziiert ausschließlich cld7, welches palmitoyliert werden kann, mit Vesikeltransportmolekülen. Es bleibt jedoch zu klären, ob cld7 eine zentrale Rolle bei der Zusammensetzung und Abgabe von Exosomen spielt.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Claudinen ist die Phosphorylierung, welche unterschiedliche Effekte auf die Aktivität und Lokalisation der Claudine hat. Ob phosphorylierte Claudine in TJs integriert werden ist dabei abhängig vom untersuchten Claudin und der Proteinkinase, welches das jeweilige Claudin phosphoryliert. So resultiert die Phosphorylierung von cld5 durch die Proteinkinase A in einer Inkorporation in TJs, während die Phosphorylierung mittels der Rho-Kinase das Gegenteil bewirkt (Ishizaki et al., 2003; Yamamoto et al., 2008). Ich habe sieben von zehn potentiellen Phosphorylierungsstellen von cld7 mutiert. Aber es konnten keine Unterschiede zwischen den HEK-EpC Zellen, die mit cld7 mit mutierten Phosphorylierungsstellen oder mit wt cld7 transfiziert wurden, festgestellt werden. Sowohl die Lokalisation von cld7^{mS} in den GEM als auch die Assoziation mit EpCAM blieb unverändert. Ich interpretiere diese Befunde dahingehend, dass zumindest in HEK Zellen aufgrund der Vielzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen von cld7

die Mutation einzelner Phosphorylierungsstellen nicht ausreichend war, um Effekte zu bewirken.

Für die Rekrutierung von Claudinen in TJs spielen nicht nur posttranslationale Modifikationen eine Rolle, sondern auch die Interaktion mit anderen Claudinen.

4.1.2 Interaktion von Claudin-7 mit anderen TJ-Proteinen

Claudine interagieren über homophile und heterophile Interaktionen innerhalb der Membran (cis) oder mit Claudinen von benachbarten Zellen (trans) miteinander (Günzel and Yu, 2013). Dies trägt zur Bildung von TJ-Strängen bei. Außerdem können Interaktionen mit ZO-Proteinen die Verankerung in den TJs stabilisieren. So verbinden ZO-Proteine Claudine über deren PDZ-Motive ihrer C-terminalen Enden mit dem Actin-Zytoskelett (Itoh et al., 1999; Van Itallie and Anderson, 2006).

Die Bedeutung von Claudin-Interaktionen für die Lokalisation in oder außerhalb von TJs, zeigte eine Studie von Hou et al. (2009). Überexprimiertes cld19 war im Gegensatz zu cld16 in TJs lokalisiert. Jedoch wurde cld16 in TJ-Stränge integriert, wenn cld19 koexprimiert wurde. Zudem interagieren diese beiden Claudine direkt miteinander. Es gab Hinweise, dass diese Interaktionen zwischen zwei Claudinen durch ihre Transmembrandomänen vermittelt werden und dies notwendig ist, um Claudine in TJs zu rekrutieren (Hou et al., 2009; Van Itallie and Anderson, 2013). Eine Studie von Van Itallie et al. (2005) zeigte, dass palmitoyliertes cld14 in den GEM angereichert und für die Lokalisation in TJs notwendig ist. Jedoch konnte keine Beteiligung von palmitoyliertem cld14 an TJ-Strängen festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Ausschließlich palmitoyliertes cld7 wurde in die GEM rekrutiert, jedoch assoziierte palmitoyliertes cld7 nicht mit anderen TJ-Proteinen. Während ZO-1 stark mit cld3 und cld4 assoziierte, kolokalisierte und ko-immunpräzipitierte wt cld7 nur schwach mit anderen TJ-Proteinen, wie cld3, cld4 und ZO-1. Die mutierte Palmitoylierungsstelle befindet sich am C-terminalen Ende von cld7 und resultierte in einer signifikanten Änderung der Interaktion von cld7^{mPalm} mit anderen TJ-Proteinen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Palmitoylierung von cld7 an dessen C-terminalem Ende zu einer Konformationsänderung führt und dadurch verhindert, dass cld7 mit anderen TJ-Proteinen interagieren kann und infolgedessen eine Integration in TJs verhindert

wird. Ob eine Überexpression von cld7 in HEK Zellen ausreichend ist, um TJs zu bilden, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Yamazaki et al. (2011) konnten jedoch zeigen, dass die Überexpression mehrerer Claudine in epithelähnlichen Zellen, die normalerweise keine TJ-Stränge bilden, polymerisieren und TJ-Stränge bilden können. Mehrere andere Claudine waren zwar in der lateralen Membran lokalisiert, polymerisierten aber nicht zu TJ-Strängen (Yamazaki et al., 2011). Da bei anderen Studien einige dieser Claudine in anderen nicht epithelialen Zellen TJ-Stränge bilden konnten, weist das darauf hin, dass die Polymerisierung von Claudinen vom zellulären Hintergrund beeinflusst sein könnte. Zudem könnten posttranslationale Modifikationen oder Interaktionen mit anderen zellspezifischen Proteinen für die Polymerisierung notwendig sein (Furuse et al., 1998b; Inai et al., 2010; Koval, 2013).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Palmitoylierung von cld7 die Lokalisation in Membranmikrodomänen bestimmt. Darüber hinaus ist die Palmitoylierung von cld7 für die Rekrutierung, Assoziation und Aktivierung einer Reihe von Molekülen erforderlich. Da einerseits palmitoyliertes cld7 nicht in TJs integriert wird und andererseits das Zelladhäsionsmolekül EpCAM nur mit palmitoyliertem cld7 assoziiert, konnte davon ausgegangen werden, dass cld7 in Abhängigkeit von der Palmitoylierung Adhäsion und Migration beeinflusst.

4.2 Der Einfluss von palmitoyliertem Claudin-7 auf die Zell-Zell-Adhäsion

Vorherige Untersuchungen in diesem Labor konnten zeigen, dass in gesundem sowie transformiertem Gewebe des Gastrointestinaltrakts cld7 mit EpCAM assoziiert. Die beiden Moleküle kolokalisierten vorwiegend in basolateralen Membranen (Ladwein et al., 2005). Lei et al. (2012) bestätigten die direkte Assoziation von EpCAM und cld7 im gesunden Darmepithel. Zudem war die fehlende EpCAM-Expression in EpCAM^{ko} Mäusen von einer signifikanten Reduktion der cld7-Expression begleitet. Die Autoren schlussfolgerten, dass EpCAM an der Bildung von funktionellen TJs im intestinalen Epithel beteiligt ist, indem EpCAM Claudine in Zell-

Zell-Verbindungen rekrutiert. Tanaka et al. (2015) zeigten hingegen mit einem darmspezifischen Ko von *cld7* in Mäusen, dass der Verlust von *cld7* die Expressionslevel von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, wie *cld4*, *cld8*, *cld15* und EpCAM, auf dem mRNA und / oder Proteinlevel verändert. Zudem gab es Hinweise, dass *cld7* EpCAM mittels eines posttranskriptionalen Mechanismus stabilisiert. Dies deutet darauf hin, dass *cld7* als ein Regulator für die Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen fungieren kann (Tanaka et al., 2015).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete signifikante Einfluss der Palmitoylierung von *cld7* auf die Umverteilung in die GEM und die Assoziation mit GEM-lokalisierten Molekülen deutet darauf hin, dass *cld7* TJ-unabhängige Funktionen erfüllt, die ich zuerst im Kontext der Assoziation mit EpCAM untersucht habe. Für die EpCAM-vermittelte, homophile Zell-Zell-Adhäsion ist eine Tetramerbildung von EpCAM erforderlich (Balzar et al., 2001). Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Assoziation von *cld7* mit EpCAM die Bildung von Tetrameren und somit die homophile EpCAM-Bindung beeinträchtigt (Kuhn et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die *cld7*-vermittelte Hemmung der homophilen EpCAM-Bindung von der *cld7*-Palmitoylierung und der Lokalisation in den GEM abhängig ist. Das *Shedding*-Enzym, TACE, spaltet Transmembranmoleküle an der Zelloberfläche, wodurch die extrazelluläre Domäne freigesetzt wird (Horiuchi, 2013). Da palmitoyliertes *cld7* EpCAM in die GEM rekrutiert, wird EpCAM für TACE zugänglich. Wird *cld7* nicht palmitoyliert, ist weniger TACE in den GEM angereichert. In der Folge wird weniger EpCAM gespalten und die Zellkulturüberstände von HEK-EpC^{mAG}-*cld7* und HEK-EpC-*cld7*^{mPalm} wiesen deutlich weniger EpEx als der Überstand von HEK-EpC-*cld7* Zellen auf. Eine Behandlung mit einem TACE-Inhibitor hemmte bei allen drei Zelllinien die Bildung von EpEx und bestätigte, dass TACE für die Abspaltung verantwortlich ist. Übereinstimmend hiermit wurde gezeigt, dass ein TACE-Inhibitor die EpEx Mengen im Zellkulturüberstand von Pankreas- und Kolonkarzinomzellen hemmt (Lin et al., 2012; Thuma and Zöller, 2013). Jedoch wurde keine Assoziation von TACE mit *cld7* in den Pankreaskarzinomzellen beobachtet (Thuma and Zöller, 2013).

4.3 Palmitoyliertes Claudin-7 fördert die Motilität

Palmitoyliertes cld7 fördert aktiv die Zellmotilität. Dies ist von einer Organisation des in HEK Zellen nicht organisierten Actin-Zytoskeletts begleitet (Auger-Messier et al., 2005). GEM-lokalisiertes, palmitoyliertes cld7 assoziiert mit CD166 und Integrin $\alpha 5$, welches das am höchsten exprimierte Integrin in HEK Zellen ist (Auger-Messier et al., 2005). Die Kolokalisation von cld7 mit dem Integrin $\alpha 5$ und dem Zelladhäsionsmolekül CD166 in den GEM ermöglicht die Assoziation und Phosphorylierung von c-Src, FAK und Paxillin.

Wie bereits erwähnt wurde, kooperiert cld7 mit TACE, welches auch das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül CD166 spaltet (Hansen et al., 2014; Rosso et al., 2007). Rosso et al. (2007) zeigten, dass ein TACE-Inhibitor die Zellmotilität von Ovarialkarzinomzellen hemmt, indem weniger CD166 gespalten wird. Die Spaltung von CD166 scheint dabei, ähnlich wie bei EpCAM, eine Rolle zu spielen und geht mit einem gesteigerten Tumorwachstum einher (Hansen et al., 2014). In Pankreaskarzinomzellen steigerte die Überexpression von CD166 zwar das Tumorwachstum, aber bei CD166^{kd} Zellen war die Migration und Invasivität erhöht (Fujiwara et al., 2014). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion von CD166 mit anderen Molekülen eine Rolle spielt. Die verminderte Lokalisation von TACE in den GEM von HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen könnte mit einer verringerten Spaltung von CD166 und somit einer verminderten Zellmotilität einhergehen.

Ezrin ist ein Bindeprotein zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett und ist an der Regulation des Umbaus des Actin-Zytoskeletts beteiligt (Bretscher et al., 2002; Föger et al., 2001; Hopkins et al., 2007; Rozsnyay et al., 1996). Die Phosphorylierung von Ezrin ist u.a. von c-Src abhängig und führt zur Aktivierung von Ezrin, wodurch die Actin- und Membranbindungsstellen freigelegt und nachgeschaltete Signalwege beeinflusst werden (Fievet et al., 2004; Föger et al., 2001; Heiska and Carpen, 2005; Marhaba et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit war die Assoziation von cld7 in den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen mit Integrinen und Ezrin sowie p-Ezrin vermindert. Die Rolle der Palmitoylierung wurde mithilfe eines Palmitoylierungsinhibitors bestätigt und zeigte, dass nur palmitoyliertes cld7 mit Ezrin interagiert. Da die Actin-Reorganisation in den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen nicht komplett verhindert war, gehe ich davon aus, dass cld7 nicht direkt mit Ezrin assoziiert ist. Vielmehr scheint die Bindung zwischen cld7 und dem Actin-Zytoskelett

durch cld7-assoziierte Moleküle, die direkt mit Ezrin interagieren, unterstützt zu werden. Übereinstimmend mit dieser Hypothese führte der cld7^{kd} einer Pankreaskarzinomzelllinie zu einer stark reduzierten Kollokalisierung und Assoziation von EpCAM mit Ezrin sowie dem $\alpha 6\beta 4$ Integrin. Im Gegensatz dazu war die Kollokalisierung von cld7 und Ezrin sowie dem $\alpha 6\beta 4$ Integrin im EpC^{kd} kaum beeinträchtigt. Zudem war die Migrationsfähigkeit der cld7^{kd} Zellen deutlich vermindert und in den cld7^{kd} Zellen konnte EpCAM nicht über das $\alpha 6\beta 4$ Integrin immunpräzipitiert werden (Thuma and Zöller, 2013). Dies weist auf die Bedeutung von cld7 bei der Komplexbildung hin, die auch in einer Studie zu den basolateralen Funktionen von cld7 in cld7-defizienten Mäusen bestätigt werden konnte. Die reduzierte cld7-Expression in den Epithelzellen der cld7^{ko}-Mäuse führte zu einer verminderten Expression und veränderten Lokalisation von Integrin $\alpha 2$. Darüber hinaus war die Komplexbildung von cld7, Integrin $\alpha 2$ und cld1, die unter normalen Bedingungen in epithelialen basolateralen Kompartimenten des Darms vorgefunden wird, verhindert (Ding et al., 2012). Tabaries et al. (2011) zeigten, dass cld2 die Zell-Matrix-Adhäsion unterstützt, indem es die Expression von $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrinkomplexen an der Zelloberfläche erhöhte. Dadurch wurde die Bildung von Lebermetastasen gefördert (Tabaries et al., 2011). Wie Claudine die Expression und Komplexbildung von Integrinen beeinflussen ist noch weitgehend unbekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass die Palmitoylierung von cld7 für die Rekrutierung von Integrinen in die GEM und damit für die Motilität der Zellen eine bedeutende Rolle spielt. Entsprechende Untersuchungen mit Tetraspaninen unterstützen diese Annahme (Gesierich et al., 2005; Yang et al., 2004; Zöller, 2009). Des Weiteren könnte die Assoziation von cld7 mit Integrinen bei der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege von Bedeutung sein, da die Assoziation von cld7^{mPalm} mit den Tyrosinkinase FAK und c-Src verringert war. Integrine besitzen keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. FAK ist häufig mit Integrinrezeptoren assoziiert. Binden Integrine an die EZM-Proteine wird FAK in fokale Adhäsionen rekrutiert und durch Autophosphorylierung an Tyr397 aktiviert. Hierdurch wird c-Src phosphoryliert, welche im Gegenzug FAK in der Aktivierungsregion phosphoryliert. Dies resultiert in einer vollständigen Aktivierung von FAK. Aktiviertes FAK ermöglicht die Rekrutierung weiterer Plaque- und Signalmoleküle in fokale Adhäsionen und in der Folge die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Die **Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)** ist eine der FAK-

aktivierten Kinasen, welche im Gegenzug die Proteinkinase B (PKB / Akt) rekrutiert und aktiviert. Der **Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)**-Weg ist eine weitere Signalkaskade, die durch die FAK-Aktivierung ausgelöst wird. Diese zahlreichen nachgeschalteten, aktivierten Signalwege haben wichtige Funktionen beispielsweise bei der Adhäsion, Migration, Proliferation und dem Überleben der Zellen (Canel et al., 2013; Jung et al., 2009; Marhaba et al., 2006; Paoli et al., 2013).

Die gestörte Assoziation von $\text{cld7}^{\text{mPalm}}$ mit Integrinen und Ezrin weisen auf die Bedeutung der Lokalisation in Membranmikrodomänen, die als Signalplattformen dienen, hin. Dies könnte eine Erklärung für die signifikanten Effekte auf die Zellmotilität und Organisation des Zytoskeletts der HEK-EpC-cld7 Zellen sein.

4.4 Claudin-7 und Invasivität

Invasivität und Metastasierung erfordern neben der Reduktion zellulärer Adhäsion das Überwinden mehrerer Barrieren, wie z.B. der endothelialen Basalmembran und das umgebende Stroma. Hierfür ist ein Umbau der EZM notwendig. Dies erfolgt mittels der Proteolyse durch Proteasen, wie den MMPs und uPAR (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*). Im aktivierten Zustand bauen MMPs die EZM proteolytisch ab und führen zu Veränderungen von Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen (Fillmore et al., 2001; Gialeli et al., 2010; Kessenbrock et al., 2010; Mu et al., 2013).

Bei HEK-cld7, HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen konnten reduzierte Expressionslevel von MMP3, MMP7 und MMP9 festgestellt werden, die von der Palmitoylierung unabhängig waren. Auch Ding et al. (2012) beobachteten in cld7^{ko} Mäusen reduzierte Expressionslevel von MMP3. Die Expression anderer MMPs, wie MMP2 und MMP14, wurden von der cld7-Expression in den HEK Zellen nicht beeinflusst. Dennoch zeigten HEK-cld7 Zellen invasives Potential. Da die Expressionslevel der MMPs nicht für die gesteigerte Invasivität verantwortlich sein konnten, wurde die Aktivität von MMP2 und MMP9 untersucht. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich die Zellen, die wt cld7 exprimierten, eine gesteigerte Aktivität von MMP2 und MMP9 aufwiesen. Zudem kolokalisierte MMP14 schwach mit cld7. Auch andere Studien haben gezeigt, dass Claudine die

Zellmigration und Invasivität mittels Claudin-assoziiierter Veränderungen der Expression und Aktivität von MMPs beeinflussen können. Beim metastasierenden Magenkrebs ist cld4 überexprimiert und geht mit einer erhöhten Aktivität von MMP2 und MMP9 einher (Hwang et al., 2014). Eine erhöhte mRNA Transkription und Proteinexpression von membrangebundenem MMP14 wurde in cld10 überexprimierenden Leberkarzinomzellen beobachtet. Dies führte zu einer gesteigerten Motilität und Invasivität. Die Überexpression von cld10 erhöhte zudem die Expressionslevel anderer Claudine, wie cld1, cld2 und cld4, was darauf hindeutet, dass in Tumorzellen cld10 die Expression anderer Claudine regulieren kann (Ip et al., 2007). Im Gegensatz dazu resultiert die Überexpression von cld16 in Mammakarzinomzellen in einer signifikanten Reduktion der Motilität und Invasivität. Außerdem konnte eine erhöhte Adhäsion an die EZM beobachtet werden und die Funktionalität der TJs war erhöht, was mit einem weniger aggressiven Phänotypen einherging (Martin et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Claudine die Expression und Aktivität von MMPs beeinflussen können. Erhöhte bzw. reduzierte Expression oder Aktivität der MMPs variiert jedoch zwischen den einzelnen Claudinen und in Abhängigkeit vom Zelltyp.

Wie bereits erwähnt wurde, war die Zell-Zell-Adhäsion von HEK-EpC-cld7 Zellen im Vergleich zu den HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen deutlich vermindert. Zudem konnte eine verminderte Expression von E-Cadherin festgestellt werden. Interessanterweise gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen E-Cadherin und MMPs. Die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin wird von der α -Secretase gespalten. Diese Reaktion wird u.a. von einigen MMPs, wie MMP3, MMP7, MMP9 und MMP14, katalysiert (David and Rajasekaran, 2012). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die abgespaltene extrazelluläre Domäne von E-Cadherin die Zell-Zell-Adhäsion stört und zu einer gesteigerten Migration und Invasion führen kann (Chunthapong et al., 2004; Ito et al., 1999; Symowicz et al., 2007). Gespaltenes E-Cadherin kann diese Veränderungen über verschiedene Mechanismen beeinflussen. Zunächst einmal führt die Spaltung von E-Cadherin dazu, dass weniger adhäsionskompetentes E-Cadherin in der Plasmamembran verfügbar ist. Außerdem kann gespaltenes E-Cadherin ungespaltenes Cadherin in der Plasmamembran blockieren und somit die Bildung von homophilen Bindungen zwischen E-Cadherinen benachbarter Zellen verhindern (David and Rajasekaran, 2012; Davies et al., 2001). Zudem verursacht die extrazelluläre Domäne von E-

Cadherin erhöhte Expressionslevel von MMPs, wie MMP2, MMP9 und MMP14, die die Basalmembran degradieren und hierdurch die Invasivität steigern können (Nawrocki-Raby et al., 2003). Da beschrieben wurde, dass MMP9 die Spaltung von E-Cadherin unterstützt, weist dies auf einen MMP-abhängigen positiven Feedbackmechanismus hin, bei welchem die Spaltung von E-Cadherin mittels MMPs in einer gesteigerten MMP-Expression resultiert (David and Rajasekaran, 2012; Jodele et al., 2006; Takahashi et al., 2002). Die verminderte E-Cadherin-Expression könnte in der Spaltung von E-Cadherin begründet sein, da der verwendete Antikörper gegen E-Cadherin an die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin bindet. Ob jedoch die Spaltung von E-Cadherin bei den HEK-EpC-cld7 Zellen die MMPs beeinflusst, ist nicht sehr wahrscheinlich, da die Expression einiger MMPs in HEK-EpC-cld7 Zellen vermindert oder unverändert war. Aber es gibt Hinweise, dass die Expression von CD147 mit der E-Cadherin-Expression negativ korreliert (Wu et al., 2015; Wu et al., 2011). HEK Zellen weisen unabhängig von der Transfektion mit EpCAM und / oder cld7 hohe Expressionslevel von CD147 auf, welches die Expression von MMPs induzieren und stabilisieren kann (Jiang and Tang, 2007). In den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen war die MMP-Aktivität leicht vermindert. Dahingegen war die Assoziation von CD147 mit cld7^{mPalm} reduziert und insbesondere die Assoziation von EpCAM und CD147 der HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen stark vermindert. Jedoch war die Invasionsrate von HEK-cld7 Zellen im Vergleich zu den HEK-EpC Zellen deutlich gesteigert. Dies weist darauf hin, dass die Lokalisation von palmitoyliertem cld7 in den GEM die Invasivität fördert und EpCAM diesen Prozess unterstützen kann, wenn palmitoyliertes cld7 vorhanden ist. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen jedoch noch geklärt werden. Die Rolle von CD147 bei der Invasion der HEK Transfektanten wurde durch die Behandlung mit einem Antikörper gegen CD147, welcher zur einer Hemmung der Invasionsrate der Zellen führte, bestätigt. Für CD147 wurde eine Interaktion mit Integrinen beschrieben und eine Rolle bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion. Aber CD147 assoziiert nicht mit Integrin $\alpha 5\beta 1$ (Berditchevski et al., 1997; Jiang and Tang, 2007), das in HEK Zellen stark exprimiert wird und scheint somit keinen Einfluss auf die Adhäsion der HEK Zellen zu haben. Vielmehr fördert CD147 die Invasivität der HEK-cld7, HEK-EpC-cld7 Zellen und auch der HEK-EpC^{mAG}-cld7 Zellen. Dies weist darauf hin, dass die Palmitoylierung von cld7 und die damit einhergehende Lokalisation in den GEM für die Invasivität entscheidend sind.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde die Bedeutung von CD147 bei der Invasion von Tumorzellen vielfach beschrieben (Hanata et al., 2007; Pan et al., 2012; Stenzinger et al., 2012; Zhu et al., 2013). So wurde eine Kollokalisation von CD147 mit MMP14 gezeigt. Zudem assoziierten die Proteine in *Lipid Rafts* und waren in der Lage, die Invasivität und die Bildung von protrusiven Strukturen bei einer nicht transformierten, nicht invadierenden Epithelzelllinie der Brust zu induzieren (Grass et al., 2012). Des Weiteren kann CD147 die Bildung eines MMP-Komplexes in Endothelzellen fördern. Hierdurch wird die Matrix, welche die Tumorzellen umgibt, modifiziert und die Invasivität gefördert (Menashi et al., 2003). CD147 ist aufgrund der Assoziation mit Laktattransportern, den Monocarboxylat-Transportern (MCT), insbesondere mit dem MCT-1 und MCT-4, in der Lage, den Laktattransport und die Glykolyse zu beeinflussen, was für Tumorzellen von Vorteil ist (Philp et al., 2003). CD147 ist für die Lokalisation und Funktion von MCT-1 und MCT-4 in der Plasmamembran essentiell (Kirk et al., 2000). Die massenspektrometrische Proteinanalyse von cld7-Immünpräzipitaten bestätigte, dass cld7 in HEK-EpC-cld7 Zellen mit CD147 und MCT-1 assoziiert ist, jedoch nicht in HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen. Übereinstimmend damit, zeigte eine Studie mit einem CD147^{kd} in HT29 Zellen, dass die mRNA- und Proteinexpressionslevel von CD147 und MCT-1 signifikant reduziert waren und auch die Aktivität von MMP2 und MMP9 vermindert war. Zudem waren die Invasivität der Zellen und das *in vivo* Tumorwachstum verringert (Li et al., 2013).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die leicht reduzierte Expression von einigen MMPs keinen Effekt auf die Invasivität hatte. Vielmehr förderte die Assoziation von palmitoyliertem cld7 mit MMP14 und CD147 die Invasivität. Die beobachteten Einflüsse von cld7 auf die Motilität und Invasivität konnten *in vivo* bestätigt werden.

4.5 Claudin-7, EMT und Metastasierung

Der Hauptgrund krebsbedingter Todesfälle ist die Metastasierung, d.h. die Ansiedlung von Krebszellen des Primärtumors in entfernt gelegenen Organen. Das Schlüsselereignis, von dem angenommen wird, dass es Krebszellen befähigt zu

metastasieren, ist die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT). Dieser Prozess beschreibt die Transformation von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp und ist reversibel (Spaderna et al., 2006; Thiery, 2002). Hierbei werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Expression von spezifischen Zelloberflächenproteinen sowie microRNAs verändert und EZM-degradierende Enzyme gebildet. Die Epithelzellen regulieren ihre Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen, verändern ihre Polarität und reorganisieren ihr Zytoskelett. Dadurch ist deren Fähigkeit, in das umgebende Stroma zu migrieren und in fremdes Gewebe einzudringen, erhöht (Kalluri, 2009; Thiery et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen spielt die EMT in der Embryonalentwicklung und bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle. Die EMT geht mit einer erhöhten Motilität und Invasivität einher, was sich epitheliale Tumorzellen beim Prozess der Metastasierung zunutze machen (Scheel and Weinberg, 2012; Thiery and Sleeman, 2006).

4.5.1 Der Einfluss von Claudin-7 auf mesenchymale Proteine

An der Initiation und dem Prozess der EMT sind u.a. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Veränderungen der Expression von spezifischen microRNAs beteiligt (Kalluri, 2009; Scheel and Weinberg, 2012). Der Prozess der EMT kann durch einige Wachstumsfaktoren eingeleitet werden, dazu gehören beispielsweise TGF- β , FGF, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) sowie der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), der die Rezeptortyrosinkinase, c-Met, aktiviert (Liu et al., 2015; Mori et al., 2015; Shiozaki et al., 1995; Weidner et al., 1993; Zavadil and Bottinger, 2005). In den HEK-EpC-cld7 Zellen wurde FGF und TGF- β erhöht exprimiert. Aktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren initiieren intrazelluläre Signalkaskaden (Efstathiou et al., 1999) und u.a. den Transport von EMT-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Die meisten EMT-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Snail und Slug, reduzieren direkt die Expression von Mediatoren der epithelialen Adhäsion, von denen E-Cadherin der wichtigste ist (Scheel and Weinberg, 2012). Die Expression von E-Cadherin war in den HEK-EpC-cld7 Zellen im Vergleich zu den HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen vermindert. Übereinstimmend damit war E-Cadherin in HT29^{wt}, SW948^{wt} Zellen, Holoklonen und Sphäroiden im Vergleich zu den cld7^{kd} Zellen reduziert. Neben der reduzierten Expression von E-

Cadherin können während der EMT erhöhte Expressionslevel von mesenchymalen Markern, wie N-Cadherin, dem mesenchymalen Intermediärfilament Vimentin und dem EZM-Protein Fibronectin festgestellt werden (Cano et al., 2000; Scheel and Weinberg, 2012). In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit in den HEK-EpC-cld7 Zellen eine erhöhte Expression der mesenchymalen Marker Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin beobachtet werden, jedoch nicht in HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen. Auch in den HT29^{wt}, SW948^{wt} sowie in den Holoklonen und Sphäroiden konnten erhöhte Expressionslevel mesenchymaler Proteine detektiert werden. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von palmitoyliertem cld7 und EpCAM und deren Lokalisation in den GEM dazu führt, dass die Zellen teilweise den Prozess der EMT durchlaufen. Die erhöhte Expression von mesenchymalen Proteinen könnte im Zusammenhang mit der erhöhten Freisetzung des Kotranskriptionsfaktors EpIC in den HEK-EpC-cld7 Zellen stehen.

4.5.2 Der Einfluss von Claudin-7 auf die Generierung des Kotranskriptionsfaktors EpIC

Palmitoyliertes cld7 kann zur EMT beitragen, indem die Bildung von EpIC mittels der intramembranären Proteolyse von EpCAM durch Presenilin-2 unterstützt wird. Mit einem Antikörper gegen EpIC konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionslevel von EpIC in den HEK-EpC^{mAG}-cld7, HEK-EpC-cld7^{mPalm} sowie in HEK-EpC-cld7 Zellen, die mit einem Palmitoylierungsinhibitor behandelt wurden, deutlich reduziert waren. Der Kotranskriptionsfaktor EpIC wird von Presenilin-2, welches Teil des γ -Secretase-Komplexes ist, abgespalten (Maetzel et al., 2009). Presenilin-2 ist in den GEM lokalisiert (Runz et al., 2002) und assoziiert mit palmitoyliertem cld7. In den HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen war Presenilin-2 in den GEM angereichert, aber cld7^{mPalm} assoziierte mit Presenilin-2 ausschließlich außerhalb der GEM-Fraktionen. Dies weist darauf hin, dass die GEM-Lokalisation für die Spaltung von EpCAM von Bedeutung ist und palmitoyliertes cld7 zu einer erhöhten, intrazellulären Freisetzung des Kotranskriptionsfaktors EpIC beiträgt. Im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom konnte eine erhöhte Abspaltung von EpEx sowie gesteigerte zytoplasmatische und nukleäre EpIC-Expressionen festgestellt werden (Ralhan et al., 2010a). Hierbei handelt es sich um eine seltene und

besonders aggressive Form des Schilddrüsenkarzinoms, bei welchem eine Koexpression von EpCAM und cld7 detektiert werden konnte (Okada et al., 2014). Die Bildung von EpIC ist jedoch nicht notwendigerweise von einer cld7-Koexpression abhängig, da EpIC auch in HEK-EpC Zellen sowie in Karzinomen ohne eine gleichzeitige Expression von cld7 detektiert werden kann (Maetzel et al., 2009; Ralhan et al., 2010b). Immunhistologische Untersuchungen der Expression von nukleärem und zytoplasmatischem EpIC vieler verschiedener Karzinome, wie der Lunge, Leber, des Kolon, Pankreas und des Ösophagus ergaben unterschiedliche Expressionsprofile, wenn diese mit normalem Gewebe verglichen wurden (Ralhan et al., 2010b). Nichtsdestotrotz erhöhte die Rekrutierung von EpCAM mittels palmitoyliertem cld7 in die GEM und die direkte Interaktion von EpCAM und cld7 die Freisetzung des Kotranskriptionsfaktors EpIC. Dies kann in einer erhöhten Expression von mesenchymalen Markern resultieren und somit den Prozess der EMT vorantreiben.

Neuere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen EMT und Tumorstammzellen (TSZ) feststellen. Zudem gibt es Hinweise, dass diese Prozesse mit der Progression von Tumoren und Therapieresistenz assoziiert sind (Dallas et al., 2009; Fan et al., 2012).

4.5.3 Der Einfluss von Claudin-7 auf kolorektale

Tumorstammzellmarker und Stammzeleigenschaften

Beim kolorektalen Karzinom ist EpCAM als ein TSZ-Marker bereits beschrieben worden (Dalerba et al., 2007; Fanali et al., 2014; Le Naour and Zoller, 2008). Vorherige Untersuchungen deuteten darauf hin, dass beim Kolorektalkarzinom der Beitrag von EpCAM zur Tumorprogression essentiell von der Interaktion mit cld7 abhängig ist (Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005). Übereinstimmend damit führte ein Knockdown von cld7 oder EpCAM in einem Pankreaskarzinommodell der Ratte zu einer signifikanten Reduktion der Bildung von Metastasen. Cld7 schien hierbei die treibende Kraft zu sein (Thuma and Zöller, 2013). Dies habe ich unter Berücksichtigung von Tumorstammzellen in kolorektalen Karzinomzelllinien überprüft.

Ein cld7^{kd} in HT29 und SW948 Zellen beeinflusste die Morphologie der Zellen. Bei den SW948 Zellen waren die sehr dichten Zell-Zell-Kontakte deutlich verringert und die HT29- cld7^{kd} Zellen wiesen eine rundere Form mit weniger Zellausläufern im Vergleich zu den wt Zellen auf. Aber die Expression weder von EpCAM noch von anderen kolorektalen TSZ-Markern war maßgeblich beeinflusst. Daher wurde der Einfluss des Verlustes von cld7 auf die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden zunächst TSZ mittels des Wachstums von Sphäroiden der SW948 Zellen und Holoklonen der HT29 Zellen angereichert. Diese Zellkulturmethoden wurden mehrfach als geeignete Bedingungen zur Anreicherung von adulten Stammzellen wie auch TSZ beschrieben. Eine Studie mit primären epidermalen Kulturen zeigte, dass Keratinozyten mittels einer Stammzellkulturmethode als Holoklone, Meroklone und Paraklone wuchsen. Die Holoklone waren vorwiegend mit Stammzellen angereichert, während die Meroklone aus Stamm- und Vorläuferzellen und Paraklone hauptsächlich aus differenzierten Zellen bestanden (Vollmers et al., 2012). Auch in einer humanen Prostatakarzinomzelllinie konnte in Holoklonen eine Anreicherung von selbsterneuernden TSZ festgestellt werden (Li et al., 2008). Wang et al. (2013) zeigten, dass in Pankreaskarzinomzelllinien die Bildung von Sphäroiden und Holoklonen durch wiederholtes Passagieren erhöht werden konnte und diese eine Anreicherung von TSZ zeigten. Übereinstimmend damit wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Kapazität, Sphäroide und Holoklone zu bilden, durch wiederholtes Passagieren von Holoklonen und Sphäroiden gesteigert werden konnte. Die Anreicherung von TSZ wurde mittels der Expression von kolorektalen TSZ-Markern bestätigt. Im Gegensatz zu den Sphäroiden und Holoklonen der wt Zellen, war die Fähigkeit der cld7^{kd} Zellen als Sphäroide oder Holoklone zu wachsen, signifikant vermindert. Die cld7^{kd} Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Kapazität der Koloniebildung im *soft agar*, wobei das adhäsionsunabhängige Wachstum eine weitere Eigenschaft von Stammzellen darstellt. Da die Expressionslevel von anderen TSZ-Markern vom cld7^{kd} unbeeinflusst waren, deutet dies darauf hin, dass der cld7^{kd} für den Verlust der TSZ-Wachstumseigenschaften verantwortlich ist. Dies könnte in einer verminderten Aktivierung von β -Catenin begründet sein. Der Wnt / β -Catenin Signalweg reguliert die Erhaltung von kolorektalen Sphäroiden (Kanwar et al., 2010). Wie bereits erwähnt wurde, rekrutiert cld7 EpCAM in die GEM, wodurch GEM-lokalisiertes Presenilin-2 intrazellulär EpIC abspalten kann, welches zusammen mit

β -Catenin in den Zellkern wandert und c-myc (Maetzel et al., 2009) sowie die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog aktiviert (Chen et al., 2011a). Lin et al. (2012) zeigten, dass eine Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit einem γ -Secretase-Inhibitor, der die Spaltung von EpIC hemmt, die Expression von Selbsterneuerungs- und EMT-Genen blockiert und deren TSZ-Eigenschaften reduziert. Zudem verminderte ein EpC^{kd} in einer Kolonkarzinomzelllinie die Expression von EMT-Genen, c-Myc, Oct4 und Nanog. Dies hatte zur Folge, dass auch die Tumorinitiation, Selbsterneuerung und Invasivität unterdrückt waren (Lin et al., 2012). Die verminderte Freisetzung des Kotranskriptionsfaktors EpIC könnte an der Reduktion von Stammzeleigenschaften der cld7^{kd} Zellen sowie einer verminderten Metastasierungsfähigkeit beteiligt sein.

Die Bildung von Mikro- und Makrometastasen im fremden Gewebe korreliert mit dem Vorhandensein von TSZ (Scheel and Weinberg, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Metastasierungsfähigkeit s.c. oder i.v. injizierter HT29-cld7^{kd} Zellen deutlich vermindert war. Darüber hinaus war das Tumorwachstum verzögert und die Überlebensdauer und -rate waren signifikant erhöht. Die *ex vivo* Untersuchung der Zellsuspensionen verschiedener Organe zeigte, dass cld7 die Ansiedlung von Tumorzellen in entfernt liegenden Organen unterstützt. Wesentlich ist der Befund, dass die Injektion von HT29^{wt}-Holoklonen die TSZ-Theorie bestätigte, da die Mäuse der Holoklon-Gruppe die höchste Anzahl an Tumorzellen in Organen, wie Milz, Leber, Lunge und im Knochenmark, aufwiesen. Zudem war ihre Überlebensdauer und -rate noch kürzer als die der HT29^{wt}-Gruppe. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten Wang et al. (2013), dass aufgrund der subkutanen Applikation von Holoklonen und Sphäroiden die Anzahl metastasierender Tumorzellen u.a. in der Milz, Lunge und im Pankreas deutlich erhöht ist. Bei einer Magenkrebszelllinie und beim Ovarialkarzinom war eine Überexpression von cld7 mit einer gesteigerten Motilität und Invasivität assoziiert (Dahiya et al., 2011; Zavala-Zendejas et al., 2011).

Die reduzierte Metastasierungsfähigkeit der HT29-cld7^{kd} Zellen bestätigt die im HEK-Modell beobachteten metastasierungsfördernden Eigenschaften von cld7. Die gesteigerte Metastasierungsfähigkeit von Holoklonen unterstützt zudem die Annahme einer zentralen Beteiligung von Stammzellen am Metastasierungsprozess.

4.6 Ausblick

Die Bedeutung des cld7-EpCAM-Komplexes unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wurde mehrfach beschrieben (Le Naour and Zoller, 2008; Lei et al., 2012; Okada et al., 2014; Thuma and Zöller, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung von cld7 zu einer Rekrutierung von cld7 in die GEM führt. Dies verhinderte jedoch eine Interaktion mit anderen TJ-Proteinen. Die Ursache des bevorzugten Palmitoylierungsstatus von cld7 muss jedoch noch geklärt werden.

Die Palmitoylierung von Proteinen kann die Internalisierung und den Abbau oder die Integration in multivesikuläre Körperchen sowie die Abgabe von Exosomen fördern (Marchese, 2014; Rodgers and Zavzavadjian, 2001; Stahl and Barbieri, 2002). Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass vorzugsweise palmitoylierungsfähiges cld7 mit Vesikeltransportmolekülen assoziiert. Ob und welche Rolle cld7 bei der Zusammensetzung und Abgabe von Exosomen spielt, muss noch untersucht werden. Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von cld7 bei der Generierung von Exosomen, muss auch ein möglicher Zusammenhang zur Expression von spezifischen microRNAs geklärt werden, da in Exosomen microRNAs selektiv angereichert sind (Rana et al., 2013; Zöller, 2013).

Studien weisen auf eine Unterstützung des Metastasierungsprozesses durch den GEM-lokalisierten cld7-EpCAM-Komplex beim Kolorektal- und Pankreaskarzinom hin (Kuhn et al., 2007; Thuma and Zöller, 2013). Diese Annahme konnte ich bestätigen. In den GEM assoziiert palmitoyliertes cld7 mit Adhäsionsmolekülen, Proteasen, Actin-Bindeproteinen und Signaltransduktionsproteinen. Diese Assoziationen unterstützen die Motilität sowie Invasivität *in vitro* und die Metastasierung *in vivo*, wie mithilfe humaner kolorektaler cld7^{kd}-Karzinomzelllinien gezeigt werden konnte. Zudem hat meine Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung von palmitoyliertem cld7 beim Prozess der EMT geliefert. In ersten Untersuchungen verwenden wir eine cld7^{mPalm}-rescue Karzinomzelllinie von cld7^{kd} Zellen. Langfristig ist geplant, die Involvement von palmitoyliertem cld7 auf die Aktivierung von EMT-assoziierten Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren zu klären. Bei der Komplexität und Reversibilität des EMT-Prozesses sind weiterführende Studien essentiell, insbesondere auch im Hinblick auf eine therapeutische Umsetzung. Zudem gibt es Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Claudinen,

TSZ, EMT und der Chemotherapieresistenz sowie Rezidiven. Folglich ist ein besseres Verständnis der Rolle von Claudinen bei der EMT und in TSZ notwendig, um die molekularen Mechanismen von Tumorrezidiven aufzuklären und bessere Therapien zu entwickeln (Kwon, 2013).

Der Fokus meiner Dissertation lag auf dem cld7-EpCAM-Komplex, da im Gegensatz zu anderen bekannten Tumorstammzellmarkern, wie CD44v6, Tspan8 und Integrin $\alpha 6\beta 4$, das cld7-EpCAM-Tandem entgegengesetzte Funktionen zu EpCAM und cld7 erfüllt. Dies stellt einen optimalen Ausgangspunkt für therapeutische Ansätze dar.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind die Claudine zunehmend in den Fokus der Krebsforschung gerückt. Claudine sind Komponenten von *Tight Junctions* (TJs), die für die Aufrechterhaltung epithelialer Barrieren essentiell sind. Da für die Dissemination von Tumorzellen der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion notwendig ist, wäre eine reduzierte Expression von Claudinen in Karzinomen zu erwarten. Dies wurde jedoch nicht einheitlich beschrieben. In Abhängigkeit vom Epithelgewebe, in welchem der Tumor entstanden ist, und vom Tumorstadium können sowohl erhöhte als auch verminderte Expressionen von Claudinen beobachtet werden.

Innerhalb der Claudin-Familie nimmt Claudin-7 eine Sonderrolle ein, da es auch in gesundem Gewebe nicht nur in TJs, sondern auch basolateral exprimiert wird. Zudem assoziiert Claudin-7 häufig direkt mit dem Zelladhäsionsmolekül EpCAM. Der Claudin-7-EpCAM-Komplex ist in glycolipidreichen Membranmikrodomänen angereichert, die Signalplattformen darstellen. Dies geht mit einer gesteigerten Metastasierungsfähigkeit beim Pankreas- und Kolorektalkarzinom einher. Die Ursache für die Lokalisation von Claudin-7 außerhalb von TJs und der Anreicherung in GEM war nicht bekannt.

Für die vorliegende Arbeit wurden HEK293 Zellen verwendet, die keine TJs haben und kein EpCAM und kaum Claudin-7 exprimieren. Diese wurden mit Wildtyp (wt) EpCAM und wt Claudin-7 oder Claudin-7 mit mutierten Phosphorylierungs- oder Palmitoylierungsstellen transfiziert. Zudem wurden HEK Zellen mit wt Claudin-7 und mutiertem EpCAM transfiziert. Dies verhindert die Assoziation der beiden Moleküle miteinander. Dadurch kann zwischen Claudin-7-vermittelten Effekten und Effekten des Claudin-7-EpCAM-Komplexes differenziert werden. Die mutierten Phosphorylierungsstellen hatten keinen Einfluss auf die Lokalisation von Claudin-7 und EpCAM in der Membran. Jedoch beeinflusste die Mutation der Palmitoylierungsstelle am C-terminalen Ende von Claudin-7 maßgeblich die Anreicherung von Claudin-7 in den glycolipidreichen Membranmikrodomänen (GEM) und die Assoziation mit anderen Molekülen, insbesondere EpCAM. Interessanterweise verhindert die Palmitoylierung von Claudin-7 eine Interaktion mit anderen TJ-Proteinen. Zudem fördert die Palmitoylierung die Rekrutierung von Claudin-7 und von Molekülen, die mit palmitoyliertem Claudin-7 assoziieren, in die GEM. Dies ist von einer gesteigerten Migrationsfähigkeit und Invasivität der Zellen begleitet.

Palmitoyliertes Claudin-7 fördert die Spaltung von EpCAM in den GEM und vermindert dadurch die EpCAM-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion. Zudem wird die intrazelluläre Domäne von EpCAM (EpIC), welche als Kotranskriptionsfaktor fungiert, vermehrt freigesetzt. Hierdurch kann die Expression mesenchymaler Proteine erhöht und die Motilität gefördert werden. Des Weiteren assoziiert palmitoyliertes Claudin-7 mit Integrinen und Zytoskelett-Bindeproteinen. Dies führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, was die signifikanten Effekte auf die Zellmotilität und Organisation des Zytoskeletts der HEK-EpC-cld7 Zellen erklärt.

In Claudin-7 exprimierenden Zellen ist die Expression von bestimmten Matrix-abbauenden Enzymen leicht vermindert. Dies beeinträchtigt jedoch nicht die Invasivität der Zellen. Vielmehr assoziiert palmitoyliertes Claudin-7 mit CD147, welches Matrix-abbauende Proteasen stabilisieren und deren Expression induzieren kann.

Die metastasierungsfördernden Eigenschaften von Claudin-7 konnten *in vivo* bestätigt werden. Die Fähigkeit Metastasen zu bilden, war in den Mäusen vermindert, denen Claudin-7-Knockdown (cld7^{kd}) Zellen injiziert wurden. Übereinstimmend damit war die Anreicherung von Tumorstammzellen, einer kleinen Subpopulation von Tumorzellen, die über die Fähigkeit der Selbsterneuerung verfügen, in den cld7^{kd} Zellen signifikant verringert. Wohingegen *in vitro* angereicherte Tumorstammzellen eine gesteigerte Metastasierungsfähigkeit zeigten. Dies bestätigt die Annahme einer zentralen Beteiligung von Tumorstammzellen am Metastasierungsprozess.

Ich konnte zum ersten Mal zeigen, dass die Palmitoylierung von Claudin-7 das Protein selbst sowie Claudin-7-assoziierte Moleküle in die GEM rekrutiert und eine Integration in TJs hemmt. Mithilfe von Molekülen, die mit palmitoyliertem Claudin-7 interagieren, wird die Motilität und Invasivität gefördert. Dies resultiert *in vivo* in einer gesteigerten Metastasierungsfähigkeit.

6 Literatur

- Alexandre, M.D., Q. Lu, and Y.H. Chen. 2005. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci.* 118:2683-93.
- Anderson, J.M., and C.M. Van Itallie. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a002584.
- Angelow, S., R. Ahlstrom, and A.S. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F867-76.
- Aono, S., and Y. Hirai. 2008. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res.* 314:3326-39.
- Auger-Messier, M., E.S. Turgeon, R. Leduc, E. Escher, and G. Guillemette. 2005. The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II modifies the morphology and cytoskeletal organization of HEK-293 cells. *Exp Cell Res.* 308:188-95.
- Balzar, M., H.A. Bakker, I.H. Briaire-de-Bruijn, G.J. Fleuren, S.O. Warnaar, and S.V. Litvinov. 1998. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol.* 18:4833-43.
- Balzar, M., I.H. Briaire-de Bruijn, H.A. Rees-Bakker, F.A. Prins, W. Helfrich, L. de Leij, G. Riethmuller, S. Alberti, S.O. Warnaar, G.J. Fleuren, and S.V. Litvinov. 2001. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol.* 21:2570-80.
- Balzar, M., M.J. Winter, C.J. de Boer, and S.V. Litvinov. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl).* 77:699-712.
- Barker, N., and H. Clevers. 2010. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology.* 138:1681-96.
- Barrandon, Y., and H. Green. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2302-6.
- Bartholow, T.L., U.R. Chandran, M.J. Becich, and A.V. Parwani. 2011. Immunohistochemical profiles of claudin-3 in primary and metastatic prostatic adenocarcinoma. *Diagn Pathol.* 6:12.
- Berditchevski, F., S. Chang, J. Bodorova, and M.E. Hemler. 1997. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem.* 272:29174-80.

- Blanchard, A.A., X. Ma, K.J. Dueck, C. Penner, S.C. Cooper, D. Mulhall, L.C. Murphy, E. Leygue, and Y. Myal. 2013. Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer*. 13:268.
- Borghi, N., and W. James Nelson. 2009. Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations. *Curr Top Dev Biol*. 89:1-32.
- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:586-99.
- Brigidi, G.S., and S.X. Bamji. 2013. Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *J Vis Exp*.
- Brown, D.A., and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:111-36.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68:533-44.
- Canel, M., A. Serrels, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2013. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*. 126:393-401.
- Cano, A., M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo, and M.A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2:76-83.
- Capaldo, C.T., A.E. Farkas, and A. Nusrat. 2014. Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Rep*. 6:1.
- Carpenter, G., and M. Red Brewer. 2009. EpCAM: another surface-to-nucleus missile. *Cancer Cell*. 15:165-6.
- Chakrabandhu, K., Z. Herincs, S. Huault, B. Dost, L. Peng, F. Conchonaud, D. Marguet, H.T. He, and A.O. Hueber. 2007. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J*. 26:209-20.
- Chazotte, B. 2010. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010:pdb prot4947.
- Chen, H.F., C.Y. Chuang, W.C. Lee, H.P. Huang, H.C. Wu, H.N. Ho, Y.J. Chen, and H.C. Kuo. 2011a. Surface marker epithelial cell adhesion molecule and E-cadherin facilitate the identification and selection of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. 7:722-35.
- Chen, S.Y., Y.C. Huang, S.P. Liu, F.J. Tsai, W.C. Shyu, and S.Z. Lin. 2011b. An overview of concepts for cancer stem cells. *Cell Transplant*. 20:113-20.
- Choo, A.B., H.L. Tan, S.N. Ang, W.J. Fong, A. Chin, J. Lo, L. Zheng, H. Hentze, R.J. Philp, S.K. Oh, and M. Yap. 2008. Selection against undifferentiated human

- embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells*. 26:1454-63.
- Chunthapong, J., E.A. Seftor, Z. Khalkhali-Ellis, R.E. Seftor, S. Amir, D.M. Lubaroff, P.M. Heidger, Jr., and M.J. Hendrix. 2004. Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion. *J Cell Biochem*. 91:649-61.
- Claas, C., J. Wahl, D.J. Orlicky, H. Karaduman, M. Schnolzer, T. Kempf, and M. Zoller. 2005. The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem J*. 389:99-110.
- Colegio, O.R., C.M. Van Itallie, H.J. McCrea, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C142-7.
- Coyne, C.B., T.M. Gambling, R.C. Boucher, J.L. Carson, and L.G. Johnson. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285:L1166-78.
- Crepaldi, T., A. Gautreau, P.M. Comoglio, D. Louvard, and M. Arpin. 1997. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol*. 138:423-34.
- D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin. 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*. 280:26233-40.
- Dahiya, N., K.G. Becker, W.H. Wood, 3rd, Y. Zhang, and P.J. Morin. 2011. Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PLoS One*. 6:e22119.
- Dalerba, P., S.J. Dylla, I.K. Park, R. Liu, X. Wang, R.W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E.H. Huang, D.M. Simeone, A.A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli, and M.F. Clarke. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:10158-63.
- Dallas, N.A., L. Xia, F. Fan, M.J. Gray, P. Gaur, G. van Buren, 2nd, S. Samuel, M.P. Kim, S.J. Lim, and L.M. Ellis. 2009. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res*. 69:1951-7.
- Darido, C., M. Buchert, J. Pannequin, P. Bastide, H. Zalzali, T. Mantamadiotis, J.F. Bourgaux, V. Garambois, P. Jay, P. Blache, D. Joubert, and F. Hollande. 2008. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 68:4258-68.
- David, J.M., and A.K. Rajasekaran. 2012. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res*. 72:2917-23.
- Davies, G., W.G. Jiang, and M.D. Mason. 2001. Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in

- hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. *Clin Cancer Res.* 7:3289-97.
- Dhawan, P., A.B. Singh, N.G. Deane, Y. No, S.R. Shiou, C. Schmidt, J. Neff, M.K. Washington, and R.D. Beauchamp. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest.* 115:1765-76.
- Diaz-Rohrer, B.B., K.R. Levental, K. Simons, and I. Levental. 2014. Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:8500-5.
- Ding, L., Z. Lu, O. Foreman, R. Tatum, Q. Lu, R. Renegar, J. Cao, and Y.H. Chen. 2012. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology.* 142:305-15.
- Ding, L., Z. Lu, Q. Lu, and Y.H. Chen. 2013. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res.* 5:367-75.
- Eddin, M. 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32:257-83.
- Efstathiou, J.A., D. Liu, J.M. Wheeler, H.C. Kim, N.E. Beck, M. Ilyas, A.J. Karayiannakis, N.J. Mortensen, W. Kmiot, R.J. Playford, M. Pignatelli, and W.F. Bodmer. 1999. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2316-21.
- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatziioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 446:801-5.
- Fan, F., S. Samuel, K.W. Evans, J. Lu, L. Xia, Y. Zhou, E. Sceusi, F. Tozzi, X.C. Ye, S.A. Mani, and L.M. Ellis. 2012. Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* 1:5-16.
- Fanali, C., D. Lucchetti, M. Farina, M. Corbi, V. Cufino, A. Cittadini, and A. Sgambato. 2014. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol.* 20:923-42.
- Fievet, B.T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol.* 164:653-9.
- Fillmore, H.L., T.E. VanMeter, and W.C. Broaddus. 2001. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* 53:187-202.
- Föger, N., R. Marhaba, and M. Zoller. 2001. Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. *J Cell Sci.* 114:1169-78.

- French, A.D., J.L. Fiori, T.C. Camilli, P.D. Leotlela, M.P. O'Connell, B.P. Frank, S. Subaran, F.E. Indig, D.D. Taub, and A.T. Weeraratna. 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci.* 6:93-101.
- Fujimoto, K., R.D. Beauchamp, and R.H. Whitehead. 2002. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology.* 123:1941-8.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita, and N. Sawada. 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem.* 54:933-44.
- Fujiwara, K., K. Ohuchida, M. Sada, K. Horioka, C.D. Ulrich, 3rd, K. Shindo, T. Ohtsuka, S. Takahata, K. Mizumoto, Y. Oda, and M. Tanaka. 2014. CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 9:e107247.
- Furuse, M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a002907.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141:1539-50.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-111.
- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 143:391-401.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Geiger, T.R., and D.S. Peeper. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1796:293-308.
- Gesierich, S., C. Paret, D. Hildebrand, J. Weitz, K. Zraggen, F.H. Schmitz-Winnenthal, V. Horejsi, O. Yoshie, D. Herlyn, L.K. Ashman, and M. Zoller. 2005. Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility. *Clin Cancer Res.* 11:2840-52.
- Gialeli, C., A.D. Theocharis, and N.K. Karamanos. 2010. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278:16-27.

- Gonzalez-Mariscal, L., S. Lechuga, and E. Garay. 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem.* 42:1-57.
- Gonzalez-Mariscal, L., C. Namorado Mdel, D. Martin, G. Sierra, and J.L. Reyes. 2006. The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 21:2391-8.
- Gonzalez, B., S. Denzel, B. Mack, M. Conrad, and O. Gires. 2009. EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells.* 27:1782-91.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36:59-74.
- Grass, G.D., M. Bratoeva, and B.P. Toole. 2012. Regulation of invadopodia formation and activity by CD147. *J Cell Sci.* 125:777-88.
- Günzel, D., and A.S. Yu. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93:525-69.
- Hachmeister, M., K.D. Bobowski, S. Hognl, B. Dislich, A. Fukumori, C. Eggert, B. Mack, H. Kremling, S. Sarrach, F. Coscia, W. Zimmermann, H. Steiner, S.F. Lichtenthaler, and O. Gires. 2013. Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PLoS One.* 8:e71836.
- Hanata, K., N. Yamaguchi, K. Yoshikawa, Y. Mezaki, M. Miura, S. Suzuki, H. Senoo, and K. Ishikawa. 2007. Soluble EMMPRIN (extra-cellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates the migration of HEP-2 human laryngeal carcinoma cells, accompanied by increased MMP-2 production in fibroblasts. *Arch Histol Cytol.* 70:267-77.
- Hansen, A.G., S.A. Arnold, M. Jiang, T.D. Palmer, T. Ketova, A. Merkel, M. Pickup, S. Samaras, Y. Shyr, H.L. Moses, S.W. Hayward, J.A. Sterling, and A. Zijlstra. 2014. ALCAM/CD166 is a TGF-beta-responsive marker and functional regulator of prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 74:1404-15.
- Haraguchi, N., H. Ishii, K. Mimori, K. Ohta, M. Uemura, J. Nishimura, T. Hata, I. Takemasa, T. Mizushima, H. Yamamoto, Y. Doki, and M. Mori. 2013. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol.* 43:425-30.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol.* 141:929-42.
- Harris, H.J., C. Davis, J.G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M.J. Farquhar, C.J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem.* 285:21092-102.

- Heiska, L., and O. Carpen. 2005. Src phosphorylates ezrin at tyrosine 477 and induces a phosphospecific association between ezrin and a kelch-repeat protein family member. *J Biol Chem.* 280:10244-52.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:801-11.
- Hogue, I.B., J.R. Grover, F. Soheilian, K. Nagashima, and A. Ono. 2011. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol.* 85:9749-66.
- Holczbauer, A., B. Gyongyosi, G. Lotz, A. Szijarto, P. Kupcsulik, Z. Schaff, and A. Kiss. 2013. Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. *J Histochem Cytochem.* 61:294-305.
- Hooper, N.M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* 16:145-56.
- Hopkins, A.M., A.A. Pineda, L.M. Winfree, G.T. Brown, M.G. Laukoetter, and A. Nusrat. 2007. Organized migration of epithelial cells requires control of adhesion and protrusion through Rho kinase effectors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292:G806-17.
- Horiuchi, K. 2013. A brief history of tumor necrosis factor alpha--converting enzyme: an overview of ectodomain shedding. *Keio J Med.* 62:29-36.
- Hou, J., A.S. Gomes, D.L. Paul, and D.A. Goodenough. 2006. Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem.* 281:36117-23.
- Hou, J., A. Renigunta, A.S. Gomes, M. Hou, D.L. Paul, S. Waldegger, and D.A. Goodenough. 2009. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:15350-5.
- Hwang, T.L., T.T. Changchien, C.C. Wang, and C.M. Wu. 2014. Claudin-4 expression in gastric cancer cells enhances the invasion and is associated with the increased level of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression. *Oncol Lett.* 8:1367-1371.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.
- Ikari, A., M. Ito, C. Okude, H. Sawada, H. Harada, M. Degawa, H. Sakai, T. Takahashi, J. Sugatani, and M. Miwa. 2008. Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *J Cell Physiol.* 214:221-9.
- Ikari, A., S. Matsumoto, H. Harada, K. Takagi, H. Hayashi, Y. Suzuki, M. Degawa, and M. Miwa. 2006. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci.* 119:1781-9.

- Inai, T., T. Kamimura, E. Hirose, H. Iida, and Y. Shibata. 2010. The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *Eur J Cell Biol.* 89:547-56.
- Inai, T., A. Sengoku, E. Hirose, H. Iida, and Y. Shibata. 2007. Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands. *Anat Rec (Hoboken).* 290:1431-8.
- Ingle, E. 2008. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1784:56-65.
- Ip, Y.C., S.T. Cheung, Y.T. Lee, J.C. Ho, and S.T. Fan. 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 6:2858-67.
- Ishizaki, T., H. Chiba, T. Kojima, M. Fujibe, T. Soma, H. Miyajima, K. Nagasawa, I. Wada, and N. Sawada. 2003. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res.* 290:275-88.
- Ito, K., I. Okamoto, N. Araki, Y. Kawano, M. Nakao, S. Fujiyama, K. Tomita, T. Mimori, and H. Saya. 1999. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene.* 18:7080-90.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 147:1351-63.
- Ivanov, A.I., A. Nusrat, and C.A. Parkos. 2004. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption. *Novartis Found Symp.* 263:115-24; discussion 124-32, 211-8.
- Jacobson, K., O.G. Mouritsen, and R.G. Anderson. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol.* 9:7-14.
- Jakab, C., A. Kiss, Z. Schaff, Z. Szabo, M. Rusvai, P. Galfi, A. Szabara, A. Sterczer, and J. Kulka. 2010. Claudin-7 protein differentiates canine cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol.* 25:857-64.
- Jiang, J.L., and J. Tang. 2007. CD147 and its interacting proteins in cellular functions. *Sheng Li Xue Bao.* 59:517-23.
- Jodele, S., L. Blavier, J.M. Yoon, and Y.A. DeClerck. 2006. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25:35-43.
- Jordan, K., R. Chodock, A.R. Hand, and D.W. Laird. 2001. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci.* 114:763-73.

- Jung, T., D. Castellana, P. Klingbeil, I. Cuesta Hernandez, M. Vitacolonna, D.J. Orlicky, S.R. Roffler, P. Brodt, and M. Zoller. 2009. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia*. 11:1093-105.
- Kalluri, R. 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 119:1417-9.
- Kanwar, S.S., Y. Yu, J. Nautiyal, B.B. Patel, and A.P. Majumdar. 2010. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*. 9:212.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141:52-67.
- Kirk, P., M.C. Wilson, C. Heddle, M.H. Brown, A.N. Barclay, and A.P. Halestrap. 2000. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*. 19:3896-904.
- Kominsky, S.L., P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, A. Rein, G. Sauter, O.P. Kallioniemi, and S. Sukumar. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 22:2021-33.
- Koval, M. 2013. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers*. 1:e24518.
- Kovalenko, O.V., X.H. Yang, and M.E. Hemler. 2007. A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics*. 6:1855-67.
- Krause, G., J. Protze, and J. Piontek. 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol*. 42:3-12.
- Kubo, A., K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki, and M. Amagai. 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 206:2937-46.
- Kuhn, S., M. Koch, T. Nubel, M. Ladwein, D. Antolovic, P. Klingbeil, D. Hildebrand, G. Moldenhauer, L. Langbein, W.W. Franke, J. Weitz, and M. Zoller. 2007. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*. 5:553-67.
- Kulka, J., A.M. Szasz, Z. Nemeth, L. Madaras, Z. Schaff, I.A. Molnar, and A.M. Tokes. 2009. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 15:59-64.
- Kummel, D., U. Heinemann, and M. Veit. 2006. Unique self-palmitoylation activity of the transport protein particle component Bet3: a mechanism required for protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:12701-6.
- Kwon, M.J. 2013. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci*. 14:18148-80.

- Ladwein, M., U.F. Pape, D.S. Schmidt, M. Schnolzer, S. Fiedler, L. Langbein, W.W. Franke, G. Moldenhauer, and M. Zoller. 2005. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res.* 309:345-57.
- Lal-Nag, M., and P.J. Morin. 2009. The claudins. *Genome Biol.* 10:235.
- Lampugnani, M.G. 2012. Endothelial cell-to-cell junctions: adhesion and signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2.
- Le Naour, F., M. Andre, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006. Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics.* 6:6447-54.
- Le Naour, F., and M. Zoller. 2008. The tumor antigen EpCAM: tetraspanins and the tight junction protein claudin-7, new partners, new functions. *Front Biosci.* 13:5847-65.
- Lei, Z., T. Maeda, A. Tamura, T. Nakamura, Y. Yamazaki, H. Shiratori, K. Yashiro, S. Tsukita, and H. Hamada. 2012. EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol.* 371:136-45.
- Leibovitz, A., J.C. Stinson, W.B. McCombs, 3rd, C.E. McCoy, K.C. Mazur, and N.D. Mabry. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36:4562-9.
- Levental, I., M. Grzybek, and K. Simons. 2010a. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry.* 49:6305-16.
- Levental, I., D. Lingwood, M. Grzybek, U. Coskun, and K. Simons. 2010b. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:22050-4.
- Li, G., P. Flodby, J. Luo, H. Kage, A. Sipos, D. Gao, Y. Ji, L.L. Beard, C.N. Marconett, L. DeMaio, Y.H. Kim, K.J. Kim, I.A. Laird-Offringa, P. Minoo, J.M. Liebler, B. Zhou, E.D. Crandall, and Z. Borok. 2014. Knockout mice reveal key roles for claudin 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 51:210-22.
- Li, H., X. Chen, T. Calhoun-Davis, K. Claypool, and D.G. Tang. 2008. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 68:1820-5.
- Li, R., Y. Pan, B. He, Y. Xu, T. Gao, G. Song, H. Sun, Q. Deng, and S. Wang. 2013. Downregulation of CD147 expression by RNA interference inhibits HT29 cell proliferation, invasion and tumorigenicity in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 43:1885-94.
- Lin, C.W., M.Y. Liao, W.W. Lin, Y.P. Wang, T.Y. Lu, and H.C. Wu. 2012. Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via

- activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *J Biol Chem.* 287:39449-59.
- Lin, X., X. Shang, G. Manorek, and S.B. Howell. 2013. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *PLoS One.* 8:e67496.
- Lin, Y.C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier, and N. Callewaert. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun.* 5:4767.
- Linares, G.R., R. Brommage, D.R. Powell, W. Xing, S.T. Chen, F.Z. Alshbool, K.H. Lau, J.E. Wergedal, and S. Mohan. 2012. Claudin 18 is a novel negative regulator of bone resorption and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* 27:1553-65.
- Linder, M.E., and R.J. Deschenes. 2007. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:74-84.
- Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327:46-50.
- Lioni, M., P. Brafford, C. Andl, A. Rustgi, W. El-Deiry, M. Herlyn, and K.S. Smalley. 2007. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol.* 170:709-21.
- Lisanti, M.P., P.E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Y.H. Tu, R.F. Cook, and M. Sargiacomo. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 126:111-26.
- Lisanti, M.P., Z. Tang, P.E. Scherer, and M. Sargiacomo. 1995. Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. *Methods Enzymol.* 250:655-68.
- Litvinov, S.V., H.A. Bakker, M.M. Gourevitch, M.P. Velders, and S.O. Warnaar. 1994a. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.* 2:417-28.
- Litvinov, S.V., M. Balzar, M.J. Winter, H.A. Bakker, I.H. Briaire-de Bruijn, F. Prins, G.J. Fleuren, and S.O. Warnaar. 1997. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol.* 139:1337-48.
- Litvinov, S.V., M.P. Velders, H.A. Bakker, G.J. Fleuren, and S.O. Warnaar. 1994b. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 125:437-46.

- Liu, R., S. Huang, Y. Lei, T. Zhang, K. Wang, B. Liu, E.C. Nice, R. Xiang, K. Xie, J. Li, and C. Huang. 2015. FGF8 promotes colorectal cancer growth and metastasis by activating YAP1. *Oncotarget*. 6:935-52.
- Liu, S., G. Dontu, I.D. Mantle, S. Patel, N.S. Ahn, K.W. Jackson, P. Suri, and M.S. Wicha. 2006. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*. 66:6063-71.
- Locke, M., M. Heywood, S. Fawell, and I.C. Mackenzie. 2005. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res*. 65:8944-50.
- Lorent, J.H., and I. Levental. 2015. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem Phys Lipids*.
- Louis, N., C. Eveleigh, and F.L. Graham. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*. 233:423-9.
- Lu, Z., L. Ding, H. Hong, J. Hoggard, Q. Lu, and Y.H. Chen. 2011. Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res*. 317:1935-46.
- Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, M. Benk, C. Kieu, P. Papior, P.A. Baeuerle, M. Munz, and O. Gires. 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 11:162-71.
- Marchese, A. 2014. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 27:72-7.
- Marhaba, R., P. Freyschmidt-Paul, and M. Zoller. 2006. In vivo CD44-CD49d complex formation in autoimmune disease has consequences on T cell activation and apoptosis resistance. *Eur J Immunol*. 36:3017-32.
- Martin, T.A., G.M. Harrison, G. Watkins, and W.G. Jiang. 2008. Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 105:41-52.
- Maruthamuthu, V., Y. Aratyn-Schaus, and M.L. Gardel. 2010. Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions. *Curr Opin Cell Biol*. 22:583-8.
- Matzku, S., A. Wenzel, S. Liu, and M. Zoller. 1989. Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 49:1294-9.
- Melkonian, K.A., A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, and D.A. Brown. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*. 274:3910-7.
- Menashi, S., M. Serova, L. Ma, S. Vignot, S. Mourah, and F. Calvo. 2003. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase

- expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63:7575-80.
- Mendoza-Rodriguez, C.A., L. Gonzalez-Mariscal, and M. Cerbon. 2005. Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Cell Tissue Res.* 319:315-30.
- Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi, and S. Tsukita. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585:606-12.
- Momburg, F., G. Moldenhauer, G.J. Hammerling, and P. Moller. 1987. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 47:2883-91.
- Mori, S., M. Kodaira, A. Ito, M. Okazaki, N. Kawaguchi, Y. Hamada, Y. Takada, and N. Matsuura. 2015. Enhanced Expression of Integrin α v β 3 Induced by TGF- β 1s Required for the Enhancing Effect of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) in TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Mammary Epithelial Cells. *PLoS One.* 10:e0137486.
- Mu, W., S. Rana, and M. Zoller. 2013. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness. *Neoplasia.* 15:875-87.
- Münz, M., P.A. Baeuerle, and O. Gires. 2009. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 69:5627-9.
- Münz, M., C. Kieu, B. Mack, B. Schmitt, R. Zeidler, and O. Gires. 2004. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene.* 23:5748-58.
- Nawrocki-Raby, B., C. Gilles, M. Polette, E. Bruyneel, J.Y. Laronze, N. Bonnet, J.M. Foidart, M. Mareel, and P. Birembaut. 2003. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer.* 105:790-5.
- Ng, V.Y., S.N. Ang, J.X. Chan, and A.B. Choo. 2010. Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 28:29-35.
- Nübel, T., J. Preobraschenski, H. Tuncay, T. Weiss, S. Kuhn, M. Ladwein, L. Langbein, and M. Zoller. 2009. Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 7:285-99.
- O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 445:106-10.
- Okada, T., T. Nakamura, T. Watanabe, N. Onoda, A. Ashida, R. Okuyama, and K. Ito. 2014. Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma. *PLoS One.* 9:e94487.

- Osta, W.A., Y. Chen, K. Mikhitarian, M. Mitas, M. Salem, Y.A. Hannun, D.J. Cole, and W.E. Gillanders. 2004. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64:5818-24.
- Overgaard, C.E., B.L. Daugherty, L.A. Mitchell, and M. Koval. 2011. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal.* 15:1179-93.
- Pan, Y., B. He, G. Song, Q. Bao, Z. Tang, F. Tian, and S. Wang. 2012. CD147 silencing via RNA interference reduces tumor cell invasion, metastasis and increases chemosensitivity in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 27:2003-9.
- Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi. 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1833:3481-98.
- Parton, R.G., and K. Simons. 1995. Digging into caveolae. *Science.* 269:1398-9.
- Philp, N.J., J.D. Ochrietor, C. Rudoy, T. Muramatsu, and P.J. Linser. 2003. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:1305-11.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22:146-58.
- Piper, R.C., and D.J. Katzmann. 2007. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:519-47.
- Ralhan, R., J. Cao, T. Lim, C. Macmillan, J.L. Freeman, and P.G. Walfish. 2010a. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer.* 10:331.
- Ralhan, R., H.C. He, A.K. So, S.C. Tripathi, M. Kumar, M.R. Hasan, J. Kaur, L. Kashat, C. MacMillan, S.S. Chauhan, J.L. Freeman, and P.G. Walfish. 2010b. Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One.* 5:e14130.
- Rana, S., K. Malinowska, and M. Zoller. 2013. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia.* 15:281-95.
- Rana, S., S. Yue, D. Stadel, and M. Zoller. 2012. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:1574-84.
- Resh, M.D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451:1-16.
- Resnick, M.B., M. Gavilanez, E. Newton, T. Konkin, B. Bhattacharya, D.E. Britt, E. Sabo, and S.F. Moss. 2005a. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol.* 36:886-92.

- Resnick, M.B., T. Konkin, J. Routhier, E. Sabo, and V.E. Pricolo. 2005b. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 18:511-8.
- Richmond, A., and Y. Su. 2008. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech.* 1:78-82.
- Rietveld, A., S. Neutz, K. Simons, and S. Eaton. 1999. Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem.* 274:12049-54.
- Rodgers, W., B. Crise, and J.K. Rose. 1994. Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol.* 14:5384-91.
- Rodgers, W., and J. Zavzavadjian. 2001. Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 267:173-83.
- Rosso, O., T. Piazza, I. Bongarzone, A. Rossello, D. Mezzanzanica, S. Canevari, A.M. Orenco, A. Puppo, S. Ferrini, and M. Fabbi. 2007. The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 5:1246-53.
- Rozario, T., and D.W. DeSimone. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 341:126-40.
- Rozsnyay, Z., G. Sarmay, M. Zoller, and J. Gergely. 1996. Membrane-bound ezrin is involved in B-cell receptor-mediated signaling: potential role of an ITAM-like ezrin motif. *Immunol Lett.* 54:163-9.
- Runz, H., J. Rietdorf, I. Tomic, M. de Bernard, K. Beyreuther, R. Pepperkok, and T. Hartmann. 2002. Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci.* 22:1679-89.
- Sagiv, E., L. Memeo, A. Karin, D. Kazanov, J. Jacob-Hirsch, M. Mansukhani, G. Rechavi, H. Hibshoosh, and N. Arber. 2006. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology.* 131:630-9.
- Sastry, S.K., and K. Burridge. 2000. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res.* 261:25-36.
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 1:16-22.
- Scheel, C., and R.A. Weinberg. 2012. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol.* 22:396-403.
- Schnell, U., V. Cirulli, and B.N. Giepmans. 2013. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1828:1989-2001.

- Scopelliti, A., P. Cammareri, V. Catalano, V. Saladino, M. Todaro, and G. Stassi. 2009. Therapeutic implications of Cancer Initiating Cells. *Expert Opin Biol Ther.* 9:1005-16.
- Seiter, S., W. Tilgen, K. Herrmann, D. Schadendorf, E. Patzelt, P. Moller, and M. Zoller. 1996. Expression of CD44 splice variants in human skin and epidermal tumours. *Virchows Arch.* 428:141-9.
- Sela, B.A., Z. Steplewski, and H. Koprowski. 1989. Colon carcinoma-associated glycoproteins recognized by monoclonal antibodies CO-029 and GA22-2. *Hybridoma.* 8:481-91.
- Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F.L. Graham. 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 16:869-71.
- Sheehan, G.M., B.V. Kallakury, C.E. Sheehan, H.A. Fisher, R.P. Kaufman, Jr., and J.S. Ross. 2007. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 38:564-9.
- Shiozaki, H., T. Kadowaki, Y. Doki, M. Inoue, S. Tamura, H. Oka, T. Iwazawa, S. Matsui, K. Shimaya, M. Takeichi, and et al. 1995. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer.* 71:250-8.
- Shultz, L.D., B.L. Lyons, L.M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S.D. Gillies, M. King, J. Mangada, D.L. Greiner, and R. Handgretinger. 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 174:6477-89.
- Simons, K., and R. Ehehalt. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110:597-603.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Simpson, R.J., J.W. Lim, R.L. Moritz, and S. Mathivanan. 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 6:267-83.
- Singh, A.B., and P. Dhawan. 2015. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Semin Cell Dev Biol.*
- Smukler, S.R., M.E. Arntfield, R. Razavi, G. Bikopoulos, P. Karpowicz, R. Seaberg, F. Dai, S. Lee, R. Ahrens, P.E. Fraser, M.B. Wheeler, and D. van der Kooy. 2011. The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell.* 8:281-93.
- Song, S.P., A. Hennig, K. Schubert, R. Markwart, P. Schmidt, I.A. Prior, F.D. Bohmer, and I. Rubio. 2013. Ras palmitoylation is necessary for N-Ras activation and signal propagation in growth factor signalling. *Biochem J.* 454:323-32.

- Spaderna, S., O. Schmalhofer, F. Hlubek, G. Berx, A. Eger, S. Merkel, A. Jung, T. Kirchner, and T. Brabletz. 2006. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 131:830-40.
- Stahl, P.D., and M.A. Barbieri. 2002. Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the "ins and outs" of endosomal traffic. *Sci STKE*. 2002:pe32.
- Stenzinger, A., D. Wittschieber, M. von Winterfeld, B. Goepfert, C. Kamphues, W. Weichert, M. Dietel, A. Rabien, and F. Klauschen. 2012. High extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 expression is strongly and independently associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Hum Pathol*. 43:1471-81.
- Stepanek, O., P. Draber, and V. Horejsi. 2014. Palmitoylated transmembrane adaptor proteins in leukocyte signaling. *Cell Signal*. 26:895-902.
- Symowicz, J., B.P. Adley, K.J. Gleason, J.J. Johnson, S. Ghosh, D.A. Fishman, L.G. Hudson, and M.S. Stack. 2007. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 67:2030-9.
- Tabaries, S., Z. Dong, M.G. Annis, A. Omeroglu, F. Pepin, V. Ouellet, C. Russo, M. Hassanain, P. Metrakos, Z. Diaz, M. Basik, N. Bertos, M. Park, C. Guettier, R. Adam, M. Hallett, and P.M. Siegel. 2011. Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene*. 30:1318-28.
- Tabaries, S., F. Dupuy, Z. Dong, A. Monast, M.G. Annis, J. Spicer, L.E. Ferri, A. Omeroglu, M. Basik, E. Amir, M. Clemons, and P.M. Siegel. 2012. Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol Cell Biol*. 32:2979-91.
- Takahashi, M., T. Tsunoda, M. Seiki, Y. Nakamura, and Y. Furukawa. 2002. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*. 21:5861-7.
- Tan, L., X. Sui, H. Deng, and M. Ding. 2011. Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLoS One*. 6:e23383.
- Tanaka, H., M. Takechi, H. Kiyonari, G. Shioi, A. Tamura, and S. Tsukita. 2015. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*. 64:1529-38.
- Tang, D.G., L. Patrawala, T. Calhoun, B. Bhatia, G. Choy, R. Schneider-Broussard, and C. Jeter. 2007. Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog*. 46:1-14.

- Tauro, B.J., D.W. Greening, R.A. Mathias, S. Mathivanan, H. Ji, and R.J. Simpson. 2013. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics*. 12:587-98.
- Tervonen, T.A., J.I. Partanen, S.T. Saarikoski, M. Myllynen, E. Marques, K. Paasonen, A. Moilanen, G. Wohlfahrt, P.E. Kovanen, and J. Klefstrom. 2011. Faulty epithelial polarity genes and cancer. *Adv Cancer Res*. 111:97-161.
- Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2:442-54.
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139:871-90.
- Thiery, J.P., and J.P. Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:131-42.
- Thuma, F., and M. Zöller. 2013. EpCAM-associated claudin-7 supports lymphatic spread and drug resistance in rat pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 133:855-66.
- Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen. 2012. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*. 125:1855-64.
- Tokes, A.M., J. Kulka, S. Paku, A. Szik, C. Paska, P.K. Novak, L. Szilak, A. Kiss, K. Bogi, and Z. Schaff. 2005. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*. 7:R296-305.
- Trebak, M., G.E. Begg, J.M. Chong, E.V. Kanazireva, D. Herlyn, and D.W. Speicher. 2001. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 276:2299-309.
- Trzpis, M., P.M. McLaughlin, L.M. de Leij, and M.C. Harmsen. 2007. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol*. 171:386-95.
- Tsukita, S., and M. Furuse. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*. 149:13-6.
- Turksen, K., and T.C. Troy. 2011. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1816:73-9.
- Usami, Y., H. Chiba, F. Nakayama, J. Ueda, Y. Matsuda, N. Sawada, T. Komori, A. Ito, and H. Yokozaki. 2006. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol*. 37:569-77.
- Van Itallie, C.M. 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci*. 118:1427-36.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 68:403-29.

- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2013. Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers*. 1:e25247.
- Van Itallie, C.M., J. Holmes, A. Bridges, J.L. Gookin, M.R. Coccaro, W. Proctor, O.R. Colegio, and J.M. Anderson. 2008. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci*. 121:298-305.
- Vollmers, A., L. Wallace, N. Fullard, T. Hoher, M.D. Alexander, and J. Reichelt. 2012. Two- and three-dimensional culture of keratinocyte stem and precursor cells derived from primary murine epidermal cultures. *Stem Cell Rev*. 8:402-13.
- von Kleist, S., E. Chany, P. Burtin, M. King, and J. Fogh. 1975. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst*. 55:555-60.
- Wang, H., S. Rana, N. Giese, M.W. Buchler, and M. Zoller. 2013. Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells. *Int J Cancer*. 133:416-26.
- Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone. 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci*. 124:1183-93.
- Weidner, K.M., M. Sachs, and W. Birchmeier. 1993. The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol*. 121:145-54.
- Wen, H., D.D. Watry, M.C. Marcondes, and H.S. Fox. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol*. 24:8408-17.
- Winter, M.J., B. Nagelkerken, A.E. Mertens, H.A. Rees-Bakker, I.H. Briaire-de Bruijn, and S.V. Litvinov. 2003. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*. 285:50-8.
- Wu, B., J. Wei, Z. Hu, C. Shan, L. Wang, C. Zhang, X. Yang, and D. Lei. 2015. Slug silencing inhibited perineural invasion through regulation of EMMPRIN expression in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Tumour Biol*.
- Wu, C.J., P. Mannan, M. Lu, and M.C. Udey. 2013. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) regulates claudin dynamics and tight junctions. *J Biol Chem*. 288:12253-68.
- Wu, J., N.Y. Ru, Y. Zhang, Y. Li, D. Wei, Z. Ren, X.F. Huang, Z.N. Chen, and H. Bian. 2011. HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF-beta signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene*. 30:4410-27.
- Yamamoto, M., S.H. Ramirez, S. Sato, T. Kiyota, R.L. Cerny, K. Kaibuchi, Y. Persidsky, and T. Ikezu. 2008. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol*. 172:521-33.

- Yamazaki, Y., R. Tokumasu, H. Kimura, and S. Tsukita. 2011. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol Biol Cell*. 22:1495-504.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol*. 19:434-46.
- Yang, X., O.V. Kovalenko, W. Tang, C. Claas, C.S. Stipp, and M.E. Hemler. 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol*. 167:1231-40.
- Ybe, J.A., D.E. Wakeham, F.M. Brodsky, and P.K. Hwang. 2000. Molecular structures of proteins involved in vesicle fusion. *Traffic*. 1:474-9.
- Yovchev, M.I., P.N. Grozdanov, H. Zhou, H. Racherla, C. Guha, and M.D. Dabeva. 2008. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology*. 47:636-47.
- Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 296:913-6.
- Zavadil, J., and E.P. Bottinger. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 24:5764-74.
- Zavala-Zendejas, V.E., A.C. Torres-Martinez, B. Salas-Morales, T.I. Fortoul, L.F. Montano, and E.P. Rendon-Huerta. 2011. Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest*. 29:1-11.
- Zheng, B., M. DeRan, X. Li, X. Liao, M. Fukata, and X. Wu. 2013. 2-Bromopalmitate analogues as activity-based probes to explore palmitoyl acyltransferases. *J Am Chem Soc*. 135:7082-5.
- Zhu, S., D. Chu, Y. Zhang, X. Wang, L. Gong, X. Han, L. Yao, M. Lan, Y. Li, and W. Zhang. 2013. EMMPRIN/CD147 expression is associated with disease-free survival of patients with colorectal cancer. *Med Oncol*. 30:369.
- Zöller, M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 9:40-55.
- Zöller, M. 2013. Pancreatic cancer diagnosis by free and exosomal miRNA. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 4:74-90.
- Zuckermann, F.A., D. Schabacker, and R.M. Binns. 1994. Biochemical analysis of molecules reactive with monoclonal antibodies specific for porcine CD45. *Vet Immunol Immunopathol*. 43:307-13.

7 Anhang

Tabelle 15: Massenspektrometrische Proteinanalyse von niedermolekularen Molekülen, die mit Claudin-7 ko-immunpräzipitieren

HEK-EpC-cld7, HEK-EpC^{mAG}-cld7 und HEK-EpC-cld7^{mPalm} Zellen wurden mit Lubrol-Lysepuffer lysiert und mit anti-cld7 immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proben in ein Tricin-SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassieblau gefärbt. Der untere Abschnitt (kleiner als 55 kDa) des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels wurde analysiert. Aufgelistet sind die Proteine, die mindestens ein proteinspezifisches Peptid aufweisen, und der Prozentsatz des Proteins, der durch die isolierten Peptid(e) abgedeckt wird sowie das Molekulargewicht in Da. Die Hauptfunktionen der Moleküle oder deren Proteinfamilien sind gezeigt. Die ko-immunpräzipitierten Moleküle sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet und gezeigt sind die ko-immunpräzipitierenden Moleküle mit HEK-EpC-cld7 unabhängig von der EpCmAG Mutation (blau) und cld7-Palmitoylierung (rot) oder nur unabhängig von der cld7-Palmitoylierung (kein rot) oder abhängig von der EpCAM-cld7-Assoziation und der cld7-Palmitoylierung (nur schwarz). Proteine, die an der Bildung oder dem Transport von Vesikeln beteiligt sind, sind unterstrichen.

Protein Description	Da	HEK-E-C		-E(mAG)-C		-E-C(mP)		family / function
		hits	%Cov	hits	%Cov	hits	%Cov	
14-3-3 proteins	29326	11	49	8	34.5	5	18.4	signal transduction by binding to phosphoserine
28 kDa phosphoprotein	20618	5	22.7	4	30.4	4	22.1	unknown
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-2	47602	3	14.6	15	54.3	12	44.4	mitochondrial matrix, oxidation of 3-hydroxyacyl-CoA
Actin	42052	14	55.5	16	61.1	18	66.1	cytoskeletal protein
Act. RNA polymerase II transcr. coactivator	14386	6	56.7	9	57.5	8	62.2	nuclear translocation upon activation
Acyl-coenzyme A thioesterase	15065	1	8.6			4	14.8	oxidation of fatty acids
Alpha-enolase	47481	13	49.5	2	11.5	4	13.4	glycolytic enzyme
Annexins	35971	8	30	6	31	4	19.5	calcium-dependent phospholipid-binding protein
AP-2 complex	17178	1	4.9	3	19	2	6.7	protein coat of coated-vesicles
<u>ATPase 16 kDa & F</u>	15725	1	11.6	1	11.6	1	11.6	organelle acidification for sorting, endocytosis
BAG2	23928	1	5.2	2	8.5	1	5.2	compete with Hip for Hsc70/Hsp70 ATPase domain
<u>BET1</u>	13395	1	15.3	3	44.1	1	15.3	vesicular transport from ER to Golgi
BolA-like protein 2	10281	1	18.6	1	18.6	1	18.6	unknown
BRI3-binding protein	27932	1	6.8	1	6.8	2	14.3	oncogene binding protein
C14orf166	28165	6	31.6	9	47.1	3	23	unknown
C7orf50	22127	2	23.2	4	35.6	5	41.8	unknown
CAAX prenyl protease 1	55063	1	3.4	2	5.5	1	3.4	metalloproteinase

Anhang

Calmodulin	16827	4	45.6	3	30.9	3	36.9	phosphorylase kinase
Casein kinase II	45229	6	32	6	27.6	4	11	protein phosphorylation
CASP	77636	1	2.1	1	2.1	1	2.1	caspase, cysteine peptidase
Cell growth-regulating nucleolar protein	44044	1	3.7	1	3.7	3	10.8	metal ion binding
Chromatin target of PRMT1	26380	2	14.5	1	5.2	2	10.5	methyltransferase 1
Cilia- and flagella-associated protein 20	22931	1	10.4	1	6.2	1	6.2	arginine methylation activity
Cleavage and polyadenylation specificity factor5	26268	5	27.3	2	10.6	2	7.5	endonuclease
Coatomer subunit epsilon	34688	7	36.4	1	8.4	6	32.8	non-clathrin-coated vesicles, retrograde Golgi-to-ER transport
Cofilin-1	18719	3	25.3	1	6.6	1	6.6	polymerize / depolymerize F- and G-actin
Coiled-coil domain-containing proteins	25820	4	36.3	8	38.1	5	36.3	actin-binding, cytoskeleton remodeling, migration
CIRBP	18637	5	38.4	5	38.4	4	32	Cold-inducible RNA-binding
Complement C1q	31742	5	31.6	3	19.9	3	27	complement activation
cornichon homolog 4	16424	1	14.4	1	14.4	1	14.4	intracellular signal transduction
Creatine kinases	47406	15	55.2	18	55.6	13	47.2	catalyzes the transfer of phosphate
Cyclin-dependent kinase 9	43149	2	8.9	6	20.4	2	6.2	cyclin-dependent serine/threonine kinase
Cytochrome b and c	11855	4	43.8	5	26.7	2	22.7	response to mechanical and glucose stimulus
DDR GK domain-containing protein 1	35589	3	15.6	3	15.6	1	4.1	positive regulation of NF-kappaB
Derlin-1 & 2	28896	2	7.6	1	4.4	1	4.4	protease binding
Dimethyladenosine transferase 1	39860	1	4	1	4	1	4	probable dimethyladenosine transferase
DnaJ homolog subfamily B members 6,8,11	40774	2	7.5	5	16.2	2	7.8	HSP binding
Dolichol-phosphate mannosyltransferase 1 & 3	29673	2	14.6	2	23.9	7	16.7	mannosyltransferase
<u>Dynein heavy & light chain 1 & 2</u>	10530	1	37.1	3	64	1	33.7	intracellular motility
STUB1 & TRIM56	35290	1	4	1	2.6	1	0.5	polyubiquitin precursors
ELAV1	36240	5	20.6			3	15.6	RNA binding
Elongation factor 1	50451	2	4.1	2	17.4	6	20.3	protein metabolism
ELOVL5	32755	2	9.3	1	4.3	1	4.3	fatty acid elongase
EMC	34982	5	21.9	3	14.2	4	17.5	ER membrane complex subunits 2,3,6,10
Endothelial differentiation-related factor 1	16359	1	10.1	1	10.1	1	10.1	endothelial cell differentiation
Enhancer of rudimentary homolog	12422	2	36.5	4	44.2	1	16.3	osteoblast differentiation
Erlin-2	38044	4	18	8	33.3	2	10	lipid rafts, critical in IP3 signaling
Eukaryotic initiation factor 4A-I,II,III	46353	21	60.1	21	60.8	22	60.8	cellular protein metabolic processes
Eukaryotic translation elongation factor 1-6	19855	1	5.7	5	33.3	27	62.5	guanine nucleotide exchange
EXOSC	21780	3	29.7	6	43.1	6	28.3	Exosome complex components

Anhang

F-actin-capping protein	33157	1	8.7	1	3.5	3	14	blocks barbed ends of F-actin filaments
FHL1	38006	8	33.4	8	33.4	8	33.4	Four and a half LIM domains protein 1
General transcription factor IIH & II-I	1E+05	4	5.2	6	6.6	3	3.1	contributes to protein kinase activity
GLULP3	42665	3	13.9	3	13.1	1	4.3	Glutamine synthetase
Glutathione S-transferases	23569	8	48.6	3	31.4	1	7.6	cytoplasmic glutathione S-transferases
GAPDH	36201	8	38.2	3	13.7	5	29	catalyzes carbohydrate metabolism
GTP-binding protein 10 & Rheb & SAR1a	43191	1	2.1	5	20.4	2	5.9	GTPase activity
Guanine nucleotide-binding protein beta-2	35511	19	79.2	19	79.2	19	79.2	SH2 domain binding
HNRNPA1	38837	11	36.8	16	36.2	11	45	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HSP10	10925	9	80.4	6	62.7	1	25.5	chaperone binding
Immediate early response 3-interacting protein 1	9020	2	34.1	2	34.1	2	34.1	may play a role in ER stress response
Interferon-induced transmembrane protein 1	14126	1	12.8	1	12.8	1	12.8	receptor signaling protein activity
Interleukin enhancer-binding factor 2	43263	14	56.2	16	60.5	15	51.3	protein binding
Keratin, type I & II	66170	10	18.6	8	15.8	13	25.3	cytoskeletal proteins
Keratinocyte-associated protein 2	14840	1	12.5	1	12.5	1	12.5	oligosaccharyltransferase
<u>Kinectin</u>	2E+05	1	2.5	2	2.9	1	2.5	involved in intracellular organelle motility
<u>LAMTOR1 & 2 & 3</u>	17848	5	38.5	1	8.1	1	8.1	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK & MTOR activator
<u>Lectin, mannose-binding 2</u>	40545	6	20.2	5	21.9	4	17.7	high mannose glycoprotein binding, facilitates sorting & trafficking
Leucine-rich repeat-containing protein 59 & 7	35308	6	26.7	9	39.7	10	45	facilitates transport of FGF1 through nuclear pores
LLP homolog	15329	1	23.3	3	29.5	2	23.3	long-term synaptic facilitation
Lupus La protein	46979	2	6.9	1	3.4	6	25.2	protein binding
Magnesium transporter protein 1	38411	3	9	3	9	1	5.7	may have a role in N-glycosylation
Mago nashi homolog	17210	3	18.5	3	32.2	2	14.4	RNA splicing
Malectin	32385	4	15.4	4	15.4	3	13	regulates glycosylation
Membrane-associated progesterone receptor 1 & 2	21772	10	47.7	7	43.6	2	21.5	progesterone steroid receptor
Metadherin	63856	2	6.9	3	9.6	1	2.2	targets of C-MYC transcriptional activation
TRM112	14304	2	21.6	4	37.6	2	21.6	protein methyltransferase activity
Minor histocompatibility antigen H13	41747	1	3.2			1	5.8	aspartic endopeptidase, intramembrane cleaving
Mitochondrial import receptor TOM22 & 5	15512	2	16.2	2	16.2	1	8.5	transmembrane transporter

Anhang

mRNA turnover protein 4	27657	1	6.3	6	37.2	2	8.8	unknown
Myosin 6B, 12A, 15	19839	3	22.8	5	34.5	5	40.4	hexameric ATPase cellular motor protein
N-alpha-acetyltransferase 10 & 50	26613	1	8.9	9	66.3	1	4.3	acetyl group transfer
Nascent polypeptide-associated subunit alpha	2E+05	6	3.8	7	3.9	6	3.8	associates with BTF3 to form NAC
NEDD3	40802	1	3.3	9	39.2	6	21.3	Developmentally-regulated GTP-binding protein
<u>NipSnap 1 & 2</u>	33460	5	23.6	4	12.9	3	13	may be involved in vesicular transport
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	35903	7	43.8	8	48.8	5	27.5	obesity linked gene ?
Nucleolin	76625	9	15.6	6	11.8	5	8.9	angiogenesis ?
Nucleophosmin	32726	2	7.8	5	22.4	4	25.9	several processes including regulation of ARF/p53 pathway
Nucleoside diphosphate kinase A & B	20703	8	61.5	9	61.5	9	56.7	metastasis inhibition factor nm23
Nucleoside-triphosphatase,cancer-related	20928	1	6.3	4	26.3	1	6.3	dephosphorylation
Oligosaccharyltransferase OSTC	16932	1	14.1	1	14.1	2	14.1	protein N-linked glycosylation via asparagine
PCMT1	24792	3	20.7	1	12.3	1	12.3	L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases	18229	10	66.7	9	47.2	5	38.2	catalyze isomerization, cyclosporin binding
Peroxiredoxin-1, 2, 5, 6	22324	9	39.7	6	35.7	6	35.7	antioxidants, reduce hydrogen peroxide & alkyl hydroperoxides
PHD finger-like domain-containing 5A	13138	3	32.7	3	47.3	4	40.9	subunit of splicing factor 3b
phosphatase 2A & PGAM5	32213	7	26.6	5	22.3	2	10.6	Phosphatases
Poly(rC)-binding protein 1 & 2	37987	5	19.4	5	25.2	4	15.9	multifunctional
POTE ankyrin domain family member E	1E+05	7	10.1	7	10.8	8	10.2	proapoptotic protein
PRA1 family protein 2 & 3	21600	2	20.2	1	6.2	1	10.1	L-glutamate and protein transport
Pre-mRNA-splicing factor SPF27	26229	1	5.8	3	20.9	3	20	mRNA splicing
Profilin-1 & 2	15216	6	54.3	3	30	1	20	small actin-binding proteins
Programmed cell death protein 5 & 6	21912	4	22.5	2	12.6	1	5.8	upregulated during apoptosis
Proliferation-associated protein 2G4	44101	11	33.8	17	44.9	17	54.8	interacts with ErbB3, transduces growth regulatory signals
Proteolipid protein 2	17022	2	18.4	2	18.4	2	18.4	may function as an ion channel
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 & 2	33568	4	16	5	25.9	5	25.4	conversion of pyrroline-5-carboxylate to proline
Ran	24579	3	20.8	2	16.2	2	11.1	formation/organization of the microtubule network
<u>SEC22b</u>	24806	4	25.6	4	25.6	3	20.9	complex with SNARE, ER-Golgi protein trafficking
Sec31B	1E+05	2	1.1	2	1.7	2	1.1	unknown
Sec61 alpha & beta	10025	2	26	2	26	2	37.5	secretory & membrane polypeptides insertion into ER
Serine/arginine-rich splicing factors	27842	9	39.9	6	34.8	6	40.9	activates or represses splicing

Anhang

Serpin H1	46525	1	6.2			2	6.2	serine proteinase inhibitors, cancer marker
SERPINE1	44995	6	23	5	22.1	7	30.6	inhibitor of tissue plasminogen activator & urokinase
Signal peptidase complex 1&2&3	25272	1	26.5	7	33.2	5	28.8	peptidase
Signal recognition particle 14&19&9	16374	5	44.4	5	44.4	6	57	cellular metabolic processes
Single-stranded DNA-binding protein	17249	5	48	3	20.3	3	27.7	involved in mitochondrial biogenesis
Small nuclear ribonucleoprotein E,F,SmD1,D2,D3	13632	8	55.9	3	31.7	9	66.9	RNA and protein binding
small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15	8595	4	36.8	4	36.8	4	47.4	not found
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B	24765	7	24.6	7	24.6	6	18.8	involved in pre-mRNA splicing
Splicing factor 3B subunit 5&6, U2AF	14690	6	52	5	44.8	5	59.2	RNA splicing
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein	12398	2	22	3	34.9	1	22	negative regulation of mitochondrial RNA catabolism
<u>Stonin-2</u>	1E+05	1	1	1	1	1	1	clathrin-associated sorting proteins, internalization
Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	23812	2	16.7	3	25.8	1	19.9	chaperone binding
Surfeit locus protein 4	30602	4	18.6	1	3.7	2	13.8	protein binding
Thioredoxin-dependent peroxide reductase	28017	5	25	7	41	6	29.3	unknown
<u>TMEM emp24 domain proteins</u>	25131	6	32.4	6	29.2	5	22.8	vesicular protein trafficking
TMEM205	21469	4	27	3	27	2	27	possibly drug resistance
TMEM230	13180	1	9.2	1	9.2	1	9.2	unknown
Trans-2,3-enoyl-CoA reductase	36410	4	13	2	7.1	1	3.2	elongation of fatty acid chains, last step
Translocon-associated protein subunit	19158	4	30.6	4	30.6	4	21	protein translocation across the ER membrane
Trifunctional enzyme subunit beta	51547	1	2.3			1	2.3	catalyzes mitochondrial beta-oxidation of long chain fatty acids
Tubulin alpha-1B,beta,beta4b	50804	10	34.4			4	16.4	structural constituent of cytoskeleton
Vacuolar ATPase assembly protein VMA21	11347	3	34.7	2	24.8	2	24.8	chaperone for assembly of lysosomal vacuolar ATPase
VAMP3	11359	3	40	3	40	2	40	docking/fusion of synaptic vesicles with presynaptic membrane
<u>Vesicle-associated membrane protein VAPA</u>	28103	5	30.1	6	41.4	4	24.9	vesicle trafficking, membrane fusion, complex assembly, cell motility
<u>Vesicle-associated membrane protein VAPB</u>	27439	5	27.2	7	28	2	16.9	interact with VAMP1 & VAMP2, vesicle trafficking

Anhang

Voltage-dependent anion-selective channel proteins	30868	7	36.7	7	36.7	2	7.4	transmembrane electron transport
WD repeat-containing protein 61 & 82	33731	2	12.1	2	12.8	2	12.1	transcriptional regulation
Zinc finger CCHC domain-cont. protein 3 & 560	44389	2	7.2	7	23	4	12.6	zinc ion binding

<u>Protein Description</u>	<u>Da</u>	<u>HEK-E-C</u>		<u>-E(mAG)-C</u>		<u>family / function</u>
		<u>hits</u>	<u>%Cov</u>	<u>hits</u>	<u>%Cov</u>	
3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase	26564	1	9.6	1	9.6	integral membrane protein of the ER
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2 & 3	43360	5	17.7	6	17.7	Fatty acid biosynthesis
7-dehydrocholesterol reductase	55195	1	4.6	1	4.6	catalyzes 7-dehydrocholesterol to cholesterol conversion
Acylphosphatase-1	11254	2	23.2	1	10.1	hydrolysis of carboxyl-phosphate bonds
ADP/ATP translocase	33059	5	17.8	5	17.8	mitochondrial carrier subfamily
ATP synthase subunits	11421	2	24.3	2	23.3	transmembrane transporter activity
Beta-2-microglobulin	13820	1	8.4	1	8.4	component of the MHC class I complex
<u>C10orf35</u>	13230	2	22.3	3	27.3	interacts with Solute carrier family 39, member 11
Calcyclin-binding protein	26308	1	3.1	1	3.9	calcium-dependent ubiquitination, proteosomal degradation
Carbonic anhydrase 2	29285	8	49.6	2	18.1	reversible hydration of carbon dioxide
Cardiotrophin-like cytokine factor 1	25388	1	3.6	1	3.6	activates the Jak-STAT signaling cascade
CD81	26476	2	18.2	1	8.5	tetraspanin
CD9	25969	1	4.4	1	4.4	tetraspanin
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein	12362	2	25.9	3	34.3	regulation of oxidation
PIS1	23865	1	5.2	1	5.2	biosynthesis of phosphatidylinositol
Cytosolic 5'-nucleotidase 3A	38266	1	1.8	1	3.9	dephosphorylation of nucleoside 5'-monophosphates
D-dopachrome decarboxylase-like protein	14414	1	15.7	1	9.7	lyase activity
<u>DJ-1</u>	20050	4	33.9	1	13.8	chaperone, protects against oxidative stress & cell death
<u>Emerin</u>	29033	1	8.7	4	29.1	mediates membrane anchorage to the cytoskeleton
ES1 protein homolog	28495	1	12.3	1	3	unknown
HSD17B12	34416	3	11.9	1	4.8	estradiol 17-beta-dehydrogenase activity
FAM207A	25441	1	5.7	3	21.3	unknown
FAM3C	24950	2	10.6	1	4.8	cytokine activity
Fructose-bisphosphate aldolase A	39851	6	24.5	1	3.8	glycolysis, conversion of fructose-1,6-bisphosphate
FXVD6	10706	1	23.2	1	1.2	encodes phosphohippolin, affects Na,K-ATPase

Anhang

Glutaredoxin-related protein 5	16732	1	8.9	1	8.9	normal iron homeostasis
high mobility group protein B1-like	24394	2	12.8	1	5.7	protein binding
Inhibitor of IκB	39399	1	3.4	1	3.4	novel p53 target gene, proapoptotic function
<u>jagunal homolog 1</u>	21111	1	6.6	1	6.6	transmembrane protein, early secretory pathway
L-lactate dehydrogenase A & B	36900	9	26.3	3	11.1	catalyzes L-lactate & NAD to pyruvate & NADH
Lysocardiolipin acyltransferase 1	49344	1	2.4	1	3.1	phospholipid metabolic process
Lysophospholipid acyltransferase 5	56511	1	1.8	1	1.8	phospholipid metabolic process
Macrophage migration inhibitory factor	12639	2	17.4	1	7.8	additional role in integrin signaling
Malate dehydrogenase	35937	12	48.8	2	8.3	pivotal role in the malate-aspartate shuttle
Methyltransferase-like protein 7A	28814	1	6.1	4	27.1	methylation
Mitochondrial import TIM14 & 16 & 50	12491	1	12.1	1	12.1	mitochondrial import inner membrane translocase
Myotrophin	13058	2	25.4	2	25.4	NFκappa B p50-p65 conversion to homodimers
NADH dehydrogenases	30337	2	9.8	2	22.6	binds STAT3, can function as tumor suppressor
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21158	4	35.8	2	17.1	Raf kinase inhibitory protein
Polyadenylate-binding protein 2	32843	1	3.6	1	3.6	crucial regulator of VEGF mRNA
Prefoldin	14202	1	17.2	1	11.7	chaperone, binds/stabilizes newly synthesized polypeptides
Prohibitin 1 & 2	33276	8	39.1	2	7.7	Antiproliferative activity
Proliferating cell nuclear antigen	29092	3	23.8	3	28.7	cofactor of DNA polymerase delta
<u>Rab-11A</u>	24492	1	6	0	7.4	secretory pathways, protein transport
<u>Rab-14</u>	24110	2	12.1	2	12.1	intracellular membrane trafficking
<u>Rab-1B</u>	22328	6	38.8	1	12.9	early secretory pathway, vesicle transport
<u>Rab-6A</u>				2	10.6	regulates trafficking in retrograde and an anterograde directions
<u>Rab-7a</u>	23760	4	28.5	2	9.7	vesicle traffic late endosomes & late endosomes to lysosomes
<u>Ran</u>	23467	2	10.9	1	5.5	formation & organization of microtubule network
Rap-1A	21316	2	17.9	1	6.5	regulates signaling pathways (proliferation, adhesion, malignancy)
Replication protein A 14	13674	1	8.3	1	8.3	protein binding
RhoA	22096	1	8.8	1	8.8	Rho protein signal transduction
SEC11A	20612	3	16.2	2	11.2	peptidase S26B family (migration, invasion, metastasis)
Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase subunit beta-3	31834	4	17.9	2	10.4	Na/K electrochemical gradients across plasma membrane
Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	38012	1	5	1	5	membrane fatty acid desaturase family
Thioredoxin-like protein 4A	16889	1	7.7	2	16.9	protein binding, splicing
Titin	4E+06	0	0.1	5	27.6	multiple functions
TMEM109	26194	2	9.1	1	4.9	stress response
TMEM33	28302	2	8.5	1	4.9	unknown

Anhang

TMEM97	21005	1	4.5	1	4.5	controls cellular cholesterol levels
Triosephosphate isomerase	31057	10	47.6	2	10.1	catalyzes isomerization of G3P and DHAP in glycolysis & gluconeogenesis
Triple QxxK/R motif-containing protein	9677	1	9.3	2	9.3	unknown
Tubulin-specific chaperone A	12904	3	27.8	1	4.4	capturing & stabilizing beta-tubulin intermediates
<u>VAMP8</u>	11488	4	32	2	24	SNARE family, synaptic vesicle fusion with presynaptic membranes
yippee-like 5	14061	2	21.5	1	21.5	interacts with RanBPM and RanBP10 (cell cycle)

HEK-E-C

<u>Protein Description</u>	<u>Da</u>	<u>hits</u>	<u>%Cov.</u>	<u>family / function</u>
Acetyl-CoA acetyltransferase	45456	1	3.0	reversible formation of acetoacetyl-CoA from acetyl-CoA
Actin-related protein 2/3 complex	34426	1	3.7	control of actin polymerization
ADP-ribosylation factor	20741	5	37.0	activation of Na(+)-selective current
BAX	21285	1	5.7	heterodimer with BCL2, apoptotic activator
<u>B-cell receptor-associated protein 31</u>	28031	3	14.2	transport from ER to Golgi, caspase 8-mediated apoptosis
C14orf1	15968	2	13.6	ergosterol biosynthetic protein 28
myeloid-derived growth factor	18897	2	13.9	unknown function
CD147	42573	6	21.6	EMMPRIN, basigin; Ig superfamily, important in tumor progression
CD54	48935	1	5.7	intercellular adhesion molecule 1
CD59	14795	1	9.4	inhibitor of complement membrane attack complex
Citrate synthase	51908	2	5.8	synthesis of citrate from oxaloacetate and acetyl coA
coagulation factor deficiency protein 2	16494	1	11.6	complex with lectin mannose binding protein, coagulation factors V and VIII transport
CXADR	40575	1	6.3	Coxsackievirus and adenovirus receptor
<u>Cytoskeleton-associated protein 2</u>	77509	1	1.8	stabalizes microtubules, regulation of cell division
Delta-CoA isomerase	36136	3	11.3	beta-oxidation of unsaturated fatty acids
Desmoglein-2	1E+05	1	1.5	expressed in colon, -carcinoma, simple stratified epithelia, found in desmosomes shuttles electrons between flavoprotein dehydrogenases and flavoprotein ubiquinone
Electron transfer flavoprotein	35400	4	17.4	oxidoreductase
Endoplasmic reticulum protein 29	29032	1	4.6	processing of secretory proteins within the ER
ER-Golgi intermediate protein 1	32971	1	7.9	cycling membrane protein, increase turnover of other proteins
Enoyl-CoA hydratase	31823	1	7.2	mitochondrial fatty acid beta-oxidation pathway
<u>Flotillin-2</u>	47434	2	6.8	caveolae-associated, thought to function in neuronal signaling
GLOD4	35170	1	4.2	Glyoxalase domain-containing protein 4

Anhang

Glycosyltransferases	50940	6	17.8	tightly associated subunit of oligosaccharyltransferase
G-rich sequence factor 1	53606	2	4.6	stimulate translation of viral mRNAs in vitro
HPRT1	24792	3	15.1	conversion of hypoxanthine to inosine and of guanine to guanosine monophosphate
HSP beta-1	22826	2	21	stress resistance and actin organization
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor1	3E+05	1	0.5	intracellular receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate, mediates calcium release
Isocitrate dehydrogenase	51333	1	6.2	catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate
MCT-1 Monocarboxylate Transporter 1	54593	2	2.4	catalyzes the rapid transport across the plasma membrane of many monocarboxylates such as lactate and pyruvate
MOB kinase activator 1A	25235	1	5.6	metal ion and protein binding
NAD(P)H-hydrate epimerase	31996	1	4.2	apolipoprotein A-I-binding protein
Non-specific lipid-transfer protein	59640	2	5.5	intracellular lipid transfer protein
<u>Nucleolysin TIA-1 p40</u>	43278	1	7.8	major granule-associated species, 15-kDa protein
<u>Phosphatidylinositol-bind. clathrin assembly protein</u>	70881	1	2.1	AP2-dependent clathrin-mediated endocytosis
Phosphoglycerate kinase 1	44985	9	32.4	conversion of 1,3-diphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate
Phosphoglycerate mutase 1	28900	5	25.2	catalyzes 3-PGA to 2-PGA in glycolysis
phosphotyrosine phosphatase	18487	1	7	concentrated in focal adhesions
Prostaglandin E synthase 3	18971	1	18.8	chaperone cofactor-dependent protein refolding
Proteasome subunit alpha-1,4,6,7,& beta-1,3,4	29822	2	10.3	catalytic subunits
Protein Phosphatase 2A	28682	2	10.8	PolyA and protein binding
<u>Rab-18</u>	23248	3	25.2	membrane trafficking in organelles and transport vesicles
<u>Rab-2A</u>	23702	2	12.7	protein transport from ER to Golgi
<u>Rab-35</u>	23296	3	21.9	Interplay with Arf6, cargo recycling, coordinates adhesion and migration.
<u>Rab-5C</u>	23696	2	18.1	ensure fidelity in docking / fusion of vesicles with acceptor compartment
Ral-A	23723	1	7.3	increases paracellular permeability, decreases incorporation into TJs
Rap-2c	20959	2	12	activate transcriptional activity of serum response element interacts with cytoskeleton, cell adhesion molecules, signaling molecules,
<u>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2</u>	2E+05	1	0.4	regulates morphology & motility
RER1	23057	2	14.8	retention of ER membrane proteins in the ER
Reticulocalbin-2	36911	1	6.6	similarity to a high affinity Ca(+2)-binding motif
<u>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</u>	23250	1	7.4	GDI's slow dissociation rate of GDP from membrane-bound rabs
Rho guanine nucleotide exchange factor 40	2E+05	1	0.4	similar to guanosine nucleotide exchange factors for Rho GTPases

<u>Secretory carrier-associated membrane protein 2</u>	37082	1	6.1	carriers to the cell surface in post-golgi recycling
SEP15	18236	1	9.9	may have redox function
SET-binding protein	2E+05	1	1	bind the SET nuclear oncogene (involved in DNA replication)
SETSIP	34861	3	12.3	endothelial cell differentiation
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	12766	1	10.5	signal transduction
Sideroflexin-1	35881	3	14.6	ion transmembrane transporter activity
SLC16A1	54593	1	2.4	proton-linked monocarboxylate transporter
<u>Small VCP/p97-interacting protein</u>	8551	1	14.3	Small VCP/p97-interacting protein
Sorcin	21947	2	16.7	regulates intracellular calcium homeostasis
<u>Spartin</u>	73358	1	4.2	regulates endosomal trafficking
<u>Stathmin</u>	17292	1	16.8	regulates microtubule filament system, destabilizes microtubules
Stomatin-like protein 2	38624	1	4.2	decreased survival in gastric Ca
Succinyl-CoA ligase subunit alpha	36626	1	9	catalyzes succinyl CoA and ADP or GDP to succinate and ATP or GTP
SUMO2	10921	1	12.6	nuclear transport, transcriptional regulation, apoptosis, protein stability
<u>Synaptophysin-like protein 1</u>	28889	1	4.2	synaptic transmission, vesicles
<u>Syntaxin-12</u>	31736	2	15.2	SNARE binding
<u>Syntaxin-7</u>	29911	3	14.6	SNARE interactions in vesicular transport
Thioredoxin domain-containing protein 12&5	19365	2	14	catalyzes disulfide bond formation, similar to disulfide isomerases
Transaldolase	37688	2	10.1	nonoxidative pentose phosphate pathway for nucleic acid synthesis and lipid biosynthesis
Transgelin-2	22548	4	27.6	thought to be a tumor suppressor
<u>Translocating chain-associated membrane protein 1</u>	43215	1	2.9	influences glycosylation, translocation of secretory proteins transcription regulator, translocates to the nucleus in response to
Tub	55845	1	1.2	phosphoinositide hydrolysis
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	17184	3	30.3	DNA postreplication repair
<u>VAMP7</u>	25261	2	14.1	SNARE family, late endosomes and lysosomes, fusion of transport vesicles to target membranes

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Zöller für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, für das interessante Thema, für Ihre stete Unterstützung, Geduld und Hilfestellungen in allen Phasen der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer möchte ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit danken.

Danke an Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper für die Begutachtung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Dr. Florian Thuma für die wissenschaftliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Danke für die schöne Zusammenarbeit in den letzten vier Jahren!

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Anja von Au, Dr. Ulrike Erb, Angela Frank, Xiaoyu Gu, Dr. Wei Mu, Christine Niesik, Rahel Philip, Ankica Stanic, Dr. Florian Thuma, Zhe Wang und Ellen Watson für eure Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft. Danke für die schöne und unvergessliche Zeit im Labor!

Danke an Frau Dr. Martina Schnölzer und ihrer Arbeitsgruppe am DKFZ für die Durchführung der Proteinanalyse.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern herzlich bedanken. Danke, dass ihr mich durch die schöne, wenn auch schwere Zeit begleitet habt. Ohne eure Unterstützung, Liebe und euer Vertrauen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Publikationsliste

Publikationen:

Philip R, **Heiler S**, Mu W, Büchler MW, Zöller M, Thuma F: Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015 Feb 10;6(4):2046-63.

Heiler S, Mu W, Zöller M, Thuma F: The importance of claudin-7 palmitoylation on membrane subdomain localization and metastasis-promoting activities. *Cell Commun Signal*. 2015 Jun 9;13:29. doi: 10.1186/s12964-015-0105-y.

Abstracts:

Florian Thuma, Sarah Heiler, Margot Zöller (2015) The CIC marker tandem EpCAM and palmitoylated Claudin-7 promotes epithelial-mesenchymal transition in non-metastatic tumor cells via exosomes, 7th Mildred Scheel Cancer Conference, Bonn, 17. - 19. Juni 2015

Sarah Heiler, Florian Thuma, Margot Zöller (2015) Exosomes expressing the CIC marker tandem EpCAM and Claudin-7 promote epithelial-mesenchymal transition in non-metastatic tumor cells, ISEV 2015 (*International Society for Extracellular Vesicles*), Washington DC, United States 23 - 26. April 2015

Sarah Heiler, Rahel Philip, Margot Zöller, Florian Thuma (2014) Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer, Stem Cells and Cancer Conference - 8th International Heinrich F. C. Behr Symposium, DKFZ, Heidelberg, 28. – 30. September 2014

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Dissertation mit dem Thema:

Der Einfluss der Palmitoylierung von Claudin-7 auf die Lokalisation in Membranmikrodomänen und metastasierungsfördernde Eigenschaften

Selbstständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keinem Prüfungsausschuss vorgelegt worden. Die Satzung der Universität Karlsruhe / KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung wurde beachtet.

Hambrücken, den 03.11.2015

Sarah Heiler