



# VARIANTE CD44 ISOFORMEN IN PROTEINKOMPLEXEN – LOKALISATION, SIGNALTRANSDUKTION UND FUNKTION

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der  
Universität Karlsruhe  
genehmigte

DISSERTATION

von  
Dirk Steffen Schmidt  
aus  
Wolzhausen

2002

Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2002
Referent:	Prof. Dr. Margot Zöller
Korreferent:	PD Dr. Jonathan Sleeman

THE DAWNING OF A BRAND NEW DAY  
THE WAKING OF THE WHISPERS SAY:  
THAT SLEEPING HEAVENS WILL RETURN  
IN DEEPEST NIGHT THE SECRET LEARNED  
AND FROM THESE WALLS THIS CITY LIES  
THE PAST WILL BE OUR FUTURE  
THE JOURNEY WILL BE OVER,  
AWAKE

Downes&Paine

Adapted from „The Rubaiyat“ of Omar Khayyam

**Für John-Boy**



**ZUSAMMENFASSUNG**

Die Mechanismen, die der Progression von Tumoren zugrunde liegen, sind noch immer weitestgehend ungeklärt. Die Schwesterzelllinien BSp73AS und BSp73ASML eines Pankreasadenokarzinoms der Ratte liefern ein Modell, in dem Fragen zur Metastasierung untersucht werden können. Ausgehend von dem Befund, daß über die beiden varianten Isoformen CD44 meta-1 und CD44 meta-2 metastastisches Potential auf BSp73AS Zellen übertragen werden kann, ohne daß die Zellen den fulminant metastasierenden Phänotyp der BSp73ASML Zellen entwickeln, stellte sich die Frage nach weiteren metastasierungsassoziierten Membranmolekülen und einer möglichen Interaktion dieser Proteine mit varianten CD44 Isoformen in BSp73ASML Zellen. Nachdem in ersten Immunpräzipitationen und Western Blot zwei weitere metastasierungsassoziierte Proteine als mit variantem CD44 assoziiert beschrieben werden konnten, wurden zur Aufklärung aller in BSp73ASML Zellen mit CD44 kopräzipitierender Moleküle nach Immunpräzipitation unter Lubrol Lyse Bedingungen die kopräzipitierenden Proteine massenspektrometrisch analysiert. Die Peptidanalyse ergab, daß die varianten Isoformen CD44 meta-1 und CD44 meta-2 mit dem Ep-CAM Homolog D5.7A, dem  $\alpha$ 3-Integrin, Annexin I und den beiden Tetraspaninen D6.1A und CD9 assoziieren, wobei auf BSp73ASML Zellen alle varianten CD44 Moleküle in Form dieser Proteinkomplexe vorliegen. Weiterhin konnte anhand von BSp73AS Zellen und D5.7A Einzeltransfektanten der BSp73AS Zellen nachgewiesen werden, daß CD9 und D5.7A in diesem Zellsystem nicht mit der Standard Isoform des CD44 assoziiert sind. Untersuchungen zur Lokalisation der assoziierten Proteine innerhalb der Membran ergaben, daß die Proteine in speziellen, lipidhaltigen Subdomänen der Membran, sog. „Lubrol Rafts“ lokalisiert sind. Diese Subdomänen lassen sich über Unlöslichkeit in Lubrol definieren, sind aber in stringenteren Detergentien wie Brij 96 oder Triton-X 100 löslich. „Lubrol-Rafts“ können auch durch Cholesterindepletion zerstört werden, was aber keinen Einfluß auf die Formierung der beschriebenen Proteinkomplexe hatte. Da Palmitoylierung als eine Moleküleigenschaft beschrieben wurde, die die Integration in „Raftdomänen“ unterstützt, wurde anhand dreier Mutanten von CD44 meta-1 untersucht, inwieweit dies auf die palmitoylierte Form von CD44 meta-1 zutrifft. Untersuchungen mit transfizierten CHO-K1 Zellen belegen, daß die „Raft“-Assoziation der CD44v enthaltenden Komplexe zumindest nicht ausschließlich auf der Palmitoylierung von CD44v beruhen kann, wengleich die Mutation beider membranproximaler Cysteine Einfluß auf die Direktion und Glykosylierung des CD44 Moleküls zu nehmen scheint. „Lipid Rafts“ werden auch als Plattform der Signaltransduktion angesehen. Daher war es essentiell das Potenzial zur Signaltransduktion dieser CD44v enthaltenden Komplexe im Vergleich zu nicht komplexiertem CD44 zu evaluieren. Ausschließlich bei Vorliegen dieser CD44v enthaltenden Proteinkomplexe kann die in vitro Serin- oder Threonin Phosphorylierung eines 22 kD Proteins beobachtet werden. Die Identifikation dieses Proteins steht noch aus. Die Proteinkomplexe kolokalisieren auch mit den kleinen G-Proteinen Rho und Rac-1 und assoziieren, vermutlich über variantes CD44, an Ezrin und Moesin. Erste funktionelle Untersuchungen der Proteinkomplexe zeigen, daß Kreuzvernetzung der betei-

ligten Komponenten, speziell von CD44v und D5.7A das proliferative Potential fördert. Dieser Effekt kann durch die Quervernetzung mehrerer Komponenten des Komplexes verstärkt werden. Im Hinblick auf die Rezeptorfunktion von CD44 für Hyaluronsäure konnte ich nachweisen, daß sowohl die Zerstörung des Zytoskeletts als auch Cholesterindepletion einen Einfluß auf die Hyaluronsäurebindung von CD44s und nicht komplexiertem CD44v auf BSp73AS Zellen hat. Im Gegensatz hierzu wird die Bindung von Komplexen, die variante CD44 Isoformen enthalten weder durch die Zerstörung des Zytoskeletts noch Cholesterindepletion beeinträchtigt. Die Tatsache, daß variante CD44 Isoformen auf metastasierenden Tumorzellen ausschließlich als Proteinkomplexe in Lipid-reichen Membranmikrodomänen vorliegen und in dieser Form Proliferation, Adhäsion und Signaltransduktion unterschiedlich zu nicht komplexierten varianten CD44 Isoformen beeinflussen, könnte ein wesentliches Element des metastatischen Potentials einer Tumorzelle darstellen.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:**

μ	mikro
°C	Grad Celsius
<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphorisotop
<sup>3</sup> H	Tritium, radioaktives Wasserstoffisotop
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APC	„Antigen Presenting Cell“
APS	Ammoniumpersulfat
ATP, GTP	Adenosin- Guanosin- Triphosphat
BGH	„Bovine Growth Hormone“
BSA	„Bovine Serum Albumine“
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CD	„Cluster of Differentiation“
CD44s	CD44 Standard Isoform
CD44v	CD44 Variante Isoform
cDNA	„complementary DNA“
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Deoxy-Adenosin/Guanosin/Cytidin/Thymidin-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleicacid“
DRM	„Detergent Resistent Membrane“
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“
ECM	„Extracellular Matrix“
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-Aceticacid
Ep-CAM	„Epithelial-Cell-Adhesion-Molecule“
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FACS	„Fluorescence-Activated-Cell-Sorter“
FCS	„Fetal Calf Serum“
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
g	Erdanziehungskraft
G418	Geneticin
GEM	„Glycosphingolipid-Enriches-Membrane“
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde(n)
HA	„Hyaluronic Acid“
HB-EGF	„Heparin-Binding-Epidermal-Growth-Factor“
HEPES	N-2-Hydroxy-Ethyl-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HEV	„High Endothelial Venules“
HLB	Hydrophile-Lipophile-Balance
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LAT	„Linker for the activation of T cells“
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Meter

M	Molar
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
min	Minute(n)
nm	Nanometer
OD <sub>Zahl</sub>	Optische Dichte (der Wellenlänge in nm)
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PE	Phycoerythrin
PKC	Protein Kinase C
PLAP	Plazentale Alkalische Phosphatase
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	„Ribonucleicacid“
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Duodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TCR	„T-Cell-Receptor“
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TX-100	Triton X-100
U	„Unit“
ÜN	Über Nacht
uPAR	„Urokinase Type Plasminogen Activator Receptor“
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen (Volumenprozent)
VT	Volumenteile
w/v	Gewicht per Volumen (Gewichtsprozent)



<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 TUMORIGENITÄT UND METASTASIERUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.2 DIE ADENOKARZINOMLINIEN BSP73AS UND BSP73ASML ALS UNTERSUCHUNGSSYSTEM DER METASTASIERUNG</b>	<b>2</b>
1.2.1 DAS C4.4 ANTIGEN	3
1.2.2 DAS EP-CAM HOMOLOG D5.7A	4
1.2.3 DAS TETRASPANIN D6.1A	5
1.2.4 CD44	7
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>2.1 MATERIAL</b>	<b>15</b>
2.1.1 CHEMIKALIEN	15
2.1.2 RADIOCHEMIKALIEN	16
2.1.3 VEKTOREN UND PRIMER	17
2.1.4 ANTIKÖRPER	17
2.1.4.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER	17
2.1.4.2 SEKUNDÄRANTI-KÖRPER UND -REAGENZIEN	18
2.1.5 ZELLINIEN	18
<b>2.2 METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>19</b>
2.2.1.1 KRYOKONSERVIERUNG EUKARYONTISCHER ZELLEN	19
2.2.1.2 PASSAGIEREN EUKARYONTISCHER ZELLEN	20
2.2.1.3 TRANSFEKTION UND SELEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MITTELS POLYFECT	20
2.2.1.4 FACS ANALYSE	20
2.2.1.5 REKLONIERUNG TRANSFIZIERTER ZELLEN MITTELS LIMITIERENDER VERDÜNNUNG	20
2.2.1.6 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG FÜR DIE MIKROSKOPISCHE ANALYSE	21
2.2.1.7 PMA STIMULATION VON ZELLEN	21
2.2.1.8 DEPLETION DES CHOLESTERINS AUS DER ZELLMEMBRAN	22
2.2.1.9 ZERSTÖRUNG DES ZYTOSKELETTS	22
2.2.1.10 BESCHICHTEN VON PLASTIKOBERFLÄCHEN	22
2.2.1.11 ADHÄSIONSSASSAY	22
2.2.1.12 PROLIFERATIONSASSAY	23
2.2.1.13 APOPTOSEASSAY	23
2.2.1.14 SCRATCH-ASSAY	23
<b>2.2.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>23</b>
2.2.2.1 OBERFLÄCHENBIOTINYLIERUNG VON ZELLEN	24
2.2.2.2 PRÄPARATION VON ZELLYSATEN	24
2.2.2.3 IMMUNPRÄZIPITATION	24
2.2.2.4 IN-VITRO KINASE ASSAY	25
2.2.2.5 PALMITOYLIERUNGSASSAY	25
2.2.2.6 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)	26
2.2.2.7 KOLLOIDAL-COOMASSIE-FÄRBUNG VON PROTEINGELEN UND MASSEN-SPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON PROTEINBANDEN	26
2.2.2.8 PROTEINBLOT (WESTERN BLOT) AUF PVDF MEMBRANEN (TOWBIN ET AL., 1979)	27
2.2.2.9 DETEKTION VON PROTEINEN AUF PVDF MEMBRANEN	27
2.2.2.9.1 ANTIKÖRPERNACHWEIS	27
2.2.2.9.2 AUTORADIOGRAPHIE	28
2.2.2.10 SACCHAROSE-DICHTE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION	28

2.2.2.11.	SEDIMENTATION VON „LIPID RAFTS“	28
2.2.2.12.	MEMBRANPRÄPARATION	29
2.2.2.13.	PRÄZIPITATION VON PROTEINEN	29
<b>2.2.3</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>29</b>
2.2.3.1	GENERIERUNG CHEMOKOMPETENTER <i>E. COLI</i> BAKTERIEN	29
2.2.3.2	HITZESCHOCKTRANSFORMATION CHEMOKOMPETENTER BAKTERIEN	30
2.2.3.3	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON BAKTERIEN	30
2.2.3.4	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IN KLEINEM MAßSTAB (MODIFIZIERT NACH (BIRNBOIM AND DOLY, 1979))	30
2.2.3.5	PLASMID PRÄPARATION IM GROßEN MAßSTAB	31
2.2.3.7	ENZYMATISCHE MODIFIKATIONEN DER DNA	32
2.2.3.7.1	RESTRIKTIONSENZYMATISCHER VERDAU	32
2.2.3.7.2	DEPHOSPHORYLIERUNG DER 3'-ENDEN VON DNA	32
2.2.3.7.3	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	32
2.2.3.8	DNA GELELEKTROPHORESE	33
2.2.3.8.1	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	33
2.2.3.8.2	AUFREINIGUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN	33
2.2.3.9	GERICHTETE MUTATION DURCH PCR	33
2.2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	34

---

**3 ERGEBNISSE** **35**

<b>3.1</b>	<b>RELATIVE OBERFLÄCHENEXPRESSION VERSCHIEDENER PROTEINE AUF DEN ZELLINIEN Bsp73AS14 UND Bsp73ASML</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>KOPRÄZIPITATION VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE MIT CD44 VARIANTEN ISOFORMEN UNTER VERSCHIEDENEN LYSISBEDINGUNGEN</b>	<b>38</b>
3.2.1	D6.1A UND D5.7A KOPRÄZIPITIEREN MIT CD44	39
<b>3.3</b>	<b>MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER MIT VARIANTEN ISOFORMEN VON CD44 NACH LUBROL-LYSE KOPRÄZIPITIERENDEN PROTEINE</b>	<b>41</b>
3.3.1	REPRÄZIPITATIONSANALYSE VON CD9	43
<b>3.4</b>	<b>VARIANTENSPEZIFITÄT DER PROTEININTERAKTIONEN IN LUBROL RESISTENTEN KOMPLEXEN</b>	<b>44</b>
3.4.1	HERSTELLUNG EINER STABILEN D5.7A EXPRIMIERENDEN VARIANTE DER Bsp73AS ZELLINIE	44
3.4.2	DIE CD44 STANDARD ISOFORM KOPRÄZIPITIERT NICHT MIT CD9 ODER D5.7A	45
<b>3.5</b>	<b>STÖCHIOMETRIE DER INTERAKTION VON VARIANTEM CD44, D5.7A UND CD9</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>LUBROL RESISTENTE PROTEINKOMPLEXE UND MIKRODOMÄNEN DER MEMBRAN</b>	<b>48</b>
3.6.1	DIE CD44 ENTHALTENDEN PROTEINKOMPLEXE SIND NICHT IN TX-100 RESISTENTEN MEMBRANDOMÄNEN LOKALISIERT	49
3.6.2	CD44, D5.7A, D6.1A UND CD9 LIEGEN IN CHOLESTERIN ABHÄNGIGEN LUBROL „LIPID RAFTS“ VOR	50
<b>3.7</b>	<b>CD44, D5.7A UND CD9 KOLOKALISIEREN IN DER MEMBRAN VON Bsp73ASML SELBST NACH ENTZUG DES CHOLESTERIN</b>	<b>54</b>
<b>3.8</b>	<b>ZYTOSKELETTVERANKERUNG VON CD44 UND D5.7A</b>	<b>57</b>
<b>3.9</b>	<b>PALMITOYLIERUNG</b>	<b>59</b>
3.9.1	EXPRESSION DER MUTIERTEN CD44 META-1 MOLEKÜLE IN CHO-K1 ZELLEN	61
3.9.2	PALMITOYLIERUNG DER VERSCHIEDENEN CD44 META-1 MUTANTEN UND EINFLUß DER PALMITOYLIERUNG AUF DIE MEMBRANLOKALISATION	62
<b>3.10</b>	<b>CD44-PROTEINKOMPLEXE UND SIGNALTRANSDUKTION</b>	<b>64</b>
3.10.1	PHOSPHORYLIERUNG	64
3.10.2	DAS PHOSPHORYLIERTE 22KD PROTEIN IST NICHT CD9	67
3.10.3	DIE PHOSPHORYLIERUNG IST KEINE TYROSIN-PHOSPHORYLIERUNG	68
3.10.4	WEITERE CHARAKTERISIERUNGEN DES PHOSPHORYLIERTEN PROTEINS UND VERSUCH DES NACHWEISES INVOLVIERTER KINASEN	68
3.10.5	ASSOZIATION VON D5.7A UND CD44 MIT DEN KLEINEN G-PROTEINEN RAC UND RHO	69

<b>3.11</b>	<b>MÖGLICHE FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN DER INTERAKTION VON VARIANTEM CD44 MIT D5.7A</b>	<b>71</b>
3.11.1	PROLIFERATION UND APOPTOSE	71
3.11.2	BINDUNG AN EXTRAZELLULÄRE MATRIX	73
3.11.3	ZELL-ZELL-ADHÄSION	77
3.11.4	MIGRATORISCHE EIGENSCHAFTEN	78
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>INTERAKTIONEN VON VARIANTEN ISOFORMEN DES CD44</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>„LIPID RAFTS“</b>	<b>83</b>
<b>4.3</b>	<b>SIGNALTRANSDUKTION</b>	<b>86</b>
<b>4.4</b>	<b>PERSPEKTIVEN</b>	<b>89</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>103</b>
	PUBLIKATIONEN:	103
	EINGEREICHTE PUBLIKATIONEN:	103
	PUBLIKATIONEN IN VORBEREITUNG:	103
	PUBLIZIERTE ABSTRACTS:	103
	<b>MEIN DANK GILT...</b>	<b>105</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>106</b>

# 1 EINLEITUNG

Krebs ist in Deutschland neben den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. So wurden 1998 in Deutschland ca. 350.000 Neuerkrankungen verschiedenster Krebsarten diagnostiziert. Der Blick auf die statistische Verteilung der Neuerkrankungen zeigt, daß die Gruppe der 80-84 jährigen 650 mal häufiger betroffen war, als die Gruppe der 0-4 jährigen, und 152 mal häufiger als die Gruppe der 30-34 jährigen (Statistik des Robert-Koch-Instituts). Diese Verteilung macht ein wesentliches Merkmal der Tumorentstehung deutlich. Tumore entstehen in einem Vielstufenprozeß, der Jahre oder Jahrzehnte dauert und sind nicht die Folge einzelner die Zellen verändernden Ereignisse. Wenngleich für viele Arten von Tumoren sowohl eine operative Behandlung mittlerweile möglich ist, und auch viele ernährungs- und umwelttechnische Einflüsse, die die Entstehung von Krebs fördern, bekannt sind und somit vermieden werden können, ist in den seltensten Fällen eine Frühdiagnose, die die ersten Stufen einer Zelltransformation erkennt, durchführbar. Ebenso treten häufig auch nach der Entfernung eines Primärtumors Metastasen auf, die zu einer fulminanten, in vielen Fällen nicht therapierbaren Erkrankung führen. Dies impliziert zumindest indirekt, daß die Prozesse der Tumorentstehung und der Metastasierung voneinander trennbare und zu trennende Ereignisse sind, auf die ich im folgenden etwas näher eingehen möchte.

## 1.1 TUMORIGENITÄT UND METASTASIERUNG

Tumore sind Körperzellen, die aufgrund fehlender Zellzyklus- oder Apoptosekontrolle ein Stadium entarteten, unkontrollierten Wachstums erreichen. Diese Zellen wachsen an dem Ort ihrer Entstehung und können unter Umständen die ihnen eigenen Funktionen erfüllen, was abgesehen von einigen Ausnahmen, wie bspw. der Entartung Hormon produzierender Zellen, zunächst keine direkte Bedrohung des Organismus darstellt. Zum Auftreten solcher benignen Tumore kommt es in einem Vielstufenprozeß, bei dem verschiedene Gene, wie Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene alterieren, und somit ihre Funktion verlieren oder unkontrolliert übererfüllen (Bishop, 1991; Fearon and Vogelstein, 1990; Marshall, 1991). Genalterationen, die zu solch einem Zustand führen, können Punktmutationen, Translokationen oder Duplikationen sein (Lodish et al., 2001). Ebenfalls können durch virale Infektionen Gene in das Genom inserieren, die zur Entartung und unkontrolliertem Wachstum führen. Dennoch impliziert eine Transformation durch Onkogene nicht notwendigerweise auch den Metastasierungsprozeß (Muschel et al., 1985; Nicolson et al., 1992; Tuck et al., 1990). Vielmehr führen alle diese möglichen Ereignisse primär zur Ausbildung eines organständigen, benignen Tumors, der in aller Regel chirurgisch entfernt werden kann. Der Prozeß der Metastasierung hingegen erfordert neben unkontrolliertem Wachstum der Zellen auch alterierte Interaktionen mit dem umgebenden Gewebe bzw. benachbarten Zellen, die zur Absiedelung einzelner maligner Zellen aus dem Primärtumor und zur Ansiedelung von Sekundärtumoren in vom Primärtumor unterschiedlichen Geweben führen. Dennoch konnte gezeigt werden, daß das Adenovirus2

E1A Protein die Ras-induzierte Fähigkeit zu metastasieren zu supprimieren vermag, ohne die Tumorigenität transformierter Rattenembryozellen zu beeinflussen (Pozzatti et al., 1986). Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß die Onkogenexpression per se die Voraussetzung für die Erlangung metastatischer Kompetenz ist. Vielmehr kann angenommen werden, daß Genprodukte, die im Prozeß der Metastasierung eine Rolle spielen, durch Onkogene aktiviert werden.

Die Schritte der Metastasierungskaskade sind

- 1) das Herauslösen aus dem bestehenden Zellverband
- 2) Invasion durch die Basalmembran in das umliegende Gewebe
- 3) Intravasation in ein Blut- oder Lymphgefäßsystem, sowie Adaptation an die dort vorherrschende Druckbedingungen
- 4) Anheften an das Endothel des jeweiligen Gefäßsystems
- 5) Extravasation durch das Endothel
- 6) Proliferation innerhalb des Gewebes des neuen Organes sowie
- 7) Anschluß an das Gefäßsystem zur Versorgung mit Nährstoffen.

Die Tatsache, daß alle diese Vorgänge der normalen Physiologie des Organismus entnommen sind, d.h. an sich keine besondere Eigenschaft eines Tumors sind, läßt die Metastasierung auch als einen Prozeß der Reaktivierung physiologischer Programme erscheinen. Zu beobachten sind die an der Metastasierung beteiligten Schritte während der Embryogenese, der Wundheilung, der Implantation in die Uteruswand oder der Aktivierungs- und Effektorphase von Lymphozyten, um nur einige zu nennen. Um diese Prozesse besser zu verstehen und schließlich auch für speziell auf die Fragestellungen der Metastasierung abgestimmte Therapieansätze verwertbar zu machen, müssen die in den einzelnen Stadien der Metastasierung beteiligten Proteine, ihre Interaktion und Regulation aufgeklärt und besser verstanden werden. Ein für solche Untersuchungen geeignetes zelluläres Modellsystem ist die Ratten-Adenokarzinomzelllinie BSp73, die im folgenden genauer beschrieben werden soll.

## **1.2 DIE ADENOKARZINOMLINIEN BSp73AS UND BSp73ASML ALS UNTERSUCHUNGSSYSTEM DER METASTASIERUNG**

Aus dem spontan entstandenen, intraperitoneal wachsenden Tumor BSp73 des BDX Rattenstammes, der als Pankreasadenokarzinom identifiziert wurde (Matzku et al., 1983) gingen nach mehrmaliger subkutaner Transplantation 2 Sublinien hervor. Zum einen die schnell wachsende BSp73AS Sublinie, die nach Injektion in die Fußpfote von BDX Ratten einen lokalen Tumor bildet, der, sofern er nicht entfernt wird Metastasen im drainierenden Lymphknoten bildet, und andererseits die langsam wachsende BSp73ASML Sublinie, die nur einen kleinen Primärtumor ausbildet, aber äußerst schnell die drainierenden Lymphknoten und im weiteren Verlauf bevorzugt die Lunge besiedelt (Matzku et al., 1983). Außer den drastischen Unterschieden im Bezug auf ihr Metastasierungspotenzial, zeigten die beiden Sublinien auch bezüglich ihrer Morphologie, der Adhärenzeigenschaften, Zytoskelettcharakteristika und Glykosylierungsmuster der

Proteine enorme Unterschiede (Ben-Ze'ev et al., 1986; Raz et al., 1986). Die BSp73AS Zellen haben eine mehr epitheloide Morphologie, hohe Bindungsfähigkeit an Laminin, Fibronectin, Kollagen des Typs II, III, IV, V, nach deren Bindung sie unter Ausprägung langer Filopodien spreiten, wohingegen die BSp73ASML eine deutlich geringere Affinität zu diesen Substraten haben, keinerlei Spreiten zeigen, sondern ihre runde mit Mikrovilli übersäte Morphologie stets beibehalten. Einhergehend mit dem unterschiedlichen Spreitverhalten weisen die BSp73ASML Zellen deutlich verringerte Mengen an Zytoskelett-adaptorproteinen Vimentin, Vinculin und Talin auf. Andererseits exprimieren die BSp73ASML Zellen im Gegensatz zu den BSp73AS Zellen große Mengen der Proteinase KathepsinB, Stromelysin und Plasminogenaktivator. Desweiteren sind die Membranproteine der BSp73ASML Zellen in deutlich höherem Maße glykosyliert (Habermaas and Spiess, 1992). In vitro zeigen die BSp73AS Zellen im Gegensatz den BSp73ASML Zellen einen hoch invasiven Phänotyp nach Aussäen auf Monolayern von Gefäßendothelien (Boxberger et al., 1989). Um speziell die Divergenzen der beiden Sublinien im Hinblick der Zuordnung für die Metastasierung wichtiger Membranproteine untersuchen zu können, wurden in verschiedenen Studien Balb/c Mäuse mit Membranpreparationen der beiden Sublinien immunisiert, und die resultierenden monoklonalen Antikörper auf die differenzielle Expression in den beiden Sublinien hin untersucht (Habermaas and Spiess, 1992; Hadjiolov and Zimmermann, 1992; Matzku et al., 1989). In unserem Labor wurden 6 differentiell exprimierte Proteine beschrieben, von denen eines, das A8.10A, auf der BSp73AS Sublinie exprimiert wird, aber bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht kloniert und identifiziert ist. Die anderen 5 Moleküle werden auf der BSp73ASML Sublinie exprimiert, sowie auf 2 weiteren metastasierenden Zelllinien der Ratte, aber nicht auf den BSp73AS Zellen sowie weiteren 9 getesteten nicht metastasierenden Rattenzelllinien. Auf Grundlage dieser Ergebnisse werden diese Moleküle in der Folge metastasierungs-assoziiert genannt (Claas et al., 1996; Matzku et al., 1989). Zu diesen, exklusiv auf den metastasierenden Zelllinien exprimierten Molekülen, gehören: Die variante Isoform CD44 meta-1 (Günthert et al., 1991), das C4.4A, ein GPI-verankertes Protein, das Ähnlichkeiten zum uPA-Rezeptor aufweist (Rösel et al., 1998), das D5.7A (EpCAM), ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (Würfel et al., 1999), das D6.1A, ein zur Familie der Tetraspanine gehörendes Membranprotein (Claas et al., 1998) und schließlich das B5.5A, das  $\alpha\beta 4$ -Integrin der Ratte (Herlevsen et al., 2002, eingereicht) Einige dieser Moleküle sollen, da sie für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung sind, im folgenden genauer beschrieben werden. Ich werde jeweils zunächst das Molekül einführen, dann auf Befunde der Transfektion der Moleküle in die BSp73AS Zellen oder andere nicht metastasierende Rattenzelllinien eingehen, um diese im Kontext der Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen zu diskutieren.

### 1.2.1 DAS C4.4 ANTIGEN

Das C4.4A ist hochglykosyliertes Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) verankertes Membranprotein, dessen Aminosäurekette aus 352 AS (entsprechend 37kD) besteht, aber nach posttranslatorischen Modifikationen eine Größe von 94-98 kD je nach beobachteter Zelllinie aufweist (Rösel et al., 1998). Es ist unterteilbar in 3 Domänen, von denen die ersten beiden im Gegensatz zur dritten Homologien zum Uro-

kinase Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR) aufweisen. Durch seine spezielle GPI-Verankerung in der Membran ist das C4.4A in TX-100 unlöslichen Regionen zu finden und kann mittels Phosphatidylinositol Phospholipase C aus der Membran herausgelöst werden (Rösel et al., 1998). Mit C4.4A transfizierte BSp73AS Zellen zeigen nach intravenöser Injektion in BDX Ratten nicht eingekapselte Metastasen in der Lunge, im Gegensatz zu mock transfizierten Kontrollen, die eingekapselte Metastasen aufweisen. Weiterhin zeigen die C4.4A Transfektanden erhöhte Bindung an Laminin und penetrieren in Matrigel, was jeweils durch Zugabe des mAK C4.4 zu inhibieren ist. Diese Befunde zeigen die Beteiligung des C4.4A an der Degradation der ECM im Rahmen der Metastasierung (Rösel et al., 1998). Ein weiteres Indiz für diese Funktion des C4.4A ist die Hochregulation während der Implantation von Blastozysten in die Uteruswand. Die Homologien zum uPAR legen nahe, daß C4.4A über die Aktivierung eines bisher nicht identifizierten Liganden an der Degradierung der ECM beteiligt ist. Das auf den oberen Gastrointestinaltrakt restringierte Expressionsmuster im adulten Organismus, macht das C4.4A desweiteren zu einem interessanten Kandidaten für mögliche therapeutische Ansätze in der Krebstherapie.

### 1.2.2 DAS EP-CAM HOMOLOG D5.7A

Das D5.7A ist das Homolog des panepithelialen Markers Ep-CAM (epitheliales Zell Adhäsions Molekül), der in verschiedenen Studien identifiziert wurde und deswegen unter einer Reihe weiterer Namen bekannt ist (GA733-2, KSA, 17-1A, EGP40, EGP, EGP-314, ESA und Trop-1). Als Typ I transmembranes Glykoprotein mit einer 315 AS langen Kette, weist es in Western Blot Analysen eine Größe von 42kD auf (Claas et al., 1996). Desweiteren enthält es im extrazellulären Teil 12 konservierte Cysteine und eine EGF-ähnliche Domäne (Würfel et al., 1999). Die cytoplasmatische Domäne enthält ein Tyrosin, dessen Phosphorylierung aber bisher nicht beschrieben ist (Basu et al., 1995). Aufgrund der Struktur gehört es nicht zu den 4 Hauptfamilien der Zelladhäsionsmolekülen, den Integrinen, Cadherinen, Selektinen und Mitgliedern der Ig-Superfamilie (Aplin et al., 1998; Horwitz and Hunter, 1996). Das Ep-CAM kann über  $\alpha$ -Aktinin an das Aktin-Zytoskelett verankert werden (Balzar et al., 1998) Es ist auf den meisten Epithelien, auf Karzinomzellen und im Gewebe des Colon exprimiert. In polarisierten Zellen wird es in der basolateralen Zellmembran exprimiert, wo es mit E-Cadherin kolokalisiert, aber von Strukturen wie „tight junctions“, Desmosomen oder Bereichen der Zell-Marx Interaktion (überprüft anhand des  $\beta$ 1-Integrins) ausgeschlossen ist (Balzar et al., 1999). Ep-CAM zeigt eine relativ schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige homophile Adhäsion von Homodimeren (Litvinov et al., 1994). In Zell-Zell-Adhäsionsassays mit transfizierten Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, daß die tryptische Spaltung des D5.7A, in zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundene Untereinheiten von 35kD resp. 7kD, zu deutlich erhöhter Adhäsion führt (Würfel et al., 1999). Transfektion von schwach metastasierenden Tumorzelllinien der Ratte, führte zu beschleunigter und vermehrter Ausprägung von Metastasen in Lymphknoten und Lunge, konnte aber durch Applikation des mAK D5.7 je nach Zeitpunkt der Applikationen retardiert oder verhindert werden (Würfel et al., 1999). Die Expressionsstärke des Ep-CAMs geht einher mit verschiedenen Eigenschaften

der Zellen: In zervikalen, intraepithelialen Neoplasien (Litvinov et al., 1996) und in Keratinozyten (Schon et al., 1995) korreliert die Expressionsstärke invers mit der Differenzierung, dafür aber mit der Proliferation (Schon et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Ep-CAM Expression die Cadherin medierte Adhäsion dahingehend moduliert, daß bei zunehmender Expression des Ep-CAM die Interaktion der E- und N-Cadherine mit dem Zytoskelett inhibiert wurde, ohne daß eine reduzierte Expression der Cadherine beobachtet wurde. Der Einfluß des Ep-CAM auf die interzelluläre Adhäsion, Proliferation und Differenzierung wurde auch während der Ontogenese des humanen Pankreas bei der Entwicklung der Langerhans'schen Inseln gezeigt (Cirulli et al., 1998). Aufgrund der hohen Immunogenität des Ep-CAM, die sich nach Immunisierungen mit Karzinomzellen herausstellte, wurde versucht mittels mAKs eine Immuntherapie durchzuführen, die bei Applikation nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors auch gute Erfolge zeigt (30% erhöhte Überlebensrate in 7 Jahres Studien) (Riethmuller et al., 1998), aber für Therapien solider Tumoren ohne vorhergehende chirurgische Entfernung des Primärtumors aufgrund der Runterregulation der Ep-CAM Expression nicht den gewünschten Erfolg brachte (LoBuglio and Saleh, 1992). Zur Zeit werden klinische Studien mit bispezifischen anti-CD3/Ep-CAM Antikörpern (Kufer et al., 1997) und Ep-CAM restringierten zytotoxischen T Zellen durchgeführt. Da EpCAM auf Normalgewebe hoch exprimiert wird, sind diese Therapieansätze mit erheblichen Nebenwirkungen belastet.

### 1.2.3 DAS TETRASPANIN D6.1A

Tetraspanine, oder auch TM4SF Proteine genannt, sind eine Familie von Proteinen, die auf den meisten eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Sie zeichnen sich durch 4 Transmembrandomänen und 2 unterschiedlich große extrazelluläre Domänen (EC1 und EC2), sowie eine Vielzahl hochkonservierter Aminosäuren aus (zusammenfassend in (Hemler, 2001; Maecker et al., 1997) (Berditchevski, 2001; Boucheix and Rubinstein, 2001)). Tetraspanine sind in eine Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse involviert: Gewebsdifferenzierung (Boismenu et al., 1996), Eizellen-Spermien Fusion (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000), Metastasierung (Berditchevski, 2001; Yanez-Mo et al., 2001), Viren induzierte Syncytionformierung (Fukudome et al., 1992), Thrombozyten-Aggregation sowie B- und T-Zell-Aktivierung (Hemler et al., 1996; Maecker et al., 1997; Wright and Tomlinson, 1994). Obwohl Tetraspanine an solch vielfältigen Prozessen beteiligt sind, konnte noch kein lösliches oder membranständiges Protein als Rezeptor identifiziert werden. Die N- und C- Termini, die beide intrazellulär lokalisiert sind, weisen für spezifische Tetraspanin große Homologien zwischen den Spezies auf, aber zeigen keine Ähnlichkeiten innerhalb der TM4SF Protein Familie, was die Vermutung distinkter Funktionalität impliziert. Obwohl bisher keine Liganden/Rezeptoren gefunden werden konnten, zeigen die Tetraspanine doch eine enorme Diversität in ihren Interaktionen innerhalb der Membran einer Zelle. So interagieren die Tetraspanine mit Integrinen, dabei vorzugsweise mit  $\beta$ 1-Integrinen, aber auch mit anderen Adhäsionsmolekülen und Molekülen des Immunsystems (zusammenfassend in (Boucheix and Rubinstein, 2001)). Anhand der Bindungsstärke zwischen den Tetraspaninen und assoziierten Molekülen, kann eine Einteil-



lung in drei Stufen vorgenommen werden (Claas et al., 2001). So werden Interaktionen mit Tetraspaninen, die sehr robust und unter TX-100 Bedingungen stabil bleiben als Stufe 1 klassifiziert. Sie sind die am seltensten vorkommenden Interaktionen wie bspw. zwischen dem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und CD151 (Yauch et al., 1998; Yauch et al., 2000) oder dem  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin und CD151 oder  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin und CD81 (Serru et al., 1999). Die Interaktionen der Stufe 2 sind in stringenten Lysisbedingungen wie TX-100 aufzulösen, bleiben aber unter Brij96/97 Bedingungen stabil. Sie sind deutlich vielzähliger als die Interaktionen der Stufe 1, aber dennoch hochspezifisch. Zu ihnen können Tetraspanin-Tetraspanin-Interaktionen gehören, aber auch die Interaktionen zu Integrinen ( $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$ ) oder zu anderen Transmembranproteinen (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Horvath et al., 1998; Lozahic et al., 2000; Nakamura et al., 1995; Nichols et al., 1998; Sincock et al., 1999; Yanez-Mo et al., 1998). Interaktionen der Stufe 3 sind am häufigsten, aber auch am anfälligsten für Detergentien, und deshalb nur unter Bedingungen wie CHAPS oder Brij98/99 zu beobachten. Interaktionen der Stufe 3 beruhen wahrscheinlich nicht auf einer direkten Interaktion zwischen Tetraspaninen und den jeweiligen Partnermolekülen. Zu den Stufe 3 Assoziationen gehören die Interaktionen zwischen Tetraspaninen und Proteinen der MHC-Moleküle oder Ig-Superfamilie (Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996; Schmidt et al., 1996), aber wiederum auch eine Reihe von Verbindungen mit Integrinen (Mannion et al., 1996; Rubinstein et al., 1994; Sincock et al., 1999; Skubitz et al., 1996). Auch die bereits in Keratinozyten beschriebene Interaktion von CD44 und CD9 gehört in diese Klasse (Jones et al., 1996), sowie eine Reihe von Interaktionen zwischen Tetraspaninen und Molekülen, die in der Signaltransduktionskaskaden eine Rolle spielen (Bell et al., 1992; Berditchevski et al., 1997; Iwamoto et al., 1994; Shi et al., 2000; Yauch and Hemler, 2000).

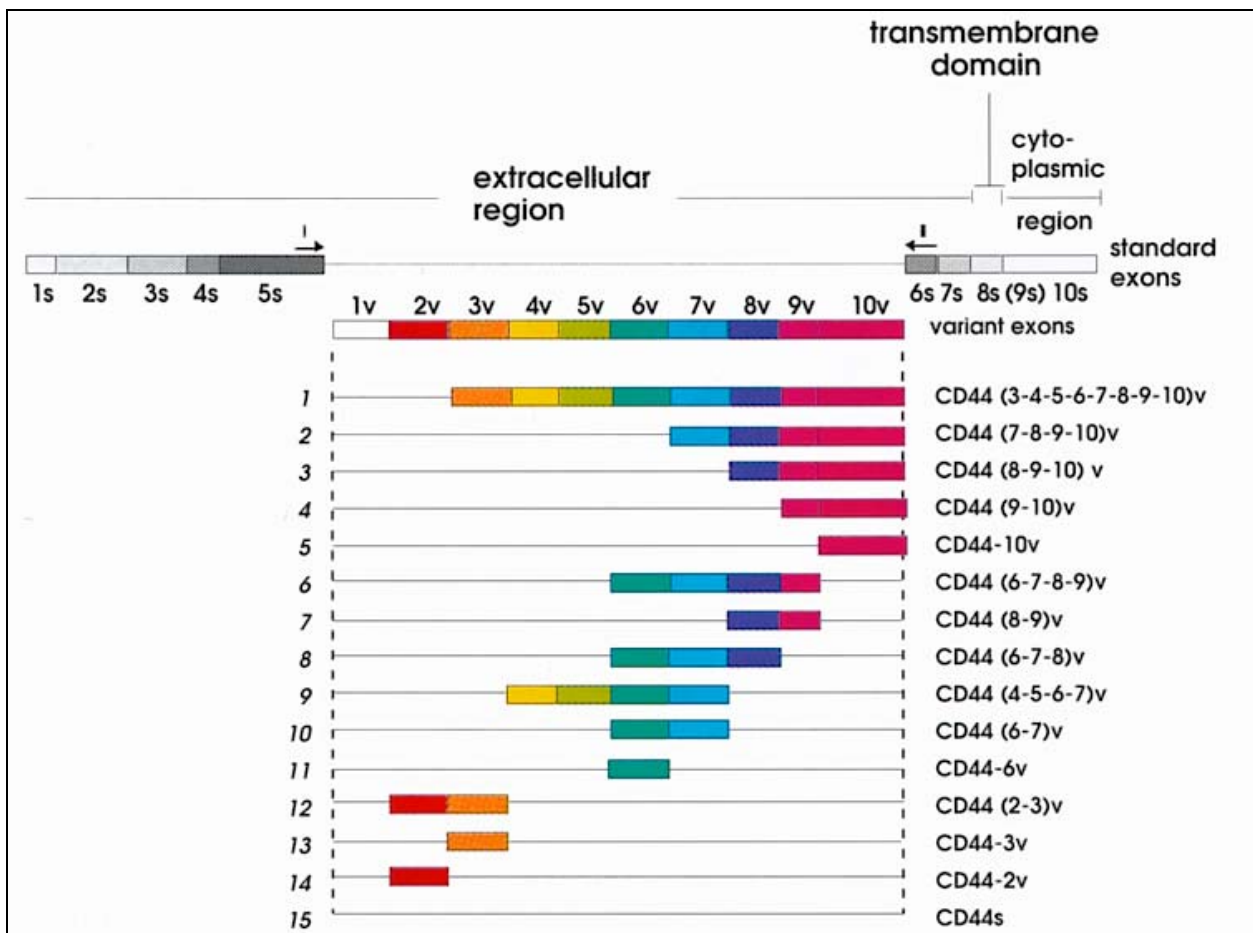
Das D6.1A ist ein 235 AS langes Glykoprotein, das aufgrund seiner 4 hydrophoben, die Membran passierenden Domänen, sowie einer kleinen (EC1) und einer großen (EC2) extrazellulären Domäne der Klasse der Tetraspanine (Wright and Tomlinson, 1994) zugeordnet wird. Es enthält 11 in der Familie der Tetraspanine konservierte Cysteine, 2 potentielle Glykosylierungsstellen, eine Konsensussequenz für die Bindung von Proteinphosphatasen, sowie eine SH2 Erkennungsstelle. Untersuchungen ergaben  $\geq 70\%$  Homologie der Nukleotid- und Aminosäuresequenz mit dem CO-029, einem humanen, tumor-assoziierten Tetraspanin (Claas et al., 1998). Das D6.1A zeigt in Übereinstimmung mit den Eigenschaften anderer Tetraspanine eine Assoziation mit Integrinen. So konnten die Interaktionen des D6.1A mit  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  (Claas et al., 1998) sowie mit  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (Herlevsen et al., 2002, eingereicht) unter CHAPS Lysisbedingungen gezeigt werden. Transfektanden der BSp73AS Zelllinie zeigten, daß D6.1A keinen direkten Einfluß auf die Proliferation hat, wohl aber auf die Metastasierung. So wurden Metastasen in der Lunge gefunden, aber nur selten in den drainierenden Lymphknoten. Weiterhin waren sowohl in der Umgebung des Primärtumors als auch der Metastasen starke Einblutungen festzustellen, sowie Infarkte in vorwiegend den abdominalen Gefäßen (Claas et al., 1998).

1.2.4 CD44

I. Molekulare und genomische Struktur des CD44

CD44 wurde erstmals 1980 als ein Molekül, das auf T-Lymphozyten, Granulozyten und kortikalen Thymozyten exprimiert ist, beschrieben (Dalchau et al., 1980). Innerhalb kürzester Zeit beschrieben eine Reihe weiterer Forscher das Molekül und gaben unterschiedliche Namen: GP90<sup>HERMES</sup>, extracellular matrix receptor III, homing cell adhesion molecule, phagocytic glycoprotein-1, glycoprotein 85, Ly-24, hyaluronate receptor oder HUTCH-1. Auf dem 3. internationalen Workshop für Leukocyte typing wurde dann die einheitliche Nomenklatur CD44 für alle diese vielen Namen festgelegt. CD44 ist ein Typ I transmembranes, hochglykosyliertes Protein enormer Diversität, die im wesentlichen durch 2 Faktoren zustande kommt:

- a) Generierung varianter Isoformen durch alternatives Spleißen und
- b) intensive posttranslatorische Modifikationen.



**Abb.E1: Schematische Darstellung der Exonstruktur des CD44**  
aus: CD44 Isoforms (Stauder und Günthert, 1995)

CD44 besteht in seiner genomischen Organisation aus 20 Exons (Screaton et al., 1993; Screaton et al., 1992), wobei die Exons 1-5 und 16-20 den sog. Standardanteil des CD44 bilden, und die Exons 6-15 als variante Isoformen v1-v10 zwischen die Exons 5 und 16 durch alternatives Spleißen inseriert werden können. Außer der Tatsache, daß 10 variante Exons existieren, können diese auch noch in unterschiedlichen Kombinationen in die Standardisoform gespleißt werden (Brown et al., 1991; Cooper et al., 1992; Dougherty et al., 1991; He et al., 1992; Jackson et al., 1992; Screaton et al., 1992), so daß sich eine nochmals enorm gesteigerte Anzahl potentieller CD44 Isoformen ergibt. Dennoch ist die am häufigsten exprimierte Form die CD44 Standard Isoform (Stamenkovic et al., 1991), bei der die Exons 5 und 16 aneinander gespleißt werden (Aruffo et al., 1990; Nottenburg et al., 1989) und die hauptsächlich auf Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden ist und deswegen auch CD44H genannt wird. Die Proteinkette des CD44H besteht aus 361 AS, was einer Größe von 37 KD entspricht (Nottenburg et al., 1989; Screaton et al., 1992; Stamenkovic et al., 1989), die durch posttranslatorische Modifikationen aber auf 85-95 kD vergrößert wird (Lokeshwar and Bourguignon, 1991; Zhou et al., 1989). Zu den Modifikationen des CD44 gehören N- und O- Glykosylierung, wobei es je nach Spezies 5-6 potentielle N-Glykosylierungsstellen und 7-10 O-Glykosylierungsstellen gibt (Goldstein et al., 1989; Zhou et al., 1989). Außerdem kann CD44 durch das Anhängen von Glykosaminglykanen, Heparansulfaten oder Chondroitinsulfaten modifiziert werden (Brown et al., 1991; Faassen et al., 1992; Jalkanen and Jalkanen, 1992; Stamenkovic et al., 1989; Tanaka et al., 1993), was CD44 zu einem Proteoglykan mit veränderter Ligandenspezifität macht. Der N-terminale Bereich des CD44 (AS12-101) ist zwischen den Spezies hoch konserviert (80-90% identisch) und hat 30% Homologie mit dem „cartilage link protein“ bzw. dem „proteoglycan core protein“. In dieser Region befinden sich 6 Cysteine, die durch Ausprägung von Disulfidbrücken eine aus 3 Untereinheiten bestehende globuläre Domäne bilden. Ebenso sind die 23AS lange Transmembran- und die Cytoplasmadomäne des CD44 zwischen den Spezies zu 80-90% konserviert. Lediglich der extrazelluläre, membranproximale Teil ist wenig (35-45%) konserviert. Die varianten Isoformen hingegen sind zu 60-70% konserviert (Goldstein et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Screaton et al., 1992; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989).

## II. Variante Isoformen

Trotz der immensen Vielfalt der varianten Isoformen, verdienen einige der Isoformen spezielle Aufmerksamkeit, da sie eng mit einer speziellen Funktion oder Gewebsspezifität verknüpft sind: Eine präferentiell auf Epithelien exprimierte Isoform CD44v8-10 oder CD44E (Brown et al., 1991; Dougherty et al., 1991; Hofmann et al., 1991), die reich an Serinen und Threoninen ist und deswegen im hohen Maße O-glykosyliert ist; Die Variante v3, die Glykosaminglykan-modifiziert ist, und aufgrund dessen Heparin bindende Wachstumsfaktoren und Chemokine binden kann (Bennett et al., 1995; Tanaka et al., 1993). Keratinozyten exprimieren vorzugsweise die Isoform CD44v3-10, die die HA-abhängige Zell-Zell-Adhäsion der Keratinozyten mediiert (Milstone et al., 1994). Nichtzuletzt die beiden auch auf

BSp73ASML Zellen exprimierten varianten Isoformen CD44v4-7 (meta-1) und CD44 v6/7 (meta-2), die wie bereits erwähnt nach Transfektion in BSp73AS einen metastatischen Phänotyp induzieren (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). In diesen beiden Varianten ist in der „konstanten“ Region des CD44 allerdings das Exon 16 nicht vorhanden (Herrlich et al., 1993). Neben der Fähigkeit den metastatischen Phänotyp zu übertragen, erweitern die varianten Isoformen v6 und v7 auch kooperativ die Bindungsfähigkeit des CD44 an Glykosaminyglykane (Sleeman et al., 1997).

### III. CD44 - Liganden und Interaktionen

#### Der extrazelluläre Teil des CD44

Viele Liganden des CD44 sind in der extrazellulären Matrix zu finden. So ist der erste beschriebene und wesentliche Ligand des CD44 die Hyaluronsäure (HA) (Aruffo et al., 1990). Die HA ist ein Glykosaminyglykan und die Hauptkomponente der ECM vieler Gewebe, unerlässlich auch für den Knorpelaufbau und die Homöostase des gewebesinternen Wasserhaushalts. Das CD44 besitzt zwei Bindungsstellen für die Hyaluronsäure (Peach et al., 1993). Die Bindung der HA an CD44 ist an Prozessen wie Stimulation der Proliferation, Zellmigration und Angiogenese beteiligt (Lokeshwar et al., 1996; Turley et al., 1991). Die HA Bindung durch CD44 selbst ist nicht per se vorhanden, sondern hängt von einer Reihe von Eigenschaften und Faktoren ab, wie der Expressionsdichte, der N- und O- Glykosylierung (Lokeshwar and Bourguignon, 1991; Sy et al., 1996), der Aktivierung durch die zytoplasmatische Domäne (Neame and Isacke, 1993) oder anderer Signale wie Stimulierung durch mAK oder PMA (Liao et al., 1993; Liu et al., 1996; Sy et al., 1996), wohingegen die membranproximale Domäne keinerlei Einfluß auf die HA Bindung hat (He et al., 1992). Außer der HA erkennt CD44 noch eine Reihe anderer Liganden wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Chondroitinsulfat, ebenfalls Komponenten der extrazellulären Matrix (Aruffo et al., 1990; Jalkanen and Jalkanen, 1992; Lokeshwar and Bourguignon, 1991; Peach et al., 1993). Außerdem gibt es noch nicht zu ECM gehörende Liganden des CD44 wie Serglyzin/gp600 (Toyama-Sorimachi and Miyasaka, 1994; Toyama-Sorimachi et al., 1995) und das chemotaktische Phosphoprotein Osteopontin (Katagiri et al., 1999).

#### Die zytoplasmatische Domäne des CD44

Die zytoplasmatische Domäne des CD44 ist ebenfalls von besonderer Bedeutung, da sie erstens die Verbindung des CD44 an das filamentöse Netzwerk der Zellen darstellt, zweitens über Phosphorylierungen ggf. in die Signaltransduktion der Zellen eingreift und drittens Modifikationen wie Palmitoylierung die Funktion und ggf. die Lokalisation des CD44 innerhalb der Zellmembran beeinflussen kann. Der zytoplasmatische Anteil des CD44 weist 2 potentielle Palmitoylierungsstellen auf, das Cystein an Position 286, welches in der Membran resident ist, und das Cystein an Position 295, welches membranproximal

im Zytoplasma lokalisiert ist. CD44 ist teilweise palmitoyliert und die Palmitoylierung ist über mAK beeinflussbar (Bourguignon et al., 1991; Guo et al., 1994), dennoch ist über die Funktion und Regulation der Palmitoylierung bisher nur wenig bekannt. Einerseits konnte gezeigt werden, daß dem Verlust der Palmitoylierung eine reduzierte Ankyrinbindung des CD44 folgte (Bourguignon et al., 1991), andererseits konnte für nicht palmitoyliertes CD44 eine Dimerisierung über die Cysteine nach PMA Stimulation, einhergehend mit einer erhöhten HA Bindung, gezeigt werden (Liu and Sy, 1997). Erhöhte HA Bindung des CD44 kann aber auch durch ein variantenspezifisches Clustering erzielt werden (Sleeman et al., 1996), sodaß der unpalmitoylierten Form diese Funktion nicht exklusiv zugeordnet werden kann.

Der zytoplasmatische Teil des CD44 ist an 2 Serinresten, Ser323 und Ser 325, konstitutiv phosphoryliert, weist aber keinerlei Phosphorylierung an Tyrosinen oder Threoninen auf (Isacke et al., 1986; Neame and Isacke, 1992; Pure et al., 1995). Nach PMA Stimulation ist keine erhöhte Phosphorylierung feststellbar, obwohl bspw. das Ser 291 in einer Erkennungssequenz für die Protein Kinase C liegt. Die Phosphorylierung der Serine wurde in Mutationsanalysen auf ihre Funktionalität überprüft und erbrachte 2 gegensätzliche Befunde. Uff und Mitarbeiter zeigten, daß die Serinphosphorylierung keinerlei Einfluß auf die HA Bindung hat (Uff et al., 1995), wohingegen Pure et al. eine verstärkte HA Bindung aufgrund der Serinphosphorylierung beschrieben (Pure et al., 1995). In weiteren Analysen mit Mutanten oder kompetitierenden Peptiden konnte eine reduzierte Migration von Melanomzellen auf HA beschichteten Substraten festgestellt werden (Peck and Isacke, 1998), was den Rückschluß auf die Beteiligung der Phosphoserine an Signalübertragungswegen nach Ligandenbindung zuläßt.

Die zytoplasmatische Domäne des CD44 enthält einerseits eine Ankyrin Bindungsstelle zwischen Asn304 und Leu318 (Kalomiris and Bourguignon, 1988), kann andererseits aber auch mit Proteinen der Ezrin-Radixin-Moesin-Merlin (ERM) Familie interagieren und so über 2 unterschiedliche Wege an das Tubulin- und Aktinzytoskelett adaptiert werden (Bourguignon and Jin, 1995; Bourguignon et al., 1992; Hirao et al., 1996; Kalomiris and Bourguignon, 1988; Lokeshwar et al., 1994; Lokeshwar et al., 1996; Tsukita et al., 1994). Die Proteine der ERM Familie existieren in einer inaktiven, geschlossenen Form und in einer aktiven, offenen Form. Im aktivierten Zustand bindet der N-Terminus der ERM Proteine u.a. an CD44, und der C-Terminus an das Aktinzytoskelett. In die Transition zwischen den beiden Formen der ERM Proteine sind vermutlich Rho-GTPasen und durch Rho-GTPasen aktivierte Protein- und Lipidkinasen involviert (Hirao et al., 1996; Tsukita and Yonemura, 1997; Tsukita and Yonemura, 1997). Über den Einfluß der Zytoskelettverankerung des CD44 auf die HA Bindung gibt es wiederum eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse. So wurde in Jurkat Zellen gezeigt, daß die HA Bindung nach PMA Stimulation sowohl durch Cytochalasin B als auch Colchicin inhibiert werden konnte (Liu et al., 1996). Murakami und Mitarbeiter zeigten, daß Cytochalasin B keinen Einfluß auf die HA Bindung nach PMA Stimulation von Lymphozyten hat (Murakami et al., 1994) und Bourguignon und Mitarbeiter schließlich konnten zeigen, daß Cytochalasin B aber nicht Colchicin diesen Effekt in einem Maus T Zell Lymphom haben (Bourguignon et al., 1993). Alle diese Befunde zeigen, daß Funktionen und Interaktionen des CD44 und

seiner varianten Isoformen eine enorme Diversität aufweisen und die Mechanismen und molekularen Partner, die den verschiedenen Funktionen zugrunde liegen, weiterer Aufklärung bedürfen.

#### IV. Funktionen des CD44

Die beschriebenen Interaktionen des extrazellulären und intrazellulären Teils der verschiedenen CD44 Moleküle manifestieren sich in einer ganzen Reihe von Funktionen, die nicht selten in Beziehung zum hämatopoetischen System stehen. So spielt CD44 eine wichtige Rolle während der Hämatopoese, des Lymphozyten Homings und der Aktivierung von Lymphozyten. Desweiteren, und wie eingangs bereits erwähnt, konnte die Beteiligung verschiedener CD44 Isoformen an metastatischen Prozessen eindrucksvoll gezeigt werden.

CD44 hat Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen des Knochenmarks (Kobayashi et al., 1994). Die Administration von anti-CD44 mAK in Langzeitkulturen des Knochenmarks blockiert sowohl Lymphopoese als auch Myelopoese, interferiert unterdessen aber nicht mit der Stromaformation (Khalidoyanidi et al., 1996; Miyake et al., 1990). Auch für die variante Isoform v10, die exklusiv auf einer Subpopulation der Knochenmarkszellen exprimiert ist, konnte eine Beteiligung am Prozeß der Stammzellmobilisierung gezeigt werden (Rösel et al., 1999).

Eine weitere Prozeß bei dem CD44 eine Rolle spielt, ist das Lymphozyten homing (Shimizu and Shaw, 1991; Zöller, 1996). Seit geraumer Zeit ist bekannt, daß CD44 beim Homing reifer Lymphozyten in periphere lymphatische Organe, im speziellen den Lymphknoten, eine Rolle spielt. Das Andocken an hohe, endotheliale Venolen (HEV) durch CD44 scheint hierbei allerdings auf die CD44s Isoform restringiert zu sein (Berg et al., 1989; DeGrendele et al., 1997; Jalkanen et al., 1988). Auch bei der Adäsion von Knochenmarkszellen an Elemente des Stromas ist CD44 (Khalidoyanidi et al., 1996; Morimoto et al., 1994), und im speziellen die CD44v7 Isoform, beteiligt (Christ et al., 2001). An der Migration der Prothymocyten in den Cortex des Thymus (Wu et al., 1993), sowie an migratorischen Prozessen aktivierter Lymphozyten in nicht lymphoide Gewebe bei Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen konnte ebenfalls die Beteiligung von CD44 und seiner varianten Isoformen gezeigt werden (Frogner and O'Neill, 1992; Seiter et al., 1999; Seiter et al., 2000; Wittig et al., 1997; Wittig et al., 1999) (DeGrendele et al., 1997).

Ebenso partizipiert CD44 am Prozeß der T Zelle Aktivierung und der Homöostase aktivierter T Zellen. So wird CD44 während der Aktivierung von T-Zellen hochreguliert (Guo et al., 1996; Hamilton et al., 1991; Lesley and Hyman, 1992) und Gedächtnis T Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte CD44 Expression aus. Kreuzvernetzung von CD44 mit anderen Molekülen wie CD3 und CD2 auf der Oberfläche von T Zellen führt zu einem verstärkten  $Ca^{2+}$  Einstrom (Conrad et al., 1992), und zu Phosphorylierungen verschiedener Proteine der an der T-Zelle Aktivierung beteiligten Signaltransduktionskaskade wie lck, fyn und ZAP70 (Ilangumaran et al., 1998; Taher et al., 1996). Diese Zusammenhänge zeigen, daß CD44 als kostimulatorisches Molekül agiert, in dem es die Bereitstellung spezieller Kinasen der src-Familie ge-

währleistet (Föger et al., 2000; Rozsnyay, 1999). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß diese kostimulatorische Funktion zur Proliferation von T-Zellen, aber auch zur Apoptose von Thymozyten führen kann (Föger et al., 2000). Desweiteren ist die Verknüpfung des CD44 mit src-Kinasen restringiert auf spezialisierte Subdomänen, sog. „Lipid Rafts“, innerhalb der Membran (Ilangumaran et al., 1998), und es konnte gezeigt werden, das die Rekrutierung der src-Kinasen über das CD44 nicht nur zur Stimulierung der T-Zellen führt, sondern weiterführend auch ein Rearrangieren des Aktin Zytoskeletts, mediert durch die Rac GTPase (Föger et al., 2001). Durch die Assoziation von sowohl src Kinasen als auch CD44 mit „Lipid Rafts“ erscheinen sie ebenfalls als ein lohnendes Untersuchungsziel in der Fragestellung der Metastasierung von BSp73ASML. Deswegen möchte ich kurz auf die Grundlage der „Lipid Rafts“ eingehen.

Die Zellmembran ist eine doppelte Schicht von Phospholipiden, in der eine Reihe weiterer Bestandteile wie Proteine, Sphingolipide und Cholesterin zu finden sind. Ursprünglich, wie im „flüssigen Mosaik“ Modell von Singer-Nicolson beschrieben (Singer and Nicolson, 1972), stellte man sich die Membran als eine neutrale, zweidimensionale Plattform vor, in der nicht an das Zytoskelett verankerte Proteine frei beweglich sind, und von Bestandteilen der Membran nur wenig beeinflusst werden. Später wurde beschrieben, daß die Lipide der Membran in unterschiedlichen Phasen oder Zuständen vorliegen können. Zu diesen gehören in der Reihenfolge zunehmender Fluidität die Gelphase, die „liquid ordered“ und „liquid disorder“ Phase (Brown and London, 1998). Die „liquid disorder“ Phase entspricht hierbei dem von Singer-Nicolson beschriebenen Modell, wohingegen in der „liquid ordered“ Phase die Phospholipide mit ungesättigten Kohlenwasserstoffen in der Membran durch Cholesterin dicht gepackt vorliegen, aber dennoch – im Gegensatz zur Gelphase – laterale Mobilität in der Membran besitzen (Sankaram and Thompson, 1990). Diese Eigenschaften zusammen mit der Untersuchung der Zellpolarität von Epithelien, führten zur Formulierung der Lipid raft Hypothese (Brown and London, 1998; Simons and Ikonen, 1997; Simons and van Meer, 1988). Sie basiert auf der Annahme, daß im exoplasmatischen Blatt der Membran Kompartimente in „liquid-ordered“ Phase wie kleine Flöße im Meer der „liquid disorder“ Lipide umherschwimmen (Brown and London, 1998; Schroeder et al., 1994). Die Beweise für diese Hypothese waren schwer zu führen, aber durch verbesserte Methodiken wie chemisches Kreuzvernetzen von Proteinen und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) konnte schließlich gezeigt werden, daß die Hypothese mit den tatsächlichen Gegebenheiten in der Membran übereinstimmen (Friedrichson and Kurzchalia, 1998; Simons and Toomre, 2000; Varma and Mayor, 1998). Dennoch besteht über die Strukturen und Charakteristika des endoplasmatischen Blattes der Membran immer noch Unklarheit, wenn auch gezeigt werden konnte, daß es ebenfalls reich an Phospholipiden und Cholesterin ist. Ein entscheidendes Kriterium der lipid rafts ist der Ein- oder Ausschluß bestimmter Proteine. Hohe Raft Affinität haben GPI verankerte Proteine (Brown and London, 1998; Hooper, 1999), doppelt acylierte Proteine, wie Kinasen der src-Familie oder die  $\alpha$ -Untereinheiten trimerer G-Proteine (Resh, 1999), Cholesterin-verknüpfte und palmitoylierte Proteine (Brown and London, 1998). Für transmembrane Proteine scheinen neben der Palmitoylierung, die alleine allerdings nicht ausreicht, um transmembrane Proteine in

lipid rafts zu dirigieren (Melkonian et al., 1999), die transmembranen Aminosäuren in der Nähe des exoplasmatischen Blattes von zentraler Bedeutung zu sein (Scheiffele et al., 1997). Weitere Kriterien, die zu einer Raft Assoziation von Proteinen führen sind bspw. Oligomerisierung oder Kreuzvernetzung von Proteinen (Harder et al., 1998). Die wesentliche Schwierigkeit in der Untersuchung von lipid rafts ist ihre limitierte Größe, die es unmöglich macht, sie im Lichtmikroskop zu untersuchen. So ist bekannt, daß rafts in Fibroblasten in etwa einen Durchmesser von 50 nm besitzen (Pralle et al., 2000), und vermutlich nicht mehr als 10-30 Proteine beinhalten. Dennoch konnten bis zu 15 identischer Moleküle in lipid rafts gefunden werden (Friedrichson and Kurzchalia, 1998; Varma and Mayor, 1998), was die Annahme einer nicht zufälligen Verteilung der Proteine in lipid rafts nahe legt.

Die wesentlichen Methoden zur Untersuchung von lipid rafts ergeben sich aus ihrer Eigenschaft der Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergentien (Brown and Rose, 1992). Solche unlöslichen Membrankompartimente können dann durch Dichtegradientenzentrifugation von den löslichen Bestandteilen der Membran getrennt und auf ihren Proteingehalt hin untersucht werden (Hooper, 1999). Die Schwierigkeiten bei diesen Untersuchungsmethoden sind zum einen die Zytoskelettassoziation von Proteinen, die ebenfalls zur Unlöslichkeit führt, und die Wahl des Detergents, welches die Ergebnisse dramatisch beeinflussen kann (Hooper, 1999; Janes et al., 1999; Waugh et al., 1999). Außer der Charakterisierung durch Detergenzunlöslichkeit, können die rafts aber auch durch bestimmte Agentien zerstört werden. So lösen bspw. Filipin und Methyl- $\beta$ -cyclo-dextrin die rafts durch Separation bzw. Depletion des Cholesterins auf.

Im Hinblick auf die varianten Isoformen des CD44 scheint von besonderem Interesse, daß im frühen Stadium der T Zell Aktivierung auch variante Isoformen, im speziellen CD44v6, hoch reguliert werden (Arch et al., 1992). Dieselbe Isoform, die wie bereits erwähnt im BSp73AS/ASML Zellsystem im Kontext der varianten Isoformen CD44 meta-1 und CD44 meta-2 einen metastatischen Phänotyp überträgt (Günthert et al., 1991; Hofmann et al., 1991; Rudy et al., 1993), was im Hinblick auf Vorgänge der Metastasierung eine spezielle Verbindung zwischen metastasierenden Tumorzellen und der Aktivierung von Lymphozyten zum Vorschein bringt (Herrlich et al., 1993).

Ausgehend von den Befunden des metastatischen Potentials des CD44, wurden in den letzten Jahren eine enorme Reihe weiterer Untersuchungen in anderen Zellsystemen, aber auch an Biopsien von Primärtumoren sowie Metastasen durchgeführt, die Erkenntnisse über die Beteiligung varianter Isoformen des CD44 an der Metastasierung bestätigten, wenn auch gesagt werden muß, daß nicht immer eine Neuexpression oder Hochregulation der varianten Isoformen zur Metastasierung führt, oder Zellen aus metastatischem Gewebe immer diese Isoformen exprimieren (zusammenfassend in (Naor et al., 1997)).



### 1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Metastasierung eines Primärtumors ist ein hoch regulierter Prozeß, der bis heute bei weitem nicht vollständig verstanden ist, und dem sicherlich auch mehr nur ein möglicher Mechanismus zugrunde liegt. Nichtsdestotrotz bietet das Rattenadenokarzinoma-Zellsystem BSp73 einen guten Ansatz, um Metastasierung zu untersuchen und besser zu verstehen. Die BSp73ASML Zellen exprimieren im Vergleich zu den BSp73AS Zellen eine Reihe von Oberflächenmolekülen neu oder in deutlich quantitativ variiert Form. Entsprechende Expressionsmuster konnten auch in weiteren (nicht)metastasierenden Zelllinien nachgewiesen werden. Dies liefert den Grund zu der Annahme, daß möglicherweise erst durch Interaktionen dieser metastasierungs-assoziierten Membranmoleküle der volle metastatische Phänotyp induziert werden kann. Ausgehend vom CD44 meta-1 Antigen sollte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersucht werden:

- I. Mit welchen der beschriebenen bzw. weiteren Membranmolekülen die metastasierungs-assoziierten varianten Isoformen des CD44 interagieren;
- II. ob diese Interaktionen auf definierte Membrandomänen, z.B. Lipid Rafts, beschränkt sind;
- III. inwieweit CD44-vermittelte Signaltransduktion durch die Assoziation mit weiteren membranständigen Molekülen bzw. durch eine Umverteilung in der Membran moduliert wird, und
- IV. welche Konsequenzen die Interaktion von varianten CD44 Isoformen mit anderen Membranmolekülen in bezug auf Proliferation, Adhäsion und Migration aufweist.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 CHEMIKALIEN

Acrylamid / Bisacrylamid Stocklösung	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Brij 96/98	Sigma
Bromphenolblau	Merck
2-Butanol	Merck
CHAPS	Appllichem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
ECL and ECL+	Amersham Lifescience
Ethanol	Riedel de Haen
Ethidiumbromid	Merck
Ethylen-dinitro-tetra-essigsäure (EDTA)	Sigma
Fettarmes Milchpulver	Grosso, Heidelberg
Filme zur Autoradiographie	Kodak
Filme (ECL)	Amersham
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma
Formaldehyd 37%	Merck
G418 Sulfat	PAA Laboratories GmbH
Gelatine (Cold Water Fish Skin)	Sigma
Glukose	Merck
Glyzerin	Roth
Glyzin	Roth
Gö6983	Calbiochem
Hefeextrakt	Gibco BRL
HEPES	Sigma
ISCOVE's Medium	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haen
Kolloidal Coomassie Konzentrat	Sigma
Lubrol 17A17	Serva
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck

β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel de Haen
Methyl-β-Cyclo-Dextrin	Sigma
Mowiol (4-88)	Calbiochem
Natriumfluorid	Sigma
Natrium-Orthovanadat	Sigma
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma
Opti-Fluor Szintillations-Flüssigkeit	Packard
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Calbiochem
Pepton 140	Gibco BRL
Phalloidin-FITC	Sigma
Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF)	Sigma
Phorbol-myristat-Acetat (PMA)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Boehringer Mannheim
Protein - Molekulargewichtsmarker	Amersham
Protein G Sepharose	Amersham
PVDF-Membran	Millipore
Ribonuclease A	Sigma
RPMI 1640	Sigma
Trypanblau	Serva
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Serva
3 MM Whatmanpapier	Schleicher-Schuell

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „Zur Analyse“ und wurden von den Firmen Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

### 2.1.2 RADIOCHEMIKALIEN

<sup>32</sup> P-ATP	Adenosin 5'-[γ- <sup>32</sup> P]-Triphosphat Triethylammoniumsalz, wässrige Lösung 5000 Ci/mmol ; 10mCi/ml
---------------------	--

<sup>3</sup> H-Thymidin	[6- <sup>3</sup> H] Thymidin, wässrige Lösung 20-30 Ci/mmol ; 1mCi/ml
<sup>3</sup> H-Palmitinsäure	[9,10(n)- <sup>3</sup> H] Palmitinsäure, ethanolische Lösung 40-60 Ci/mmol ; 1mCi/ml

### 2.1.3 VEKTOREN UND PRIMER

pCDNA3:	eukaryontischer Expressionsvektor mit Neomycin Selektionsmarker
BGH-Primer:	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
T7-Primer:	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
CD44 Cys286Ala-Primer:	5'-CTTGCCGTCGCCATTGCTGTC-3'
CD44 Cys295Ala-Primer:	5'-TAGGAGAAGGGCTGGGCAGAA-3'

### 2.1.4 ANTIKÖRPER

#### 2.1.4.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER

Antikörper	Isotyp und Spezifität	Quelle / Referenz
B5.5	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte $\alpha 6\beta 4$ Integrin	M. Zöller DKFZ Heidelberg (Claas et al., 1996)
D5.7	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte D5.7A	M. Zöller DKFZ Heidelberg (Claas et al., 1996)
C4.4	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte C4.4	M. Zöller DKFZ Heidelberg (Claas et al., 1996)
D6.1	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte D6.1A	M. Zöller DKFZ Heidelberg (Claas et al., 1996)
Ox50	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte CD44s	(Paterson et al., 1987)
A2.6	Maus IgG1 mAK: anti-Ratte CD44v6	M. Zöller DKFZ Heidelberg (Claas et al., 1996)
Ox26	Maus IgG2a mAK: anti-Ratte CD71 (Transferrinrezeptor)	Prof. A Williams, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford (Jefferies et al., 1984)
B2C11	Maus IgG mAK: anti-Ratte CD9	(Akeson and Warren, 1984)
PY99	Maus IgG2a mAK: anti-Phosphotyrosin	Santa Cruz Biotechnology
RPM.7	Maus IgG3 mAK: anti-Ratte CD9	Pharmingen
Cholera Toxin B Untereinheit	Biotin markiert	Sigma

Anti-Ezrin	Kaninchen-anti-Ezrin polyklonales, affinitätsgereinigtes Serum	Upstate Biotechnology
Anti-Moesin	Kaninchen-anti-Moesin polyklonales, affinitätsgereinigtes Serum	Upstate Biotechnology
Sc-217 (Rac1)	Kaninchen-anti-Rac1 polyklonales, affinitätsgereinigtes Serum	Santa Cruz Biotechnology
Sc-180 (Rho)	Kaninchen-anti-Rho polyklonales, affinitätsgereinigtes Serum	Santa Cruz Biotechnology
N20 (Caveolin)	Kaninchen-anti-Ezrin polyklonales, affinitätsgereinigtes Serum	Santa Cruz Biotechnology

#### 2.1.4.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER UND -REAGENZEN

Spezies, Isotyp und Konjugat	Quelle / Referenz
Cy2 konjugierter Esel-anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
FITC konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova
PE konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova
FITC konjugierter Esel-anti-Kaninchen-IgG	Dianova
Rhodamin konjugierter Esel-anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
POD konjugierter Schaf-anti-Maus-IgG	Pharmingen
POD konjugierter Esel-anti-Kaninchen-IgG	Pharmingen
Streptavidin Texas-Red Konjugat	Southern Biotechnology Associates, Inc.
Extravidin POD-Konjugat	Sigma

#### 2.1.5 ZELLINIEN

Zelllinie	Species (Stamm)	Anmerkung	Referenz
BSp73AS	<i>R. norvegicus</i> (BD X)	Nicht metastasierende Ratten Pankreas-adenokarzinom Zelllinie	(Matzku et al., 1983)
BSp73AS14	<i>R. norvegicus</i> (BD X)	Ratten-CD44 meta-1 Transfektante der BSp73AS	(Günthert et al., 1991)
BSp73AS5.7	<i>R. norvegicus</i> (BD X)	Ratten-D5.7A Transfektante der BSp73AS	(Würfel et al., 1999)
BSp73ASML	<i>R. norvegicus</i> (BD X)	Metastasierende Ratten Pankreas-	(Matzku et al., 1983)

	X)	adenokarzinom Zelllinie	
Progressor	<i>R. norvegicus</i> (BDIX)	Metastasierende Ratten Kolonkarzinom Zelllinie	(Reisser et al., 1993)
CHO-K1	<i>Cricetulus griseus</i>	Subklon der ovariellen Zelllinie CHO	(Kao and Puck, 1968)

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Generell verwendete Agentien, Puffer und Arbeitsroutinen:

Medium: RPMI, DMEM, ISCOVE mit 10% Hitze-inaktiviertem FCS supplementiert

PBS: 137mM NaCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

HEPES-Puffer: 25mM HEPES; 150 mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,2

Trypsin: 0,25% (w/v) in PBS

EDTA: 5mM in PBS pH 8,0

Trypanblau: 0,4% (w/v) Trypan Blau; 0,9% NaCl

Antibiotika: 100 Einheiten Penicillin/ml und 100 µg/ml Streptomycin wurden den Zellkulturmedien routinemäßig zugesetzt

Waschen: alle Zellen wurden durch Resuspension und Zentrifugation (483g, 5min) gewaschen

Inkubation: alle Zellen wurden bei 37°C, 5% v/v CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte inkubiert

Plastikwaren: Zellkulturmaterialien wurden sofern nicht anders erwähnt von der Fa. Greiner bezogen

#### 2.2.1.1 KRYOKONSERVIERUNG EUKARYONTISCHER ZELLEN

Einfriermedium: 5% oder 10% DMSO (v/v) in FCS

Die Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen mittels Trypsin oder EDTA abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in auf Eis vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Da der Einfrierprozeß idealerweise langsam ablaufen sollte, wurden die Zellen für zunächst 2h bei -20°C und danach ÜN bei -80°C eingefroren, bevor sie in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert wurden.

### **2.2.1.2 PASSAGIEREN EUKARYONTISCHER ZELLEN**

Adhärenz wachsende Zellen wurden im konfluenten Stadium mit PBS gespült, um Spuren des FCS zu beseitigen, mittels Trypsin oder EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in einer der Proliferationsrate der Zellen adäquaten Verdünnungen in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Nicht adhärenz wachsende Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

### **2.2.1.3 TRANSFEKTION UND SELEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MITTELS POLYFECT**

$4-6 \times 10^5$  Zellen wurden in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und ÜN bis etwa 60% Konfluenz wachsen lassen. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und 1,5ml frisches Medium zugegeben. 1,5 µg Plasmid DNA wurde in 100 µl Medium ohne FCS zusammen mit 10 µl Polyfect für 10 sec gevortext, mit 600 µl Medium inkl. 10% FCS gemischt und auf die Zellen pipettiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht.

### **2.2.1.4 FACS ANALYSE**

$0,1-1 \times 10^6$  Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte pipettiert, zweimal mit 200 µl PBS/Loch gewaschen, und in entweder 200 µl Hybridomüberstand oder 50µl Antikörperlösung(1-10µg/ml) resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 50 µl Fluorochrom-markiertem Zweitantikörper entsprechender Verdünnung resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen wiederum dreimal gewaschen und anschließend in 2% Formaldehyd in PBS bis zur Analyse gelagert. Die Proben wurden an einem FACSCalibur der Fa. Becton Dickinson gemessen und mittels der CellQuest Software analysiert.

### **2.2.1.5 REKLONIERUNG TRANSFIZIERTER ZELLEN MITTELS LIMITIERENDER VERDÜNNUNG**

Transfizierte Zellen wurden nach Selektion und FACS Analyse in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in 24 Loch Platten in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesät. Üblicherweise wurden je 1-3 Platten der Konzentrationen eine Zelle/Loch, drei Zellen/Loch und zehn Zellen/Loch zusammen mit  $2 \times 10^6$  Rattenthymozyten in 1 ml Selektionsmedium angelegt. Sobald die Zellen begannen zu wachsen, wurden die Vertiefungen der 24 Loch Platten, in denen einzelne Klone anwuchsen, markiert. Diese wurden, sobald ausreichend Zellen zur Verfügung standen, einer FACS Analyse unterzogen, und wenn sie

eine ausreichend hohe Expressionsstärke des transfizierten Gens zeigten, erneut rekloniert, um sicher zu stellen, daß Einzelklone kultiviert wurden.

#### **2.2.1.6 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG FÜR DIE MIKROSKOPISCHE ANALYSE**

PBG:	PBS mit 0,2% (v/v) Gelatine und 0,5% (w/v) BSA
PFA:	4% Paraformaldehyd in PBS
Elvanol:	20% (w/v) Mowiol in 2/3 PBS pH 8,0 und 1/3 Glyzerin
PBS-Glycin:	200mM Glycin in PBS
Waschen:	5 min auf Schütteltisch bei RT

Runde Glasplättchen von 12mm Durchmesser wurden in 70% Ethanol sterilisiert und in die Vertiefungen einer 24 Loch Platte gelegt. Darauf wurden die Zellen ausgesät und für 1 bis 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Die adhärenen Zellen wurden zweimal in Medium gewaschen und mit 200 µl Antikörperlösung (10µg/ml) in auf 37°C vorgewärmtem Medium mit 10% FCS für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Medium mit 10% FCS wurden die Zellen für 30 min im Brutschrank mit 200µl Cy2-markiertem Sekundärantikörper (10µg/ml Medium mit 10% FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem PBS dreimal gewaschen und mit 500 µl eiskaltem PFA 15-30 min auf Eis fixiert. Es folgten weitere sechs Waschschrte, dreimal mit PBS-Glycin und dreimal mit PBG. Für den Fall sich anschließender intrazellulärer Färbungen wurden die Zellen mit 0,1% TX-100 in PBG für 4 min permeabilisiert, woran sich wiederum sechs Waschschrte anschlossen. Es folgte die Inkubation mit 200µl zweitem Erstantikörper (2µg/ml PBG, Texas-Red-markiert) für 1-2 Stunden bei RT, oder zweitem Erst- und zweitem Zweitantikörper sowie entsprechenden Waschschrten. Färbungen für GM1 wurden mit der biotinylierten Cholera toxin Untereinheit B (2µg/ml PBG) durchgeführt, an die sich die Inkubation mit Texas-Red-markiertem Streptavidin (2µg/ml PBG) anschloß. Abschließend erfolgten wiederum sechs Waschschrte, dreimal mit PBG und dreimal mit destilliertem Wasser, bevor die Zellen luftgetrocknet wurden. Danach wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Elvanol auf einen Objektträger aufgebracht und ÜN trocknen lassen. Die mikroskopische Analyse erfolgte an einem Leica DMRBE Mikroskop, welches mit einer SPOT CCD Kamera und der entsprechenden Software SPOT 2.1.2. ausgerüstet ist.

#### **2.2.1.7 PMA STIMULATION VON ZELLEN**

Die zu stimulierenden Zellen wurden ÜN in Medium ohne FCS inkubiert. Das PMA wurde  $10^{-7} - 10^{-8}$  M in FCS-freiem Medium appliziert, und die Zellen für die angegebene Dauer im Brutschrank inkubiert.



### **2.2.1.8 DEPLETION DES CHOLESTERINS AUS DER ZELLMEMBRAN**

Die Zellen wurden in ihren Zellkulturflaschen zweimal mit HEPES Puffer gewaschen und 10-50 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin in HEPES Puffer appliziert. Die Extraktion des Cholesterolins erfolgte bei 37°C unter gelegentlichem, sanften Schütteln im Brutschrank.

### **2.2.1.9 ZERSTÖRUNG DES ZYTOSKELETTS**

Zur Auflösung des Aktin- oder Tubulinzytoskeletts wurden 1  $\mu$ M Latrunculin B bzw. 30  $\mu$ M Cytochalasin D verwendet. Latrunculin B oder Cytochalasin D wurden in PBS oder serumfreien Medium für 30 min bis 1h im Brutschrank appliziert.

### **2.2.1.10 BESCHICHTEN VON PLASTIKOBERFLÄCHEN**

Proteine haben die Eigenschaft in alkalischem Milieu an Plastikoberflächen zu binden. Als Puffer kann dabei wahlweise 50mM Tris pH 9,5 oder ein Bicarbonatpuffer pH 9,6 verwendet werden. Routinemäßig werden 10 $\mu$ g Antikörper/ml Kopplungspuffer eingesetzt und die Antikörper ÜN an das Plastik binden lassen. Für Substrate der ECM wurde routinemäßig 1 $\mu$ g/ml eingesetzt. Die Hyaluronsäure hingegen wurde bei hoher Konzentration in neutralem pH-Bereich (1mg/ml PBS) an Plastik gebunden. Nachdem die Beschichtungslösungen entfernt waren, wurde dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen des Plastiks durch Inkubation mit 3mg/ml BSA in PBS für 2h bei 37°C blockiert. Nach dreimaligem Waschen waren die 96-Loch Platten für die Assays einsetzbar, konnten aber auch für einige Tage bei 4°C gelagert werden, bevor sie eingesetzt wurden.

### **2.2.1.11 ADHÄSIONSSASSAY**

Zellen wurden mit 2 $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin /ml Medium ÜN inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und in 96-Loch Platten ausgesät, die zuvor mit den gewünschten Antikörpern oder Substraten beschichtet worden waren (2.2.1.10). Nach weiterer Inkubation für zwei Stunden wurden nicht adhärenente Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, und die adhärenente Zellen mit geringen Mengen Trypsin oder EDTA vom Boden der 96-Loch Platten gelöst. Diese Zellen wurden mittels eines Erntegerätes (Fa. Packard) auf Filtermatten gesaugt. Nach zweistündigem Trocknen bei 60°C wurden die Filtermatten mit Szintillationsflüssigkeit getränkt, in Plastikhüllen eingeschweißt und in einem Beta-Counter ausgewertet. Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Triplikat nicht gewaschener Zellen, was 100% der eingesetzten Zellen entspricht.

### **2.2.1.12 PROLIFERATIONSASSAY**

Die Zellen wurden in 150 µl Medium/Loch in 96-Loch Platten ausgesät, die zuvor mit Substraten, Antikörpern oder ausschließlich BSA beschichtet worden waren (2.2.1.10). Zum gewünschten Meßzeitpunkt wurde den Zellen mit 50 µl 10µCi <sup>3</sup>H-Thymidin / ml supplementiertes Medium zugesetzt, und die Zellen wurden für weitere 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zelle mit Trypsin oder EDTA von Boden der 96-Loch Platten abgelöst und wie unter 2.2.1.11 geerntet und ausgewertet.

### **2.2.1.13 APOPTOSEASSAY**

Der von uns angewendete Apoptoseassays beruht auf der disintegrierten Zellmembran der apoptotischen Zellen. Annexin V, ein Protein, das ausschließlich an das endoplasmatischen Blatt der Zellmembran bindet, erkennt dementsprechend ohne vorhergehende Permeabilisierung nur Zellen mit disintegrierter Membran. Dies kann per FACS-Analyse (2.2.1.4) nachgewiesen werden kann. Für die Färbung wurde ein FITC-markiertes AnnexinV (2µg/ml) verwendet.

### **2.2.1.14 SCRATCH-ASSAY**

Zellen wurden in einer zuvor (un)beschichteten Petrischale (2.2.1.10) zu 50%iger Konfluenz wachsen lassen. Zu diesem Zeitpunkt wurden mit einer sterilen, gelben Eppendorfspitze ein Kratzer in den Zellrasen gezogen, und die Zellen für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung des Zellwachstums entlang oder über den Kratzer hinweg wurde am Mikroskop durchgeführt.

## **2.2.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN**

Generell wurden ja nach Bedarf den verwendeten Lösungen und Puffern folgende Proteinase- oder Phosphataseinhibitoren zugesetzt:

Proteinase-Inhibitoren:	2mM PMSF
	1xProteinase-Inhibitor-Cocktail
Phosphatase-Inhibitoren:	1mM Natrium-Orthovanadat
	10mM NaF

Desweiteren wurden je nach Bedarf die Chemikalien zur Pufferung von Lösungen zwischen Tris, HEPES und PBS variiert, je nach Erfordernissen des Assays.

### 2.2.2.1 OBERFLÄCHENBIOTINYLIERUNG VON ZELLEN

Biotinylierungspuffer: 25mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100-500 µg Biotin-NHS  
(wasserlöslich, nicht spaltbar)

PBS-Glycin: 200mM Glycin in PBS

Die zu biotinylierenden Zellen wurden in der Zellkulturflasche dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde 1ml/25cm<sup>2</sup> Flaschenoberfläche frisch angesetzter Biotinylierungspuffer zugegeben und die Zellen unter sanftem Schütteln für 30 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Biotinesters wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS-Glycin gespült.

### 2.2.2.2 PRÄPARATION VON ZELLYSATEN

Lysis-Puffer: 25mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Detergenz

Die zu lysierenden Zellen wurden in den Zellkulturflaschen dreimal mit 4°C kalter Pufferlösung ohne Detergenz gespült und anschließend mittels eines Zellschabers in dem benötigten Volumen auf 4°C vorgekühltem Lysispuffers vom Boden der Zellkulturflasche gekratzt. Danach wurden die Suspension in Reaktionsgefäße überführt und für 1h bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (20min, 4°C, 15.000g) sedimentiert und das geklärte Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.2.3 IMMUNPRÄZIPITATION

6xLämmli-Puffer: 300mM Tris pH6,8; 12% (w/v) SDS; 0,6% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin, 2-Mercaptoethanol (im Bedarfsfall)

Für die Immunpräzipitation wurden geklärte Lysate (2.2.2.2) verwendet, denen zunächst zur Vorreinigung 1/20 VT Protein-G-Sepharose zugesetzt wurde. Nach einstündiger Inkubation (4°C, Rotation) wurde die Protein-G-Sepharose abzentrifugiert (15sec, 13.000g), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, wahlweise 200 µl Hybridomüberstand oder 1-5 µg aufgereinigten Antikörpers zugesetzt, und weitere 2h bei 4°C zur Bildung der Antikörperkomplexe rotierend inkubiert. Schließlich wurde wiederum 1/20 VT Protein-G-Sepharose zur Antikörperbindung zugesetzt und das Gemisch für eine weitere Stunde bei 4°C rotiert. Abschließend wurde die Protein-G-Sepharose viermal mit 4°C kaltem Lysispuffer gewaschen, der nach dem letzten Waschen mittels einer Wasserstrahlpumpe durch eine Kanüle abgesaugt wurde, um Kontaminationen zu minimieren. Die Protein-G-Sepharose wurde daraufhin in 1x Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5min bei 95°C aufgeköcht. Nach Abkühlen und Zentrifugation

wurden die Proben der Auftrennung in einer SDS-PAGE unterzogen. Im Falle von Repräzipitationen wurde die Protein-G-Sepharose nach Immunpräzipitation mit Lysispuffer, der ein Detergenz höherer Stringenz beinhaltet, 15min bei RT oder bei 37°C unter starkem Schütteln extrahiert. Die Protein-G-Sepharose wurde abzentrifugiert und der ÜS einer erneuten Präzipitation zugeführt. Die Protein-G-Sepharose der ersten Präzipitation wurde dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen und schließlich in dem gewünschten Volumen 1x Lämmli-Puffer bei 95°C 5min aufgeköcht.

#### **2.2.2.4 IN-VITRO KINASE ASSAY**

Kinase-Assay-Puffer: 25mM HEPES pH7,2; 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM MnCl<sub>2</sub>;  
Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren

Für einen in-vitro Kinase Assay wurde zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt, wobei alle Puffer konsequent phosphatfrei gehalten wurden. Danach wurde die Protein-G-Sepharose dreimal mit Lysispuffer, einmal mit Lysispuffer ohne Detergenz und einmal mit Kinase-Assay-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde anschließend mit 30 µl Kinase-Assay-Puffer, der 10µCi <sup>32</sup>P-ATP enthielt, inkubiert. Die Reaktion wurde für 15 min bei 37°C durchgeführt und anschließend durch 1/6 VT 6x Lämmli-Puffer gestoppt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben einer SDS-PAGE(2.2.2.6), Western-Blot auf eine PVDF-Membran (2.2.2.8) und Autoradiographie(2.2.2.9.2) unterzogen.

#### **2.2.2.5 PALMITOYLIERUNGSASSAY**

Die Zellen wurden bis 80-90% Konfluenz wachsen lassen, zweimal in PBS gewaschen und für vier weitere Stunden ohne FCS inkubiert. In dieser Zeit wurde die radioaktiv markierte Palmitinsäure, die in ethanolischer Lösung vorlag durch Begasung mit Argon soweit eingeeengt, daß die finale Ethanol Konzentration im Medium bei maximal 5% lag. Die Palmitinsäure wurde mit 0,25 µCi/ml Medium plus 5% FCS für 2h appliziert. Anschließend erfolgte eine TX-100 Zelllyse (2.2.2.2), Immunpräzipitation (2.2.2.3), SDS-PAGE (2.2.2.6) und Western-Blot (2.2.2.8) auf eine PVDF Membran. Die Membran wurde einmal in Detergenz-freiem Lysispuffer gewaschen und getrocknet, bevor sie in Szintillationsflüssigkeit getränkt und wiederum getrocknet wurde. Zur Detektion der Signale wurde eine 3-12 wöchige Exposition auf einem Röntgenfilm durchgeführt.

**2.2.2.6 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)**

Acrylamidstammlösung:	30%(w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH <sub>2</sub> O
Sammelgel:	375mM Tris pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 3-5% Acrylamidstammlösung; 0.1% TEMED; 0.1% (w/v) Ammoniumpersulfat
Trenngel:	375mM Tris pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 4-20% Acrylamidstammlösung; 0.1% TEMED; 0.1% (w/v) Ammoniumpersulfat
Laufpuffer:	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Gelsysteme der Fa. BIORAD verwendet. Entweder das Mini-Protean II System, dessen Gele ein Volumen von ca. 5ml haben und Proben bis zu einem Volumen von 30µl auftrennen können, oder das Hofer SE 600 System zum Anfertigen von Gelen mit einem Gelvolumen von 16ml und einem Probenvolumen bis 200µl. Die entsprechenden Volumina Trenngels wurden zwischen die zuvor mit Ethanol und Aceton gereinigten Glasplatten gegossen, mit 2-Butanol überschichtet und für 1h bei RT polymerisieren lassen. Nach Entfernen des Butanols wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden das Gel in die dafür vorgesehenen Elektrophoresekammern gesetzt, Laufpuffer eingefüllt, die Käme entfernt und die einzelnen Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Proben sowie Größenmarker wurden in die Taschen geladen und die Elektrophorese mit konstanten 200V Spannung (für die Mini-Protean II Gelapparatur) oder konstanten 10mA pro Gel (für die Hofer SE 600 Gelapparatur) laufen lassen, bis das Bromphenolblau das Gel vollständig passiert hatte. Desweiteren wurden fertig gegossene 4-20% Gradientengele verwendet, die in die MiniProteanII-Apparatur eingespannt werden konnten. Diese wurden laut Empfehlung des Herstellers mit konstanten 150V Spannung laufen lassen. Nach Beenden des Gellaufs wurden die Apparaturen auseinandergebaut, und die Gele entweder einer Coomassiefärbung (2.2.2.7) oder einem Elektrolot (2.2.2.8) unterzogen.

**2.2.2.7 KOLLOIDAL-COOMASSIE-FÄRBUNG VON PROTEINGELEN UND MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON PROTEINBANDEN**

ME-Puffer:	7% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol
Färbelösung:	4VT Kolloidal Coomassie Färbelösung (Sigma), 1VT Methanol
Entfärber A:	10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) Methanol
Entfärber B:	25% Methanol (v/v)

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Proteine im Gel durch einstündige Inkubation im ME-Puffer fixiert. Anschließend wurde das Gel in Färbelösung inkubiert, die alle 2h erneuert wurde. Nach achtstündigem Färben wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 30 sec in Entfärber A und für 1 Tag in Entfär-

ber B inkubiert. Nach der Dokumentation des Gels wurden alle Banden, die ausreichende Mengen Proteins für eine massenspektrometrische Analyse enthielten, mit einem Skalpell ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Vorbereitung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse wurden von der zentralen Einrichtung des DKFZ (Fr. Dr. Schnölzer) durchgeführt.

#### **2.2.2.8 PROTEINBLOT (WESTERN BLOT) AUF PVDF MEMBRANEN (TOWBIN ET AL., 1979)**

Blotpuffer: 25mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,02% (w/v) SDS, vorgekühlt auf 4°C

Die Gele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine für 30 min in Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurden in einem Blothalter ein in Blotpuffer getränktes Polster, drei Lagen getränktes Whatman Papier, das Gel, eine auf die perfekte Größe zugeschnittene, in Methanol äquilibrierte PVDF-Membran, drei Lagen getränktes Whatman Papier und schließlich ein weiteres Polster luftblasenfrei aufeinandergeschichtet und mittels einer Klammer verschlossen. Die Proteine wurden daraufhin elektrisch aus dem Gel auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für die Minigele ÜN bei konstanter Spannung von 30V, für große Gele ÜN bei konstanten 15V in der Kühlzelle. Am folgenden Morgen wurden die Blots auseinandgebaut und die einzelnen Banden des Größenmarkers mit einem Schreiber auf der PVDF-Membran markiert. Die Membranen wurden dann der Proteindetektion unterzogen (2.2.2.9).

#### **2.2.2.9 DETEKTION VON PROTEINEN AUF PVDF MEMBRANEN**

PBT: 0,1 (v/v) Tween20 in PBS

Die auf die PVDF Membran transferierten Proteine wurden je nach Anwendung mit Antikörpern, Extravidin-Komplexen oder per Autoradiographie detektiert.

##### **2.2.2.9.1 ANTIKÖRPERNACHWEIS**

Die Membranen wurden, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, für 1h in 10% fettarmem Milchpulver (w/v) in PBT auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Für den Nachweis von Phosphotyrosinen wurde anstelle des Milchpulvers 3% (w/v) BSA in PBT verwendet, da das Milchpulver viele Phosphotyrosine enthält und so zu enormen Hintergrundsignalen führt. Nach dem Blocken wurden die Membranen drei mal 5 min in PBT gewaschen und mit 2-5µg/ml aufgereinigtem Erstantikörper oder Hybridomüberstand für 1h auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBT wurden die Membranen mit einem POD-markiertem Zweitantikörper für 1h unter Schütteln inkubiert und überschüs-

siger Antikörper wiederum durch Waschen in PBT entfernt. Für den Fall des Nachweises biotinylierter Proteine wurden die Membranen mit POD-markiertem Extravidin inkubiert. Abschließend wurden die Membranen mit 1ml ECL-Substrat Lösung / 60 cm<sup>2</sup> Membran für 1min inkubiert, zwischen 2 Whatman Papieren getrocknet und die Membran auf einem ECL-Film exponiert. Die Markerbanden wurden auf den Film übertragen, um eine Größenzuordnung der Signale zu ermöglichen.

#### **2.2.2.9.2                   AUTORADIOGRAPHIE**

Im Falle durch <sup>32</sup>P radioaktiv markierter Proteine wurden die Membranen nach dem Blot drei mal 5 min in Detergenz freiem Puffer gewaschen, zwischen zwei Whatman Papieren getrocknet und die Membranen in einer Entwicklerkassette auf einem Kodakfilm exponiert. Um die Entwicklungsdauer abschätzen zu können, wurde zuvor die Menge der Radioaktivität auf der Membran mit einem Zählrohr abgeschätzt. Typischerweise lagen die Entwicklungszeiten für solche Membranen zwischen 3 und 120 Stunden. Nach dem Entwickeln wurden die Banden des Größenmarkers auf den Film übertragen. Waren die Proteine durch <sup>3</sup>H markiert, wurden die Membranen nach dem Blot dreimal in Detergenz freiem Puffer gewaschen, getrocknet, für wenige Minuten in Szintillationsflüssigkeit inkubiert und wiederum getrocknet. Danach wurden die Membranen in einer Entwicklungskassette auf einem Kodakfilm bei –80°C inkubiert. Typische Expositionsdauern lagen zwischen drei und zwölf Wochen.

#### **2.2.2.10.                   SACCHAROSE-DICHTE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION**

800 µl eines geklärten Lysats (2.2.2.2) wurden mit 800 µl 80% Saccharoselösung gemischt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurde die Lösung mit 1,6 ml 30%iger und 800 µl 5%iger Saccharoselösung überschichtet, wobei diese Lösungen identische Pufferbedingungen wie das Lysat aufwiesen, aber kein Detergenz enthielten. Der Gradient wurde ÜN in einer Ultrazentrifuge bei 200.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Gradient in 300 µl große Aliquots – beginnend vom oberen Ende – aufgeteilt, die wiederum für weitere Versuche zur Verfügung standen.

#### **2.2.2.11.                   SEDIMENTATION VON „LIPID RAFTS“**

Eine Möglichkeit inkomplett solubilisierte Bestandteile der Membranen anzureichern, zu denen auch die „Lipid Rafts“ gehören, ist die Zentrifugation bei 100.000 g. Dazu wurden geklärte Lysate (2.2.2.2) einer einstündigen Zentrifugation bei 100.000 g unterzogen, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in dem zur Lyse verwendeten Puffer resuspendiert. Bei einer solchen Zentrifugation

mit Aliquots aus Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationen ist darauf zu achten, daß der Saccharosegehalt bei < 5% liegt.

#### **2.2.2.12. MEMBRANPRÄPARATION**

Membranen der BSp73ASML Zellen wurden präpariert, indem die Zellen sechs aufeinanderfolgenden Einfrier- und Auftauvorgängen ausgesetzt wurden. Zum Einfrieren wurde flüssiger Stickstoff verwendet und der Auftauprozeß in einem 37°C warmen Wasserbad durchgeführt. An die Prozedur schloß sich die Bearbeitung durch 30 Zyklen mit einem Bounce-Homogenisator an. Anschließend wurden die Zellkerne durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1000g, 4°C abgetrennt. Schließlich wurden die Membranen durch einstündige Zentrifugation bei 100.000g, 4°C pelletiert und konnten danach der Lyse durch ein Detergenz zugeführt werden.

#### **2.2.2.13. PRÄZIPITATION VON PROTEINEN**

1 VT der das Protein enthaltenden Lösung wurde mit 4 VT Methanol versetzt, geschüttelt und 10 sec bei 9000 g abzentrifugiert. 1 VT Chloroform wurde hinzupipettiert, geschüttelt und wiederum für 10 sec bei 9000 g abzentrifugiert. Zur Phasentrennung wurden 3 VT ddH<sub>2</sub>O zugegeben, stark geschüttelt und 1 min bei 9000 g abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und die verbleibende Interphase sowie Chloroformphase werden mit 3 VT Methanol versetzt, geschüttelt und für 2 min bei 9000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und wieder in die gewünschte Lösung aufgenommen.

### **2.2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

#### **2.2.3.1 GENERIERUNG CHEMOKOMPETENTER *E. COLI* BAKTERIEN**

LB Medium: 10g (w/v) Pepton, 5g (w/v) Hefe Extrakt, 10g NaCl, 1ml 1M NaOH pro Liter ddH<sub>2</sub>O

TFB I: 30mM Kaliumacetat, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8

TFB II: 10mM MOPS pH 7,0 , 10mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8

Eine einzelne Kolonie *E.coli* Bakterien (Stamm DH5α) wurde in 5 ml LB Medium ÜN (37°C, 250 rpm) in einem Bakterienrüttler kultiviert und zum Animpfen einer 200 ml Kultur in LB Medium verwendet.



Diese wurde bis zur  $OD_{600} = 0,4$  wachsen lassen. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien bei 1700g abzentrifugiert, in 60 ml TFB I resuspendiert, erneut abzentrifugiert, in 8 ml TFB II resuspendiert und in 100  $\mu$ l Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Anschließend wurde die Transformationseffizienz an einem Aliquot durch Hitzeschocktransformation (siehe 2.2.3.2.) mit 10 ng Plasmid DNA getestet. Entscheidend für die Transformationseffizienz der Bakterien ist das konsequente Arbeiten auf Eis und das Vorkühlen aller benötigten Agentien.

### 2.2.3.2 HITZESCHOCKTRANSFORMATION CHEMOKOMPETENTER BAKTERIEN

SOC Medium: 20g (w/v) Pepton, 5g (w/v) Hefe Extrakt, 0,5g (w/v) NaCl, 2,5mM KCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 20mM Glukose

LB-Agar-Platten: 1% (w/v) in LB Medium mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin

Die Hälfte einer Ligationsreaktion (2.2.3.7.3) oder 10 ng Plasmid DNA wurden mit einem Aliquot chemokompetenter Bakterien, das zuvor auf Eis aufgetaut wurde, gemischt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit war darauf zu achten, daß die Bakterien möglichst frei von Erschütterungen blieben. Daraufhin wurde das Bakterien-DNA Gemisch für 90 Sekunden einem Hitzeschock von  $42^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt, und wieder für 5 min auf Eis transferiert. Dann wurden die Bakterien für 1h in 1ml vorgewärmtem SOC Medium geschüttelt (250 rpm,  $37^{\circ}\text{C}$ ). Ein Aliquot – üblicherweise 100 $\mu$ l – wurde auf LB-Agar Platten ausplattiert, um transformierte Bakterien durch eine ÜN Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  zu selektionieren.

### 2.2.3.3 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON BAKTERIEN

900  $\mu$ l dichtgewachsener Bakterienkultur wurden mit 100  $\mu$ l Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Anzucht wurde ein Aliquot der tiefgefrorenen Bakterienkultur mit einer Impföse steril entnommen und auf eine LB-Antibiotika-Agarplatte ausgestrichen. Nach ÜN Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  konnten wiederum einzelne Klone gepickt und angeimpft werden.

### 2.2.3.4 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IN KLEINEM MAßSTAB (MODIFIZIERT NACH (BIRNBOIM AND DOLY, 1979))

P1: 25mM Tris pH 7,5 , 10mM EDTA, 1% Glukose, 10 $\mu$ g/ml RNaseA

P2: 2% SDS, 0,4M NaOH

P3: 3M Kaliumacetat pH4,8

Eine einzelne Kolonie Bakterien, die auf einer LB-Agar Platte  $\ddot{U}N$  gewachsen war, wurde in 5 ml LB Medium plus Antibiotikum resuspendiert und  $\ddot{U}N$  unter Schütteln (250 rpm, 37°C) wachsen lassen. Ein Aliquot von 1,5 ml wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und die Bakterien für 15 sec bei 13000g sedimentiert. Nach Resuspension in 250  $\mu$ l P1, wurden die Bakterien mit 400  $\mu$ l P2 lysiert (5min, RT, mehrmaliges Invertieren) und das Gemisch schließlich mit 300  $\mu$ l P3 neutralisiert. Nach Abzentrifugieren der lysierten Bakterienbestandteile (15min, 13000g) und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgesäß, konnte die Plasmid DNA durch Zugabe von 600 $\mu$ l Isopropanol, mehrmaligem Invertieren und Zentrifugation für 15min bei 13000g pelletiert werden. Die DNA wurde nun einmal mit 70% Ethanol gewaschen (5min, 13000g) und konnte nach Trocknen (5-15 min, RT) in 50 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Die DNA steht damit weiteren Analysen durch Restriktionsenzymverdau (2.2.3.7.1.) oder PCR (2.2.3.9.) zur Verfügung, ist aber wegen ihrer niedrigen Reinheit nicht für andere Anwendungen wie Transfektion (2.2.1.3.) zu gebrauchen.

#### **2.2.3.5 PLASMID PRÄPARATION IM GROßEN MAßSTAB**

Puffer QBT: 43,83g NaCl, 10,46g MOPS;pH 7,0; 150ml Isopropanol, 15ml 10% TX-100; auf 1l auffüllen

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

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

Mit 1 ml einer bakteriellen  $\ddot{U}N$  Kultur wurden 100 ml LB-Antibiotikum-Medium angeimpft und wiederum bis zur bakteriellen Sättigung wachsen lassen. Nach Pelletierung der Bakterien wurden diese in 4 ml P1 resuspendiert, mit 4 ml P2 durch mehrmaliges Invertieren für 5min bei RT lysiert und nach Durchmischung mit 4 ml P3 für 20 min auf Eis neutralisiert. Nach anschließender Zentrifugation (20000g, 30min, 4°C) wird der klare Überstand auf eine zuvor mit Puffer QBT äquilibrierte Säule gegeben und per Gravitation durchfließen lassen. Es folgt zweimaliges Waschen der Säulenmatrix mit je 10 ml Puffer QC, woraufhin die Plasmid DNA mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert wurde. Der Präzipitation der DNA aus dem Eluat mittels 0,7 VT Isopropanol (20.000g, 30min, 4°C) folgte einmaliges Waschen des DNA Pellets mit 70% Ethanol. Nach Trocknen des DNA Pellets wurde es in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und Quantität sowie Qualität photometrisch bestimmt (2.2.3.6.).

#### **2.2.3.6 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Absorption von Licht der Wellenlänge  $\lambda=260\text{nm}$  quantifiziert werden. Dabei gilt, daß 1 OD = 50 $\mu$ g/ml DNA, 40 $\mu$ g/ml RNA oder 33 $\mu$ g/ml Oligonukleotiden entspricht.

Da die Nukleinsäuren auch das Licht der Wellenlänge  $\lambda=280\text{nm}$  absorbieren, aber in geringerem Ausmaß, kann auch die Reinheit der DNA photometrisch bestimmt werden. Reine DNA weist einen Quotienten von  $OD_{260}/OD_{280} = 1,6-1,8$  und reine RNA von  $1,8-2,0$  auf. Proteinkontaminationen führen zu einer erhöhten Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda=280\text{nm}$  und somit zu einem erniedrigten Koeffizienten.

### **2.2.3.7 ENZYMATISCHE MODIFIKATIONEN DER DNA**

#### **2.2.3.7.1 RESTRIKTIONSENZYMATISCHER VERDAU**

Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen palindromen Sequenzen und hinterlassen dabei entweder gleich lange („blunt end“) oder unterschiedlich lange („sticky end“) Enden der beiden DNA Stränge. Für den Verdau von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingehalten. Nach dem Verdau wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.3.8.1.), ausgeschnitten und aus dem Gel aufgereinigt (2.2.3.8.2.).

#### **2.2.3.7.2 DEPHOSPHORYLIERUNG DER 3'-ENDEN VON DNA**

Nach der Hydrolyse von DNA kann die Phosphatgruppe am 3'-Ende mittels einer alkalischen Phosphatase entfernt werden. Dazu wurden zwei Einheiten des Enzyms nach Abschluß des Restriktionsverdau in dem DNA-Puffer-Enzym Gemisch zupipettiert und für weitere 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Auf diese Weise werden Vektoren behandelt, um eine Religation des Vektors (2.2.3.7.3.) ohne Insert zu verhindern.

#### **2.2.3.7.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN**

Anschließend an einen Restriktionsverdau und Aufreinigung können DNA Fragmente die komplementäre Enden besitzen miteinander ligiert werden. Hierzu wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (je kleiner das Insert, desto größer sollte der molare Überschuß sein) in  $20\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt und  $10\mu\text{l}$  3x Puffer-Ligase Gemisch zupipettiert. Die Ligation wurde für „sticky-end“ Ligationen bei RT (mindestens 30 min) und für „blunt-end“ Ligationen bei  $16^\circ\text{C}$  ÜN durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch 15 min Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$  gestoppt und konnte direkt für die Hitze-schocktransformation (2.2.3.2.) eingesetzt werden.

### 2.2.3.8 DNA GELELEKTROPHORESE

#### 2.2.3.8.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

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

6xLadepuffer: 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol, 40% Glycerin

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA Fragmenten wurden Agarosegele mit 0,8-1,5% Agarosegehalt präpariert. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf weniger als 60°C mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Die zu analysierende DNA wurde mit 1/6 VT Ladepuffer gemischt und bei 5V/cm Gellänge aufgetrennt. Nach der Auftrennung konnte die DNA auf einem Transilluminator (Eagle Eye II, Herolab) mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=254$  nm analysiert und photographiert werden.

#### 2.2.3.8.2 AUFREINIGUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN

Lysispuffer QG: QIAGEN, Komposition nicht angegeben

Waschpuffer PE: QIAGEN, Komposition nicht angegeben

Die Banden elektrophoretisch aufgetrennter DNA Proben wurden mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten, in ein Eppendorfgesäß überführt und gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 100 µl Lysispuffer QG zugesetzt, und die Gelstücke bei 60°C, 1400 rpm in einem Schüttler depolymerisiert. Die DNA-Agarose Lösung wurde auf eine Eppendorf-Filtereinheit pipettiert und 1 min 13.000g zentrifugiert, wobei die DNA an die Matrix der Filtereinheit band. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer PE wurde die DNA mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O durch Zentrifugation eluiert.

### 2.2.3.9 GERICHTETE MUTATION DURCH PCR

Um die Sequenz einer cDNA an spezifischen Stellen wunschgemäß ändern zu können, wurde eine PCR durchgeführt in der in pCDNA3 klonierte cDNA als template diente. Die verwendeten Primer lagen einerseits in den Vektorregionen des T7 Promotors und der BGH-polyA-Stelle, zum anderen innerhalb der cDNA Sequenz. Die Primer innerhalb der cDNA-Sequenz enthielten die wunschgemäß abgeänderte DNA Information. Mit diesen und dem BGH Primer wurde die erste PCR durchgeführt, deren Produkt elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt wurde (2.2.3.8.). Dieses PCR-Produkt wurde dann als Primer zusammen mit dem T7-Primer für eine zweite PCR verwendet. Das resultierende PCR Produkt ist identisch mit der Ausgangs-cDNA, ausgenommen der über den intern

lokalisierten Primer eingebrachten Mutation. Folgende Komponenten wurden für eine PCR Reaktion verwendet:

Matrizen DNA :	1 µg pCDNA3meta-1 /pCDNA3mut-2
Primer :	je 0,2 µM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP :	je 250 µM
10xPuffer :	1/10 VT
MgCl <sub>2</sub> :	1,5 mM
Polymerase:	1 Einheit
ddH <sub>2</sub> O:	auf 50µl auffüllen

Die Konditionen der PCR wurden zunächst mit einer Taq-Polymerase etabliert. Für die Erzeugung des zu klonierenden PCR Fragments wurde dann eine proof-reading taq-Polymerase verwendet, um die Quote falsch eingebauter dNTPs zu minimieren. Folgende Konditionen wurden ermittelt:

Hot Start:	70°C	5min	} 1 Zyklus
Primeranlagerung:	50°C	30 sec	
Polymeraseaktivität:	68°C	5 min	} 30 Zyklen
DNA Strangseparation:	94°C	30 sec	
Polymeraseaktivität:	68°C	10min	1 Zyklus

Die finalen PCR Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut (2.2.3.7.1.), in den Vektor pCDNA3 ligiert (2.2.3.7.3.), und nach Plasmidpräparation (2.2.3.4.) wurde die Sequenz analysiert (Fa. Seqlab, Göttingen).

#### 2.2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN

Die Signifikanz unterschiedlicher Meßergebnisse wurde mittels zweiseitigen Student'schen t-Tests ermittelt. Hierbei sind Konfidenzen < 0,05 mit einem Stern und Konfidenzen < 0,01 mit zwei Sternen gekennzeichnet.

### 3 ERGEBNISSE

Die einzelnen Schritte der Metastasierungskaskade, wie das Herauslösen aus einem Zellverband, das Durchwandern der Basallamina oder der Gefäßepithelien und die Ansiedelung innerhalb anderer, neuer Gewebsstrukturen, erfordern eine Vielzahl zellulärer Interaktionen. Daneben aber auch eine enorme Vielzahl molekularer Interaktionen innerhalb der Membran einer Zelle, zur Übermittlung von Informationen von der Membran in den Zellkern und zur Anpassung der Zelle an die sich veränderenden Bedingungen. Auf der molekularen Ebene, bedeutet dies, daß Zell-Zell oder Zell-Matrix-Interaktionen in jedem Fall zu Interaktionen von Molekülen in der Zellmembran der jeweiligen Zellen führen, die wiederum Kapazitäten zur Signalübermittlung in die Zelle hinein besitzen. Das wohl am besten beschriebene Modell solcher Interaktionen in der Zellmembran ist die Bildung der sog. immunologischen Synapse in der Membran von T-Zellen. An diesem Beispiel kann man sehen, daß eine Vielzahl von Molekülen innerhalb kürzester Zeit einen hochregulierten Prozeß durchlaufen, der schließlich in die Aktivierung der T-Zelle mündet.

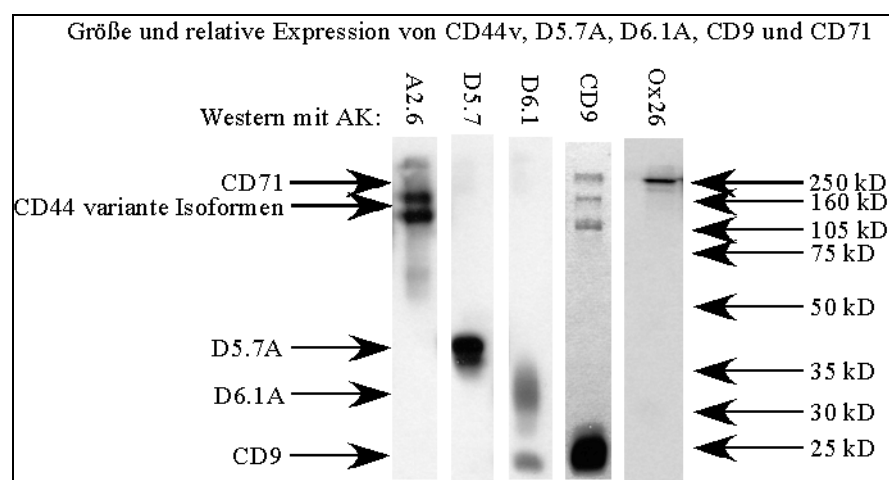
Antikörper, ob monoklonal oder polyklonal, bieten eine gute Möglichkeit die Frage molekularer Interaktionen zu beantworten, da sie spezifisch und mit hoher Affinität an definierte Epitope unterschiedlichster Struktur binden, und somit eine selektive Färbung oder Präzipitation der durch sie erkannten Moleküle erlauben.

Für die vorliegende Dissertationsarbeit sind eine Reihe von Antikörpern, die durch Immunisierung von Mäusen mit zwei unterschiedlichen Pankreasadenokarzinomlinien, der nicht metastasierenden, BSp73AS und der metastasierenden Schwesterzelllinie BSp73ASML generiert wurden, von speziellem Interesse, da sie membranständige Proteine erkennen, die selektiv auf der metastasierenden Zelllinie exprimiert werden. Zu diesen gehören die mAK C4.4, der ein GPI-verankertes Protein erkennt, D6.1, der an ein Tetraspanin bindet, D5.7, der das Ep-CAM Homolog erkennt, und A2.6, der die variante Isoform v6 des CD44 Moleküls erkennt. Diese - und andere - Antikörper wurden für die Untersuchungen über Interaktionen innerhalb der Zellmembran der metastasierenden Zelllinie BSp73ASML verwendet.

#### 3.1 RELATIVE OBERFLÄCHENEXPRESSION VERSCHIEDENER PROTEINE AUF DEN ZELLLINIEN BSP73AS14 UND BSP73ASML

Für die Untersuchung der Interaktionen verschiedener Proteine in der Zellmembran ist es zunächst von Bedeutung die relative Dichte der Proteinexpression zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde eine FACS Färbung der Zelllinien BSp73AS14, einer CD44-meta-1 Transfektante der BSp73AS-Zelllinie (Günthert et al., 1991), und BSp73ASML vorgenommen (Abb.2), bei der im besonderen auf identische Zellzahlen, Antikörperkonzentrationen und -mengen geachtet wurde, um das Ergebnis der Färbung auf die Frage-

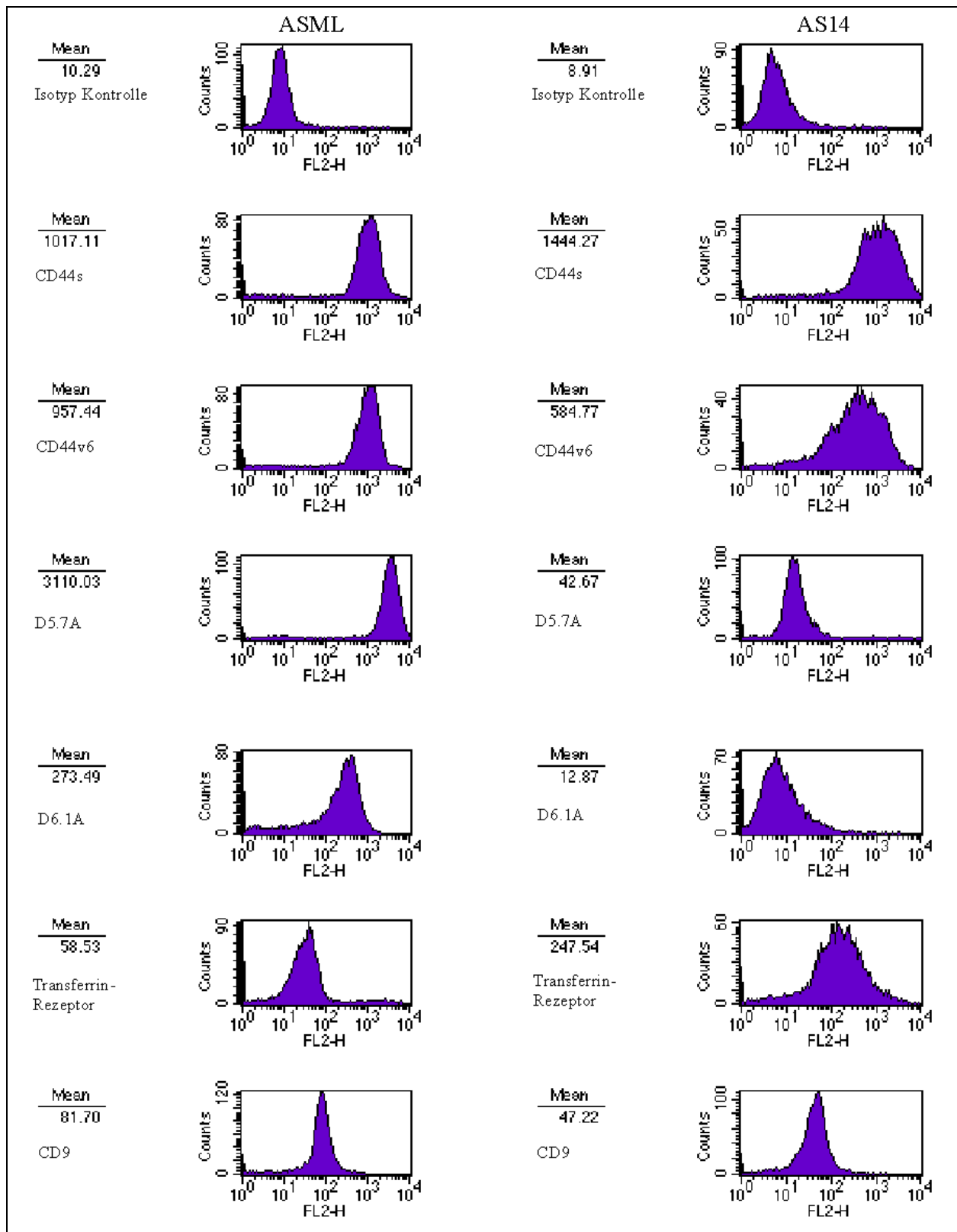
stellung der Quantität der Oberflächenexpression hin analysieren zu können. Ausgehend von identischen Färbe- und Meßbedingungen kann die mittlere Fluoreszenzintensität in etwa als Maß für die Menge des auf der Zelloberfläche exprimierten Proteins angesehen werden, wobei jedoch noch weitere Faktoren wie die Antikörperaffinität von Bedeutung sind. Aus diesem Grund kann nicht von absoluter Expressionstärke, wohl aber von relativer gesprochen werden. Von dieser Prämisse ausgehend kann gefolgert werden, daß die Zelllinie BSp73AS14 kein D5.7A und D6.1A exprimiert, wie bereits beschrieben wurde (Matzku et al., 1989), und daß im Hinblick auf CD44 die Standardisoform etwas stärker exprimiert wird als die variante Isoform CD44-meta-1 (MFI Verhältnis 860 : 580). Die nicht transfizierte Zelllinie BSp73AS exprimiert hingegen praktisch keine CD44 varianten Isoformen. Im Kontrast dazu exprimiert die Zelllinie BSp73ASML kein CD44s, sondern alle exprimierten CD44 Isoformen enthalten das variante Exon v6 wie Western Blot Analysen zeigen (Abb.1). Weiterhin werden im wesentlichen 2 variante Isoformen, CD44v6/7 (120kD) und CD44 meta-1 (160kD), von BSp73ASML Zellen exprimiert. Zwar sind noch 2 weitere, größere Isoformen des CD44 beschrieben (Rudy et al., 1993), diese werden aber deutlich schwächer exprimiert. Das D5.7A Molekül (EpCAM Homolog) wird in etwa 3 mal so häufig exprimiert wie die Summe der unterschiedlichen CD44 Isoformen, wohingegen das D6.1A etwas schwächer exprimiert wird als die Summe der CD44 Isoformen. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Proteinen wird der Transferrinrezeptor (CD71) auf den BSp73ASML sehr niedrig exprimiert. Die hier dargestellte Abbildung für die Expression von CD9 ist aus einer anderen Meßreihe entnommen, und kann somit nicht in den Vergleich der Expressionsstärken einbezogen werden.



**Abb. 1: Expression der CD44 varianten Isoformen, D5.7A und D6.1A auf BSp73ASML**

Triton X-100 Lysate von BSp73ASML Zellen wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von CD44 varianten Isoformen, D5.7A, D6.1A, CD9 und CD71 erfolgte mit den entsprechenden mAK, POD-konjugierten Sekundärantikörpern und ECL Substrat.

Im Western Blot (Abb.1) ist zu beobachten, daß das D6.1A eine verschmierte sowie eine distinkte Bande liefert, was auf unterschiedliche Glykosylierungen zurückzuführen ist. Der Transferrinrezeptor weist im nichtreduzierenden Gel eine Größe von 190 kD auf, was zeigt, daß das Molekül als Homodimer vorliegt.



**Abb 2: Relative Expression verschiedener membranständiger Proteine auf den Zelllinien BSp73AS14 und BSp73ASML**

Je  $10^6$  BSp73AS14 oder BSp73ASML Zellen wurden mit  $1\mu\text{g}$  aufgereinigtem Erstantikörper (Ox8 (Isotypkontrolle), Ox50, A2.6, D5.7, D6.1, Ox26, B2C11) und  $0,1\mu\text{g}$  PE-markiertem Zweitantikörper in einem Volumen von  $100\mu\text{l}$  gefärbt. Von jeder Probe wurden 5000 Zellen im FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert. Die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI = Mean) erfolgte durch die Software CellQuest.



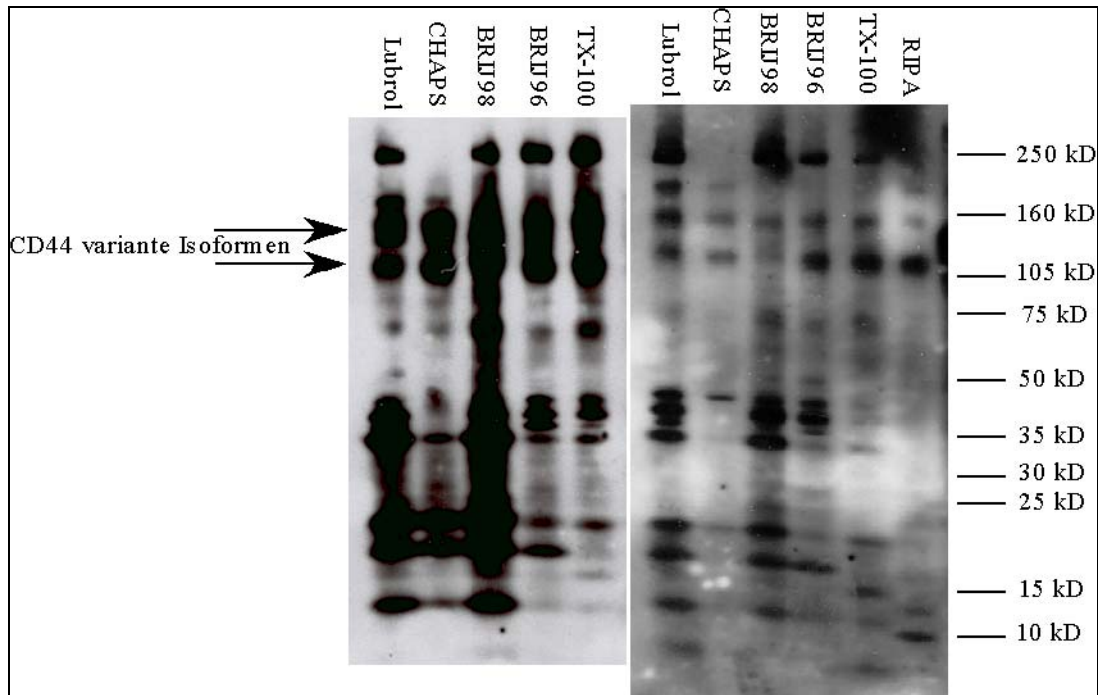
### 3.2 KOPRÄZIPITATION VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE MIT CD44 VARIANTEN ISOFORMEN UNTER VERSCHIEDENEN LYSISBEDINGUNGEN

Die Interaktion verschiedener Proteine in der Zellmembran ist von einer Reihe von Faktoren wie bspw. Ladungen, hydrophilen oder hydrophoben Wechselwirkungen, kovalenten Bindungen oder Protein-Lipid-Interaktionen abhängig. Diese Wechselwirkungen können ggf. durch Detergentien zerstört werden. Je stringenter ein Detergenz ist, desto mehr der beschriebenen Wechselwirkungen innerhalb der Membran werden zerstört. Die Stringenz eines Detergenz wird als Hydrophile-Lipophile-Balance (HLB) angegeben (Tab.1), wobei gilt, daß je niedriger der HLB-Wert eines Detergenz ist, desto größer ist seine Stringenz. Der HLB-Wert von CHAPS ist aufgrund der Eigenschaften als Zwitterion nicht zu bestimmen, ebenso wie das SDS eine Sonderstellung einnimmt, da es neben der detergenten Eigenschaft auch zur Denaturierung von Proteinen führt, und somit fast alle Protein-Interaktionen zerstört.

**Tab.1: Verwendete Detergentien und deren HLB Werte**  
 Die in der Tabelle aufgeführten Detergentien wurden für die verschiedenen Versuche verwendet. Je niedriger der HLB Wert, desto stringenter das Detergenz. SDS als denaturierendes Detergenz und CHAPS als zwitterionisches Detergenz nehmen dabei Sonderstellungen ein.

Detergenz	Art des Detergenz	HLB Wert
SDS	Anionisch	40
TX-100	Nicht-Ionisch	13,5
Brij 96/97	Nicht-Ionisch	12,4
Brij 98/99	Nicht-Ionisch	15,3
CHAPS	Zwitter-Ionisch	nicht bestimmbar
Lubrol	Nicht-Ionisch	14,9

Werden die Interaktionen durch die verwendeten Detergentien nicht zerstört, so kann die Summe aller interagierender Proteine mittels entsprechender Antikörper präzipitiert werden, wobei das direkt an den Antikörper gebundene Protein als Präzipitat, und die indirekt über das Präzipitat gebundenen Proteine als Kopräzipitat bezeichnet werden. Um erstens alle Präzipitate in einem Western Blot auch sichtbar machen zu können, und zweitens exklusiv membranständige Proteine zu detektieren, wurden die Proteine der Zellmembran vor der Lyse biotinyliert und später mittels eines Extravidin-POD Konjugates auf der PVDF-Membran nachgewiesen (Abb.3).



**Abb. 3: Ko-Immünpräzipitationen von CD44 unter verschiedenen Lysisbedingungen**

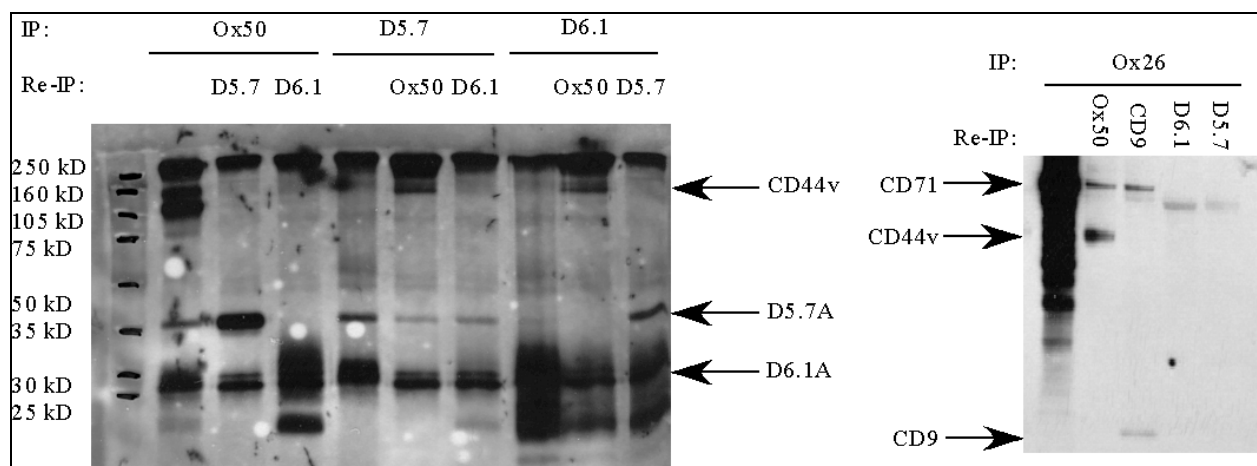
BSp73ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert und mit 1% des angegebenen Detergenz lysiert. Die Lysate wurden einer Präzipitation mit Ox50 (links) oder A2.6 (rechts) unterzogen. Nach Auftrennung in einer 4-20% linearen SDS-PAGE und Western Blot auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mittels Extravidin-POD Konjugat nachgewiesen.

Die Kopräzipitationen mit den Antikörpern A2.6, der im Bereich des CD44v6 Exons bindet, und Ox50, der ein Epitop im nicht varianten Bereich des CD44 erkennt, lieferten wie erwartet identische Ergebnisse, auch wenn festzustellen bleibt, dass der mAK Ox50 in Präzipitationsassays unter nicht denaturierenden Bedingungen CD44 besser bindet, aber unter denaturierenden Bedingungen (RIPA) sein Epitop nicht mehr erkennt. Die Anzahl und Intensität der kopräzipitierten Proteine nimmt mit abnehmender Stringenz der verwendeten Detergentien zu. Daß dies nicht an unterschiedlichen Mengen eingesetzten Lysates liegt, zeigt die jeweils gleichbleibende Menge präzipitierten CD44. Wie sich später herausstellte, sind eine Reihe der kopräzipitierten Proteine intrazellulärer Herkunft, wurden aber biotinyliert, da in DMSO gelöstes Biotin verwendet wurde, welches offensichtlich in die Zellen eindringen konnte. Nach der Umstellung auf wasserlösliches Biotin, konnten verschiedene der in Abb.3 sichtbaren Banden mittels Extravidin nicht mehr detektiert werden, wohl aber in einer Coomassie Färbung (siehe Abb.5).

### 3.2.1 D6.1A UND D5.7A KOPRÄZIPITIEREN MIT CD44

Die Methodik der Kopräzipitation nach Oberflächenbiotinylierung hat den Vorteil der Darstellbarkeit multipler Banden, liefert aber außer der Molekülgröße keine präzise Aussage über die Proteine, die sich tatsächlich in den Banden darstellen. Die beobachteten Molekulargewichte der kopräzipitierten Proteine

ließen jedoch die Vermutung zu, dass sowohl das D5.7A (35kD) als auch das D6.1A (20-30kD „Schmier“) in den Kopräzipitaten unter weniger stringenten Lysisbedingungen wie CHAPS, Lubrol oder Brij99 enthalten sein könnten. Zur Verifizierung dieser Annahme ist ein sich an eine Kopräzipitation anschließender Western Blot nicht geeignet, da die Größe der mAK und der varianten CD44 Isoformen ähnlich sind, was die Detektion von evtl. kopräzipitierendem CD44 aus D6.1 und D5.7 Präzipitaten ohne direkt markierte oder biotinylierte Antikörper verhindert. Daher wurden Repräzipitationen von Lysaten biotinylierter BSp73ASML Zellen durchgeführt. Als Detergenz für die erste Präzipitation wurde Lubrol ausgewählt, da es zum einen das stringenteste Detergenz war, bei dem die Mehrzahl aller prinzipiell kopräzipitierenden Moleküle zu identifizieren war, und zum anderen als ein Detergenz beschrieben ist (Röper et al., 2000), welches Subdomänen der Zellmembran, die von den klassischen TX-100 unlöslichen differenzierbar sind, klassifiziert. Für die Repräzipitation wurden die kopräzipitierenden Moleküle durch TX-100 von den Protein-G-Sepharose-Partikeln eluiert und mit entsprechenden mAK repräzipitiert (Abb. 4).



**Abb.4: Repräzipitation von CD44, D5.7A und D6.1A**

BSp73ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert, in 1% Lubrol lysiert und einer IP mit den angegebenen Antikörpern unterzogen. Anschließend wurden die kopräzipitierenden Moleküle mit 1% TX-100 von den Präzipitaten eluiert und einer Re-IP mit den jeweils angegebenen Antikörpern unterzogen. Nach Auftrennung der Proteine in einer 12% SDS-PAGE und Blot auf eine PVDF Membran, wurden die Proteine mittels Extravidin-POD-Konjugat nachgewiesen.

Wie Abb.4 deutlich zu entnehmen ist, kopräzipitieren die 3 Moleküle D5.7A, D6.1A und CD44 variante Isoformen unter Lubrol Lysis Bedingungen miteinander und sind jeweils aus den Primärpräzipitaten der beiden anderen Moleküle durch Triton X-100 herauslösbar. Die gleichen Ergebnisse konnten mit einer weiteren metastasierenden Rattenzelllinie, den Progressor Zellen, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aus den Kontrollpräzipitaten des Transferrinrezeptors (CD71) konnten ebenfalls geringe Mengen an CD44, D5.7, D6.1 und CD9 repräzipitiert werden (rechte Hälfte Abb.4). Da die Banden aber sehr

schwach sind, und erst nach langer Exposition zu sehen waren, kann dies als auf die Methodik zurückzuführende Kontamination gewertet werden.

Ausgehend von diesen Befunden wurden 2 Ziele verfolgt: Zum einen die Identifizierung weiterer Proteine, die in den unter Lubrol Lysis Bedingungen zu beobachtenden Komplexen enthalten sind, mittels massenspektrometrischer Analyse. Zum anderen die Fragestellung der Variantenspezifität der Interaktion von CD44 mit anderen Proteinen innerhalb der Komplexe.

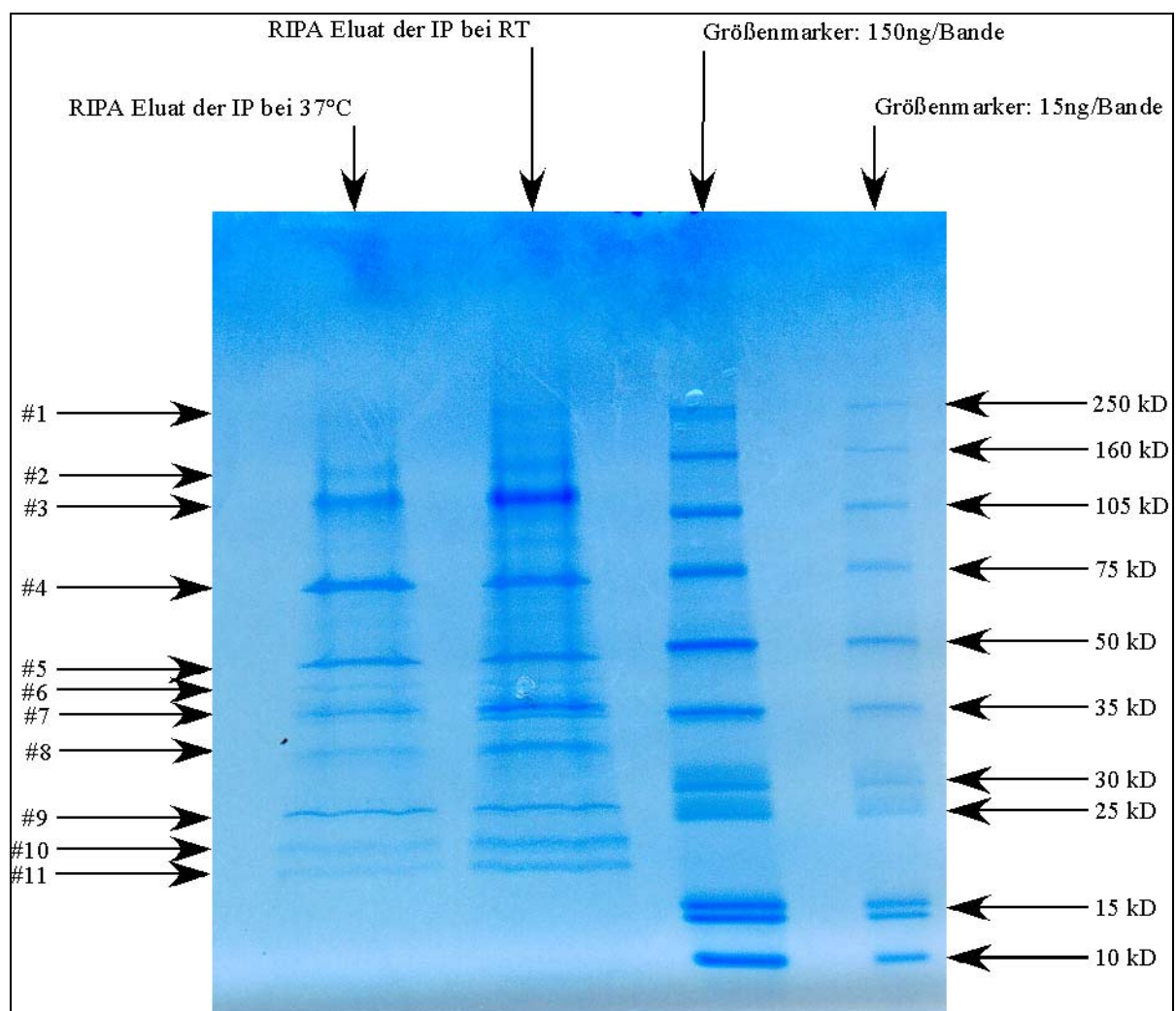
### 3.3 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER MIT VARIANTEN ISOFORMEN VON CD44 NACH LUBROL-LYSE KOPRÄZITIERENDEN PROTEINE

Voraussetzung für eine massenspektrometrische Analyse von Proteinen ist zunächst die Anreicherung der Proteine bis zu einem Maß, das Sichtbarmachung in einem Coomassie gefärbten Gel erlaubt. Dies entspricht – im Vergleich zur gängigen Detektion mit ECL Substrat im Western Blot – in etwa einer 100-fachen Menge an benötigtem Protein. Um solche Proteinmengen zu präzipitieren, wurden BSp73ASML Zellen aus 10 Rollerflaschen (entspricht ca.  $10^9$  Zellen) lysiert und das Lysat der Immunpräzipitation mit Ox50 zugeführt. Ein weiteres Problem neben der benötigten Proteinmenge für eine massenspektrometrische Analyse stellen Proteinkontaminationen dar. Immer wieder auftretende Kontaminationen sind Aktine, Keratine, Hitzeschockproteine und Myosine. Um Kontaminationen zytoplasmatischer Proteine so weit als möglich zu reduzieren, wurden zunächst die Membranen der BSp73ASML präpariert, bevor Lyse und Immunpräzipitation durchgeführt wurden. Weiterhin muß darauf geachtet werden, ein ausreichendes Lysisvolumen zu gewährleisten, um eine vollständige Lyse der Membranen sicher zu stellen. Letztlich wurden nach der IP die Proteine durch Elution mit RIPA-Puffer bei RT und 37°C von den Antikörpern getrennt, um Kontamination durch das Protein-G oder den mAK Ox50 zu minimieren. Da wie bereits erwähnt mit großen Volumina gearbeitet werden mußte, wurden die von den Antikörpern eluierten Proteine nochmalig präzipitiert und unter reduzierenden Bedingungen in einem 4-20%igen, linearen Gradientengel aufgetrennt (Abb.5). Nach kolloidaler Coomassie-Färbung konnten 11 Banden ausgeschnitten werden, die tryptisch verdaut und einer massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt wurden. Nach der Analyse wurden die identifizierten Fragmente einem Datenbankvergleich unterzogen und lieferten folgendes Ergebnis (Tab.2):

<p><b>Tab. 2:</b>            <b>Massenspektrometrische Analyse der unter Lubrol Lysis Bedingungen mit variantem CD44 kopräzipitierenden Proteine</b></p> <p>Ergebnisse der Massenspektrometrie für die analysierten Banden 1-11 nach Datenbankabgleich</p>
--

Bande	Identifiziertes Protein
#1	nicht eindeutig zu identifizierende Keratine
#2	CD44 meta-1 der Ratte

#3	Integrin $\alpha 3$ Kette der Maus
#4	dnaK-Typ molekulares Chaperon grp75 der Ratte
#5	Immunglobulin schwere Kette der Maus
#6	zytoplasmatisches $\beta$ -Aktin der Maus
#7	Annexin I der Ratte
#8	EGP-314 Homolog der Ratte (D5.7A)
#9	Immunglobulin $\kappa$ -leichte Kette der Maus
#10	CD9 der Ratte
#11	nicht eindeutig zu identifizierende Bruchstücke von Immunglobulinen der Maus



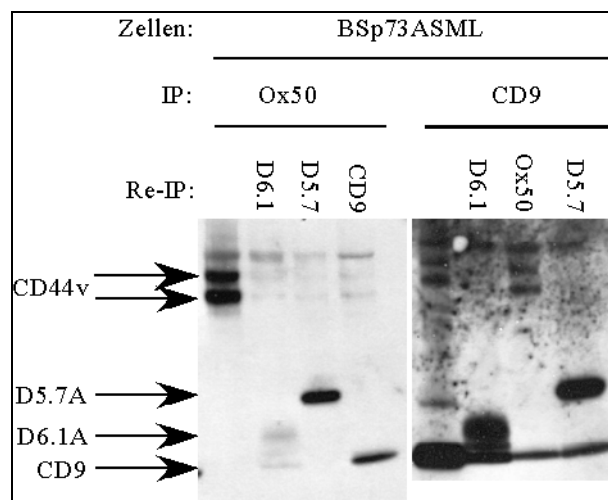
**Abb. 5 Präparative Immunpräzipitation der CD44 enthaltenden Komplexe unter Lubrol-Lyse-Bedingungen von  $10^9$  BSp73ASML Zellen**

Membranpräparationen von  $10^9$  BSp73ASML Zellen wurden in 1% Lubrol lysiert und die CD44 enthaltenden Proteinkomplexe mittels des mAK Ox50 präzipitiert. Nach der Präzipitation wurden die Proteine mit RIPA-Puffer zunächst bei RT (2. Spur von links) und nochmals bei 37°C (linke Spur) eluiert und unter reduzierenden Bedingungen in einer 4-20% linearen Gradienten-SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Abschätzung der Mengen wurden 2 Spuren mit Größenmarkerproteinen aufgetragen, die 15ng Protein/Bande (rechte Spur) respektive 150ng Protein/Bande (2. Spur von rechts) enthielten. Die Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt, die markierten Banden (1-11) ausgeschnitten, tryptisch verdaut und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

Die massenspektrometrische Analyse bestätigt einerseits die auf Antikörpernachweis basierenden Ergebnisse der Assoziation von CD44 varianten Isoformen mit D5.7A, bringen andererseits aber auch den Befund des Vorhandenseins weiterer Proteine in den beschriebenen Komplexen. Zu diesen gehören CD9, alpha3-Integrin und Annexin I. Daß das D6.1A nicht nachgewiesen werden konnte, mag an der speziellen Glykosylierung in den BSp73ASML Zellen liegen, die dazu führt, daß das D6.1A nicht als distinkte Bande, sondern „verschmiert“, und somit nicht in für die Massenspektrometrie geeigneter Form vorliegt. Außerdem muß davon ausgegangen werden, daß noch weitere Proteine in den Komplexen vorliegen, wie bspw. das Beta-1-Integrin, die aus Mengen- oder Auftrennungsgründen nicht identifiziert wurden. Daher sind weitere massenspektrometrische Analysen geplant, bei denen noch größere Mengen Protein oder noch besser auftrennende Gradientengele (4-10% oder 10-20%) verwendet werden sollen.

### 3.3.1 REPRÄZIPITATIONSANALYSE VON CD9

Um auszuschließen, daß der Nachweis weiterer Proteine in den CD44-Lubrol-Komplexen durch die Massenspektrometrie artifizieller Natur oder durch Kontaminationen zustande gekommen ist, wurden in der Folge weitere Repräzipitationsanalysen unter identischen Bedingungen, d.h. BSp73ASML Zellen, Lubrol-Lyse und TX-100 Extraktion, durchgeführt (Abb. 6).



**Abb. 6: Repräzipitation von CD9 aus den CD44-Lubrol-Komplexen**

BSp73ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert, in 1% Lubrol lysiert und die Komplexe mit Ox50 (links) oder CD9 (rechts) präzipitiert. Nach Extraktion mit 1% TX-100 wurden D5.7A, D6.1A und CD44/CD9 repräzipitiert. Nach Auftrennung in einer 12% SDS-PAGE und Blot auf PVDF-Membran wurden die Proteine mittels Extravidin-POD-Konjugat nachgewiesen.

Massenspektrometrie und Repräzipitation zeigen deutlich, daß CD9 in den Lubrol resistenten Komplexen enthalten ist. Nach TX-100 Extraktion der CD9 Immunpräzipitation sind noch 2 Banden im Größenbereich des CD44 zu erkennen. Dies müssen von CD44 unterscheidbare Proteine sein, die eine TX-100

stabile Interaktion mit CD9 eingehen, oder es handelt sich um Hintergrund oder Kontaminationen. Im Gegensatz dazu sind die Spuren von CD44 (links) oder CD9 (rechts), die in allen Repräzipitationen zu sehen sind, als technische Artefakte (nicht gebundene Antikörper der ersten IP oder verschleppte Protein-G-Sepharose beads) zu werten.

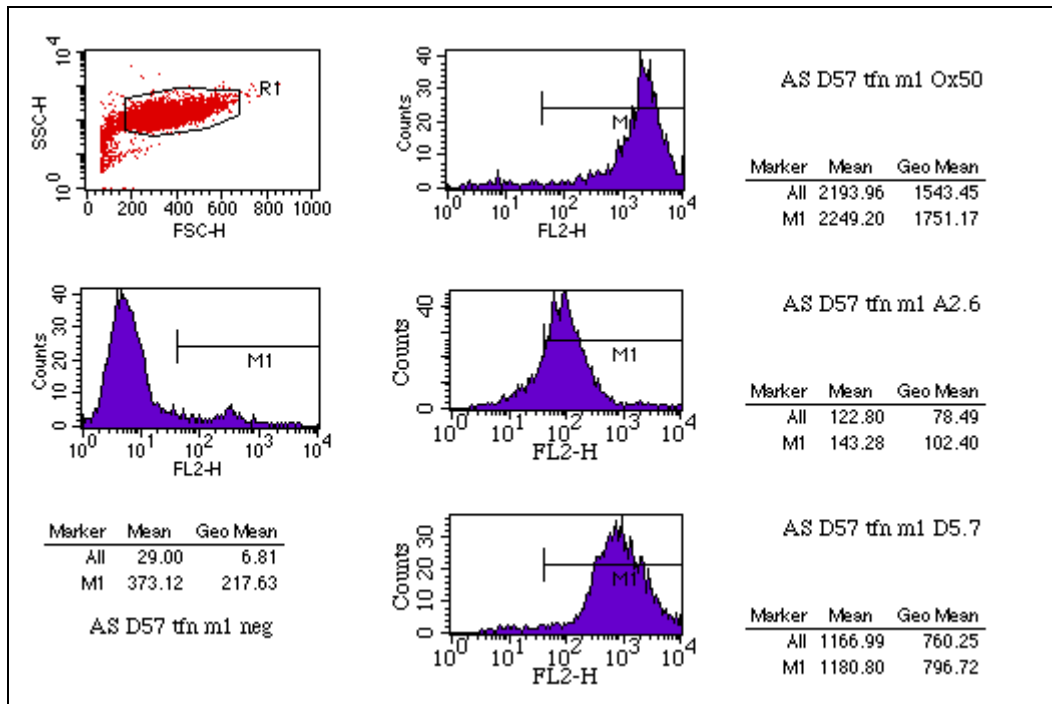
### **3.4 VARIANTENSPEZIFITÄT DER PROTEININTERAKTIONEN IN LUBROL RESISTENTEN KOMPLEXEN**

Ausgehend von den Befunden über das metastatische Potential der BSp73ASML Zellen, die keine CD44 Standard Isoform exprimieren (Rudy et al., 1993), sowie der Prävention der Metastasierung von BSp73AS14 durch den mAK A2.6 (Seiter et al., 1993), liegt die Vermutung nahe, daß die Beteiligung der CD44 varianten Isoformen in den beschriebenen Lubrol resistenten Proteinkomplexen nicht durch Eigenschaften des Standardanteils von CD44 zustande kommt, sondern durch die varianten Isoformen vermittelt wird. Weitere Indizien hierfür sind die Beteiligung anderer metastasierungs-assoziiierter Antigene wie D6.1A und D5.7A, sowie Befunde über funktionelle Korrelationen zwischen CD44 varianten Isoformen und  $\beta$ 1-Integrin in der Osteopontinbindung (Katagiri et al., 1999).

Da die BSp73ASML Zellen die CD44s Isoform nicht exprimieren, sind sie zur Untersuchung dieser speziellen Fragestellung nicht geeignet, wohl aber die BSp73AS Zelllinie, die CD44s in großen Mengen, aber CD44 variante Isoformen in nur geringen Mengen exprimieren. Für die Experimente wurden zwei Transfektanden verwendet, die CD44 meta-1 Transfektande BSp73AS-14 (Abb. 1) und eine neu generierte D5.7A exprimierende Variante BSp73AS5.7 (Abb.7).

#### **3.4.1 HERSTELLUNG EINER STABILEN D5.7A EXPRIMIERENDEN VARIANTE DER BSP73AS ZELLINIE**

Zur Generierung einer stabilen Transfektande für das D5.7A Molekül wurden die BSp73AS Zellen mit dem die cDNA des D5.7A enthaltenden Vektor pCDNA3 (Würfel et al., 1999) transfiziert. Für die Transfektion wurde das Polyfect Agents verwendet, und die BSp73AS Zellen wurden mit 400 $\mu$ g G418 / ml Medium selektioniert. Nach Reklonierung durch limitierende Verdünnung wurden die einzelnen Klone per Durchflußzytometrie auf die Expression des D5.7A Moleküls überprüft. Zur Durchführung der Experimente wurde der Klon mit der höchsten Expression ausgewählt (Abb. 7). Auffällig am Expressionsmuster der BSp73AS5.7 Transfektande ist die vergleichsweise hohe Expression von CD44v6, die durch den Reklonierungsprozeß zu erklären ist, d.h. es wurde ein BSp73AS Klon expandiert, der im Vergleich zu BSp73AS Gesamtkulturen CD44v6 vergleichsweise hoch exprimiert. Dennoch ist die Expression von CD44v6 im Vergleich zu CD44s um den Faktor 20 und im Vergleich zu D5.7A um den Faktor 10 niedriger.



**Abb. 6: FACS-Analyse des Expressionsmusters der BSp73AS5.7 Zelllinie**

4x10<sup>5</sup> BSp73AS Zellen wurden in einer 6-well Gewebezuchtplatte ausgesät und mit 1,5 µg pCDNA3/D5.7A transfiziert. Nach Selektion mit G418 und Reklonierung wurden die Expression des D5.7A Proteins der individuellen Klone untersucht. Der Klon mit der höchsten Expressionsrate wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt und ist hier dargestellt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 10<sup>6</sup> Zellen mit 10µg/ml des Erstantikörpers und 0,1µg/Probe PE-markiertem Zweitantikörper angefärbt und in einem FACSCalibur ausgewertet.

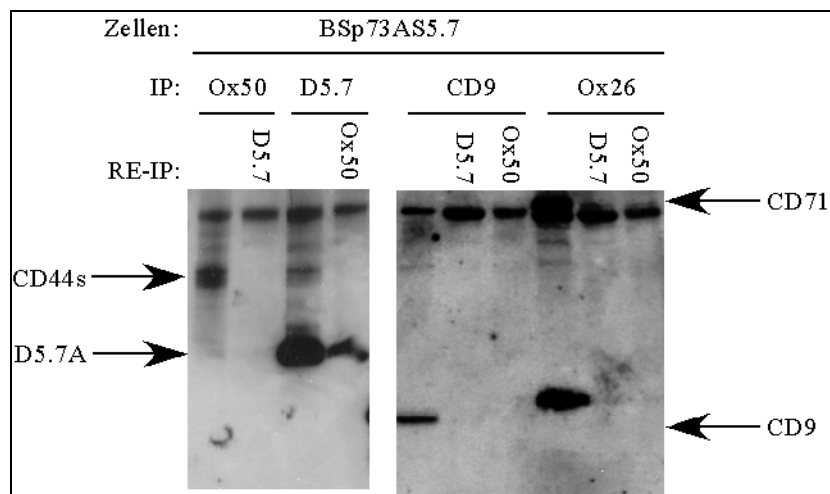
### 3.4.2 DIE CD44 STANDARD ISOFORM KOPRÄZIPITIERT NICHT MIT CD9 ODER D5.7A

Die Ko- und Repräzitationen mit Lysaten der BSp73AS Zellen stellten ein besonderes Problem dar, da einerseits der mAK Ox50 sein Epitop nicht unter denaturierenden Bedingungen erkennt, und somit nicht für eine Western Blot Analyse zu verwenden ist. Zum anderen erfolgt die dadurch notwendig werdende Oberflächenbiotinylierung für CD44s nur schwach. Dies könnte an der intensiven Glykosylierung des Moleküls liegen, die vermutlich nur wenige Möglichkeiten für die Biotinbindung bietet. Aus diesem Grund scheinen die Intensitäten der zu beobachtenden Banden für CD44s nicht in Relation zur FACS Analyse zu stehen. Dessen ungeachtet zeigen die Repräzitationen mit Lysaten der BSp73AS5.7 Zelllinie, daß CD44s und D5.7A nicht kopräzipitieren (Abb 8.), sondern sich ebenso verhalten wie die Repräzitationen mit dem Kontrollantikörper Ox26, der den Transferrinrezeptor (CD71) präzipitiert.

Auch die Analyse von Kopräzipitaten unter Lubrol Bedingungen zeigte, daß CD44s nicht mit D5.7A kopräzipitierte und umgekehrt, da keine Proteine der entsprechenden Größen zu finden waren (Daten nicht gezeigt).

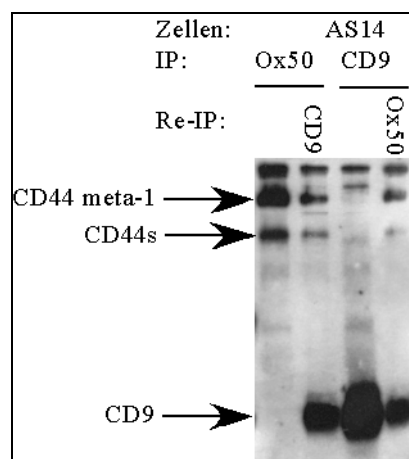


Repräzipitationen mit CD9 und CD44 auf der Zelllinie BSp73AS14 zeigen hingegen, daß sowohl CD44 meta-1 als auch CD44s mit CD9 kopräzipitieren (Abb. 9), wenn auch die Interaktion zwischen der Standardisoform und CD9 deutlich schwächer ist. Allerdings konnte die Kopräzipitation von CD9 und CD44s nicht auf BSp73AS Zellen reproduziert werden (Daten nicht gezeigt), wie man aber auch in einer Repräzipitation von CD9 und CD44s auf den BSp73AS5.7 erkennen kann (Abb.8). Dies läßt den möglichen Rückschluß zu, daß die CD44 Standard Isoform gemeinsam mit den varianten Isoformen in die Komplexe einbezogen wird, ggf. über CD44-CD44 Interaktionen, aber daß die CD44 Standard Isoform nicht per se mit CD9 interagiert.



**Abb. 8 CD44s und D5.7A kopräzipitieren nicht in Lysaten der Transfektante BSp73AS5.7**

BSp73AS5.7 Zellen wurden oberflächenbiotinyliert und in 1% Lubrol lysiert. Nach Präzipitation mit Ox50, D5.7, Ox26 oder B2C11 wurden die kopräzipitierenden Proteine mit TX-100 eluiert und mit jeweils anderen mAK (wie angegeben) repräzipitiert.



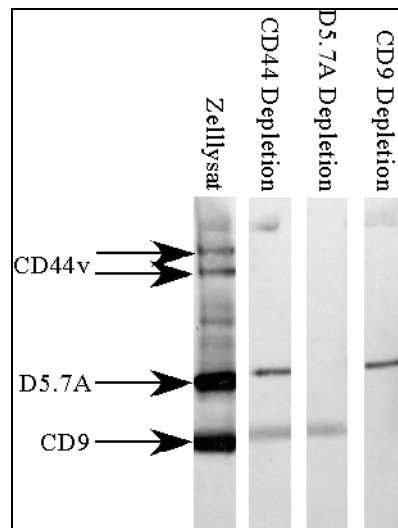
**Abb. 9 Interaktion von CD44s bzw. CD44 meta-1 mit CD9**

BSp73AS14 Zellen wurden oberflächenbiotinyliert und in 1% Lubrol lysiert. Nach Präzipitation mit Ox50 bzw. CD9 wurden die kopräzipitierenden Proteine mit TX-100 eluiert und mit dem jeweils anderen mAK repräzipitiert.

Ausgehend von diesen Beobachtungen erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die Interaktion zwischen CD44 und den kopräzipitierenden Molekülen CD9 und D5.7A von varianten Isoformen des CD44 Moleküls abhängt. Ob dafür eine spezielle Variante und/oder Glykosylierungsstrukturen verantwortlich sind, könnte über entsprechende Versuche mit Transfektanten einzelner Varianten bzw. nach Tunicamycinbehandlung der verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Diese Untersuchungen sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt.

### **3.5 STÖCHIOMETRIE DER INTERAKTION VON VARIANTEM CD44, D5.7A UND CD9**

Eine bis hierhin ungeklärte Frage ist, ob variante Isoformen des CD44 in der Membran von BSp73ASML in der Regel in Form der beschriebenen Proteinkomplexe vorliegen, oder ob diese Komplexe nur einen begrenzten Anteil der exprimierten Moleküle beinhalten. Um diese Frage hinreichend zu beantworten, muß wiederum die relative Expression der Moleküle auf der Zelloberfläche berücksichtigt werden. Ausgehend von einer hoch stöchiometrischen Anordnung der Komplexe und unter der Annahme einer äquimolaren Beteiligung der einzelnen Proteine, muß man annehmen, daß nach vollständiger Depletion des CD44 aus einem Lysat durch Präzipitation dennoch D5.7A und CD9 in dem Lysat verbleiben würden, da die Ausgangsmengen der letztgenannten Moleküle ungleich höher sind. Im Gegensatz dazu würde man nach einer Depletion von CD9 oder D5.7A aus den Lysaten jedoch keine verbleibenden varianten Isoformen des CD44 erwarten. Gesetzt den Fall, daß es sich nicht um einen hochstöchiometrischen Komplex handelt, wäre es wiederum unmöglich durch Extraktion von CD9 oder D5.7A auch das variante CD44 aus den Lysaten zu eliminieren. Allerdings muß ebenfalls beachtet werden, daß durch die Lyse der Zellen sicherlich auch Proteininteraktionen zerstört werden, so daß ein solches Experiment lediglich die untere Grenze der Interaktionsqualität der Proteine darstellen kann. Zur Durchführung dieses Experimentes wurden sehr geringe Mengen an Lysat verwendet (in etwa  $2,5 \times 10^5$  BSp73ASML Zellen), dreimal mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert und die Antikörper gebundenen Präzipitate je viermal mit Protein-G-Sepharose aus dem Lysat entfernt (Abb. 10).



**Abb. 10: Stöchiometrie der CD44 enthaltenden Komplexe**

Je  $2,5 \times 10^5$  BSp73ASML Zellen wurden in 1% Lubrol lysiert und je dreimal mit den angegebenen Antikörpern präzipitiert, wobei für jede Präzipitation die Komplexe viermal mit Protein-G-Sepharose sedimentiert wurden. Schließlich wurden vom Ausgangslysat (linke Spur) und den Überständen der Präzipitationen von CD44 (2. Spur von links), D5.7A (3. Spur) und CD9 (rechts) gleiche Mengen in einer 12 % igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte per Western Blot mit den Antikörpern A2.6, D5.7 und B2C11.

Wie dem Experiment klar zu entnehmen ist, handelt es sich bezüglich der varianten Isoformen des CD44 um Komplexe hoher Stöchiometrie, da sowohl durch Entzug von D5.7A als auch von CD9 entsprechend der Hypothese, das gesamte CD44 aus den Lysaten zu entfernen ist. Im Umkehrfall verbleiben jedoch CD9 und D5.7A in den Lysaten. Betrachtet man die Extraktionen von D5.7A und CD9 fällt auf, daß Anteile des jeweils anderen Moleküls immer noch im Überstand befindlich sind. Zusammengenommen mit den Ergebnissen der BSp73AS Transfektanden läßt dies den möglichen Rückschluß zu, daß zunächst CD44 mit CD9 interagiert, und D5.7A über die varianten Isoformen des CD44 in den Komplex mit aufgenommen werden. Würde D5.7A zunächst mit CD9 interagieren, dürfte je nach Expressionsniveau nur eines der beiden Moleküle nach Extraktion des jeweils anderen im Überstand verbleiben. Um diese Annahme hinlänglich zu zeigen, muß man nach CD44 Extraktion den verbleibenden Überstand noch von CD9 oder D5.7A klären und den Verbleib des jeweils anderen Moleküls in einem Western Blot nachweisen, was allerdings bisher nicht geschehen ist.

### 3.6 LUBROL RESISTENTE PROTEINKOMPLEXE UND MIKRODOMÄNEN DER MEMBRAN

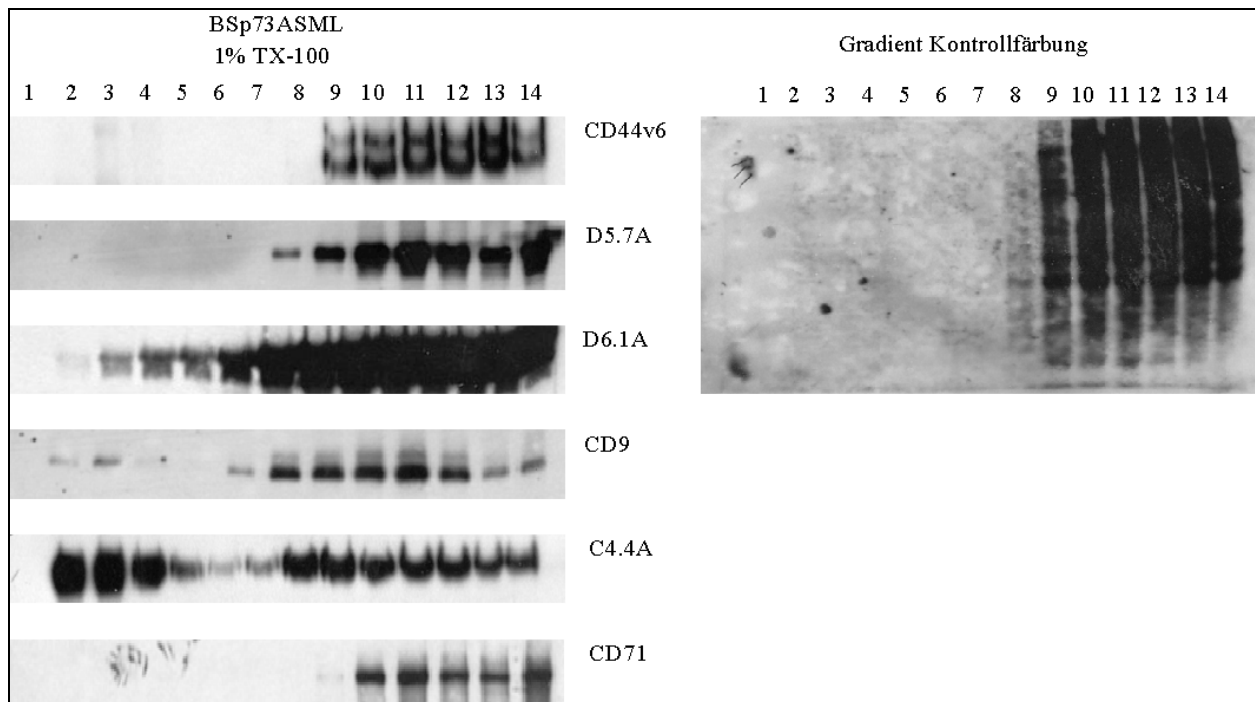
Neben der Frage der Interaktion von Molekülen, ist die Frage der Lokalisation solcher Proteinkomplexe innerhalb der Membran von zentraler Bedeutung. So zeichnet sich im Verlauf der letzten Jahre ein genaueres Bild der Zellmembran, abweichend vom reinen „flüssigen-Mosaik“ Modell, in der prinzipiell alle Proteine frei beweglich sind, hin zu einem Modell, in dem spezielle Regionen der Membran nicht für alle

Proteine zugänglich sind. Diese Regionen, auch „Lipid Rafts“ (Simons and Toomre, 2000), Glykosphingolipid angereicherte Regionen (GEM) oder Detergenz resistente Regionen (DRM) genannt, zeichnen sich durch ihre spezielle Zusammensetzung, die hoch an Cholesterin und Sphingolipiden ist, aus. Diese spezielle Zusammensetzung wiederum bewirkt, daß diese Membranregionen für bestimmte Detergentien unlöslich sind. Das ist immer dann der Fall, wenn die Lipid-Lipid-Wechselwirkungen stabiler sind als die Lipid-Detergenz-Wechselwirkungen. Diese Unlöslichkeit führt zur Generierung von Vesikeln mit hohem Lipid-Protein-Verhältnis, die durch Dichtegradientenzentrifugation von den im Detergenz löslichen Bestandteilen getrennt werden können. So sind die unlöslichen Membranbestandteile in der Interphase zweier unterschiedlich dichter Saccharoselösungen durch Ultrazentrifugation anzureichern. In den folgenden Experimenten wurden generell auf Saccharose basierende Dichtegradienten gefahren, in denen die Lysate in 40% Saccharose vorlagen und mit einer 30%- und einer 5% Saccharosephase überschichtet wurden. Nach der Zentrifugation befinden sich die unlöslichen Membranbestandteile zwischen der 5% und der 30%igen Saccharosephase, was nach Aliquotierung der Gradienten jeweils den Fraktionen 2-4 entspricht. Ausgehend von den Befunden, daß CD44 sowohl auf aktivierten T Zellen (Föger et al., 2001) als auch in Fibroblasten (Neame and Isacke, 1993; Perschl et al., 1995) in TX-100 unlöslichen Membrandomänen zu finden ist, wurde dies auch für die BSP73ASML Zellen überprüft.

### **3.6.1 DIE CD44 ENTHALTENDEN PROTEINKOMPLEXE SIND NICHT IN TX-100 RESISTENTEN MEMBRANDOMÄNEN LOKALISIERT**

Die Lokalisation der CD44-D5.7A-Tetraspanin Komplexe innerhalb der Membran der BSp73ASML Zellen ist für weiterführende funktionelle Betrachtungen im speziellen im Hinblick auf die Signaltransduktion von Bedeutung. Um die für uns interessanten Proteine auf ihre Lokalisation in der Membran hin beschreiben zu können, wurden gleichzeitig Kontrollproteine analysiert, deren Lokalisation innerhalb oder außerhalb von „Lipid Rafts“ dokumentiert ist. Dieses waren CD71 (Transferrinrezeptor), ein nicht in „Lipid Rafts“ lokalisiertes Molekül, Caveolin, ein 21kD Molekül, das in hoher Stöchiometrie an Cholesterin bindet, und C4.4A, ein zur Familie der GPI-verankerten Proteine gehörendes Molekül. Letztere sind bekannt für ihre Lokalisation innerhalb von TX-100 unlöslichen „Lipid Rafts“ (Simons and Toomre, 2000). Aus diesem Grund wurden zunächst Dichtegradientenzentrifugationen unter TX-100 Bedingungen durchgeführt (Abb. 11), die klar zeigen, daß die von uns untersuchten Moleküle nicht in TX-100 unlöslichen Membrankompartimenten vorliegen. CD44v, D5.7A, D6.1A und CD9 sind nach Zelllyse mit TX-100 ebenso wie der Transferrinrezeptor weitestgehend in den schweren Fraktionen, d.h. Fraktionen höherer Dichte, zu finden. Das zeigt ihre TX-100 Löslichkeit und schließt somit eine Lokalisation in dieser speziellen Klasse von „Lipid Rafts“ aus. Im Gegensatz dazu kann das C4.4A, wie für ein GPI-verankertes Protein zu erwarten, in den leichten, TX-100 unlöslichen Fraktionen gefunden werden. Die Auftrennung C4.4A enthaltender Membranpartikel in der Dichtegradientenzentrifugation zeigt aber auch die Grenzen dieser Separationsmethodik auf. Obwohl GPI-verankerte Moleküle ausschließlich in TX-100 unlöslichen

Domänen der Membran vorliegen und deshalb in den leichten Fraktionen zu finden sein sollten, ist ein nicht unbeträchtlicher Anteil des Proteins in den schweren Fraktionen verblieben.



**Abb. 11: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unter TX-100 Bedingungen**

BSp73ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert, in 1% TX-100 lysiert, 800 µl des Lysats mit 800 µl 80% Saccharoselösung gemischt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert. Anschließend wurde mit 1,6 ml 30% Saccharoselösung und 800 µl 5% Saccharoselösung überschichtet und 16 h bei 200.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden von oben beginnend Fraktionen je 300 µl entnommen. Aliquots der Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und per Western Blot die jeweiligen Proteine detektiert (linke Hälfte). Die Gesamtheit der biotinylierten Oberflächenproteine wurde mittels Extravidin-POD Komplexen nachgewiesen (rechte Hälfte).

Wie man anhand der Kontrollfärbung erkennt, bei der alle Proteine anhand der vorangegangenen Biotinylierung detektiert wurden, ist die überwiegende Mehrzahl der Proteine einer Zellmembran TX-100 löslich, und somit nicht „Triton-Raft“ assoziiert.

### 3.6.2 CD44, D5.7A, D6.1A UND CD9 LIEGEN IN CHOLESTERIN ABHÄNGIGEN LUBROL „LIPID RAFTS“ VOR

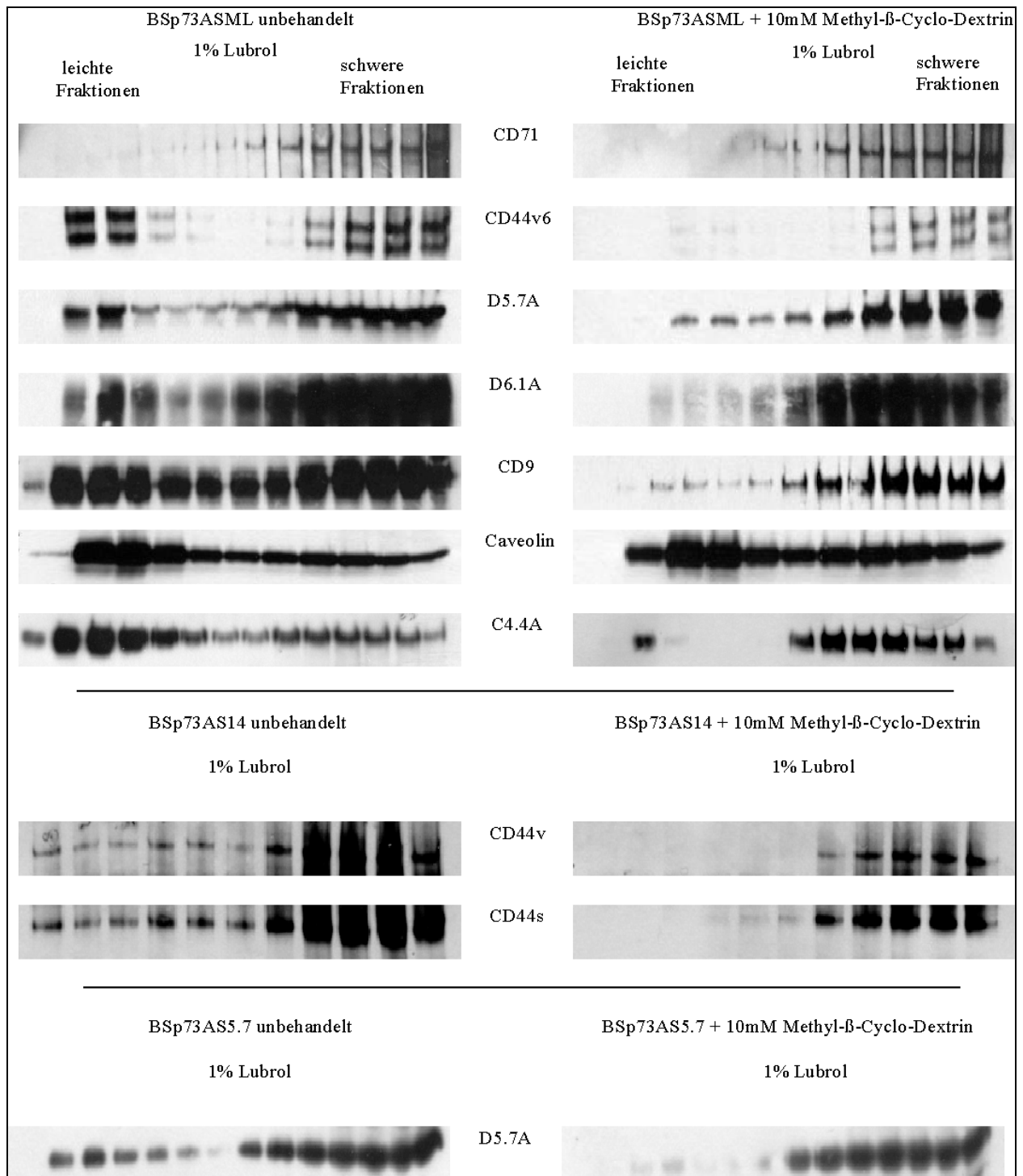
Wie eingangs erwähnt, sind „Lipid Rafts“ Subdomänen der Membran, die sich durch eine spezielle Komposition ihrer Bestandteile auszeichnen. Daraus resultiert eine Unlöslichkeit in nichtionischen Detergentien bei 4°C, deren erste Beschreibung und Definition über die Unlöslichkeit in TX-100, erfolgte (Simons and Ikonen, 1997). In jüngster Zeit wurden Membransubdomänen unter Zuhilfenahme anderer nichtionischer Detergentien beschrieben, die sich von den TX-100 Membransubdomänen unterscheiden (Röper et

al., 2000). Von der Tatsache ausgehend, daß auch die Interaktionen zwischen CD44v und anderen Proteinen unter den eben milderen Detergenzbedingungen – im speziellen Lubrol – zu beobachten sind, wurden folglich auch die Untersuchungen zur Lokalisation innerhalb spezieller Membrandomänen unter identischen Detergenzbedingungen betrieben (Abb. 12). Nach Lyse in 1% Lubrol und Ultrazentrifugation werden die mit dem varianten CD44 assoziierten Moleküle CD9, D5.7A und D6.1A zu großen Teilen in den leichten Fraktionen gefunden. Die Tatsache, daß typische Nicht-Raft-Marker wie der Transferrinrezeptor in den schweren, also Lubrol löslichen, Fraktionen verbleibt, und Proteine, die typischerweise in unlöslichen Membrandomänen lokalisiert sind, wie C4.4A und Caveolin, in den leichten Fraktionen zu finden sind, erlaubt es an dieser Stelle die Definition sogenannter „Lubrol Lipid Rafts“ einzuführen.

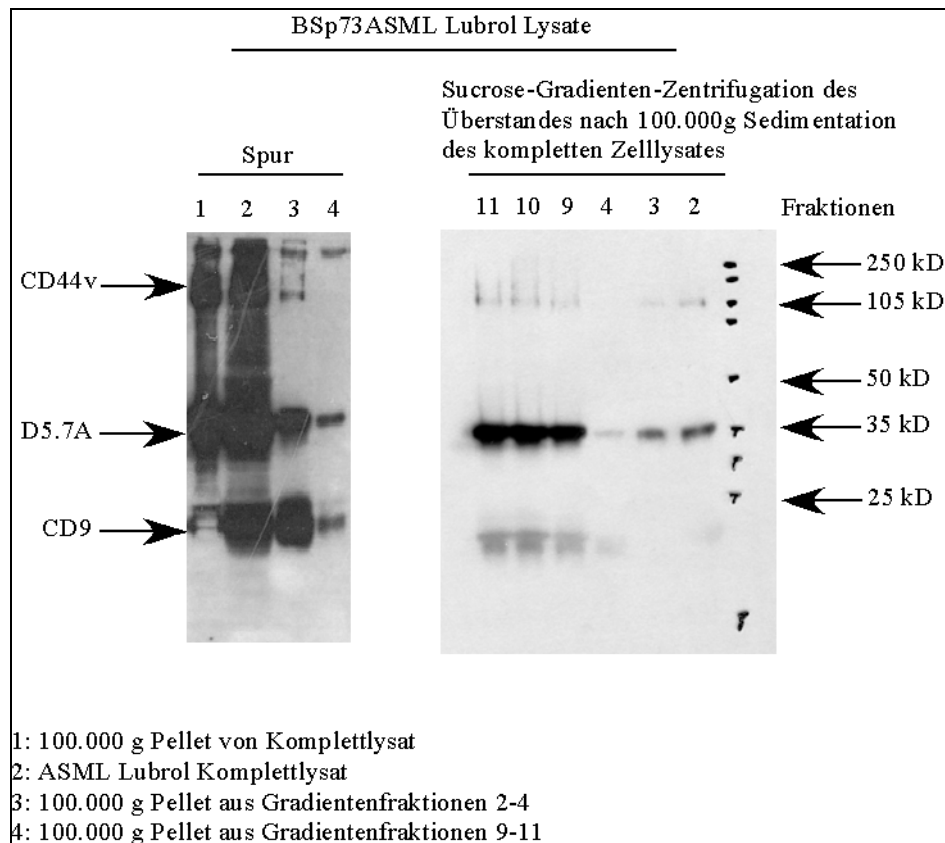
Cholesterin interkaliert zwischen den Fettsäureketten der Membranlipide, verringert dadurch die Fluidität der Membran und stabilisiert die Lipid-Lipid-Wechselwirkungen. Wesentliches Kriterium der „Lubrol-Rafts“ ist die Cholesterinabhängigkeit, d.h. nach Entzug des Cholesterins aus der Zellmembran durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin sind die Raftstrukturen und Eigenschaften nicht länger existent, und die in ihnen zuvor lokalisierten Proteine nicht mehr in den leichten Fraktionen einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zu finden. Filipin, ein anderes, innerhalb der Zellmembran das Cholesterin komplexierendes Agents, hat den selben Effekt auf die Lokalisation der Proteine (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist das Verhalten von Caveolin, welches selbst nach Cholesterindepletion der Membran nicht in den schweren Fraktionen zu finden ist. Typischerweise werden mit einer Cyclodextrinbehandlung der Zellen in etwa 40-60% des Gesamtcholesterins entfernt (Claas et al., 2001; Olfierenko et al., 1999), was offensichtlich nicht ausreicht, um die Lipidinteraktionen der Caveolin enthaltenden Subdomänen zu zerstören. Dies ist ein weiterer Beleg für die Unterschiedlichkeit der TX-100- oder Lubrol-unlöslichen „Lipid Rafts“, und konnte auch für die GPI-verankerte plazentale alkalische Phosphatase (PLAP) unter Lubrol Lysis Bedingungen gezeigt werden (Röper et al., 2000). Zu beachten ist ferner, daß in BSp73AS14 die Standardisoform des CD44 sowie in BSp73AS5.7 das D5.7A ebenfalls in den leichten Fraktionen der Lubrol Gradienten zu finden ist, wenngleich die Menge an Protein im Vergleich zu den BSp73ASML geringer zu sein scheint.

**Abb. 12: Lokalisation von CD44, D5.7A und CD9 in den leichten Fraktionen von Lubrol Gradienten ist Cholesterin-abhängig**

BSp73AS14, AS5.7 und ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert, in 1% Lubrol lysiert und 800  $\mu$ l des Lysats mit 800  $\mu$ l 80% Saccharoselösung gemischt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert. Anschließend wurde mit 1,6 ml 30% Saccharoselösung und 800  $\mu$ l 5% Saccharoselösung überschichtet und ÜN bei 200.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden von oben beginnend Fraktionen je 300  $\mu$ l entnommen. Aliquots der Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und per Western Blot die jeweiligen Proteine detektiert (linke Hälfte). BSp73ASML Zellen wurden vor der Biotinylierung für 30min im Brutschrank mit 10mM M $\beta$ CD behandelt (rechte Hälfte).



Eine weitere Möglichkeit zwischen „Raft“ und „Nicht-Raft“ Regionen zu unterscheiden ist die Zentrifugation eines Lysates bei 100.000g. Sie führt zur Sedimentation inkomplett lysierter Membranfraktionen und damit der „Rafts“, wohingegen die Detergenz-gelösten Bestandteile im Überstand verbleiben. Die Kombination der beiden Methoden (100.000g Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation) ist in Abb. 13 zu sehen.



**Abb. 13: 100.000 g Sedimentation der Lubrol unlöslichen Membrandomänen**

BSp73ASML Zellen wurden oberflächenbiotinyliert, in 1% Lubrol lysiert und das Lysat durch Zentrifugation bei 17.000g von Kernen und unlöslichen Bestandteilen getrennt. Dieser Überstand (Spur 2, linke Hälfte) wurde teils einer Dichtegradientenzentrifugation bei 200.000g, ÜN unterzogen, dessen Fraktionen 2-4 und 9-11 vereinigt, auf <5% Saccharose verdünnt und nochmalig bei 100.000g für 1h zentrifugiert. Die Pellets dieser Zentrifugation sind in Spur 3 und 4 (linke Hälfte) aufgetragen. Der andere Teil des Primärlysates wurde direkt bei 100.000g für 1h zentrifugiert. Das Pellet ist in Spur 1 (linke Hälfte) zu sehen, der Überstand hingegen wurde einer Dichtegradientenzentrifugation bei 200.000g ÜN unterzogen. Die Fraktionen 2-4 und 9-11 sind in der rechten Hälfte zu sehen. Die Proteine wurden nach SDS-PAGE und Blot auf eine PVDF-Membran mittels der mAK A2.6, D5.7 und B2C11 nachgewiesen.

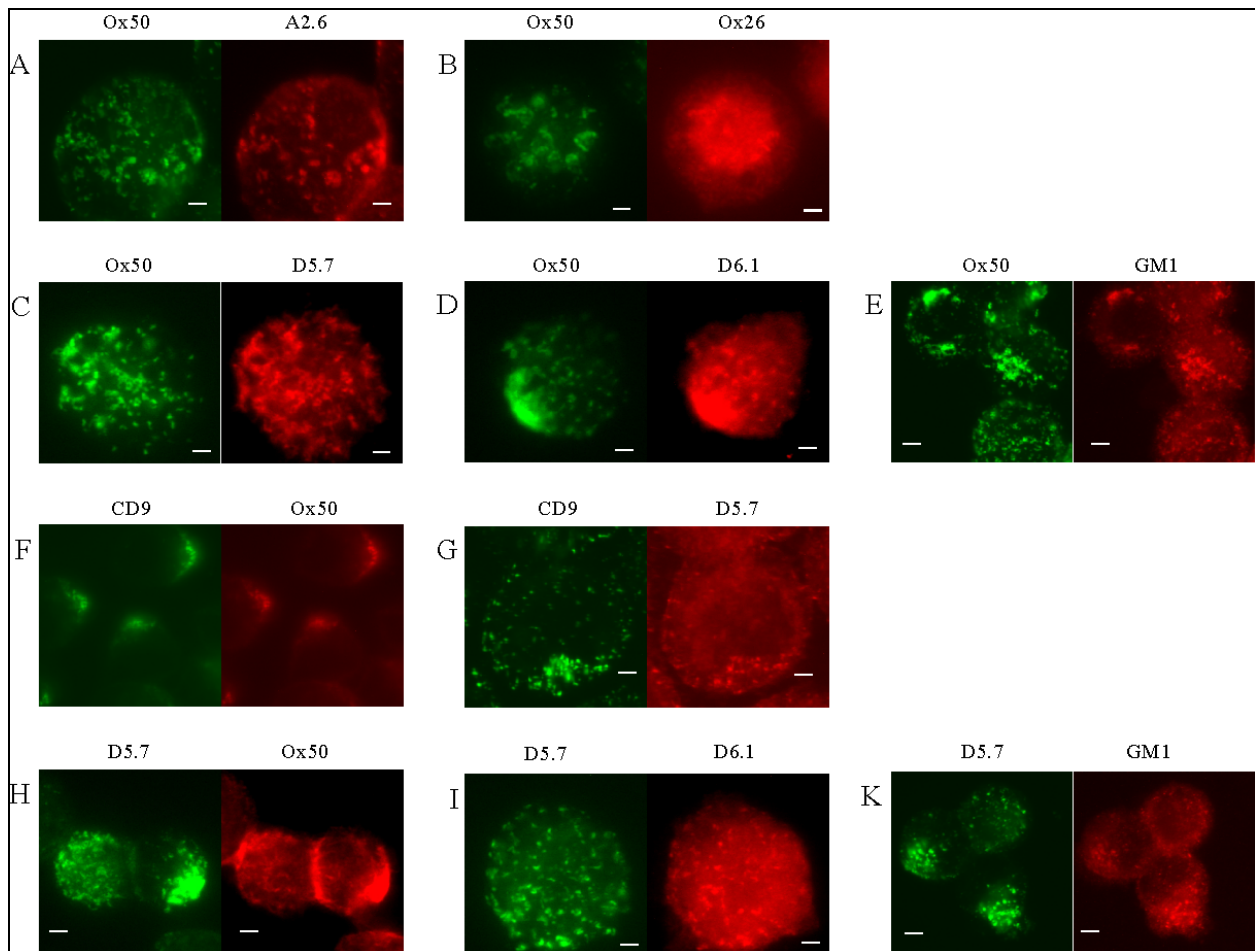
Wie zu erkennen (Spur1+2, linkes Gel) ist die überwiegende Menge der CD44, CD9 und D5.7A durch Zentrifugation bei 100.000g zu sedimentieren, was ihre Lokalisation in Lubrol-Rafts dokumentiert. Dasselbe gilt für den Fall, daß nach Dichtegradientenzentrifugation schwere und leichte Fraktionen nochmals einer Sedimentation bei 100.000g unterzogen werden, obgleich der Anteil sedimentierbarer Proteine in den schweren Fraktionen (Spur 4 linkes Gel) deutlich geringer ist, als in den leichten Fraktionen (Spur3, linkes Gel). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Röper et al., die ebenfalls inkomplett solubisiertes Protein in den schweren Fraktionen eines Gradienten finden konnten (Röper et al., 2000). Unterzieht man den Überstand einer 100.000g Sedimentation kompletten Zelllysates einer weiteren Dichtegradientenzentrifugation (rechtes Gel), können im wesentlichen nur noch Detergenz-lösliche Proteine, also Proteine in den schweren Fraktionen, gefunden werden. Die Kombination der beiden Methoden zeigt deutlich, daß CD44, CD9 und D5.7A in Lubrol unlöslichen Membransubdomänen vorliegt, aber ausgenommen eines kleinen Anteils CD9 und D6.1A nicht in TX-100 unlöslichen Subdomänen.



### 3.7 CD44, D5.7A UND CD9 KOLOKALISIEREN IN DER MEMBRAN VON BSp73ASML SELBST NACH ENTZUG DES CHOLESTERIN

Proteine können innerhalb der Zellmembran, indem sie über Primär- und Sekundärantikörper kreuzvernetzt werden, an bestimmten Stellen akkumuliert werden. Diesen Prozeß bezeichnet man als „Clustering“ oder „Patching“. Je nach Dauer der Kreuzvernetzung endet dies in einem Zustand, bei dem alle Moleküle gegen die der Primärantikörper gerichtet ist, in einer Region der Zelloberfläche zusammengefaßt sind, was als „Capping“ bezeichnet wird. Wird eine für ein bestimmtes Protein „gepatchte“ oder „gecappede“ Zelle mit Paraformaldehyd fixiert, um weitere Molekülbewegungen in der Zellmembran zu verhindern, kann man mittels weiterer Antikörper nachweisen, ob in den Anhäufungen eines bestimmten Proteins andere, sog. kolokalisierende Proteine zu finden sind. Verwendet man zur Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper, so kann man die kolokalisierenden Proteine fluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Abb. 14). Die Kolokalisationsassays wurden durchgeführt, um mit einer zweiten, unabhängigen Methode die „Raft“-Assoziation der beschriebenen Proteinkomplexe zu zeigen.

Abb.14A zeigt das Patchen (CD44s) und Gegenfärben (CD44v6) anhand ein und desselben Moleküls und liefert somit die maximale Trennschärfe des Assays unter den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten. Prinzipiell ist darauf hinzuweisen, daß es sich nicht um eine konfokale Mikroskopie handelt, und somit nicht eine distinkte Ebene der gefärbten Zellen sichtbar gemacht werden kann. Dieses führt je nach Färbungsintensität zu den im roten Kanal zu beobachtenden Schleiern, welches gefärbte Membranbereiche sind, die allerdings außerhalb des eingestellten Focus der Kamera liegen. In Abb. 14B wurde nach Patching des CD44 der Transferrinrezeptor gegengefärbt. Hier erkennt man, daß der überwiegende Anteil des CD71 gleichmäßig über die gesamte Zellmembran verteilt ist, also nicht kolokalisiert, wenngleich zu beobachten ist, daß in den CD44 „patches“ auch eine erhöhte Signalintensität für CD71 zu erkennen ist. Dies könnte bedeuten, daß neben den „Raft“ Formationen, in denen das CD44 lokalisiert ist, auch an die „Rafts“ angrenzende Bereiche mit kreuzvernetzt werden. In den Abb.14 C,D,F,G,H,I ist klar zu erkennen, daß die zuvor als kopräzipitierend beschriebenen Moleküle CD44, CD9, D6.1A und D5.7A in der Tat auch innerhalb der Membran der BSp73ASML Zellen kolokalisieren.



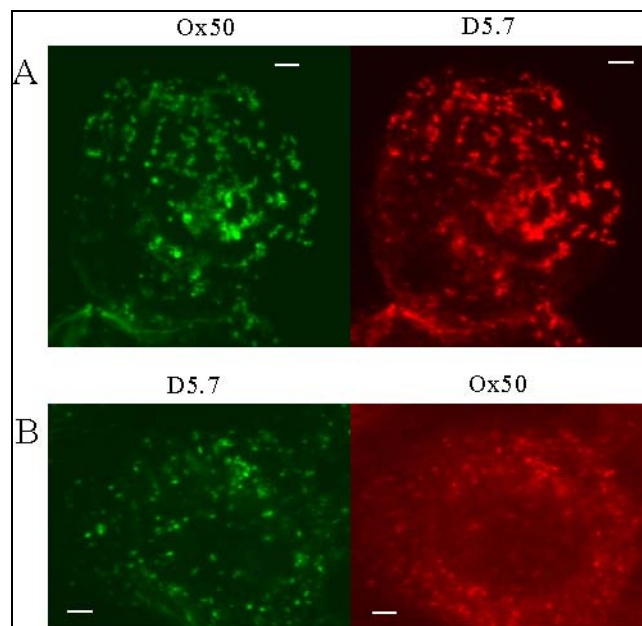
**Abb. 14: Kolokalisation verschiedener Proteine in der Membran von BSp73ASML**

Oberflächenproteine der BSp73ASML wurden mit den indizierten Antikörpern markiert und mittels eines Cy2-konjugierten Sekundärantikörpers (grüne Färbung) für 30 min bei 37°C kreuzvernetzt. Nach Fixierung durch 4% Paraformaldehyd wurde jeweils ein weiteres Oberflächenprotein mittels eines TexasRed-konjugierten Antikörpers, oder im Falle des GM1 mittels biotinylierter Cholera-toxin-Untereinheit B und TexasRed-konjugiertem Streptavidin, nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop DMBRE der Firma Leica, das mit einer SPOT CCD Kamera und SPOT2.1.2 Software ausgerüstet ist.

Auffällig ist allerdings der Befund, daß, wenngleich selbige Moleküle nicht in den TX-100 unlöslichen Subdomänen lokalisiert sind, wie die Dichtegradientenzentrifugation zeigt, sie dennoch mit eben diesen Subdomänen kolokalisieren, wie Färbungen gegen das GM1, eines typischen Triton-Raft Markers, (Abb.14 E,K) zeigen. Zusammengenommen mit der Tatsache, daß die Proteine der unterschiedlichen rafts auch nicht kopräzipitieren, führt dies zu der möglichen Annahme, daß die Lubrol resistenten Domänen der Zellmembran um die TX-100 unlöslichen Domänen herum organisiert sind, und letztere aufgrund dessen in „Patches“ und „Caps“ mit eingeschlossen werden. Denkbar ist auch die Vorstellung, daß es sich nicht um zwei voneinander trennbare Domänen der Membran handelt, sondern lediglich um in ihrer molekularen Architektur bezüglich des Gehalts an Cholesterin oder Sphingolipiden unterscheidbare Anteile einer Subdomäne der Zellmembran. Weitere Färbungen zeigen, daß auch das C4.4A in durch

CD44-Kreuzvernetzung entstandenen caps zu finden ist (Daten nicht gezeigt), was den Befund der Abb. 14 E,K nachhaltig bestärkt.

Die Tatsache, daß Cholesterindepletion die Auflösung der Lubrol unlöslichen Domänen zur Folge hat, sollte ebenfalls durch patching Experimente gezeigt werden. Das Auflösen der Subdomänen einer Membran hat in dieser Hinsicht zur Folge, daß die Patches kleiner werden und ebenmäßiger über die Membran der Zellen verteilt sind (Oliferenko et al., 1999). Gesetzt den Fall, daß die Interaktion der Proteine, wie sie durch Kopräzipitationen gezeigt wurde, die gemeinsame Lokalisation innerhalb von Membransubdomänen zur Voraussetzung hat, würde eine Kolokalisation nach Cholesterinentzug unmöglich werden lassen. Erstaunlicherweise ergaben Färbungen der BSp73ASML Zellen nach Cholesterinentzug aber den Befund, daß CD9, D5.7A und CD44 nach wie vor in „Membranpatches“ kolokalisierten (Abb. 15). Dies zeigt, daß die hier beschriebenen Proteinkomplexe unabhängig von den Beschaffenheiten der Membran miteinander interagieren, und somit eine funktionelle Einheit darstellen, die unter normalen Bedingungen in Lubrol resistenten Rafts angesiedelt sind. Zumindest kann aber eine cholesterinabhängige Lipid-Protein-Interaktion als Grundlage für die beschriebenen Proteinkomplexe ausgeschlossen werden.

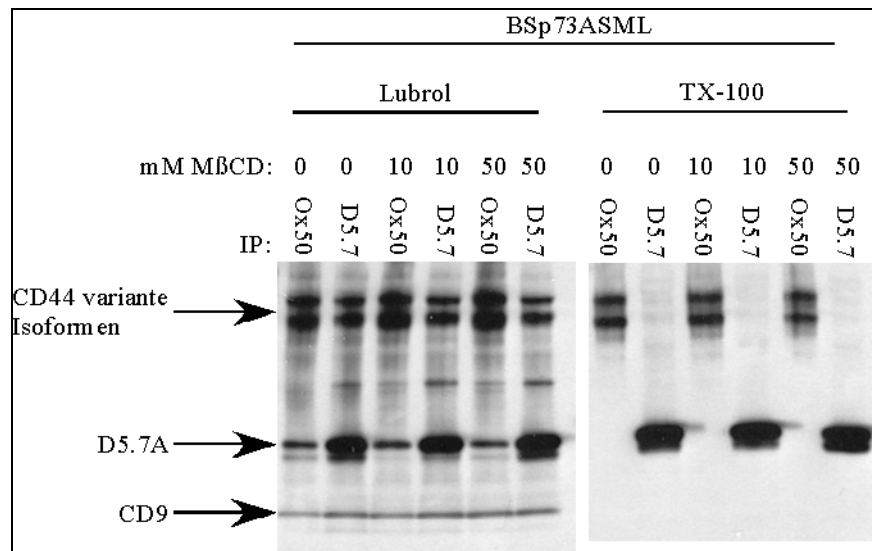


**Abb. 15: Kolokalisation von CD44 und D5.7A in der Membran von BSp73ASML nach Cholesterinentzug durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin**

Oberflächenproteine der BSp73ASML Zellen wurden mit den indizierten Antikörpern markiert und mittels eines Cy2-konjugierten Sekundärantikörpers (grüne Färbung) für 30 min bei 37°C kreuzvernetzt. Nach Fixierung durch 4% Paraformaldehyd wurde jeweils ein weiteres Oberflächenprotein mittels eines TexasRed-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop DMBRE der Firma Leica, das mit einer SPOT CCD Kamera und SPOT2.1.2 Software ausgerüstet ist.

Der Befund, daß die Interaktionen von variantem CD44 und D5.7A auch durch den Entzug des Cholesterins aus der Membran nicht zu zerstören sind, wurde ebenfalls in Kopräzipitationsanalysen nachgewiesen (Abb.16). Wie man erkennen kann, wird die Komposition der Komplexe durch Behandlung der Zellen

mit bis zu 50mM M $\beta$ CD nicht beeinträchtigt. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß auch eine Behandlung mit Saponin die Proteinkomplexe nicht auflöst (Daten nicht gezeigt).



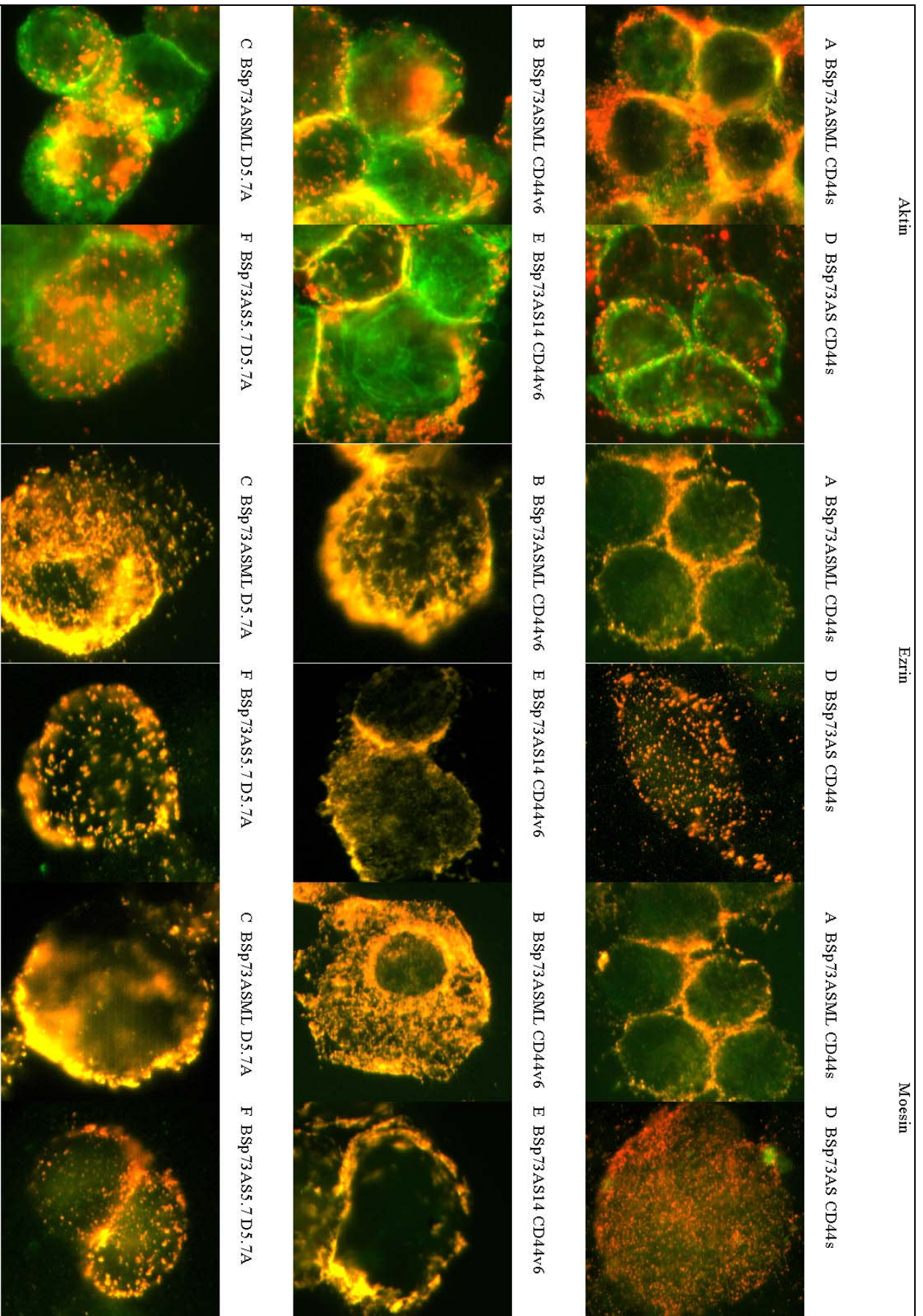
**Abb. 16: Kopräzipitation von CD44v, CD9 und D5.7A nach M $\beta$ CD Behandlung von BSp73ASML**

BSp73ASML Zellen wurden für 30min bei 37°C mit den angegebenen Mengen M $\beta$ CD behandelt, oberflächenbiotinyliert, lysiert und eine IP mit den angegebenen mAK durchgeführt. Nach Auftrennung in einer SDS-PAGE und Blot auf eine PVDF Membran wurden die Proteine mit Extravidin-POD und ECL gefärbt.

### 3.8 ZYTOSKELETTVERANKERUNG VON CD44 UND D5.7A

Von entscheidender Bedeutung für migratorische Prozesse der Zellen ist die Anknüpfung an das Zytoskelett. Es ist bekannt, daß CD44 über Adaptormoleküle der ERM-Familie mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sein kann. Aus diesem Grund wurde nach Antikörperkreuzvernetzung die Kolokalisation von CD44s, CD44v und D5.7A mit Aktin, Ezrin und Moesin in den BSp73AS, -AS14, -AS5.7 und -ASML analysiert (Abb.17). Zusammenfassend kann man sagen, daß die varianten Isoformen sowohl in den BSp73AS14 (Abb.17,E), als auch in den BSp73ASML (Abb.17,A-C) mit Aktin und den Adaptorproteinen Ezrin und Moesin kolokalisieren. Im Gegensatz dazu ist die Kolokalisation der CD44 Standard Isoform mit Aktin und den Adaptorproteinen deutlich reduziert. Das D5.7A zeigt in den Einzeltransfektanden BSp73AS5.7 (Abb.17,F) praktisch keine Kolokalisation mit Aktin und Moesin, aber dennoch kann eine schwache Kolokalisation mit Ezrin nachgewiesen werden. Folglich erscheint die starke Kolokalisation des D5.7A in den BSp73ASML Zellen mit Aktin, Ezrin und Moesin ein „passiver“ Prozeß zu sein, in dem die varianten Isoformen des CD44 die treibende Kraft sind, und in den D5.7A über die Assoziation mit CD44v mit hinein genommen wird.





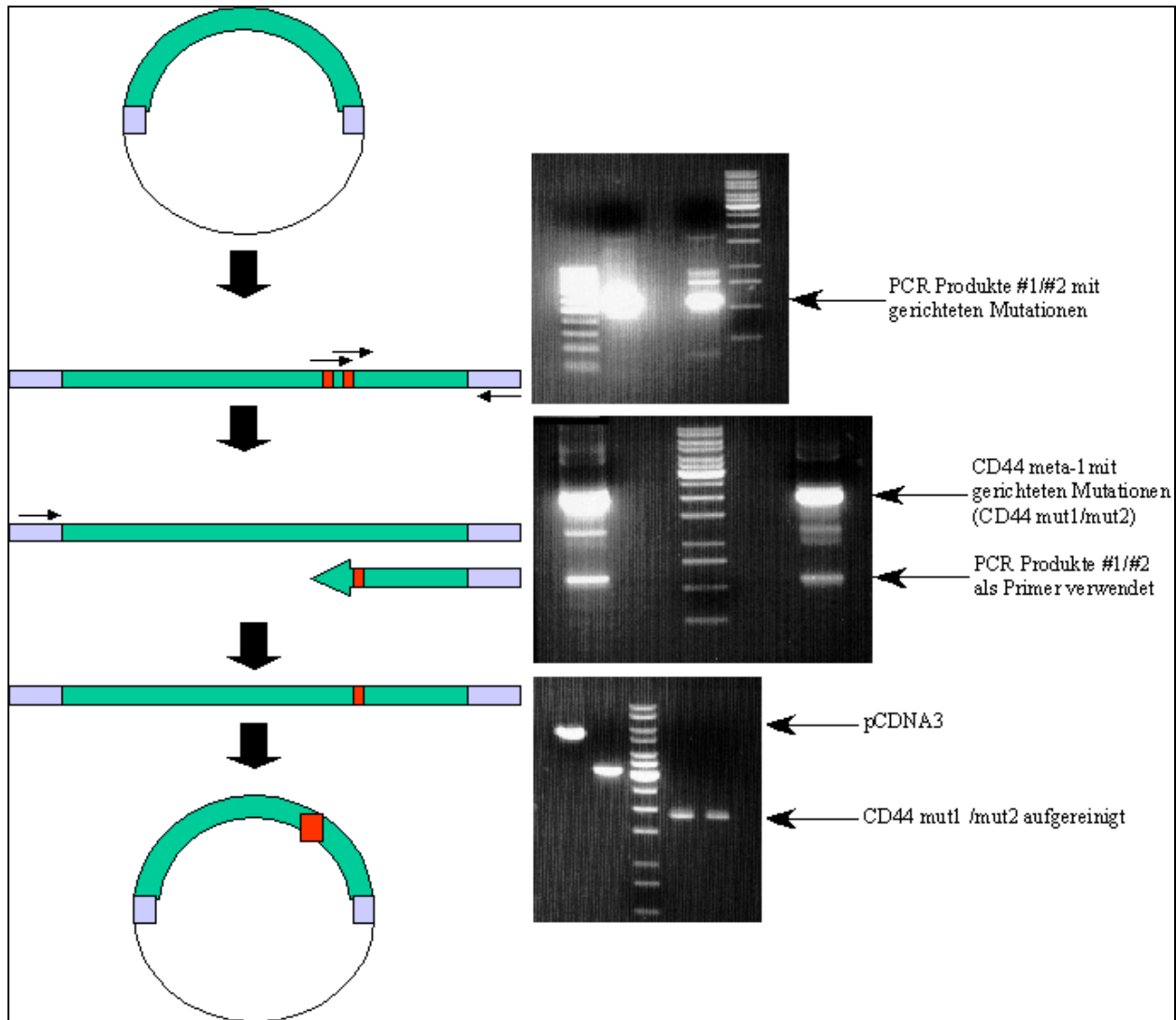
**Abb. 17: Kolokalisation von CD44 und D5.7A mit Aktin, Ezrin und Moesin in verschiedenen BSp73 Zelllinien**

Die Oberflächenproteine CD44s, CD44v6 oder D5.7A wurden mittels der entsprechenden mAK auf den angegebenen Zellen markiert und für 30 min bei 37°C mit einem Rhodamin-markierten Sekundärantikörper kreuzvernetzt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die intrazellulären Proteine Ezrin und Moesin durch Primär- und FITC-markierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Aktin wurde mit Phalloidin-FITC gefärbt. Auswertung und Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie.

### 3.9 PALMITOYLIERUNG

Die Eigenschaft von Proteinen in Detergenz unlöslichen Membrandomänen lokalisiert zu sein, erfordert spezielle Merkmale oder Modifikationen der Proteine. Zu diesen gehören die GPI-Anker, wie im Falle des C4.4, oder spezielle Acylierungen, wie sie bspw. bei src-Kinasen zu finden sind (Simons and Toomre, 2000). Palmitoylierungen sind Modifikationen der Proteine, bei denen innerhalb der Transmembrandomäne oder in membranproximalen Regionen Palmitinsäure, eine gesättigte C16 Fettsäure, per Thioesterbindung an Cysteinreste der Proteine angehängt wird. Das CD44 Molekül bietet prinzipiell 2 potentielle Palmitoylierungsstellen, das Cys 286, welches innerhalb der Transmembrandomäne nahe des Cytoplasmas lokalisiert ist, und das Cys 295, das membranproximal im cytoplasmatischen Teil des CD44 zu finden ist. Um zu klären, ob CD44 palmitoyliert ist, und ob dies der Grund für die Lokalisation der Komplexe in den Lubrol Rafts ist, wurden per gerichteter Mutation 3 Varianten der CD44 meta-1 cDNA erstellt, bei denen die Cysteine einzeln oder gemeinsam gegen Alanine ausgetauscht wurden (Abb. 18). Anschließend wurden die mutierten Proteine in CHO-K1 Zellen exprimiert und sowohl in Dichtegradientenzentrifugation als auch Palmitoylierungsassays die Lokalisation und der Grad der Palmitoylierung der unterschiedlichen Mutanten analysiert.

Die Klonierung der mutierten DNAs erfolgte ausgehend von der cDNA kodierend für das CD44 meta-1 Molekül. Durch spezielle Primer wurden die Sequenzen, die für die beiden Cysteine kodieren in Sequenzen, die für Alanine kodieren, ersetzt. Nach einer ersten PCR wurden die PCR Produkte ihrerseits als Primer für eine zweite PCR verwendet, in der das CD44 meta-1 vervollständigt wurde. Diese PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in den pCDNA3 Vektor zurückkloniert.



**Abb. 18: Generierung palmitoylierungsdefizienter Mutanten des CD44 meta-1 durch gerichtete Mutation der CD44 meta-1 cDNA**

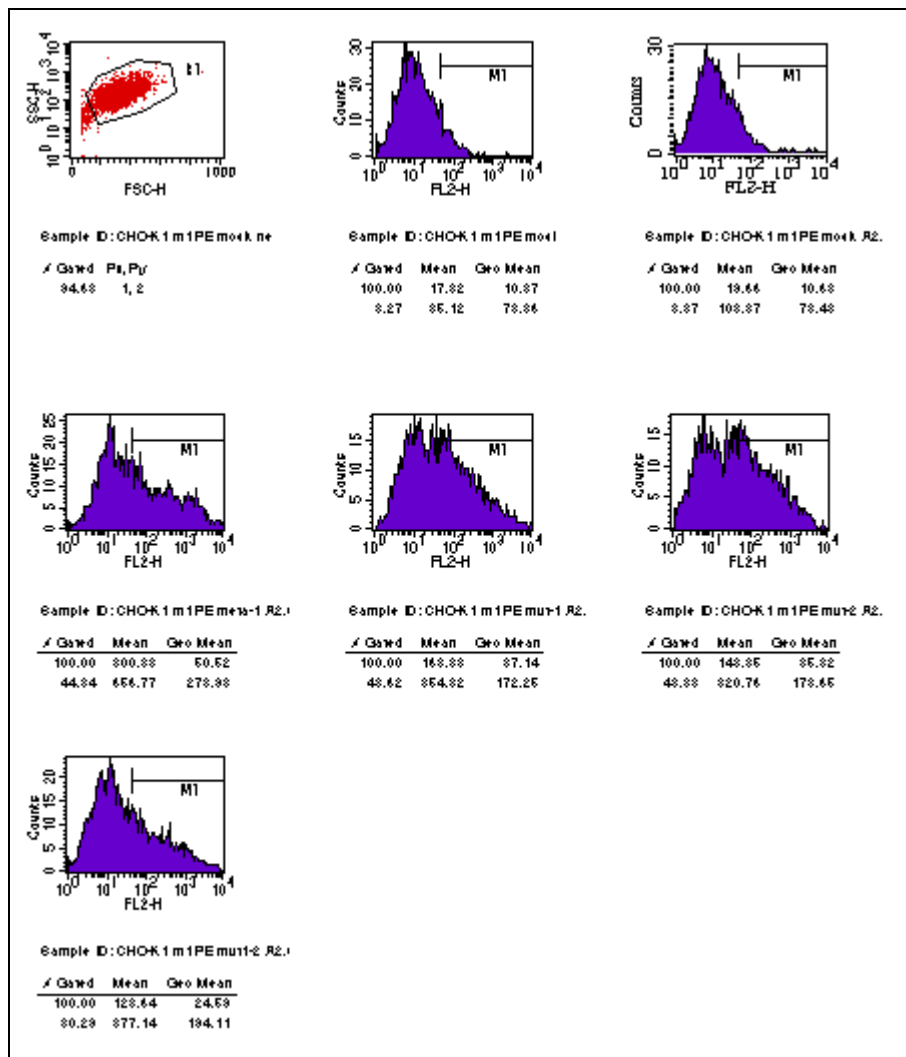
Mittels PCR wurden in der für CD44 meta-1 kodierenden cDNA die Sequenzen der Cysteine 286/295 gegen Alanine ausgetauscht. In einer ersten PCR mit Primern, die die mutierte Sequenz enthalten, und Primern die der BGH Sequenz (am 3' Ende des CD44 meta-1 innerhalb des pCDNA3 Vektors) entsprechen, wurde ein PCR Fragment erzeugt (dokumentiert im oberen Gel), das nach Aufreinigung nun selbst als Primer für eine zweite PCR mit Primern des T7 Promotors (am 5' Ende des CD44 meta-1 innerhalb des pCDNA3 Vektors) eingesetzt wurde (dokumentiert im mittleren Gel). Nach Aufreinigung und Restriktionsverdau wurden die neu generierten, mutierten DNAs wieder in den pCDNA3 Vektor kloniert. Die Cys-Ala 295 Mutante wurde in einem zweiten, identischen Durchgang verwendet, um die Doppelmutante herzustellen. Schließlich wurden die mutierten cDNAs sequenziert und für Transfektionen der CHO-K1 Zellen verwendet.

Grüne Boxen: cDNA des CD44 meta-1 Gens; rote Boxen: mutierte DNA-Sequenzen; blaue Boxen: T7 und BGH Sequenzen des pCDNA3 Vektors; kleine schwarze Pfeile: Lage der verwendeten Primer

Somit standen neben der nicht mutierten CD44 meta-1 cDNA nun die cDNAs für 3 Mutanten zur Verfügung: CD44 mut-1 (Cystein 286 gegen Alanin ausgetauscht), CD44 mut-2 (Cystein 295 gegen Alanin ausgetauscht) und CD44 mut1/2 (beide Cysteine ausgetauscht).

### 3.9.1 EXPRESSION DER MUTIERTEN CD44 META-1 MOLEKÜLE IN CHO-K1 ZELLEN

Die verschiedenen cDNAs wurden durch das Transfektionsagents Polyfect in CHO-K1 Zellen eingebracht und die exprimierenden Zellen durch Selektion mit 1mg G418/ml Medium angereichert. Im weiteren Verlauf wurden einzelne, stark exprimierende Klone durch limitierende Verdünnung gewonnen. Die Expressionsstärke einzelner Klone (Daten nicht gezeigt) sowie der Gesamtpopulation (Abb. 19) wurde durch FACS Analysen ermittelt.



**Abb. 19: Expressionsprofil transfizierter CHO-K1 Zellen**

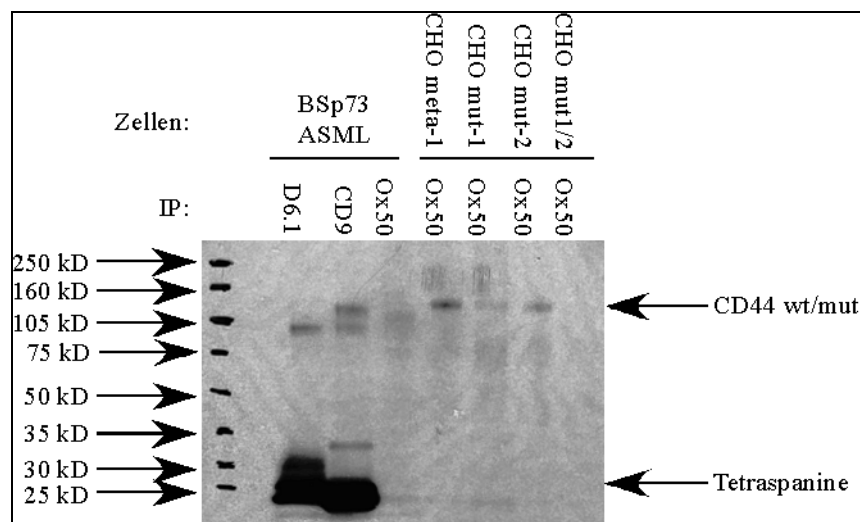
4x10<sup>5</sup> CHO-K1 Zellen wurden mit 1,5 µg pCDNA3 (mock), pCDNA3meta-1 (CD44 meta-1), pCDNA3mut-1 (CD44 mut-1), pCDNA3mut-2 (CD44 mut-2) und pCDNA3mut1/2 (CD44 mut1/2) transfiziert und durch Zugabe von 1mg G418/ml Medium selektiert. Die Expressionsstärke der verschiedenen Mutanten des CD44 meta-1 wurde mittels FACS-Analyse vorgenommen. Hierzu wurden 10<sup>5</sup> CHO-K1 Zellen mit dem mAκ A2.6 und PE-konjugiertem Zweitantikörper gefärbt. Die Messung der Zellen erfolgte am FACSCalibur. Ausgewertet wurden die Daten mittels der CellQuest Software.



Da die Expressionstärke der unterschiedlich transfizierten Gesamtkulturen in Prozentualität und mittlerer Intensität besser vergleichbar war als die spezieller Einzelklone, wurden die Dichtegradientenzentrifugation und Palmitoylierungsassays mit den nicht subklonierten Zellen durchgeführt.

### 3.9.2 PALMITOYLIERUNG DER VERSCHIEDENEN CD44 META-1 MUTANTEN UND EINFLUSS DER PALMITOYLIERUNG AUF DIE MEMBRANLOKALISATION

In einem Palmitoylierungsassay wird die Anheftung von Palmitat (C16 gesättigte Fettsäure) durch Thioesterbildung an Cysteine überprüft. Zum Nachweis der Palmitoylierung wird <sup>3</sup>H-markiertes Palmitat verwendet, welches durch Zugabe einer Szintillatorflüssigkeit schließlich auf Röntgenfilmen nachgewiesen werden kann. Da einerseits eine transfizierte Zelllinie nicht notwendigerweise dieselben Palmitoylierungseigenschaften aufweisen muß wie BSp73ASML Zellen, andererseits über die Palmitoylierung des CD44 in BSp73ASML noch keine genauen Aussagen vorliegen, wurden neben den CHO-K1 Transfektanden auch die Palmitoylierung von CD44, CD9 und D6.1A der BSp73ASML Zellen untersucht. CD9 und D6.1A dienten als Kontrollen, da Tetraspanine bekanntermaßen in hohem Maße palmitoyliert sind (Charrin et al., 2002; Yang et al., 2002). Um eine effiziente Palmitoylierung der Proteine zu erreichen, wurden die Zellen vor Zugabe des radioaktiven Palmitats 4 Stunden serumfrei kultiviert. Nach der Palmitoylierungsreaktion wurden die Zellen in 1% TX-100 lysiert und eine Immunopräzipitation mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt (Abb.20).

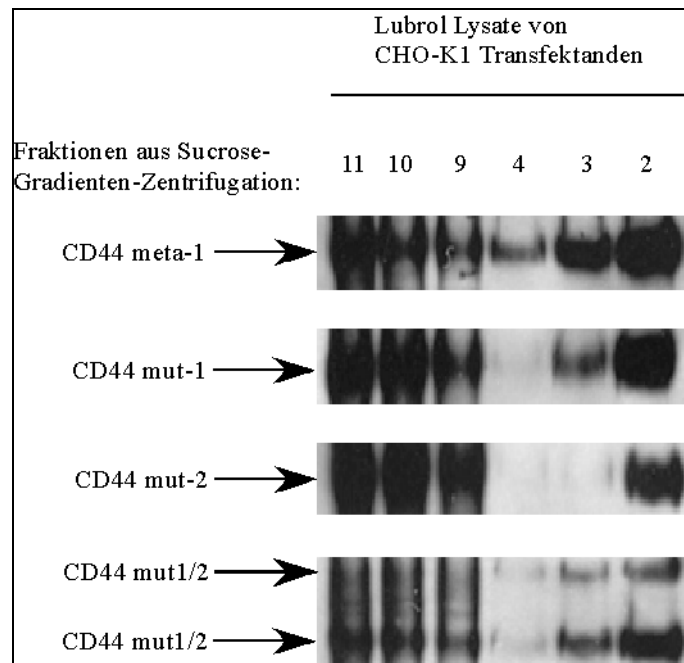


**Abb. 20: Palmitoylierung von CD44 und Tetraspaninen in BSp73ASML und CHO-K1 Transfektanden**

Jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurden für 4h serumfrei und 2h mit  $0,25 \text{ mCi } ^3\text{H}$ -Palmitat/ml Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1% TX-100 lysiert und Immunpräzipitationen mit den angegebenen mAK durchgeführt. Nach SDS-PAGE und Blot auf eine PVDF-Membran wurde diese in Szintillatorflüssigkeit getränkt, getrocknet und für 12 Wochen auf einem Röntgenfilm exponiert.

Auffällig an der Palmitoylierung ist, daß im Vergleich zu den Tetraspaninen CD9 und D6.1A die CD44 varianten Isoformen der BSp73ASML Zellen so gut wie nicht palmitoyliert sind. Dennoch kann man in den CHO-K1 Transfektanden der drei CD44 Mutanten Unterschiede ausmachen. Zunächst ist feststellbar, daß offensichtlich beide Cysteine in den CHO-K1 Zellen palmitoyliert werden, da außer der Doppelmutante CD44 Moleküle ein Signal liefern. Jedoch ist die Palmitoylierung der Cys 286 offensichtlich stärker, da die Mutante-1 (Cys286-Ala) ein nur sehr schwaches Signal im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante-2 aufweist.

Durch Dichtegradientenzentrifugationen sollte nun der Einfluß der unterschiedlichen Palmitoylierungen auf die Lokalisation innerhalb der Membran überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine Dichtegradientenzentrifugation von Lubrol Lysaten der unterschiedlichen Transfektanden durchgeführt und die Verteilung des CD44 analysiert (Abb. 21).



**Abb. 21: Lokalisation verschiedener CD44 meta-1 Mutanten in der Membran transfizierter CHO-K1 Zellen**

CHO-K1 Transfektanden der unterschiedlich mutierten CD44 meta-1 Moleküle wurden in 1% Lubrol lysiert, und die Lysate einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die leichten Fraktionen 2-4 sowie die schweren Fraktionen 9-11 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und CD44meta-1 und CD44 Mutanten mit dem mAK A2.6 detektiert.

Die Western Blot Analyse der mutierten CD44 meta-1 Isoformen in transfizierten CHO-K1 Zellen zeigt, daß die Präsenz der Cysteine 286 und 295 und somit die potentielle Palmitoylierung alleine nicht für die Lokalisation innerhalb der Lubrol Rafts verantwortlich sind. Alle untersuchten Mutanten zeigen eine Verteilung innerhalb der Membran, die dem CD44 meta-1 Wildtyp entspricht, wenngleich die Menge, die sich in leichten oder schweren Fraktionen befindet, variiert. So sind größere Mengen CD44 meta-1 in den Detergenz resistenten Membranbereichen nachweisbar, als es für die Mutanten der Fall ist. Dennoch läßt

sich die (Un-)abhängigkeit der Lokalisation in der Membran von der Palmitoylierung hier nicht genau definieren, da durchaus auch die Assoziation mit endogenem CD44 zur Lokalisation in der Membran beitragen könnte. Um dies auszuschließen, müssten die mutierten CD44 Varianten in einer CD44 negativen Zelllinie exprimiert werden. Auch Assoziationen mit Tetraspaninen sind denkbar. So können unter Lubrol Lyse Bedingungen auch in den CHO-K1 Zellen verschiedene Proteine mit den mutierten CD44 Isoformen präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt), deren genaue Identifikation aufgrund fehlender Antikörper gegen Proteine des Hamsters nicht erfolgen konnte.

Im speziellen fällt auf, daß bei der Doppelmutante CD44 mut1/2 eine weitere Bande – in etwa 40 kD größer als das CD44 meta-1 – erscheint, die vermutlich auf eine unterschiedliche Glykosylierung hindeutet. Dies wiederum könnte bedeuten, daß der Transport des CD44 in die Zellmembran die Palmitoylierung membranproximaler Cysteine benötigt, und daß ohne diese ein anderer Transportweg einhergehend mit anderer Glykosylierung verbunden ist, aber diese Annahme ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch rein spekulativ.

### **3.10 CD44-PROTEINKOMPLEXE UND SIGNALTRANSDUKTION**

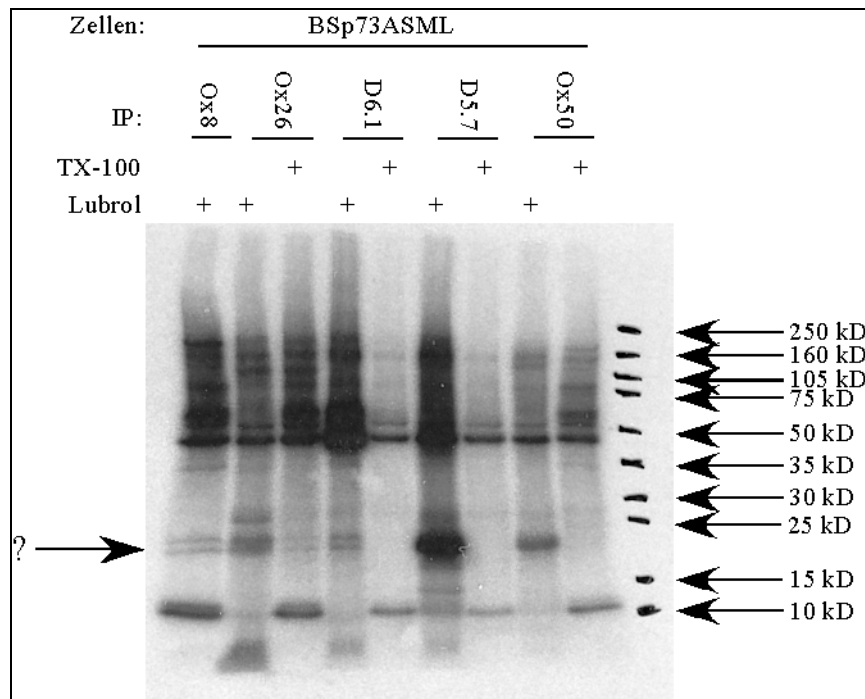
Ausgehend von den Befunden, daß sich in der Membran der BSp73ASML Zellen CD44-Multi-Protein-Komplexe innerhalb Lubrol unlöslicher Subdomänen befinden, und solche „Lipid Rafts“ oftmals den Ausgangspunkt für Signaltransduktionskaskaden darstellen, sollte in der Folge geklärt werden, ob über die CD44 beinhaltenden Proteinkomplexe selektiv Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden.

#### **3.10.1 PHOSPHORYLIERUNG**

Zu diesem Zweck wurden in ersten Untersuchungsreihen in-vitro Kinase Assays durchgeführt, um potentielle Phosphorylierungsereignisse nachzuweisen. Nach Immunopräzipitation wurde den präzipitierten Komplexen radioaktiv markiertes ATP zugesetzt und die phosphorylierten Proteine nach SDS-PAGE und Western Blot in Autoradiogrammen nachgewiesen (Abb.22).

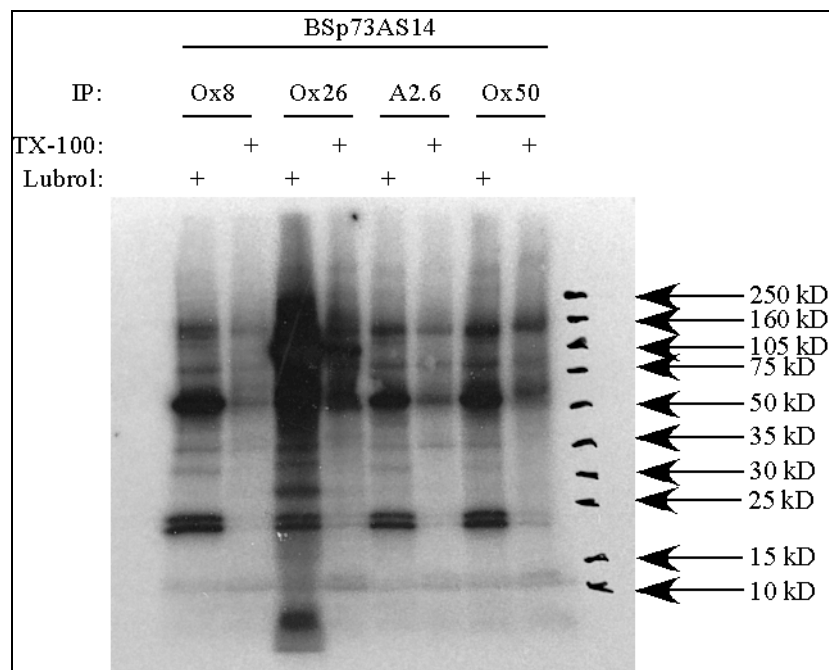
Das Phosphorylierungsmuster der Isotypkontrolle (Ox8, linke Spur) sowie der Kontrolle durch Präzipitation eines nicht assoziierten Moleküls (CD71, 2.+3.Spur von links) zeigen eine ganze Reihe phosphorylierter Proteine. Wenn man diese Banden außer Betracht läßt, zeigt sich, daß die unter Lubrol Bedingungen mit Ox50 und D5.7 (und auch CD9) präzipitierten Komplexe eine starke Phosphorylierung eines in etwa 20-22 kD großen Proteins aufweisen, die unter TX-100 Bedingungen, d.h. nach Auflösung der Proteinkomplexe und Lubrol „Lipid Rafts“, nicht zu sehen ist. Dasselbe Phosphorylierungsmuster konnte auch in Progressorzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Wie sich herausstellte und in Abb.23 exemplarisch an den BSp73AS14 Zellen gezeigt ist, kann man in den BSp73AS, BSp73AS14 und

BSp73AS5.7 keine Phosphorylierung eines 20-22kD großen Proteins in Präzipitaten mit den Antikörpern Ox50, A2.6, D5.7 oder CD9 erkennen.



**Abb. 22: In-vitro Kinase assay unterschiedlicher Präzipitate von BSp73ASML Zellen**

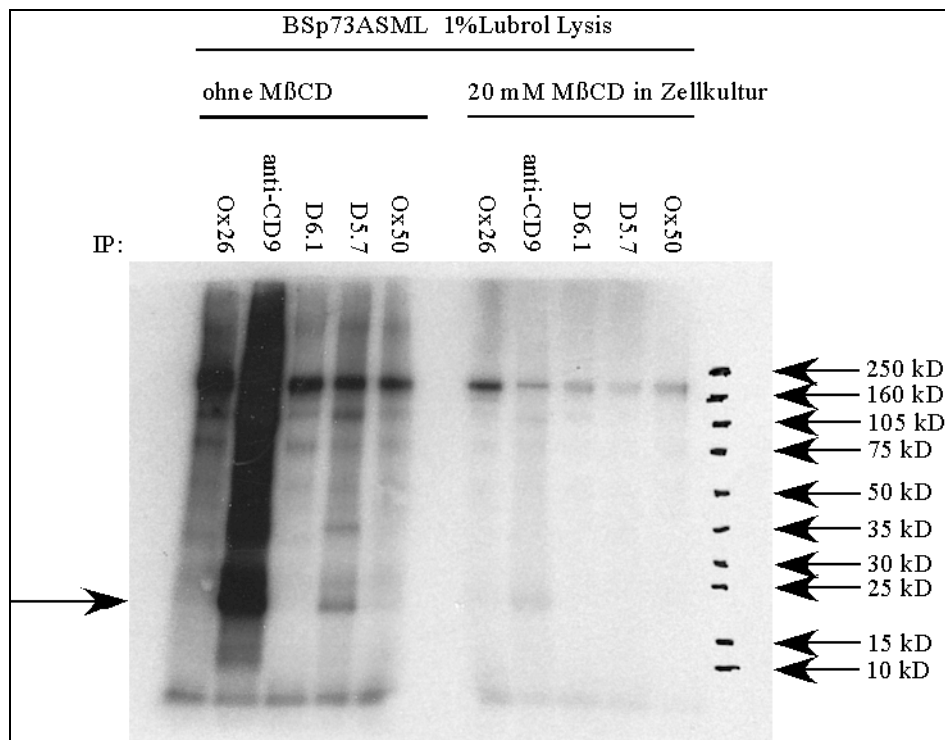
BSp73ASML Zellen wurden in 1% TX-100 oder 1% Lubrol lysiert und Immunpräzipitationen mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Den Präzipitaten wurden 10 $\mu$ Ci  $^{32}$ P- $\gamma$ ATP zupipettiert und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde das Autoradiogramm erstellt.



**Abb. 23: In vitro Kinase assay mit Präzipitaten von BSp73AS14 Zellen**

BSp73AS14 Zellen wurden in 1% TX-100 oder 1% Lubrol lysiert und Immunpräzipitationen mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Den Präzipitaten wurden 10 $\mu$ Ci  $^{32}$ P- $\gamma$ ATP zupipettiert und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde das Autoradiogramm erstellt.

Wenngleich dieser Befund die Möglichkeit offen läßt, daß die für die spezielle Phosphorylierung verantwortliche Kinase oder das Substrat in den BSp73ASML Zellen nicht exprimiert wird, erscheint es auch im Hinblick auf die fehlende Phosphorylierung dieses Proteins in TX-100 Präzipitaten, wahrscheinlicher, daß die Phosphorylierung vom Vorhandensein der definierten Membrankomplexe abhängt.



**Abb. 24: MβCD Behandlung der BSp73ASML Zellen verhindert Phosphorylierung des 22 kD Proteins**

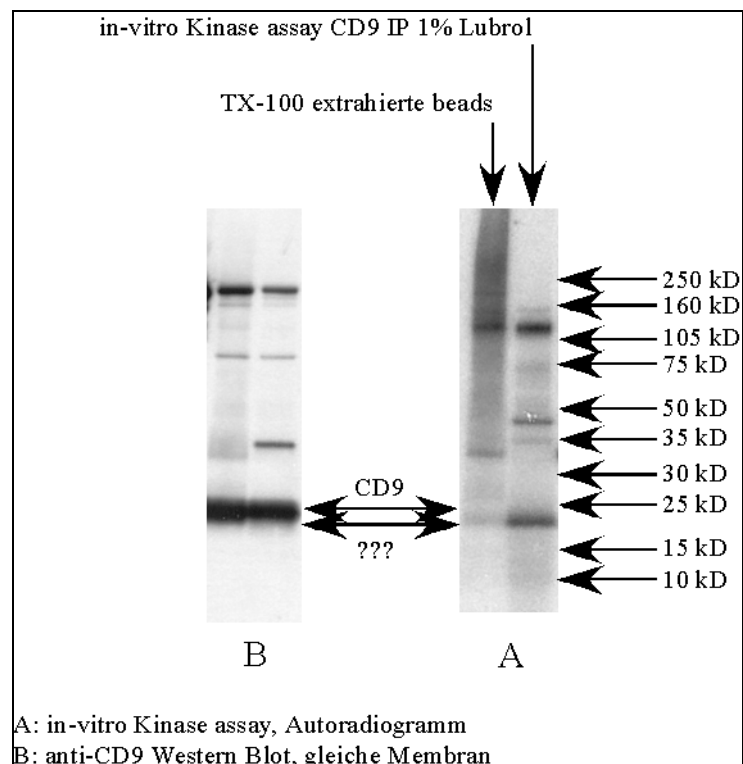
BSp73ASML Zellen wurden mit 20mM MβCD für 30 min bei 37°C behandelt, unter Lubrol Bedingungen lysiert und einer Immunpräzipitation mit den angegebenen Antikörpern unterzogen. Anschließend erfolgte ein in-vitro Kinase Assay. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und ein Autoradiogramm erstellt.

Wie zuvor gezeigt führt eine TX-100 Lyse im Gegensatz zum Cholesterinentzug aus der Membran zur Auflösung der Proteinkomplexe. Im Hinblick auf diesen Befund erschien die Phosphorylierung nach Cholesterinentzug aus der Membran von besonderem Interesse (Abb. 24). Interessanterweise führt der Entzug von Cholesterin aus der Membran der BSp73ASML Zellen zu einem annähernd totalen Verlust der Phosphorylierungskapazität. Daß die Unfähigkeit zur Phosphorylierung nicht aufgrund wie auch immer gearteter Inhibition der Kinasen durch Methyl-β-Cyclodextrin zu erklären ist, zeigt ein Versuch in dem unmittelbar vor der Phosphorylierungsreaktion zu den präzipitierten Komplexen MβCD zugegeben wurde. Dieses Experiment zeigte keinerlei Veränderung in den Phosphorylierungsmustern, was eine mögliche Inhibition durch MβCD ausschließt (Daten nicht gezeigt). Da die Proteinkomplexe als solches nicht durch Cholesterinentzug beeinflusst werden, weisen die Ergebnisse darauf hin, daß die Lubrol Rafts gleichsam als Signalübertragungsplattform der Proteinkomplexe fungieren, und die assoziierten Kinasen

durch M $\beta$ CD Behandlung der Zellen, und somit der Auflösung der rafts, aus den Komplexen entfernt werden.

### 3.10.2 DAS PHOSPHORYLIERTE 22kD PROTEIN IST NICHT CD9

Das Molekulargewicht des phosphorylierten Proteins entspricht in etwa dem des CD9 Moleküls. Deswegen wurde überprüft, ob gegebenenfalls CD9 Substrat der Phosphorylierungsreaktion ist. Hierzu wurde einerseits nach dem in-vitro Kinase Assay eine TX100 Extraktion durchgeführt, zum anderen wurden die Membranen nach der Autoradiographie einem Western Blot mit anti-CD9 Antikörper unterzogen (Abb.25).



**Abb. 25: CD9 ist nicht das 22kD Substrat der in-vitro Kinase Assays**

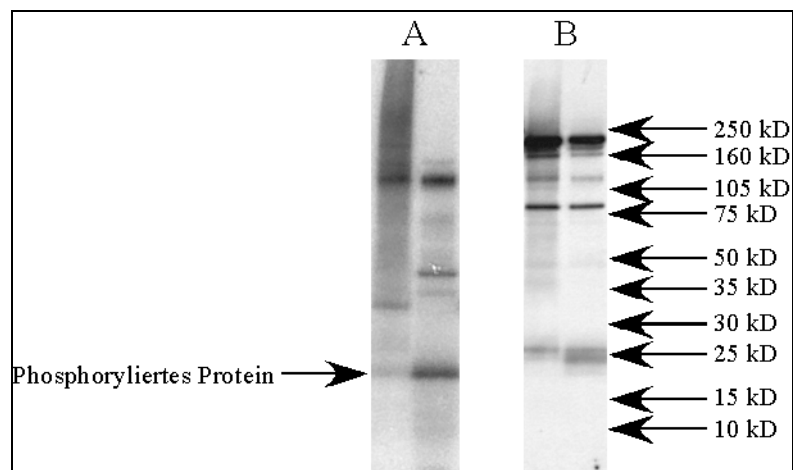
BSp73ASML Zellen wurden mit Lubrol lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-CD9 mAK durchgeführt. Nach einem in-vitro Kinase Assay wurden 50% des Präzipitats einer TX-100 Extraktion unterzogen. Anschließend wurden die Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde sowohl einer Autoradiographie (A) als auch einer Western Blot Analyse mit anti-CD9-mAK (B) unterzogen.

Wie Abb. 25 B zu entnehmen ist, bleibt die Signalstärke des präzipitierten CD9 in einer Western Blot Analyse auch nach TX-100 Extraktion des Präzipitats unverändert. Wäre CD9 das Substrat der Phosphorylierungsaktion, müßte aber auch die Signalstärke in der Autoradiographie unverändert bleiben, was

nicht der Fall ist. Somit konnte gezeigt werden, daß CD9 nicht das Substrat der Kinasen in den in-vitro-Kinase Assays ist.

### 3.10.3 DIE PHOSPHORYLIERUNG IST KEINE TYROSIN-PHOSPHORYLIERUNG

Um weiteren Aufschluß über potentielle Kinasen oder Substrate an der gezeigten Phosphorylierung zu erhalten, wurde in Western Blot Analysen untersucht, ob es sich um eine Tyrosin Phosphorylierung handelt oder nicht. Wie in Abb. 26 gezeigt wird, kann eine Tyrosin-Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Leider existieren keine gut funktionierenden Antikörper zur Differenzierung von Serin- oder Threoninphosphorylierungen, so daß hier keine weiteren Untersuchungen per Western Blot angeschlossen wurden.



**Abb. 26: Die Phosphorylierung des 22 kD Proteins ist keine Tyrosinphosphorylierung**

A: Wie Abb. 25A

B: Western Blot derselben Membran mit anti-Phosphotyrosin-mAK PY99

### 3.10.4 WEITERE CHARAKTERISIERUNGEN DES PHOSPHORYLIERTEN PROTEINS UND VERSUCH DES NACHWEISES INVOLVIERTER KINASEN

Nachdem sowohl das CD9 als Kandidat als auch eine Tyrosinphosphorylierung ausgeschlossen waren, sollte die Vermutung, daß es sich um ein kleines G-Protein handelt, untersucht werden. Diese sind für ihre Lokalisation in Detergenz-resistenten Membrandomänen bekannt, können Serin- oder Threonin phosphoryliert werden und weisen die entsprechende Größe auf. Ein erster GTP-Bindungs-Assay, in dem versucht wurde die Bindung radioaktiven GTPs an das Protein nachzuweisen, erbrachte leider keine interpretierbaren Daten (nicht gezeigt). Die Bestimmung mittels monoklonaler Antikörper wurde als wenig aussichtsreich nicht in Angriff genommen, da es mehr als 50 bekannte kleine G-Proteine gibt, und

wir zusätzlich damit rechnen mussten, daß die vorhandenen Antikörper nicht notwendigerweise an die entsprechenden Rattenproteine binden.

Da es sich um eine Serin- oder Threonin-Phosphorylierung handelt, könnte auch eine der vielen Isoformen der Protein Kinase C Familie in die Phosphorylierung involviert sein. Zur Klärung der Frage wurden 2 unterschiedliche Ansätze gewählt. Einerseits wurden dem Kinase Assay ein Breitspektrum-Inhibitor der Protein-Kinase-C, Gö6893, zugesetzt, zum anderen wurden die ASML Zellen mittels niedrigen Dosen PMA für 20 Minuten stimuliert, was eine Aktivierung der PKC zur Folge hat. Leider führten auch diese beiden Ansätze bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu der gewünschten Klärung der Fragestellung involvierter Kinasen (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen zum Nachweis über CD44 Komplexe aktivierter Kinasen werden zur Zeit weiter vorangetrieben. Im Hinblick auf die Identifikation des 22 kD großen, phosphorylierbaren Proteins, erscheint eine massenspektrometrische Analyse am erfolgversprechendsten. Entsprechende Untersuchungen sind bereits eingeleitet.

### **3.10.5 ASSOZIATION VON D5.7A UND CD44 MIT DEN KLEINEN G-PROTEINEN RAC UND RHO**

Die Assoziation kleiner G-Proteine der Rho-Familie ist wesentlich für die Reorganisation des Zytoskeletts. In BSp73AS Zellen und deren Einzeltransfektanden sowie in BSp73ASML wurde nach Kreuzvernetzung von D5.7A oder CD44 mittels Fluoreszenzmikroskopie die Kolokalisation mit Rac-1 und Rho untersucht (Abb. 27). Wie auch für das Aktin-Zytoskelett und die Adaptorproteine Ezrin und Moesin zu beobachten war, kann nach Kreuzvernetzung der verschiedenen Moleküle auf BSp73ASML und Kreuzvernetzung des CD44 meta-1 auf BSp73AS14 eine klare Kolokalisation mit den untersuchten kleinen G-Proteinen festgestellt werden. Nach Quervernetzung von D5.7A auf den BSp73AS5.7 konnte keine Kolokalisation festgestellt werden, und für CD44s auf den BSp73AS konnte nur eine Kolokalisation mit dem Rho-Protein gezeigt werden.

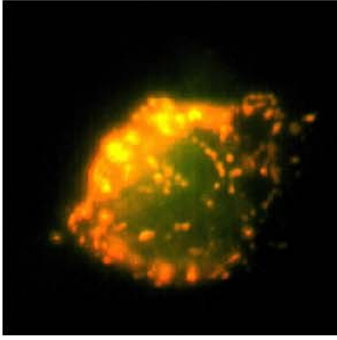
#### **Abb. 27: Die Proteinkomplexe kolokalisieren mit Rac-1 und Rho in BSp73ASML**

DIE VERSCHIEDENEN BSp73 ZELLEN WURDEN MIT DEN MAK Ox50, A2.6 ODER D5.7 WIE ANGEGEBEN MARKIERT, UND DIE MOLEKÜLE MIT RHODAMIN MARKIERTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERN FÜR 30 MIN BEI 37°C IM BRUTSCHRANK KREUZVERNETZT. NACH FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG WURDEN DIE ZELLEN MIT ANTI-RAC ODER ANTI-RHO ANTIKÖRPERN SOWIE FITC-MARKIERTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERN GEFÄRBT. DIE

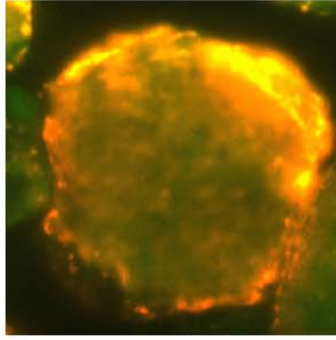


Rho

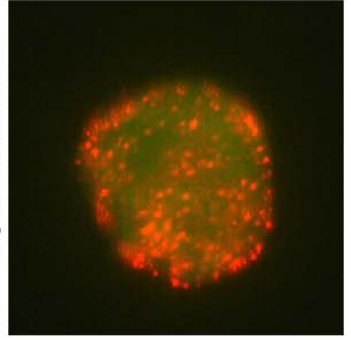
BSp73AS CD44s



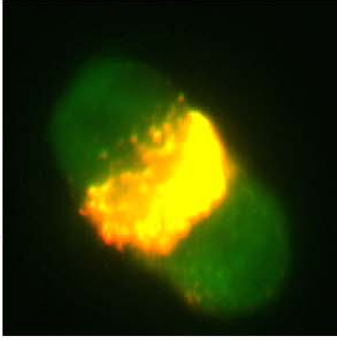
BSp73AS14 CD44v6



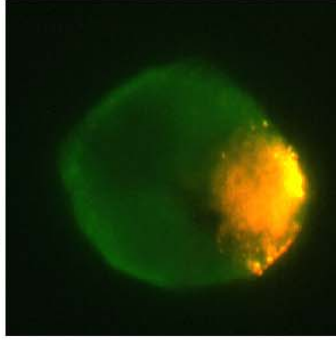
BSp73AS5.7 D5.7A



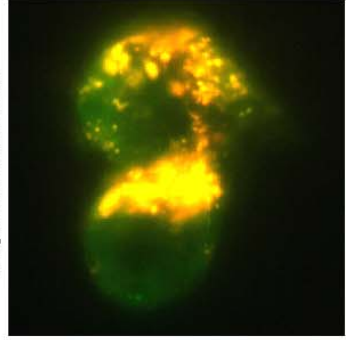
BSp73ASML CD44s



BSp73ASML CD44v6

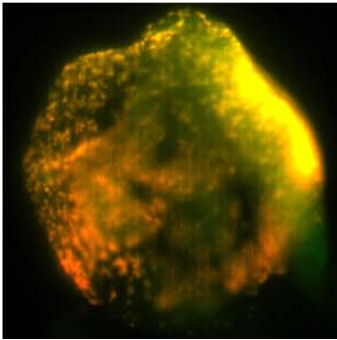


BSp73ASML D5.7A

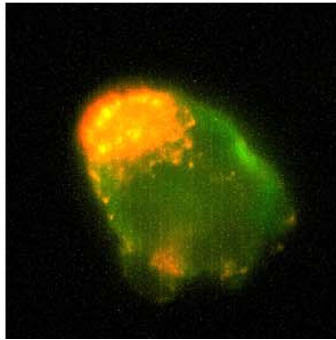


Rac-1

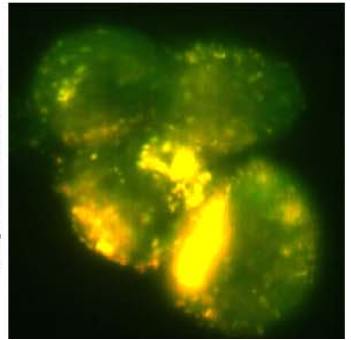
BSp73ASML CD44s



BSp73ASML CD44v6



BSp73AS5.7 D5.7A



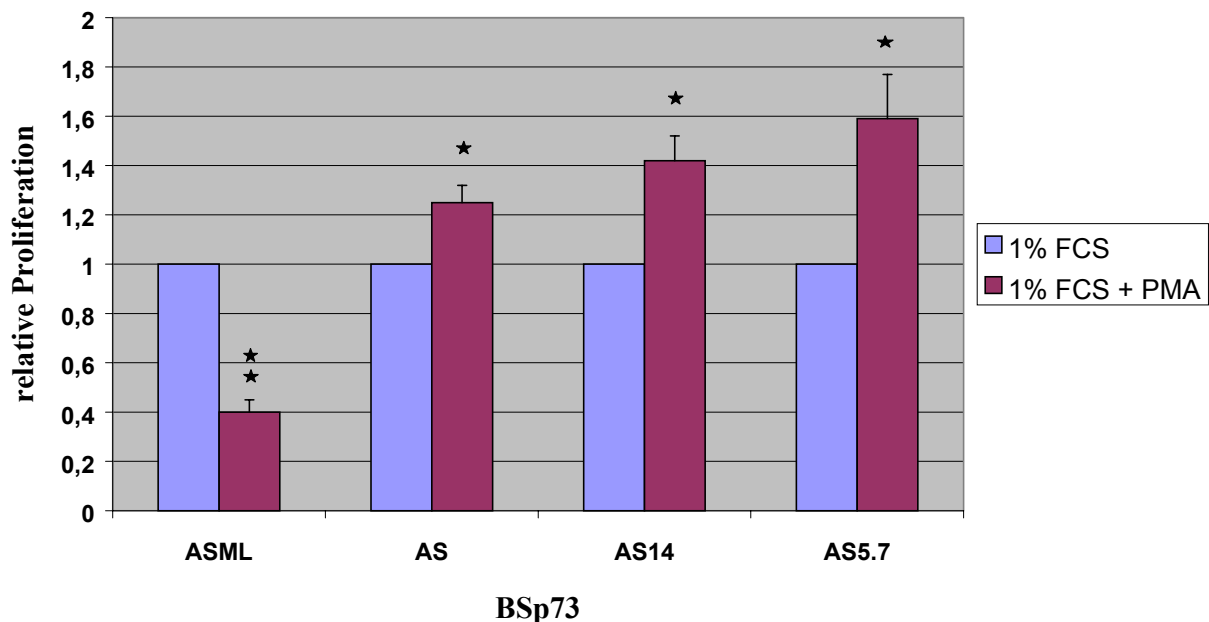
### 3.11 MÖGLICHE FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN DER INTERAKTION VON VARIANTEM CD44 MIT D5.7A

Die im folgenden gezeigten funktionellen Untersuchungen beschränken sich zunächst auf die Interaktion des varianten CD44 mit dem Ep-CAM Homolog D5.7A, da es sich bei beiden Molekülen um metastasierungs-assoziierte Moleküle handelt, die in Proteinkomplexen hoher Stöchiometrie vorliegen. Als für die Metastasierung interessante Parameter wurden, proliferative, apoptotische, adhäsive und migratorische Eigenschaften erfaßt. Zur Darstellung der Eigenschaften wurden jeweils die BSp73ASML Zellen, in denen die beiden Proteine als Komplexe vorliegen, mit den BSp73AS Zellen und deren Transfektanten der Einzelmoleküle verglichen. Um die Relevanz zu beobachtender Unterschiede zu sichern, wurden die Untersuchungsbedingungen entsprechend der Fragestellung variiert, z.B. Aktivierung durch PKC, Zerstörung des Zytoskeletts oder Cholesterindepletion.

#### 3.11.1 PROLIFERATION UND APOPTOSE

Die proliferative Aktivität von Tumorzellen wird in der Regel als vom metastatischen Potential unabhängig erachtet. Es ist bekannt, daß die BSp73ASML Zellen eine niedrigere Proliferationsrate aufweisen, als

**Einfluß von PMA auf die Proliferation der BSp73 Zellen**

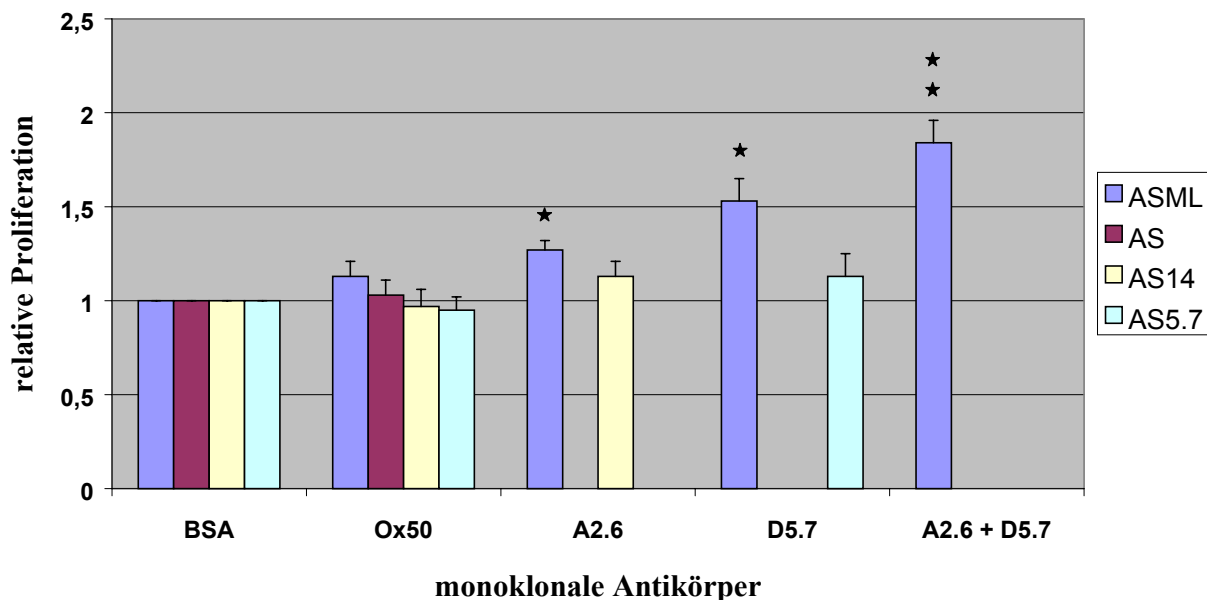


**Abb. 28: Einfluß von PMA auf die Proliferation von BSp73 Zellen**

BSp73 Zellen wurden in Medium mit 1% FCS in Gegenwart von  $10^{-8}$ M PMA und  $10\mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin/ml}$  für zwölf Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gerntet und in einem Beta-Counter der Einbau radioaktiven Thymidins ermittelt.

die BSp73AS (Matzku et al., 1983). Dennoch erschien es von Interesse, die proliferativen Eigenschaften der Zellen unter PKC Aktivierung oder nach Kreuzvernetzen von CD44v und D5.7A durch Antikörper zu beobachten. Das proliferative Verhalten der BSp73 Zellen nach PKC Stimulation brachte einen erstaunlichen Befund. Speziell unter weitgehendem Entzug von FCS wurde die Proliferation der BSp73ASML durch PKC Stimulation inhibiert. Im Gegensatz dazu konnte in den BSp73AS eine Zunahme der Proliferation beobachtet werden (Abb. 28). Einen zweiten, unerwarteten Befund ergab das Kreuzvernetzen von CD44 Isoformen und D5.7A (Abb. 29). So hatte das Kreuzvernetzen von CD44 Isoformen und D5.7A auf BSp73AS Einzeltransfektanden keinen Einfluß auf die Proliferation, führte aber zu gesteigerter Proliferation in den BSp73ASML. Außerdem ist eine weitere Verstärkung dieses Effektes durch gleichzeitiges

**Einfluß der Kreuzvernetzung verschiedener Oberflächenantigene auf die Proliferation von BSp73 Zellen**



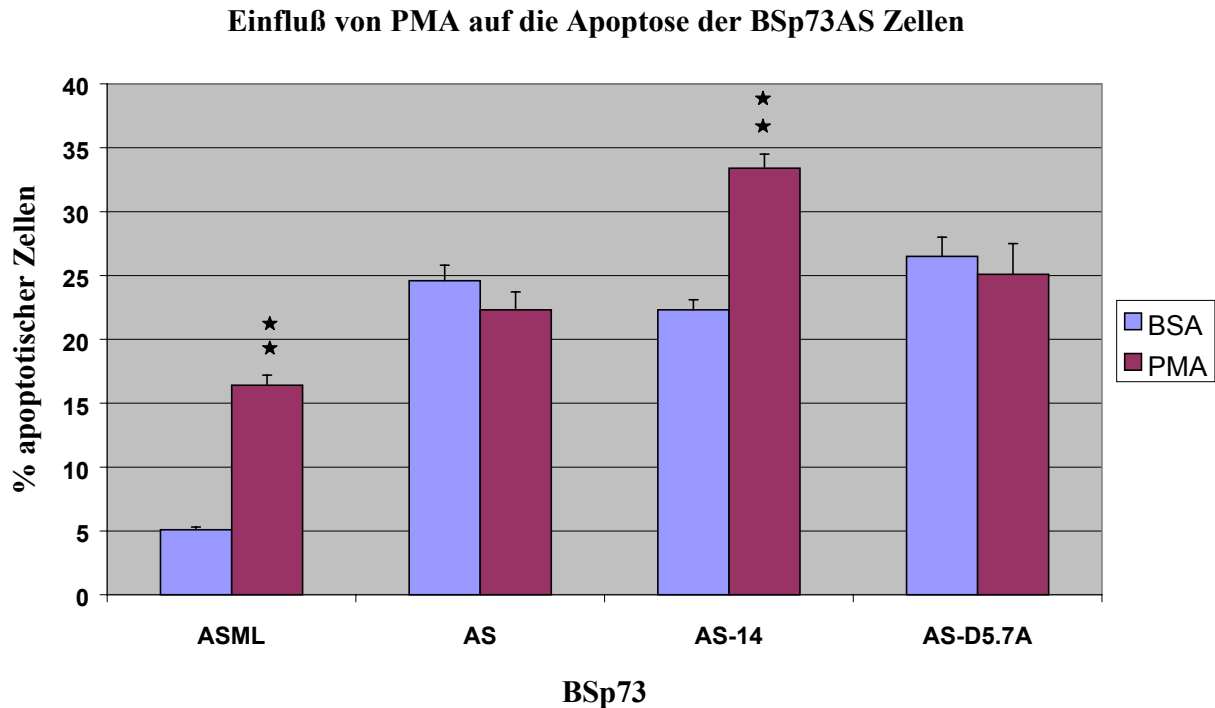
**Abb. 29: Einfluß kreuzvernetzender Antikörper auf die Proliferation von BSp73 Zellen**

BSp73 Zellen wurden für zwölf Stunden in beschichteten 96-Loch-Platten kultiviert. Das Medium enthielt 1% FCS, sowie 10µCi <sup>3</sup>H-Thymidin/ml. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in einem Beta-Counter auf den Einbau radioaktiven Thymidins untersucht.

Kreuzvernetzen beider Oberflächenproteine zu beobachten. Dies erlaubt die Annahme, daß über den Komplex, der die beiden Moleküle CD44v und D5.7A beinhaltet, Signale aktiviert werden, die weder durch Kreuzvernetzung von CD44s oder CD44v noch D5.7A in den BSp73AS induzierbar sind.

Ein Einfluß auf die Apoptose war hingegen weder bei einzelner noch doppelter Kreuzvernetzung durch die unterschiedlichen Antikörper feststellbar (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Behandlung der Zellen mit PMA hatte eine doch erhebliche Zunahme der Apoptose in Zellen, die variantes CD44 exprimieren zur Folge (Abb. 30). So stieg die Zahl apoptotischer BSp73ASML von 4% auf 16% und apoptotischer

BSp73AS14 von 26% auf 32% an, wobei die generell sehr hohe Apoptoseresistenz der BSp73ASML nicht unerwähnt bleiben darf.

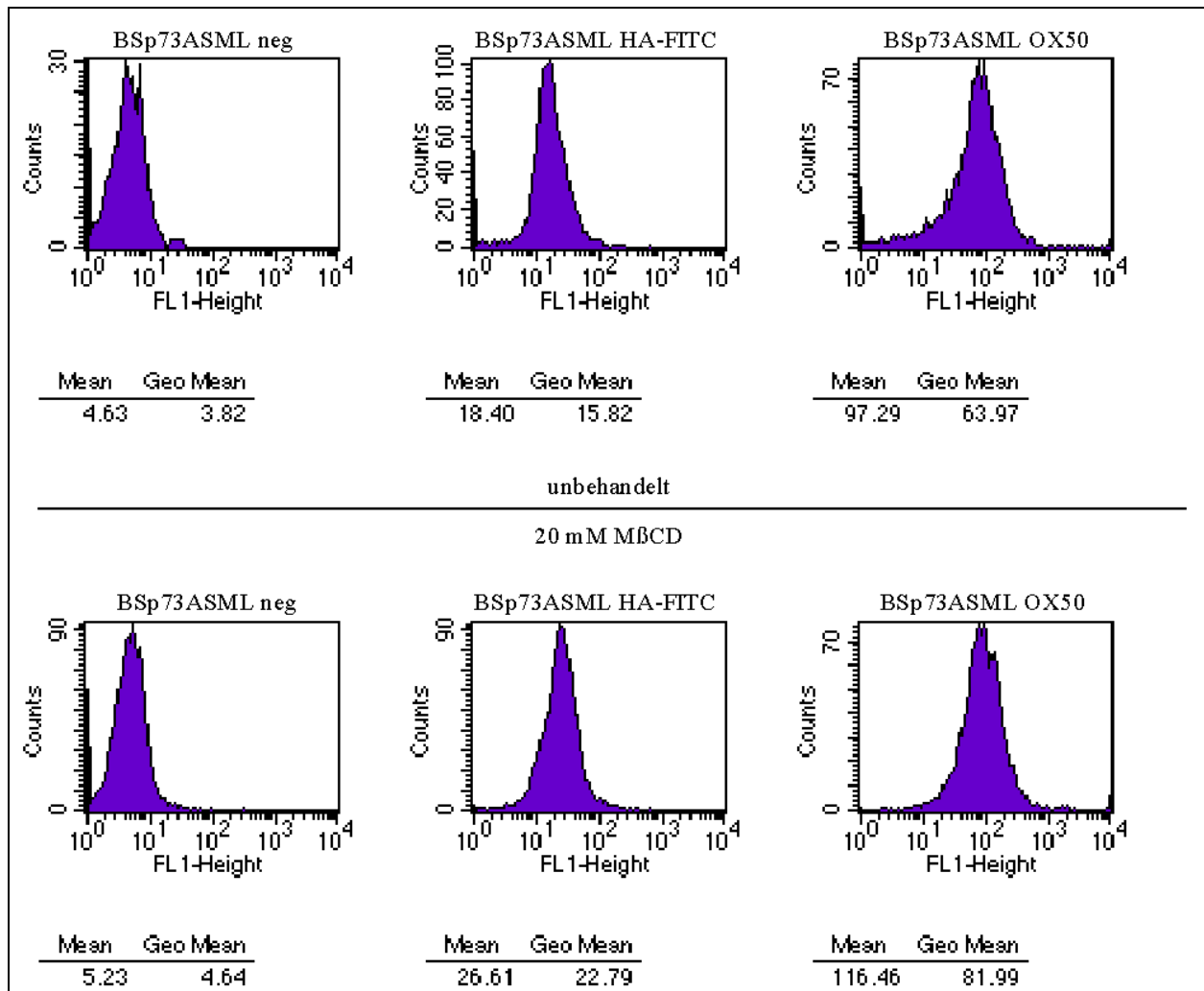


**Abb. 30: Einfluß von PMA auf die Apoptose der BSp73 Zellen**  
 Die BSp73 Zellen wurden für 48 Stunden in Medium mit 1% FCS sowie  $10^{-8}$  M PMA inkubiert. Anschließend wurde eine Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt, und die Prozentualität apoptotischer Zellen im FACS gemessen.

### 3.11.2 BINDUNG AN EXTRAZELLULÄRE MATRIX

Bindungseigenschaften an die Bestandteile der extrazellulären Matrix sind bei dem Prozeß der Metastasierung von zentraler Bedeutung. Im Hinblick auf CD44 gilt dies speziell für die Bindung an Hyaluronsäure, die über FACS-Analysen mit FITC-markierter HA und über die Adhäsion radioaktiv markierter Zellen nachgewiesen wurde. Wie die FACS Analysen zeigen, binden die BSp73ASML Zellen deutlich besser an HA als die BSp73AS (Daten nicht gezeigt), was auch schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Sleeman et al., 1996). In diesem und anderen Zellsystemen konnte gezeigt werden, daß ein Clustering von CD44 über die varianten Isoformen oder nach PMA Stimulation zu einer erhöhten HA Bindung führt. Die FACS Analysen zeigen (Abb.31), daß die HA-Bindungseigenschaften der BSp73ASML nach Cholesterinentzug durch M $\beta$ CD unverändert sind. Ebenso ist die Gesamtmenge an CD44 auf der Oberfläche nach Cholesterinentzug nicht vermindert. Dies belegt einerseits die Tatsache, daß die von uns beschriebenen Komplexe auch nach M $\beta$ CD Behandlung stabil sind, und zeigt anderer-

seits, daß die Komplexe nicht durch die „Lipid Rafts“ in der Membran gehalten werden und nach Cholesterinentzug in den Zellkulturüberstand gehen, wie es bspw. für einen Großteil der GPI verankerten Moleküle üblich ist. Weitere Untersuchungen zeigten, daß die HA Bindungseigenschaften der BSp73ASML Zellen durch Stimulation mit PMA nicht verändert werden (Daten nicht gezeigt).



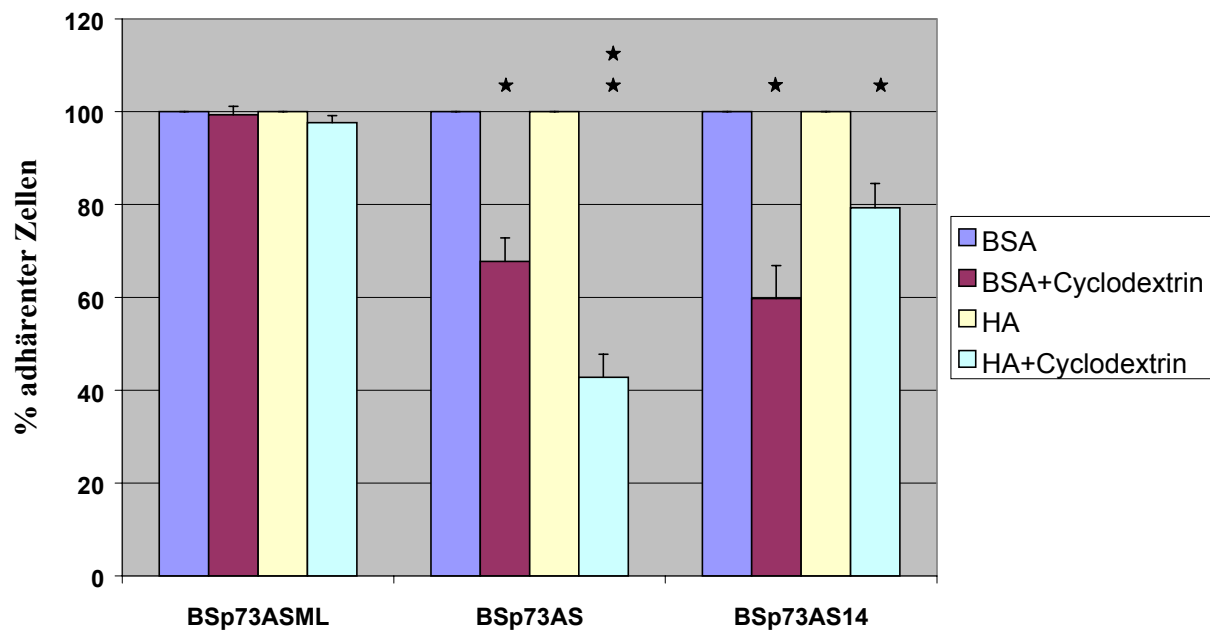
**Abb. 31: HA-Bindung der BSp73ASML Zellen nach Cyclodextrin Behandlung**

Unbehandelte oder mit 20mM MβCD behandelte BSp73ASML Zellen wurden mit FITC markierter Hyaluronsäure (1:200 in PBS) oder Ox50 und FITC markiertem Sekundärantikörper gefärbt. Die Messung und Auswertung erfolgte an einem FACS Calibur (Becton Dickinson).

Wichtig in diesem Zusammenhang ist allerdings die Tatsache, daß im Gegensatz zu den BSp73ASML und BSp73AS14 Zellen, die BSp73AS Zellen nach Cyclodextrinbehandlung deutlich verringerte Hyaluronsäurebindung zeigen, wie durch Adhäsionsassays gezeigt werden konnte. Dargestellt ist hier die relative Bindung der Zellen an BSA oder HA im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Es fällt auf, daß Cyclodextrin behandelte BSp73AS und BSp73AS14 insgesamt schwächer binden. Um so dramatischer stellt sich aber der Verlust der Hyaluronsäurebindung der BSp73AS Zellen dar. Auch dieser Befund

unterstützt die Annahme, daß die Ausbildung der Proteinkomplexe in der Membran der BSp73ASML von zentraler Bedeutung sind (Abb.32).

### Hyaluronsäurebindung der BSp73 Zellen nach Cholesterindepletion

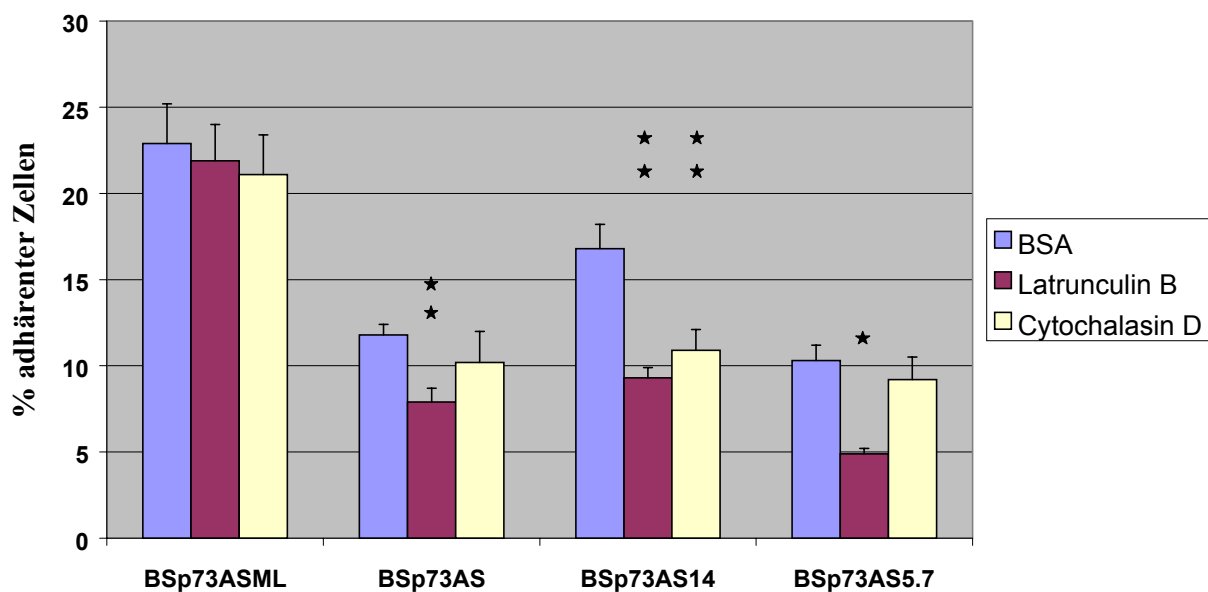


**Abb. 32 Hyaluronsäurebindung der BSp73 Zellen nach Methyl-βCyclodextrin Behandlung**

BSp73 Zellen wurden  $\dot{U}N$  mit  $10\mu Ci$   $^3H$ -Thymidin/ml Medium markiert. Am nächsten Tag wurden die BSp73 in 96-Loch Platten ausgesät, die zuvor mit HA beschichtet worden waren. Als Kontrolle dienten BSA beschichtete 96-Loch Platten. Nach 2h wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gespült, geerntet und die Radioaktivität in einem Beta-Counter gemessen. Dargestellt ist hier der Prozentsatz adherenter, Cyclodextrin-behandelter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Ausgehend von den gezeigten Befunden über die Kolo-kalisation von CD44 und D5.7A mit Elementen des Zytoskeletts wie Aktin, Moesin und Ezrin, erschien es wichtig auch den Einfluß von Zytoskelett zerstörenden Agentien auf die Bindung der Hyaluronsäure zu untersuchen. Hierzu wurden Adhäsionsassays mit den unterschiedlichen BSp73AS Zellen nach Behandlung mit Latrunculin B oder Cytochalasin D durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente erbrachten allerdings keinen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Assoziation von variantem CD44 mit D5.7A, da in allen Fällen eine reduzierte Adhäsion an Hyaluronsäure nach Behandlung der Zellen mit Latrunculin B zu beobachten war. Dasselbe, wenngleich in etwas abgeschwächter Form konnte nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D gezeigt werden.

### Einfluß von Latrunculin B und Cytochalasin D auf die HA Bindung der BSp73 Zellen



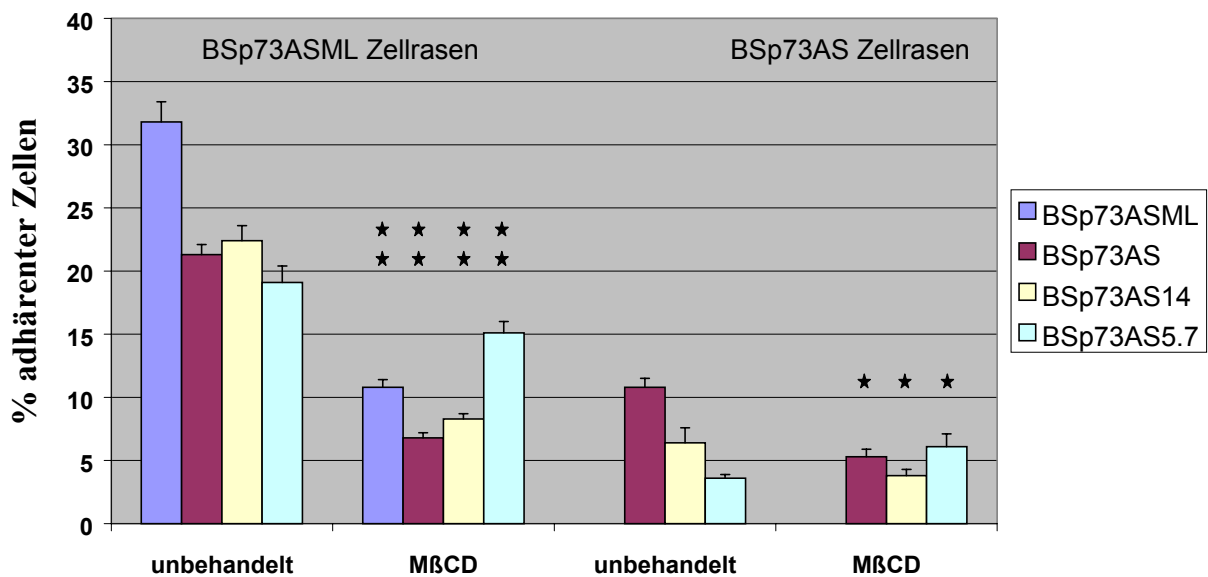
**Abb. 33: Einfluß von Latrunculin B und Cytochalasin D auf die HA Bindung der BSp73 Zellen**

Die BSp73 Zellen wurden ÜN mit 10µCi <sup>3</sup>H-Thymidin/ml Medium markiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen wie indiziert mit 1µM Latrunculin B in PBS oder 30 µM Cytochalasin D in PBS für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Adhäsionsassay in HA oder BSA gecoateten 96-Loch Platten. Die Zellen wurden geerntet und die Radioaktivität in einem Beta-Counter analysiert. Dargestellt ist die Prozentualität adhärenter Zellen, wobei 100% der Menge ausgesäter Zellen entspricht.

**3.11.3 ZELL-ZELL-ADHÄSION**

Neben der Zell-Matrix-Adhäsion ist die Zell-Zell-Adhäsion für die Metastasierung von Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Adhäsionsassays (Abb.34) liefern zwei erwähnenswerte Befunde. Erstens konnten wir zeigen, daß die beiden Einzeltransfektanten BSp73AS14 und BSp73AS5.7 besser an die BSp73ASML Zellen adhären als an BSp73AS, und zweitens ist eine deutlich verminderte Zell-Zell-Adhäsion nach Behandlung der Zellen mit Cyclodextrin feststellbar. Die BSp73AS5.7 müssen von dem zweiten Befund allerdings ausgenommen werden, da sie nach Behandlung mit Cyclodextrin keine verminderte Zell-Zell-Adhäsion zeigten. Dieser Befund bestätigte sich auch in einem Aggregationsassay (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß sowohl das CD44 meta-1, als auch das D5.7A zur Zell-Zell-Adhäsion beitragen, allerdings ohne Hinweise auf die Notwendigkeit einer Komplexbildung. Die Daten zeigen weiterhin, daß ausschließlich die Zell-Zell-Adhäsion über nicht komplexiertes D5.7A von einer Raft Formation unabhängig ist.

**Einfluß von Cyclodextrin auf die Zell-Zell-Adhäsion der BSp73 Zellen**



**Abb. 34: Einfluß von Cyclodextrin auf die Zell-Zell-Adhäsion der BSp73 Zellen**

Die BSp73 Zellen wurden ÜN mit 10µCi <sup>3</sup>H-Thymidin/ml Medium markiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 20 mM Methyl-β-Cyclodextrin in PBS für 30min bei 37°C behandelt (wie indiziert) und auf einen BSp73ASML oder BSp73AS Zellrasen ausgesät. Die Zellen des Zellrasens waren in allen Fällen in RPMI mit 10% FCS gewachsen und nicht behandelt. Nach 2h Adhäsion wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gespült. Danach wurden die Zellen trypsiniert und die Radioaktivität mittels eines Beta-Counters analysiert. 100% entsprechen der Menge eingesetzter Zellen.



### 3.11.4 MIGRATORISCHE EIGENSCHAFTEN

Ein weiteres wesentliches Kriterium der Metastasierung ist die Migration von Zellen. Der Einfluß von CD44v und D5.7A auf das migratorische Verhalten der Zellen wurde in einem „Scratch-Assay“ als einem in-vitro Korrelat der Wundheilung überprüft. An Stelle der BSp73ASML Zellen wurden allerdings Progressorzellen verwendet, da die zuvor genannten für diese Art Assay nicht geeignet sind. Die mAK A2.6 und D5.7 hatten keinen nennenswerten Einfluß auf die Migration der Progressorzellen. Dies könnte bedeuten, daß die Assoziation der beiden Moleküle für das migratorische Potential metastasierender Tumorzellen keine Bedeutung hat, was wiederum nicht ausschließt, daß dem erweiterten Komplex, der wie gezeigt zumindest noch Tetraspanine, Integrin und Annexin enthält, entsprechende funktionelle Bedeutung zukommen könnte.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, daß die metastasierungsassoziierten varianten Isoformen von CD44 Bestandteil größerer Proteinkomplexe sind. Zu den ko-immunpräzipitierenden Proteinen gehören das Ep-CAM Homolog D5.7A, die Tetraspanine D6.1A und CD9, das  $\alpha 3$ -Integrin, sowie das Annexin I. Bis auf das D6.1A konnten die genannten Proteine auch anhand massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden. Diese Proteinkomplexe sind durch stringente Detergentien wie TX-100 zerstörbar, bleiben aber nach Behandlung mit milderer Detergentien wie Lubrol intakt. Weiterhin konnte durch Depletionsanalysen gezeigt werden, daß das variante CD44 in den BSp73ASML Zellen ausschließlich in den Proteinkomplexen lokalisiert ist, und die Untersuchung von Transfektanden der BSp73AS Zellen zeigten, daß CD44s nicht mit D5.7A interagiert. Wichtig ist auch der Befund, daß diese Proteinkomplexe in „Lipid Rafts“ angesiedelt sind, die durch Lubrol aber nicht durch TX-100 zu definieren sind. Unabhängig von der Lokalisation in „Lubrol Rafts“ konnten wir zeigen, daß die Proteinkomplexe auch nach Cholesterindepletion stabil bleiben. Da „Lipid Rafts“ als Plattform der Signaltransduktion bekannt sind, erschien es von besonderem Interesse zu untersuchen, inwieweit die Membrankomplexe mit variantem CD44 eine selektive Signaltransduktion induzieren können. Die Phosphorylierung eines 20-22 kD großen Proteins, die ausschließlich in Zellen zu beobachten war, die den „kompletten“ Proteinkomplex ausbilden, bestätigte diese Annahme. Weitere Untersuchungen dieses noch nicht identifizierten Proteins ergaben, daß es Serin oder Threonin phosphoryliert wird, und daß die benötigte Kinase nicht konstitutiv mit dem CD44-Proteinkomplex assoziiert ist. Der Verlust des Phosphorylierungssignals nach Cholesterindepletion zeigt dennoch, daß die Kinase Bestandteil der „Lipid Rafts“ ist. In Untersuchungen der kleinen G-Proteine Rac und Rho, sowie der Zytoskelettadaptorproteine Ezrin und Moesin konnte gezeigt werden, daß alle diese Proteine mit den von uns beschriebenen Komplexen koloalisieren, was in den BSp73AS Zellen und deren Einzeltransfektanden nicht in diesem Ausmaß gezeigt werden konnte. Erste funktionelle Untersuchungen belegen, daß die in „Lubrol Rafts“ lokalisierten, varianten CD44 beinhaltenden Proteinkomplexe Einfluß auf die Proliferation, Matrix- und Zelladhäsion haben.

Ich habe ausgehend von der Analyse varianter CD44 Isoformen festgestellt, daß es mit einer Reihe weiterer Moleküle, darunter auch weiterer metastasierungsassoziierte Moleküle, einen Lubrol resistenten Proteinkomplex bildet, der in speziellen Membrandomänen lokalisiert ist. Dort ist er in der Lage, spezielle Signaltransduktion zu initiieren. Entsprechend dieser drei zentralen Befunde, möchte ich die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit in drei Schwerpunkten diskutieren.

#### 4.1 INTERAKTIONEN VON VARIANTEN ISOFORMEN DES CD44

Der Befund der Übertragung des metastatischen Potentials über CD44 meta-1 und CD44 meta-2 auf BSp73AS Zellen (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993) bei gleichzeitig unaltered metastatischem Potenzial durch Überexpression von CD44s (Seiter et al., 1993), sowie der Befund der Prävention der Metastasierung im Tiermodell durch Administration des mAK A2.6, zeigen deutlich die zentrale Stellung der varianten Isoformen des CD44 in diesem speziellen System. Weitergehend konnte gezeigt werden, daß im Fall des BSp73 Zellsystems, die Bindung der Hyaluronsäure über CD44, wenngleich diese durch Clustering der Varianten erhöht wird (Sleeman et al., 1996), nicht der Grund für den metastatischen Phänotyp ist (Sleeman et al., 1996). Folglich verbleiben zunächst zwei weitere Begründungen für den veränderten Phänotyp: Zum einen eine durch variante Isoformen veränderte Signaltransduktion des CD44 Moleküls, zum anderen die Interaktion mit anderen Proteinen, die der CD44 Standard Isoform nicht zugänglich sind. Auch die Kombination beider Ereignisse ist vorstellbar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die CD44 varianten Isoformen CD44meta-1 und CD44meta-2 mit D5.7A, dem Ep-CAM Homolog, sowie den Tetraspaninen D6.1A und CD9 in der Zellmembran der BSp73ASML assoziieren (Abb. 4-6). Desweiteren zeigten Transfektionen des D5.7A in die BSp73AS Zelllinie, daß das Ep-CAM Homolog nicht mit der Standard Isoform des CD44 assoziiert (Abb. 7+8), wenngleich gezeigt werden konnte, daß D5.7A auch in den Einzeltransfektanden in den beschriebenen „Lubrol Rafts“ lokalisiert (Abb.12). Dies läßt den Rückschluß zu, daß die varianten Isoformen für die Assoziation mit D5.7A essentiell sind. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Stöchiometrie der Assoziation in BSp73ASML (Abb.9). Über die Depletion von D5.7A oder CD9 ist es möglich alle CD44 Moleküle aus einem BSp73ASML Lysat zu entfernen. Aber die Depletion von entweder CD9 oder D5.7A aus den Lubrol Lysaten führte nicht zur Entfernung des jeweils anderen Proteins, d.h. wir können davon ausgehen, daß CD44v sowohl mit D5.7A als auch dem Tetraspanin interagiert, aber das Tetraspanin nicht direkt mit dem Ep-CAM Homolog interagiert. Aufgrund dieser Befunde erscheinen die varianten Isoformen des CD44 ein wichtiges Bindeglied in der Komposition der beschriebenen Proteinkomplexe zu sein. Wenngleich wir die Interaktionsdomänen zwischen CD44v, D5.7A und den Tetraspaninen noch nicht definiert haben, können wir ausschließen, daß die Bindung der varianten CD44 Isoformen in den BSp73ASML Zellen an andere Proteine über Disulfidbrücken zustande kommt, da unter nicht reduzierenden Bedingungen im Western Blot die einzelnen Moleküle in der ihnen eigenen Größe vorliegen.

Das Phänomen, daß variante CD44 Isoformen mit Membranmolekülen assoziieren können, die nicht an die Standard Isoform des CD44 binden, wurde auch in weiteren Tumorsystemen beobachtet. So konnten Bourguignon und Mitarbeiter zeigen, daß in der Metastasierung der Tumorzellen Met-1 aus der Brustdrüse die variante Isoform CD44v3,8-10 eine essentielle Rolle spielt, indem sie einerseits die Verbindung zum Zytoskelett über Ankyrin vermittelt, und andererseits über die varianten Isoformen die aktive Form der Matrix-Metalloprotease MMP9 rekrutiert (Bourguignon et al., 1998; Yu and Stamenkovic, 1999). In einem weiteren Modell dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß in einer metastasierenden Tumorzelllinie

des Ovars, SK-OV-3, das CD44v3 einerseits physikalisch über Disulfidbrücken mit p185<sup>Her2</sup> verbunden ist, und andererseits dieser Komplex die Signaltransduktion über ras und rac-1 initiiert. Dies führt wiederum zur Proliferation sowie zur Reorganisation des Zytoskeletts. Allerdings ist in diesem System die Bindung an Hyaluronsäure notwendig, um Signaltransduktion zu induzieren (Bourguignon et al., 2001). Ebenso konnte die Beteiligung der Signaltransduktion über c-src in Abhängigkeit von HA Bindung nachgewiesen werden (Bourguignon et al., 2001). Weitere Studien zeigen eindrucksvoll, daß die Bindung von Wachstumsfaktoren wie HB-EGF oder b-FGF an die variante Isoform v3 zu einer Anreicherung der Wachstumsfaktoren in einer Art CD44 Plattform führt, die wiederum in eine Signaltransduktion mündet, die Wachstum und Metastasierung begünstigt (Bennett et al., 1995; van der Voort et al., 1999). Auch in der Embryogenese kann das Prinzip der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren durch CD44 beobachtet werden (Sherman et al., 1998).

Die Interaktion von D5.7A und variantem CD44 ist von besonderem Interesse, weil es sich hier um zwei metastasierungs-assoziierte Moleküle handelt. Die beschriebene Funktion des D5.7A als interzelluläres Adhäsionsmolekül wird auch in den metastasierenden Zellen und Einzeltransfektanden aufrechterhalten und kann in Zelladhäsionsassays nachgewiesen werden (Abb.34). Hinzu kommt, daß das D5.7A durch Einbeziehung in den beschriebenen Proteinkomplex potentiellen Anschluß an Zytoskelett und signaltransduktorische Moleküle wie Rac und Rho bekommt (Abb.27), was zu einer Verstärkung des metastatischen Potentials beitragen könnte. Zumindest einen veränderten Einfluß auf die Proliferation in BSp73ASML verglichen mit BSp73AS5.7 konnten wir feststellen (Abb.29), was eine veränderte Signaltransduktion durch das Molekül impliziert. Einen nächsten Schritt in der Klärung dieser Frage wird die Transfektion des D5.7A in die BSp73AS14 Zellen bringen, die aber im Moment noch nicht abgeschlossen ist. Desweiteren sind die Interaktionsdomänen der beiden Moleküle von Interesse, d.h. welche Variante des CD44, welche Regionen oder Aminosäuren sind an der Assoziation beteiligt, und wie ist die Assoziation reguliert? Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten wir feststellen, daß Depletion des Cholesterins aus der Membran, Zerstörung des Zytoskeletts durch Latrunculin B oder Nocodazol sowie Stimulierung der BSp73ASML Zellen mit PMA keinen Einfluß auf die Kopräzipitation der beiden Moleküle unter Lubrol Bedingungen zur Folge hat.

Die Tatsache, daß zwei Tetraspanin Moleküle, D6.1A und CD9, in dem Proteinkomplex enthalten sind lieferte einen weiteren interessanten Befund. Ausgehend von dieser Klassifizierung der Tetraspaninkomplexe, die in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, handelt es sich bei den von uns gefundenen Proteinkomplexen um Interaktionen der Stufe 3. Sowohl das variante CD44 als auch das D5.7A können zwar unter BRIJ98/99, CHAPS und Lubrol mit den Tetraspaninen kopräzipitiert werden, aber nicht mehr unter stringenteren Bedingungen wie BRIJ96 oder TX-100. Unterstützt wird diese Interpretation auch von den Befunden, daß wir zwei unterschiedliche variante Isoformen des CD44, nämlich CD44 meta-1 und meta-2, mit CD9 assoziiert finden, und auch in Keratinozyten CD44 – vermutlich die CD44 v3-v10 Isoform – mit CD9 unter CHAPS Lysis Bedingungen assoziiert ist (Jones et al., 1996). Dies läßt es als unwahrscheinlich erscheinen, daß eine spezielle Variante die Verbindung zu dem Tetraspanin herstellt, da

dies der Logik folgend nur v6 oder v7 sein könnte, diese aber in den drei genannten Isoformen in unterschiedlicher Position zu den Tetraspaninen vorliegen. Dennoch scheint diese Interaktion mit der Expression varianter Isoformen zu korrelieren, und wird ebenso wie die Interaktion mit D5.7A ein Schwerpunkt folgender Untersuchungen darstellen. Durch die Beteiligung von Tetraspaninen in den CD44v Komplexen wird das signaltransduktorische Potenzial nochmals erweitert. Darauf werde ich an späterer Stelle eingehen.

Als letztes der assoziierten Moleküle möchte ich das Annexin I näher betrachten. Die Annexine sind eine Familie konservierter Proteine, die sich durch zwei Charakteristika definieren. Sie binden Phospholipide der Membran in  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Abhängigkeit (Gerke and Moss, 1997). Annexin I und II benötigen dabei im Vergleich zu den anderen Annexinen niedrigere Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$ . Wesentliche Voraussetzung zur Bildung von Vesikeln über membranbindende Proteine ist die Eigenschaft, an (mindestens) zwei Stellen des Proteins mit der Membran zu interagieren. Das Annexin II hat 1 Membranbindungsstelle, aber durch Ausbildung eines Heterotetramers mit p11 besitzt der Komplex dann zwei Bindungsstellen. Annexin I hingegen besitzt zwei Membranbindungsstellen (de la Fuente and Parra, 1995; Meers et al., 1992). In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden beide Annexine auch in verschiedenartigen Vesikeln gefunden (Bitto and Cho, 1999). Annexin I kann man in den Membranen früher Endosomen/Phagosomen von Makrophagen, sowie in Phagosomen von Neutrophilen finden (Ernst, 1991; Kaufman et al., 1996). Auch in BHK oder MDCK Zellen kann das Annexin I in Plasmamembran und frühen Endosomen gefunden werden (Seemann et al., 1996). Von besonderer Bedeutung für die Beteiligung an intrazellulären Vesikeln ist dabei die Phosphorylierung des Annexin I, das auch ein Substrat der EGFR-Kinasen und PKC ist (De et al., 1986; Haigler et al., 1987). So findet man in NIH3T3 Zellen, die EGFR überexprimieren, Annexin I in multivesikulären Endosomen, wo es von den Rezeptorkinasen phosphoryliert werden kann (Futter et al., 1993). Im phosphorylierten Zustand benötigt Annexin I deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, um mit der Zellmembran zu interagieren, und ist über diesen Weg am Sorting des EGFR beteiligt (Futter et al., 1993). Auch an exocytotischen Prozessen wie der Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist Annexin I, wiederum in Abhängigkeit einer Phosphorylierung, beteiligt (Ohnishi et al., 1995). Desweiteren kann Annexin mit dem Aktin- und Tubulin-Zytoskelett assoziieren (Gerke and Weber, 1984; Tanaka et al., 1994; Traverso et al., 1998). Neben dem Potenzial zur Vesikelbildung wurde für Annexin I auch gezeigt, daß eine erhöhte Annexin I Expression über Einfluß auf die Kalzium-Freisetzung zur Runterregulation von Phospholipase C, Phospholipase A2 und E-Cadherin und somit erhöhtem Tumorwachstum führt (Frey et al., 1999). Weitere Befunde sind die Beteiligung an der Extravasation (Oliani et al., 2001), der Apoptoseresistenz (Wu et al., 2000) und der Signaltransduktion (Alldridge et al., 1999). Diese vielfältigen Funktionen machen das Annexin I zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen, im speziellen hinsichtlich der Frage möglicher Internalisierung und Redistribution der von uns beschriebenen Proteinkomplexe während Interaktionen der BSp73 ASML Zellen mit anderen Zellen oder der ECM im Verlauf der Metastasierung.

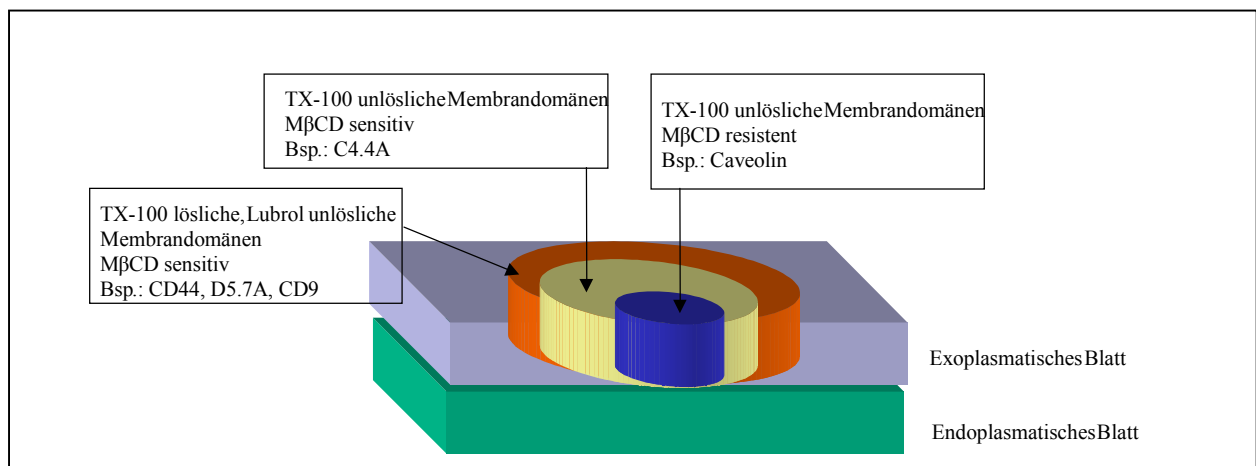
## 4.2 „LIPID RAFTS“

CD44 wurde in einer Reihe von Studien mit Detergenz unlöslichen Membranbereichen in Verbindung gebracht. So konnte in Fibroblasten die TX-100 Unlöslichkeit gezeigt werden (Neame and Isacke, 1993; Neame et al., 1995; Perschl et al., 1995), die unabhängig von der zytoplasmatischen, aber abhängig von der transmembranen Domäne von CD44 war (Perschl et al., 1995). Im Gegensatz dazu konnte in epithelialen Zellen und Lymphozyten selbst nach HA Exposition die Lokalisation in TX-100 resistenten Membrandomänen nicht nachgewiesen werden (Neame and Isacke, 1993; Neame et al., 1995). In Erweiterung dieser Befunde konnten Ilangumaran und Mitarbeiter nachweisen, daß CD44 nach Octylglucosid Lyse epithelialer Zellen, sowie niedrigerer Dosen TX-100 (0,2%) auch in den Detergenz resistenten Membrandomänen zu finden ist (Ilangumaran et al., 1997). Desweiteren wurde gezeigt, daß CD44 in Glykosphingolipid angereicherten Membrandomänen selektiv mit Mitgliedern der Src-Kinasen Familie assoziiert (Föger et al., 2000; Ilangumaran et al., 1998), auf diesem Weg als kostimulatorisches Molekül während der T-Zell-Aktivierung agiert (Föger et al., 2000), und auch das Rac-1 induzierte Rearrangement des Aktinzytoskeletts der T-Zellen beeinflusst (Föger et al., 2001). Gomez-Mouton und Mitarbeiter konnten zeigen, daß in aktivierten T-Lymphozyten, die einen migratorischen Phänotyp zeigen, CD44 in speziellen „Uropod-Rafts“, die durch GM1 charakterisiert sind, vorliegt, aber von „Leading-Rafts“, die durch GM3 charakterisiert werden, ausgeschlossen ist (Gomez-Mouton et al., 2001), was eine gerichtete Redistributi-on der beteiligten Moleküle wie CD44 zeigt. Ausgehend von diesen Befunden war es von Interesse, die Lokalisation des CD44 in Membransubdomänen in den BSp73AS/ASML Zellen zu studieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß CD44 in BSp73- und Progressor Zellen nicht Bestandteil von TX-100 resistenten Membransubdomänen ist (Abb.11). Dennoch kann es unter milderer Lysisbedingungen wie Lubrol (Abb.12), Brij98 und CHAPS in „Lipid Raft“ Strukturen gefunden werden. Typische nicht „Raft“ assoziierte Proteine, wie hier an CD71 gezeigt, lassen sich nicht in diesen Subdomänen finden, was die Spezifität der Lokalisation sicherstellt. Desweiteren konnte klar nachgewiesen werden, daß die Lubrol resistenten Subdomänen, in denen CD44 lokalisiert ist, cholesterinabhängig sind (Abb.12), da sie durch Behandlung der Zellen oder der Präzipitate mit M $\beta$ CD oder Filipin aufgelöst werden konnten. Daß CD44 über eine Assoziation mit dem Zytoskelett in die Detergenz unlöslichen Membransubdomänen dirigiert wird, ist auszuschließen, da es erstens nicht in TX-100 unlöslichen Domänen zu finden ist, und zweitens auch nach Behandlung der BSp73ASML Zellen mit Latrunculin B und Nocodazol, die das Aktin- bzw. Tubulinzytoskelett auflösen, in unveränderten Mengen in den „Lubrol Rafts“ zu finden ist. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Ergebnissen, die Oliferenko und Mitarbeiter in einer epithelialen Zelllinie beobachteten (Oliferenko et al., 1999). Dort konnte zwar ebenfalls eine Assoziation varianter Isoformen des CD44 mit Annexin II, das wie oben erwähnt dem Annexin I sehr ähnlich ist, und dem Aktin Zytoskelett im basolateralen Bereich der polarisierten Zellen gezeigt werden, und diese Komplexe sind ebenfalls „Lipid Raft“ assoziiert. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde das CD44 nach Zer-

störung des Zytoskeletts aber ausschließlich in „Lipid Rafts“ gefunden, wohingegen die Zytoskelettzerstörung keinen Einfluß auf die Menge der in „Lubrol Rafts“ befindlichen Proteinkomplexe hat.

Über eine ursächliche Beteiligung der Palmitoylierung an der Lokalisation des CD44 in den „Lubrol Rafts“ läßt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nur spekulieren. Die Generierung der drei Mutanten, bei denen die membraninternen und -proximalen Cysteine Cys 286 und Cys 295 gegen Alanine ausgetauscht wurden, sollte dem Zweck dienen, das für die Lokalisation in den „Rafts“ verantwortliche Cystein zu charakterisieren. Allerdings stellte sich heraus, daß CD44 in den BSp73ASML Zellen nur äußerst schwach palmitoyliert ist (Abb.20). Wie die CHO Transfektanden zeigen kann das CD44 meta-1 aber an beiden Cysteinen palmitoyliert werden, im wesentlichen wird aber das Cystein 286 palmitoyliert. Dennoch ist die Lokalisation innerhalb von „Lipid Raft“ Subdomänen der Membran davon weitestgehend unbeeinträchtigt. Um die Assoziation mit endogen synthetisiertem CD44 auszuschließen, sind Transfektionen der mutierten cDNAs in die CD44 negative Zelllinie SAT geplant. Bei Betrachtung der BSp73AS14 Zelllinie stellte sich heraus, daß sowohl CD44 meta-1 als auch CD44s in den Cholesterin abhängigen „Lubrol Raft“ Strukturen zu finden war. Dies könnte zeigen, daß die schwache Palmitoylierung des CD44 ausreicht, um die Moleküle in diese Subdomänen zu dirigieren, oder daß die Standard Isoform durch Interaktion mit der varianten Isoform in die Bereiche der „Lubrol Rafts“ mit integriert wird, was die Kopräzipitationen nahelegen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte auch für ein Tetraspanin, das CD151, gezeigt werden, daß die Palmitoylierung des Proteins keinen Einfluß auf die Lokalisation innerhalb von „Raft“ Strukturen hat (Yang et al., 2002). Dennoch konnte in diesem Modell bei fehlender Palmitoylierung eine verminderte Assoziation mit anderen Tetraspaninen gezeigt werden, sowie eine verändertes „Traffiking“ innerhalb der Zelle. Dies könnte ggf. in unseren Transfektanden auch das Auftreten einer um etwa 40kD größeren, vermutlich anders glykoslierten Form des CD44mut1/2 erklären. Aus diesem Grund ist es interessant CD44 Palmitoylierungsmutanten der BSp73AS herzustellen, um die eventuell bestehende Abhängigkeit der Assoziation von der Palmitoylierung zu überprüfen. Auch der Einfluß der Palmitoylierung auf die Proliferation oder andere funktionelle Aspekte könnte von Interesse sein. So konnte in humanen T Zellen gezeigt werden, daß die Palmitoylierung des CD44 mit der CD3 mediierten Signaltransduktion korreliert (Guo et al., 1994).

Ilangumaran und Mitarbeiter haben ausgehend von Ergebnissen, die durch Untersuchungen an Lymphozyten gemacht wurden, ein Schema für die Verteilung der unterschiedlich zu definierenden Subdomänen innerhalb der Zellmembran erarbeitet (Abb. D1). In Übereinstimmung mit diesem Modell können auf den BSp73ASML Zellen auch verschiedene Subdomänen durch Detergenzlöslichkeit und Cholesterinabhängigkeit beschrieben werden, und Beispiele für die in den verschiedenen Domänen angesiedelten Proteine sind der Abbildung zu entnehmen. Ausgehend von diesem Modell ist auch die Kolokalisation von CD44, D5.7A und CD9 einerseits sowie GM1 und C4.4A andererseits in „patching“ und „capping“ Experimenten zu erklären. Allerdings lassen sich die Befunde, daß Proteine der verschiedenen Subdomänen unter



**Abb. D1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Detergenz resistenten Subdomänen**

Darstellung einer möglichen Anordnung unterschiedlicher Subdomänen der Membran im exoplasmatischen Blatt der Zellmembran. Modifiziert nach Ilangumaran et al., 1998

milderen Lubrol Lysis Bedingungen nicht miteinander kopräzipitieren anhand dieses Modells nicht erklären. Um dieses Phänomen zu erklären, muß man die verschiedenen Subdomänen als unabhängig voneinander in der Membran vorkommende Einheiten betrachten, wie es auch von Röper und Mitarbeitern vorgeschlagen wird (Röper et al., 2000). Um ein genaueres Bild der Verteilung der verschiedenen „Rafts“ in der Membran zu erhalten, sollte die Verteilung nach so geringer Einflußnahme wie möglich untersucht werden. Zu diesem Zweck sind Analysen durch konfokale Mikroskopie geplant, die aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorliegen.

Desweiteren ergibt sich eine zweite Ebene der Diskussion durch den Befund, daß „Lubrol Rafts“ zwar in Abhängigkeit von Cholesterin existieren, aber die Proteinkomplexe, die wir den „Lubrol Rafts“ zuordnen, konnten diese Abhängigkeit nicht zeigen. Dies bedeutet wiederum, daß die von uns beschriebenen „Lubrol Raft“ assoziierten Proteine nicht miteinander kopräzipitieren, weil sie alle in der gleichen Subdomäne lokalisiert sind, sondern daß sie einen Proteinkomplex bilden, der inner- und außerhalb der „Lubrol Rafts“ existiert. Eine ähnliche Beobachtung machten Harder und Kuhn (Harder and Kuhn, 2000), die in Jurkat Zellen zeigen konnten, daß das LAT-Protein, sofern es palmitoyliert ist, in TCR angereicherten Membrandomänen zu finden ist. Im Gegensatz dazu waren in diesen Regionen typische „Raft-Marker“ wie GM1 oder Ick nur in geringen Mengen nachzuweisen. Harder und Kuhn folgern aus ihren Experimenten, daß die Interaktion zwischen TCR und LAT eher auf Protein-Interaktionen zurückzuführen ist, als auf die „Raft“-Assoziation.

Eine m.E. interessante Hypothese ist die, daß die „Lubrol-Raft“-Assoziation der einzelnen Komponenten der von uns beschriebenen Proteinkomplexe zum „Zusammenbau“ notwendig ist, aber sobald der Komplex gebildet ist, die Lokalisation in „Lubrol Rafts“ nicht mehr zwingend notwendig ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte man die BSp73ASML Zellen längere Zeit mit hohen Konzentrationen



PUFA (Poly-ungesättigten-Fettsäuren) (Stulnig et al., 1998; Stulnig et al., 2001) oder einem Cholesterinsynthesehemmer behandeln und das Vorkommen der Proteinkomplexe innerhalb der Membran analysieren (Stulnig et al., 1997). Auch die Inkubation der BSp73ASML mit Bromopalmitat, einem Palmitoylierungsinhibitor, wäre ein mögliches Vorgehen, um diese Frage zu klären (Creaser and Peterson, 2002).

Von entscheidender Bedeutung für das Zusammenspiel der verschiedenen „Lipid Rafts“ in der Membran könnte das Zytoskelett sein. So ist bei der Ausbildung der sog. immunologischen Synapse das Zytoskelett im wesentlichen für die fein abgestimmte Bereitstellung oder Entfernung der einzelnen Komponenten verantwortlich. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, daß die von uns beschriebenen Proteinkomplexe in den BSp73ASML nach Kreuzvernetzung mit Ezrin und Moesin kolokalisieren. Außerdem ist eine Anbindung des Annexin I an das Aktin- und Tubulinnetzwerk beschrieben, so daß sich vielfältige Möglichkeiten einer Assoziation ergeben. Desweiteren spricht die erhöhte Proliferation der BSp73ASML nach Kreuzvernetzung von variantem CD44 und D5.7A dafür (Abb.29), daß dieser Prozeß zu einer Umverteilung der Proteinkomplexe und signaltransduktorisch aktiver Elemente führt, der zur Aktivierung einer die Proliferation stimulierenden Signaltransduktionskaskade führt. Ausgehend von der Identifizierung der Bestandteile in BSp73ASML Zellen im Bereich von „Lubrol-Rafts“ vorliegender Proteinkomplexe, erfordert die detaillierte Klärung eines Zusammenhangs mit Reorganisation des Zytoskeletts und die Beteiligung an Signaltransduktionswegen noch mannigfaltige Untersuchungen, die im Rahmen einer Dissertation nicht zum Abschluß gebracht werden konnten. Abschließend möchte ich dennoch kurz diskutieren, daß die beschriebenen Befunde klare Evidenzen für eine über CD44v Komplexe initiierte Signaltransduktion erbringen, und welche weiterführenden Experimente sinnvoll erscheinen.

### 4.3 SIGNALTRANSDUKTION

Eine der wesentlichen Funktionen der Formierung von „Rafts“ ist die erleichterte Initiierung von Signaltransduktionskaskaden. Die am besten beschriebenen Beispiele hierfür sind die Signaltransduktion durch den IgE-Rezeptor und den TCR-CD3-Komplex (Baird et al., 1999; Field et al., 1995; Janes et al., 2000; Langlet et al., 2000; Sheets et al., 1999). Der T-Zell-Rezeptor liegt in einem Multiproteinkomplex vor, der mit den Haupthistokompatibilitäts(MHC)-Molekülen auf Antigen-Präsentierenden-Zellen (APC) interagiert. Nach einer solchen Interaktion beginnt eine Kaskade von Phosphorylierungsereignissen, in deren Verlauf eine Reihe von Molekülen an der Amplifikation und Regulation der Signale beteiligt sind. Zu diesen gehören Kinasen der src-Familie (Janes et al., 2000; Langlet et al., 2000), das LAT (Brdicka et al., 1998; Lin et al., 1999; Zhang et al., 1998), verschiedene GPI-verankerte Proteine sowie weitere akzessorische Moleküle und Phosphatasen (Cary and Cooper, 2000; Montixi et al., 1998; Viola et al., 1999; Xavier et al., 1998). Desweiteren ist das Aktin Zytoskelett (van der Merwe et al., 2000) in die Ausbildung der sog. immunologischen Synapse (Grakoui et al., 1999) involviert, d.h. die T-Zellen polarisieren und richten den Membranverkehr an die Kontaktstelle zur APC (van der Merwe et al., 2000).

Eine Involvierung einiger der von uns beschriebenen Moleküle wurde auch bei der T Zell Aktivierung beobachtet. So ist für CD44 bekannt, daß es mit Mitgliedern der Familie der src-Kinasen, wie *lck*, *lyn* und *fyn* assoziiert und so als kostimulatorisches Molekül in bspw. der T Zell Aktivierung agiert (Föger et al., 2000; Ilangumaran et al., 1998; Rozsnyay, 1999), aber auch Einfluß auf die Apoptose von Thymozyten hat (Föger et al., 2000). Desweiteren wurde die CD44 meta-1 Isoform in transgenen Mäusen mit beschleunigter Aktivierung von T Zellen in Verbindung gebracht (Moll et al., 1996). Die src Kinasen sind aber nicht nur in lymphoiden Zellen beschrieben, sondern auch in die Signaltransduktion von Tumorzellen involviert. So wurde gezeigt, daß *c-src* eine über Cortactin medierte Zytoskelett Reorganisation beeinflusst, die in der Folge zur Migration der Tumorzellen führt (Bourguignon et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, daß in humanen Pankreas-Karzinomen die src Kinasen häufig überexprimiert sind (Lutz et al., 1998). Die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade über die Kinasen der src Familie vorausgesetzt, bleibt die wesentliche Frage, wie die beiden Komponenten vereinigt werden. Das variante CD44 liegt in „Lubrol Rafts“, die src Kinasen in „TX-100 Rafts“ vor. Ein analoges Problem wurde für den Fcε-Rezeptor I beobachtet. Holowka und Mitarbeiter konnten zeigen, daß der FcεRI nach Kreuzvernetzung Anschluß an TX-100 unlösliche Membrankompartimente erhält und eine Signaltransduktion einsetzt. Über Aktin-Polymerisierung wiederum wurden die FcεRI-Komplexe aus den „Signalplattformen“ entfernt, was über Cytochalasin D inhibiert werden konnte und zu verlängerter signaltransduktori-scher Aktivität führte. In den von uns beschriebenen Proteinkomplexen bietet CD44 die Möglichkeit über Mitglieder der ERM Familie an das Aktin-Zytoskelett angeschlossen zu werden. Eine solche Kolokalisation nach Kreuzvernetzung konnte auch gezeigt werden (Abb. 17). Die Regulation der ERM Proteine kann dabei auf vielfältige Weise geschehen. Tyrosin Phosphorylierung ausgelöst durch Rezeptor Kinasen oder auch Serin-Threonin Phosphorylierung, die durch die Rho-GTPase vermittelt werden kann, spielen dabei eine wichtige Rolle. Ebenso erleichtert das PIP<sub>2</sub>, das ebenfalls in „Lipid Rafts“ vorliegt, die Bindung von ERM Proteinen an CD44. Auch die Kolokalisation mit der Rho GTPase nach Kreuzvernetzung konnte von uns gezeigt werden (Abb. 27), so daß in Analogie für den beim Fcε-Rezeptor beschriebenen „Abtransport“ der Proteinkomplexe aus einer TX-100 unlöslichen Signaltransduktionsplattform alle notwendigen Komponenten zur Verfügung stehen. Wie jedoch der mögliche Zusammenschluß von „Lubrol Rafts“ und „TX-100 Rafts“ zustande kommt, inwieweit und welche Komponenten der von uns beschriebenen Komplexe in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, bleibt Zielsetzung weiterer Untersuchungen.

Für die von uns beobachtete Phosphorylierung eines 20-22 kD großen Proteins kommen Mitglieder der src Kinasen Familie allerdings nicht in Frage, da wir die Phosphorylierung als Serin- oder Threoninphosphorylierung bestimmen konnten, und die src Kinasen eine Tyrosinphosphorylierung vornehmen. Potentielle Kandidaten für eine Serin oder Threonin Phosphorylierung sind die Mitglieder der Protein Kinase C Familie. So konnte gezeigt werden, daß bestimmte Fibroblasten Protein Kinase C Aktivität benötigen, um auf einen Stimulus über HA reagieren zu können (Hall et al., 2001). Wiederum beschrieben ist, daß CD9

intrazellulär mit der aktivierten Protein Kinase C assoziiert sein kann (Zhang et al., 2001), was einen Zugang der von uns beschriebenen Komplexe zur Protein Kinase C erklären könnte.

Eine dritte potentielle Möglichkeit der Signaltransduktion durch die beschriebenen Proteinkomplexe ist die Assoziation mit proHB-EGF, welches als mit CD9 Komplexen assoziiert beschrieben ist (Nakamura et al., 1995), und nach Abspaltung als Transaktivator des EGF-Rezeptors fungieren kann. Die mögliche Assoziation von phosphorylierten ERM Proteinen mit CD44 wurde bereits erwähnt.

Schließlich, und als am besten beschriebene Interaktion, sei noch die Signaltransduktion über die kleinen G-Proteine Rho und Rac erwähnt, die wir nach Kreuzvernetzung des CD44 mit dem Komplex kolokalisiert gefunden haben. Die Signaltransduktion über Rac löst eine Reorganisation des Zytoskeletts aus, die nach Kreuzvernetzung von CD44 in Lymphozyten (Föger et al., 2001), Keratinozyten (Cywes) und verschiedenen Tumorzelllinien (Bourguignon et al., 2000) beobachtet wurde. Obwohl in allen diesen beschriebenen Systemen als zentrale Elemente das (variante) CD44 und Rac-1 aufscheinen, ergeben sich bei den intermediären Stufen doch deutliche Unterschiede. So beschreiben Bourguignon und Mitarbeiter die Interaktion des CD44 mit Tiam1 als zentrales Protein, das die Aktivierung des Rac-1 auslöst, wohingegen Cywes und Mitarbeiter ein bisher noch nicht indentifiziertes, aber in jedem Falle Tyrosinphosphoryliertes Protein als maßgeblich definieren. Betrachtet man das Modell von Cywes und Mitarbeitern, fällt auf, daß durch „einfaches“ kreuzvernetzen von CD44 in einer Keratinozytenkultur sowohl die Zonula Occludens, als auch die Cadherin vermittelten Zellkontakte aufgelöst wurden, eine über Rac-1 mediierte Reorganisation des Zytoskeletts stattfindet und verstärkte Internalisierung von Endosomen zu beobachten war. Dies legt nahe, daß eine ganze Reihe von signaltransduktorischen Prozessen durch das Kreuzvernetzen von CD44 in Gang gesetzt werden können. Betrachtet man andererseits, daß für Keratinozyten sowohl eine Interaktion von variantem CD44 mit CD9, als auch von CD9 mit  $\beta$ 1-Integrin beschrieben ist (Jones et al., 1996), so kommt dieses System, dem von uns beschriebenen recht nahe, und könnte ein lohnendes Untersuchungsobjekt für Interaktionen und Signaltransduktion varianter CD44 Isoformen enthaltender Proteinkomplexe darstellen.

#### 4.4 PERSPEKTIVEN

Ausgehend von den Untersuchungen über die CD44v enthaltenden Proteinkomplexe in den „Lubrol Raft“ Subdomänen der BSp73ASML Zellen ergeben sich eine Reihe weiterer Fragen, die zur Bearbeitung anstehen. In erster Linie sollten für die beteiligten Proteine die Regionen und/oder Aminosäuren, die die Assoziation bedingen aufgeklärt werden. Hierzu dürften verschiedene Transfektanden und Mutanten der verschiedenen Moleküle unerlässlich sein. Die Generierung einiger Doppeltransfektanden im BSp73AS Zellsystem ist bereits auf den Weg gebracht. Einen zweiten Schwerpunkt bildet die Klärung der Assoziation mit intrazellulären Molekülen, die hier nur im Kontext der Signaltransduktion kurz angesprochen wurde. Neben mikroskopischen Lokalisationsstudien, werden auch zur Beantwortung dieser Frage Mutationen und partielle Deletionen im zytoplasmatischen Bereich der beteiligten Moleküle erforderlich sein. Damit komme ich zum dritten Aspekt weiter zu führender Untersuchungen, der Signaltransduktionskaskaden, die durch die von uns beschriebenen Komplexe initiiert werden. Hier muß in erster Instanz das in in-vitro Kinase Assays phosphorylierte 22 kD große Molekül identifiziert werden. Desweiteren sollten Studien über die Kinetik von Phosphorylierungen nach Stimulation oder Antikörper-Kreuzvernetzung betrieben werden. Auch der Einsatz spezieller Inhibitoren wie PP2, Gö6893 oder Genistein sowie bekannter Substrate spezifischer Kinasen dürfte ein vielversprechender Ansatz sein. All diese Untersuchungen haben das Ziel, die funktionelle Bedeutung dieser Komplexbildung für den Metastasierungsprozeß zu definieren. Dies impliziert auch die Weiterführung der funktionellen in-vitro Studien, evtl. unter Hinzunahme weiterer Testsysteme zur Überprüfung des migratorischen Potenzials und letztlich eine in vivo Kontrolle. Für die Beantwortung einzelner dieser Fragestellungen bietet sich auch das Modell der Lymphozytenaktivierung an. Wissend, daß CD9 konstitutiv auf Lymphozyten exprimiert ist, und variantes CD44 nach Aktivierung hoch reguliert wird, ergeben sich aufgrund des weit fortgeschrittenen Wissensstandes, speziell im Bereich der Signaltransduktion, zahlreiche Möglichkeiten die Funktion von in Proteinkomplexen vorliegenden varianten Isoformen des CD44 zu klären. Die Liste der Fragen, die durch den Nachweis, daß variante Isoformen des CD44 in metastasierenden Tumorzellen als Proteinkomplexe, u.a. mit weiteren metastasierungsassoziierten Proteinen in Subdomänen der Membran vorliegen, aufgeworfen wurde, ließe sich beliebig fortsetzen. Ich hoffe es ist mir gelungen zu zeigen, daß die Beantwortung dieser Frage lohnend ist, da es gute Gründe für die Annahme gibt, daß die Komplexbildung von variantem CD44 in speziellen Membrandomänen ein wesentliches Schlüsselement bei Tumorprogression und Metastasierung darstellen könnte.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Akeson, R., and Warren, S. L. (1984). Detection of a cell surface antigen found on rat peripheral nervous system neurons and multiple glia: astrocytes, oligodendrocytes, and Schwann cells. *J Neurosci Res* *12*, 41-57.
- Alldrige, L. C., Harris, H. J., Plevin, R., Hannon, R., and Bryant, C. E. (1999). The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem* *274*, 37620-8.
- Angelisova, P., Hilgert, I., and Horejsi, V. (1994). Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* *39*, 249-56.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* *50*, 197-263.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., and Zöller, M. (1992). Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* *257*, 682-5.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* *61*, 1303-13.
- Baird, B., Sheets, E. D., and Holowka, D. (1999). How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys Chem* *82*, 109-19.
- Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., and Litvinov, S. V. (1998). Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* *18*, 4833-43.
- Balzar, M., Prins, F. A., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., and Litvinov, S. V. (1999). The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* *246*, 108-21.
- Basu, A., Goldenberg, D. M., and Stein, R. (1995). The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7-3G11, is phosphorylated on serine 303. *Int J Cancer* *62*, 472-9.
- Bell, G. M., Seaman, W. E., Niemi, E. C., and Imboden, J. B. (1992). The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line. *J Exp Med* *175*, 527-36.
- Bennett, K. L., Jackson, D. G., Simon, J. C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., and Aruffo, A. (1995). CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* *128*, 687-98.
- Ben-Ze'ev, A., Zöller, M., and Raz, A. (1986). Differential expression of intermediate filament proteins in metastatic and nonmetastatic variants of the BSp73 tumor. *Cancer Res* *46*, 785-90.
- Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* *114*, 4143-51.
- Berditchevski, F., Bazzoni, G., and Hemler, M. E. (1995). Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem* *270*, 17784-90.
- Berditchevski, F., Tolias, K. F., Wong, K., Carpenter, C. L., and Hemler, M. E. (1997). A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* *272*, 2595-8.
- Berditchevski, F., Zutter, M. M., and Hemler, M. E. (1996). Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell* *7*, 193-207.
- Berg, E. L., Goldstein, L. A., Jutila, M. A., Nakache, M., Picker, L. J., Streeter, P. R., Wu, N. W., Zhou, D., and Butcher, E. C. (1989). Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* *108*, 5-18.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-23.

- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-48.
- Bitto, E., and Cho, W. (1999). Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38, 14094-100.
- Boismenu, R., Rhein, M., Fischer, W. H., and Havran, W. L. (1996). A role for CD81 in early T cell development. *Science* 271, 198-200.
- Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58, 1189-205.
- Bourguignon, L. Y., Gunja Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J., and Cardiff, R. D. (1998). CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 176, 206-15.
- Bourguignon, L. Y., and Jin, H. (1995). Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor and its role in the regulation of IP3-mediated internal Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* 270, 7257-60.
- Bourguignon, L. Y., Kalomiris, E. L., and Lokeshwar, V. B. (1991). Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 266, 11761-5.
- Bourguignon, L. Y., Lokeshwar, V. B., Chen, X., and Kerrick, W. G. (1993). Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J Immunol* 151, 6634-44.
- Bourguignon, L. Y., Lokeshwar, V. B., He, J., Chen, X., and Bourguignon, G. J. (1992). A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol Cell Biol* 12, 4464-71.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2000). Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol* 150, 177-91.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2001). CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem* 276, 7327-36.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Zhou, B., Diedrich, F., Singleton, P. A., and Hung, M. C. (2001). Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 276, 48679-92.
- Boxberger, H. J., Paweletz, N., Spiess, E., and Kriehuber, R. (1989). An in vitro model study of BSp73 rat tumour cell invasion into endothelial monolayer. *Anticancer Res* 9, 1777-86.
- Brdicka, T., Cerny, J., and Horejsi, V. (1998). T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 356-60.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-36.
- Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-44.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St John, T., Wayner, E., and Carter, W. G. (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 113, 207-21.
- Cary, L. A., and Cooper, J. A. (2000). Molecular switches in lipid rafts. *Nature* 404, 945, 947.
- Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett* 516, 139-44.

- Christ, O., Günthert, U., Haas, R., and Zöller, M. (2001). Importance of CD44v7 isoforms for homing and seeding of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol* 69, 343-52.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G. M., Mally, M. I., Lopez, A. D., Fannon, A., Ptasznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., Ellisman, M., Reisfeld, R. A., and Hayek, A. (1998). KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140, 1519-34.
- Claas, C., Herrmann, K., Matzku, S., Moller, P., and Zöller, M. (1996). Developmentally regulated expression of metastasis-associated antigens in the rat. *Cell Growth Differ* 7, 663-78.
- Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M., and Zöller, M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol* 141, 267-80.
- Claas, C., Stipp, C. S., and Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem* 276, 7974-84.
- Conrad, P., Rothman, B. L., Kelley, K. A., and Blue, M. L. (1992). Mechanism of peripheral T cell activation by coengagement of CD44 and CD2. *J Immunol* 149, 1833-9.
- Cooper, D. L., Dougherty, G., Harn, H. J., Jackson, S., Baptist, E. W., Byers, J., Datta, A., Phillips, G., and Isola, N. R. (1992). The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 569-78.
- Creaser, S. P., and Peterson, B. R. (2002). Sensitive and rapid analysis of protein palmitoylation with a synthetic cell-permeable mimic of SRC oncoproteins. *J Am Chem Soc* 124, 2444-5.
- Dalchau, R., Kirkley, J., and Fabre, J. W. (1980). Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10, 745-9.
- De, B. K., Misono, K. S., Lukas, T. J., Mroczkowski, B., and Cohen, S. (1986). A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. *J Biol Chem* 261, 13784-92.
- de la Fuente, M., and Parra, A. V. (1995). Vesicle aggregation by annexin I: role of a secondary membrane binding site. *Biochemistry* 34, 10393-9.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., and Siegelman, M. H. (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278, 672-5.
- Dougherty, G. J., Landorp, P. M., Cooper, D. L., and Humphries, R. K. (1991). Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J Exp Med* 174, 1-5.
- Ernst, J. D. (1991). Annexin III translocates to the periphagosomal region when neutrophils ingest opsonized yeast. *J Immunol* 146, 3110-4.
- Faassen, A. E., Schragar, J. A., Klein, D. J., Oegema, T. R., Couchman, J. R., and McCarthy, J. B. (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 116, 521-31.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67.
- Field, K. A., Holowka, D., and Baird, B. (1995). Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9201-5.
- Föger, N., Marhaba, R., and Zöller, M. (2000). CD44 supports T cell proliferation and apoptosis by apposition of protein kinases. *Eur J Immunol* 30, 2888-99.
- Föger, N., Marhaba, R., and Zöller, M. (2001). Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. *J Cell Sci* 114, 1169-78.

- Frey, B. M., Reber, B. F., Vishwanath, B. S., Escher, G., and Frey, F. J. (1999). Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. *Faseb J* 13, 2235-45.
- Friedrichson, T., and Kurzchalia, T. V. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394, 802-5.
- Frogner, F. J., and O'Neill, H. C. (1992). Lymphocyte recirculation: the need for site-specific receptors to dictate T-lymphocyte localization into different tissue sites. *Scand J Immunol* 35, 627-32.
- Fukudome, K., Furuse, M., Imai, T., Nishimura, M., Takagi, S., Hinuma, Y., and Yoshie, O. (1992). Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. *J Virol* 66, 1394-401.
- Futter, C. E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A., and Hopkins, C. R. (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 120, 77-83.
- Gerke, V., and Moss, S. E. (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357, 129-54.
- Gerke, V., and Weber, K. (1984). Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *Embo J* 3, 227-33.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., and Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-72.
- Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S., and Martinez, A. C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9642-7.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-7.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24.
- Guo, Y., Wu, Y., Shinde, S., Sy, M. S., Aruffo, A., and Liu, Y. (1996). Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J Exp Med* 184, 955-61.
- Guo, Y. J., Lin, S. C., Wang, J. H., Bigby, M., and Sy, M. S. (1994). Palmitoylation of CD44 interferes with CD3-mediated signaling in human T lymphocytes. *Int Immunol* 6, 213-21.
- Habermaas, S., and Spiess, E. (1992). Cell surface glycosylation and characterization of a differentially expressed glycoprotein in metastatic and non metastatic cell lines of the rat BSp73 tumor. *Anticancer Res* 12, 1251-8.
- Hadjiolov, N., and Zimmermann, H. P. (1992). Monoclonal antibodies distinguishing between two rat pancreatic carcinoma cell lines with different metastatic capacities. *Neoplasma* 39, 147-50.
- Haigler, H. T., Schlaepfer, D. D., and Burgess, W. H. (1987). Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 262, 6921-30.
- Hall, C. L., Collis, L. A., Bo, A. J., Lange, L., McNicol, A., Gerrard, J. M., and Turley, E. A. (2001). Fibroblasts require protein kinase C activation to respond to hyaluronan with increased locomotion. *Matrix Biol* 20, 183-92.
- Hamilton, M. S., Ball, J., Bromidge, E., and Franklin, I. M. (1991). Surface antigen expression of human neoplastic plasma cells includes molecules associated with lymphocyte recirculation and adhesion. *Br J Haematol* 78, 60-5.



- Harder, T., and Kuhn, M. (2000). Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J Cell Biol* *151*, 199-208.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* *141*, 929-42.
- He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishihara, K., and Kincade, P. W. (1992). Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J Cell Biol* *119*, 1711-9.
- Hemler, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* *155*, 1103-7. Submitted
- Hemler, M. E., Mannion, B. A., and Berditchevski, F. (1996). Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* *1287*, 67-71.
- Herlevsen, M., Schmidt, D. S., and Zöller, M. (2002). Co-expression of the alpha6beta4 integrin and the tetraspanin D6.1A supports formation of liver metastasis. Eingereicht
- Herrlich, P., Rudy, W., Hofmann, M., Arch, R., Zöller, M., Zawadzki, V., Tolg, C., Hekele, A., Koopman, G., Pals, S., Heider, K. H., Sleeman, J., and Ponta, H. (1993). Cell Adhesion molecules (M.E. Hemler and E. Michich, Eds.), 265-288.
- Herrlich, P., Zöller, M., Pals, S. T., and Ponta, H. (1993). CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* *14*, 395-9.
- Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., and Tsukita, S. (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* *135*, 37-51.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and Günthert, U. (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* *51*, 5292-7.
- Hooper, N. M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol* *16*, 145-56.
- Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1998). CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem* *273*, 30537-43.
- Horwitz, A. F., and Hunter, T. (1996). Cell adhesion: integration circuitry. *Trends Cell Biol* *6*, 460-461.
- Ilangumaran, S., and Hoessli, D. C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* *335*, 433-40.
- Ilangumaran, S., Briol, A., and Hoessli, D. C. (1998). CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood* *91*, 3901-8.
- Ilangumaran, S., Briol, A., and Hoessli, D. C. (1997). Distinct interactions among GPI-anchored, transmembrane and membrane associated intracellular proteins, and sphingolipids in lymphocyte and endothelial cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* *1328*, 227-36.
- Isacke, C. M., Sauvage, C. A., Hyman, R., Lesley, J., Schulte, R., and Trowbridge, I. S. (1986). Identification and characterization of the human Pgp-1 glycoprotein. *Immunogenetics* *23*, 326-32.
- Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *Embo J* *13*, 2322-30.
- Jackson, D. G., Buckley, J., and Bell, J. I. (1992). Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* *267*, 4732-9.

- Jalkanen, S., and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-25.
- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M., and Butcher, E. C. (1988). Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol* 141, 1615-23.
- Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147, 447-61.
- Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12, 23-34.
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C., and Mason, D. Y. (1984). Transferin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312, 162-3.
- Jones, P. H., Bishop, L. A., and Watt, F. M. (1996). Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun* 4, 297-305.
- Kalomiris, E. L., and Bourguignon, L. Y. (1988). Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin. *J Cell Biol* 106, 319-27.
- Kao, F. T., and Puck, T. T. (1968). Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 1275-81.
- Katagiri, Y. U., Sleeman, J., Fujii, H., Herrlich, P., Hotta, H., Tanaka, K., Chikuma, S., Yagita, H., Okumura, K., Murakami, M., Saiki, I., Chambers, A. F., and Uede, T. (1999). CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 59, 219-26.
- Kaufman, M., Leto, T., and Levy, R. (1996). Translocation of annexin I to plasma membranes and phagosomes in human neutrophils upon stimulation with opsonized zymosan: possible role in phagosome function. *Biochem J* 316, 35-42.
- Khaldoyanidi, S., Denzel, A., and Zöller, M. (1996). Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol* 60, 579-92.
- Kobayashi, M., Imamura, M., Uede, T., Sakurada, K., Maeda, S., Iwasaki, H., Tsuda, Y., Musashi, M., and Miyazaki, T. (1994). Expression of adhesion molecules on human hematopoietic progenitor cells at different maturational stages. *Stem Cells* 12, 316-21.
- Kufer, P., Mack, M., Gruber, R., Lutterbuse, R., Zettl, F., and Riethmuller, G. (1997). Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 45, 193-7.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., and He, H. T. (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 12, 250-5.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-21.
- Lesley, J., and Hyman, R. (1992). CD44 can be activated to function as an hyaluronic acid receptor in normal murine T cells. *Eur J Immunol* 22, 2719-23.
- Liao, H. X., Levesque, M. C., Patton, K., Bergamo, B., Jones, D., Moody, M. A., Telen, M. J., and Haynes, B. F. (1993). Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 151, 6490-9.
- Lin, J., Weiss, A., and Finco, T. S. (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* 274, 28861-4.

- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* *148*, 865-75.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* *125*, 437-46.
- Liu, D., and Sy, M. S. (1997). Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J Immunol* *159*, 2702-11.
- Liu, D., Zhang, D., Mori, H., and Sy, M. S. (1996). Binding of CD44 to hyaluronic acid can be induced by multiple signals and requires the CD44 cytoplasmic domain. *Cell Immunol* *174*, 73-83.
- LoBuglio, A. F., and Saleh, M. N. (1992). Advances in monoclonal antibody therapy of cancer. *Am J Med Sci* *304*, 214-24.
- Lodish, H., Berk, A., Zipurski, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2001). *Molecular Cell Biology*. .
- Lokeshwar, V. B., and Bourguignon, L. Y. (1991). Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem* *266*, 17983-9.
- Lokeshwar, V. B., Fregien, N., and Bourguignon, L. Y. (1994). Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol* *126*, 1099-109.
- Lokeshwar, V. B., Iida, N., and Bourguignon, L. Y. (1996). The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* *271*, 23853-64.
- Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol* *30*, 900-7.
- Lutz, M. P., Esser, I. B., Flossmann-Kast, B. B., Vogelmann, R., Luhrs, H., Friess, H., Buchler, M. W., and Adler, G. (1998). Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* *243*, 503-8.
- Maecker, H. T., Todd, S. C., and Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J* *11*, 428-42.
- Mannion, B. A., Berditchevski, F., Kraeft, S. K., Chen, L. B., and Hemler, M. E. (1996). Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol* *157*, 2039-47.
- Marshall, C. J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* *64*, 313-26.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildnerberger, M., and Zöller, M. (1983). Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* *3*, 109-23.
- Matzku, S., Wenzel, A., Liu, S., and Zöller, M. (1989). Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res* *49*, 1294-9.
- Meers, P., Mealy, T., Pavlotsky, N., and Tauber, A. I. (1992). Annexin I-mediated vesicular aggregation: mechanism and role in human neutrophils. *Biochemistry* *31*, 6372-82.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., and Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* *274*, 3910-7.
- Milstone, L. M., Hough-Monroe, L., Kugelman, L. C., Bender, J. R., and Haggerty, J. G. (1994). Epican, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan form of CD44, mediates cell-cell adhesion. *J Cell Sci* *107*, 3183-90.

- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., and Mekada, E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287, 321-4.
- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T., and Kincade, P. W. (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171, 477-88.
- Moll, J., Schmidt, A., van der Putten, H., Plug, R., Ponta, H., Herrlich, P., and Zöller, M. (1996). Accelerated immune response in transgenic mice expressing rat CD44v4-v7 on T cells. *J Immunol* 156, 2085-94.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17, 5334-48.
- Morimoto, K., Robin, E., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Li, Y., Clay, D., Jasmin, C., and Smadja-Joffe, F. (1994). CD44 mediates hyaluronan binding by human myeloid KG1A and KG1 cells. *Blood* 83, 657-62.
- Murakami, S., Shimabukuro, Y., Miki, Y., Saho, T., Hino, E., Kasai, D., Nozaki, T., Kusumoto, Y., and Okada, H. (1994). Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton association but does require new protein synthesis. *J Immunol* 152, 467-77.
- Muschel, R. J., Williams, J. E., Lowy, D. R., and Liotta, L. A. (1985). Harvey ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am J Pathol* 121, 1-8.
- Nakamura, K., Iwamoto, R., and Mekada, E. (1995). Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites. *J Cell Biol* 129, 1691-705.
- Naor, D., Sionov, R. V., and Ish Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 71241-319.
- Neame, S. J., and Isacke, C. M. (1993). The cytoplasmic tail of CD44 is required for basolateral localization in epithelial MDCK cells but does not mediate association with the detergent-insoluble cytoskeleton of fibroblasts. *J Cell Biol* 121, 1299-310.
- Neame, S. J., and Isacke, C. M. (1992). Phosphorylation of CD44 in vivo requires both Ser323 and Ser325, but does not regulate membrane localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *Embo J* 11, 4733-8.
- Neame, S. J., Uff, C. R., Sheikh, H., Wheatley, S. C., and Isacke, C. M. (1995). CD44 exhibits a cell type dependent interaction with triton X-100 insoluble, lipid rich, plasma membrane domains. *J Cell Sci* 108, 3127-35.
- Nichols, T. C., Guthridge, J. M., Karp, D. R., Molina, H., Fletcher, D. R., and Holers, V. M. (1998). Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur J Immunol* 28, 4123-9.
- Nicolson, G. L., Gallick, G. E., Spohn, W. H., Lembo, T. M., and Tainsky, M. A. (1992). Transfection of activated c-H-rasEJ/pSV2neo or pSV2neo genes into rat mammary cells: rapid stimulation of clonal diversification of spontaneous metastatic and cell-surface properties. *Oncogene* 7, 1127-35.
- Nottenburg, C., Rees, G., and St John, T. (1989). Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8521-5.
- Ohnishi, M., Tokuda, M., Masaki, T., Fujimura, T., Tai, Y., Itano, T., Matsui, H., Ishida, T., Konishi, R., Takahara, J., and et al. (1995). Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 136, 2421-6.
- Oliani, S. M., Paul-Clark, M. J., Christian, H. C., Flower, R. J., and Perretti, M. (2001). Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. *Am J Pathol* 158, 603-15.

- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Günthert, U., and Huber, L. A. (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* *146*, 843-54.
- Paterson, D. J., Jefferies, W. A., Green, J. R., Brandon, M. R., Cortesy, P., Puklavec, M., and Williams, A. F. (1987). Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol* *24*, 1281-90.
- Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., and Aruffo, A. (1993). Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol* *122*, 257-64.
- Peck, D., and Isacke, C. M. (1998). Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *J Cell Sci* *111*, 1595-601.
- Perschl, A., Lesley, J., English, N., Hyman, R., and Trowbridge, I. S. (1995). Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J Cell Sci* *108*, 1033-41.
- Pozzatti, R., Muschel, R., Williams, J., Padmanabhan, R., Howard, B., Liotta, L., and Khoury, G. (1986). Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science* *232*, 223-7.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* *148*, 997-1008.
- Pure, E., Camp, R. L., Peritt, D., Panettieri, R. A., Jr., Lazaar, A. L., and Nayak, S. (1995). Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J Exp Med* *181*, 55-62.
- Raz, A., Zöller, M., and Ben, Z. e. (1986). Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* *162*, 127-41.
- Reisser, D., Olsson, N. O., and Martin, F. (1993). In vivo and in vitro reactivity of rat spleen cells against regressor and progressor colon-cancer cell variants. *Int J Cancer* *53*, 651-6.
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* *1451*, 1-16.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., and Pichlmayr, R. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* *16*, 1788-94.
- Röper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* *2*, 582-92.
- Rösel, M., Claas, C., Seiter, S., Herlevsen, M., and Zöller, M. (1998). Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* *17*, 1989-2002.
- Rösel, M., Khaldoyanidi, S., Zawadzki, V., and Zöller, M. (1999). Involvement of CD44 variant isoform v10 in progenitor cell adhesion and maturation. *Exp Hematol* *27*, 698-711.
- Rozsnyay, Z. (1999). Signaling complex formation of CD44 with src-related kinases. *Immunol Lett* *68*, 101-8.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M., and Boucheix, C. (1994). CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol* *24*, 3005-13.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., and Boucheix, C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* *26*, 2657-65.

- Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K. H., Ponta, H., and Herrlich, P. (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 53, 1262-8.
- Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* 29, 10670-5.
- Scheiffele, P., Roth, M. G., and Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J* 16, 5501-8.
- Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E. S., Schmitz, B., and Schachner, M. (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43, 12-31.
- Schon, M. P., Schon, M., Klein, C. E., Blume, U., Bisson, S., and Orfanos, C. E. (1994). Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol* 102, 987-91.
- Schon, M. P., Schon, M., Klein, C. E., Kaufmann, R., Herzberg, F., Schmidt, R., and Orfanos, C. E. (1995). Properties of the carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4 in normal and transformed human keratinocytes: regulation of synthesis, molecular cross-linking and ultrastructural localization. *Br J Dermatol* 133, 176-85.
- Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12130-4.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I., and Jackson, D. G. (1993). The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* 268, 12235-8.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., and Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12160-4.
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R. G., and Gerke, V. (1996). The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca<sup>2+</sup> and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell* 7, 1359-74.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., and Zöller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 177, 443-55.
- Seiter, S., Engel, P., Fohr, N., and Zöller, M. (1999). Mitigation of delayed-type hypersensitivity reactions by a CD44 variant isoform v3-specific antibody: blockade of leukocyte egress. *J Invest Dermatol* 113, 11-21.
- Seiter, S., Schmidt, D. S., and Zöller, M. (2000). The CD44 variant isoforms CD44v6 and CD44v7 are expressed by distinct leukocyte subpopulations and exert non-overlapping functional activities. *Int Immunol* 12, 37-49.
- Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D. O., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1999). Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 340, 103-11.
- Sheets, E. D., Holowka, D., and Baird, B. (1999). Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 3, 95-9.
- Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* 12, 1058-71.
- Shi, W., Fan, H., Shum, L., and Derynck, R. (2000). The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol* 148, 591-602.
- Shimizu, Y., and Shaw, S. (1991). Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb J* 5, 2292-9.

- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-72.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 31-9.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* *27*, 6197-202.
- Sincock, P. M., Fitter, S., Parton, R. G., Berndt, M. C., Gamble, J. R., and Ashman, L. K. (1999). PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci* *112*, 833-44.
- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720-31.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., Iida, J., and Skubitz, A. P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol* *157*, 3617-26.
- Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P., and Ponta, H. (1996). Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* *135*, 1139-50.
- Sleeman, J. P., Arming, S., Moll, J. F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L. S., Kreil, G., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* *56*, 3134-41.
- Sleeman, J. P., Kondo, K., Moll, J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1997). Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J Biol Chem* *272*, 31837-44.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M., and Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* *56*, 1057-62.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* *10*, 343-8.
- Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Raederstorff, D., Stockinger, H., and Waldhausl, W. (1998). Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol* *143*, 637-44.
- Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Stockinger, H., Horejsi, V., and Waldhausl, W. (1997). Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J Biol Chem* *272*, 19242-7.
- Stulnig, T. M., Huber, J., Leitinger, N., Imre, E. M., Angelisova, P., Nowotny, P., and Waldhausl, W. (2001). Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* *276*, 37335-40.
- Sy, M. S., Liu, D., Schiavone, R., Ma, J., Mori, H., and Guo, Y. (1996). Interactions between CD44 and hyaluronic acid: their role in tumor growth and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* *213*, 129-53.
- Taher, T. E., Smit, L., Griffioen, A. W., Schilder-Tol, E. J., Borst, J., and Pals, S. T. (1996). Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem* *271*, 2863-7.
- Tanaka, K., Tashiro, T., Sekimoto, S., and Komiya, Y. (1994). Axonal transport of actin and actin-binding proteins in the rat sciatic nerve. *Neurosci Res* *19*, 295-302.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* *361*, 79-82.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4.
- Toyama-Sorimachi, N., and Miyasaka, M. (1994). A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int Immunol* *6*, 655-60.

- Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K., and Miyasaka, M. (1995). A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* *270*, 7437-44.
- Traverso, V., Morris, J. F., Flower, R. J., and Buckingham, J. (1998). Lipocortin 1 (annexin 1) in patches associated with the membrane of a lung adenocarcinoma cell line and in the cell cytoplasm. *J Cell Sci* *111*, 1405-18.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., and Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* *126*, 391-401.
- Tsukita, S., and Yonemura, S. (1997). ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 70-5.
- Tsukita, S., and Yonemura, S. (1997). ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci* *22*, 53-8.
- Tuck, A. B., Wilson, S. M., and Chambers, A. F. (1990). ras transfection and expression does not induce progression from tumorigenicity to metastatic ability in mouse LTA cells. *Clin Exp Metastasis* *8*, 417-31.
- Turley, E. A., Austen, L., Vandelight, K., and Clary, C. (1991). Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol* *112*, 1041-7.
- Uff, C. R., Neame, S. J., and Isacke, C. M. (1995). Hyaluronan binding by CD44 is regulated by a phosphorylation-independent mechanism. *Eur J Immunol* *25*, 1883-7.
- van der Merwe, P., Davis, S. J., Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* *12*, 5-21.
- van der Voort, R., Taher, T. E., Wielenga, V. J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E., and Pals, S. T. (1999). Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem* *274*, 6499-506.
- Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* *394*, 798-801.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* *283*, 680-2.
- Waugh, M. G., Lawson, D., and Hsuan, J. J. (1999). Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *Biochem J* *337*, 591-7.
- Wittig, B., Seiter, S., Föger, N., Schwarzler, C., Günthert, U., and Zöller, M. (1997). Functional activity of murine CD44 variant isoforms in allergic and delayed type hypersensitivity. *Immunol Lett* *57*, 217-23.
- Wittig, B., Seiter, S., Schmidt, D. S., Zuber, M., Neurath, M., and Zöller, M. (1999). CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* *79*, 747-59.
- Wright, M. D., and Tomlinson, M. G. (1994). The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* *15*, 588-94.
- Wu, L., Kincade, P. W., and Shortman, K. (1993). The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate. *Immunol Lett* *38*, 69-75.
- Wu, Y. L., Jiang, X. R., Lillington, D. M., Newland, A. C., and Kelsey, S. M. (2000). Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol* *111*, 807-16.
- Würfel, J., Rösel, M., Seiter, S., Claas, C., Herlevsen, M., Weth, R., and Zöller, M. (1999). Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314. *Oncogene* *18*, 2323-34.



- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8, 723-32.
- Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M. A., Ashman, L. K., de Landazuri, M. O., and Sanchez-Madrid, F. (1998). Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 141, 791-804.
- Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2001). Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 8, 153-68.
- Yang, X., Claas, C., Kraeft, S. K., Chen, L. B., Wang, Z., Kreidberg, J. A., and Hemler, M. E. (2002). Palmitoylation of Tetraspanin Proteins: Modulation of CD151 Lateral Interactions, Subcellular Distribution, and Integrin-dependent Cell Morphology. *Mol Biol Cell* 13, 767-81.
- Yauch, R. L., Berditchevski, F., Harler, M. B., Reichner, J., and Hemler, M. E. (1998). Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* 9, 2751-65.
- Yauch, R. L., and Hemler, M. E. (2000). Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J* 351 Pt 3, 629-37.
- Yauch, R. L., Kazarov, A. R., Desai, B., Lee, R. T., and Hemler, M. E. (2000). Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 275, 9230-8.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13, 35-48.
- Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-46.
- Zhang, X. A., Bontrager, A. L., and Hemler, M. E. (2001). Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 276, 25005-13.
- Zhou, D. F., Ding, J. F., Picker, L. J., Bargatze, R. F., Butcher, E. C., and Goeddel, D. V. (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* 143, 3390-5.
- Zöller, M. (1996). Joint features of metastasis formation and lymphocyte maturation and activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 213, 215-47.

**PUBLIKATIONSLISTE****PUBLIKATIONEN:**

Wittig, B., Seiter, S., Schmidt, D. S., Zuber, M., Neurath, M., and Zöller, M. (1999). CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* 79, 747-59.

Seiter, S., Schmidt, D. S., and Zöller, M. (2000). The CD44 variant isoforms CD44v6 and CD44v7 are expressed by distinct leukocyte subpopulations and exert non-overlapping functional activities. *Int Immunol* 12, 37-49.

Christ, O., Günthert, U., Schmidt, D. S., and Zöller, M. (2002). Allogeneic reconstitution after nonmyeloablative conditioning: mitigation of graft-versus-host and host-versus-graft reactivity by anti-CD44v6. *J Leukoc Biol* 71, 33-46.

**EINGEREICHTE PUBLIKATIONEN:**

Herlevsen, M., Schmidt, D. S., and Zöller, M. (2002). Co-expression of the alpha6beta4 integrin and the tetraspanin D6.1A supports formation of liver metastasis. .

**PUBLIKATIONEN IN VORBEREITUNG:**

Schmidt, D.S., Schnölzer, M., Zöller, M. (2002). CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and selectively with Ep-CAM

Schmidt, D.S., Zöller, M. (2002). Signal transduction via CD44 variant isoforms is modulated by associating molecules as demonstrated for a CD44 variant isoform – EpCAM complex

**PUBLIZIERTE ABSTRACTS:**

S Seiter, DS Schmidt, M Zöller

The CD44 variant isoforms CD44v6 and CD44v7 are expressed by distinct leukocyte subpopulations and exert non-overlapping functional activities

Poster und Vortrag

Dgfl Jahrestagung 1999 Hannover

DS Schmidt, U. Günthert, M. Zöller

Manipulation of tolerance induction after non-myeloablative pretreatment and transfer of allogeneic stem cells

11<sup>th</sup> international congress of immunology july 2001 Stockholm

DS Schmidt, O Christ, U Günthert, M Zöller

Allogeneic bone marrow reconstitution: importance of CD44v6 on thymocyte selection

Dgfl Jahrestagung 2000 Düsseldorf

O Christ, DS Schmidt, U Günthert, R Kronenwett, R Haas, M Zöller

Mobilization of hematopoietic progenitor cells by blockade of adhesion: Comparison between G-CSF and distinct CD44 isoforms

DGfl Jahrestagung 1999 Hannover

DS Schmidt, B Wittig, S Seiter, M Zöller

Selective upregulation of CD44v7 on peripheral blood leukocytes of patients with Crohn's disease

Dgfl Jahrestagung 1998 Freiburg

BM Wittig, DS Schmidt, U Günthert, M Zöller  
CD44v7 is involved in the regulation of Th-1 mediated autoimmune diseases  
DGfJ Jahrestagung 1998 Freiburg

Seiter, DS Schmidt, P Engel, M Zöller  
Distinct CD44 isoforms differently mitigate Th-1 mediated DTH reactions  
DGfJ Jahrestagung 1998 Freiburg

**MEIN DANK GILT...**

in erster Linie Prof. Dr. Margot Zöller für meine Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen Aufmunterungen und Hilfestellungen in den richtigen Momenten sowie der Zeit und Anstrengung, die sie in das Projekt investiert hat.

Weiterhin danke ich Dr. Christoph Claas für die jederzeit kompetenten und wertvollen Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Fr. Dr. Martina Schnölzer danke ich für die massenspektrometrische Analysen und Datenbankrecherchen.

5 Jahre und mehr als 60 Kollegen sind eine Menge – dennoch seien einige und einiges hervorgehoben: Mika H und Peter danke ich vor allem für ihre Freundschaft, ihre Offenheit und Ehrlichkeit – es war schon eine besondere Zeit in vielerlei Hinsicht. Vielen Dank auch für eure helfenden Hände, wenn Not am Mann war. Wir sehen uns spätestens 2005 zum Grenzgang im Hinterland!

Mika H danke ich darüber hinaus für 2 grandiose WM Titel – das waren gelungene Sonntag Nachmittage. Angelika und Waltraud danke ich für ihre Hilfe in den vielen technischen und bürokratischen Dingen des Labors – auf euch ist immer Verlaß!

Meike und Tanja sowie Sandra und Gunja gilt mein besonderer Dank – nicht viele dürfen solche „Doppelpack“-Diplomandinnen erleben. Ich durfte das gleich zweimal. Ich hoffe ihr bekommt ebenso nette Kollegen während eurer Promotion.

Auch ManU danke ich für den Doppelpack!

Zusammen mit den bereits genannten danke ich Eberhardt, Watzki, Nicole Föhr, Robert, Niko, Burki, Michaela, Andreas, Susanne, Joachim, Markus, Frank und natürlich Handan für die harmonische Atmosphäre im Labor, die vielen Diskussionen über die „wirklich wichtigen“ Dinge des Lebens, die laborphilosophische Prägung und die oftmals gewährte Hilfe im Laboralltag.

Ihr werdet immer mit den guten Erinnerungen an Heidelberg verbunden sein.

Den meisten anderen der nicht Erwähnten sei ebenfalls gedankt.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die unübertreffliche und umfassend gewährte Unterstützung, die ich in all den Jahren mehr als genossen habe.

Last but not least ein Dankeschön an Iffe, Otto, Schorsch und die anderen Hinterländer. Es ist schon ein besonderes Vergnügen Freunde wie euch zu haben. Ihr wart mehr als nur eine Hilfe - ohne euch hätte ich es sicher nicht geschafft!

**LEBENS LAUF**

Name:		Dirk-Steffen Schmidt
Geburtsdatum:		15. September 1971
Geburtsort:		Marburg (an der Lahn) – Wehrda
Wohnort:		Schelde-Lahn-Strasse 5 35236 Breidenbach-Wolzhausen
Familienstand:		ledig
Schul Ausbildung:	1977-1981	Grundschule Wolzhausen
	1981-1990	Gymnasium Lahntalschule Biedenkopf
	Mai 1990	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Zivildienst:	August 1990 bis Oktober 1991	Zivildienst im Jugendwerk der FeG des Biedenkopf-Nord-Kreises
Studium:	Oktober 1991 bis März 1996	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn
	März 1996 bis März 1997	Diplomarbeit am Institut für Immunologie bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hartmann zum Thema „Untersuchungen zur RAG Expression während der Embryogenese von Mäusen“
Promotion:	seit Mai 1997	Promotion am DKFZ Heidelberg Abteilung für Tumorprogression und Tumorabwehr bei Fr. Prof. Dr. Zöller zum Thema „Variante Isoformen von CD44 in Protein- komplexen - Lokalisation, Signaltransduktion und Funk- tion“

