

EpCAM und Claudin 7: Konzertierte Aktion zweier Adhäsionsmoleküle fördert Metastasierung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom Biologe Florian Thuma

aus

Bonn

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Koreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Metastasierung.....	1
1.3 Krebsstammzellen.....	4
1.4 EpCAM.....	6
1.4.1 Struktur und Expression.....	6
1.4.2 EpCAM und Krebs	8
1.5 Claudine	11
1.5.1 Struktur und Funktion.....	11
1.5.2 Claudin 7	14
1.6 BSp73 Tumormodell.....	15
1.7 Ziele der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material	18
2.1.1 Technische Geräte.....	18
2.1.2 Sonstige Materialien.....	20
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.4 Standard Puffer und Lösungen	25
2.1.5 Enzyme	26
2.1.6 Nukleotid- und Proteinstandards.....	26
2.1.7 Kits.....	26
2.1.8 siRNA.....	27
2.1.9 Oligos.....	27
2.1.10 Primer	28
2.1.11 Antikörper.....	29
2.1.11.1 Primärantikörper	29

2.1.11.2 Sekundärantikörper.....	31
2.1.12 Expressionsvektoren.....	31
2.1.13 Bakterinstämme.....	32
2.1.14 Zelllinien.....	32
2.1.15 Tiere.....	33
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Bakterienkulturen.....	33
2.2.1.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	33
2.2.1.3 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterienkulturen.....	34
2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA.....	34
2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	35
2.2.1.6 Plasmid Ligation.....	35
2.2.1.7 siRNA – Transfektion.....	35
2.2.1.8 Generierung der knockdown Konstrukte.....	35
2.2.1.9 Generierung der EpCAM rescue Konstrukte.....	36
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	37
2.2.2.1 Quervernetzung von Proteinen.....	37
2.2.2.2 Zellyse zur Gewinnung von Gesamtproteinproben.....	38
2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	38
2.2.2.4 Immunpräzipitation (IP).....	38
2.2.2.5 In Vitro Kinase-Assay.....	39
2.2.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.2.7 Western-Blot (WB).....	40
2.2.2.8 Sucrose Gradient Ultrazentrifugation.....	41
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1 Zellkultur.....	41
2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl.....	42
2.2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	42
2.2.3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	42
2.2.3.5 Reklonierung transfizierter Zellen.....	43
2.2.3.6 Kristallviolett-Färbung von adhärennten Zellen.....	43
2.2.3.7 CFSE-Markierung von Zellen.....	43
2.2.3.8 Adhäsions Assay.....	43

2.2.3.9 Migrations Assays	44
2.2.3.10 ³ H-Thymidin Inkorporations Assay	45
2.2.3.11 MTT-Färbung	45
2.2.3.12 Soft Agar Colony Formation Assay	45
2.2.3.13 Immunfluoreszenz.....	46
2.2.3.14 Kryo-Schnitte von Tumor Gewebe	46
2.2.3.15 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten.....	47
2.2.3.16 FACS-Analyse	48
2.2.3.17 Zellzyklus-Analyse	48
2.2.4 Tierexperimente	49
2.2.4.1 <i>In vivo</i> Metastasierung	49
2.2.4.2 <i>Ex vivo</i> Soft Agar Colony Formation Assay.....	50
2.2.4.3 <i>In vivo</i> Apoptoseresistenz	51
2.2.5 Statistik	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Ein knockdown von EpCAM oder Claudin 7 reduziert das metastatische Potenzial von ASML ^{wt} Zellen <i>in vivo</i> drastisch.	52
3.2 Claudin 7 beeinträchtigt EpCAM-vermittelte Zell-Adhäsion	61
3.3 Claudin 7 fördert die Motilität.....	64
3.4 TEM Lokalisierung des EpCAM-Claudin 7-Komplexes fördert die Assoziation mit α6β4 Integrin und dem Zytoskelett	69
3.5 Spaltung von Claudin 7-assoziiertem EpCAM fördert die Zellproliferation	76
3.6 Claudin 7 fördert Apoptoseresistenz	80
3.7 Claudin 7 stabilisiert anti-apoptotische Moleküle.....	85
3.8 EpCAM rescue	88
4 Diskussion	89
4.1 Einfluss von EpCAM und Claudin 7 auf Tumor- und Metastasenwachstum....	89
4.2 Der Beitrag von EpCAM und Claudin 7 zu lymphatischer Metastasierung	91
4.2.1 Claudin 7 und ASML Zellmotilität	91
4.2.2 EpCAM und die lymphatische Ausbreitung von ASML Tumorzellen.....	92
4.2.3 Claudin 7 unterstützt EpCAM-medierte Tumorzellproliferation.....	94
4.2.4 Claudin 7 ist in die Expression von Pten involviert und unterdrückt über Pten die Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade	95
4.3 Perspektiven.....	99

5 Zusammenfassung	101
6 Literatur	103
Danksagung	121
Publikationsliste	122
Lebenslauf	123
Ehrenwörtliche Erklärung	124

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von EpCAM	7
Abb. 3: Schematische Darstellung EpCAM-vermittelter Signaltransduktion	10
Abb. 4: Schematische Darstellung des Claudin Monomers	12
Abb. 5: Schematische Darstellung pSUPER RNAi System™	36
Abb. 6: Kd von EpC bzw. Cld7 in ASML ^{wt} Zellen	53
Abb. 7: <i>In vivo</i> Wachstum von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} oder ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	54
Abb. 8: Immunhistochemie der Rattenlunge	55
Abb. 9: Immunhistochemie von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Tumoren	56
Abb. 10: Immunhistochemie von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Tumoren	57
Abb. 11: FACS Analyse von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Tumoren	58
Abb. 12: <i>Ex vivo</i> Analyse von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Tumoren	60
Abb. 13: Zell-Matrix-Adhäsion von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	62
Abb. 14: Zell-Zell-Adhäsion von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	63
Abb. 15: Transwell Migration von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	65
Abb. 16: <i>In vitro</i> Wundheilung von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	66
Abb. 17: Auswertung der <i>in vitro</i> Wundheilung von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	67
Abb. 18: <i>In vivo</i> Migration von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	68
Abb. 19: Immunfluoreszenz von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	71
Abb. 20: Immunpräzipitation und Sucrose Gradient von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	72
Abb. 21: Immunpräzipitation und Sucrose Gradient von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	73
Abb. 22: <i>In vitro</i> Kinase assay und Immunpräzipitation von ASML ^{wt} Zellen	74
Abb. 23: Transwell Migration von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	75
Abb. 24: Expression von TACE und PS2/NTF in ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	76
Abb. 25: Proliferation von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	77
Abb. 26: Zellzyklusprogression von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	78

Abb. 27: Hinweise auf EpICD-Aktivität und -Generierung in ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	79
Abb. 28: Apoptoseresistenz von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen....	81
Abb. 29: Koloniewachstumseffizienz von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen.....	82
Abb. 30: <i>In vivo</i> Apoptoseresistenz von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen.....	83
Abb. 31: Caspaseaktivität in ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen.....	86
Abb. 32: MAPK, JNK und NFκB Aktivierung in ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	86
Abb. 33: Einfluss von EpC und Cld7 auf die Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalwegs	87
Abb. 34: EpC rescue.....	88
Abb. 35: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege.....	96
Abb. 36: Schematische Darstellung des NFκB-Signalwegs.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte unter Angabe des Herstellers.....	18
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien unter Angabe des Herstellers ...	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien unter Angabe des Herstellers.....	21
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen unter Angabe des Herstellers	25
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Enzyme unter Angabe des Herstellers.....	26
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers	26
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers	26
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten siRNAs unter Angabe des Herstellers.....	27
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligos unter Angabe der Sequenz	27
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer unter Angabe der Sequenz.....	28
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe des Herstellers	29
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe des Herstellers	31
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps	32
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Zelllinien unter Angabe des Ursprungs	32
Tabelle 15: <i>In vivo</i> Wachstum von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} oder ASML-Cld7 ^{kd} Zellen	54
Tabelle 16: <i>In vivo</i> Wachstum von ASML ^{wt} , ASML-EpC ^{kd} und ASML-Cld7 ^{kd} Zellen nach intraperitonealer Applikation	84

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
aa	Aminosäure (amino acid)
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	BSp73AS, Pankreastumorzelllinie der Ratte
ASML ^{kd}	BSp73ASML, knockdown, Pankreastumorzelllinie der Ratte
ASML ^{wt}	BSp73ASML, wilotyp, Pankreastumorzelllinie der Ratte
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAM	Zelladhäsionsmolekül (cell adhesion molecule)
CD	„cluster of differentiation“
Cld7	Claudin 7
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DSP	Dithiobis(succinimidyl) propionate
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpC	EpCAM, „epithelial cell adhesion molecule“
EpEX	Extrazelluläre Domäne von EpCAM
EpICD	Intrazelluläre Domäne von EpCAM

EU	Europäische Union
FACS	„fluorescent activated cell sorting“
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calv serum)
FN	Fibrinektin
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Horse Raddish Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
ifp	in die Fusspfote (intra footpad)
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
ip	ins Peritoneum (intra peritoneal)
kd	knockdown
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LK	Lymphknoten
LM	Laminin
LM5	Laminin5
m	Meter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger RNA
MTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte

p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
siRNA	small interfering RNA
STAB	Standardabweichung
t	Zeit
TEM	„tetraspanin-enriched-microdomain“
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
U	unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktale Adenokarzinom des exokrinen Pankreas ist eine der tödlichsten Krebserkrankungen. Obwohl das Pankreaskarzinom in der Europäischen Union (EU) in der Liste der häufigsten Krebserkrankungen nur an 13. Stelle steht, nimmt es bei den krebsbedingten Todesfällen die fünfte Position ein (Ferlay et al., 2007). Im Jahr 2006 erkrankten in der EU ~58.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Mit ~64.000 Todesfällen gleicht die krankheitsspezifischen Sterberate ungefähr der Inzidenz (Ferlay et al., 2007). Folglich hat das Pankreaskarzinom eine extrem niedrige Fünf-Jahres-Überlebensrate. In Deutschland liegt diese für Frauen bei 3-8 %, für Männer bei 5-7 % (Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). Die niedrige Überlebensrate ist in der frühen Metastasierung und der meist späten Diagnose, sowie der Resistenz gegen systemische Therapien begründet (Benson, 2007; Carpelan-Holmstrom et al., 2005).

1.2 Metastasierung

Metastasierung ist der Prozess der Ausbreitung von Tochtergeschwüren in einem vom Primärtumor entfernten Organ. Metastasierung ist die Ursache von 90 % aller tumorbedingten Todesfälle. Sie ist ein höchst komplexer, mehrschrittiger Prozess, in dessen Verlauf sich Zellen aus dem Primärtumor lösen, durch Lymph- oder Blutgefäße zu entfernten Organen gelangen und dort sekundäre Tumore, die Metastasen, bilden. Dieser Vorgang wird als metastatische Kaskade (Abb. 1) bezeichnet und fasst die einzelnen Prozesse der Metastasierung, lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation, Adhäsion, Extravasation im Zielorgan, Überleben, Proliferation und Angiogenese, zusammen (Chaffer and Weinberg, 2011; Fidler, 2003; Gassmann et al., 2004; Weigelt et al., 2005).

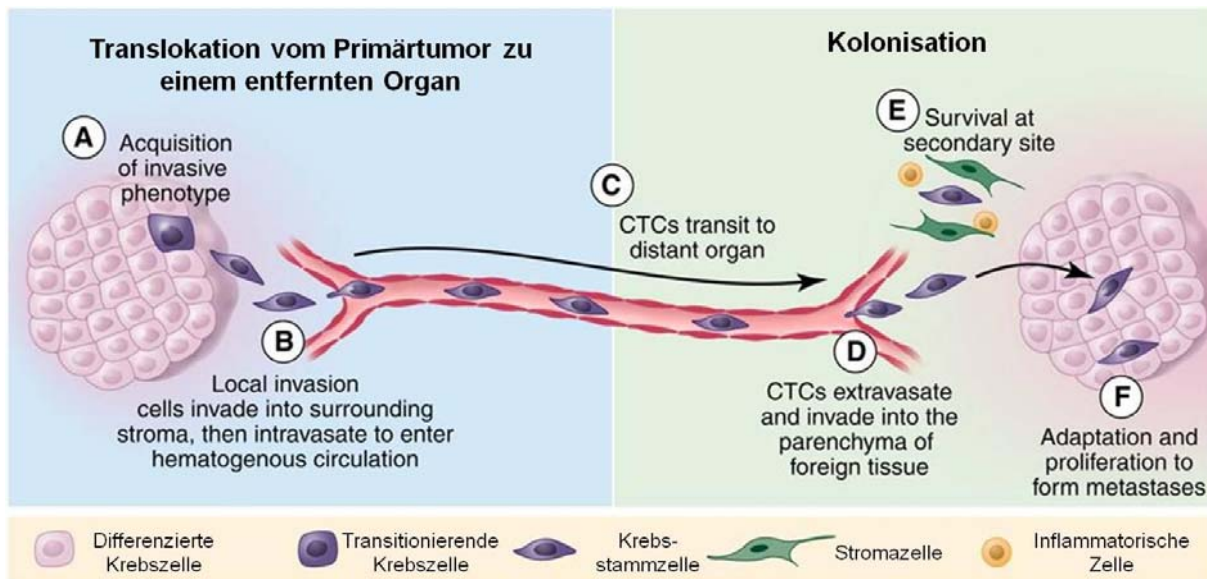


Abb. 1: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade

Die Metastasierung kann in zwei Phasen eingeteilt werden: (i) Translokation vom Primärtumor zu einem entfernten Organ, (ii) Kolonisation im Zielorgan. **(A)** Beginn der metast. Kaskade durch Erwerb des invasiven Phänotyps. **(B)** Tumorzellen durchdringen die umgebende Matrix und wandern in Lymph- oder Blutgefäße ein. **(C)** Zirkulierende Tumorzellen (CTC) überleben in den Gefäßen und erreichen entfernte Organe. **(D)** CTCs adhären an die Gefäßwand und extravasieren in fremdes Gewebe. **(E)** Die Tumorzellen überleben im Fremdgewebe. **(F)** Die Tumorzellen adaptieren sich an die fremde Umgebung und proliferieren. [Modifiziert nach (Chaffer and Weinberg, 2011)]

Um die ersten zwei Schritte der Metastasierungskaskade, das Lösen aus dem Primärtumor und das Einwandern in das umgebende Gewebe sowie das Penetrieren der Blut- oder Lymphgefäße, zu ermöglichen, müssen die Tumorzellen migratorische und invasive Eigenschaften entwickeln. Dies geht einher mit einer Veränderung der Genexpression, die als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird (Thiery et al., 2009). Die Tumorzellen erlangen die Fähigkeit zur Proteolyse der Extrazellulären Matrix (ECM) sowie der Basallamina durch Expression von Proteasen, wie zum Beispiel MMPs (Matrix-Metalloproteasen) und ADAMs („a disintegrin and metalloproteinase“), oder der Unterdrückung der Expression von Inhibitoren dieser Proteasen, den TIMPs („tissue inhibitors of metalloproteinases“). Tumorzellen können auch umliegende Stromazellen zur Produktion invasionsfördernder Faktoren anregen (Kessenbrock et al., 2010). Aufgrund dessen können isolierte Tumorzellen durch das umliegende Gewebe zu Lymph- und Blutgefäßen migrieren (Yang and Weinberg, 2008; Yilmaz et al., 2007). Des Weiteren müssen die Tumorzellen in der Lage sein Anoikis (Zelltod durch Verlust der Adhäsion) und Amorphosis (Zelltod durch Verlust der Zellform) zu überwinden. Beides sind apoptotische Prozesse, die durch verminderte Adhäsion, Ablösen aus

dem Zellverband und Proteolyse der ECM ausgelöst werden (Martin and Leder, 2001; Martin and Vuori, 2004; Streuli and Gilmore, 1999). Sind die Tumorzellen in das Gefäßsystem eingedrungen, spricht man von zirkulierenden Tumorzellen (CTC). Im Blut- oder Lymphkreislauf müssen die CTCs der Kontrolle des Immunsystems entgehen und mechanischem Stress standhalten (Jakobisiak et al., 2003; Weiss et al., 1993). Um das Gefäßsystem zu verlassen, müssen die CTCs am vaskulären Endothel adhären, es penetrieren und in das umgebende Gewebe migrieren. Die Adhäsion von CTCs an Endothelzellen (EC) kann sowohl durch Embolisierung in einer Kapillare, als auch durch Bindung zwischen auf der Tumorzelle vorhandenen Oberflächenrezeptoren und deren Liganden auf den Endothelzellen erfolgen. Endothelien verschiedener Organe weisen unterschiedliche Expressionsprofile EC-typischer Antigene, z.B. CD31 oder von Willebrandt Faktor, auf und unterscheiden sich in der Sekretion von Wachstumsfaktoren, wodurch sie zur organspezifischen Verteilung metastasierender Tumorzellen beitragen (Gassmann et al., 2004; Pauli et al., 1990). In die Adhäsion von CTCs an EC sind oftmals Selektine involviert. Selektine sind eine kleine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die das sog. „rolling“ (Entlangrollen an der Gefäßwand) von Neutrophilen, T-Gedächtniszellen und Monozyten vermitteln und damit die Adhäsion an der Gefäßwand und die Extravasation ermöglichen (Bird et al., 1997). Erstmals konnte eine Rolle der Selektine in der metastatischen Kaskade bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms gezeigt werden (Brodt et al., 1997). Mittlerweile konnte dies für viele verschiedene Tumore, wie z.B. Magen- (Alexiou et al., 2003), Blasen- (Numahata et al., 2002) und Pankreaskarzinome (Iwai et al., 1993) beschrieben werden (Gassmann et al., 2004). Zum Abschluss der Extravasation kommt es zur Bindung der CTCs an die subendotheliale ECM. Die hierfür bedeutendsten Moleküle sind Integrine, die, neben Zelladhäsion, mehrere zelluläre Funktionen wie Apoptose, Migration, Proliferation und Differenzierung beeinflussen können. Die Integrin-vermittelten Interaktionen zwischen CTCs und ECM Komponenten gehören zu den wichtigsten Elementen einer organspezifischen Metastasierung (Miranti and Brugge, 2002; Nicolson, 1989). Ein weiteres solches Element ist die prämetastatische Nische. Schon 1889 wurde beobachtet, dass bestimmte Tumore hauptsächlich in für sie typischen Organen Metastasen bilden, was auf eine Interaktion von Tumorzellen mit spezifischen Umgebungen („seed and soil“) zurückgeführt wurde (Paget, 1989). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass eine Nische im Zielorgan geschaffen wird,

lange bevor die ersten Tumorzellen sich dort ansiedeln (Hiratsuka et al., 2006; Kang et al., 2009; Kaplan et al., 2005). Anfänglich gelangen VEGFR1 („Vascular Endothelial Growth Factor Receptor“) und VLA-4 („Very Late Antigen-4“, CD49d/CD29) exprimierende, hematopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die prämetastatischen Regionen. VLA-4 bindet Fibronectin, welches in der prämetastatischen Nische angereichert wird. Diese Anreicherung von FN, durch die Überexpression in lokalen Fibroblasten, scheint ein Schlüsselereignis für die Ansiedlung von Tumorzellen zu sein (Kaplan et al., 2005). Die lokalen Fibroblasten werden durch vom Primärtumor sezernierte Wachstumsfaktoren zur FN-Sezernierung angeregt. Um welche Faktoren es sich handelt, ist noch nicht geklärt (Chaffer and Weinberg, 2011; Marhaba et al., 2008; Yilmaz et al., 2007). Mittels dieser prämetastatischen Nische können die Tumorzellen im fremden Gewebe überleben, dort adaptieren sowie proliferieren und somit einen Sekundärtumor etablieren. Die Metastasierung ist eine Abfolge extrem selektiver Prozesse. Man geht davon aus, dass täglich mehrere Millionen Zellen pro Gramm Tumormasse in das lymphatische System oder den Blutkreislauf gelangen. Lediglich $\sim 1/10^6$ Zellen gelingt der Wechsel in ein fremdes Organ (Butler and Gullino, 1975; Liotta et al., 1976; Mehlen and Puisieux, 2006; Yilmaz et al., 2007).

1.3 Krebsstammzellen

Es gibt überzeugende Hinweise, dass Tumore eine kleine Population von Tumorstammzellen (CSC, cancer stem cells oder CIC, cancer initiating cells) beinhalten (Chaffer and Weinberg, 2011; Lobo et al., 2007; Regenbrecht et al., 2008; Visvader and Lindeman, 2008; Werbowetski-Ogilvie and Bhatia, 2008; Yang and Chang, 2008). Diese Population wird funktionell charakterisiert durch ihre Fähigkeit zum Wachstum in xenogenen immundefizienten Organismen (z.B. SCID Maus), ihrer Fähigkeit Metastasen zu bilden, die Heterogenität des Primärtumors in der Metastase wiederherzustellen sowie Metastasen auch nach einer langen Latenzperiode zu bilden (Allan et al., 2006; Li et al., 2007b; Lobo et al., 2007). CSC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung, sind resistent gegen Bestrahlungs- und Zytostatika-induzierte Apoptose und benötigen höchstwahrscheinlich eine spezielle Wachstumsnische (Kalluri, 2009; Ricci-Vitiani et al.,

2009; Scopelliti et al., 2009). Weitere Charakterisierungsmerkmale sind CSC-Marker (CIC-marker), chemische und eine Reihe spezieller biologischer Eigenschaften (Allan et al., 2006; Lobo et al., 2007; Marhaba et al., 2008; Papathanasiou et al., 2009; Visvader and Lindeman, 2008). Neben der Selektion von CSC-Marker exprimierenden Zellen, kann man CSC-Populationen aus einem Tumor durch „soft agar cloning“ anreichern (s. Kapitel 2.2.3.12). Sphäroid Wachstum, hohe Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität und der mit gesteigerter Apoptoseresistenz einher gehende Höchst³³³⁴² Ausschluss sind weitere CSC-Charakteristika. Zellen, die den Farbstoff Höchst³³³⁴² sehr schnell ausschleusen, die sogenannte „side population“, zeichnen sich insbesondere durch Expression von „Stammzell-Genen“ und Resistenz gegenüber Chemotherapie aus (Clarke et al., 2006; Huang et al., 2009; Lobo et al., 2007; Telford et al., 2007; Visvader and Lindeman, 2008). Am häufigsten wird heute die Selektion über Zelloberflächenmarker zur Anreicherung von CSC eingesetzt. Auf vielen unterschiedlichen Tumoren gehören hierzu CD133, EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), ABCG5 (ATP-binding cassette B5), CD44, CD24 und CD90 (Visvader and Lindeman, 2008). Die Anreicherung von CSC erfolgt dabei meist über Marker-Profile. Dies sind z.B. bei Leukämie $CD44^+CD38^-$ (Lapidot et al., 1994), beim Prostatakarzinom $CD44^+\alpha2\beta1^{high}CD133^+$ (Collins et al., 2005), beim Kolorektalkarzinom $EpCAM^+CD44^+CD166^+$ (Dalerba et al., 2007) und beim Pankreaskarzinom $CD44^+EpCAM^+CD24^+$ (Li et al., 2007a).

Die Rolle von EpCAM als Tumorstammzellmarker beim Pankreaskarzinom soll an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden, da EpCAM-abhängige Prozesse, im Modellsystem eines Pankreaskarzinoms, ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit sind.

CSC haben viele Eigenschaften mit embryonalen (ESC) und adulten (ASC) Stammzellen gemeinsam. Hierzu gehören Signalwege, die in die Regulation der Stammzeleigenschaften „stemness“ und der Differenzierung involviert sind (Stewart et al., 2008; van den Brink and Offerhaus, 2007). Ebenso wie Genexpressionsprofile, die auf eine bedeutende Rolle von Zelladhäsion, Matrixinteraktionen und Wnt (wingless/int-1), JAK/STAT (Janus family kinases/signal transducers and activators of transcription) und FAK (focal adhesion kinase) Signalwegen hindeuten (Saini and Shoemaker, 2010). Für den hematopoetischen und Leukämie-SC-Marker CD44 konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von CD44 eine Mobilisierung von hematopoetischen Stammzellen zur Folge hatte und die Ansiedlung von Leukämie

SC in ihrer Nische behinderte (Selleri et al., 2006; Yin and Li, 2006). CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4), der in embryonalen und adulten Stammzellen verschiedener Organe, aber auch in verschiedenen Tumorzellen exprimiert wird (Ara et al., 2003; Askari et al., 2003; Balkwill and Coussens, 2004; Kucia et al., 2005) und sein Ligand SDF1 (stromal cell-derived factor 1) sind für die Migration von hematopoetischen Stammzellen und Tumorzellen essentiell. SDF1 wird von Stroma- und Endothelzellen sezerniert und zieht hematopoetische Vorläuferzellen, zirkulierende gewebespezifische Zellen und metastasierende Tumorzellen an (Clarke and Fuller, 2006; Jung et al., 2006; Kucia et al., 2005; Polyak and Hahn, 2006; Yilmaz et al., 2006). HGF (hepatocyte growth factor) – c-Met (HGF-Rezeptor) fördern die Mobilisierung und Wanderung von Stammzellen sowohl in Embryonen als auch im adulten Organismus. Eine hohe c-Met-Expression ist in vielen Karzinomen für die Tumorzellmigration und Bildung von Metastasen erforderlich. Ebenso beeinflusst HGF – c-Met-Expression in mesenchymalen Zellen die Angiogenese (Boccaccio and Comoglio, 2006; Forte et al., 2006; Mueller and Fusenig, 2002). Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Mobilisierung und Zielführung von Stammzellen wird β -Catenin zugeschrieben (Ratajczak et al., 2006). Nach Aktivierung gelangt β -Catenin in den Zellkern, interagiert mit Tcf/Lef (Transkriptionsfaktoren) und aktiviert zellzyklusrelevante Gene wie Cyclin und c-Myc (Deshpande and Buske, 2007).

1.4 EpCAM

1.4.1 Struktur und Expression

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM; CD326) ist ein Typ I Transmembranglycoprotein, bestehend aus 314 aa, und wurde erstmalig in Kolonkarzinomen beschrieben (Herlyn et al., 1979). EpCAM ist ein Ca^{++} -unabhängiges, homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül. Es besteht aus einer EGF-ähnlichen Domäne (EGF-like), gefolgt von einer Thyroglobin-Wiederholungsdomäne (Thyroglobin repeat), einer cysteinarmen Region, einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytoplasmatischen Ende (Abb. 2) (Chong and Speicher, 2001; Cirulli et al., 1998; Litvinov et al., 1994a; Litvinov et al., 1994b; Trebak et al., 2001). Die EGF-like- und die Thyroglobin-Domäne bilden eine globuläre Struktur, wobei beide für die

homophile Zell-Zell-Adhäsion von EpCAM essentiell sind. Hierbei vermittelt die EGF-like-Domäne die reziproke Zell-Zell-Interaktion, die Thyroglobindomäne die laterale Interaktion zwischen benachbarten EpCAM Molekülen. Beide Domänen sind auch an der Bindung von Aktinfilamenten an die Zellmembran, über α -Aktinin beteiligt, wobei dieser Prozess durch die cytoplasmatische Region reguliert wird (Balzar et al., 2001).

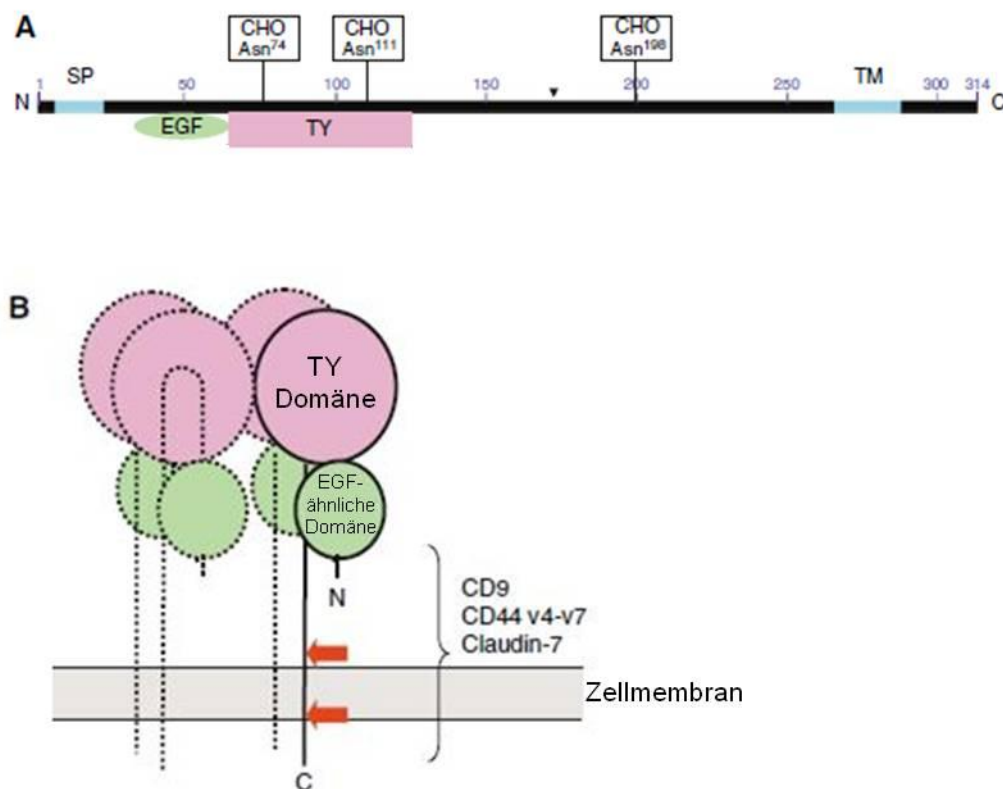


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von EpCAM

(A) Das EpCAM Polypeptid besteht aus 314 aa. N- (N) und C-Terminus (C), Signalpeptid (SP), Transmembrandomäne (TM), N-gebundene Kohlenhydrate (CHO), EGF-like Domäne (EGF) and TY repeat Domäne (TY). (B) Domänenmodell von EpCAM: EpCAM ist als Tetramer gezeigt. Zwei Spaltstellen für Proteasen zur Freisetzung der extrazellulären und der intrazellulären Domänen sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Interaktionsregion mit den gelisteten Molekülen ist durch eine Klammer dargestellt. [Modifiziert nach (Baeuerle and Gires, 2007)]

EpCAM wird in fast allen ausdifferenzierten Epithelien basolateral exprimiert und dient als panepithelialer Marker (Balzar et al., 1999). Ausnahmen bilden das kortikale Thymusepithel sowie einige spezialisierte epitheliale Zelltypen wie epidermale Keratinozyten, Hepatozyten, Myoepithelzellen und Parietalzellen des Magens. Nicht epitheliale Zellen, mit Ausnahme von Plasmazellen, exprimieren kein EpCAM (Bergsagel et al., 1992; Momburg et al., 1987). Während EpCAM-Expression

in adulten Geweben auf die Epithelien beschränkt ist, wird es während der Embryonalentwicklung auch in Zellen exprimiert, die noch nicht epithelialen Charakter haben. EpCAM spielt, wie die meisten CAM's, eine Rolle in der Embryogenese und Differenzierung. So findet man EpCAM z.B. in befruchteten Eizellen, im Zwei-Zell-Stadium, in der Morula und in embryonalen Stammzellen (Trzpis et al., 2007).

1.4.2 EpCAM und Krebs

Anomale Expression (Über-, Unter- oder *de novo Expression*) im Verlauf maligner Transformation ist charakteristisch für viele CAM's. EpCAM wird in einer Vielzahl von Karzinomen im Vergleich zur Expression in nicht-transformiertem Gewebe überexprimiert (Went et al., 2004). Während EpCAM in gesunden Epithelien meist basolateral exprimiert wird (s. Kapitel 1.4.1), variiert die EpCAM-Verteilung in verschiedenen Karzinomtypen, wobei membranöse, zytoplasmatische- und lumenale-Expression beschrieben wurde (Ogura et al., 1998; Xie et al., 2005). In fast allen Karzinomen wird EpCAM exprimiert, aber auch in Myelomen, der malignen Entsprechung der Plasmazellen. EpCAM wird nicht in Tumoren mesodermalen- oder ektodermalen Ursprungs, z.B. neurogenen Tumoren, Sarkomen, Melanomen oder Lymphomen, exprimiert (Le Naour and Zoller, 2008; Momburg et al., 1987; Trzpis et al., 2007; van der Gun et al., 2010).

Aufgrund der charakteristischen Überexpression ist EpCAM seit mehr als zwanzig Jahren, ein Zielmolekül in der antikörperbasierten Krebstherapie (Gottlinger et al., 1986). Überraschenderweise, da EpCAM auch in gesunden Epithelien exprimiert wird, treten bei der Antikörpertherapie kaum ernste Nebenwirkungen auf. Eine Vielzahl von EpCAM-spezifischen AK zeigten in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse (Armstrong and Eck, 2003; Baeuerle and Gires, 2007; Chaudry et al., 2007; Le Naour and Zoller, 2008). Der anti-Tumoreffekt wird auf AK-vermittelte Zelltoxizität und Aktivierung des Komplementsystems zurückgeführt (Prang et al., 2005). Daneben werden auch bi- und trispezifische anti-EpCAM-AK verwendet. Häufig werden als „Partner“ Antikörper eingesetzt, die Zellen des Immunsystems targetieren. Zum Beispiel „Catumaxomab“, ein anti-EpCAM x anti-CD3 trifunktionaler AK, der Tumorzellen durch Apoptoseinduktion, Freisetzung von

Zytokinen und Perforin und Antikörper-vermittelter Zytotoxizität tötet (Riesenberg et al., 2001). Alternativ erfolgt eine Kopplung mit Chemo- oder Radio-therapeutischen Substanzen (Andratschke et al., 2007; Reusch et al., 2006; Ruf and Lindhofer, 2001; Salnikov et al., 2009; Zeidler et al., 2000).

Die Überexpression von EpCAM in Karzinomen ist unerwartet, da EpCAM, als homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, Tumorzellmigration und damit Metastasierung hemmen sollte. Tatsächlich sind jedoch gegenteilige Effekte beschrieben. So wurde gezeigt, dass EpCAM die cadherinabhängige Zell-Zell-Adhäsion durch Zerstörung der Bindung zwischen α -Catenin und F-Aktin negativ beeinflusst und so Zell-Zell-Kontakte lockert (Osta et al., 2004; Winter et al., 2003). Des Weiteren konnte die Involvierung von EpCAM in Signaltransduktion und die Förderung von Zellmotilität gezeigt werden (Bremer et al., 2004; Guillemot et al., 2001; Lovicu and McAvoy, 2001; Trebak et al., 2001). Ebenso konnte eine EpCAM-abhängige Expression von E-FABP („epidermal fatty acid binding protein“) nachgewiesen werden. E-FABP spielt eine zentrale Rolle beim Transport von Fettsäuren und im Stoffwechsel. Es ist ein Zielgen von *c-myc* und ist in mehreren Karzinomen überexprimiert (Munz et al., 2005). In jüngster Zeit konnte EpCAM als direktes „Zelloberflächen-zu-Zellkern“-Signalmolekül charakterisiert werden. Durch Oligomerisation von EpCAM wird eine intramembranöse Proteolyse mittels TACE ([TNF] tumor necrosis factor- α -converting enzyme) initiiert, die die extrazelluläre Domäne (EpEX) von EpCAM abspaltet. Nach Abspaltung der extrazellulären, erfolgt die Abspaltung der intrazellulären Domäne (EpICD) durch PS2-NTF (presenilin 2 N-terminal fragment). EpICD bindet an FHL2 (four and a half LIM domain protein 2), β -Catenin und den Transkriptionsfaktor Lef-1. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern, bindet an die Lef-1-Konsensussequenz der DNA und induziert die Expression des Proto-Onkogens *c-myc* sowie die verstärkte Bildung von Cyclin A und E, wodurch Proliferation unterstützt wird (Abb. 3) (Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2004; Osta et al., 2004). EpCAM-transgene Mäuse, die EpCAM in den Brustdrüsen überexprimieren, bestätigen die Einbindung von EpCAM in mitogene Signalkaskaden mit hoher Bcl-2- und Ki67-Expression (Hussain et al., 2006). Prometastatische Eigenschaften von EpCAM konnten in einem weiteren Kontext beschrieben werden. Assoziation von EpCAM mit Claudin 7, einem „tight junction“ (zonula occludens)-Protein, behindert die EpCAM-vermittelte homophile Zell-Zell-Adhäsion. Die Bildung eines Multiproteinkomplexes aus EpCAM, Claudin 7, CD44v6 (Variante Isoform des

Zell-Matrix CAM's CD44) und dem Tetraspanin Tspan8 sowie dessen Rekrutierung in tetraspaninreiche Membrandomänen (TEM, tetraspanin enriched domains) fördert die Metastasierung (Kuhn et al., 2007).

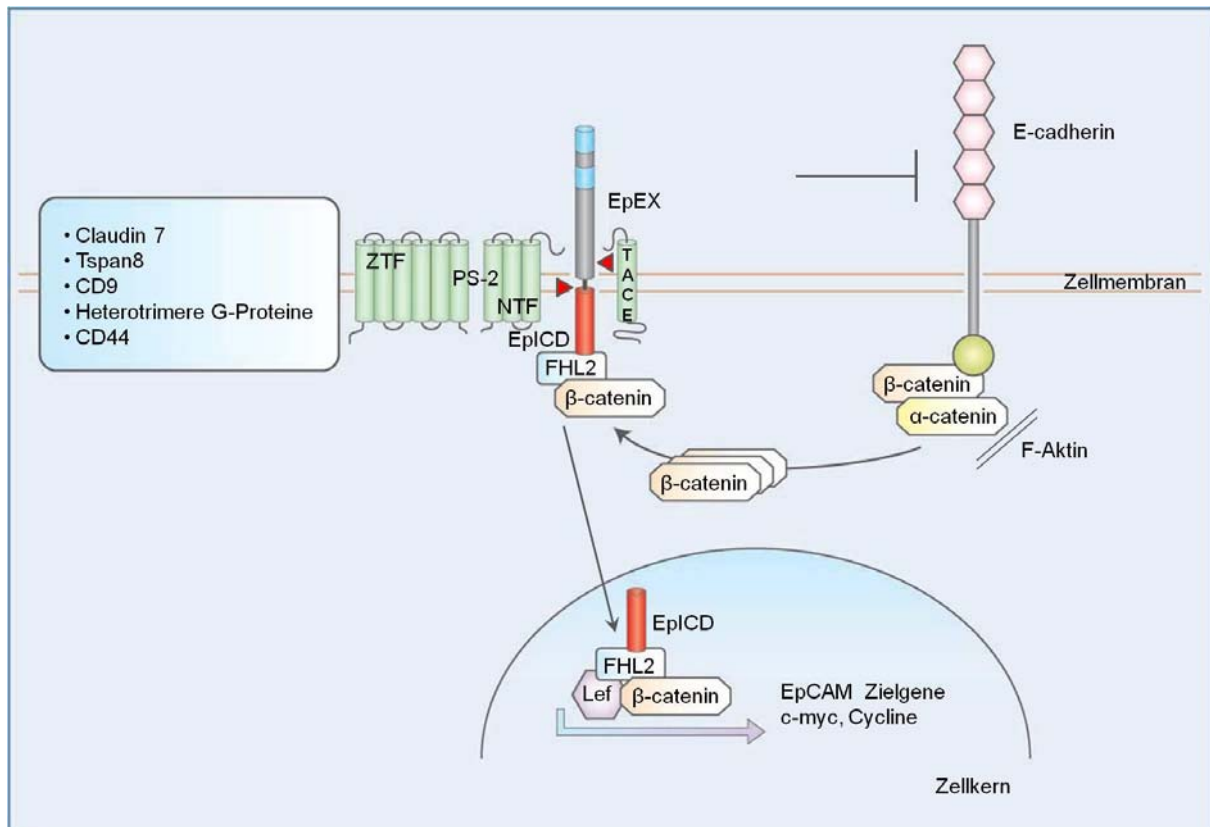


Abb. 3: Schematische Darstellung EpCAM-vermittelter Signaltransduktion

Nach Spaltung durch TACE/PS-2 (Spaltstellen sind durch rote Pfeilspitzen markiert) bildet EpICD mit FHL2, β-Catenin und Lef-1 einen Multiproteinkomplex, gelangt in den Zellkern und bindet an der Lef-1 Konsensussequenz an die DNA. Durch seine Fähigkeit E-Cadherin abhängige Adhäsion zu inhibieren erhöht EpCAM selbst die Menge an freiem β-Catenin. [Modifiziert nach (Munz et al., 2009)]

Klinische Studien unterstützen die metastasierungsfördernden Eigenschaften von EpCAM. Eine Korrelation einer hohen EpCAM-Expression mit einem besseren klinischen Ergebnis wird nur in zwei Tumorarten beschrieben. Im Nierenzellkarzinom geht eine hohe EpCAM-Expression mit höherem Überleben der Patienten einher und in Metastasen dieses Tumors wird EpCAM weniger stark exprimiert als im Primärtumor (Klatte et al., 2009; Seligson et al., 2004; Went et al., 2005). Beim Schilddrüsenkarzinom exprimieren geringer differenzierte Tumore weniger EpCAM als ausdifferenzierte und eine höhere Überlebenschancen korrelierte mit einer hohen EpCAM-Expression (Ensinger et al., 2006; Ralhan et al., 2010).

Hingegen ist hohe EpCAM-Expression in vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert, wie z.B. in Blasen-, Gallenblasen-, Pankreas- und Brustkarzinomen (Brunner et al., 2008; Fong et al., 2008; Gastl et al., 2000; Scheunemann et al., 2008; Schmidt et al., 2008; Spizzo et al., 2004; Varga et al., 2004). Seine metastasierungsfördernden Eigenschaften werden auch durch die hohe Expression auf Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Kolorektalkrebs-CSC unterstützt (Al-Hajj et al., 2003; Li et al., 2007a; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007).

Wenngleich insbesondere die Studien zur Aktivität des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls EpCAM als Transkriptionsfaktor einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle des Moleküls in der Tumorprogression geliefert haben, bleiben noch viele Fragen unbeantwortet. Dies schließt auch die Klärung eines funktionellen Beitrags von EpCAM auf CSC mit ein.

1.5 Claudine

1.5.1 Struktur und Funktion

Die Proteinfamilie der Claudine besteht aus 24 Mitgliedern mit Molekulargewichten von 20-34 kDa, wobei die meisten Vertreter Molekulargewichte von 22-24 kDa aufweisen. Claudine sind integrale Membranproteine mit vier hydrophoben Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen (loop). Sowohl ihr amino- als auch carboxyterminales Ende erstreckt sich ins Zytoplasma (Abb. 4). Obwohl sie die Plasmamembran viermal durchspannen, gehören die Claudine nicht zu der Proteinfamilie der Tetraspanine (Morita et al., 1999; Tsukita and Furuse, 2000; Van Itallie and Anderson, 2006). Das n-terminale Ende ist ca. 4-5 Aminosäurereste kurz und gefolgt vom ersten extrazellulären Loop. Dieser enthält mehrere geladene Aminosäuren (aa) und ist für die intrazelluläre Ladungsselektivität von Bedeutung. Weiterhin enthält er zwei hochkonservierte Cysteinreste, von denen angenommen wird, dass sie einen Loop bilden und durch intramolekulare Disulfidbindung zur Proteinstabilität beitragen (Angelow et al., 2008; Colegio et al., 2002). Der zweite, kleinere, Extrazelluläre Loop kann als Rezeptor für Bakterientoxine dienen (Fujita et al., 2000).

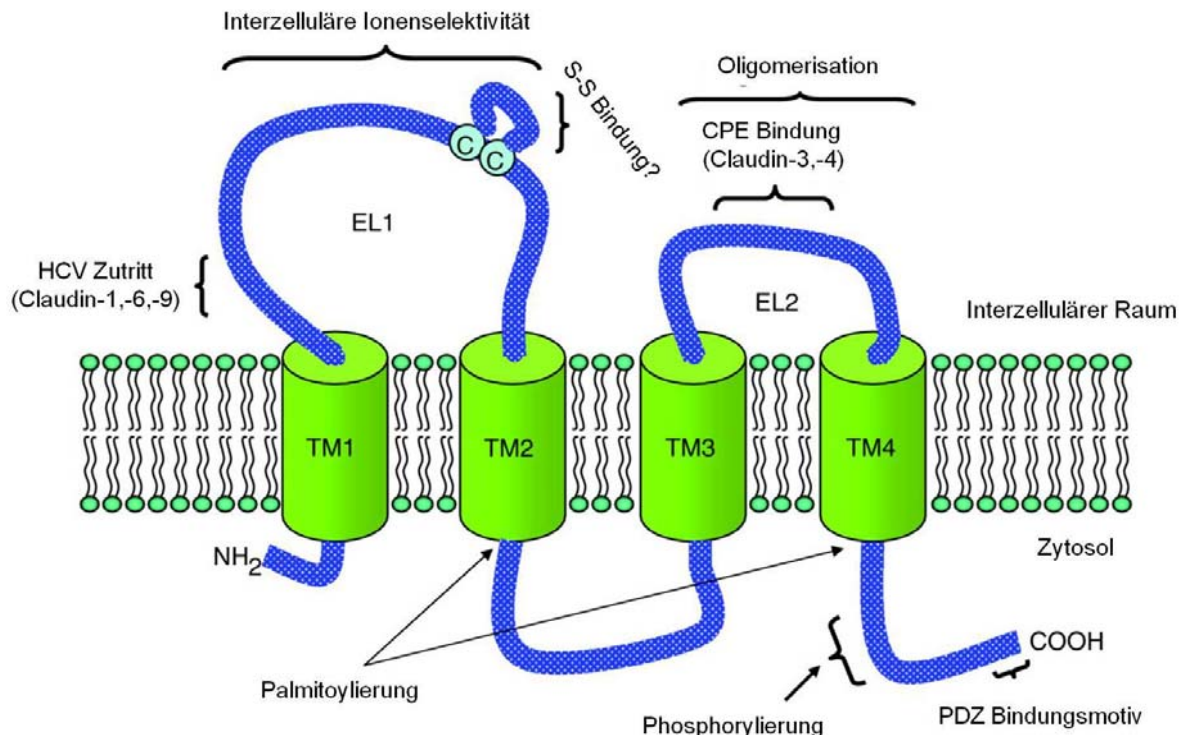


Abb. 4: Schematische Darstellung des Claudin Monomers

Dargestellt sind die konservierten Strukturen der Claudine und einige bekannte Interaktions- bzw. Modifikationsstellen. (EL1/2) Extrazellulärer Loop 1/2, (TM1-4) Transmembrandomäne 1-4, (HCV) Hepatitis C Virus Zutrittsstelle, (CPE) *Clostridium perfringens* Enterotoxinbindungsstelle. [Modifiziert nach (Lal-Nag and Morin, 2009)]

Das c-terminale Ende weist die größte Diversität innerhalb des Moleküls auf. Seine Länge variiert zwischen 21-63 aa (106 aa bei Claudin 23). Es beinhaltet, mit Ausnahme von Claudin 12, ein PDZ (PSD-95, Disks-large, ZO-1, Proteine die dieses Motiv haben) Bindungsmotiv. Des Weiteren ist es die Ansatzstelle für verschiedene post-translationale Modifikationen wie Tyrosin-Phosphorylierung und Palmitoylierung (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Hamazaki et al., 2002; Itoh et al., 2001; Mitic et al., 2000; Tsukita et al., 2001; Van Itallie et al., 2005).

Erstmals wurden Claudine als Komponenten von „tight junctions“ (zonula occludens) beschrieben und gelten heute, aufgrund ihrer Funktion, als integraler Bestandteil der tight junctions (TJ) (Balda and Matter, 1998; Furuse et al., 1998). Weitere Komponenten der TJ sind die Transmembranproteine Occludin und Tricellulin, sowie Verbindungskomplex- und zyttoplasmatische Plaqueproteine ZO 1 (zonula occludens), ZO 2, ZO 3, Cingulin und Symplekin (Bazzoni, 2003; Gonzalez-Mariscal et al., 2003). TJ befinden sich am apikalen Ende der lateralen Oberfläche von Epithel- oder Endothelzellen, bilden eine kontinuierliche, interzelluläre Diffusionsbarriere und trennen apikale von basolateralen Membranregionen (Balda

and Matter, 1998; Morita et al., 1999; Schneeberger and Lynch, 2004; Tsukita and Furuse, 2000). Die Bedeutung der Claudine für den Erhalt dieser Barriere ist klar beschrieben worden (Tsukita et al., 2008). Zwei Beispiele dafür sind: Claudin 1 defiziente Mäuse sterben kurz nach ihrer Geburt an Dehydration durch transdermalen Wasserverlust (Furuse et al., 2002). Claudin 11 defiziente Mäuse sind, wegen des Verlustes der TJ in der stria vascularis (laterale, sekretorische Wand des ductus cochlearis im Innenohr, produziert Endolymphe), taub (Gow et al., 2004; Kitajiri et al., 2004). Claudin-vermittelte Funktionen werden in mehreren Ebenen reguliert (Findley and Koval, 2009; Gonzalez-Mariscal et al., 2008). Viele Claudine haben in ihrem c-terminalen Ende Tyrosin- und/oder Threonin-Phosphorylierungsstellen sowie konservierte Dicystein-Palmitoylierungsstellen. Phosphorylierung dieser Domänen durch PKA (Proteinkinase A), PKC und die MLCK („myosin light chain kinase“), kann sich auf die claudinvermittelte Barrierefunktion auswirken, vermutlich aufgrund veränderter Lokalisation (D'Souza et al., 2005; D'Souza et al., 2007; Van Itallie et al., 2005). Palmitoylierte Claudine können in glykolipidreiche Membrandomänen verlagert werden, wo sie mit zytosolischen Gerüstproteinen („scaffold proteins“) interagieren und so Plattformen für die Signaltransduktion und die Anbindung an das Zytoskelett bilden (Yeaman et al., 1999). Des Weiteren unterliegen Claudin-abhängige Strukturen wie TJ einer konstanten Modulation durch endozytotisches Recycling (Matsuda et al., 2004; Sasaki et al., 2003). Die Endozytose wird durch Phosphorylierung der Claudine verstärkt, wodurch gleichzeitig ihre Integration in die TJ negativ beeinflusst wird (D'Souza et al., 2005; Ivanov et al., 2004; Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Die Auswirkungen der Claudinexpression auf die Barrierefunktion der TJ führten zu der Annahme, dass eine negative Regulation der Claudinexpression im Verlauf der EMT erfolgt und diese unterstützt (Carrozzino et al., 2005; Ikenouchi et al., 2003). Die oben beschriebene Einbindung der Claudine in Signalstrukturen unterstreicht jedoch die Möglichkeit einer aktiven Regulation der EMT durch Claudine, wie sie für Claudin 1 gezeigt werden konnte, welches über den Wnt / β -Catenin Signalweg die EMT beeinflusst (Okamoto et al., 2005). Diese Beobachtungen liefern, neben EpCAM, ein weiteres Beispiel dafür, dass ein Adhäsionsmolekül aktiv am metastatischen Prozess beteiligt sein kann.

Die klinische Datenlage ist allerdings nicht so eindeutig wie für EpCAM. Es gibt in der Tat Hinweise, dass die Auflösung der TJ durch Verlust der Claudine und anderer TJ-Proteine ein wichtiger Schritt in der Progression zu metastasierenden

Tumoren sein kann (Morin, 2005). So ist beispielsweise die Expression von Claudin 1 in Brust- und Darmkrebs reduziert (Kramer et al., 2000; Resnick et al., 2005). Andererseits wird die Expression von Claudin 3 und 4 in vielen Tumortypen hochreguliert (Morin, 2005). Auch in der Mehrheit der Pankreaskarzinome wird Claudin 4 überexprimiert (Michl et al., 2003; Nichols et al., 2004). Speziell beim IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasms) des Pankreas konnte hingegen gezeigt werden, dass die Expression von Claudin 4 mit einem stärker invasiven Phänotyp assoziiert ist (Sato et al., 2004). Diese Beispiele unterstreichen, dass die Funktionen der Claudine bei der Tumorgenese und Metastasierung maßgeblich durch den Gewebe- und Tumortyp bestimmt werden (Escudero-Esparza et al., 2011; Lal-Nag and Morin, 2009; Le Naour and Zoller, 2008; Morin, 2005; Ouban and Ahmed, 2010). Dies sei speziell für Claudin 7 ausgeführt, das bei der vorliegenden Dissertation eine zentrale Rolle einnimmt.

1.5.2 Claudin 7

Für Claudin 7 wurde beschrieben, dass es für die Bildung einer interzellulären Cl⁻-Barriere und eines Na⁺-Kanals verantwortlich ist. Die Regulation der interzellulären Permeabilität erfolgt mittels der ersten extrazellulären Domäne des Moleküls (s. Kapitel 1.5.1) (Alexandre et al., 2007; Alexandre et al., 2005). Claudin 7 ist aber auch das erste Claudin, für das eine diffuse Expression in basolateralen Membranen außerhalb der TJ in gesundem Gewebe nachgewiesen werden konnte (Alexandre et al., 2007; Alexandre et al., 2005; Blackman et al., 2005; Fujita et al., 2006). Diese Beobachtungen deuteten auf weitere, Barriere-unabhängige, Funktionen von Claudin 7 hin. Über diese möglichen weiteren Funktionen von Claudin 7 ist jedoch bis heute kaum etwas bekannt. In jüngerer Zeit konnte Claudin 7 als Stammzellmarker der Leber (oval cells) identifiziert werden (Yovchev et al., 2007).

Wie für alle Claudine gibt es auch für Claudin 7 immer mehr Hinweise auf wichtige Funktionen in der Tumorgenese. In verschiedenen Tumoren konnte eine anormale Expression von Claudin 7 festgestellt werden. Reduzierte Claudin 7-Expression war bei Brustkrebs, Kopf- und Nackenkrebs und im Plattenepithelkarzinom des Oesophagus mit einer schlechten Prognose assoziiert (Al Moustafa et al., 2002; Kominsky et al., 2003; Lioni et al., 2007; Park et al., 2007; Sauer et al.,

2005; Usami et al., 2006). Eine gesteigerte Claudin 7-Expression, verbunden mit einer schlechten Prognose, konnte beim chromophoben Nierenzellkarzinom und Nierenonkozytom sowie beim Riesenzelltumor des Knochens und im hepatozellulären Karzinom beobachtet werden (Borlak et al., 2005; Choi et al., 2007; Guenther et al., 2005). In vielen Fällen lässt sich die Claudin 7-Expression bei malignen Prozessen mit tumorigenen und prometastatischen Eigenschaften korrelieren. Wie bereits erwähnt, gibt es bei Kolon- und Pankreaskarzinomen Hinweise, dass ein aus Claudin 7, EpCAM, Tspan8 und CD44v6 bestehender Komplex die Metastasierung unterstützt (Kuhn et al., 2007). Letztlich sei erwähnt, dass beim Kolonkarzinom Claudin 7-Überexpression einen Polaritätsverlust der Tumorzellen unterstützt sowie β -Catenin/TCF-4-Aktivität und Proliferation verstärkt (Darido et al., 2008).

1.6 BSp73 Tumormodell

Das BSp73 Tumormodell geht auf eine Parentalzelllinie zurück, die aus einem spontan aufgetretenem Pankreasadenokarzinom (BSp73) einer BDX Ratte etabliert wurde (Zoller et al., 1978). Mehrmaliges subkutanes Passagieren einer aus Aszites gewonnenen Parentalzelllinie *in vivo* zeigte, dass der Primärtumor zwei Subklone enthielt, die sich hinsichtlich ihres metastatischen Potenzials stark unterschieden. Der Klon mit sehr geringem metastatischem Potenzial wurde mit BSP73AS (AS; Aszites → Subkutan) bezeichnet. Nach subkutaner Injektion in syngene Ratten, etablierte dieser Klon vornehmlich große, lokale Tumore an der Injektionsstelle und metastasierte nur gelegentlich in die drainierenden Lymphknoten. Der andere Klon, der ein sehr hohes metastatisches Potenzial aufwies, wurde mit BSp73ASML (ASML; Aszites → Subkutan, metastatisch, lymphogen) bezeichnet und wuchs nach Injektion in die Fusspfote oder subkutan kaum lokal. Er breitete sich jedoch sehr schnell über das Lymphsystem aus und etablierte miliare Lungenmetastasen, die zum Tod der Tiere führten (Matzku et al., 1983). AS Zellen ähneln in ihrer Morphologie und ihren adhäsiven Eigenschaften Epithelzellen. ASML Zellen hingegen weisen eine runde Form ohne erkennbares Ausbreiten auf und binden nur schwach an typische Substrate der ECM wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen (Matzku et al., 1985). Durch Generierung monoklonaler Antikörper konnten metastasierungsassoziierte

Moleküle identifiziert werden, die von ASML Zellen sehr stark, von AS Zellen jedoch nicht exprimiert werden (Matzku et al., 1989). Beschrieben wurden eine variante Isoform des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (Gunthert et al., 1991), C4.4A (Rosel et al., 1998), ein Molekül ähnlich uPAR, EpCAM (Wurfel et al., 1999), Integrin $\alpha 6\beta 4$ sowie Tetraspanin D6.1A (Tspan8) (Claas et al., 1998; Herlevsen et al., 2003). Mittels eines „Affimetrix GeneChip Arrays“ konnten mehrere hundert, in beiden Zelllinien differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden (Tarbe et al., 2002).

Die Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit basieren auf der Generierung dieses Tumormodells und der Identifikation der metastasierungsassoziierten Moleküle. So konnte in ASML Zellen, aber auch in humanen Kolorektal- und Pankreaskarzinomen gezeigt werden, dass phosphoryliertes Claudin 7 mit EpCAM assoziiert. Diese Bindung geht mit einer Verlagerung von EpCAM/Claudin 7 in TEMs einher. Dort assoziiert der EpCAM-Claudin 7-Komplex mit dem Tetraspanin Tspan8 und dem metastasierungsfördernden CAM CD44v6. Hierbei ist Claudin 7 und seine Bindung an EpCAM entscheidend für die Komplexbildung. Die Ko-Expression dieser Proteine und die Komplexbildung in den TEM korreliert invers mit krankheitsfreiem Überleben (Claas et al., 2005; Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005; Le Naour et al., 2006b). Zellen, die alle vier Moleküle des Komplexes exprimieren, sind stark apoptoseresistent. Hingegen weisen Zellen, die ein Protein des Komplexes nicht exprimieren oder deren TEMs durch Cholesterolfentfernung zerstört sind, eine stark reduzierte Apoptoseresistenz auf (Hemler, 2005; Kuhn et al., 2007; Le Naour et al., 2006a). Es gibt Hinweise, dass die EpCAM/Claudin 7/Tspan8/CD44v6 vermittelte Apoptoseresistenz durch Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges reguliert wird (Nubel et al., 2009). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass die Metastasierungsfähigkeit von ASML Zellen maßgeblich durch CD44v6 beeinflusst wird. Bei Reduktion der CD44v6-Expression durch einen stabilen CD44v4-v7-knockdown, verloren ASML Zellen ihr hohes metastastatisches Potenzial, wobei der von ASML Zellen sezernierten Matrix eine wesentliche Rolle zukommt. Die von ASML Zellen sezernierte Matrix unterstützt die Adhäsion von migrierenden, aus dem Primärtumor gelösten Tumorzellen und trägt in erheblichem Maße zu CD44v6-vermittelter Signaltransduktion bei (Jung et al., 2009; Jung et al., 2011; Klingbeil et al., 2009). Diese Befunde stehen im Einklang sowohl mit der Aktivität von CD44/CD44v6 als Hyaluronsäure-Rezeptor, als auch mit einem wesentlichen Beitrag der Tumorzell-Matrix-Interaktion in der Tumورprogression. Da die erwähnten Arbeiten

zu EpCAM-vermittelter Signaltransduktion zwar Hinweise auf die Bedeutung von EpCAM beim Tumorwachstum, nicht aber bei der Metastasierung lieferten, klinische Befunde aber eine Beteiligung von EpCAM am Metastasierungsprozess nahelegen, bot sich das ASML Tumormodell an, diese Frage mittels eines EpCAM-knockdown in Angriff zu nehmen.

1.7 Ziele der Arbeit

Patienten, die an einem Pankreaskarzinom leiden, haben aufgrund der meist späten Diagnose, verbunden mit einer frühen Metastasierung, eine extrem schlechte Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt deutlich unter zehn Prozent. Erkenntnisse über die Regulation der Metastasierung und Tumorigenität beim Pankreaskarzinom sind deswegen von größter klinischer Bedeutung, wobei nach heutigem Erkenntnisstand speziell CSC eine zentrale Rolle zukommt. Für das Pankreaskarzinom sind als CSC-Marker vornehmlich CD44v6 und EpCAM beschrieben. Für CD44v6 konnten wir und weitere Gruppen nachweisen, dass der Expression von CD44v6 eine funktionelle Bedeutung beim Metastasierungsprozess zukommt. Für EpCAM liegen keine entsprechenden Daten vor. Ziel meiner Arbeit war es daher in dem beschriebenen Tumormodell folgende Fragen zu beantworten:

- Ist EpCAM für den Metastasierungsprozess von essentieller Bedeutung?
- Welche Rolle spielt die Assoziation von EpCAM mit Claudin 7 bei der Metastasierung?
- Sofern EpCAM oder der Claudin 7-EpCAM-Komplex für die Metastasierung essentiell sind, welche molekularen Mechanismen liegen dem Beitrag von EpCAM und/oder EpCAM/Claudin 7 zur Metastasierung zugrunde?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Analysenwaage PT 3100	Sartorius, Göttingen
DNA-Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-Rad, Munich
ELISA Microplattenleser	Anthos labtec, Wals, Austria
Entwickler Agfa Curix 60	Siemens, Erlangen
FACS Calibur	Becton-Dickinson, Heidelberg
Fluoroskan Ascent Mikroplattenleser	Thermo scientific, Langenselbold
Geldokumentationssystem (Mididoc)	Herolab, Wiesloch
Inkubator für Bakterienkulturen	Melag, Berlin
Inkubator für Zellkulturen	Labotec, Goettingen
Inverslichtmikroskop DM-IL	Leica, Bensheim
Lichtmikroskop DMBRE	Leica, Bensheim
Magnetrührer	Heidolph, Keilheim
Mikrowelle	Phillips, Wiesbaden
Netzgerät PS 9009	GIBCO, Darmstadt
Netzgeräte	Consort, Turnhout, Belgien
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Ph-Meter-761 Calimatic	Knick, Berlin
Photokassette	Amersham, Freiburg

Photometer Ultraspec III	Amersham, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Präzisionswaage RC 210 D	Sartorius, Göttingen
Rotor GSA	Kendro, Langenselbold
Rotor SW 34	Kendro, Langenselbold
Rotor SW 41 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor SW 60	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttelgerät Vortex Genie [®]	Scientific Industries, New York, USA
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-PAGE System Mini-PROTEAN [®]	Bio-Rad, München
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab UW 2070	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Optima Le-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Western Blot System Mini Trans-Blot [®]	Bio-Rad, München
Zählkammer Neubauer improved	Brand, Wertheim
Zell Harvester 96	Tomtec, Hamden, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J6-MC	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Megafuge 10 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC5B Plus	Kendro, Langenselbold
β-Zähler betaplate 1205	LKB Wallac, Mt Waverley, USA

2.1.2 Sonstige Materialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Dako Stift	DakoCytomat., Glostrup, Denmark
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Migrationskammer AP48	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Nitrozellulosemembran Hybond [®] ECL [®]	Amersham, Freiburg
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm [®] M	American Nat. Can., Greenwich, GB
PCR Reaktionsgefäße	Axon Kaiserslautern
Pipettenspitzen	Sarstedt, Numbrecht
Polycarbonatmembran (Poren 8µm)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter 0,2µm	Renner, Darmstadt
Whatman [™] 3MM paper	Whatman GmbH, Dassel
Zellkultur Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur Multiwell Platten (96 Well, 24 Well, 6 Well)	Greiner, Frickenhausen

Zellkulturschalen (100mm)	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien unter Angabe des Herstellers

Name	Hersteller
^{32}P -ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
^3H -Thymidin	Amersham Bioscience, Freiburg
Acetoacetat	Merck, Darmstadt
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma, Seelze
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Seelze
Ampicillin Sulfat	Calbiochem, Darmstadt
Bactoagar	Fluka, Buchs, Switzerland
Biotin-X-NHS	Calbiochem, Darmstadt
Bradford Reagent	Bio-Rad, München
Brilliant Blau G-Colloidal Konzentrat	Sigma, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	PAA, Pasching, Österreich
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CFSE	Invitrogen, Darmstadt
Chloroform	Sigma, Seelze
Cisplatin (cis-Diaminplatinum(II)dichlorid)	Sigma, Seelze

Coomassie R250	Gerbu-Biotechnik, Gaiberg
DEPC	Applichem, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DSP	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
DTSSP	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
DTT	Sigma, Seelze
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Seelze
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Seelze
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
G418 Sulfat	PAA, Pasching, Österreich
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	GIBCO, Darmstadt
HEPES	Sigma, Seelze
Hyaluronsäure (Rooster Comb)	Sigma, Seelze
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth,, Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Laminin-5	K.Miyazaki, Yokohama, Japan
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Darmstadt
Lubrol MX (17A17)	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumkarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mayer´s Hämalau	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Roth, Karlsruhe
MTT (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdodekylsulfat (SDS)	Sigma, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma, Seelze

Natriumorthovanadat	Sigma, Seelze
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Natriumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Optifluor O	Perkin Elmer, Rodgau
Paraformaldehyd	Sigma, Seelze
Penizillin	Sigma, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Seelze
Phosphataseinhibitor PhosSTOP [®]	Roche Diagnostik, Mannheim
PMA (Phorbolmyristataacetat)	Sigma, Seelze
Poly-L-Lysin	Sigma, Seelze
Ponceau-S-Lösung	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Calbiochem, Darmstadt
Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostik, Mannheim
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	GIBCO, Darmstadt
Salzsäure	Sigma, Seelze
Streptomycinsulfat	Sigma, Seelze
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Seelze
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Seelze
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma, Seelze

Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Urea	Sigma, Seelze
β -Mercaptoethanol	Sigma, Seelze

2.1.4 Standard Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen unter Angabe des Herstellers

6x Laemmli Puffer	350 mM Tris, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 36 % (w/v) Glyzerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Bicarbonatpuffer	15 mM Na ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ , pH 9,6
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
Ethidiumbromid	0,01 % (w/v) in Wasser
HEPES Puffer	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, Protease-+ Phosphataseinhibitoren
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)	1 % SDS (w/v), 144 g Glyzin, 30 g Tris, ad 1 L dd H ₂ O
LB Medium	10 g Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 L dd H ₂ O. 15 g Agar für LB Agarplatten.
PBS	137 mM NaCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Stripping Puffer für WB	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 0,1 M β -Mercaptoethanol
TAE Puffer	242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1 L dd H ₂ O, pH 8,5
Transferpuffer (WB)	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, 20 % Methanol
Waschpuffer (WB Membranen)	PBS, 0,1 % Tween 20

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Enzyme unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
AccuPrime [®] Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
AflIII Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, USA
Calf Intestinal alkaline phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse	Promega, Mannheim
T4 Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Nukleotid- und Proteinstandards

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Nukleotid- und Proteinstandards unter Angabe des Herstellers

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

2.1.7 Kits

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Freiburg
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.8 siRNA

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten siRNAs unter Angabe des Herstellers

<u>siRNA</u>	<u>Hersteller</u>
Claudin 7 rat, SI01499463	QIAGEN, Hilden
Claudin 7 rat, SI01499470	QIAGEN, Hilden
MAPK1	QIAGEN, Hilden
ALEXA Fluor 488	QIAGEN, Hilden

2.1.9 Oligos

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligos unter Angabe der Sequenz

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
EpCAM kd 1.15 sense	5'-gatccccTGAGAATGAGAATGGTGAATGCCAGTTC AAGAGACTGGCATTACCATTCTCATTCTCAtttta-3'
EpCAM kd 1.15 antisense	5'-agcttaaaaaTGAGAATGAGAATGGTGAATGCCAGTCTC TTGAACTGGCATTACCATTCTCATTCTCAggg-3'
EpCAM kd 2.4 sense	5'-gatccccCTGCACTTCAGGACACATTTGCATCTTCAAGA GAGATGCAAATGTGTCCTGAAGTGCAGtttta-3'
EpCAM kd 2.4 antisense	5'-agcttaaaaaCTGCACTTCAGGACACATTTGCATCTCTC TTGAAGATGCAAATGTGTCCTGAAGTGCAGggg-3'
Claudin 7 kd 1 sense	5'-gatccccGGCTCGGTTAACAAGATTTTTC AAGAGAAAATCTTGTTAACCGAGCCtttta-3'
Claudin 7 kd 1 antisense	5'-agcttaaaaaGGCTCGGTTAACAAGATTTTCTC TTGAAAATCTTGTTAACCGAGCCggg-3'

Claudin 7 kd 2 sense	5'-gatcccc GAGACAAGGAAATGGCTAATTC AAGAGATTAGCCATTTCTTGTCTCttttta-3'
Claudin 7 kd 2 antisense	5'-agcttaaaaa GAGACAAGGAAATGGCTAATCTC TTGAATTAGCCATTTCTTGTCTCggg-3'

2.1.10 Primer

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer unter Angabe der Sequenz

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
EpCAM rescue Pst I sense	5'-GAGAGTTTGCATACTGCCCTGCAGGACA CATTTGCATC-3'
EpCAM rescue Pst I antisense	5'-GATGCAAATGTGTCCTGCAGGGCAGTAT GCAAACCTCTC-3'
EpCAM rescue Afl III sense	5'-CTGCACTTCAGGACACGTTTCGCATCTCGA TACATGC-3'
EpCAM rescue Afl III antisense	5'-GCATGTATCGAGATGCGAACGTGTCCTGA AGTGCAAG-3'
EpCAM rescue Pst I + Afl III sense	5'-CTGCCCTGCAGGACACGTTTCGCATCTCG ATACATGC-3'
EpCAM rescue Pst I + Afl III antisense	5'-GCATGTATCGAGATGCGAACGTGTCCTG CAGGGCAG-3'

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primärantikörper

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
AnnexinV-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
AnnexinV-APC	BD Biosciences, Heidelberg
Akt	BD Biosciences, Heidelberg
BAD	BD Biosciences, Heidelberg
Bak	Biozol, Eching
Bax	BD Biosciences, Heidelberg
Bcl-2	BD Biosciences, Heidelberg
Bcl-Xl	Cell Signaling, Frankfurt
Bid	BD Biosciences, Heidelberg
C4.4 (Klon C4.4)	Matzku et al., 1989
casp9,cleaved	Cell Signaling, Frankfurt
caspase3	Cell Signaling, Frankfurt
caspase8	BD Biosciences, Heidelberg
caspase9	Santa Cruz, Heidelberg
CD104	BD Biosciences, Heidelberg
CD11b(Klon Ox42)	European Association of Animal Cell Cultures
CD31	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 (Klon Ox35)	European Association of Animal Cell Cultures
CD8 (Klon Ox8)	European Association of Animal Cell Cultures
c-jun	Santa Cruz, Heidelberg

claudin-7	Pape et al., 2004
c-myc (Klon 9E10)	European Association of Animal Cell Cultures
cytochr. C	BD Biosciences, Heidelberg
EpCAM (Klon D5.7)	Matzku et al., 1989
ERK1,2	Santa Cruz, Heidelberg
ezrin	Sigma, München
JNK	BD Biosciences, Heidelberg
MEK	Santa Cruz, Heidelberg
NFκB	Santa Cruz, Heidelberg
p-Akt	BD Biosciences, Heidelberg
p-BAD	Santa Cruz, Heidelberg
p-c-jun	Santa Cruz, Heidelberg
p-ERK1,2	BD Biosciences, Heidelberg
p-ezrin	Cell Signaling, Frankfurt
PI3K	BD Biosciences, Heidelberg
p-IκB	Cell Signaling, Frankfurt
p-JNK	BD Biosciences, Heidelberg
PKC	BD Biosciences, Heidelberg
p-PKC	Cell Signaling, Frankfurt
PS2-NFT	Santa Cruz, Heidelberg
ras	BD Biosciences, Heidelberg
TACE	Stressgen, Ann Arbor, USA
Tspan8 (Klon D6.1)	Matzku et al., 1989
α6β4 (Klon B5.5)	Matzku et al., 1989
β-actin	BD Biosciences, Heidelberg

β -catenin

BD Biosciences, Heidelberg

2.1.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe des Herstellers

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-mouse-IgG-APC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-mouse-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-mouse-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-mouse-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-guineapig IgG-HRP	Dianova, Hamburg
Anti-guineapig-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-rat-IgG-HRP	Dianova, Hamburg
Anti-rabbit-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA
Anti-rabbit-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Anti-goat-IgG-HRP	Rockland, Gilbertsville, USA

2.1.12 Expressionsvektoren

Alle knockdown Konstrukte wurden in das pSUPER.gfp/neo Expressionsplasmid (Oligoengine, Seattle, USA) geklont.

Die EpCAM rescue Konstrukte wurden in das pcDNA3.1(+) Expressionsplasmid mit Hygromycinresistenz (Invitrogen, Darmstadt) geklont.

2.1.13 Bakterinstämme

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps

<u>Name</u>	<u>Genotyp</u>
<i>E.coli</i> DH5α	F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻,mk⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>rel A1</i> , λ ⁻ (Invitrogen, Darmstadt)
<i>E.coli</i> oneShot [®] TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen, Darmstadt)

2.1.14 Zelllinien

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Zelllinien unter Angabe des Ursprungs

<u>Name</u>	<u>Ursprung</u>
BSp73ASML	Pankreas Adenokarzinom, stark metastasierend, BDX Rattenstamm (Matzku et al., 1983)
BSp73ASML-EpCAM ^{kd}	BSp73ASML Zellen, bei denen die EpCAM-Expression stabil herunter reguliert wurde.
BSp73ASML-Claudin 7 ^{kd}	BSp73ASML Zellen, bei denen die Claudin 7-Expression stabil herunter reguliert wurde.
BSp73AS	Pankreas Adenokarzinom, nicht metastasierend, BDX Rattenstamm (Matzku et al., 1983)
Fibroblasten	Immortalisierte Lungenfibroblasten, BDX Rattenstamm (Weth, 2000)
Endothelzellen	Ratten Aorta Endothelzellen (RAEC), (isoliert aus dem Wistar Rattenstamm, Cell lining, Berlin)

2.1.15 Tiere

BDX Ratten wurden in der IBF (Universität Heidelberg) gezüchtet, unter Pathogen freien Bedingungen gehalten und mit sterilisiertem Futter und Wasser gefüttert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkulturen

Bakterien (*E.coli*) wurden in Luria Bertani (LB) Medium bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung von *E.coli* auf Agarplatten (60 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur abzentrifugiert (5 min, 4.000 Upm, RT), das Zellpellet in 500 µl des entsprechenden Mediums resuspendiert, mit 500 µl (1 Volumen = 50 %) sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* erfolgte nach der verbreiteten heat-shock-Methode. Hierzu wurden 50 µl der bei -80 °C gelagerten Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 50 µg Plasmid-DNA oder 20 µl PCR-Produkt gemischt. Diese Mischung wurde 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45 – 60 s bei 42 °C. Anschließend wurde die Mischung wieder 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB Medium wurde der Ansatz 45 min – 1 h bei 37 °C unter schütteln inkubiert (in dieser Zeit erfolgte die Expression des Ampicillin Resistenzgens). Darauf folgend wurden 50 – 150 µl des Transformationsansatzes auf einer LB_{amp}-Agarplatte ausplattiert und für 12 – 16 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne

Bakterienkolonien wurden von der Platte in LB Medium überführt und 12 – 16 h bei 37 °C unter schütteln zur Plasmidisolierung kultiviert.

2.2.1.3 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterienkulturen

Zur Präparation kleiner und mittlerer Mengen Plasmid-DNA wurden QIAGEN kits gemäß den Herstellerangaben verwendet (Miniprep / Midiprep).

Kleinere Plasmid-DNA Mengen wurden alternativ ohne Verwendung eines kits isoliert. Hierzu wurden 3 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur, welche das gewünschte Plasmid enthält, abzentrifugiert (5 min, 4.000 Upm, RT). Das erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCL, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, zur alkalischen Lyse mit 200 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt und durch mehrmaliges Umdrehen kräftig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Lyse durch Zugabe von 200 µl, 4 °C kaltem Puffer P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) abgestoppt. Nach sofortigem, vorsichtigem Mischen durch mehrmaliges Umdrehen, wurde die Probe 10 min auf Eis gehalten und anschließend abzentrifugiert (15 min, 13.000 Upm, 4 °C). Der Überstand wurde mit einem Volumen 4 °C kalten Isopropanol versetzt, gut gemischt und anschließend zentrifugiert (30 min, 13.000 Upm, 4 °C). Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 4 °C kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 30 – 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau erfolgte standardmäßig in einem 20 µl Ansatz. 1 – 15 µg DNA wurden mit 5 – 10 Units des entsprechenden Enzyms und 2 µl 10x-Restriktionspuffer gemischt und mit dd H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die 10x-Restriktionspuffer wurden nach Angaben des Enzymherstellers ausgewählt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 – 3 h oder über Nacht in Abhängigkeit von der DNA Menge.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Minimierung der Rezirkularisierung von linearisierter Plasmid-DNA wurden die 5'-Phosphatreste an beiden Enden der linearen, doppelsträngigen Plasmid-DNA enzymatisch entfernt (calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Reaktion wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und erfolgte 30 min bei 37 °C. Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 85 °C für 15 min.

2.2.1.6 Plasmid Ligation

Zur Ligation von cDNA Fragmenten in ein Plasmid wurde T4 Ligase und der zugehörige Ligasepuffer verwendet (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). 200 ng linearisierte und dephosphorylierte Plasmid-DNA wurden eingesetzt. Die Menge des Fragmentes wurde im molaren Verhältnis 3 : 1 (Fragment : Plasmid) berechnet. Die Reaktion erfolgte 1 h bei RT. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min.

2.2.1.7 siRNA-Transfektion

Für die Transfektion von ASML Zellen wurden 5×10^4 Zellen pro Well (24-Well-Platte) ausplattiert. Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte am nächsten Tag. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Expression der Zielproteine 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mittels SDS-PAGE und anschließendem WB kontrolliert.

2.2.1.8 Generierung der knockdown Konstrukte

Zur Generierung sowohl der EpCAM-, als auch der Claudin 7-knockdown-Konstrukte wurde das pSUPER RNAi System™ (Oligoengine, Seattle, USA) gemäß der

Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde jeweils die Sequenz der funktionalen siRNA in eine DNA Sequenz translatiert und in die vorgegebene Rahmensequenz des pSUPER RNAi System hairpins eingefügt. Die dementsprechend synthetisierten Oligos wurden anhand der integrierten BglIII und HindIII Restriktionsschnittstellen in die multiple cloning site des pSUPER.gfp/neo Expressionsplasmids ligiert (Abb. 5). Anschließend wurden die Konstrukte in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien transformiert und auf LB_{Amp}-Agarplatten kultiviert. Die aus einzelnen Bakterienkolonien gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau auf Enthalt der gewünschten Konstrukte überprüft. Vielversprechende Proben wurden durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft. Mittlere Mengen der knockdown Konstrukte wurden durch Plasmid Midiprep (QIAGEN, Hilden) gewonnen und Bakteriendauerkulturen wurden angelegt.

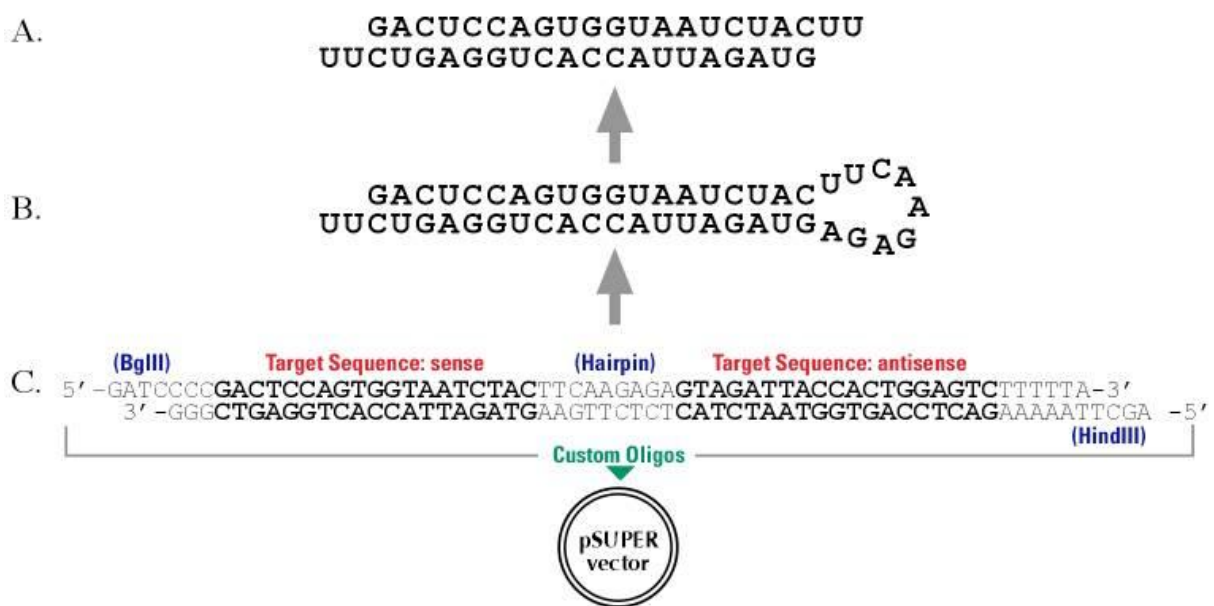


Abb. 5: Schematische Darstellung pSUPER RNAi System™

Schematische Darstellung der Transkription eines 60 Nukleotid Oligos in hairpin RNA und anschließende Prozessierung in funktionale siRNA. [pSUPER RNAi System™ Handbuch (Oligoengine, Seattle, USA)]

2.2.1.9 Generierung der EpCAM rescue Konstrukte

Der EpCAM rescue sollte in ASML-EpC^{kd} Zellen durch stabile Transfektion eines EpCAM cDNA enthaltenden Expressionsplasmids erreicht werden.

Als Ausgangspunkt zur Generierung des rescue Konstruktes wurde ein bereits vorhandenes Konstrukt verwendet, in welchem EpCAM in der Transmembrandomäne so mutiert ist, dass keine Bindung mit Claudin 7 erfolgen kann (Nubel et al., 2009). Um die Unterdrückung der Expression des exogenen EpCAMs durch das knockdown Konstrukt zu verhindern oder zumindest stark zu reduzieren, wurde die EpCAM cDNA im Erkennungsbereich der siRNA mutiert. Dies erfolgte durch das Einbringen mehrerer stiller Punktmutationen ohne Veränderung der Aminosäuresequenz. Durch diese Mutationen entstanden neue Restriktionsschnittstellen, die zur Erfolgskontrolle der Klonierung verwendet wurden. Die mutierte Plasmid-DNA wurde durch PCR unter Verwendung entsprechend synthetisierter Primer hergestellt. Anschließend erfolgte die Transformation der Konstrukte in chemisch kompetente *E.coli* und die Kultivierung auf LB_{Amp}-Agarplatten. Die aus einzelnen Bakterienkolonien gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdauung auf den Gehalt der gewünschten Konstrukte überprüft. Vielversprechende Proben wurden durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft. Mittlere Mengen der knockdown Konstrukte wurden durch Plasmid Midiprep (QIAGEN, Hilden) gewonnen und Bakteriendauerkulturen wurden angelegt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Quervernetzung von Proteinen

Zur Quervernetzung von Proteinen wurde der membranpermeable „Cross-Linker“ DSP (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) oder der membranimpermeable „Cross-Linker“ DTSSP entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Adhärente Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und für 2 h in Zellkulturmedium im Inkubator gehalten. Alternativ wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und 30 min bei RT mit DSP (1mM Endkonzentration) inkubiert. Durch Zugabe von Tris pH 7,5 (Endkonzentration 20 mM) und Inkubation für 15 min bei RT wurde die Reaktion abgestoppt.

2.2.2.2 Zellyse zur Gewinnung von Gesamtproteinproben

Zur Gewinnung von Gesamtproteinproben wurden adhärenen Zellen zunächst mit Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst und für 2 Stunden im Inkubator gehalten. Alternativ wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Danach wurden die Zellen pelletiert (1.600 Upm, 4 min, RT) und zweimal in HEPES-Puffer gewaschen. Die Zellyse erfolgte in 500 – 1500 µl Lysepuffer (HEPES-Puffer, 1 % Triton X 100 oder 1 % Lubrol) für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Durch Zugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zum Lysepuffer, gemäß der Herstellerangaben, wurde ein Proteinabbau bzw. die Dephosphorylierung durch die, bei der Zellyse freigesetzten, intrazellulären Proteasen und Phosphatasen verhindert. Daraufhin wurde das Lysat für 15 min bei 4 °C mit 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde konsequent bei 4 °C gehalten oder bei -20 °C gelagert. Der Proteingehalt des Lysates wurde mit der „Bradford-Methode“ bestimmt.

2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lysatprobe erfolgte mittels Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) entsprechend der Herstellerangaben. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurde 1 µl in eine 96-Well-Platte, in der 99 µl Bradford-Reagenz vorgelegt wurden, pipettiert. Als Standard dienten definierte BSA-Verdünnungen (0 – 5 µg/µl) in HEPES-Puffer. Die Ansätze wurden für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm (ELISA Microplattenleser Anthos labtec, Wals, Austria) gemessen. Die Auswertung erfolgte im Gerät mittels einer, am Proteinstandard erstellten, Kalibriergeraden.

2.2.2.4 Immunpräzipitation (IP)

Zum Nachweis möglicher, direkter Interaktion von Membran- bzw. zytosolischen Proteinen wurden Zellysate hergestellt. Bei den Proben erfolgte entweder vor der Lyse ein chemisches „cross-linking“ oder der Lysepuffer enthielt nur ein besonders

mildes Detergenz (HEPES-Puffer, 1 % Lubrol). Aus den Zelllysaten wurden entsprechend der Konzentrationsbestimmung 300 – 800 µg Gesamtprotein als Probe in die IP eingesetzt. Die Proben wurden mit HEPES-Puffer auf gleiches Volumen gebracht. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 5 µg/ml Primärantikörper gefolgt von 1 h Inkubation bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C in einem Über-Kopf-Rotierer. Anschließend wurden die Proben mit 5 % Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia, Freiburg) versetzt und 1 h bei 4 °C in einem Über-Kopf-Rotierer inkubiert. Die Sepharose wurde danach durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, 4 °C) pelletiert und dreimal mit kaltem HEPES-Puffer gewaschen, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (13.000 Upm, 1 min, 4 °C). Das erhaltene Sepharosepellet wurde in 20 – 60 µl 6x-SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Protein-Antikörper-Sepharose-Bindung zu lösen. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt in einer SDS-PAGE verwendet.

2.2.2.5 *In vitro* Kinase Assay

Kinase-Assay-Puffer: 25 mM HEPES pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂,
5 mM MnCl₂, Phosphatase- und Proteaseinhibitoren

Für einen *in vitro* Kinase Assay wurde zunächst eine IP durchgeführt, wobei alle Puffer phosphatfrei gehalten wurden. Danach wurde die Protein-G-Sepharose dreimal mit Lysepuffer, einmal mit Lysepuffer ohne Detergenz und einmal mit Kinase-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde anschließend in 20 µl Kinase-Assay-Puffer, der 10 µCi [³²P]γ-ATP enthielt, aufgenommen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgend wurde die Reaktion, durch Zugabe von 6x Laemmli-Puffer, gestoppt und anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurde die Probe in eine SDS-PAGE eingesetzt. Anschließend wurde das Gel entweder in Plastikfolie eingeschweißt oder einem Western-Blot (WB) unterzogen. In beiden Fällen folgte die Auswertung per Autoradiographie.

Alternativ wurde der Assay ohne vorhergehende IP durchgeführt. Hierzu wurden 60 µg Gesamtprotein aus Zelllysaten, anstelle des Präzipitates, in die Reaktion eingesetzt.

2.2.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische wurde das Mini-Protean[®] (II) System (Bio-Rad, München) verwendet. Das Trenngel (375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 10 – 12 % Bis-Acrylamid 30 % (Roth, Karlsruhe), 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)) wurde in die Gelapparatur gegossen und zur Begradigung mit ddH₂O, 1 % SDS überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde die Überschichtung abgesaugt und das Sammelgel (375 mM Tris pH 6,8, 0,1 % SDS, 4 % Bis-Acrylamide 30 % (Roth, Karlsruhe), 0,1 % TEMED (v/v), 0,1 % (w/v) APS) über das Trenngel gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt und die Kammer mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Nach Einbringen der Proben erfolgte die Elektrophorese zu Beginn bei 60 V, nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 100 – 120 V erhöht. Nach Abschluss der Auftrennung wurden die Gele einem WB unterzogen.

2.2.2.7 Western-Blot (WB)

Nach einer SDS-PAGE wurde das Proteingel 10 min in Transferpuffer equilibriert. Ebenso wurde mit der Nitrozellulosemembran und 3MM Whatman-Papieren verfahren. Zum Transfer wurde das Gel auf eine Doppellage 3MM-Papier gelegt, gefolgt von der Nitrozellulosemembran. Darauf folgte wiederum eine Doppellage 3MM-Papier. Anschließend wurde die Anordnung in einem mit zwei angefeuchteten Schwämmen versehenen Gelhalter fixiert und so in die Transferkammer (Mini Trans-Blot[®], Bio-Rad, München) eingesetzt, dass die Nitrozellulosemembran zur Anode orientiert war. Der Transfer erfolgte bei 60 V für 2 h bei 4 °C bzw. bei 30 V über Nacht bei 4 °C.

Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Magermilch in PBST (PBS, 0,1 % Tween 20) für 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte für 1 h bei RT mit Hybridomüberständen oder über Affinitätschromatographie gereinigten

Antikörpern in PBST, 5 % Milch. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit Peroxidase (horse radish peroxidase (HRP)) gekoppelten Sekundärantikörpern in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBST für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran nochmals dreimal 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der durch primär- und sekundär Antikörper markierten Proteinbanden erfolgte durch Chemilumineszenz. Hierzu wurden „ECL Western Blotting Detection Reagents“ und „Hyperfilm ECL“-Filme (Amersham, Freiburg) verwendet.

2.2.2.8 Sucrose Gradient Ultrazentrifugation

Die verschiedenprozentigen Sucrose Lösungen wurden entsprechend dem Zellysepuffer in HEPES-Puffer angesetzt.

Zur Aufteilung eines Zelllysates in seine Dichtefractionen, wurden 800 µl Zelllysate mit 800 µl 80 %iger Sucrose gemischt. Die hierdurch erhaltenen 1,6 ml Lysat in 40 %iger Sucrose wurden in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen eingefüllt und durch sehr vorsichtiges pipettieren mit 1,6 ml 30 %iger Sucrose überschichtet. Abschließend wurde eine Schicht aus 800 µl 5 %iger Sucrose hinzugefügt. Die Proben wurden sehr vorsichtig in einen SW41 Ti Schwingrotor eingesetzt und in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (30.000 Upm/100.000 G, 4 °C, 15 h). Darauf folgte die Aufteilung der Proben durch sehr vorsichtiges pipettieren in zwölf gleiche Fraktionen. Die so gewonnenen Proben wurden entweder sofort für eine SDS-PAGE oder, nach teilweisem Vereinigen der Fraktionen, für eine IP verwendet. Nach der Fraktionierung der Proben konnten diese auch bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultur

BSp73ASML^{wt} -, BSp73ASML-EpC^{kd} -, BSp73ASML-Cld7^{kd}-, BSp73AS-Zellen, Fibroblasten, sowie RAEC wurden in RPMI 1640-Medium, welches 10 % Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml

Streptomycin enthielt, im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Partialdruck und 90 % Luftfeuchte unter sterilen Bedingungen kultiviert. Für die Kultivierung der beiden knockdown Zelllinien wurden dem Medium in regelmäßigen Abständen 500 ng/ml G418 Sulfat zur Selektion zugesetzt. Ab einer 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden sie mit 0,25 % (w/v) Trypsin / 5 mM EDTA in PBS von der Zellkulturflasche abgelöst

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit einer „Neubauer Zählkammer-improved“ bestimmt. Hierfür wurden 50 µl einer Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt, entsprechend einer Verdünnung von 1:1. Nach Auszählen der vier Eckgroßquadrate unter dem Mikroskop, wurde der erhaltene Wert durch vier geteilt und so ein Mittelwert pro Großquadrat ermittelt. Dieser Wert wird mit dem Faktor 10 multipliziert (Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe) wodurch man die Zellzahl pro Mikroliter, ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, erhält. Daraus ergibt sich die Formel:

Zellzahl (pro Großquadrat) x Verdünnungsfaktor x 10.000 = Zellzahl/ml

2.2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

1×10^7 Zellen wurden unter sterilen Bedingungen trypsiniert, mit frischem RPMI 1640-Medium gewaschen und in eiskaltem FCS/10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei -80 °C gelagert und anschließend zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

2×10^5 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 24 Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ~90 % transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin™ 2000 entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.3.5 Reklonierung transfizierter Zellen

Transfizierte Zellen wurden unter Selektionsdruck kultiviert. Die Expression des Transgenes wurde mittels WB und/oder FACS überprüft. Die Zellen wurden mit einer Verdünnung von ein oder drei Zellen pro Well in einer 96 Well-Platte ausgesät. Nach vier bis sechs Wochen wurden die Klone mittels WB und/oder FACS analysiert und für eine zweite Reklonierung ausgesät, um den Erhalt eines Einzelzellklons mit hohem bzw. niedrigem (bei kd) Expressionslevels sicherzustellen.

2.2.3.6 Kristallviolett-Färbung von adhärennten Zellen

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 4 min bei RT mit 4 % Formalin fixiert. Danach wurde das Formalin abgesaugt und durch eine 1 %ige Kristallviolett-Lösung ersetzt. Inkubiert wurde bei RT für 4 min. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit ddH₂O gewaschen, getrocknet und in 10 %iger Essigsäure lysiert. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption bei 595 nm (ELISA Microplattenleser Anthos labtec, Wals, Austria).

2.2.3.7 CFSE-Markierung von Zellen

Zur Markierung mit CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) wurden die Zellen in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit CFSE (5 µM in Serum freien Medium) für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal in normalem Zellkulturmedium (10 % FCS) gewaschen und für 30 min in frischem Medium im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.8 Adhäsions Assay

96 Well-Platten wurden mit BSA und Matrixproteinen beschichtet (6 h, 4 °C in Bicarbonatpuffer pH 9,6; HA 100 µg/ml, FN 2 µg/ml, LN 2 µg/ml, VN 1 µg/ml, Col III

10 µg/ml, Col IV 10 µg/ml, BSA 10 µg/ml) oder enthielten einen einschichtigen Zellrasen (monolayer). Unbehandelte und PMA (10 nM) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in die beschichteten Platten ausgesät. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Platten vorsichtig mit PBS gewaschen. Die verbleibenden adhärenen Zellen wurden mittels Kristallviolett-Färbung ausgewertet. Alternativ wurde der Assay mit CFSE-markierten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen durchgeführt, wobei die Auswertung mit einem Fluoreszenz Mikroplattenleser (Fluoroskan Ascent multiplate reader, Erregung: 490 nm, Emission: 518 nm) erfolgte. Die Adhäsion wurde jeweils in Prozent der ausgesäten Zellen dargestellt.

2.2.3.9 Migrations Assays

a) Scratch Assay

In etwa 70 % konfluente Monolayer aus ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurde mit einer feinen Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Wundheilung wurde 24 h und 48 h nach der Verwundung mittels Lichtmikroskopie ausgewertet. Wo beschrieben, wurden die Zellen in Gegenwart von PMA (10 nM) oder Antikörpern (10 µg/ml) kultiviert.

b) Transwell Assay (Boyden-Chamber)

Die Transwell Migration wurde mittels einer Boyden-Chamber mit einer Membranporengröße von 8 µm analysiert. ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Antikörpern (10 µg/ml) inkubiert, in 30 µl Medium (RPMI/0,1 % BSA) aufgenommen und in die obere Kammer pipettiert. Die untere Kammer enthielt 30 µl RPMI Medium mit entweder 1 % oder 20 % FCS. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran in eiskaltem Methanol fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Die Migrationseffizienz wurde in Prozent der ausgesäten Zellen dargestellt.

2.2.3.10 ³H-Thymidin Inkorporations Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden 5×10^4 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen in eine 96 Well-Platte in Zellkulturmedium ausgesät. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen mit PMA (10 nM), oder mit Cisplatin (0-10 µg/ml für 48 h bzw. 72 h) inkubiert. Nach Zugabe von ³H-Thymidin (10 µCi/ml) wurde der Ansatz 16 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet (Zell Harvester 96) und die ³H-Thymidin-Aufnahme mit Hilfe eines Flüssig-Scintillationszählers (betaplate 1205) bestimmt.

2.2.3.11 MTT-Färbung

Mit Hilfe des MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) kann die Proliferationsaktivität (Vitalität) von Zellen durch Messung der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt werden. Dies erfolgt durch Umwandlung des Tetrasoliumsalses MTT, je nach metabolischer Aktivität der Zellen, zu dunkelrotem Formazan.

ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in eine 96 Well-Platte in Zellkulturmedium ausgesät und 48 h mit Cisplatin (0-10 µg/ml) inkubiert. Eine sterile MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) wurde im Verhältnis 1:10 direkt in die Proben pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bis 2 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der Platte (1.400 Upm, 4 min) wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von 100 µl MTT-Lysemischung (99,4 % (v/v) DMSO, 0,6 % (v/v) konz. Essigsäure, 10 % (w/v) SDS) wurden die Zellen lysiert und die Formazankristalle aufgelöst. Nach fünfminütiger Inkubation und leichtem Schütteln erfolgte die Auswertung durch Messung der Absorption bei 560 nm (ELISA Microplattenleser Anthos labtec).

2.2.3.12 Soft Agar Colony Formation Assay

2×10^3 – 5×10^3 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in 0,25 % Agar (in RPMI Medium, 10 % FCS) aufgenommen und auf einer vorbereiteten

Schicht 0,5 % Agar (in RPMI Medium, 10 % FCS) in 6 Well-Platten ausgesät. Nach 3 Wochen erfolgte die Auswertung durch Auszählung der Kolonien. Je nach Versuchsansatz enthielt die Zell-Agar-Schicht 0-1 µg/ml Cisplatin. Die Kolonien-Wachstums-Effizienz wurde in Prozent der ausgesäten Zellen dargestellt.

2.2.3.13 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 3×10^5 Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei RT fixiert, mit 0,2 % Tween (in PBS/1 % BSA) permeabilisiert und mit 0,2 % Gelatine (freshwater goldfish in PBS/1 % BSA) für 15 min geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern (AK) (2 – 10 µg/ml, 1 h, 4 °C). Die Objektträger wurden gewaschen und mit einem fluorchrom-gekoppelten Sekundär-AK inkubiert (1 h, 4 °C). Nach erneutem blocken und einer Inkubation mit einem zweiten, fluorchrom-gekoppelten Primär-AK (1 h, 4 °C) wurden die Proben erneut gewaschen und in Elvanol (20 % (w/v) Mowiol in 2 Teilen PBS, pH 8,0 und 1 Teil Glycerin) eingebettet. Die Auswertung erfolgte über digitale Bilder (40x Objektiv Leica DMRBE Mikroskop, SPOT-CCD Kamera, Diagnostic Instruments, SPOT2.1.2 Software).

2.2.3.14 Kryo-Schnitte von Tumor Gewebe

Nach Präparation von Rattenorganen wurden diese auf Kork-Plättchen aufgebracht und mit Einbettmedium `Neg-50` (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo) überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Mit einem Kryotom (Reichert Jung `2800-FRIGOCUT E`) wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 8 µm angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt.

2.2.3.15 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Verwendete Lösungen:

- Vectastain-Lösung: 2 Tropfen Reagenz A (Avidin) und 2 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) werden in 10 ml PBS verdünnt (Vectastatin ABC Kit)
- AEC-Lösung 1: 2,1 ml 0,1 M Essigsäure mit 7,9 ml 0,1 M Natriumacetat gemischt
- AEC-Lösung 2: 4,0 mg AEC in 500 µl Dimethylformamid gelöst

Gewebeschnitte wurden mit eiskaltem Aceton 4 min fixiert und über Nacht bei RT getrocknet und anschließend mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet. Die Schnitte wurden mit PBS/2 % BSA geblockt und mit je 10 µl Primärantikörper (in PBS/2 % BSA), für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal in PBS/1 % BSA gewaschen, getrocknet und mit je 10 µl Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper (in PBS/2 % BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/1 % BSA wurden die Schnitte getrocknet und mit je 10 µl Vectastatin-Lösung für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/1 % BSA wurden die Schnitte getrocknet. AEC-Lösung 1 und 2 wurden vermischt und mit 5 µl 30 %iger H₂O₂ versetzt. Nach Auftragen von je 10 µl der AEC-Lösung wurden die Schnitte für 5 - 20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert, dreimal mit PBS/1 % BSA gewaschen, getrocknet, mit Mayers Hämalaunlösung 5 min gegengefärbt und unter fließendem Wasser gespült. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Kaisers Glyceringelatine eingebettet. Die Auswertung erfolgte über digitale Bilder (Leica DMRBE Mikroskop, SPOT-CCD Kamera, Diagnostic Instruments, SPOT2.1.2 Software).

2.2.3.16 FACS-Analyse

Zur Detektion fluoreszenzmarkierter Proteine und Zellen mittels FACS (Fluorescence activated cell sorter [Durchflußzytometer]) wurden $1 - 3 \times 10^5$ Zellen in Rundboden-96-Well-Platten überführt. Wurden die Zellen zuvor trypsinisiert, verblieben die Zellen für 2 h im Brutschrank zur Regeneration der Oberflächenmoleküle. Zum Flüssigkeitswechsel wurden die Platten zentrifugiert (1.600 Upm, 4 min, 4 °C) und danach der Überstand durch ausschlagen der Platte entfernt. Nach einmaligem waschen in FACS-Puffer (PBS, 1 % FCS, pH 7,4) wurden die Proben mit Primärantikörper (1 – 5 µg/ml) für 30 min bei 4 °C inkubiert, dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und danach mit Fluorochrom markiertem Sekundärantikörper (0,3 – 0,5 µg/ml) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann gemessen. Wo angegeben, für intrazellulären Proteinnachweis erforderlich, wurden die Zellen in 1 % Formalin (20 min, 4 °C) fixiert, dreimal in FACS-Puffer gewaschen und mit 0,2 % Tween (in FACS-Puffer) permeabilisiert (30 min, 4 °C) bevor die Antikörperinkubationen erfolgten. Gemessen und ausgewertet wurde mit dem „FACSCalibur“ und der Software „CellQuestPro“, (Becton-Dickinson).

2.2.3.17 Zellzyklus-Analyse

Zur Analyse des Zellzyklus mittels FACS, erfolgte eine Propidiumiodid (PI) Färbung. Hierzu wurden ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in Rundboden-96 Well Platten überführt und zentrifugiert (1.600 Upm, 4 min, 4 °C). Nach einmaligem Waschen mit PBS (1.600 Upm, 5 min, 4 °C) erfolgte für 2 h die Fixierung der Zellen in 70 %igem Ethanol bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation (1.600 Upm, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet angefärbt (RNAase [0,1 mg/ml], PI [10 µg/ml]) und 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung der Zellen mittels Durchflußzytometer analysiert. (Auswertung: CellQuestPro Software, Becton-Dickinson).

2.2.3.18 Apoptose Assay (AnnexinV/PI)

1×10^5 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in Zellkulturmedium mit titrierten Mengen Cisplatin (0 – 40 µg/ml) kultiviert. Nach 48 h wurden die Proben mit AnnexinV/PI markiert und mittels FACS analysiert. Hierbei wird der Effekt genutzt, dass sich Phosphatidylserin (PS) ausschließlich in der inneren Lipidschicht der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet. Bereits in der frühen Phase der Apoptose wird PS in die äußere Lipidschicht der Zellmembran transloziert. AnnexinV bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit flouorchromgekoppeltem AnnexinV kann man apoptotische Zellen mittels FACS nachweisen. Nekrotische Zellen haben eine durchlässige Zellmembran, durch die AnnexinV in die Zellen eindringen und sich an innengelegenes PS binden kann. Daher können durch eine AnnexinV-Markierung apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die AnnexinV-Markierung mit einer PI-Färbung. Das (PI) gelangt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also nekrotische Zellen. Lebende Zellen sind daher AnnexinV-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind AnnexinV-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind AnnexinV-positiv und PI-positiv.

Zur AnnexinV/PI-Markierung wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1.600 Upm, 4 min, 4 °C). Die Zellen wurden anschließend in 50 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM Ca₂Cl) resuspendiert, welcher 0,5 µl fluorchrommarkiertes AnnexinV und 1 µg/ml PI enthielt. Die Färbung wurde bei RT für 15 min im Dunkeln durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 150 µl Bindungspuffer aufgenommen und mittels FACS gemessen. (Auswertung: CellQuestPro Software, Becton-Dickinson).

2.2.4 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.

2.2.4.1 *In vivo* Metastasierung

ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen (1×10^6 bzw. 5×10^6) wurden in die Fusspfote (ifp) von 10 – 14 Wochen alten, weiblichen BDX Ratten injiziert. Die Ratten

wurden wöchentlich auf lokales Tumorwachstum, Tumorwachstum in den drainierenden Lymphknoten (LK), intraperitoneales Tumorwachstum, Entwicklung von Aszites, Kurzatmigkeit oder Gewichtsverlust untersucht. Die Tiere wurden getötet, wenn der drainierende LK einen Durchmesser von 2 cm erreichte, Aszites auffällig wurde, die Ratten bleich oder erschöpft waren, Gewicht verloren (10 % des Ausgangskörpergewichtes) oder nach spätestens vier Monaten. Bei der Autopsie wurde der durchschnittliche Durchmesser des lokalen Tumors, sowie aller LK gemessen. Aszites und Pleuraergüsse wurden gesammelt. Die Lungen wurden herauspräpariert, gewogen und zusammen mit anderen Organen makroskopisch auf Metastasen untersucht. Teilweise wurden Organproben für die Histologie eingefroren. Tumorzellen aus Lungen und LK wurden per FACS und WB analysiert. Aus makroskopisch tumorfreien Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, welche in Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

In einem anderen Ansatz wurden 10 – 14 Wochen alten, weiblichen BDX Ratten 5×10^6 CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Nach einer Woche wurden die Tiere getötet und die Injektionsstelle sowie der drainierende LK herauspräpariert. Die Proben wurden auf das Vorhandensein von CFSE-markierten Tumorzellen mittels FACS untersucht.

2.2.4.2 Ex vivo Soft Agar Colony Formation Assay

Mit *ex vivo* Einzelzellsuspensionen des lokalen Tumors, der Lunge und dem poplitealen LK, aus dem unter 2.2.4.2 oben beschriebenen Experiment, wurden „Soft Agar Colony Formation“ Assays (siehe 2.2.3.12) angesetzt, um eine makroskopisch nicht erkennbare Metastasierung nachweisen zu können. Hierzu wurden die Lymphknoten komplett und die Lungen zur Hälfte in Einzelzellsuspension gebracht und $\sim 5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt.

2.2.4.3 *In vivo* Apoptoseresistenz

Nach der intraperitonealen (ip) Injektion von 5×10^6 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen, erhielten 10 – 14 Wochen alte, weibliche BDX Ratten PBS- oder Cisplatininjektionen (ip, 1 mg/kg Körpergewicht, 3 d und 24 d nach der Tumorzellinjektion). Die Ratten wurden wöchentlich auf intraperitoneales Tumorstadium, Entwicklung von Aszites, Kurzatmigkeit oder Gewichtsverlust untersucht. Die Tiere wurden getötet, wenn Aszites auffällig wurde, die Ratten bleich oder erschöpft waren, Gewicht verloren (10 % des Ausgangskörpergewichtes) oder nach spätestens vier Monaten. Bei der Autopsie wurde der durchschnittliche Durchmesser des lokalen Tumors sowie aller LK gemessen. Aszites und Pleuraergüsse wurden gesammelt. Die Lungen wurden herauspräpariert, gewogen und zusammen mit anderen Organen makroskopisch auf Metastasen untersucht. Teilweise wurden Organproben für die Histologie eingefroren. Tumorzellen aus Lungen und LK wurden per FACS und WB analysiert. Aus makroskopisch tumorfreien Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, welche in Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

2.2.5 Statistik

Alle *in vitro* Versuche die statistisch ausgewertet wurden, repräsentieren mindestens drei unabhängige Wiederholungen. Bei P-Werten < 0.05 (Student's t-Test) wurde ein signifikanter Unterschied angenommen.

In *in vivo* Versuchen wurde bei dem kleinstmöglichen P-Wert von 0,1 (Wilcoxon Rangsummentest) ein signifikanter Unterschied angenommen.

3 Ergebnisse

EpCAM (EpC) ist ein CSC-Marker beim Pankreaskarzinom. Welche Rolle EpC funktionell für CSC spielt, ist bislang nicht bekannt. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass eine Tumorzelllinie, die EpC bzw. EpC/Claudin 7 (Cld7) hoch exprimiert, sich durch fulminante Metastasierungsfähigkeit auszeichnet. Daher bot sich dieses Modellsystem an, die Rolle von EpC als CSC-Marker mittels eines EpC-knockdown (kd) zu untersuchen. Ein kd von Cld7 diene als Kontrolle, ob EpC alleine oder der EpC-Cld7-Komplex die Metastasierung beeinflusst.

3.1 Ein knockdown von EpCAM oder Claudin 7 reduziert das metastatische Potenzial von ASML^{wt} Zellen *in vivo* drastisch

Um einen stabilen kd von EpC bzw. Cld7 zu etablieren, wurden entsprechende siRNA-Konstrukte entweder im Labor etabliert (Pamela Klingbeil, nicht veröffentlicht) oder kommerziell bezogen. Von vier EpC bzw. zwei Cld7 siRNAs wurde die effizienteste Sequenz ausgewählt, wie für Cld7 gezeigt (Abb. 6A). Nach diesem Vorscreening wurde, basierend auf der siRNA-Sequenz, ein kd Konstrukt hergestellt, welches zur stabilen Expression von EpC bzw. Cld7 siRNA in der Zelle führt. Diese Konstrukte wurden in ASML^{wt} Zellen transfiziert. Aus Bulkulturen, die im WB eine deutliche Reduktion der EpC- bzw. Cld7-Expression zeigten, wurden durch Klonierung in limitierenden Verdünnungsreihen, Klone mit effizienter Reduktion der Expression selektioniert und so ein stabiler EpC bzw. Cld7 kd in ASML Zellen etabliert (Beispiel in Abb. 6B).

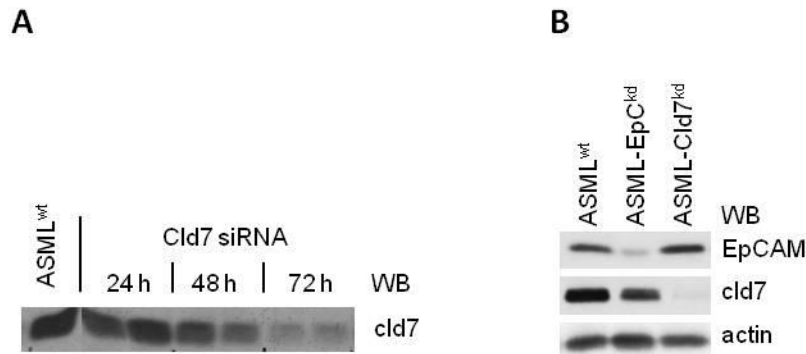


Abb. 6: Kd von EpC bzw. Cld7 in ASML^{wt} Zellen

(A) ASML^{wt} Zellen wurden mit Cld7 siRNA behandelt und nach den angegebenen Inkubationszeiten in Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

Um die von uns aufgestellte Hypothese, EpC bzw. ein EpC-Cld7-Komplex beeinflusst das metastatische Potenzial von ASML^{wt} Zellen, zu überprüfen, wurden BDX Ratten 1×10^6 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Das lokale und metastatische Tumorwachstum wurde beobachtet. Tiere, denen ASML^{wt} Zellen injiziert worden waren, wiesen ein sehr geringes lokales Tumorwachstum auf. In den drainierenden Lymphknoten und den Lungen war ein exzessives Tumorwachstum zu beobachten. Die Tiere mussten nach sechs bis sieben Wochen aufgrund der massiven Lungenmetastasen getötet werden. Die Tiere, denen ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen injiziert worden waren, wurden nach 120 Tagen in gutem Allgemeinzustand getötet. Die ASML-EpC^{kd} Tiere hatten kleine lokale Tumore und Metastasen in den drainierenden LK (popliteal und/oder paraaortal) entwickelt. Kontralaterale LK und die Lungen der Tiere waren nicht betroffen. In ASML-Cld7^{kd} Tieren zeigte sich ein noch geringeres metastatisches Potenzial. Mit Ausnahme eines Tieres, waren die drainierenden LK makroskopisch metastasenfrem. Eine Überprüfung der Expression von EpC/Cld7 in den lokalen Tumoren mittels WB zeigte, dass das beobachtete Tumorwachstum tatsächlich durch die ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen verursacht worden und keine Reexpression dieser Proteine erfolgt war (Abb. 7, Tabelle 15).

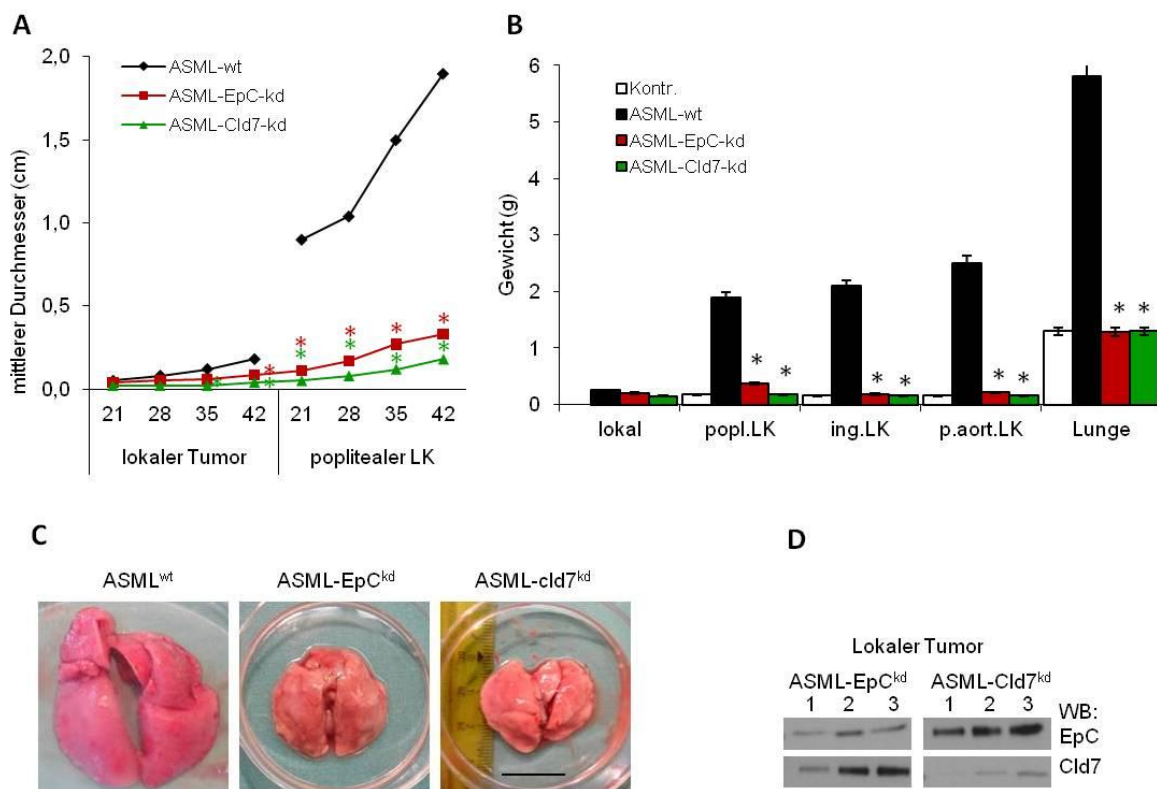


Abb. 7: *In vivo* Wachstum von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen
 BDX Ratten wurden 1x10⁶ ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. (A) Lokales Tumorwachstum und LK Metastasierung wurden für einen Zeitraum von sechs Wochen kontrolliert (Angabe in Tagen). Wenn die Tiere merklich krank wurden, spätestens aber nach 120 d, wurden sie getötet und durch (B) wiegen und (C) makroskopisch [Mittelwerte ± STAB] (Maßstab: 2 cm) auf LK- und Lungenmetastasen untersucht. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit * gekennzeichnet. (D) Proben des lokalen Tumors von ASML-EpC^{kd} bzw. ASML-Cld7^{kd} tragenden Tieren wurden in Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundäntikörper detektiert.

Tumor ^a	Lokales Wachstum ^b	Metastasen ^b		
		drainierende LK	entfernte LK	Lunge
ASML ^{wt}	0.1-0.2cm 10/10	>2cm 10/10	>2cm 10/10	>1000 (miliar) 10/10
ASML-EpC ^{kd}	0.1-0.6 7/11	0.4 (0.1-1) 6/11	0/11	0/11
ASML-Cld7 ^{kd}	0.1-0.2 2/10	0.2 1/10	0/10	0/10

Tabelle 15: *In vivo* Wachstum von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen
^aBDX Ratten wurden 1x10⁶ Tumorzellen in die Fusspfote injiziert. ^b ASML^{wt} Tieren wurden getötet wenn sie merklich krank wurden, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tiere wurden nach 120 d getötet.

Zusätzlich zur makroskopischen Auswertung wurden Proben von potentiellen Metastasen-Zielorganen schockgefroren und 5 µm dünne Schnitte angefertigt, die immunhistochemisch auf Tumorzellen untersucht wurden. Da im Lungenepithel EpC stark und Cld7 schwach exprimiert wird (Abb. 8), welches auch in lymphatischen Gefäßen exprimiert wird (Nelson et al., 2007) diente C4.4A [ASML-Marker, der nicht in der Lunge und in LK exprimiert wird (Matzku et al., 1989)] als zusätzlicher ASML-Marker.

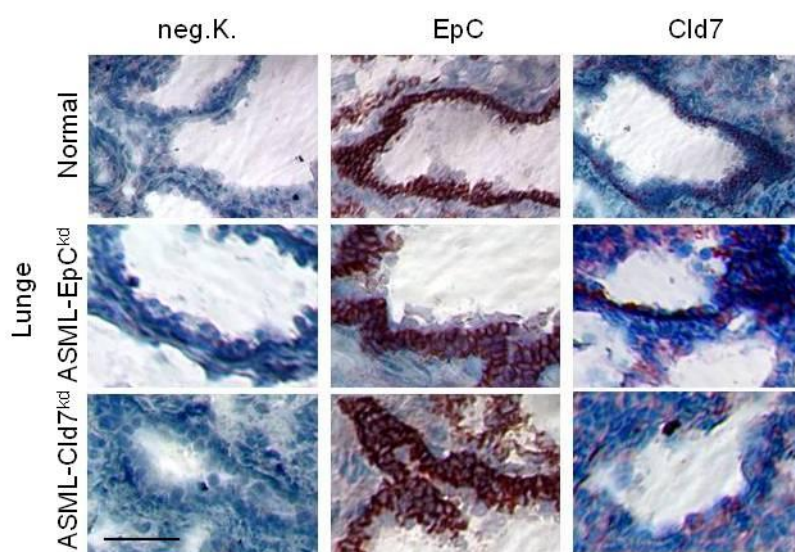


Abb. 8: Immunhistochemie der Rattenlunge
BDX Ratten wurden 1×10^6 ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Nach 120 d wurden die Tiere getötet. Immunhistologische Färbung der Lunge mit D5.7 (anti-EpC) und anti-Cld7. Die Lungen waren makroskopisch metastasenfrei. Die starke (EpC) und schwächere (Cld7) Expression in Gewebeproben un behandelter BDX Ratten macht die Notwendigkeit eines zusätzlichen Tumormarkers (C4.4A) deutlich (obere Reihe). Maßstab: 50 µm.

Die immunhistologischen Untersuchungen bestätigten die makroskopischen Befunde. Es konnten Tumorzellen in den drainierenden LK von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen tragenden Tieren nachgewiesen werden, jedoch nur in den Lungen der ASML^{wt} tragenden Tiere (Abb. 9). Weitere immunhistologische Untersuchungen mit dem endothelialen Gefäß-Marker CD31 (PECAM-1) und den T-Zell-Markern CD4 und CD8 zeigten hinsichtlich der Vaskularisierung keine Unterschiede zwischen Tumoren der wt- bzw. kd-Zellen. In den LK der ASML^{wt} Tiere zeigten sich ausschließlich Tumoreareale, die die T-Zellen weitestgehend verdrängt hatten. In den LK der ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tiere machen die T-Zellen hingegen noch ~80 % der Zellmasse aus, was auf eine Infiltration der LK mit Tumorzellen, jedoch auf kein massives Metastasenwachstum hindeutet (Abb. 10).

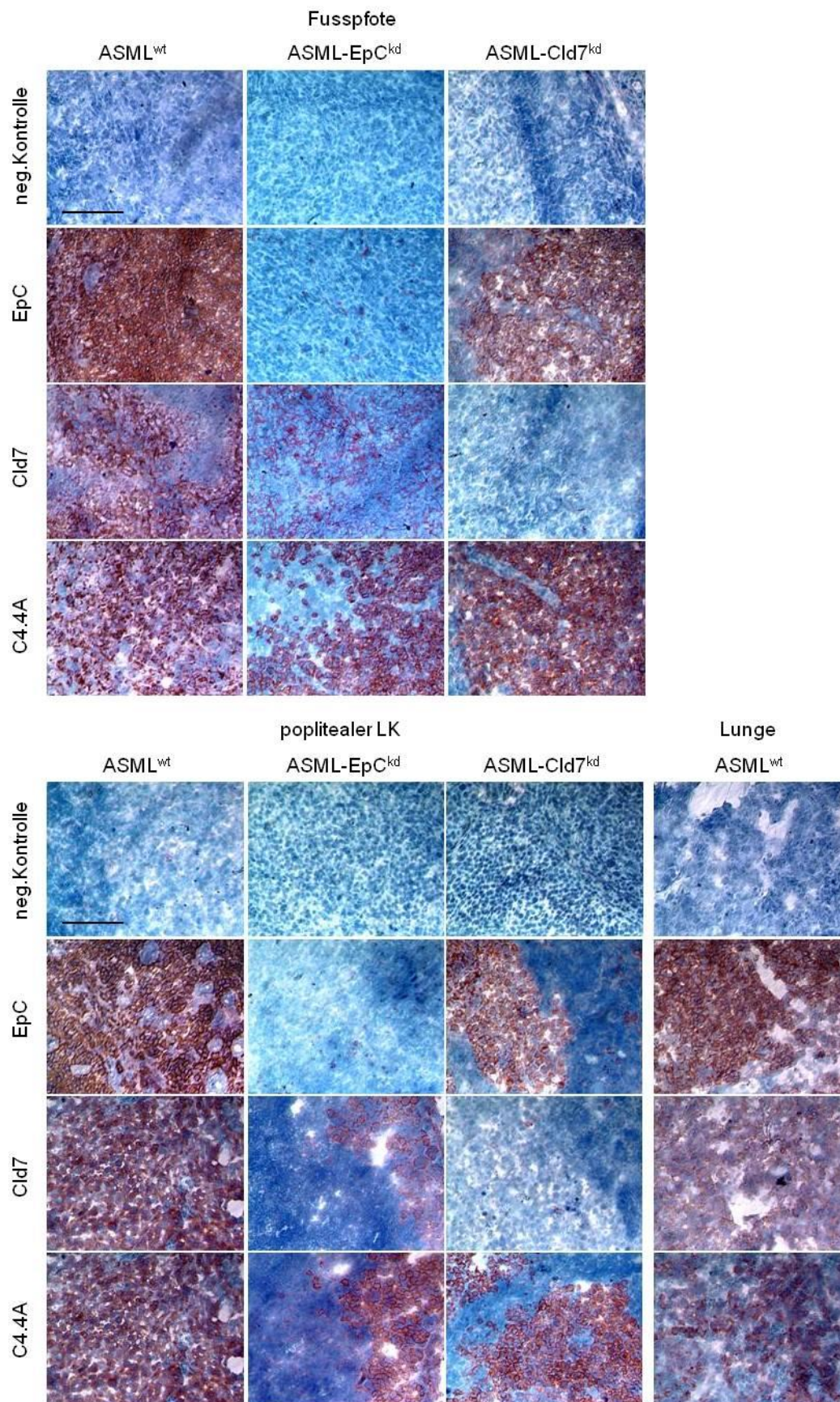


Abb. 9: Immunhistochemie von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tumoren
BDX Ratten wurden 1×10^6 ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Immunhistologische Färbung der Fusspfote, dem poplitealen LK und der Lunge mit D5.7 (anti-EpC), anti-Cld7 und anti-C4.4A. Maßstab: 100 μ m.

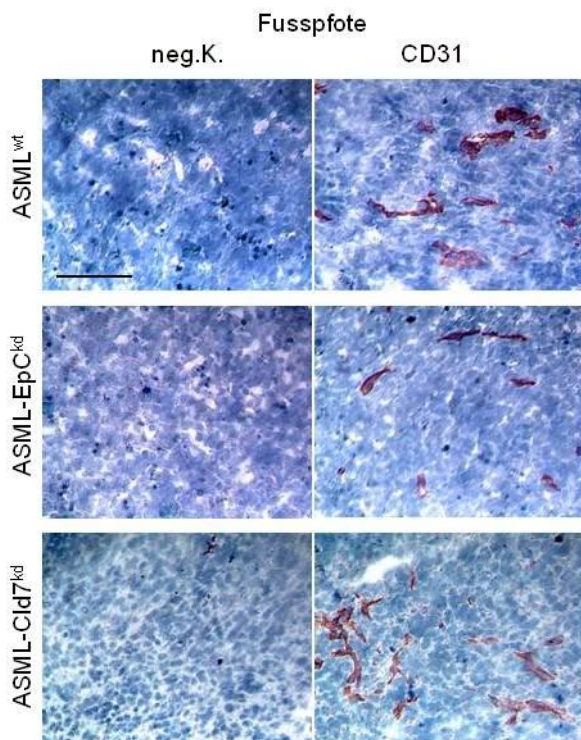
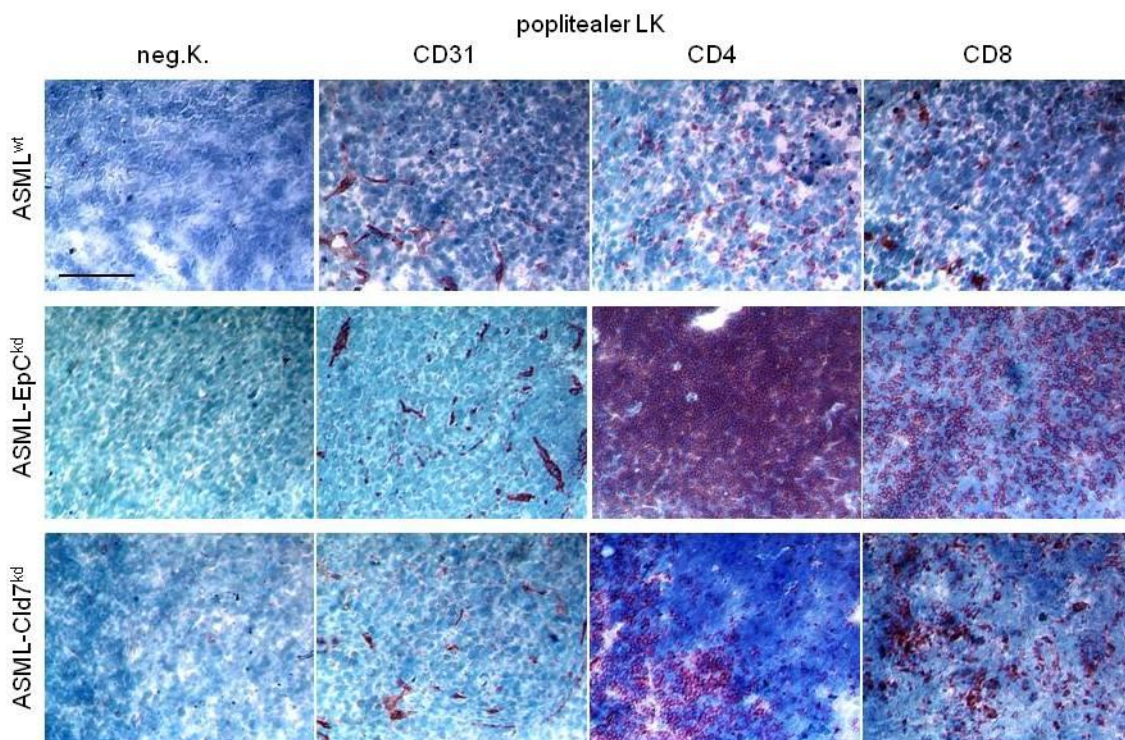


Abb. 10: Immunhistochemie von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tumoren
BDX Ratten wurden 1×10^6 ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Immunhistologische Färbung der Fusspfote und des poplitealen LK mit anti-CD31, anti-CD4 und anti-CD8. Maßstab: 100 μ m.



Zur weiteren Analyse des Tierexperiments wurden Einzelzellsuspensionen der LK und Lungen der Tiere per FACS (Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Scanning, Durchflusszytometrie) untersucht. Hierbei konnten die histologischen Daten bestätigt werden. ASML^{wt} Zellen wurden in den drainierenden LK und den Lungen zu einem hohen Prozentsatz nachgewiesen. Zu einem deutlich geringeren Prozentsatz ließen sich ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen in den poplitealen LK nachweisen.

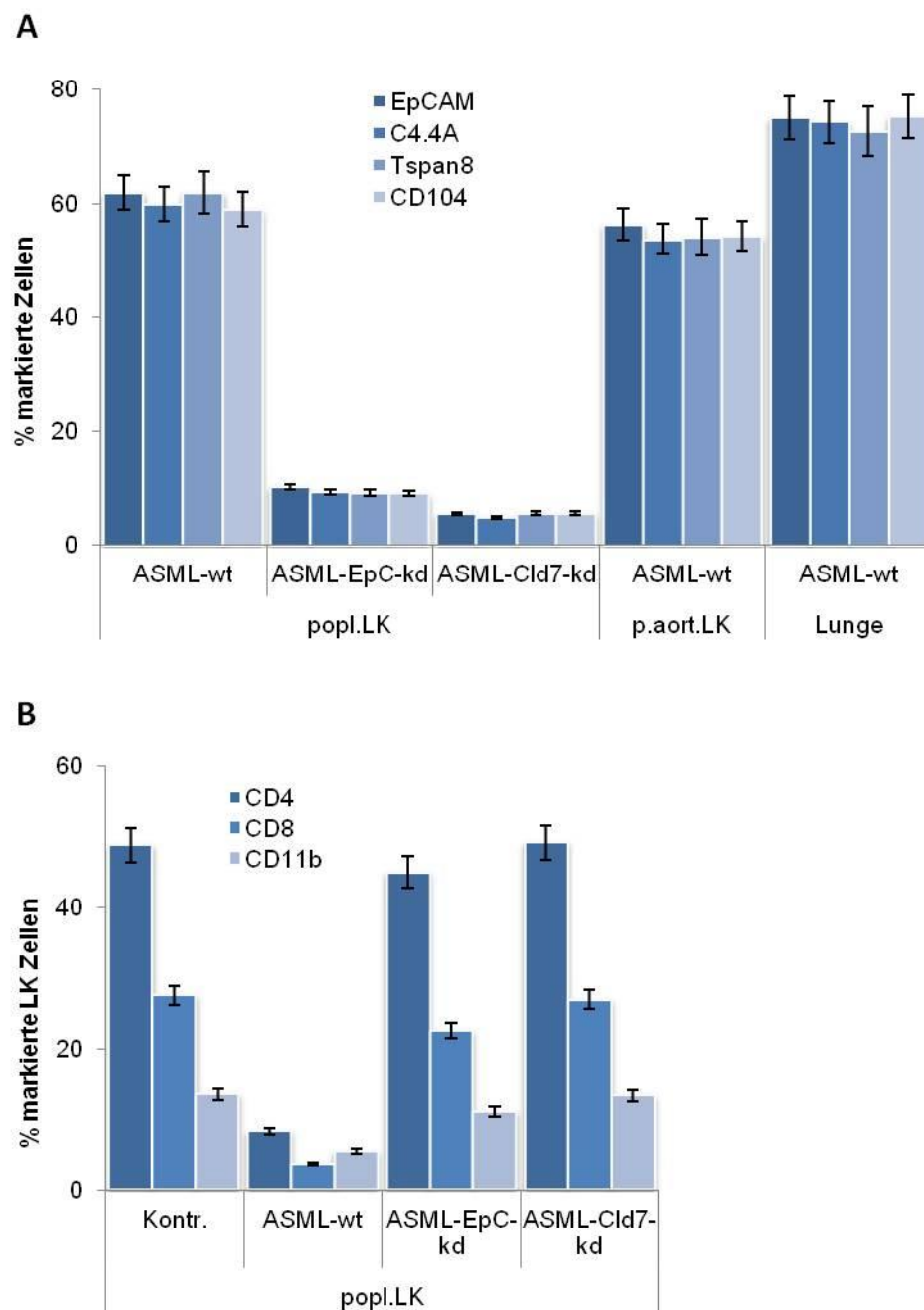


Abb. 11: FACS Analyse von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tumoren

Tierbehandlung siehe Abb. 7. Einzelzellsuspensionen der angegebenen Organe wurden anhand der angegebenen Marker auf das Vorhandensein von (A) Tumorzellen oder (B) Zellen des Immunsystems hin untersucht. Angaben in Prozent \pm STAB.

In den paraaortalen LK und den Lungen konnten keine kd Zellen nachgewiesen werden. C4.4A, Tspan8 und CD104 ($\alpha 6\beta 4$ Integrin) wurden als zusätzliche ASML-Marker verwendet (Abb. 11A). Die bisherigen Ergebnisse bestätigend, konnte bei der FACS Analyse der poplitealen LK auf T-Zellen (CD4/CD8) und Makrophagen

(CD11b) hin, nur bei Proben der ASML^{wt} tragenden Tiere eine Verdrängung der Immunzellen beobachtet werden (Abb. 11B).

Zur weiteren Analyse wurden Zelllysate der lokalen Tumore, des poplitealen LK und der Lunge der ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen tragenden Tiere proteinbiochemisch mittels WB untersucht. Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen konnte der ASML-Marker C4.4A in lokalen Tumoren, den popl. LK und der Lunge von ASML^{wt} Tieren nachgewiesen werden. In den popl. LK der ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tiere ließ sich C4.4A ebenfalls nachweisen, in den ASML-Cld7^{kd} Tieren jedoch in deutlich geringeren Mengen (Abb. 12A). In *ex vivo* „soft agar colony formation“-Experimenten erfolgte Zellkoloniewachstum bei Proben der ASML-EpC^{kd} Tiere aus dem lokalen Tumor und in geringerem Maße bei Proben aus dem poplitealen LK. Bei Proben des lokalen Tumors der ASML-Cld7^{kd} Tiere waren weniger Kolonien zu beobachten und bei Proben des poplitealen LK waren lediglich einzelne Kolonien vorhanden. Keine der beiden Tiergruppen zeigte Koloniewachstum in Proben der Lunge (Abb. 12B). Das Wachstum der beobachteten Kolonien erfolgte über mehrere Wochen. Aus Einzelzellsuspensionen der poplitealen LK angesetzte *ex vivo* flüssig-Zellkulturen von ASML^{wt} Tieren zeigten ein deutliches Tumorzellwachstum. In entsprechenden Kulturen der ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tiere war ebenfalls Tumorzellwachstum zu beobachten. Dies erfolgte im Vergleich zu den ASML^{wt} Tieren jedoch langsamer und nur bei gleichzeitigem Wachstum von Stromazellen (Abb. 12C). Ebenso wie in den soft agar-Experimenten dauerte die Etablierung der Tumorzellkulturen aus den Organproben mehrere Wochen.

Zusammengefasst konnte in diesem Tierexperiment beobachtet werden, dass ASML^{wt} Zellen große LK- und miliare Lungenmetastasen innerhalb von sechs Wochen bilden, ASML-EpC^{kd} Zellen hingegen bilden lediglich kleine Tumornester in den LK und erreichen nicht die Lunge. ASML-Cld7^{kd} Zellen bilden, mit einer Ausnahme, keine makroskopisch diagnostizierbaren Metastasen. Diese Befunde zeigen, dass ein kd von EpC oder Cld7 in ASML Zellen eine dramatische Reduktion des metastatischen Potenzials der Zellen zur Folge hat. Der stärker reduzierende Effekt beim Cld7^{kd}, könnte auf weitere EpC- oder Cld7-selektive Funktionen hindeuten.

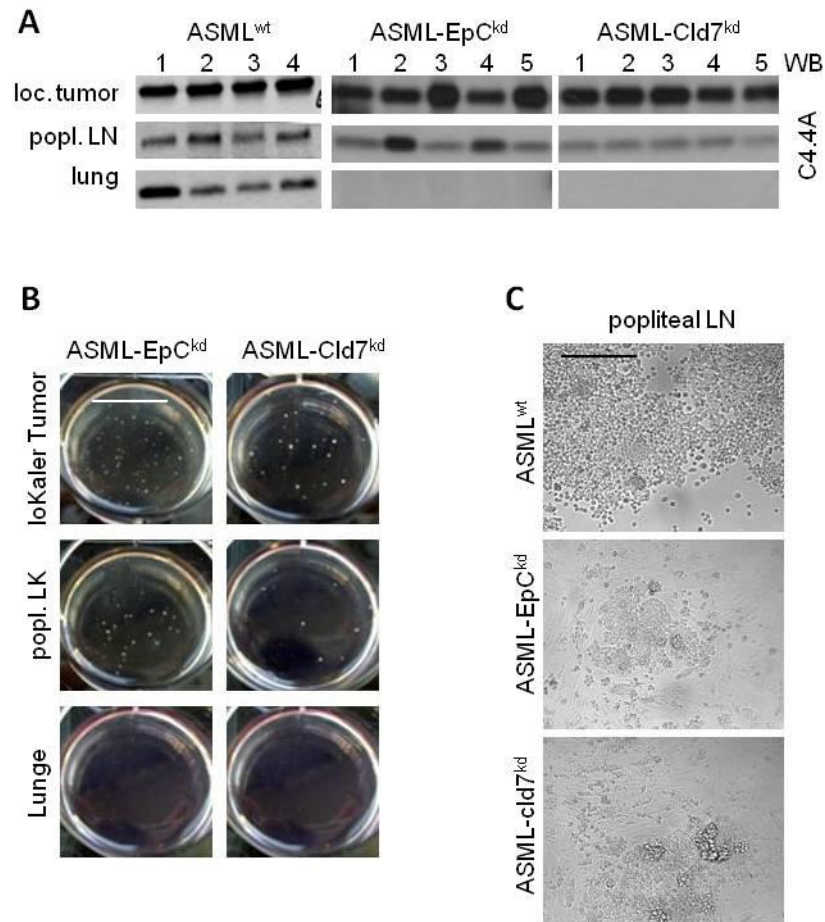


Abb. 12: *Ex vivo* Analyse von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Tumoren

Tierbehandlung siehe Abb. 7. (A) Organproben wurden in Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen spezifischen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) „soft agar colony formation assay“. Proben der angegebenen Organe wurden in Einzelzellsuspension gebracht. $\sim 5 \times 10^6$ Zellen wurden eingesetzt und der Ansatz mehrere Wochen im Brutschrank kultiviert. Maßstab: 2,5 cm. (C) Flüssig-Zellkultur aus Einzelzellsuspensionen der angegebenen Organe. $\sim 5 \times 10^6$ Zellen wurden eingesetzt und der Ansatz mehrere Wochen im Brutschrank kultiviert. Maßstab: 100 μm .

3.2 Claudin 7 beeinträchtigt EpCAM-vermittelte Zell-Adhäsion

Der kd von EpC bzw. Cld7 reduzierte *in vivo* dramatisch die Metastasierung von ASML Tumorzellen. Um die molekularen Ursachen dieses Effekts zu verstehen, wurden mehrere zelluläre Eigenschaften untersucht, die für das metastatische Potential einer Zelle und insbesondere für CSCs von Bedeutung sind. Als erstes wurde der Einfluss des EpC- bzw. Cld7-kd auf die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion evaluiert.

Zur Untersuchung der Zell-Matrix-Adhäsion wurden unbehandelte oder PMA (PKC Aktivator, Stress-Stimulus) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen auf mit BSA- oder verschiedenen ECM-Proteinen beschichteten Platten ausgesät und teilweise in Gegenwart von D5.7 (anti-EpC) oder B5.5 (anti- $\alpha 6\beta 4$) kultiviert. Die Adhäsion wurde durch Färbung mit Kristall-Violett gemessen. ASML^{wt} Zellen adhäreren generell nur schwach an ECM-Proteine (Matzku et al., 1985). Dies ist auch bei unbehandelten und PMA-behandelten ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen zu beobachten. Eine geringere Adhäsion dieser Zellen auf FN ist nicht EpC-vermittelt, da eine Inhibition der ASML-Cld7^{kd} Zellen auf FN durch D5.7 nicht zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wurde die Adhäsion auf Col IV von ASML-Cld7^{kd} Zellen durch den D5.7 AK inhibiert, nicht jedoch die Adhäsion von ASML^{wt} Zellen. Dies deutet auf eine von freiem EpC abhängige Adhäsion an Col IV hin. Die Inhibition der Adhäsion an LN1 sowohl durch D5.7 als auch B5.5 deutet darauf hin, dass LN1-Bindung über den EpC/Cld7-Komplex und das $\alpha 6\beta 4$ Integrin vermittelt wird. Die Adhäsion an LN5 hingegen zeigte sich als EpC und EpC/Cld7-Komplex unabhängig, da die Bindung aller drei Zelllinien nur durch B5.5 inhibiert wurde (Abb. 13).

Um die Zell-Zell-Adhäsion zu untersuchen wurden unbehandelte und PMA-behandelte, CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen auf einem einschichtigen Zellrasen (monolayer) aus ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd}, ASML-Cld7^{kd}, AS Zellen, Lungenfibroblasten (LF) oder Endothelzellen (EC) ausgesät. ASML^{wt} Zellen und ASML-Cld7^{kd} Zellen adhärerten besser auf ihren entsprechenden Monolayern als auf ASML-EpC^{kd}-und AS Zellen (Ladwein et al., 2005) sowie auf LF und EC.

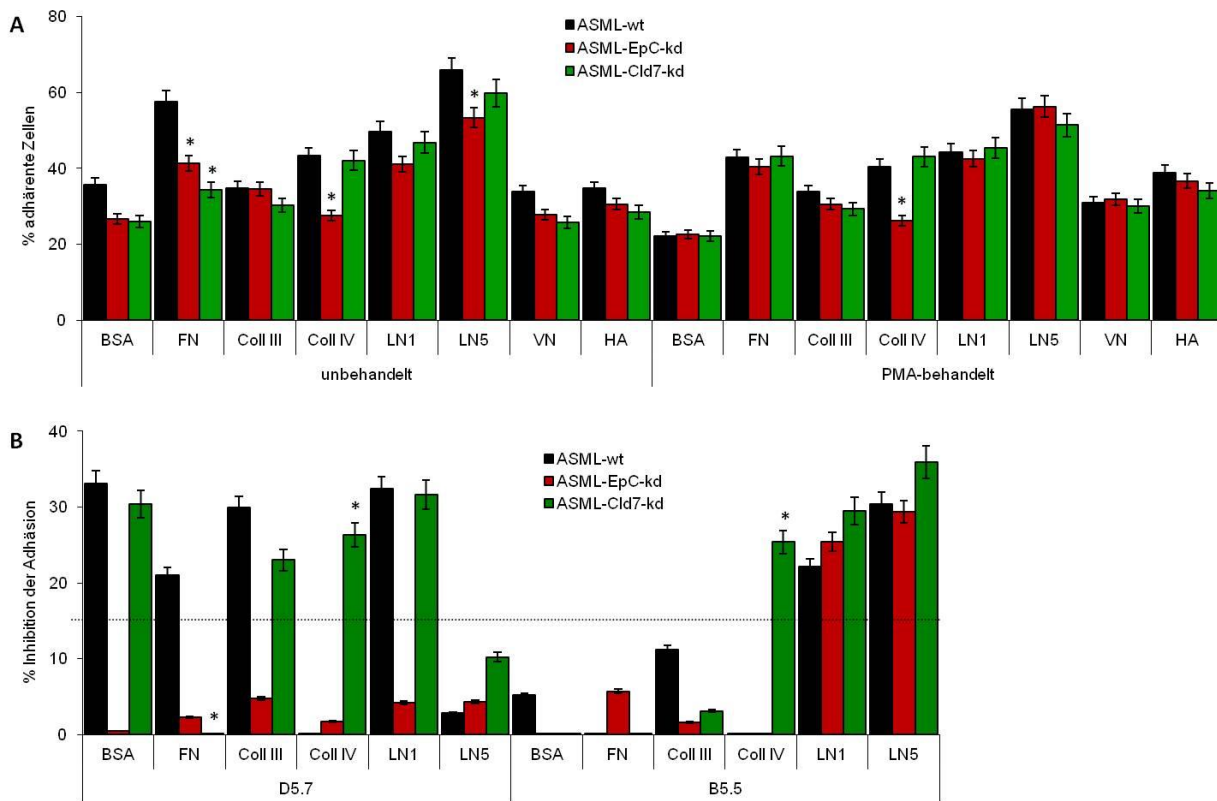


Abb. 13: Zell-Matrix-Adhäsion von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

Unbehandelte oder PMA (10 nM) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden auf BSA oder den beschriebenen ECM Proteinen ausgesät. (A) Angegeben sind die adhärenen Zellen in Prozent (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. (B) Die Zellen wurden zusammen mit D5.7 oder B5.5 AK inkubiert. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Adhäsion im Vergleich zu Kontroll IgG (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). 15 % Inhibition (gestrichelte Linie) sind statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Inhibition im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

Die hohe Adhäsion der ASML-Cld7^{kd} Zellen ist konform mit der beschriebenen Behinderung der EpC-Tetramerbildung durch Cld7. EpC-Tetramerbildung ist für die EpC vermittelte homotypische Zell-Zell-Adhäsion erforderlich (Balzar et al., 2001). ASML-EpC^{kd} Zellen adhärten gleich gut auf den drei verschiedenen ASML Tumorzelllinien, jedoch weniger stark im Vergleich mit ASML^{wt} und ASML-Cld7^{kd} Zellen. Die Behandlung der Zellen mit PMA, welches die EpC-Cld7-Assoziation fördert, reduzierte die Bindung von ASML^{wt} Zellen auf ASML^{wt} und ASML-Cld7^{kd} Zellen, beeinträchtigte jedoch nicht die Bindung von ASML-EpC^{kd} Zellen (Abb. 14A).

Des Weiteren wurde die Zell-Zell-Adhäsion innerhalb der Zelllinien in einer flüssig-Zellkultur getestet. Die Zellen wurden für zwei Stunden unter leichtem Schütteln in eine Flüssigkultur ausgesät. Bei ASML-Cld7^{kd} Zellen war eine signifikant höhere Agglomeration der Zellen zu beobachten als bei ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen (Abb. 14B).

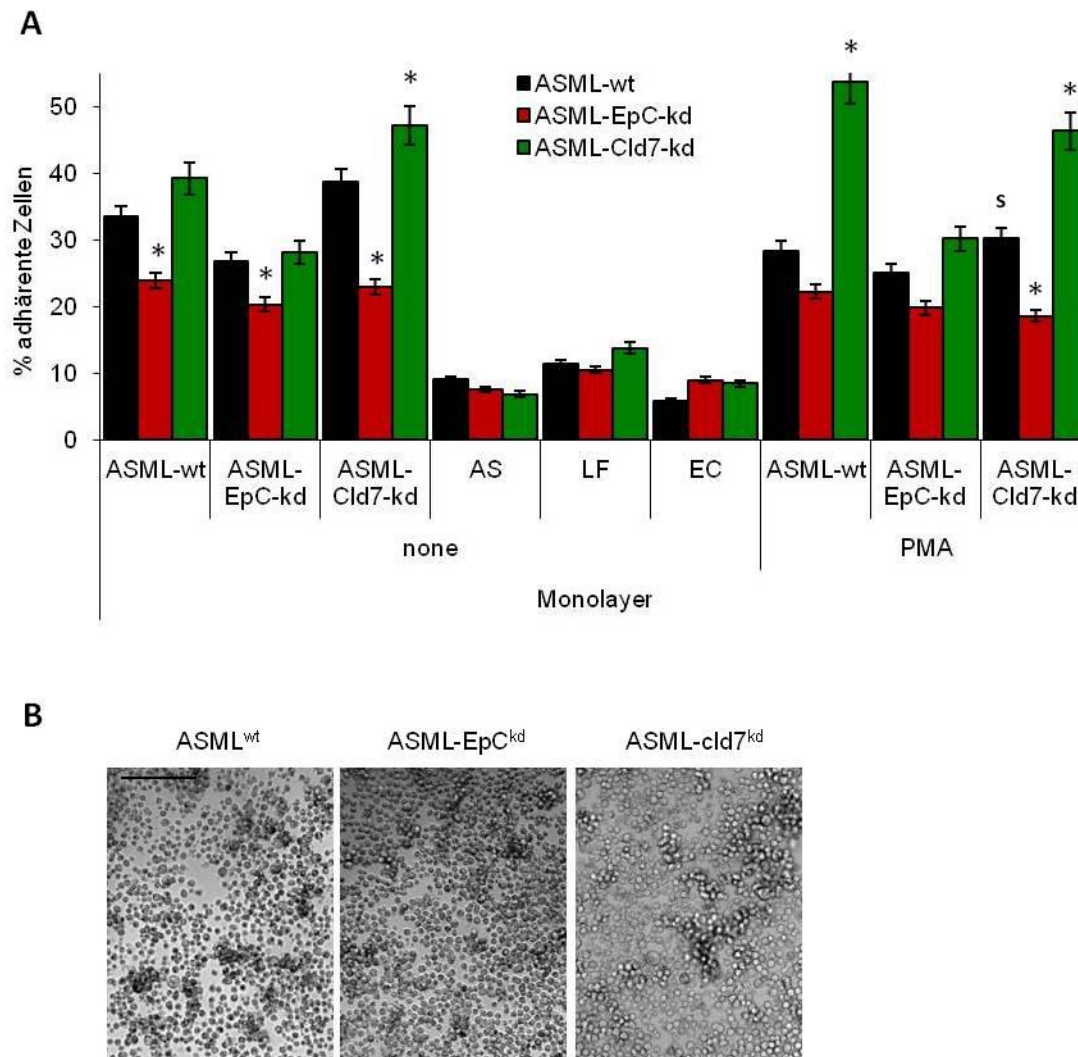


Abb. 14: Zell-Zell-Adhäsion von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
 (A) Unbehandelte oder PMA (10 nM) -behandelte, CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden auf einem einschichtigen Zellrasen der angegebenen Zelllinien ausgesät. Angegeben sind die adhärenzten Zellen in Prozent (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Zell-Zell-Adhäsion zwischen unbehandelten und PMA-behandelten Zellen sind mit s gekennzeichnet. (B) ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden unter leichtem Schütteln inkubiert. Gezeigt sind lichtmikroskopische Bilder der Kulturen nach zweistündiger Inkubation. Maßstab: 100 μ m.

Mit wenigen Ausnahmen wird die Zell-Matrix-Adhäsion nicht durch den kd von EpC bzw. Cld7 beeinflusst. Wie durch die Untersuchungen unter Antikörperinhibition gezeigt werden konnte, ist speziell die LN5 vermittelte Adhäsion eher $\alpha 6\beta 4$ -Integrinals EpC-abhängig. Eine entscheidende Rolle dieser geringen Unterschiede im Adhäsionsverhalten an der Reduktion der metastatischen Kapazität der ASML^{kd} Zelllinien im Vergleich zu den wt Zellen ist eher unwahrscheinlich. Hingegen könnte die Beeinträchtigung der EpC-abhängigen homotypischen Zell-Zell-Adhäsion durch Cld7, in einer frühen Phase der metastatischen Kaskade, z.B. bei der lokalen Invasion, von Bedeutung sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde im Folgenden der Einfluss des EpC- bzw. Cld7-kd in ASML Zellen auf die Migration überprüft.

3.3 Claudin 7 fördert die Motilität

Die Migrationsfähigkeit von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurde mittels einer „Boyden chamber“ (Transwell assay, Migrationskammer) bestimmt. Hierzu wurden ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen in Gegenwart von Kontroll IgG, D5.7 (anti-EpC), B5.5 (anti- $\alpha 6\beta 4$) oder D6.1 (anti-Tspan8) AK inkubiert, gewaschen und in den oberen Teil einer Migrationskammer ausgesät. Die Porengröße der Membran betrug 8 μm . Der untere Teil der Kammer enthielt Medium mit 20 % FCS. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die Migrationseffizienz durch Anfärben der durch die Membran migrierten Zellen mittels Kristall-Violett bestimmt. Im Vergleich zu ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen, ist die Migrationsfähigkeit von ASML-Cld7^{kd} Zellen deutlich reduziert. Des Weiteren wurde die Migration von ASML^{wt} Zellen durch D5.7, B5.5 und D6.1 AK inhibiert. Dies zeigte sich ebenso bei ASML-EpC^{kd} Zellen, wobei hier der inhibitorische Effekt des B5.5 AK deutlich größer war als bei den ASML^{wt} Zellen. Die geringe Migrationseffizienz der ASML-Cld7^{kd} Zellen wurde durch die AK Inkubation nicht oder nur schwach beeinträchtigt (Abb. 15). Zur weiteren Untersuchung der Migrationsfähigkeit wurde ein Wundheilungsversuch („scratch assay“) durchgeführt. Hierzu wurde mit einer feinen Pipettenspitze ein subkonfluenter Monolayer von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen „verletzt“. Das Schließen der so entstandenen „Wunde“ ist ein Maß für die Migrationsfähigkeit der Zellen.

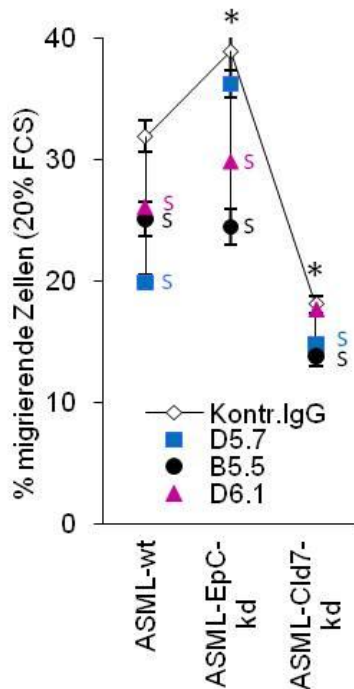


Abb. 15: Transwell Migration von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in Gegenwart von Kontroll IgG, D5.7, B5.5 oder D6.1 AK inkubiert und in den oberen Teil einer „Boyden chamber“ ausgesät. Die Porengröße der Membran betrug 8 μ m. Der untere Kammerteil enthielt Medium mit 20 % FCS. Nach 16 stündiger Inkubation wurde der Prozentsatz der durch die Membran migrierten Zellen mittels Kristall-Violett-Färbung ausgewertet. Angegeben sind die migrierten Zellen in Prozent der ausgesäten Zellen (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen \pm STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Migration im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Migration durch AK-Inhibition sind mit s gekennzeichnet.

Die Ansätze wurden mit oder ohne PMA durchgeführt und enthielten entsprechend der Angaben D5.7, B5.5 oder D6.1 Antikörper. Die Wundheilung wurde nach 24 bzw. 48 Stunden kontrolliert. Die Wundheilung von ASML-EpC^{kd} Zellen erfolgte im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen beschleunigt. Bei ASML-Cld7^{kd} Zellen hingegen erfolgte die Wundheilung deutlich langsamer. Unbehandelte und PMA-stimulierte ASML^{wt} Zellen ließen eine durch D5.7 AK und, weniger deutlich, durch B5.5 AK reduzierte Wundheilung erkennen. Die Wundheilung der ASML-EpC^{kd} Zellen wurde hingegen nur durch B5.5 und D6.1 AK inhibiert. Auf die geringe Wundheilungskapazität der ASML-Cld7^{kd} Zellen wirkte sich die Antikörperinhibition fast gar nicht aus, lediglich in Gegenwart von D5.7 AK war eine geringe Reduktion nach 48 Stunden zu beobachten (Abb. 16, Abb. 17). Keine der drei Zelllinien hat die Fähigkeit durch Matrigel zu migrieren (nicht gezeigt). Die in den beiden Migrationsversuchen zu beobachtende, im Vergleich zu ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen deutlich geringere Migrationseffizienz der ASML-Cld7^{kd} Zellen, gibt deutliche Hinweise auf eine essentielle Rolle von Cld7 bei der Bildung eines migrationsfördernden „Komplexes“ bestehend aus EpC, Cld7 und $\alpha 6\beta 4$ Integrin.

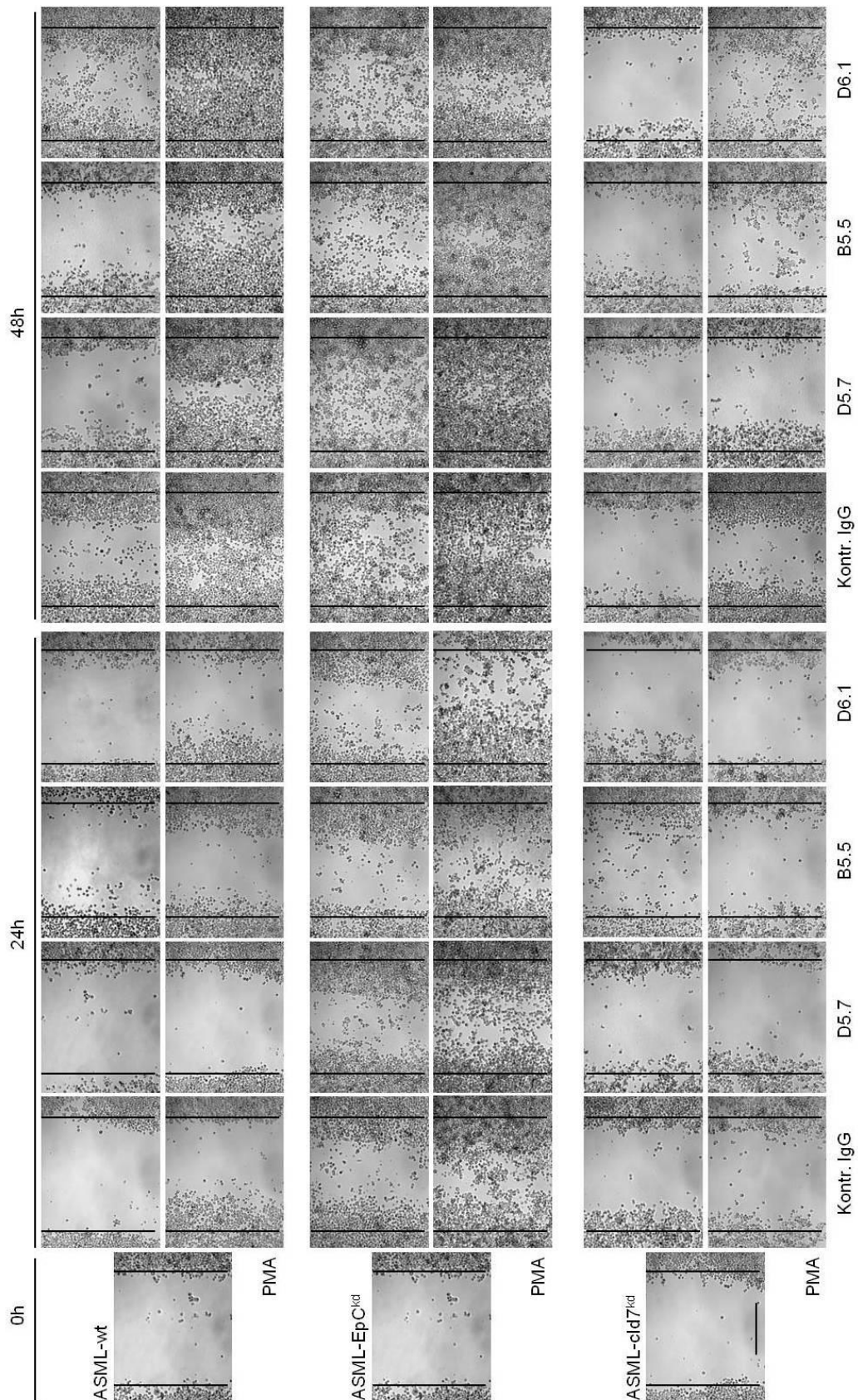


Abb. 16: *In vitro* Wundheilung von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

In subkonfluente Monolayer der angegebenen Zelllinien wurde mit einer feinen Pipettenspitze eine „Wunde“ gekratzt. Die Wundränder zu Beginn des Versuchs sind durch eine schwarze Linie markiert. Wo angegeben, wurden die Kulturen mit PMA (10 nM) stimuliert bzw. enthielten die angegebenen AK. Gezeigt sind lichtmikroskopische Bilder nach 24 h bzw. 48 h Inkubation. Maßstab: 100 µm.

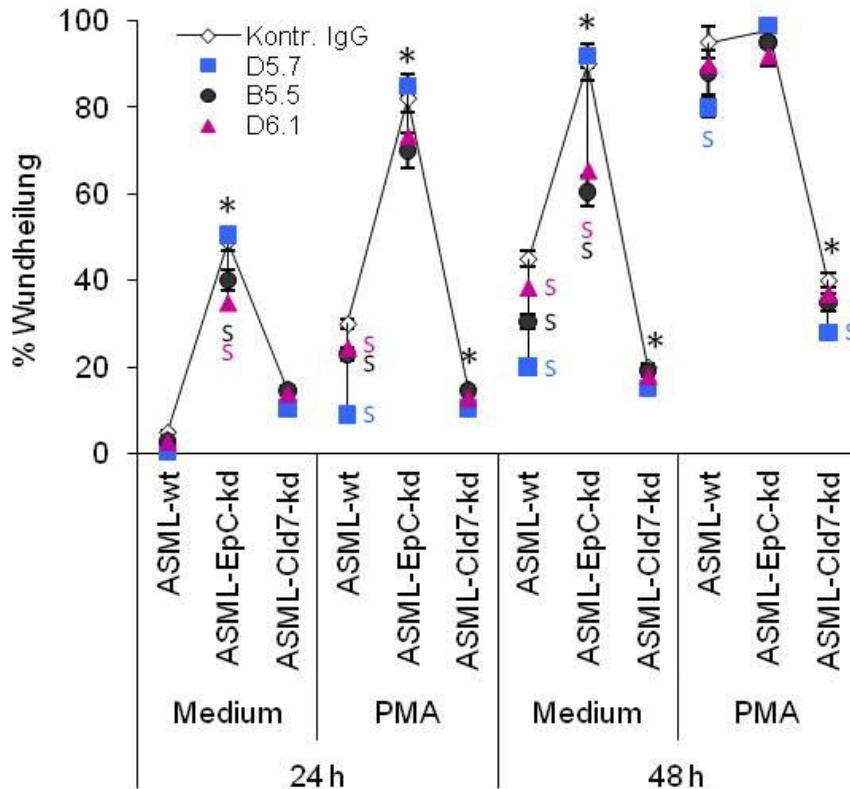


Abb. 17: Auswertung der *in vitro* Wundheilung von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen. Versuchsansatz s. Abb. 16. Gezeigt ist die Wundheilung in Prozent (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Wundheilung im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Wundheilung durch AK-Inhibition sind mit s gekennzeichnet.

Aufgrund der deutlich geringeren Migrationsfähigkeit der ASML-Cld7^{kd} Zellen *in vitro*, erfolgte als nächstes die Überprüfung des Einflusses von Cld7 auf die Tumorzellmigration *in vivo*. Hierzu wurden BDX Ratten 5×10^6 CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet und die Anwesenheit von CFSE-markierten Zellen in Gewebe-Einzelzellsuspensionsproben der Injektionsstelle und des poplitealen LK durchflusszytometrisch sowie durch Fluoreszenzlichtmikroskopie bestimmt. In den Proben der Injektionsstelle ließen sich keine Unterschiede in der Zahl der CFSE-markierten Zellen zwischen den ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} behandelten Tieren feststellen. Die Anzahl der CFSE-markierten Zellen in den poplitealen LK war bei den ASML-EpC^{kd} Zellen deutlich geringer als bei den ASML^{wt} Zellen. ASML-Cld7^{kd} Zellen konnten nur vereinzelt in den poplitealen LK nachgewiesen werden (Abb. 18).

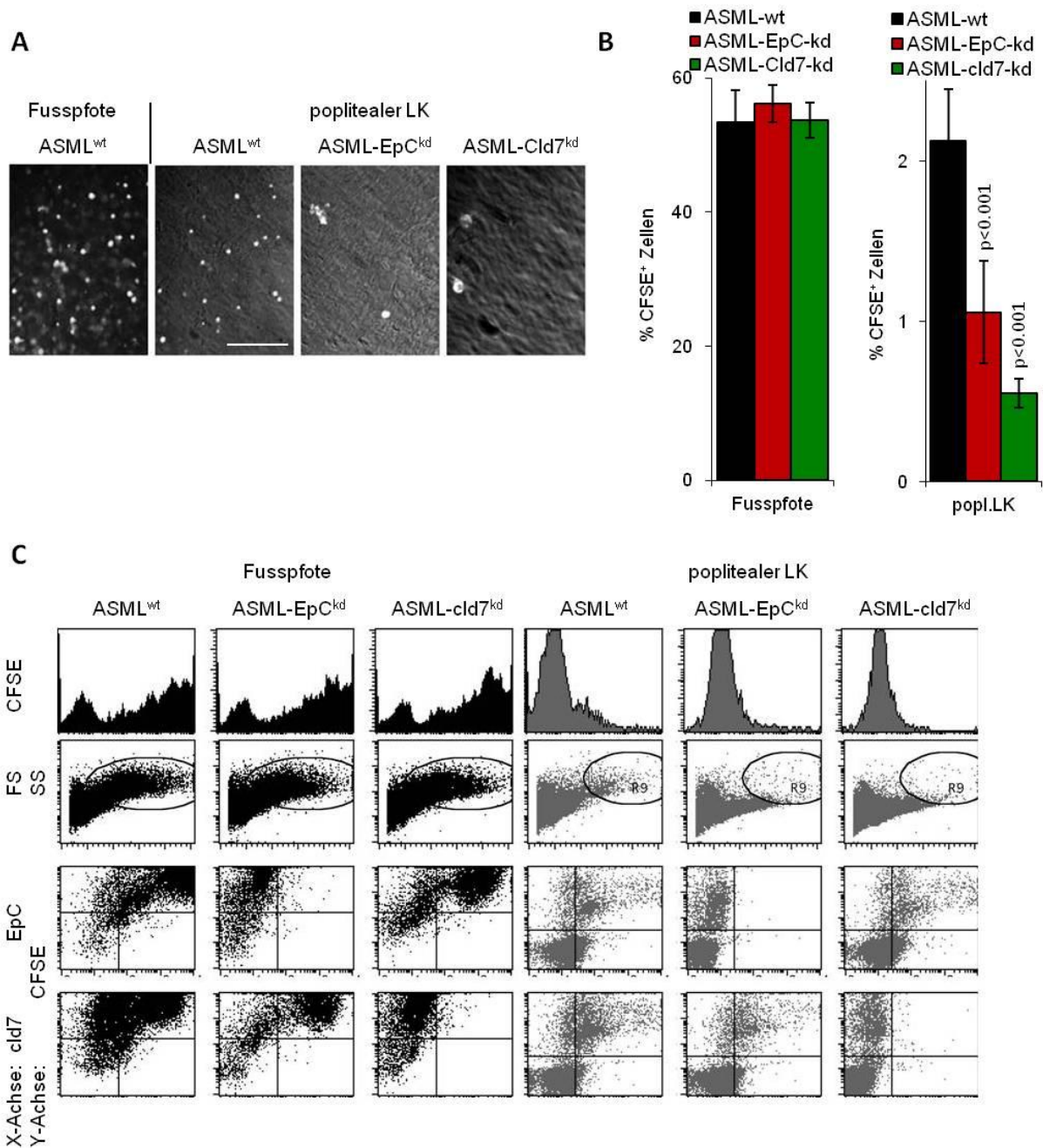


Abb. 18: *In vivo* Migration von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

BDX Ratten wurden 5×10^6 CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen in die Fusspfote injiziert. Nach 7 d wurden die Tiere getötet und die Anzahl der CFSE-markierten Zellen an der Injektionsstelle und im poplitealen LK gemessen. (A) „Cytospin“ Fixierung, 200 μ l Einzelzellsuspension wurden mittels Zentrifugation auf einem Objektträger fixiert. Gezeigt sind repräsentative Beispiele fluoreszenzlichtmikroskopischer Bilder. Maßstab: 100 μ m. (B) Auswertung der durchflusszytometrisch gewonnenen Daten. Gezeigt sind die gemessenen CFSE-markierten Zellen in Prozent der injizierten Zellen (Mittelwerte \pm STAB). (C) Repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Messung. Zusätzlich zu der CFSE-Markierung wurden die Tumorzellen mit D5.7 und anti-Cld7 AK markiert. Ausgewertet wurde die Population innerhalb der Umrandung (gate R9).

Zusammengefasst zeigten sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Versuche zum Einfluss eines ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} auf die Migrationsfähigkeit von ASML Tumorzellen, dass Cld7 Migration fördert. Diese migrationsfördernde Eigenschaft von Cld7 könnte von der Formation eines EpC-Cld7-Tetraspanin-Integrin-Komplexes in TEMs (tetraspanin enriched microdomains) (Kuhn et al., 2007; Nubel et al., 2009) sowie der Phosphorylierung von Cld7 und der Assoziation des Komplexes mit Zytoskelettproteinen abhängig sein.

3.4 TEM-Lokalisierung des EpCAM-Claudin 7-Komplexes fördert die Assoziation mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin und dem Zytoskelett

Der Einfluss eines EpC^{kd} oder Cld7^{kd} auf die Kolokalisation von EpC bzw. Cld7 mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Tspan8 und Ezrin wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierzu wurden ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten D5.7, anti-Cld7, B5.5, D6.1 und anti-Ezrin AK markiert. Die Kolokalisation von EpC und Cld7 in den Zellmembranen von ASML^{wt} Zellen konnte deutlich gezeigt werden (Abb. 19A). Insbesondere in PMA-behandelten ASML^{wt} Zellen war eine Kolokalisation von EpC mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Tspan8 und Ezrin nachzuweisen. In ASML-Cld7^{kd} Zellen war diese Kolokalisation stark reduziert (Abb. 19A). Hingegen konnte in ASML-EpC^{kd} Zellen nur eine geringe Reduktion der Kolokalisation von Cld7 mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Tspan8 und Ezrin festgestellt werden (Abb. 19B). Mittels Ko-Immunpräzipitation (IP) ließen sich die Assoziationen zwischen EpC, Cld7, Tspan8 und $\alpha 6\beta 4$ Integrin in ASML^{wt} Zellen bestätigen. Ebenso konnte die Assoziation von Cld7 mit Tspan8 und $\alpha 6\beta 4$ Integrin in ASML-EpC^{kd} Zellen bestätigt werden. In ASML-Cld7^{kd} Zellen jedoch ließ sich EpC nicht über $\alpha 6\beta 4$ ko-präzipitieren (Abb. 20A). Diese Daten geben deutliche Hinweise auf eine zentrale Rolle von Cld7 für die Komplexbildung. Die TEM-Lokalisation des Komplexes ließ sich mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation nachweisen.

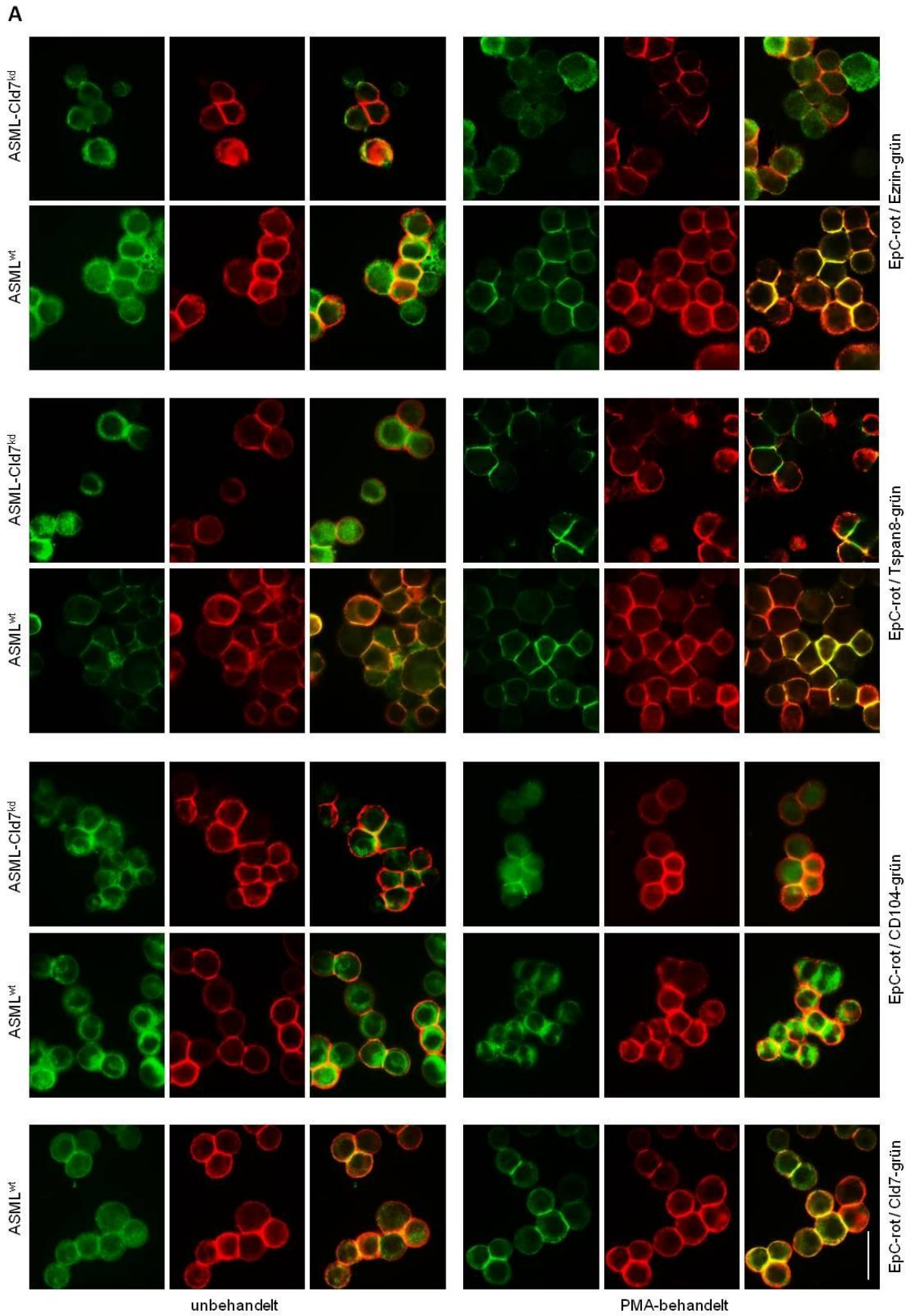


Abb. 19A: Legende siehe Abb. 19.

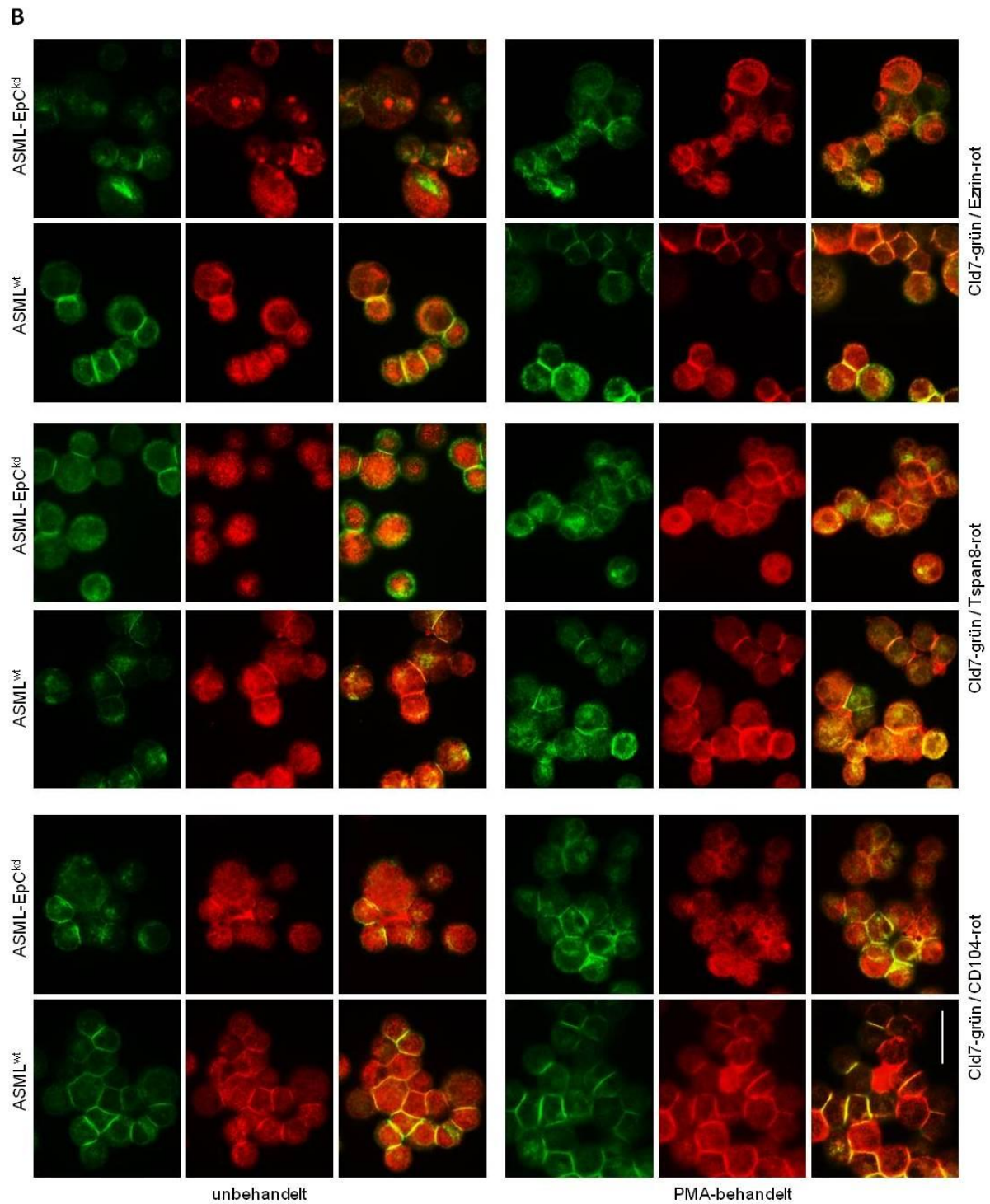


Abb. 19: Immunfluoreszenz von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

Wo angegeben, wurden die Zellen mit PMA (10 nM) behandelt. (A) ASML^{wt} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sowie (B) ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen wurden mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten D5.7, anti-Cld7, B5.5, D6.1 und anti-Ezrin AK markiert. Gezeigt sind die Einzel fluoreszenzen sowie die digitalen Überlagerungen (overlays) der fluoreszenzlichtmikroskopischen Aufnahmen. Maßstab 10 µM.

In unbehandelten Proben sind EpC, Cld7 und Tspan8 in den leichten Fraktionen 2-4 (1,117-1,130 M) und den schweren Fraktionen 7-12 (1,171-1,287 M) angereichert. Nach Behandlung mit M β CD (Methyl- β -Cyclodextrin), wodurch die TEMs aufgrund partieller Cholesterolfentfernung zerstört werden, sind EpC, Cld7 und Tspan8 nur noch in den schweren Fraktionen 7-12 angereichert (Abb. 20B).

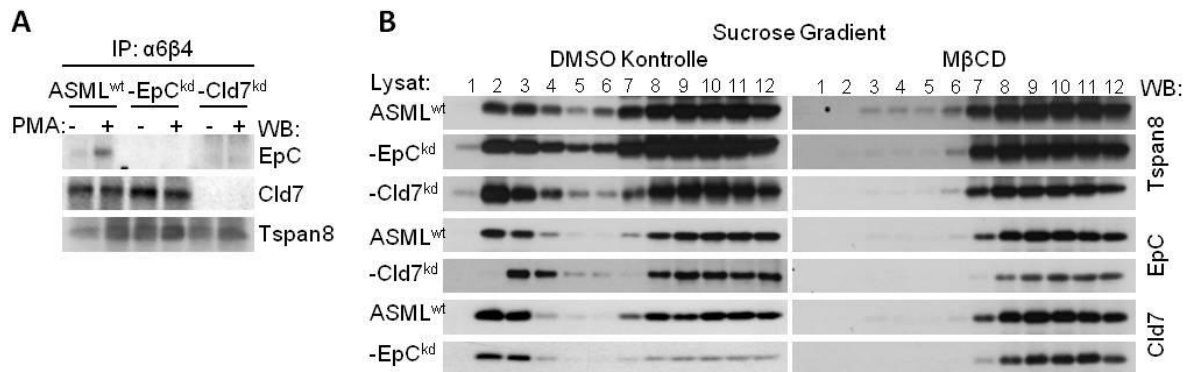


Abb. 20: Immunpräzipitation und Sucrose-Gradient von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
 (A) Unbehandelte oder PMA (10 nM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Lubrol lysiert. Immunkomplexe wurden mit B5.5 AK präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) Unbehandelte oder M β CD (20 mM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Lubrol lysiert und einer Sucrose-Dichtegradient-Zentrifugation unterzogen. Die Fraktionen (1 = geringe Dichte (1,112 M) - 12 = hohe Dichte (1,287 M)) wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

Mittels Immunpräzipitation von unbehandelten und M β CD-behandelten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen konnte gezeigt werden, dass, nach partieller Zerstörung der TEMs, die EpC-Cld7-Assoziation bestehen bleibt. Die Assoziationen von Tspan 8 mit EpC bzw. Cld7 sind hingegen deutlich reduziert. In ASML-EpC^{kd} Zellen lassen sich Cld7 und Tspan8 ko-immunpräzipitieren, aber EpC und Tspan 8 ko-immunpräzipitieren nicht in ASML-Cld7^{kd} Zellen (Abb. 21A). Nach einer Sucrose-Dichtegradient-Zentrifugation und anschließender IP mit Tspan8 AK zeigte sich, dass EpC und Cld7 nur in den TEM Fraktionen (2-4) ko-immunpräzipitieren. Die Ko-Immunpräzipitation von EpC und Tspan8 war in Proben der ASML-Cld7^{kd} Zellen deutlich reduziert. Dies zeigt, dass dieser Komplex vornehmlich in TEMs existiert und Cld7 essentiell für die Komplexbildung ist (Abb. 21B).

Ich hatte gezeigt, dass PMA-Stimulation die Kolokalisation von EpC, Cld7, $\alpha 6\beta 4$ und Tspan8 verstärkt. Folglich könnte der EpC-Cld7-Komplex innerhalb der

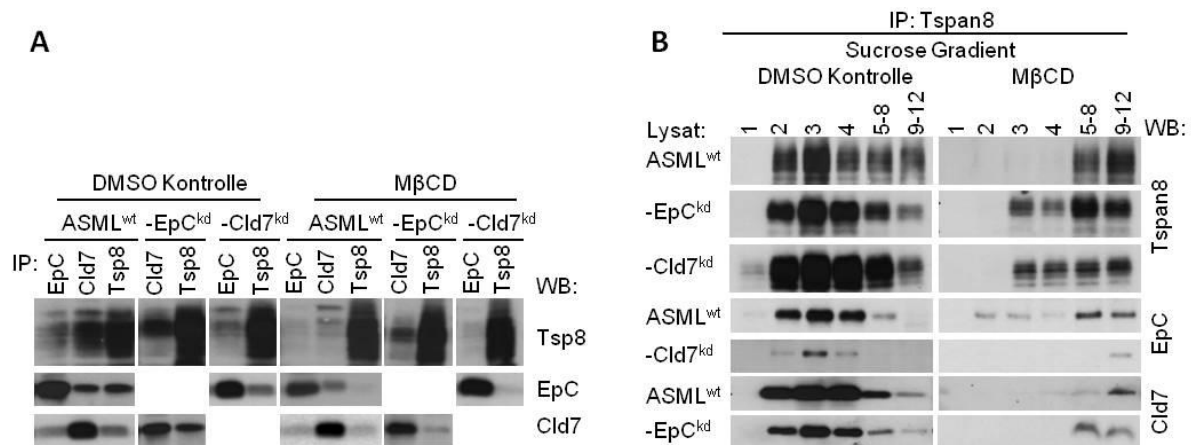


Abb. 21: Immunpräzipitation und Sucrose Gradient von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen (A) Unbehandelte oder MβCD (20 mM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Lubrol lysiert. Immunkomplexe wurden mit D5.7 (anti-EpC), anti-Cld7 oder D6.1 (anti-Tspan8) AK präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) Unbehandelte oder MβCD (20 mM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Lubrol lysiert und einer Sucrose-Dichtegradient-Zentrifugation unterzogen. In den Fraktionen 1, 2, 3, 4 (1,112, 1,117, 1,122, 1,130 M) und den vereinigten Fraktionen 5-8 (1,156-1,182 M) und 9-12 (1,213-1,287 M) wurden Immunkomplexe mit D6.1 AK präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

TEMs von der Gegenwart weiterer TEM-assoziiertes Signaltransduktions- und Adapterproteine profitieren. So ist z.B. bekannt, dass PKC (Protein Kinase C) an Tetraspanine assoziiert und für die Cld7-Phosphorylierung notwendig ist (Hemler, 2005; Sjo et al., 2010; Steinberg, 2008; Wang et al., 2007).

Mittels eines *in vitro* Kinase Experiments konnte gezeigt werden, dass die Cld7-Phosphorylierung in ASML^{wt} Zellen durch eine Behandlung mit MβCD verringert wird. Staurosporin, ein PKC Inhibitor, unterbindet nahezu gänzlich die Cld7-Phosphorylierung in unbehandelten Zellen und reduziert sie stark in PMA-behandelten Zellen. Darüber hinaus wurde eine Inhibition der Phosphorylierung von PKC und Ezrin beobachtet (Abb. 22A). Da phosphoryliertes Cld7 an Ezrin assoziiert, weisen diese Daten darauf hin, dass EpC über Cld7 mit dem Zytoskelett verbunden werden könnte. Allerdings konnte eine Ko-Immünpräzipitation von Cld7 und Ezrin in Lysaten von PMA-behandelten ASML^{wt} Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 22B). Wir überprüfen zurzeit, ob Ezrin mit Tspan8, α6β4 oder direkt mit EpCAM ko-immunpräzipitiert.

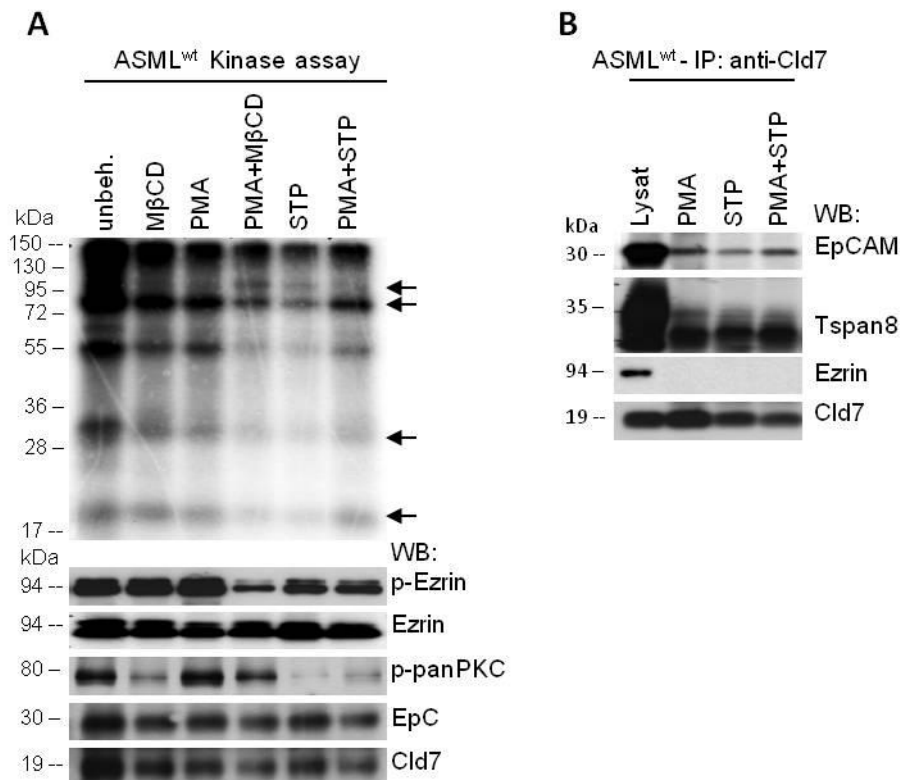


Abb. 22: *In vitro* Kinase assay und Immunpräzipitation von ASML^{wt} Zellen

(A) ASML^{wt} Zellen wurden soweit angegeben mit MβCD (20 mM, 1 h), PMA (10 nM, 1 h) oder/und Staurosporin (500 nM, 1 h) behandelt. Die Zellen wurden mit Triton-x-100 lysiert. Die Proben wurden zur Markierung phosphorylierter Proteine mit 10 μCi [³²P]γ-ATP versehen. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Radiographie. Zur Identifikation der verschiedenen Banden wurden die gleichen Lysate einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) ASML^{wt} Zellen wurden wo angegeben mit PMA (10 nM, 1 h) oder/und Staurosporin (500 nM, 1 h) behandelt. Die Zellen wurden mit Lubrol lysiert. Immunkomplexe wurden mit anti-Cld7 AK präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert.

Mittels Migrationskammer (Boyden chamber) wurde der Einfluss der Phosphorylierung von Cld7 auf das Migrationspotenzial von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen überprüft. Hierzu wurden die unbehandelten oder mit Staurosporin behandelten Zellen in den oberen Teil einer Migrationskammer ausgesät. Der untere Teil der Kammer enthielt Medium mit 20 % FCS, 10 nM PMA. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die Migrationseffizienz bestimmt. Den bisherigen Daten entsprechend, konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Staurosporin die Migration von ASML^{wt}, und ASML-EpC^{kd} Zellen stark reduziert war. Auch das ohnehin geringe Migrationspotenzial von ASML-Cld7^{kd} Zellen konnte durch Staurosporin-Behandlung weiter reduziert werden (Abb. 23).

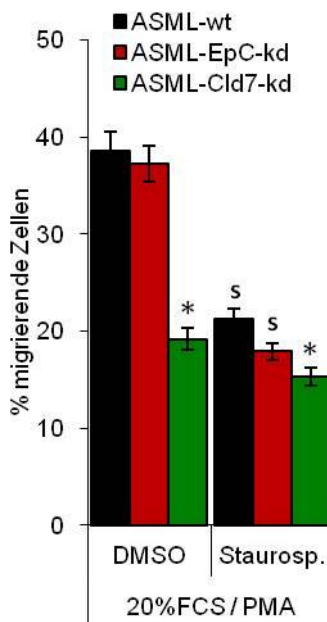


Abb. 23: Transwell Migration von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden in den oberen Teil einer „Boyden chamber“ ausgesät. Das Medium enthielt PMA (10 nM) und DMSO oder Staurosporin (500 nM). Die Porengröße der Membran betrug 8 µm. Der untere Kammerteil enthielt Medium mit 20 % FCS. Nach 16 stündiger Inkubation wurde der Prozentsatz der durch die Membran migrierten Zellen mittels Kristall-Violett-Färbung ausgewertet. Angegeben sind die migrierten Zellen in Prozent der ausgesäten Zellen (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Migration im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Migration durch Staurosporin sind mit s gekennzeichnet.

Die Kolo-kalisation von EpC mit $\alpha\beta4$, Tspan8 und Ezrin ist in ASML-Cld7^{kd} Zellen im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen deutlich beeinträchtigt. In ASML-EpC^{kd} Zellen ist sie kaum beeinflusst. Zur Bildung des in den TEM lokalisierten EpC-Cld7-Tspan8- $\alpha\beta4$ Integrin-Komplexes wird essentiell Cld7 benötigt. In dem TEM lokalisierten Komplex sind Cld7, EpC und Ezrin phosphoryliert. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass die Cld7-abhängige Migration auf PKC-vermittelter Cld7- und Ezrin-Phosphorylierung beruht. Durch die Experimente wird eine aktive Beteiligung von Cld7-assoziiertem EpC an der Zellmotilität nicht ausgeschlossen. Eine Cld7-unabhängige Rolle von EpC an der Zellmotilität muss hingegen ausgeschlossen werden. Weiterhin offen bleibt die Frage nach der Rolle von EpC im metastatischen Prozess, da die Metastasierung von ASML-EpC^{kd} Zellen deutlich beeinträchtigt war.

3.5 Spaltung von Claudin 7-assoziiertem EpCAM fördert die Zellproliferation

Neben Adhäsion und Migration ist die Proliferation ein weiterer Faktor, der für das metastatische Potenzial von Tumorzellen entscheidend sein kann, wobei sich sowohl ASML-EpC^{kd} als auch ASML-Cld7^{kd} Zellen durch ein signifikant verzögertes Tumorwachstum speziell in den drainierenden LK auszeichnen. Für EpC ist bekannt, dass es von TACE und PS2-NTF in eine extrazelluläre (EpEX) und eine intrazelluläre Domäne (EpICD) gespalten wird. EpICD dient als Ko-Transkriptionsfaktor und fördert die Proliferation, indem es an FHL2, β -Catenin und den Transkriptionsfaktor Lef-1 bindet [Kapitel 1.4.2, (Maetzel et al., 2009)]. Da die Expression sowohl von TACE als auch von PS2/NTF in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 24), wurde untersucht, ob Cld7 Einfluss auf die Spaltung von EpC nimmt. Vorab habe ich die Proliferationsfähigkeit von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen *in vitro* getestet.

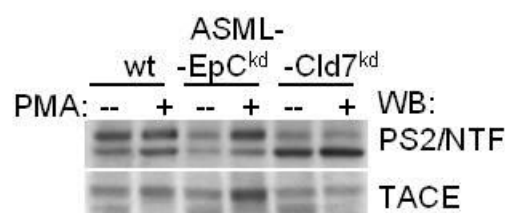


Abb. 24: Expression von TACE und PS2/NTF in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden, wo angegeben, mit PMA (10 nM, 1 h) behandelt und mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundäntikörper detektiert.

Die Proliferationsraten der Zellen wurden mittels ³H-Thymidin-Inkorporation ermittelt. Hierzu wurden ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen mit oder ohne PMA für 16 Stunden in ³H-Thymidin beihaltendem Medium inkubiert und anschließend die Radioaktivität der Proben als Maß für die Proliferation ermittelt. Des Weiteren wurde die Proliferationsaktivität mittels Farbstoff-Verdünnung gemessen. Hierzu wurden CFSE-markierte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen mit oder ohne PMA für 72 Stunden inkubiert. Die Verringerung der Farbstoffintensität, als Maß für die Proliferation, wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Proliferation von ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen ohne PMA-Inkubation war im Vergleich zu ASML^{wt}

Zellen nur geringfügig reduziert. PMA-Stimulation erhöhte die proliferative Aktivität von ASML^{wt} Zellen deutlich, auf ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wirkte sie sich hingegen nur geringfügig aus (Abb. 25A). Deutlich weniger ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen als ASML^{wt} Zellen durchliefen drei oder mehr Zellzyklen innerhalb von 72 Stunden (Abb. 25B, C).

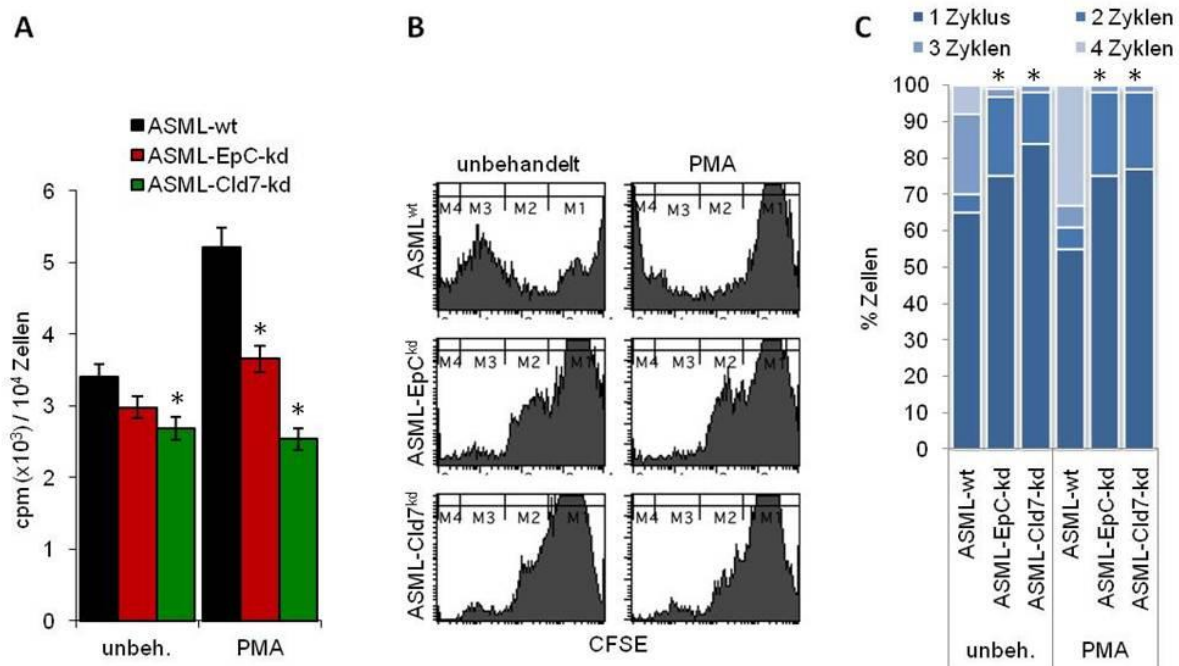


Abb. 25: Proliferation von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

Wo angegeben, wurden die Zellen mit PMA (10 nM) behandelt. (A) ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden 16 h in Medium mit ³H-Thymidin inkubiert. Gezeigt ist die Aktivität in cpm (counts pro Minute) (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede (p<0,05) der Proliferation im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. (B) ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden CFSE-markiert. Nach 72 stündiger Inkubation wurde die Anzahl der Zellteilungen anhand der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der FACS-Messung. (C) Auswertung von B. Gezeigt sind die Zellen entsprechend der von ihnen durchlaufenen Zellzyklen in Prozent (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede (p<0,05) der durchlaufenen Zellzyklen im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

Weiterhin wurde die Zellzyklusprogression der Zellen nach Aushungern (starvation) untersucht. ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden für 48 Stunden ohne FCS kultiviert. Zwei bzw. sechs Stunden nach Zugabe von 10 % FCS zum Medium wurden die Zellen mittels PI-Färbung markiert und die Zellzyklusprogression durchflusszytometrisch gemessen. Signifikant weniger ASML-Cld7^{kd} Zellen als ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen waren nach 2 Stunden in der G2/M Phase (Abb. 26).

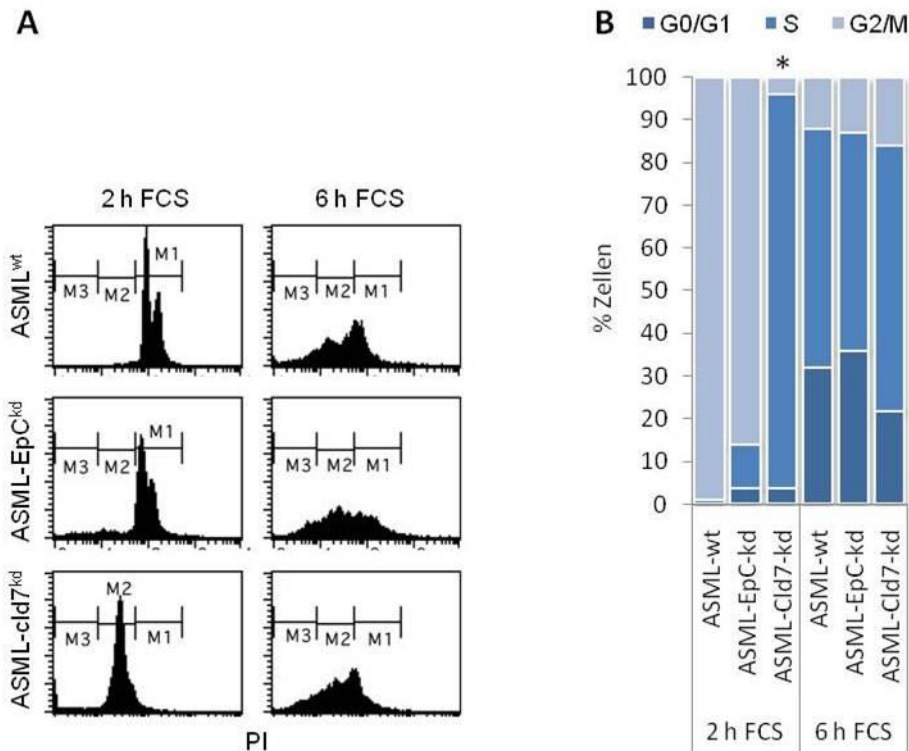


Abb. 26: Zellzyklusprogression von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden für 48 h ohne FCS kultiviert. 2 bzw. 4 h nach Zugabe von 10 % FCS wurden die Zellen mittels PI-Färbung markiert und Zellzyklusprogression durchflusszytometrisch gemessen. (A) Gezeigt sind repräsentative Beispiele der FACS-Messung. G0/G1 = M1, S = M2, G2/M = M3 (B) Auswertung von A. Gezeigt sind die Zellen entsprechend ihrer Position im Zellzyklus in Prozent (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet.

Die letztgenannten Beobachtungen geben Hinweise auf einen zusätzlichen Defekt bei der Zellzyklusprogression von ASML-Cld7^{kd} Zellen. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass EpICD zur Proliferation in ASML^{wt} Zellen, insbesondere bei Stress, beiträgt. Hierbei könnte die EpC-Cld7-Assoziation in TEMs durch die Förderung der EpC-Spaltung eine wichtige Rolle spielen.

In der Tat wurde in PMA-stimulierten ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen ein geringerer Anstieg der β -Catenin und c-myc-Expression als in ASML^{wt} Zellen beobachtet (Abb. 27A). Dies weist auf eine mögliche Reduktion der EpICD-Generierung in ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen hin. Diese konnte nicht direkt überprüft werden, da ein kommerziell erhältlicher EpICD AK entgegen den Angaben Ratten EpICD nicht erkennt (Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt, dass PS2/NTF erst nach Abspaltung der extrazellulären EpC-Domäne aktiv wird. Da der D5.7 AK die extrazelluläre Domäne erkennt, kann nach Abspaltung der extrazellulären Domäne auch EpC nicht mehr detektiert und die Assoziation mit Cld7 nicht mehr

nachgewiesen werden. Nach kurzfristiger PMA-Behandlung ko-immunpräzipitiert Cld7, jedoch nicht TACE und PS2/NTF, mit EpC. Nach vierstündiger PMA-Behandlung ist die Menge an Cld7, die mit EpC ko-immunpräzipitiert, reduziert; es wird aber auch PS2/NTF detektiert. Anti-Cld7 ko-immunpräzipitiert auch nach kurzfristiger PMA-Behandlung EpC und PS2/NTF. Nach vierstündiger PMA-Stimulation wird weniger EpC aber vermehrt PS2/NTF durch anti-Cld7 ko-immunpräzipitiert (Abb. 27B). Wir schließen daraus, dass Cld7 und PS2/NTF assoziiert sind und diese Assoziation durch PMA-Behandlung verstärkt wird. Weder EpC noch Cld7 sind direkt mit TACE assoziiert.

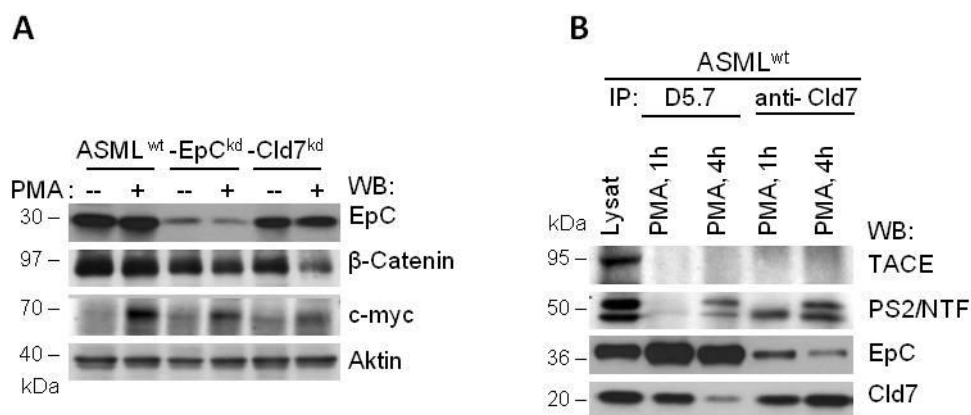


Abb. 27: Hinweise auf EpICD-Aktivität und -Generierung in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen (A) Unbehandelte und PMA (10 nM, 1 h)-behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundäntikörper detektiert. (B) ASML^{wt} Zellen wurden in Triton-X-100 (Lysat) bzw. Lubrol (IPs) lysiert. Wo angegeben, waren die Zellen PMA (10 nM)-behandelt. Immunkomplexe wurden mit D5.7 bzw. anti-Cld7 AK präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundäntikörper detektiert.

Die Experimente belegen, dass unter Stress (PMA) die proliferative Aktivität von ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen beeinträchtigt ist und die Cld7-Assoziation mit PS2-NTF die Spaltung von EpC fördert. Darüber hinaus ergab sich eine von EpC unabhängige Beteiligung von Cld7 an der Zellzyklusprogression. Die Daten deuten darauf hin, dass Cld7 über die Rekrutierung von EpC in TEMs, wo die Spaltung von EpC durch TEM-lokalisierendes TACE und PS2/NTF erfolgt, zu EpICD-vermittelter Zellzyklusprogression beiträgt.

Diese Resultate erklären das geringe Wachstum von ASML-EpC^{kd} Zellen in den poplitealen LK. Die deutlich geringere *in vivo* Progression von ASML-Cld7^{kd} Zellen kann jedoch durch die Befunde nicht erklärt werden. Vielmehr weisen sie auf weitere Cld7^{kd}-bedingte Defekte in den Zellen hin.

3.6 Claudin 7 fördert Apoptoseresistenz

Weitere Faktoren, neben den bisher untersuchten, die für das hohe metastatische Potenzial von Tumorzellen von Bedeutung sein können, sind die Apoptoseresistenz und die Fähigkeit ohne Kontakt zu anderen Zellen (Anoikis) überleben und proliferieren zu können. Zur Bestimmung des Einflusses des EpC^{kd} bzw. des Cld7^{kd} auf die Apoptose, wurden ASML Zellen, unter dem Einfluss von Cisplatin, auf ihre Proliferation, respiratorische Aktivität und Apoptoserate hin untersucht. Cisplatin ist ein Zytostatikum, das häufig in der Krebstherapie eingesetzt wird. ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden für 48 bzw. 72 Stunden in Anwesenheit von Cisplatin inkubiert. Die Messung des Einflusses von Cisplatin auf die Proliferation der Zellen wurde mittels ³H-Thymidin-Inkorporation durchgeführt (Abb. 28A). Die Bestimmung der respiratorischen Aktivität erfolgte mittels MTT-Färbung (Abb. 28B). Die Apoptoseraten der Zellen wurden durch AnnexinV/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse gemessen (Abb. 28C). Es zeigte sich, dass ASML Zellen stark apoptoseresistent sind. Die Proliferation von ASML-Cld7^{kd} Zellen wurde in Gegenwart von 1 µg/ml Cisplatin um 50 % reduziert. Diese Reduktion wurde bei ASML-EpC^{kd} Zellen durch Inkubation mit 2,6 µg/ml Cisplatin erreicht. Um die Proliferationsrate von ASML^{wt} Zellen um 50 % zu reduzieren, war hingegen eine Cisplatinkonzentration von mehr als 10 µg/ml erforderlich (Abb. 28A). Ähnliche Unterschiede in der Cisplatinsensitivität zeigten sich in der MTT-Färbung (Abb. 28B). Bei 72 stündiger Inkubation genügte eine Konzentration von weniger als 2,5 µg/ml Cisplatin für das Absterben von 50 % der ASML-Cld7^{kd} Zellen, während hierfür bei ASML-EpC^{kd} Zellen 15 µg/ml und bei ASML^{wt} Zellen 35 µg/ml Cisplatin erforderlich waren (Abb. 28C).

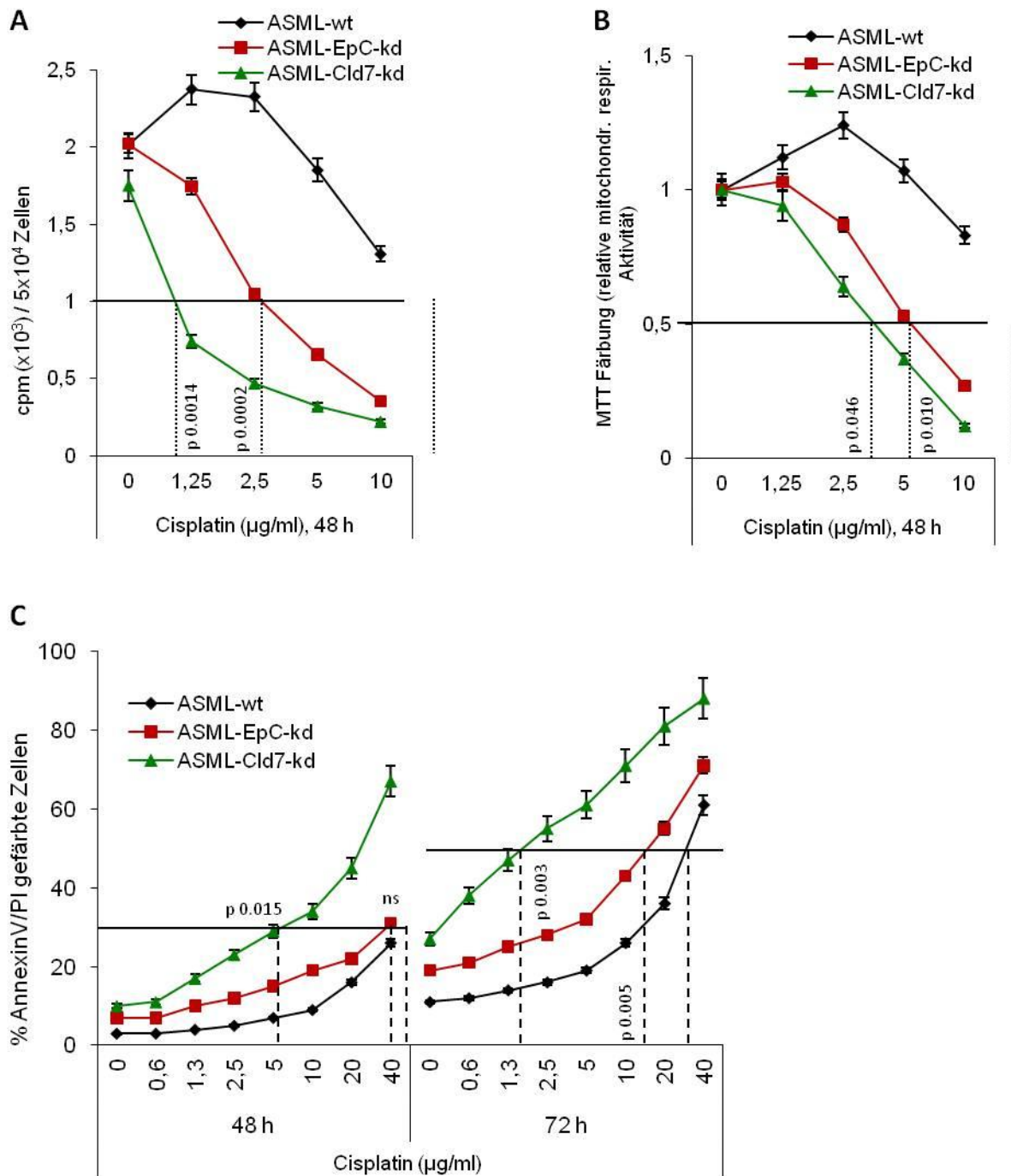


Abb. 28: Apoptoresistenz von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden für 48-72 h in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von Cisplatin kultiviert. (A) Für die letzten 16 h wurde ³H-Thymidin zugesetzt und die Proliferation mittels ³H-Thymidininkorporation gemessen. Gezeigt ist die Aktivität in cpm (counts pro Minute) (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). (B) Die mitochondriale Aktivität wurde mittels MTT-Färbung gemessen. Gezeigt ist die relative mitochondriale respiratorische Aktivität (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). (C) Nach 48 h bzw. 72 h Stunden wurde die Apoptoserate mit Hilfe der AnnexinV/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die AnnexinV⁺ und/oder PI⁺ Zellen (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). (A-C) Die Cisplatinkonzentration, welche für eine 50 %ige Reduktion der Proliferation und mitochondrialen Aktivität oder für 30 % apoptotische Zellen erforderlich war, ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sind angegeben.

Der Einfluss von EpC und Cld7 auf die Apoptoseresistenz wurde auch im „soft agar colony formation“ Assay überprüft. Hierbei wurden ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen mit oder ohne Cisplatin in 0,3 %igem Agar ausgesät. Nach einer dreiwöchigen Inkubation wurde das Koloniewachstum überprüft. Entsprechend den vorherigen Ergebnissen war die hohe Koloniebildungseffizienz der ASML^{wt} Zellen (Matzku et al., 1983) in beiden kd Zelllinien stark reduziert, wobei die Reduktion in den ASML-Cld7^{kd} Zellen am massivsten war (Abb. 29A, B). Schon 0,2 µg/ml Cisplatin waren für eine weitere Reduktion der Kolonienzahl um 50 % in ASML-Cld7^{kd} Zellen ausreichend (Abb. 29C).

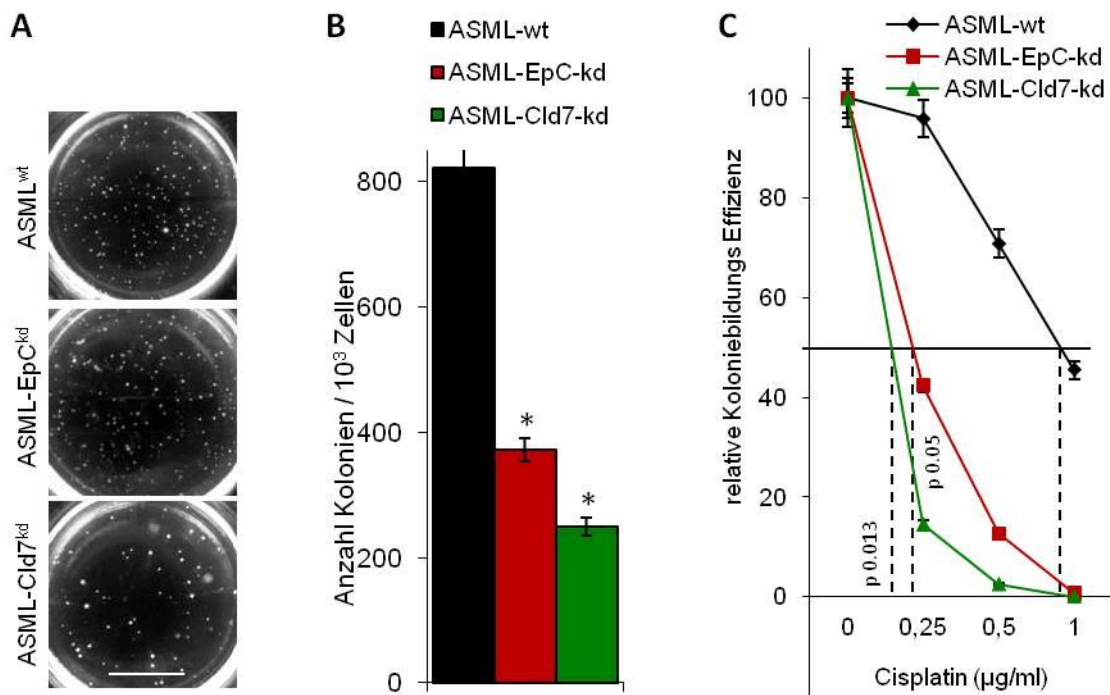


Abb. 29: Koloniewachstumseffizienz von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

(A) „soft agar colony formation“ von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen. Die Zellen wurden in einer Agarschicht ausgesät. Nach drei Wochen wurde das Koloniewachstum analysiert. Gezeigt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen. Maßstab 8 mm. (B) Auswertung von A. Gezeigt ist die Anzahl der gewachsenen Kolonien (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu ASML^{wt} Zellen sind mit * gekennzeichnet. (C) „soft agar colony formation assay“ von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen mit oder ohne Cisplatinbehandlung. Die verschiedenen Cisplatinkonzentrationen sind angegeben. Gezeigt ist die relative Koloniebildungseffizienz nach dreiwöchiger Inkubation in Prozent. Die Cisplatinkonzentration, die für eine 50 %ige Reduktion der Koloniewachstumseffizienz erforderlich war, ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sind angegeben.

Zur Untersuchung der medikamentös induzierten Apoptose *in vivo* wurden BDX Ratten 5×10^6 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen injiziert. Die hohe Zellzahl sollte ein Tumorwachstum sicherstellen. Um einen Effekt der geminderten Migrationsfähigkeit von ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen auf das Experiment auszuschließen, wurden die Zellen intraperitoneal injiziert. Pro Tumorzelllinie wurden, in Intervallen von drei Wochen, jeweils einer Gruppe 1 mg/kg Körpergewicht Cisplatin injiziert. Die Behandlung mit Cisplatin verlängerte die Überlebensdauer der ASML^{wt} Zellen tragenden Tiere von 25 auf 40 Tage. Die Überlebensdauer der ASML-EpC^{kd} Zellen tragenden Tiere verlängerte sich nicht signifikant. Hingegen wurde die Überlebensdauer der Tiere, welche die stärker apoptoseanfälligen ASML-Cld7^{kd} Zellen injiziert bekommen hatten, nahezu verdoppelt (Abb. 30).

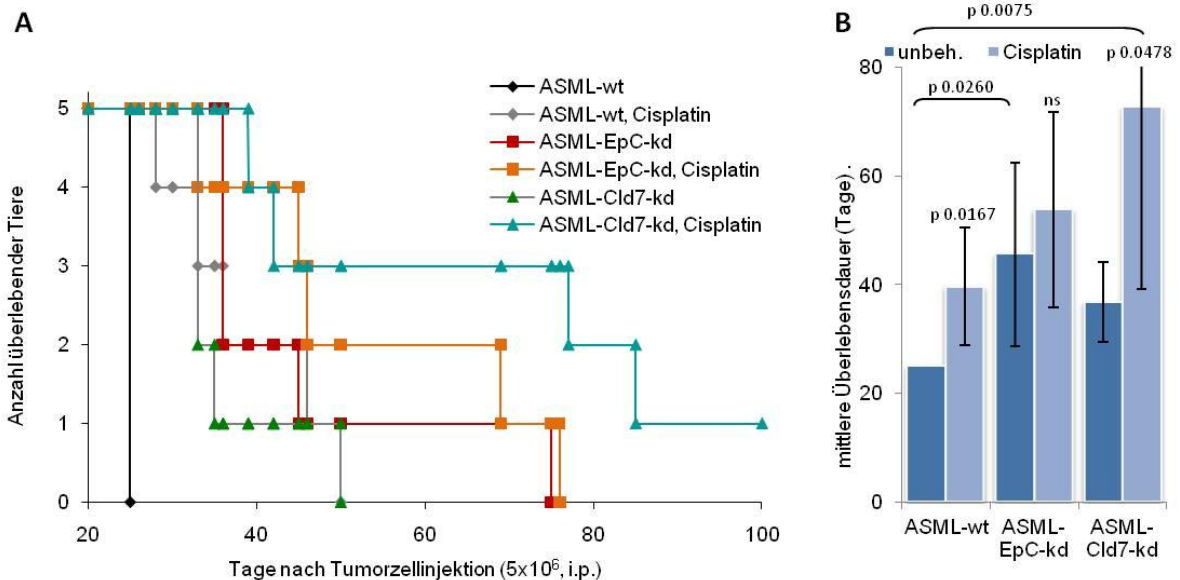


Abb. 30: *In vivo* Apoptoseresistenz von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen
BDX Ratten wurden 5×10^6 ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} oder ASML-Cld7^{kd} Zellen intraperitoneal (ip) injiziert. Nach 2 und 23 Tagen wurden den angegebenen Tieren 1 mg/kg Körpergewicht Cisplatin ip injiziert. Gezeigt sind die (A) Überlebensrate und (B) die Überlebensdauer (Mittelwert \pm STAB von 5 Tieren/Gruppe). Signifikante Unterschiede zwischen ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Ratten sowie zwischen unbehandelten und Cisplatin-behandelten Ratten sind angegeben.

Das makroskopische Wachstum der ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen unterschied sich deutlich. ASML^{wt} Zellen wuchsen miliär und hauptsächlich im Bauchnetz (Omentum). Ein miliäres Wachstum in den Lungen wurde nur in zwei Tieren, die eine Überlebenszeit von mehr als 30 Tagen hatten, beobachtet.

Zelllinie ^a	Behandlung	Überlebens-		p Wert (Zelllinie)	p Wert (Behandlung)	lokaler Tumor	Metastase	Aszites	Pleura- erguss
		Rate ^b	Zeit ^b						
ASML ^{wt}	keine	0/5	25+0			4-5 cm, miliar meist im Omentum	Lunge 1/5	5 ml 5/5	kein
	Cisplatin	0/5	39.6+10.8	0.0167		1-2 cm, miliar meist im Omentum	Lunge 3/5	0.5 ml 2/5	5/5
ASML- EpC ^{kd}	keine	0/5	45.6+16.9	0.0260		5 cm, große Knoten, verbacken mit intraperitonealen Organen	keine	20-40 ml 4/5	kein
	Cisplatin	0/5	53.8+17.9		ns	0,3-2 cm, große Knoten, verbacken mit intraperitonealen Organen	Thymus 1/4	10 ml, blutig 4/5	1/4
ASML- Cld7 ^{kd}	keine	0/5	36.8+7.4	0.0075		2 cm, große Knoten, verbacken mit intraperitonealen Organen	Thymus 2/5	70-100 ml 5/5	2/5
	Cisplatin	1/5	72.6+33.5		0.0478	0,5-2 cm, große Knoten, verbacken mit intraperitonealen Organen	Thymus 4/4	5-10 ml, blutig 4/4	3/4

Tabelle 16: In vivo Wachstum von ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen nach intraperitonealer Applikation
^a BDX Ratten wurden 5x10⁶ Tumorzellen intraperitoneal injiziert. ^b Die Tiere wurden getötet, wenn sie merklich krank wurden, spätestens jedoch nach 120 Tagen.

ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen bildeten große Tumorknoten, die mit den intraperitonealen Organen verbacken waren. Sie bildeten keine Metastasen in der Lunge, aber insbesondere ASML-Cld7^{kd} Zellen bildeten Metastasen im Thymus. Bei ASML-EpC^{kd} und vor allem ASML-Cld7^{kd} Zellen tragenden Tieren wurden Aszites und Pleuraergüsse diagnostiziert, welche jeweils große Mengen an Tumorzellen enthielten (Tabelle 16).

Zusammengefasst zeigten sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Versuche deutlich, dass Cld7 essentiell zur Fähigkeit von Tumorzellen außerhalb ihres normalen Milieus überleben und proliferieren zu können sowie zur Apoptose-resistenz beiträgt. Für EpC konnte dieser Einfluss nicht gezeigt werden.

3.7 Claudin 7 stabilisiert anti-apoptotische Moleküle

Diese Befunde belegen einen signifikanten Einfluss von Cld7 auf die Apoptose-resistenz der ASML Tumorzellen. Speziell im Hinblick auf die therapeutische Effizienz einer Modulation der Cld7-Expression, erschien es zwingend, die Signalwege, über die Cld7 die Apoptoseresistenz beeinflusst, zu untersuchen. In einem ersten Versuchsansatz habe ich zu klären versucht, ob Cld7 auf rezeptor-vermittelte oder mitochondriale Apoptose Einfluss nimmt. Hierzu wurde die Aktivierung der Caspasen 3, -8 und -9 unter PMA-Behandlung untersucht. Nur in ASML^{wt} Zellen konnte eine Reduktion der Aktivierung (Spaltung) von Caspase 9 sowie von Caspase 3 gezeigt werden. Für Caspase 8 (Rezeptorvermittelte Apoptose) konnten keine Unterschiede zwischen ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen festgestellt werden (Abb. 31). Dieser Befund weist auf einen Einfluss von EpC und Cld7 auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg hin. Ich habe daher als nächstes untersucht, ob die Aktivierung anti-apoptotischer Proteine über den MAPK- oder den JNK-Signalweg bzw. über NFκB gestört ist. Insbesondere in PMA-behandelten Zellen konnte ein Einfluss des EpC^{kd} und Cld7^{kd} auf die Aktivierung des MAPKinase-Signalwegs mit einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet werden. Auch die Phosphorylierung der JNK und in der Folge von c-jun war erheblich beeinträchtigt. Letztlich erschien die Freisetzung von NFκB von seinem Inhibitor, aufgrund der reduzierten Phosphorylierung von IκB in ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen, beeinträchtigt (Abb. 32).

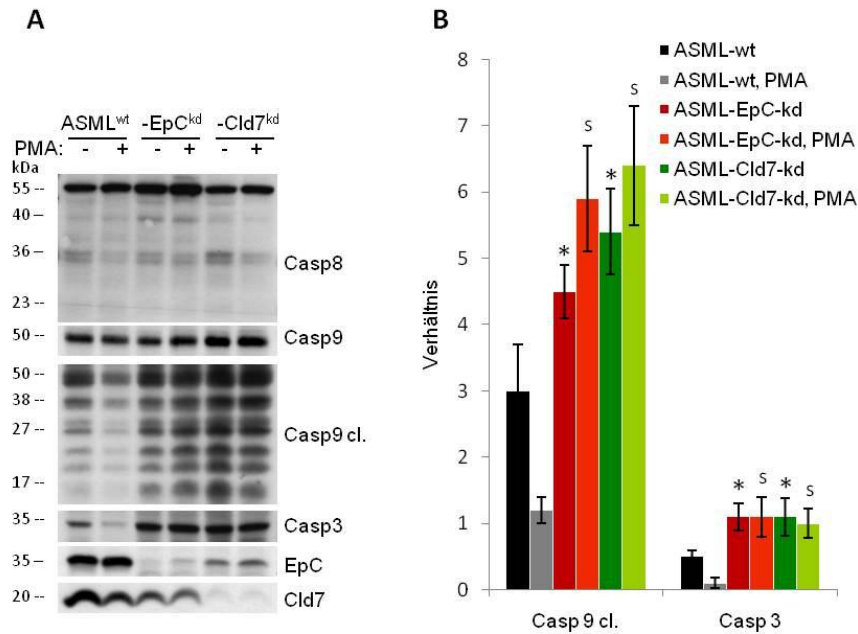


Abb. 31: Caspaseaktivität in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

(A) Unbehandelte und PMA (10 nM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) Auswertung von A. Gezeigt ist das Expressionsverhältnis der angegebenen Proteine zu Aktin (Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten ± STAB). Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen unbehandelten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den PMA-behandelten Zelllinien sind mit s gekennzeichnet.

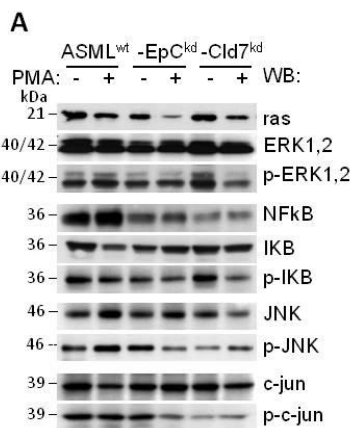
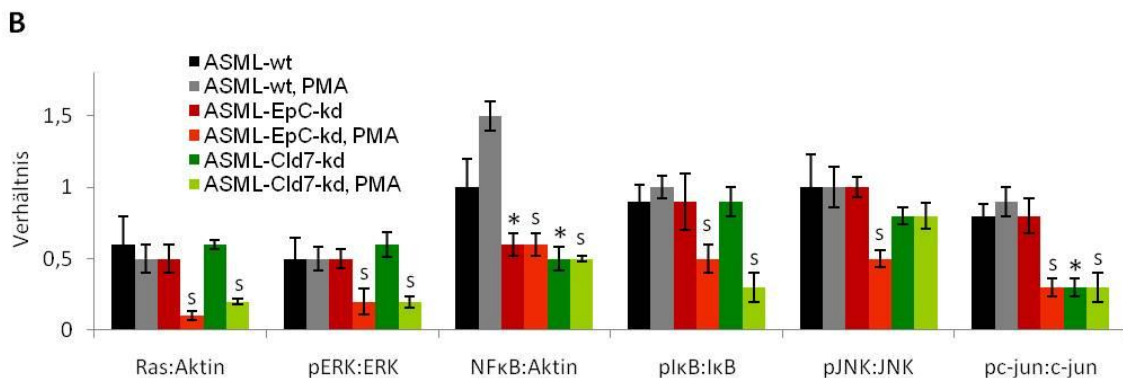


Abb. 32: MAPK, JNK und NFκB Aktivierung in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen

Unbehandelte und PMA (10 nM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) Auswertung von A. Gezeigt ist das Expressionsverhältnis der angegebenen Proteine zu Aktin bzw. der phosphorylierten zur nicht-phosphorylierten Form (Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten ± STAB). Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen unbehandelten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den PMA-behandelten Zelllinien sind mit s gekennzeichnet.



Diese Befunde stehen mit der Reduktion der Apoptoseresistenz von ASML-EpC^{kd} Zellen im Einklang, jedoch erklären sie nicht den dramatischen Verlust der Apoptoseresistenz in ASML-Cld7^{kd} Zellen. Die Aktivierung von Akt und den nachgeordneten anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-XI sowie die Inaktivierung von BAD durch Phosphorylierung unterschieden sich zwischen ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} Zellen nicht signifikant. Bei PMA-stimulierten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} Zellen waren Akt und BAD in erhöhtem Maße phosphoryliert. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung dieser Proteine in ASML-Cld7^{kd} Zellen signifikant reduziert. Ebenso konnte in diesen Zellen eine reduzierte Bcl-2- und Bcl-XI-Expression beobachtet werden. Hingegen waren Expression und Phosphorylierung von Pten in ASML-Cld7^{kd} Zellen deutlich erhöht (Abb. 33). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der dramatische Verlust der Apoptoseresistenz in ASML-Cld7^{kd} Zellen, durch die erhöhte Expression von Pten, welches die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs unterbindet, bedingt ist.

A

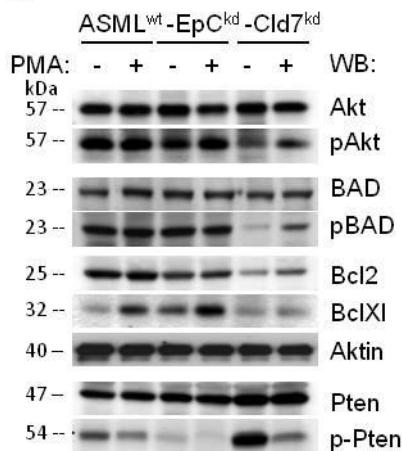
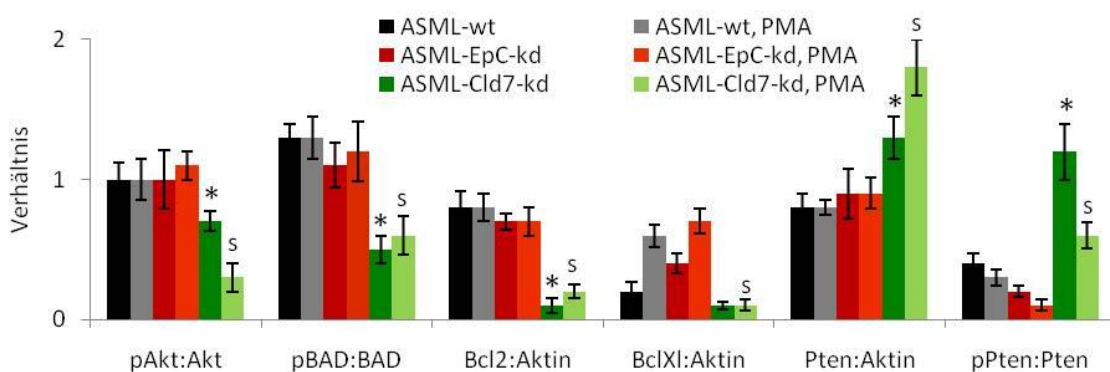


Abb. 33: Einfluss von EpC und Cld7 auf die Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalwegs

Unbehandelte und PMA (10 nM, 1 h) -behandelte ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen wurden mit Triton-X-100 lysiert, einer SDS-PAGE mit anschließendem WB unterzogen und mit den angegebenen Antikörpern und einem HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. (B) Auswertung von A. Gezeigt ist das Expressionsverhältnis der angegebenen Proteine zu Aktin bzw. der phosphorylierten zur nicht-phosphorylierten Form (Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten ± STAB). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen unbehandelten ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den PMA-behandelten Zelllinien sind mit s gekennzeichnet.

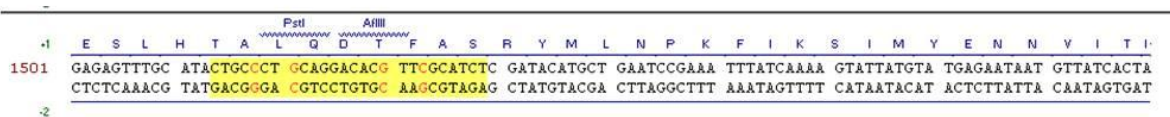
B



3.8 EpCAM rescue

Um in weiterführenden Arbeiten insbesondere die Cld7-unabhängige Funktion von EpC in CSC eingehender untersuchen zu können, wurde mit der Generierung einer ASML-EpC^{kd, EpC+} Zelllinie begonnen. Als Ausgangspunkt für die Klonierung dient ein cDNA-Konstrukt, in welchem EpC in der Transmembrandomäne so mutiert ist, dass keine Bindung mit Cld7 erfolgen kann (Nubel et al., 2009). Durch Einbringen weiterer stiller Punktmutationen in der siRNA-Konsensussequenz soll eine Unterdrückung der EpC-Expression durch das EpC^{kd}-Konstrukt verhindert werden. Die Generierung der stillen Punktmutanten wurde in zwei Klonierungsschritte aufgeteilt. Zur Erleichterung der Überprüfung, ob die Klonierung erfolgreich war, wurden die Primer so erstellt, dass bei erfolgreicher Inserterung der zwei Mutationen eine neue Restriktionsenzymbindungsstelle entsteht. Bisher gelang der erste Schritt, die Inserterung der ersten zwei von vier Mutationen (Abb. 34).

A



B

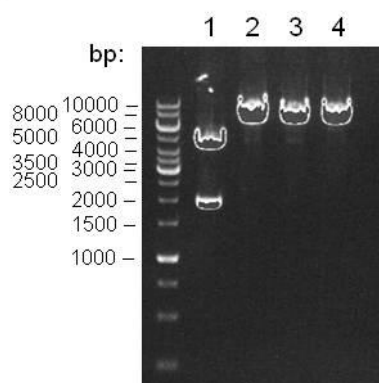


Abb. 34: EpC rescue

(A) Ausschnitt der EpC DNA Sequenz. Gezeigt ist die doppelsträngige DNA mit der Aminosäuresequenz. Der gelb markierte Bereich ist der siRNA Bindungsbereich. Rot markiert sind die mutierten Basenpaare. Bei bp 1517 und 1520 sind die beiden Mutationen, die zusammen mit der Pst I Restriktionsschnittstelle im ersten Klonierungsteil eingeführt wurden. (VectorNTI) (B) Kontrollverdau der DNA von vier transfizierten Bakterienklonen. Klon 1 enthält neben einer normalen eine zweite, zusätzliche Pst I Schnittstelle, ist damit positiv kontrollverdaut und enthält die gewünschten Mutationen. Gezeigt ist die UV-Licht Aufnahme eines 1 %igen DNA-Agarosegels nach Einfärbung mit Ethidiumbromid.

4 Diskussion

Ein Hauptproblem bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms stellt die früh einsetzende Metastasierung dar. In jüngster Zeit wird Krebsstammzellen (CSC) eine entscheidende Rolle bei der Etablierung von Metastasen zugeschrieben (Chaffer and Weinberg, 2011; Lobo et al., 2007; Regenbrecht et al., 2008; Visvader and Lindeman, 2008; Werbowetski-Ogilvie and Bhatia, 2008; Yang and Chang, 2008). Für CSC vieler Karzinome ist ein typisches Profil von Oberflächenmarkern bekannt, mit dessen Hilfe sie angereichert werden können. Beim Pankreaskarzinom ist das Profil der CSC: CD44⁺EpCAM⁺CD24⁺ (Li et al., 2007a). Während eine funktionelle Rolle von CD44 im Metastasierungsprozess gut dokumentiert ist, liegen für EpC entsprechende Untersuchungen nicht vor. Meine Arbeit sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob EpC ein funktioneller Krebsstammzellmarker ist. Meine Ergebnisse weisen überraschender Weise darauf hin, dass nicht EpC, sondern vielmehr ein EpC-assoziiertes Molekül, Cld7, über seine Interaktion mit EpC, einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierung hat.

4.1 Einfluss von EpCAM und Claudin 7 auf Tumor- und Metastasenwachstum

ASML Zellen besitzen mehrere typische Krebsstammzeleigenschaften. Sie exprimieren das CSC-Marker-Profil von Pankreas CSC, sie proliferieren langsam, benötigen keinen Zellkontakt, sind apoptoseresistent und stark metastatisch (Jung et al., 2009; Klingbeil et al., 2009; Matzku et al., 1983). Nach subkutaner Injektion wachsen ASML^{wt} Zellen kaum lokal. Sie migrieren über die Lymphgefäße zum drainierenden Lymphknoten, wo sie Metastasen etablieren. Über weitere LK-Stationen erreichen sie die Lunge, wo sie miliare Metastasen bilden (Matzku et al., 1983). Ich möchte an dieser Stelle darauf hinweisen, dass dieser Tumor, aufgrund des fehlenden lokalen Wachstums, in spezieller Weise für Untersuchungen des Metastasierungsprozesses geeignet ist, da eine Exzision des Primärtumors entfällt, die ihrerseits den Metastasierungsprozess fördern kann. Ich konnte zeigen, dass die Fähigkeit zu metastasieren sowohl in ASML-EpC^{kd} als auch ASML-Cld7^{kd} Zellen

erheblich eingeschränkt ist. Die Zellen beider kd-Zelllinien verbleiben zum Großteil an der subkutanen Injektionsstelle und etablieren dort, nach einer längeren Ruhephase, kleine Tumore. Während ASML-EpC^{kd} Zellen noch die drainierenden LK erreichen und dort makroskopisch nachweisbare Metastasen bilden, wird dies bei ASML-Cld7^{kd} Zellen nur selten beobachtet. Ich möchte darauf hinweisen, dass im Unterschied zu Blutgefäßen, Zellen des lymphatischen Gefäßsystems Cld7 exprimieren (Nelson et al., 2007). Ob diese Cld7-Expression eine Ursache der strikt lymphatischen Metastasierung von ASML^{wt} Zellen (Matzku et al., 1983) und der drastisch behinderten Fähigkeit von ASML-Cld7^{kd} Zellen durch das Lymphgefäßsystem zu metastasieren ist, bleibt noch zu klären. Weder ASML-EpC^{kd} noch ASML-Cld7^{kd} Zellen bildeten Lungenmetastasen. Bisher gibt es keine Möglichkeit nachzuweisen, ob die Zellen das Organ nicht erreichen oder nicht in der Lage sind dort zu überleben. Ungeachtet dieser offenen Frage belegen meine Experimente deutlich, dass das metastatische Potenzial von ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen stark beeinträchtigt ist.

Neben dem unterschiedlichen Wachstum in den drainierenden LK gibt es noch weitere Unterschiede zwischen ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen. Nach intraperitonealer Injektion, wodurch ein Einfluss der Migrationsfähigkeit der Zellen auf das Tumorwachstum reduziert wird, bilden beide Zelllinien große Tumorknoten, welche in das umliegende Gewebe einwachsen. Insbesondere aber ASML-Cld7^{kd} Zellen tragende Tiere bildeten so große Mengen Aszites und massive Pleuraergüsse, dass die Tiere aufgrund dessen getötet werden mussten. Mit Ausnahme eines cisplatinbehandelten ASML-EpC^{kd} Tieres bildeten ausschließlich ASML-Cld7^{kd} Zellen tragende Tiere Thymusmetastasen. Der deutlichste Unterschied zwischen ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen zeigte sich jedoch in der Antwort auf eine Cisplatin-Behandlung. Im Gegensatz zu ASML-EpC^{kd} Zellen tragenden Tieren verlängerte eine Cisplatin-Behandlung die Überlebensdauer von ASML-Cld7^{kd} Zellen tragenden Tieren signifikant. In Kürze:

- (i) Sowohl EpC als auch Cld7 sind für eine effiziente lymphatische Ausbreitung und metastatisches Wachstum in der Lunge essentiell.
- (ii) In Abwesenheit von Cld7 vermittelt EpC die Bildung von Aszites und Metastasenwachstum im Thymus.
- (iii) Cld7 spielt eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber apoptoseinduzierenden Chemotherapeutika.

Die diesen Befunden zugrunde liegenden Mechanismen habe ich im Folgenden zu klären versucht und möchte die Interpretation meiner Befunde an dieser Stelle kurz diskutieren.

4.2 Der Beitrag von EpCAM und Claudin 7 zu lymphatischer Metastasierung

4.2.1 Claudin 7 und ASML Zellmotilität

Warum weisen ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen ein geringeres metastatisches Potenzial als ASML^{wt} Zellen auf? Für EpC konnte ein ähnlicher Befund beim humanen Mammakarzinom erhoben werden. Eine erhöhte EpC-Expression geht mit verstärkter LK-Metastasierung einher (Tandon et al., 1990). EpC ist ein homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, welches durch erhöhte Adhäsion die Metastasierung behindern könnte (Balzar et al., 2001; Balzar et al., 1999; Marhaba et al., 2008). Durch die Assoziation mit Cld7 wird die EpC-Tetramerbildung, die zur homophilen Adhäsion von EpC erforderlich ist, unterbunden und EpC wird in TEMs rekrutiert (Kuhn et al., 2007). Die Stärkung der EpC-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion durch die fehlende Assoziation mit Cld7 könnte eine Erklärung für die geringere metastatische Kapazität von ASML-Cld7^{kd} Zellen sein.

ASML-EpC^{kd} Zellen zeigten ebenfalls ein geringeres metastatisches Potenzial. Die Motilität der EpC^{kd} Zellen war jedoch nicht beeinträchtigt. Hingegen wurde in Cld7^{kd} Zellen ein signifikanter Einfluss auf die Motilität beobachtet. Dies deutete auf eine aktive Rolle von Cld7 in der Zellmigration hin. Ich konnte zeigen, dass Cld7 essentiell für die Bildung des migrationsfördernden EpC-Cld7-Tspan8- α 6 β 4-Komplexes in TEM ist und das Cld7 in TEM phosphoryliert ist. Ebenfalls konnte die Phosphorylierung von Ezrin gezeigt werden. Seit langem ist bekannt, dass PKCs (Serin/Threonin-spezifische Kinasen) epitheliale und endotheliale Barrieren beeinflussen (Gonzalez-Mariscal et al., 2008). So wird z.B. die Cld-Integration in tight junctions durch PKC-Phosphorylierung negativ beeinflusst (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Durch PKC phosphoryliertes Ezrin, welches an F-Aktin bindet, wird die Zellmigration im nasopharyngealen Karzinom gefördert (Endo et al., 2009). Ich konnte zeigen, dass Ezrin nicht direkt mit Cld7 assoziiert ist. Jedoch gehe ich davon

aus, dass EpC, im Komplex mit Cld7, über phosphoryliertes Ezrin mit dem Zytoskelett verbunden wird und ausschließlich komplexassoziiert Einfluss auf die Migration nimmt. Diese Annahme unterstützen ähnliche Befunde beim Ovarialkarzinom. Phosphorylierung von Cld4 durch PKC ϵ schwächt dort die tight junction-Integrität (D'Souza et al., 2007). Des Weiteren führt eine Mutation von Cld1, die eine Phosphorylierung durch PKA unterbindet, zu abgeschwächter Motilität in Melanomzellen (French et al., 2009). PKC trägt auch zur Phosphorylierung von β 4-Integrin bei und fördert so die Motilität durch Auflösung hemidesmosomaler Strukturen (Germain et al., 2009). Da, wie ich zeigen konnte, TEM assoziiertes und phosphoryliertes Cld7 mit dem α 6 β 4 Integrin ko-immunpräzipitiert, könnte auch eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von Cld7 und α 6 β 4 die Tumorzellmotilität unterstützen.

Zusammengefasst unterbindet phosphoryliertes Cld7 EpC-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und fördert, möglicherweise unterstützt durch die Assoziation mit α 6 β 4, die Tumorzellmotilität.

4.2.2 EpCAM und die lymphatische Ausbreitung von ASML

Tumorzellen

Pankreaskarzinome, Kolonkarzinome, Mammakarzinome, Gebärmutterkarzinome, aber in ganz besonderem Maße Ovarialkarzinome, zeichnen sich durch die Ausbildung von Aszites aus (Saif et al., 2009; Wilailak et al., 1999). Ich hatte für einen therapeutischen Ansatz die intraperitoneale Applikationsform gewählt, da ich zuvor gezeigt hatte, dass die Motilität der ASML-EpC^{kd} Tumorzellen beeinträchtigt ist, ein Befund, der die Auswertung eines Therapieansatzes erschweren würde. Die Problematik der Unterschiede in der Tumorzellmotilität konnte in der Tat durch die intraperitoneale Applikation umgangen werden. Allerdings entwickelten Tiere, die ASML-Cld7^{kd} Zellen injiziert bekommen hatten, erhebliche Mengen an Aszites und Pleuraergüssen, die letztlich die Tötung der Tiere erforderlich machte. Erstaunlicherweise war bis vor kurzem nur wenig über mögliche Ursachen unterschiedlicher Exsudatbildung bekannt. Wie lässt sich dieser Befund bei ASML Tumorzellen erklären? Nach intraperitonealer Injektion von ASML^{wt} Zellen in BDX Ratten, wuchsen die Zellen im Bauchnetz und bildeten eine Vielzahl miliarer Tumore.

Die Tiere entwickelten auch in fortgeschrittenem Krankheitsstadium keinen oder nur sehr geringe Mengen Aszites. Im Gegensatz dazu, entwickelten ASML-Cld7^{kd} Zellen tragende Tiere große, solide, mit den intraperitonealen Organen verwachsene Tumorknoten. Daneben bildeten sich große Mengen an Aszites (20- bis 50-fache Menge im Vergleich zu ASML^{wt} tragenden Tieren) und Pleuraergüsse. Ich möchte darauf hinweisen, dass auch bei massiven Pleuraergüssen die Lunge tumorfrei war. Diese dramatische Exsudatbildung lässt sich wahrscheinlich auf verstärkte EpC-Tetramerformation in Abwesenheit von Cld7 zurückführen. Wie bereits erwähnt, ist das Ovarialkarzinom eine der Krebsarten, die für eine besonders hohe und häufige Aszitesentwicklung im Krankheitsverlauf bekannt ist (Saif et al., 2009; Wilailak et al., 1999). Für dieses wurde beschrieben, dass Tumorzellen, die sich durch eine hohe EpC-Expression auszeichnen, an den Eintrittsporen der lymphatischen Gefäße des Peritoneums akkumulieren und somit die Drainage durch das Lymphsystem unterbinden. Dies führt zu einer verstärkten Ansammlung aszitischer Flüssigkeit (Feki et al., 2009).

Meine Experimente haben gezeigt, dass ASML-Cld7^{kd} Zellen tragende Tiere keine Lungenmetastasen entwickeln. Die geringe Anzahl Tumorzellen, die aus dem Peritonealraum über die Lymphe abtransportiert werden, bilden jedoch Thymusmetastasen. Dieses *in vivo* Wachstum entspricht dem Wachstum von AS Tumorzellen (nichtmetastasierende Schwesterzelllinie der ASML Zellen) die, nach Transfektion mit EpC oder EpC plus Cld7, bei intraperitonealer Injektion ebenfalls Thymusmetastasen bilden (Nubel et al., 2009). In jüngster Zeit wurde bei aggressiven und chemotherapieresistenten Ovarialkarzinomen mit hoher EpC-Expression, ebenfalls eine Verbreitung über das Lymphsystem nachgewiesen, bei der vornehmlich die parathymischen LK bereits in einer frühen Phase befallen werden (Feki et al., 2009; Richter et al., 2010). Diese Befunde bestätigen unsere Beobachtung, dass EpC vornehmlich zur lymphatischen Metastasierung beiträgt. Die fehlende Besiedlung des Thymus bei Ovarialkarzinomen ist wahrscheinlich auf die altersbedingte Thymusinvolution zurückzuführen. Die von mir beobachtete Ausbildung von Thymusmetastasen, vornehmlich durch ASML-Cld7^{kd} Zellen, untermauert darüber hinaus die Hypothese, dass die homophile Adhäsion von EpC der Tumorzellen mit EpC des Thymusepithels die Proliferation der Tumorzellen fördert. Eine entsprechende proliferationsfördernde Rolle der homophilen EpC-Adhäsion wurde ursprünglich bei der Interaktion früher EpC⁺ Thymozyten mit EpC⁺

Thymusepithel beschrieben (Claas et al., 1996; Nelson et al., 1996; Osada et al., 2006).

4.2.3 Claudin 7 unterstützt EpCAM-medierte Tumorzellproliferation

ASML^{wt} Zellen zeigen unter PMA-Behandlung ein höheres proliferatives Potenzial als ASML-EpC^{kd} Zellen. Dies steht mit der beschriebenen Aktivität von EpICD, dem zytoplasmatischen Spaltprodukt von EpC, als Ko-Transkriptionsfaktor von c-myc in Einklang (Maetzel et al., 2009). In der Tat konnte in ASML^{wt} Zellen eine höhere c-myc -Expression im Vergleich zu ASML-EpC^{kd} Zellen nachgewiesen werden. Wider Erwarten wurde dies jedoch nicht in ASML-Cld7^{kd} Zellen beobachtet, und zwar weder *in vitro* noch *in vivo*, sodass davon ausgegangen werden muss, dass Cld7 die Generierung und/oder Aktivierung von EpICD unterstützt. Eine mögliche Erklärung könnte in der Cld7-vermittelten Rekrutierung von EpC in TEMs liegen. Durch die Rekrutierung in TEMs gelangt EpC in Kontakt mit TACE und PS2/NTF, wodurch die Generierung von EpICD gefördert wird (Thiel and Carpenter, 2006; Vetrivel et al., 2005). Hinzu kommt ein weiterer wesentlicher Befund, der bisher nicht beschrieben wurde. Cld7 assoziiert mit PS2/NTF, wodurch Cld7 den Kontakt zwischen EpC und PS2/NTF fördert und somit die Effizienz der EpC-Spaltung erhöht. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Cld7 die proliferationsfördernden Eigenschaften von EpC aktiv unterstützt. Die beschriebene Eigenschaft von EpC/EpICD erklärt das geringere Tumorwachstum und die erniedrigte Proliferationsrate von ASML-EpC^{kd} Zellen im Vergleich mit ASML^{wt} Zellen. Die Beobachtungen bezüglich der PS2/NTF-Assoziation von Cld7 sowie der Cld7-medierten TEM-Lokalisation von EpC liefern eine Erklärung dafür, warum das Tumorwachstum von ASML-Cld7^{kd} Zellen geringer ist, als das von ASML^{wt} Zellen. Allerdings kann das, auch im Vergleich zu ASML-EpC^{kd} Zellen, reduzierte Wachstum der ASML-Cld7^{kd} Zellen dadurch nicht geklärt werden, sodass ich mich in den abschließenden Untersuchungen diesem Problemkreis zugewandt habe.

4.2.4 Claudin 7 ist in die Expression von Pten involviert und unterdrückt über Pten die Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade

In *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte ich zeigen, dass die stark reduzierte *in vivo* Progression von ASML-Cld7^{kd} Zellen durch eine apoptoseresistenzfördernde Funktion von Cld7 bedingt ist. Unter Cisplatinbehandlung proliferierten ASML-Cld7^{kd} Zellen deutlich weniger, wiesen eine geringere respiratorische Aktivität auf und waren zu einem höheren Prozentsatz apoptotisch als ASML^{wt} und ASML-EpC^{kd} Zellen. *In vivo* verdoppelte eine Cisplatinbehandlung die Überlebenszeit ASML-Cld7^{kd} Zellen tragender Tiere. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der von mir beobachteten Befunde zu klären, habe ich die Expression verschiedener apoptoserelevanter Moleküle proteinbiochemisch untersucht. Die Resultate meiner Untersuchungen möchte ich kurz diskutieren:

Die Apoptose ist morphologisch definiert durch Schrumpfung der Zelle und des Zellkerns (pyknosis) sowie der Kondensation des Chromatins, Bläschenbildung (dem sog. blebbing), Fragmentierung des Zellkerns (karyorrhexis) und der Bildung von apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) (Kerr et al., 1972). Auf biochemischer Ebene ist die Apoptose durch Permeabilisierung der Mitochondrien-Membranen (MMP) und/oder starke Caspaseaktivität charakterisiert (Adams, 2003; Green and Reed, 1998; Wang, 2001; Zhivotovsky and Kroemer, 2004). Zwei Hauptsignalwege können Apoptose auslösen. Zum einen, der extrinsische, (todes-)rezeptorvermittelte Signalweg. Über Aktivierung von Rezeptoren der TNF (tumor necrosis factor)-Rezeptorfamilie in der Zellmembran, kommt es zur Bildung eines Todesaktivierungs-Komplexes (DISC, death-inducing signalling complex). Dieser besteht aus dem Rezeptor plus Ligand sowie FADD (Fas-associated death domain protein), einem Protein, welches die Initiator-Procaspase-8 bzw. -10 in den Komplex rekrutiert. Durch autokatalytische Spaltung wird die Initiator-Procaspase-8 (-10) aktiviert. Die aktivierte Caspase-8 (-10) aktiviert dann ihrerseits katalytisch weitere Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -6, -7). Hierdurch wird eine Kettenreaktion angestoßen, die schließlich in die Apoptose führt (Igney and Krammer, 2002). Nach Aktivierung der Caspase-8 kann auch eine Interaktion mit dem zweiten Apoptosesignalweg stattfinden, nämlich mittels Aktivierung von BID durch die Caspase-8 (Zhivotovsky and Kroemer, 2004) (Abb. 35). Daneben existiert der intrinsische (Stress-) Signalweg bzw. mitochondriale Apoptosesignalweg. Ausgelöst

durch Mitochondrien-Membran-Permeabilisierung (MMP) gelangen spezielle Proteine, wie z.B. Cytochrom-c, aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytoplasma und aktivieren das sog. Apoptosom (Caspase-Aktivierungs-Komplex). Dieser Komplex initiiert die Aktivierung der Initiatorcaspase-9, welche ihrerseits, durch Aktivierung weiterer Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -6, -7), eine zur Apoptose führende Signalkaskade in Gang setzt. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs spielen die Proteine der BCL2-Familie durch Regulierung der MMP (Zamzami and Kroemer, 2001) (Abb. 35).

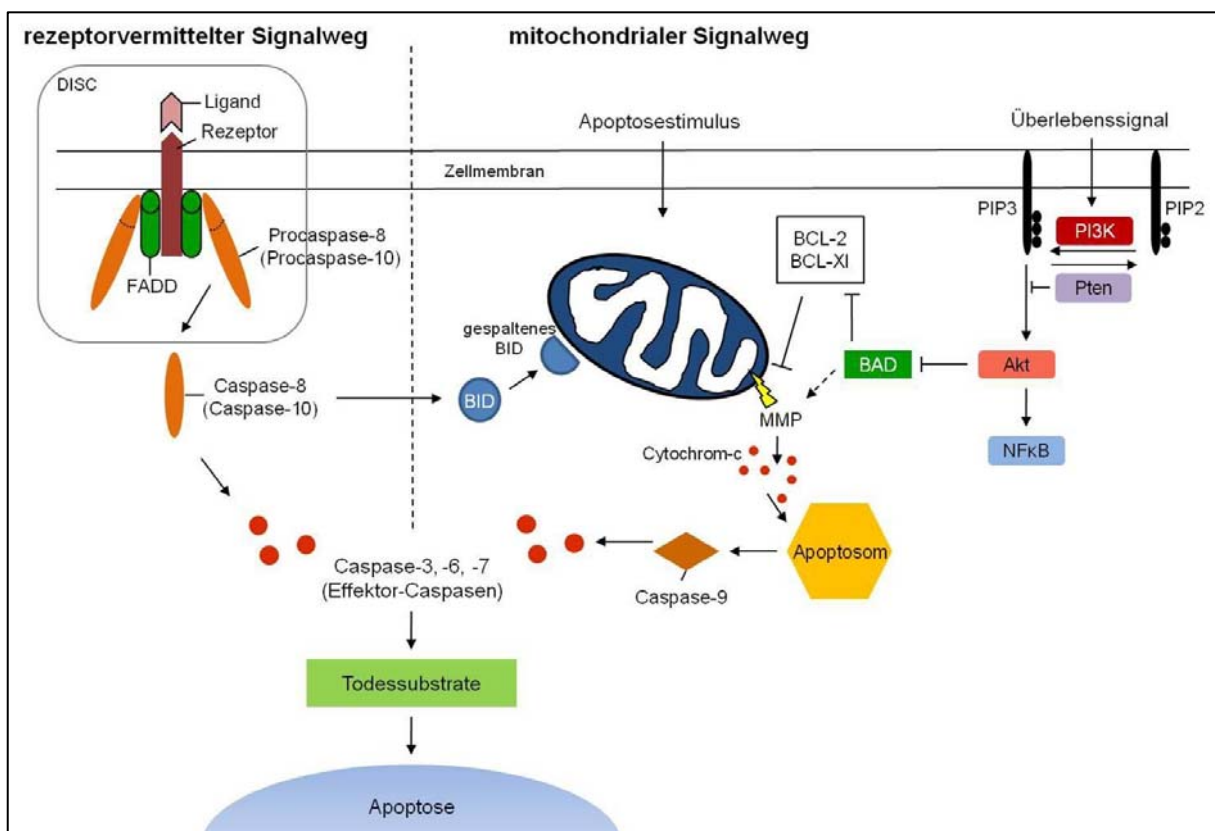


Abb. 35: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege

(Links) Extrinsischer Apoptosesignalweg. Nach Aktivierung durch Rezeptor-Ligand-Bindung bildet sich der DISC-Komplex (death-inducing signalling complex). Es kommt zur Spaltung der Procaspase-8 (-10). In der Folge aktiviert diese die Effektorcaspasen und es kommt zur Apoptose. (Mitte) Intrinsischer Apoptosesignalweg. Nach Aktivierung der MMP kommt es zur Freisetzung von Cytochrom-c ins Zytoplasma und in der Folge zur Bildung des Apoptosoms. Dieses aktiviert die Initiatorcaspase-9. Die mitochondrial-vermittelte Apoptose kann auf mehreren Ebenen durch pro- oder anti-apoptotische Moleküle reguliert werden (z.B. BAD, BID, BCL-2, BCL-XI). (Rechts) PI3K/Akt-Signalweg. Überlebenssignale aktivieren die PI3K-vermittelte Bildung von PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat). Dies führt zur Aktivierung von Akt. Pten wirkt antagonistisch zu PI3K durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2. Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung der Signalwege. Modifiziert nach (Igney and Kramer, 2002).

In meinen Experimenten zeigte sich eine vergleichbare Expression von Caspase-8 in ASML^{wt}, ASML-EpC^{kd} und ASML-Cld7^{kd} Zellen. Dieser Befund spricht gegen eine rezeptorvermittelte Aktivierung der Apoptose. Stattdessen war eine Aktivierung der Caspasen -9 und -3 in cisplatinbehandelten ASML-EpC^{kd} Zellen sowie verstärkt in ASML-Cld7^{kd} Zellen zu beobachten, was für eine Regulation über den mitochondrialen Apoptosesignalweg spricht.

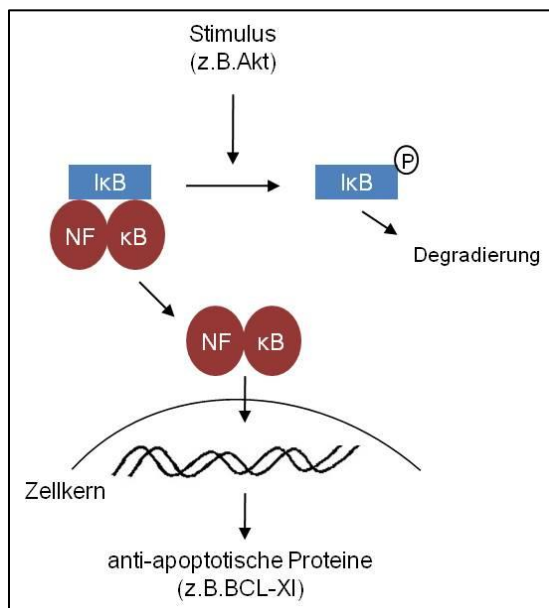


Abb. 36: Schematische Darstellung des NFκB-Signalwegs. Durch Phosphorylierung des Inhibitors IκB kommt es zur Freisetzung von NFκB. DNA-bindende Untereinheiten von NFκB gelangen in den Zellkern und aktivieren die Transkription der Zielgene. Diese können in Abhängigkeit vom Stimulus und des zellulären Kontextes pro- oder anti-apoptotische Gene sein. Modifiziert nach (Schulze-Bergkamen and Kramer, 2004).

Eine maßgebliche Rolle bei der mitochondrial initiierten Apoptose spielen Proteine der BCL2-Familie sowie deren Regulatoren. Anti-apoptotische Proteine sind z.B. BCL2 und BCL-XI. Pro-apoptotische Proteine dieser Familie sind z.B. BAD, BAX und BID (Huang and Strasser, 2000). Im Folgenden möchte ich einige Beispiele für regulierende Signalwege der Apoptose nennen: Der PI3K/Akt-Signalweg, der hauptsächlich die Inaktivierung des pro-apoptotischen Moleküls BAD vermittelt (Chang et al., 1997) (Abb. 35). Des Weiteren der NFκB-Signalweg (Abb. 36), der, wie der MAPK/ERK-Signalweg, die Apoptose über die Regulation der Genexpression beeinflusst (Rayet and Gelinias, 1999; Roy et al., 2010).

In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass die erhöhte Aktivität der Caspasen -3 und -9 in ASML-EpC^{kd} Zellen sowie deutlich verstärkt in ASML-Cld7^{kd} Zellen mit einer reduzierten Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie des NFκB-Signalwegs einhergeht. Letztere wurde durch eine reduzierte Freisetzung von NFκB, aufgrund der ineffizienten Phosphorylierung von IκB (zytoplasmatischer Inhibitor von

NFκB), bedingt (Abb. 36). Die deutlich stärkere Reduktion der Apoptoseresistenz in ASML-Cld7^{kd} Zellen liegt in der stark reduzierten Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges und der daraus resultierenden Destabilisierung anti-apoptotischer Proteine begründet, welche ausschließlich in ASML-Cld7^{kd} Zellen beobachtet werden konnte. Als Auslöser der verringerten Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges konnte ich eine massive Erhöhung der Pten-Expression in ASML-Cld7^{kd} Zellen feststellen. Pten ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Hauptaktivität in der Unterdrückung des PI3K/Akt-Überlebenssignalwegs liegt. Durch Dephosphorylierung von PIP3 beeinflusst Pten den Signalweg oberhalb (upstream) der PI3K. Dadurch ist Pten ein zentrales Molekül der negativen Regulation des Überlebens der Zelle (Zhang and Yu, 2010) (Abb. 35). Wenngleich die Frage zu klären bleibt, wie Cld7 in die Transkription von Pten involviert ist, unterstützen meine Befunde nachhaltig, dass der Verlust der Apoptoseresistenz in ASML-Cld7^{kd} Zellen maßgeblich auf die Aktivierung von Pten und damit der Ruhigstellung des PI3K/Akt-Signalwegs zurückzuführen ist.

EpC und CD44/CD44v6 sind Pankreas-CSC-Marker (Bohl et al., 2011; Marhaba et al., 2008; Zoller, 2011). Für CD44v6 hatte unser Labor gezeigt, dass ein CD44v6^{kd} die Metastasierung von ASML Tumorzellen stark beeinträchtigt (Klingbeil et al., 2009). Ich hatte daher erwartet, dass ein EpC^{kd}, ähnlich wie der CD44v6^{kd}, die Bildung von Metastasen, einer zentralen Eigenschaft von CSCs, behindert. Der Befund, dass ASML-Cld7^{kd} Zellen ebenfalls nicht die Fähigkeit zu einer effektiven Metastasierung besitzen, wäre noch mit einer funktionellen Aktivität von EpC als CSC-Marker vereinbar, wenn man davon ausgeht, dass nur Cld7-assoziiertes EpC als CSC-Marker fungiert. Jedoch zeigten ASML-Cld7^{kd} Zellen in meinen Untersuchungen eine deutlich abgeschwächte metastatische Kapazität im Vergleich zu ASML-EpC^{kd} Zellen. Dies deutet darauf hin, dass, zumindest in dem beschriebenen Pankreaskarzinommodell, die Resistenz gegenüber medikamentös-induzierte Apoptose sowie die Metastasierungskapazität der Tumorzellen, vornehmlich von Cld7 abhängig sind. Über seine Assoziation mit Cld7 ist EpC an der Vermittlung der CSC-typischen Funktionen beteiligt, kann in diesem Modell aber nicht als funktionaler CSC-Marker bestätigt werden.

4.3 Perspektiven

Der zentrale Befund der vorliegenden Arbeit war unerwartet. Ich wollte überprüfen, ob EpCAM als CSC-Marker funktionell aktiv ist und habe dies anhand der Metastasierungsfähigkeit einer Pankreaskarzinomzelllinie überprüft. Die Untersuchungen ergaben, dass EpC für den Metastasierungsprozess essentiell benötigt wird, jedoch nur im Komplex mit Cld7, sodass die Hypothese im Raum steht, dass Cld7 einen funktionell aktiven CSC-Marker darstellt. Von allen beschriebenen CSC-Markern konnte eine funktionelle Beteiligung am CSC-Status bisher nur für CD44 nachgewiesen werden. Es ist daher dringend erforderlich, in weiteren Tumormodellen und speziell bei humanen Tumoren zu kontrollieren, ob Cld7 generell einen funktionellen CSC-Marker darstellt. Neben der Überprüfung in humanen Tumoren, erscheint mir die Generierung einer ASML-EpC^{kd, EpC+} rescue-Zelllinie sinnvoll (siehe Kapitel. 3.8). Mittels dieses rescues wird es möglich sein, die spezifisch EpC-vermittelten Prozesse von EpC-Cld7-Komplex-vermittelten Prozessen klar abzugrenzen. Durch Einfügen einer Mutation während der Generierung des EpC-rescues, die eine direkte Bindung an Cld7 verhindert, erübrigt sich zudem ein EpC-Cld7-doppel-knockdown.

In meinen Untersuchungen zeigte sich eine Abhängigkeit der EpC-Cld7-vermittelten Prozesse von der Lokalisation in TEMs. Diese wiederum ist abhängig von der Rekrutierung von EpC durch phosphoryliertes Cld7. An welcher potentiellen Phosphorylierungsstelle des Cld7-Moleküls funktionell entscheidende Phosphorylierungen erfolgen, ist noch ungeklärt. Wir versuchen diese Frage zurzeit durch die Erstellung von Cld7-Mutanten, in denen diskrete Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet wurden, zu überprüfen.

Aus therapeutischer Sicht erscheint mir der Verlust der Apoptoseresistenz von ASML-Cld7^{kd} Zellen von hoher Relevanz. Meine bisherigen Untersuchungen verweisen auf die Regulation von Pten durch Cld7 als zentrales Element. Dieser Befund bedarf essentiell einer detaillierten Analyse der involvierten Signalwege und -moleküle. Die Untersuchungen sollten eine klinische Umsetzung der Befunde bei der hohen Strahlen- und Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms ermöglichen.

Letztlich möchte ich darauf hinweisen, dass EpC-spezifische AK seit vielen Jahren in der Krebstherapie etabliert sind. Ihre Nutzung zur Anreicherung von CSC ist in der Diskussion. Meine Resultate deuten darauf hin, dass in die Überlegungen

zu therapeutischen Ansätzen, die auf Pankreas-CSCs ausgerichtet sind, Cld7, als möglicher funktioneller CSC-Marker, mit einbezogen werden sollte.

5 Zusammenfassung

EpCAM ist als Oberflächenmolekül seit langem ein Ziel für die antikörperbasierte Krebstherapie. Es ist bekannt, dass EpCAM, über die Abspaltung der intrazellulären Domäne, Proliferation und damit Tumorwachstum fördern kann. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass EpCAM, nach Claudin7-Assoziation, Zellmotilität und Apoptoseresistenz von Pankreas-Tumorzellen beeinflussen kann. In jüngster Zeit wurde beschrieben, dass EpCAM auch auf Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms exprimiert wird. Über eine funktionelle Rolle von EpCAM in Tumorstammzellen ist jedoch nichts bekannt. Die Untersuchung einer potentiellen, funktionalen Rolle des Tumorstammzellmarkers EpCAM war der Ausgangspunkt meiner Arbeit. Hierfür etablierte ich einen stabilen knockdown (kd) von EpCAM und Claudin 7 in der hoch metastatischen Pankreasadenokarzinomzelllinie BSp73ASML (ASML-EpCAM^{kd}, ASML-Claudin 7^{kd}). Die ASML-Claudin 7^{kd} Zelllinie sollte hierbei Hinweise liefern, ob EpCAM oder Claudin 7-assoziiertes EpCAM die Metastasierung beeinflusst.

Ich konnte zeigen, dass der EpCAM^{kd} und, deutlich stärker, der Claudin 7^{kd} in BSp73ASML Zellen, die Tumorigenität der Zellen sowie ihre Fähigkeit Lymphknotenmetastasen zu bilden reduzieren und eine Metastasierung in die Lunge verhindern. Dieser Befund deutete auf funktionelle Aktivität von EpCAM hauptsächlich in Assoziation mit Claudin 7 hin. Weiterführende Untersuchungen bestätigten, dass mit EpCAM assoziiertes Claudin 7 die EpCAM-abhängige Zell-Zell-Adhäsion beeinträchtigt und stressinduzierte Tumorzellmigration aktiv unterstützt. Voraussetzung hierfür ist die Phosphorylierung von Claudin 7 und die Lokalisation des EpCAM-Claudin 7-Komplexes in tetraspaninreichen Membranmikrodomänen. Darüber hinaus konnte ich nachweisen, dass Claudin 7, durch Assoziation mit Presenilin-2 sowie Rekrutierung von EpCAM in tetraspaninreiche Membranmikrodomänen, wodurch EpCAM in die Nähe von TACE gelangt, die Spaltung von EpCAM durch Presenilin-2 und TACE unterstützt. Somit fördert Claudin 7 die Freisetzung der intrazellulären Domäne von EpCAM und infolgedessen die EpCAM-induzierte Tumorzellproliferation. Zuletzt konnte ich eine Rolle des EpCAM-Claudin 7-Komplexes in der Regulation von Anoikis sowie der Resistenz gegen medikamentös induzierte Apoptose nachweisen. Dies geschieht über eine Beeinflussung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Sowohl EpCAM als auch Claudin 7 fördern die Aktivität des

MAPK- und NF κ B-Signalwegs. Im Gegensatz dazu konnte ausschließlich für Claudin 7 eine Beeinflussung des PI3K/Akt-Signalwegs über die Ruhigstellung von Pten beobachtet werden. Dementsprechend sind ASML-Claudin 7^{kd} Zellen durch einen signifikanten Verlust der Apoptoseresistenz gekennzeichnet und sprechen mit einer Verdopplung der Überlebenszeit auf eine Cisplatinbehandlung an.

Zusammengefasst schließe ich aus den genannten Ergebnissen, dass, zumindest im ASML Tumormodell, nur Claudin 7-assoziiertes EpCAM zur Metastasierung beiträgt. Hingegen erfüllt Claudin 7 zusätzliche, EpCAM-unabhängige Funktionen beim Metastasierungsprozess. Wenn man voraussetzt, dass die Fähigkeit zur Metastasierung eines der zentralen Charakteristika von Tumorstammzellen darstellt, muss man davon ausgehen, dass Claudin 7, nicht aber EpCAM, ein funktionell relevanter Tumorstammzellmarker ist.

6 Literatur

- Adams, J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17:2481-95.
- Al Moustafa, A.E., M.A. Alaoui-Jamali, G. Batist, M. Hernandez-Perez, C. Serruya, L. Alpert, M.J. Black, R. Sladek, and W.D. Foulkes. 2002. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene.* 21:2634-40.
- Alexandre, M.D., B.G. Jeansonne, R.H. Renegar, R. Tatum, and Y.H. Chen. 2007. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl⁻ permeability. *Biochem Biophys Res Commun.* 357:87-91.
- Alexandre, M.D., Q. Lu, and Y.H. Chen. 2005. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci.* 118:2683-93.
- Alexiou, D., A.J. Karayiannakis, K.N. Syrigos, A. Zbar, E. Sekara, P. Michail, T. Rosenberg, and T. Diamantis. 2003. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol.* 98:478-85.
- Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3983-8.
- Allan, A.L., S.A. Vantyghem, A.B. Tuck, and A.F. Chambers. 2006. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26:87-98.
- Andratschke, M., F.J. Gildehaus, V. Johansson, B. Schmitt, B. Mack, G. Reisbach, S. Lang, H. Lindhofer, R. Zeidler, B. Wollenberg, and C.W. Luebbbers. 2007. Biodistribution and radioimmunotherapy of SCCHN in xenotransplanted SCID mice with a ¹³¹I-labelled anti-EpCAM monoclonal antibody. *Anticancer Res.* 27:431-6.
- Angelow, S., R. Ahlstrom, and A.S. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F867-76.
- Ara, T., Y. Nakamura, T. Egawa, T. Sugiyama, K. Abe, T. Kishimoto, Y. Matsui, and T. Nagasawa. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:5319-23.
- Armstrong, A., and S.L. Eck. 2003. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther.* 2:320-6.

- Askari, A.T., S. Unzek, Z.B. Popovic, C.K. Goldman, F. Forudi, M. Kiedrowski, A. Rovner, S.G. Ellis, J.D. Thomas, P.E. DiCorleto, E.J. Topol, and M.S. Penn. 2003. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 362:697-703.
- Baeuerle, P.A., and O. Gires. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*. 96:417-23.
- Balda, M.S., and K. Matter. 1998. Tight junctions. *J Cell Sci*. 111 (Pt 5):541-7.
- Balkwill, F., and L.M. Coussens. 2004. Cancer: an inflammatory link. *Nature*. 431:405-6.
- Balzar, M., I.H. Briaire-de Bruijn, H.A. Rees-Bakker, F.A. Prins, W. Helfrich, L. de Leij, G. Riethmuller, S. Alberti, S.O. Warnaar, G.J. Fleuren, and S.V. Litvinov. 2001. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol*. 21:2570-80.
- Balzar, M., M.J. Winter, C.J. de Boer, and S.V. Litvinov. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med*. 77:699-712.
- Bazzoni, G. 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 15:525-30.
- Benson, A.B., 3rd. 2007. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: one small step forward. *Jama*. 297:311-3.
- Bergsagel, P.L., C. Victor-Kobrin, L.A. Brents, J.F. Mushinski, and W.M. Kuehl. 1992. Genes expressed selectively in plasmacytomas: markers of differentiation and transformation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 182:223-8.
- Bird, M.I., M.R. Foster, R. Priest, and R. Malhotra. 1997. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans*. 25:1199-206.
- Blackman, B., T. Russell, S.K. Nordeen, D. Medina, and M.C. Neville. 2005. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res*. 7:R248-55.
- Boccaccio, C., and P.M. Comoglio. 2006. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer*. 6:637-45.
- Bohl, S.R., A. Pircher, and W. Hilbe. 2011. Cancer stem cells: characteristics and their potential role for new therapeutic strategies. *Onkologie*. 34:269-74.
- Borlak, J., T. Meier, R. Halter, R. Spanel, and K. Spanel-Borowski. 2005. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene*. 24:1809-19.
- Bremer, E., J. Kuijlen, D. Samplonius, H. Walczak, L. de Leij, and W. Helfrich. 2004. Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancreatic carcinoma-associated antigen EGP2. *Int J Cancer*. 109:281-90.

- Brodt, P., L. Fallavollita, R.S. Bresalier, S. Meterissian, C.R. Norton, and B.A. Wolitzky. 1997. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer*. 71:612-9.
- Brunner, A., M. Prelog, I. Verdorfer, A. Tzankov, G. Mikuz, and C. Ensinger. 2008. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol*. 61:307-10.
- Butler, T.P., and P.M. Gullino. 1975. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*. 35:512-6.
- Carpelan-Holmstrom, M., S. Nordling, E. Pukkala, R. Sankila, J. Luttges, G. Kloppel, and C. Haglund. 2005. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut*. 54:385-7.
- Carrozzino, F., P. Soulie, D. Huber, N. Mensi, L. Orci, A. Cano, E. Feraille, and R. Montesano. 2005. Inducible expression of Snail selectively increases paracellular ion permeability and differentially modulates tight junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 289:C1002-14.
- Chaffer, C.L., and R.A. Weinberg. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 331:1559-64.
- Chang, H.W., M. Aoki, D. Fruman, K.R. Auger, A. Bellacosa, P.N. Tsichlis, L.C. Cantley, T.M. Roberts, and P.K. Vogt. 1997. Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science*. 276:1848-50.
- Chaudry, M.A., K. Sales, P. Ruf, H. Lindhofer, and M.C. Winslet. 2007. EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer*. 96:1013-9.
- Choi, Y.D., K.S. Kim, S. Ryu, Y. Park, N.H. Cho, S.H. Rha, J.J. Jang, J.Y. Ro, S.W. Juhng, and C. Choi. 2007. Claudin-7 is highly expressed in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *J Korean Med Sci*. 22:305-10.
- Chong, J.M., and D.W. Speicher. 2001. Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem*. 276:5804-13.
- Cirulli, V., L. Crisa, G.M. Beattie, M.I. Mally, A.D. Lopez, A. Fannon, A. Ptasznik, L. Inverardi, C. Ricordi, T. Deerinck, M. Ellisman, R.A. Reisfeld, and A. Hayek. 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., K. Herrmann, S. Matzku, P. Moller, and M. Zoller. 1996. Developmentally regulated expression of metastasis-associated antigens in the rat. *Cell Growth Differ*. 7:663-78.

- Claas, C., S. Seiter, A. Claas, L. Savelyeva, M. Schwab, and M. Zoller. 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., J. Wahl, D.J. Orlicky, H. Karaduman, M. Schnolzer, T. Kempf, and M. Zoller. 2005. The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem J.* 389:99-110.
- Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl. 2006. Cancer stem cells-- perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66:9339-44.
- Clarke, M.F., and M. Fuller. 2006. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 124:1111-5.
- Colegio, O.R., C.M. Van Itallie, H.J. McCrea, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C142-7.
- Collins, A.T., P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, and N.J. Maitland. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65:10946-51.
- Dalerba, P., S.J. Dylla, I.K. Park, R. Liu, X. Wang, R.W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E.H. Huang, D.M. Simeone, A.A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli, and M.F. Clarke. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:10158-63.
- Darido, C., M. Buchert, J. Pannequin, P. Bastide, H. Zalzal, T. Mantamadiotis, J.F. Bourgaux, V. Garambois, P. Jay, P. Blache, D. Joubert, and F. Hollande. 2008. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 68:4258-68.
- Deshpande, A.J., and C. Buske. 2007. Knocking the Wnt out of the sails of leukemia stem cell development. *Cell Stem Cell.* 1:597-8.
- D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin. 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 280:26233-40.
- D'Souza, T., F.E. Indig, and P.J. Morin. 2007. Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res.* 313:3364-75.
- Endo, K., S. Kondo, J. Shackelford, T. Horikawa, N. Kitagawa, T. Yoshizaki, M. Furukawa, Y. Zen, and J.S. Pagano. 2009. Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration. *Oncogene.* 28:1725-35.

- Ensinger, C., R. Kremser, R. Prommegger, G. Spizzo, and K.W. Schmid. 2006. EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *J Immunother.* 29:569-73.
- Escudero-Esparza, A., W.G. Jiang, and T.A. Martin. 2011. The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci.* 16:1069-83.
- Feki, A., P. Berardi, G. Bellingan, A. Major, K.H. Krause, P. Petignat, R. Zehra, S. Pervaiz, and I. Irminger-Finger. 2009. Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model. *Crit Rev Oncol Hematol.* 72:1-9.
- Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, and P. Boyle. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 18:581-92.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3:453-8.
- Findley, M.K., and M. Koval. 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life.* 61:431-7.
- Fong, D., M. Steurer, P. Obrist, V. Barbieri, R. Margreiter, A. Amberger, K. Laimer, G. Gastl, A. Tzankov, and G. Spizzo. 2008. Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol.* 61:31-5.
- Forte, G., M. Minieri, P. Cossa, D. Antenucci, M. Sala, V. Gnocchi, R. Fiaccavento, F. Carotenuto, P. De Vito, P.M. Baldini, M. Prat, and P. Di Nardo. 2006. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells.* 24:23-33.
- French, A.D., J.L. Fiori, T.C. Camilli, P.D. Leotlela, M.P. O'Connell, B.P. Frank, S. Subaran, F.E. Indig, D.D. Taub, and A.T. Weeraratna. 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci.* 6:93-101.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita, and N. Sawada. 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem.* 54:933-44.
- Fujita, K., J. Katahira, Y. Horiguchi, N. Sonoda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2000. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* 476:258-61.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141:1539-50.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the

- mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-111.
- Gassmann, P., A. Enns, and J. Haier. 2004. Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie.* 27:577-82.
- Gastl, G., G. Spizzo, P. Obrist, M. Dunser, and G. Mikuz. 2000. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet.* 356:1981-2.
- Germain, E.C., T.M. Santos, and I. Rabinovitz. 2009. Phosphorylation of a novel site on the β 4 integrin at the trailing edge of migrating cells promotes hemidesmosome disassembly. *Mol Biol Cell.* 20:56-67.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B.E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81:1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1778:729-56.
- Gottlinger, H.G., I. Funke, J.P. Johnson, J.M. Gokel, and G. Riethmuller. 1986. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 38:47-53.
- Gow, A., C. Davies, C.M. Southwood, G. Frolenkov, M. Chrustowski, L. Ng, D. Yamauchi, D.C. Marcus, and B. Kachar. 2004. Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci.* 24:7051-62.
- Green, D.R., and J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-12.
- Guenther, R., V. Krenn, L. Morawietz, A. Dankof, I. Melcher, K.D. Schaser, H.U. Kasper, R.J. Kuban, U. Ungethum, and C. Sers. 2005. Giant cell tumors of the bone: molecular profiling and expression analysis of Ephrin A1 receptor, Claudin 7, CD52, FGFR3 and AMFR. *Pathol Res Pract.* 201:649-63.
- Guillemot, J.C., M. Naspetti, F. Malergue, P. Montcourrier, F. Galland, and P. Naquet. 2001. Ep-CAM transfection in thymic epithelial cell lines triggers the formation of dynamic actin-rich protrusions involved in the organization of epithelial cell layers. *Histochem Cell Biol.* 116:371-8.
- Gunthert, U., M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zoller, I. Hausmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, and P. Herrlich. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell.* 65:13-24.
- Hamazaki, Y., M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* 277:455-61.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:801-11.

- Herlevsen, M., D.S. Schmidt, K. Miyazaki, and M. Zoller. 2003. The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. *J Cell Sci.* 116:4373-90.
- Herlyn, M., Z. Steplewski, D. Herlyn, and H. Koprowski. 1979. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1438-42.
- Hiratsuka, S., A. Watanabe, H. Aburatani, and Y. Maru. 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 8:1369-75.
- Huang, D.C., and A. Strasser. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 103:839-42.
- Huang, E.H., M.J. Hynes, T. Zhang, C. Ginestier, G. Dontu, H. Appelman, J.Z. Fields, M.S. Wicha, and B.M. Boman. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69:3382-9.
- Hussain, S., A. Pluckthun, T.M. Allen, and U. Zangemeister-Wittke. 2006. Chemosensitization of carcinoma cells using epithelial cell adhesion molecule-targeted liposomal antisense against bcl-2/bcl-xL. *Mol Cancer Ther.* 5:3170-80.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2:277-88.
- Ikenouchi, J., M. Matsuda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 116:1959-67.
- Itoh, M., H. Sasaki, M. Furuse, H. Ozaki, T. Kita, and S. Tsukita. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol.* 154:491-7.
- Ivanov, A.I., A. Nusrat, and C.A. Parkos. 2004. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption. *Novartis Found Symp.* 263:115-24; discussion 124-32, 211-8.
- Iwai, K., H. Ishikura, M. Kaji, H. Sugiura, A. Ishizu, C. Takahashi, H. Kato, T. Tanabe, and T. Yoshiki. 1993. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer.* 54:972-7.
- Jakobisiak, M., W. Lasek, and J. Golab. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett.* 90:103-22.
- Jung, T., D. Castellana, P. Klingbeil, I. Cuesta Hernandez, M. Vitacolonna, D.J. Orlicky, S.R. Roffler, P. Brodt, and M. Zoller. 2009. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia.* 11:1093-105.

- Jung, T., W. Gross, and M. Zoller. 2011. CD44v6 Coordinates Tumor Matrix-triggered Motility and Apoptosis Resistance. *J Biol Chem.* 286:15862-74.
- Jung, Y., J. Wang, A. Schneider, Y.X. Sun, A.J. Koh-Paige, N.I. Osman, L.K. McCauley, and R.S. Taichman. 2006. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone.* 38:497-508.
- Kalluri, R. 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 119:1417-9.
- Kang, S.Y., O.J. Halvorsen, K. Gravidal, N. Bhattacharya, J.M. Lee, N.W. Liu, B.T. Johnston, A.B. Johnston, S.A. Haukaas, K. Aamodt, S. Yoo, L.A. Akslen, and R.S. Watnick. 2009. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12115-20.
- Kaplan, R.N., R.D. Riba, S. Zacharoulis, A.H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D.D. MacDonald, D.K. Jin, K. Shido, S.A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J.L. Port, N. Altorki, E.R. Port, D. Ruggero, S.V. Shmelkov, K.K. Jensen, S. Rafii, and D. Lyden. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 438:820-7.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141:52-67.
- Kitajiri, S., T. Miyamoto, A. Mineharu, N. Sonoda, K. Furuse, M. Hata, H. Sasaki, Y. Mori, T. Kubota, J. Ito, M. Furuse, and S. Tsukita. 2004. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci.* 117:5087-96.
- Klatte, T., A.J. Pantuck, J.W. Said, D.B. Seligson, N.P. Rao, J.C. LaRochelle, B. Shuch, A. Zisman, F.F. Kabbinavar, and A.S. Belldegrun. 2009. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15:1162-9.
- Klingbeil, P., R. Marhaba, T. Jung, R. Kirmse, T. Ludwig, and M. Zoller. 2009. CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance. *Mol Cancer Res.* 7:168-79.
- Kominsky, S.L., P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, A. Rein, G. Sauter, O.P. Kallioniemi, and S. Sukumar. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene.* 22:2021-33.

- Kramer, F., K. White, M. Kubbies, K. Swisshelm, and B.H. Weber. 2000. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet.* 107:249-56.
- Kucia, M., R. Reza, K. Miekus, J. Wanzek, W. Wojakowski, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, and M.Z. Ratajczak. 2005. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 23:879-94.
- Kuhn, S., M. Koch, T. Nubel, M. Ladwein, D. Antolovic, P. Klingbeil, D. Hildebrand, G. Moldenhauer, L. Langbein, W.W. Franke, J. Weitz, and M. Zoller. 2007. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res.* 5:553-67.
- Ladwein, M., U.F. Pape, D.S. Schmidt, M. Schnolzer, S. Fiedler, L. Langbein, W.W. Franke, G. Moldenhauer, and M. Zoller. 2005. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res.* 309:345-57.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lal-Nag, M., and P.J. Morin. 2009. The claudins. *Genome Biol.* 10:235.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 367:645-8.
- Le Naour, F., M. Andre, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006a. Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics.* 6:6447-54.
- Le Naour, F., M. Andre, C. Greco, M. Billard, B. Sordat, J.F. Emile, F. Lanza, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006b. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics.* 5:845-57.
- Le Naour, F., and M. Zoller. 2008. The tumor antigen EpCAM: tetraspanins and the tight junction protein claudin-7, new partners, new functions. *Front Biosci.* 13:5847-65.
- Li, C., D.G. Heidt, P. Dalerba, C.F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M.F. Clarke, and D.M. Simeone. 2007a. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67:1030-7.
- Li, F., B. Tiede, J. Massague, and Y. Kang. 2007b. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17:3-14.
- Lioni, M., P. Brafford, C. Andl, A. Rustgi, W. El-Deiry, M. Herlyn, and K.S. Smalley. 2007. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol.* 170:709-21.

- Liotta, L.A., M.G. Sidel, and J. Kleinerman. 1976. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res.* 36:889-94.
- Litvinov, S.V., H.A. Bakker, M.M. Gourevitch, M.P. Velders, and S.O. Warnaar. 1994a. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.* 2:417-28.
- Litvinov, S.V., M.P. Velders, H.A. Bakker, G.J. Fleuren, and S.O. Warnaar. 1994b. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 125:437-46.
- Lobo, N.A., Y. Shimono, D. Qian, and M.F. Clarke. 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:675-99.
- Lovicu, F.J., and J.W. McAvoy. 2001. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development.* 128:5075-84.
- Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, M. Benk, C. Kieu, P. Papior, P.A. Baeuerle, M. Munz, and O. Gires. 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 11:162-71.
- Marhaba, R., P. Klingbeil, T. Nuebel, I. Nazarenko, M.W. Buechler, and M. Zoeller. 2008. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med.* 8:784-804.
- Martin, S.S., and P. Leder. 2001. Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2. *Mol Cell Biol.* 21:6529-36.
- Martin, S.S., and K. Vuori. 2004. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta.* 1692:145-57.
- Matsuda, M., A. Kubo, M. Furuse, and S. Tsukita. 2004. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci.* 117:1247-57.
- Matzku, S., D. Komitowski, M. Mildenerger, and M. Zoller. 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., A. Wenzel, S. Liu, and M. Zoller. 1989. Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 49:1294-9.
- Matzku, S., H.O. Werling, C. Waller, B. Schmalenberger, and H. Zankl. 1985. Clonal analysis of diversity in the BSp73 rat tumor. *Invasion Metastasis.* 5:356-70.
- Mehlen, P., and A. Puisieux. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 6:449-58.
- Michl, P., C. Barth, M. Buchholz, M.M. Lerch, M. Rolke, K.H. Holzmann, A. Menke, H. Fensterer, K. Giehl, M. Lohr, G. Leder, T. Iwamura, G. Adler, and T.M. Gress.

2003. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 63:6265-71.
- Miranti, C.K., and J.S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* 4:E83-90.
- Mitic, L.L., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279:G250-4.
- Momburg, F., G. Moldenhauer, G.J. Hammerling, and P. Moller. 1987. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 47:2883-91.
- Morin, P.J. 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 65:9603-6.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:511-6.
- Mueller, M.M., and N.E. Fusenig. 2002. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation.* 70:486-97.
- Munz, M., P.A. Baeuerle, and O. Gires. 2009. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 69:5627-9.
- Munz, M., C. Kieu, B. Mack, B. Schmitt, R. Zeidler, and O. Gires. 2004. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene.* 23:5748-58.
- Munz, M., R. Zeidler, and O. Gires. 2005. The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Lett.* 225:151-7.
- Nelson, A.J., R.J. Dunn, R. Peach, A. Aruffo, and A.G. Farr. 1996. The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 26:401-8.
- Nelson, G.M., T.P. Padera, I. Garkavtsev, T. Shioda, and R.K. Jain. 2007. Differential gene expression of primary cultured lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Neoplasia.* 9:1038-45.
- Nichols, L.S., R. Ashfaq, and C.A. Iacobuzio-Donahue. 2004. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am J Clin Pathol.* 121:226-30.
- Nicolson, G.L. 1989. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr Opin Cell Biol.* 1:1009-19.

- Nubel, T., J. Preobraschenski, H. Tuncay, T. Weiss, S. Kuhn, M. Ladwein, L. Langbein, and M. Zoller. 2009. Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 7:285-99.
- Numahata, K., M. Satoh, K. Handa, S. Saito, C. Ohyama, A. Ito, T. Takahashi, S. Hoshi, S. Orikasa, and S.I. Hakomori. 2002. Sialosyl-Le(x) expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma. *Cancer.* 94:673-85.
- Nunbhakdi-Craig, V., T. Machleidt, E. Ogris, D. Bellotto, C.L. White, 3rd, and E. Sontag. 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol.* 158:967-78.
- O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 445:106-10.
- Ogura, E., H. Senzaki, K. Yoshizawa, K. Hioki, and A. Tsubura. 1998. Immunohistochemical localization of epithelial glycoprotein EGP-2 and carcinoembryonic antigen in normal colonic mucosa and colorectal tumors. *Anticancer Res.* 18:3669-75.
- Okamoto, R., K. Irie, A. Yamada, T. Katata, A. Fukuhara, and Y. Takai. 2005. Recruitment of E-cadherin associated with alpha- and beta-catenins and p120ctn to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells. *Genes Cells.* 10:435-45.
- Osada, M., E. Ito, H.A. Fermin, E. Vazquez-Cintron, T. Venkatesh, R.H. Friedel, and M. Pezzano. 2006. The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin Dev Immunol.* 13:299-319.
- Osta, W.A., Y. Chen, K. Mikhitarian, M. Mitas, M. Salem, Y.A. Hannun, D.J. Cole, and W.E. Gillanders. 2004. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64:5818-24.
- Ouban, A., and A.A. Ahmed. 2010. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol.* 25:83-90.
- Paget, S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 8:98-101.
- Papathanasiou, P., J.L. Attema, H. Karsunky, N. Hosen, Y. Sontani, G.F. Hoyne, R. Tunngley, S.T. Smale, and I.L. Weissman. 2009. Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem Cells.* 27:3082-92.
- Park, D., R. Karsen, U. Axcrone, T. Noren, and T. Sauer. 2007. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *Apmis.* 115:52-65.

- Pauli, B.U., H.G. Augustin-Voss, M.E. el-Sabban, R.C. Johnson, and D.A. Hammer. 1990. Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev.* 9:175-89.
- Polyak, K., and W.C. Hahn. 2006. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med.* 12:296-300.
- Prang, N., S. Preithner, K. Brischwein, P. Goster, A. Woppel, J. Muller, C. Steiger, M. Peters, P.A. Baeuerle, and A.J. da Silva. 2005. Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 92:342-9.
- Ralhan, R., J. Cao, T. Lim, C. Macmillan, J.L. Freeman, and P.G. Walfish. 2010. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer.* 10:331.
- Ratajczak, M.Z., E. Zuba-Surma, M. Kucia, R. Reca, W. Wojakowski, and J. Ratajczak. 2006. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* 20:1915-24.
- Rayet, B., and C. Gelinas. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 18:6938-47.
- Regenbrecht, C.R., H. Lehrach, and J. Adjaye. 2008. Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors. *Stem Cell Rev.* 4:319-28.
- Resnick, M.B., T. Konkin, J. Routhier, E. Sabo, and V.E. Pricolo. 2005. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 18:511-8.
- Reusch, U., M. Sundaram, P.A. Davol, S.D. Olson, J.B. Davis, K. Demel, J. Nissim, R. Rathore, P.Y. Liu, and L.G. Lum. 2006. Anti-CD3 x anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to EGFR-positive cancers in vitro and in an animal model. *Clin Cancer Res.* 12:183-90.
- Ricci-Vitiani, L., E. Fabrizi, E. Palio, and R. De Maria. 2009. Colon cancer stem cells. *J Mol Med.* 87:1097-104.
- Ricci-Vitiani, L., D.G. Lombardi, E. Pillozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445:111-5.
- Richter, C.E., E. Cocco, S. Bellone, D.A. Silasi, D. Ruttinger, M. Azodi, P.E. Schwartz, T.J. Rutherford, S. Pecorelli, and A.D. Santin. 2010. High-grade, chemotherapy-resistant ovarian carcinomas overexpress epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and are highly sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EpCAM antibody. *Am J Obstet Gynecol.* 203:582 e1-7.

- Riesenberg, R., A. Buchner, H. Pohla, and H. Lindhofer. 2001. Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem.* 49:911-7.
- Rosel, M., C. Claas, S. Seiter, M. Herlevsen, and M. Zoller. 1998. Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene.* 17:1989-2002.
- Roy, S.K., R.K. Srivastava, and S. Shankar. 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal.* 5:10.
- Ruf, P., and H. Lindhofer. 2001. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood.* 98:2526-34.
- Saif, M.W., I.A. Siddiqui, and M.A. Sohail. 2009. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Ann Saudi Med.* 29:369-77.
- Saini, V., and R.H. Shoemaker. 2010. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells. *Cancer Sci.* 101:16-21.
- Salnikov, A.V., A. Groth, A. Apel, G. Kallifatidis, B.M. Beckermann, A. Khamidjanov, E. Ryschich, M.W. Buchler, I. Herr, and G. Moldenhauer. 2009. Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma. *J Cell Mol Med.* 13:4023-33.
- Sasaki, H., C. Matsui, K. Furuse, Y. Mimori-Kiyosue, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3971-6.
- Sato, N., N. Fukushima, A. Maitra, C.A. Iacobuzio-Donahue, N.T. van Heek, J.L. Cameron, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and M. Goggins. 2004. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol.* 164:903-14.
- Sauer, T., M.K. Pedersen, K. Ebeltoft, and O. Naess. 2005. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology.* 16:193-8.
- Scheunemann, P., N.H. Stoecklein, A. Rehders, M. Bidde, S. Metz, M. Peiper, C.F. Eisenberger, J. Schulte Am Esch, W.T. Knoefel, and S.B. Hosch. 2008. Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg.* 393:359-65.
- Schmidt, M., D. Hasenclever, M. Schaeffer, D. Boehm, C. Cotarelo, E. Steiner, A. Lebrecht, W. Siggelkow, W. Weikel, I. Schiffer-Petry, S. Gebhard, H. Pilch, M. Gehrman, H.A. Lehr, H. Koelbl, J.G. Hengstler, and M. Schuler. 2008. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 14:5849-55.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1213-28.

- Schulze-Bergkamen, H., and P.H. Krammer. 2004. Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol.* 31:90-119.
- Scopelliti, A., P. Cammareri, V. Catalano, V. Saladino, M. Todaro, and G. Stassi. 2009. Therapeutic implications of Cancer Initiating Cells. *Expert Opin Biol Ther.* 9:1005-16.
- Seligson, D.B., A.J. Pantuck, X. Liu, Y. Huang, S. Horvath, M.H. Bui, K.R. Han, A.J. Correa, M. Eeva, S. Tze, A.S. Beldegrun, and R.A. Figlin. 2004. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10:2659-69.
- Selleri, C., P. Ragno, P. Ricci, V. Visconte, N. Scarpato, M.V. Carriero, B. Rotoli, G. Rossi, and N. Montuori. 2006. The metastasis-associated 67-kDa laminin receptor is involved in G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Blood.* 108:2476-84.
- Sjo, A., K.E. Magnusson, and K.H. Peterson. 2010. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells. *J Membr Biol.* 236:181-9.
- Spizzo, G., P. Went, S. Dirnhofer, P. Obrist, R. Simon, H. Spichtin, R. Maurer, U. Metzger, B. von Castelberg, R. Bart, S. Stopatschinskaya, O.R. Kochli, P. Haas, F. Mross, M. Zuber, H. Dietrich, S. Bischoff, M. Mirlacher, G. Sauter, and G. Gastl. 2004. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 86:207-13.
- Steinberg, S.F. 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88:1341-78.
- Stewart, M.H., S.C. Bendall, and M. Bhatia. 2008. Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency. *J Mol Med.* 86:875-86.
- Streuli, C.H., and A.P. Gilmore. 1999. Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4:183-91.
- Tandon, A.K., G.M. Clark, G.C. Chamness, and W.L. McGuire. 1990. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res.* 50:3317-21.
- Tarbe, N., S. Losch, H. Burtscher, M. Jarsch, and U.H. Weidle. 2002. Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. *Anticancer Res.* 22:2015-27.
- Telford, W.G., J. Bradford, W. Godfrey, R.W. Robey, and S.E. Bates. 2007. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells.* 25:1029-36.

- Thiel, K.W., and G. Carpenter. 2006. ErbB-4 and TNF-alpha converting enzyme localization to membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun.* 350:629-33.
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139:871-90.
- Trebak, M., G.E. Begg, J.M. Chong, E.V. Kanazireva, D. Herlyn, and D.W. Speicher. 2001. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 276:2299-309.
- Trzpis, M., P.M. McLaughlin, L.M. de Leij, and M.C. Harmsen. 2007. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* 171:386-95.
- Tsukita, S., and M. Furuse. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol.* 149:13-6.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:285-93.
- Tsukita, S., Y. Yamazaki, T. Katsuno, and A. Tamura. 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene.* 27:6930-8.
- Usami, Y., H. Chiba, F. Nakayama, J. Ueda, Y. Matsuda, N. Sawada, T. Komori, A. Ito, and H. Yokozaki. 2006. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol.* 37:569-77.
- van den Brink, G.R., and G.J. Offerhaus. 2007. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell.* 11:109-17.
- van der Gun, B.T., L.J. Melchers, M.H. Ruiters, L.F. de Leij, P.M. McLaughlin, and M.G. Rots. 2010. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis.* 31:1913-21.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 68:403-29.
- Van Itallie, C.M., T.M. Gambling, J.L. Carson, and J.M. Anderson. 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci.* 118:1427-36.
- Varga, M., P. Obrist, S. Schneeberger, G. Muhlmann, C. Felgel-Farnholz, D. Fong, M. Zitt, T. Brunhuber, G. Schafer, G. Gastl, and G. Spizzo. 2004. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res.* 10:3131-6.
- Vetrivel, K.S., H. Cheng, S.H. Kim, Y. Chen, N.Y. Barnes, A.T. Parent, S.S. Sisodia, and G. Thinakaran. 2005. Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem.* 280:25892-900.

- Visvader, J.E., and G.J. Lindeman. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 8:755-68.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15:2922-33.
- Wang, X.Q., Q. Yan, P. Sun, J.W. Liu, L. Go, S.M. McDaniel, and A.S. Paller. 2007. Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C- α activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. *Cancer Res*. 67:9986-95.
- Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 5:591-602.
- Weiss, L., G. Elkin, and E. Barbera-Guillem. 1993. The differential resistance of B16 wild-type and F10 cells to mechanical trauma in vitro. *Invasion Metastasis*. 13:92-101.
- Went, P., S. Dirnhofer, T. Salvisberg, M.B. Amin, S.D. Lim, P.A. Diener, and H. Moch. 2005. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 29:83-8.
- Went, P.T., A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter, and S. Dirnhofer. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 35:122-8.
- Werbowski-Ogilvie, T.E., and M. Bhatia. 2008. Pluripotent human stem cell lines: what we can learn about cancer initiation. *Trends Mol Med*. 14:323-32.
- Wilailak, S., V. Linasmita, and S. Srivannaboon. 1999. Malignant ascites in female patients: a seven-year review. *J Med Assoc Thai*. 82:15-9.
- Winter, M.J., B. Nagelkerken, A.E. Mertens, H.A. Rees-Bakker, I.H. Briaire-de Bruijn, and S.V. Litvinov. 2003. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*. 285:50-8.
- Wurfel, J., M. Rosel, S. Seiter, C. Claas, M. Herlevsen, R. Weth, and M. Zoller. 1999. Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314. *Oncogene*. 18:2323-34.
- Xie, X., C.Y. Wang, Y.X. Cao, W. Wang, R. Zhuang, L.H. Chen, N.N. Dang, L. Fang, and B.Q. Jin. 2005. Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World J Gastroenterol*. 11:344-7.
- Yang, J., and R.A. Weinberg. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 14:818-29.
- Yang, Y.M., and J.W. Chang. 2008. Current status and issues in cancer stem cell study. *Cancer Invest*. 26:741-55.
- Yeaman, C., K.K. Grindstaff, M.D. Hansen, and W.J. Nelson. 1999. Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr Biol*. 9:R515-7.

-
- Yilmaz, M., G. Christofori, and F. Lehenbre. 2007. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med.* 13:535-41.
- Yilmaz, O.H., R. Valdez, B.K. Theisen, W. Guo, D.O. Ferguson, H. Wu, and S.J. Morrison. 2006. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature.* 441:475-82.
- Yin, T., and L. Li. 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 116:1195-201.
- Yovchev, M.I., P.N. Grozdanov, B. Joseph, S. Gupta, and M.D. Dabeva. 2007. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology.* 45:139-49.
- Zamzami, N., and G. Kroemer. 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:67-71.
- Zeidler, R., J. Mysliwietz, M. Csanady, A. Walz, I. Ziegler, B. Schmitt, B. Wollenberg, and H. Lindhofer. 2000. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer.* 83:261-6.
- Zhang, S., and D. Yu. 2010. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res.* 16:4325-30.
- Zhivotovsky, B., and G. Kroemer. 2004. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:752-62.
- Zoller, M. 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer.* 11:254-67.
- Zoller, M., S. Matzku, and K. Goerttler. 1978. High incidence of spontaneous transplantable tumours in BDx rats. *Br J Cancer.* 37:61-6.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Margot Zöller, für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen, die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie die ständige Bereitschaft zu fachlicher Unterstützung, fachlichen Beratungen und Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Doris Wedlich danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Uwe Galli, Herrn Dr. Theron S. Johnson und Herrn Dr. Tobias Nübel danke ich für ihre ständige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft sowie die Anregungen und Diskussionen zur Unterstützung meiner Arbeit.

Den Doktoren, Doktoranden, Diplomanten und Praktikanten der Arbeitsgruppe Prof. Zöller danke ich für die angenehme Atmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Bei allen technischen Assistenten/innen möchte ich mich für die Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Frau Stéphanie Lülldorf danke ich für Verständnis, Geduld, Orientierung und Liebe.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Publikationsliste

Publikationen:

Torka, R., **Thuma, F.**, Herzog, V. and G. Kirfel: ROCK signalling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumour cells. *Exp Cell Res.* 2006 Nov 15;312(19):3857-71.

Thuma, F. and Zöller, M.: Metastasis-promoting activity of EpCAM depends on claudin-7 association (manuscript in preparation)

Abstracts:

Florian Thuma, Theron S. Johnson, Uwe Galli, Tobias Nübel and Margot Zöller (2009) Effects of Claudin-7 on EpCAM Mediated Signalling and Apoptosis, XIV. Graduate Seminar, PhD-Retreat (Weil der Stadt, 19. – 21. July 2009).

Florian Thuma, Theron S. Johnson, Uwe Galli and Margot Zöller (2010) Effects Of Claudin 7 On Cancer Initiating Cell Marker EpCAM Mediated Signalling And Apoptosis, 6th International Heinrich F. C. Behr-Symposium (Heidelberg, 3. – 5. Oktober 2010)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Florian Thuma
Geburtsdatum: 17.02.1980
Geburtsort: Bonn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1986 – 1990: Katholische Grundschule Meckenheim-Merl
1990 – 1999: Vinzenz-Pallotti-Kolleg Rheinbach, Gymnasium

Wehrdienst:

1999 – 2001: SAZ II, PzGrenBtl 342, Koblenz

Studium:

2001 – 2006: Diplomstudium der Biologie an der Universität Bonn

Promotion:

2007 – 2011: Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und am Universitätsklinikum Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Margot Zöller

Ehrenwörtliche Erklärung

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

EpCAM und Claudin 7: Konzertierte Aktion zweier Adhäsionsmoleküle fördert Metastasierung

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

Heidelberg, den 24.05.2011

Florian Thuma

