

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Identifikation und Validierung EpCAM-
assoziierter Interaktionspartner:
Das EpCAM-Signalosom

Dorothea Maetzel

aus

Bonn

München, 2008

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Olivier Gires betreut und durch Herrn Prof. Dr. Dirk Eick vor der Fakultät für Biologie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20. März 2008

.....
(Dorothea Maetzel)

Dissertation eingereicht am 20. März 2008

1. Gutachter Herr Prof. Dr. Dirk Eick

2. Gutachter Herr Prof. Dr. Michael Ackmann

Mündliche Prüfung am 16. Juni 2008

Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden publiziert bzw. werden zur Publikation eingereicht:

Gires O., **Maetzel D.**, Munz M., (2007) Epithelial Cell Adhesion Molecule EpCAM: Past, Present, Future; Nova Science Publishers Inc., ISBN:978-1-60021-577-3

Maetzel, D., Munz, M., Mack, B., Went, P., Benk, M., Baeuerle, P. and Gires, O. (2008) Nuclear Signalling by Tumour- and Stem Cell-Associated Antigen EpCAM (CD326), (*Manuscript submitted*)

Patent:

Daten aus dieser Arbeit sind Bestandteil einer beim Europäischen Patentamt eingereichten Patentschrift:

N°/patent N° 06011852.8, date of filing 08/06/2006-EPA

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 KARZINOGENESE	2
1.1.1 <i>Proto-Onkogene</i>	4
1.1.2 <i>Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgene</i>	5
1.1.3 <i>Die DNA-Reparatur-Gene</i>	7
1.1.4 <i>Onkogene Membranproteine</i>	8
1.2 DAS HUMANE EPITHELIALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL EPCAM	8
1.2.1 <i>Das epcam-Gen und die GA-733 Familie</i>	9
1.2.2 <i>Das EpCAM-Protein</i>	10
1.2.3 <i>Das EpCAM-Expressionsmuster</i>	13
1.2.4 <i>Therapeutische Verwendung des EpCAM Moleküls</i>	15
1.3 ZIELSETZUNG	17
2. MATERIAL	18
2.1 ANTIKÖRPER UND DETEKTIONSSYSTEME	18
2.2 BAKTERIEN	19
2.3 CHEMIKALIEN, GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	19
2.3.1 <i>Chemikalien und Kits</i>	19
2.3.2 <i>Dienstleistungen</i>	21
2.3.3 <i>Geräte</i>	22
2.3.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	23
2.4 OLIGONUKLEOTIDE	24
2.4.1 <i>DNA-Sonden</i>	24
2.4.2 <i>Primer</i>	24
2.4.3 <i>siRNAs</i>	25
2.5 PLASMIDE	25
2.6 ZELLINIEN	26
3. METHODEN	28
3.1 ZELLKULTUR	28
3.1.1 <i>Aufbewahrung und Kultivierung von permanenten Zelllinien</i>	28
3.1.2 <i>Verwendung von Protease- und Proteasom-inhibitoren</i>	29
3.1.3 <i>Stimulation des Signalweges durch Verwendung von rekombinantem EpEX</i>	29
3.1.4 <i>Bestimmung der Zellzahlen</i>	29
3.1.5 <i>Generierung von Zelllysaten</i>	29
3.1.6 <i>Generierung von Zellkulturüberständen</i>	30
3.2 BAKTERIENKULTUR	30
3.2.1 <i>Vermehrung und Aufbewahrung</i>	30
3.2.2 <i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	31
3.2.3 <i>Transformation von E.coli</i>	31

3.3	HEFEKULTUR	31
3.3.1	<i>Vermehrung und Aufbewahrung transformierter Hefeklone</i>	31
3.3.2	<i>Generierung von Lysaten</i>	32
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32
3.4.1	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	32
3.4.2	<i>Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)</i>	33
3.4.3	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen</i>	33
3.5	IN VITRO TRANSKRIPTIONS- UND TRANSLATIONSSYSTEM ZUM NACHWEIS DIREKTER PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN	34
3.5.1	<i>Transkription</i>	34
3.5.2	<i>Translation</i>	34
3.5.3	<i>Protein-Protein-Bindungsanalyse</i>	34
3.6	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN	35
3.7	FACS-ANALYSE	35
3.7.1	<i>Bestimmung der Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien</i>	35
3.7.2	<i>Bestimmung der Oberflächenexpression eines Proteins</i>	35
3.7.3	<i>Propidiumiodid-(PI)-Analyse</i>	36
3.8	KO-IMMUNPRÄZIPITATION	36
3.9	WESTERN-BLOT	37
3.10	ZWEIDIMENSIONALE NATIVE GELELEKTROPHORESE	37
3.10.1	<i>1. Dimension: Natives Gradientengel</i>	37
3.10.2	<i>2. Dimension: Tris-Tricin-Gelelektrophorese</i>	38
3.11	„ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY“ (EMSA)	38
3.11.1	<i>Band-Shift-Assay unter Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden</i>	38
3.11.2	<i>Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie</i>	39
3.11.3	<i>Verwendung biotinmarkierter DNA-Sonden</i>	39
3.12	LUZIFERASE-ASSAY	40
3.13	IMMUNHISTOCHEMISCHE SCHNITTFÄRBUNG	40
3.14	IMMUNZYTOCHEMIE	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1	REGULIERTE PROTEOLYTISCHE SPALTUNG VON EpCAM	42
4.1.1	<i>Identifizierung beteiligter Proteasen</i>	48
4.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG VON EpCAM DURCH NOTCH-ASSOZIIERTE PROTEASEN	49
4.2.1	<i>Die Inhibition von TACE und Presenilin beeinflusst die proteolytische Spaltung von EpCAM</i>	49
4.2.2	<i>Die Inhibition von TACE und Presenilin beeinflusst die EpCAM-vermittelte Genexpression und Zellproliferation</i>	51
4.3	EpIC TRANSLOZIERT IN DEN ZELLKERN	54
4.3.1	<i>Unterschiede der EpIC-Lokalisation in gesundem Epithel und primären Karzinomen</i>	57
4.3.2	<i>EpIC ist für EpCAM-vermittelte onkogene Effekte essentiell und ausreichend</i>	58
4.4	IDENTIFIZIERUNG UND VALIDIERUNG WEITERER POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON EpIC	59

4.4.1	<i>Isolierung und Identifizierung potentieller EpIC-Interaktionspartner in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten</i>	60
4.4.2	<i>Validierung der potentiellen Interaktionspartner FHL2, CGI-128, Galectin-1 und Syntrophin-1</i> ..	61
4.4.3	<i>EpCAM und FHL2 interagieren direkt miteinander</i>	63
4.4.4	<i>EpCAM, FHL2 und β-Catenin bilden einen trimeren Komplex</i>	64
4.4.5	<i>Expressionsprofil von EpIC, FHL2 und β-Catenin im HEK293-Zellsystem und in Karzinomzelllinien</i>	66
4.5	FUNKTIONELLE ANALYSE DER EPCAM-FHL2 INTERAKTION.....	69
4.5.1	<i>Auswirkungen der Repression von FHL2 und EpCAM auf die Zellproliferation und Aktivierung von EpCAM-Zielgenen im HEK293-Zellsystem</i>	69
4.6	EPIC, FHL2, β -CATENIN UND LEF-1 BILDEN EINEN NUKLEÄREN KOMPLEX.....	71
4.6.1	<i>Analyse von EpIC-Kernkomplexen aus Karzinomzelllinien in der nativen zweidimensionalen Gelelektrophorese</i>	72
4.6.2	<i>Der EpIC spezifische Kernkomplex bindet Lef-1-DNA-Konsensussequenzen</i>	74
4.6.3	<i>Nachweis der funktionellen Relevanz der EpCAM-Expression für die Bindung Lef-1-spezifischer DNA-Sequenzen</i>	77
4.7	EPEx IST EIN LÖSLICHER, EXTRAZELLULÄRER LIGAND FÜR INTAKTE EPCAM MOLEKÜLE	78
4.7.1	<i>EpExrec induziert die Spaltung von EpCAM-YFP nach ektopischer Expression in HEK293 Zellen</i>	78
4.7.2	<i>EpEX induziert die Spaltung von endogenem EpCAM in FaDu-Karzinomzellen</i>	80
4.8	ABHÄNGIGKEIT DER ZELLPROLIFERATION UND DER AKTIVIERUNG DES EPCAM-SIGNALWEGES VON DER ZELLDICHTE	80
5.	DISKUSSION	83
5.1	EPCAM WIRD DURCH REGULIERTE INTRAMEMBRANPROTEOLYSE (RIP) AKTIVIERT	84
5.1.1	<i>Die Spaltung durch TACE führt zur Freisetzung des agonistischen EpCAM-Liganden EpEX</i>	85
5.1.2	<i>Die Spaltung durch Presenilin führt zur Bildung der funktionellen, Signal-vermittelnden Domäne EpIC</i>	87
5.2	PARALLELEN IN DER PROZESSIERUNG, STRUKTUR UND FUNKTION DER EPCAM UND NOTCH-MOLEKÜLE	90
5.3	UNTERSCHIEDE IN DER LOKALISATION VON EPIC IM GESUNDEN UND KARZINOMGEWEBE.....	91
5.4	VALIDIERUNG VON POTENTIELLEN EPCAM-INTERAKTIONSPARTNERN.....	93
5.4.1	<i>FHL2 ist ein direkter Bindungspartner und spielt eine Schlüsselrolle bei der EpCAM-Signaltransduktion</i>	93
5.5	DIE NUKLEÄRE TRANSLOKATION VON EPIC FÜHRT ZUR BINDUNG AN TCF/LEF-SPEZIFISCHE DNA-SEQUENZEN	95
5.6	THERAPEUTISCHE NUTZUNG VON PROTEASEINHIBITOREN ZUR HEMMUNG DER EPCAM-SIGNALTRANSDUKTION	99
5.7	AUSBLICK.....	102
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	104
7.	LITERATURVERZEICHNIS	106

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
9. DANKSAGUNG	125
10. LEBENSLAUF	126

1. Einleitung

Hippokrates (460-370 v.Chr.) war der Erste, der den Begriff *carcinus* (griechisch - Krebs) in Zusammenhang mit einer humanen Erkrankung verwendete. Grund dieser Namensgebung war für ihn die Ähnlichkeit der Struktur von Brustgeschwüren mit denen des Krustentieres (Abb. 1.1). Hippokrates differenzierte bereits damals zwischen verschiedenen Arten von Krebsgeschwüren: Den benignen Tumor nannte er *oncos* (griechisch - anschwellend), den malignen *carcinus* (griechisch - Krebs).

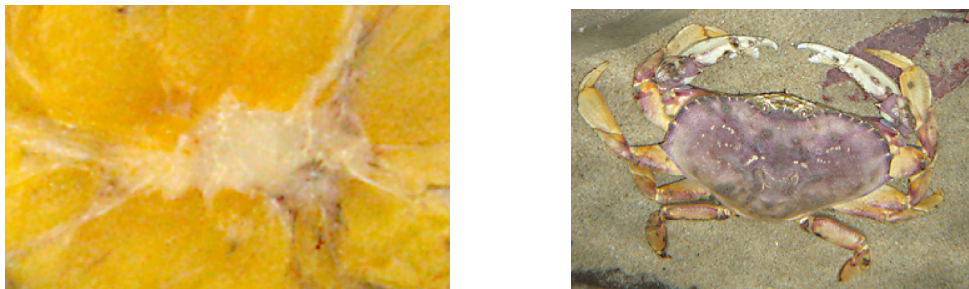


Abbildung 1.1: Die Namensgebung der humanen Krebserkrankung kam auf Grund struktureller Ähnlichkeit des Brustkrebsgewebes (links) mit dem äußeren Erscheinungsbild eines Krebses (rechts) zustande.

Unter der allgemeinen Bezeichnung Krebs werden heute über 100 verschiedene Erkrankungen zusammengefasst. Diese Krankheiten haben gemein, dass sie unabhängig von ihrem Ursprung jeden Teil des Körpers (Invasion, Metastasierung) befallen können. Die Metastasierung ist einer der Hauptgründe für den tödlichen Verlauf von Krebserkrankungen.

Krebs ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Nach Schätzungen der WHO ist davon auszugehen, dass weit über 22 Millionen Menschen bereits an Krebs erkrankt sind. Jährlich werden mehr als 11 Millionen neue Fälle diagnostiziert. 2005 waren weltweit insgesamt 13% aller Todesfälle (7,6 Millionen Tote) auf eine Krebserkrankung zurückzuführen. Es wird erwartet, dass die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen und Todesfälle in den nächsten Jahren stetig ansteigt (<http://www.who.int/cancer/en/>).

Mit knapp 30% ist Krebs in den entwickelten Ländern nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Das zunehmende Alter und die damit verbundene längere Exposition gegenüber Karzinogenen (physikalische, chemische, biologische) spielen dabei eine wichtige Rolle. Es wird davon ausgegangen, dass rund 40% aller Krebserkrankungen durch präventive Maßnahmen, wie das Vermeiden des Tabakkonsums, eine gesunde Ernährung und ausreichende körperlicher Aktivität, verhindert werden können.

Die Behandlung von Krebs gestaltet sich auf Grund der hohen Komplexität und einer Vielzahl molekularer Ursachen dieser Erkrankung sehr schwierig. Grundvoraussetzung für die Senkung der Mortalitätsrate bei einer Erkrankung ist neben einer verbesserten Diagnose vor allem die Neu- und Weiterentwicklung spezifischer Therapien. Dabei ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die den unterschiedlichen Krebserkrankungen zu Grunde liegen, von essentieller Bedeutung.

1.1 Karzinogenese

Als Karzinogenese wird der komplexe, mehrstufige Prozess bezeichnet, der zur Entwicklung von Tumoren epithelialen Ursprungs führt. Die molekularen Mechanismen, die diesem Vorgang zu Grunde liegen und ihr Zusammenwirken, sind trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig verstanden (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die einzelnen Stufen der Karzinogenese reflektieren die progressive Transformation einer gesunden humanen Zelle zu einer hoch malignen Tumorzelle (Hanahan und Weinberg, 2000; Renan, 1993). Ein charakteristisches Merkmal dieses Prozesses ist die sequenzielle Anhäufung von Mutationen und chromosomalen Aberrationen, die eine Veränderung der Proteinausstattung (das Proteom) der betroffenen Zellen zur Folge haben (Bishop, 1991; Vogelstein und Kinzler, 2004). Die Akkumulation genetischer Veränderungen verursacht eine Deregulation komplexer Signalwege, welche u.a. den Zellmetabolismus, den Zelltod und die Zellproliferation steuern (Vogelstein und Kinzler, 2004). Durch die permanente Aktivität mitogener Signale und den Ausfall regulatorischer Mechanismen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose, kommt es zu einem unkontrollierten zellulären Wachstum. Dies ist ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen. Formal ist das Modell der Tumorentstehung analog zur Darwinschen Evolutionstheorie. Gesunde humane Zellen erhalten durch genetische oder epigenetische Modifikationen einen Wachstumsvorteil, der zur Umwandlung in eine Tumorzelle führt (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Die Endstufe dieses Prozesses wird als Krebs bezeichnet. Es muss dennoch festgehalten werden, dass die große Mehrheit der täglich entstehenden Mutationen in der chromosomalen DNA erkannt und beseitigt werden, zum programmierten Zelltod führen und/oder keinen Wachstumsvorteil bieten, sondern viel mehr nachteilig sind.

Nach heutigem Wissen werden sechs essentielle Veränderungen der Zellphysiologie postuliert, die für die Initiierung und Aufrechterhaltung eines malignen Wachstums verantwortlich sind: (1) Induktion autokriner Wachstumssignale, (2) Apoptose-Resistenz, (3)

Sensitivitätsverlust gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (4) verstärkte Angiogenese/Neoangiogenese, (5) Gewebeinvasion/Metastasierung und (6) ein uneingeschränktes Replikationspotential (Hanahan und Weinberg, 2000).

Im Bezug auf diese physiologischen Prozesse spielen zwei Klassen von Genen eine besondere Rolle (Vogelstein und Kinzler, 2004; Vogelstein et al., 2000):

1. Proto-Onkogene
2. Tumor-Suppressor-Gene

Mechanismen, die der Transformation einer gesunden Zelle zu Grunde liegen, werden an bereits differenzierten, meist transformierten Zellen untersucht. In den letzten Jahren gewinnt jedoch die Hypothese, dass die Bildung der Tumore von einer Subpopulation spezialisierter Zellen aus der Tumormasse, den Krebsstamm- oder Progenitorzellen, ausgeht, immer mehr an Bedeutung. So konnte bereits Ende der 90er Jahre bei Leukämien und kürzlich für verschiedene solide Tumore (Brust-, Kolon-, Prostata-, Pankreas- und Kopf-Halskarzinome) gezeigt werden, dass die Fähigkeit Karzinome *in vivo* zu etablieren von einer solchen Subpopulation ausgeht (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007a; Juang et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Richardson et al., 2004; Wang und Dick, 2005). Krebsstammzellen solider Tumore zeichnen sich durch die Expression spezifischer Marker (CD44, CD133, CD166, BMI-1, EpCAM) und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung, *ergo* Merkmale embryonaler Stammzellen, aus (Dalerba et al., 2007b; Reya et al., 2001; Richardson et al., 2004). Man geht davon aus, dass es auch in diesen Zellen zu Mutationen in den zwei oben genannten Genklassen kommt und somit zur malignen Transformation. Mutationen in bereits differenzierten Zellen, die auf Grund dessen einen stammzellähnlichen Phänotyp annehmen, stehen ebenfalls zur Diskussion (Brabletz et al., 2005). Theodor Boveri postulierte bereits 1912 in einer wegweisenden SCIENCE-Publikation, dass die meisten Tumore klonalen Ursprungs sind (Boveri, 1912). Diese klonale Theorie ist im Einklang mit der Auffassung von Krebsstammzellen als Initiator von Tumoren, da Stammzellen in der Lage sind phänotypisch verschiedene Vorläuferzellen zu bilden und somit die Heterogenität von Tumoren bedingen können. Analog zu normalen Stammzellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es in Tumorstammzellen zu epigenetischen Veränderungen kommt (Vogelstein und Kinzler, 2004; Widschwendter et al., 2007), welche beispielsweise durch verstärkte DNA-Methylierung zu einer malignen Veränderung führen (Widschwendter et al., 2007). Diese initialen Beobachtungen bedürfen selbstverständlich noch weiterer Untersuchungen, um verifiziert zu werden.

Ein beeindruckendes Merkmal von Krebsstammzellen ist die hohe Effizienz der Tumorbildung *in vivo*. Im Falle von CD133 als Marker wurde experimentell bewiesen, dass 50.000 CD133-negative Zellen in einem Maus Xenotransplantationsmodell nicht tumorigen sind, während 200 CD133-positive Zellen ausreichen, um einen Tumor zu bilden (Beier et al., 2007).

Im Zusammenhang mit Stammzellen, Tumorstammzellen und Tumorentwicklung spielen β -Catenin-APC- ('adenomatosis polyopsis coli') vermittelte Signale und der WNT-Signalweg eine besondere Rolle. Der WNT-Signalweg ist in Stammzellen aktiv und führt durch die Aktivierung von β -Catenin über TCF/Lef zur Induktion spezifischer Zielgene. Dies hat wiederum eine Stimulation der Proliferation und eine Inhibition der Apoptose dieser Zellen zur Folge (Hoppler und Kavanagh, 2007). In differenzierten Zellen ist der WNT-Signalweg inaktiv. In diesen Zellen bindet APC das β -Catenin, welches durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert und somit zur Degradation durch das Proteasom markiert ist. Des Weiteren kommt es zu einer Wechselwirkung von β -Catenin mit Cadherinen, die eine zentrale Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen und der Migration von Zellen spielen. Mutationen in APC und β -Catenin, die in Tumoren häufig auftreten, führen zur Aufhebung der beschriebenen Regulation und somit zur unkontrollierten Proliferation und Inhibition der Apoptose der Tumorzelle (Hoppler und Kavanagh, 2007; Katoh und Katoh, 2007).

1.1.1 Proto-Onkogene

Proto-Onkogene sind an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. Die Umwandlung von Proto-Onkogenen in genuine Onkogene, *i.e.* eine Deregulation ihrer Funktion, ist eine treibende Kraft der Karzinogenese. Ursachen für diesen molekularen Schalter können Genmutationen, Genamplifikationen, chromosomale Translokationen oder retrovirale Insertionen sein (Yamamoto, 1993) (Temin, 1990). Diese können das Gen selbst und dessen regulatorische Signalwege betreffen. Es kommt zu einer veränderten Genregulation und zu einer erhöhten Aktivität der Genprodukte. Damit verbunden ist häufig eine unkontrollierte Zellproliferation, Dysregulation des Zellwachstums und Dedifferenzierung. Diese Mutationen bezeichnet man als „*gain of function mutation*“. Beispiele für Proto-Onkogene sind Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [z.B. PDGF-Rezeptor, c-erb-B (EGF-Rezeptor), c-erb-B2 (Her2/c-neu)], Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Myc, Fos/Jun, NF- κ B), nukleare Rezeptoren (Thyroid- und Steroid-Hormon-Rezeptoren), intrazelluläre Signalüberträger (Src, Ras, Raf, STAT1 und 3), Zellzyklusregulatoren (Zykline)

und Gene, die an der Apoptose beteiligt sind (Vogelstein und Kinzler, 2004; Vogelstein et al., 2000).

Anhand des Beispiels des Proto-Onkogens *c-myc* wird deutlich, wie komplex die Auswirkungen einer funktionellen Änderung des Moleküls in Bezug auf die Transformation sein können. Der Transkriptionsfaktor c-Myc nimmt eine zentrale Rolle bei der Zellzyklus- und Wachstumsregulation ein (Adhikary und Eilers, 2005; Amati et al., 1998; Dang, 1999) und ist in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert (de la Guardia et al., 2001; Liao und Dickson, 2000). Die erhöhte Expression von c-Myc hat Auswirkungen auf viele Aspekte der Tumorzellbiologie, unter anderem auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Metastasierung und die genomische Instabilität. Das *c-myc* Gen kann durch unterschiedliche direkte und indirekte Ereignisse zum Onkogen werden: (i) Punktmutationen, die dazu führen, dass post-translationale Modifikationen fehlschlagen (Bahram et al., 2000; Foley und Eisenman, 1999), (ii) chromosomale Translokation von Chromosom 8 auf Chromosom 14 in die direkte Nachbarschaft des Transkriptionsverstärkers des Gens der schweren Immunglobulinkette, die eine verstärkte Transkription in B-Zellen zur Folge hat, oder (iii) durch Deregulation von Molekülen der Signalwege, die wiederum für die Regulation von c-Myc verantwortlich sind. Ein prominentes Beispiel für eine funktionelle Deregulation eines c-Myc regulierenden Proteins ist der EGF-Rezeptor (Di Fiore et al., 1987; Vogelstein und Kinzler, 2004). Durch Mutation des EGF-Rezeptors, die eine Überexpression des Rezeptors oder eine ligandenunabhängige Dimerisierung zur Folge haben kann, kommt es zur konstitutiven Aktivierung und dadurch zu einer verstärkten c-Myc-Expression (Coughlin et al., 1985). Weitere Signalwege, die an der *c-myc* Aktivierung beteiligt sind und in Tumoren häufig dereguliert sind, umfassen den Wnt-, Ras/Raf/MAP-Kinase-, Jak/Stat- und NFκB-Signalweg, sowie den des transformierenden Wachstumsfaktor-β (Clevers, 2004; Henriksson und Lüscher, 1996; Liu und Levens, 2006).

1.1.2 Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgene

Tumorsuppressorgene haben wie Protoonkogene regulatorische Funktionen. Es handelt sich hierbei um Transkriptionsfaktoren oder um Proteine, mit Funktion bei der Zellzyklusregulation. Eine Deletion oder Mutation führt zu einem Funktionsverlust des Tumorsuppressors. Voraussetzung für den vollständigen Aktivitätsverlust ist, dass die entsprechenden Gene auf beiden Chromosomen inaktiviert werden (Haber und Harlow, 1997). In manchen Fällen kann jedoch schon die Mutation eines Allels zu einer starken

Einschränkung der Funktion führen. Man bezeichnet diese Art der Mutationen auch als „*loss of function mutation*“ (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Inaktivierung dieser Genprodukte hat einen Verlust der transkriptionellen Regulation der Zielgene und meist eine Veränderung der Regulation des Phasenübergangs im Zellzyklus und des Zellwachstums zur Folge. Die bekanntesten Beispiele für Tumorsuppressorproteine sind das Retinoblastomprotein (Rb) und p53 (Chen et al., 1990).

Das Rb-Protein ist ein transkriptioneller Ko-Regulator des Zellzyklus, welcher durch den Grad der Phosphorylierung reguliert wird. Die Phosphorylierung erfolgt durch Komplexe aus Zyklinen und zyklinabhängige Kinasen (CdKs), über die Rb mit der Regulation des Zellzyklus verbunden ist. Hypophosphoryliertes Rb bildet mit dem Transkriptionsregulator E2F und der Histondeacetylase (HDAC) einen Komplex (Ferreira et al., 2001). Durch diese Wechselwirkung wird die E2F-vermittelte Aktivierung von Genen, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und die Proliferation der Zellen essentiell sind, gehemmt. Die Hyperphosphorylierung von Rb durch Zyklin E/ CDK2-Komplex, führt zur Freisetzung von E2F und somit zur Aktivierung spezifischer Zielgene, wie beispielsweise *Zyklin A/E*, *E2F* und *c-myc* (Cooper und Whyte, 1989). Die Aktivierung des *Zyklin E* Gens hat zwei positive Rückkopplungseffekte zur Folge: Zum einen kommt es zu einer verstärkten Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins und somit zu dessen Inaktivierung, zum anderen hat die erhöhte Zyklin E-Bildung die Phosphorylierung von p27^{Kip1}, einem Inhibitor des Zyklin E/CDK-Komplexes zur Folge. Durch die Phosphorylierung von p27^{Kip1} wird eine Ubiquitinierung und anschließende Degradation des Inhibitors und folglich eine Erhöhung der Zyklin E/CDK-Aktivität ermöglicht (Herrera et al., 1996; Weinberg, 1995). Die Inaktivierung des Rb-Proteins durch Mutation im *Rb*-Gen, Deregulation der Rb-Phosphorylierung oder die Bindung des Rb-Proteins durch virale Oncoproteine (z.B. humanes Papillomavirus (HPV) E7-Protein) führt zur dauerhaften Aktivierung von E2F (Weinberg, 1995). Als Folge werden die DNA-Replikation und die Zellproliferation kontinuierlich aktiviert (DePinho, 1998; Matsushime et al., 1994). Die Inaktivierung des Rb-Proteins führt zu unkontrollierten Phasen-Übergängen im Zellzyklus und einer erhöhten Proliferation (Hanahan und Weinberg, 2000; Sherr, 1996).

Eines der am häufigsten mutierten Gene ist das Tumor-Suppressorgen *p53* (Harris, 1996). Zu den Krebsarten, in denen am häufigsten *p53*-Mutationen detektiert werden, gehören Kolon-, Brust-, Oesophagus-Karzinome und Melanome (Chino et al., 2001; Harris, 1996; Kastriakis et al., 1995; Varley et al., 1991). Das *p53*-Gen kodiert für einen der vielseitigsten Tumorsuppressoren. Das Protein besteht aus drei funktionellen Domänen (Cho et al., 1994).

Die N-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne besitzt Phosphorylierungsstellen (Ser¹⁵, Ser²⁰), die unter anderem von einer DNA-abhängigen Serin/Threonin-Kinase genutzt werden. Die zentrale DNA-Bindedomäne ermöglicht die Interaktion des p53-Proteins mit der Ziel-DNA und verursacht dadurch eine Aktivierung der Transkription des Zielgens. Durch eine Wechselwirkung mit viralen Onkoproteinen, z.B. E6 des HPV, kann die p53-vermittelte Zielgenhemmung aufgehoben werden (McMurray und McCance, 2004). Die C-terminale regulatorische Domäne beinhaltet eine zweite Phosphorylierungsstelle sowie ein Kerntranslokationssignal (Cho et al., 1994). In gesunden Zellen wird p53 bei Schädigung der DNA durch Phosphorylierung aktiviert, mit dem Ziel die DNA-Reparatur zu ermöglichen und eine Proliferation von Zellen mit mutiertem Genom zu verhindern (Giaccia und Kastan, 1998). In diesem Zusammenhang spielt die p53-vermittelte Aktivierung von p21^{Cip1} eine zentrale Rolle. p21^{Cip1} ist ein wichtiger Inhibitor der zyklinabhängigen Kinasen CDK2 und CDC. Die Aktivierung von p21^{Cip1} durch p53 kann zur Arretierung der Zelle in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus führen. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von Genen des DNA-Reparaturmechanismus wie beispielsweise p53R2 (Lozano und Elledge, 2000; Tanaka et al., 2000). Kann die Zelle die DNA-Schäden beheben, wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und die Zelle ist zur Proliferation befähigt. Ist der DNA-Schaden jedoch beträchtlich, kommt es zu einer Akkumulation von p53 in der Zelle, welche zur Aktivierung von Genen der Bcl2-Familie führt. Deren Genprodukte sind wiederum in der Lage durch eine Signalkaskade Kaspasen zu aktivieren und somit zur Apoptose der betroffenen Zelle zu führen (Gottlieb und Oren, 1998). Somit kann p53 die unkontrollierte Proliferation deregulierter Zellen verhindern. Kommt es zum Funktionsverlust von p53 wird der Zellzyklusarrest und die damit verbundenen Reparaturmechanismen, so wie die pro-apoptotischen Mechanismen außer Kraft gesetzt. In Folge dessen kommt es zu einer Akkumulation von Mutationen, die zur Transformation der Zelle führen können. Diese vielfältige Funktionsweise und protektive Fähigkeit von p53 führte zur Namensgebung „Guardian of the cell“.

1.1.3 Die DNA-Reparatur-Gene

DNA-Reparaturgene kontrollieren durch Detektion und anschließende Reparatur von DNA-Schäden die Mutationsrate im Genom gesunder Zellen (Rotman und Shiloh, 1999). DNA-bindende Proteine sind in der Lage Schäden in der DNA zu detektieren, diese an Kinasen wie ATM/ATR zu „melden“ und auf diese Weise diverse DNA-Reparaturmechanismen zu

aktivieren. Zu diesen gehören u.a. die „*base excision repaire*“ (BER) und „*nucleotide excision repaire*“ (NER), sowie die nicht-homologe Rekombination von DNA-Bruchstücken. Die Mutation von DNA-Reperaturgenen führt ebenso wie bei Tumorsuppressorgenen zu einem Funktionsverlust („*loss of function mutations*“) der entsprechenden Proteine. Mutationen von DNA-Reperaturgenen verursachen eine genomische Instabilität und eine erhöhte Mutationsrate im Genom der betroffenen Zellen. Durch die Anhäufung von Mutationen werden weitere Kontrollmechanismen der Zellen negativ beeinflusst. Es kommt zu einer chromosomalen Aberration, die zur Aneuploidie der Tochterzelle führt und somit die Tumorentstehung fördert (Chan et al., 1999).

1.1.4 Onkogene Membranproteine

In der Karzinogenese sowie bei der Diagnose und der Therapie von Tumoren, spielen onkogene Membranproteine eine wichtige Rolle. Sie sind auf Grund von Mutationen oder Deregulationen für den malignen Phänotyp der Zellen mitverantwortlich. Durch Überexpression tumorassoziierter Oberflächenmoleküle können maligne Läsionen identifiziert werden. Bei einer anschließenden Therapie dienen Membranproteine häufig als Zielantigene für eine Antikörper-vermittelte Immunreaktion. Für die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen wichtige und funktionell gut charakterisierte Membranproteine sind der EGF-Rezeptor und Her2/neu (Curigliano et al., 2007; Harari et al., 2007). Im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ist die Analyse der Expression und der Funktion weiterer Membranproteine von grundlegendem Interesse.

1.2 Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (CD326) ist ein Ca^{2+} -unabhängiges, transmembranes Glykoprotein (Litvinov et al., 1994a; Ross et al., 1986). Es ist eines der ersten identifizierten tumorassozierten Antigene. Bereits 1979 wurde es durch Verwendung monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche von gastrointestinalen Karzinomzellen detektiert und identifiziert (Herlyn et al., 1979; Koprowski et al., 1979). EpCAM besitzt ein nominelles Molekulargewicht (M_r) von 40 kDa (Ross et al., 1986) und wird während der Embryogenese und auch danach in verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert (Trzpis et al., 2007a). Während der Karzinogenese kommt es häufig zu einer *de novo*- oder Überexpression des

Moleküls (Balzar et al., 1999b). Die Veränderung des Expressionsmusters in Zusammenhang mit dem Verlauf der Karzinogenese ist unter anderem für Tumore des Kolons und der Gebärmutter beschrieben (Balzar et al., 1999b; Litvinov et al., 1996; Went et al., 2006). Auf Grund der starken Expression in Karzinomen unterschiedlicher Entitäten gehört EpCAM heute zu den am häufigsten verwendeten prognostischen Markern und ist ein bevorzugtes Zielmolekül bei der Entwicklung antikörpervermittelter Immuntherapien zur Krebsbehandlung (Baeuerle und Gires, 2007; Bremer et al., 2004; Brischwein et al., 2006; Di Paolo et al., 2003; Mosolits et al., 2004; Riesenberg et al., 2001).

Erstaunlicherweise wurde EpCAM bereits in den späten 1980er Jahren als Zielmolekül für monoklonale Antikörper verwendet, obschon ein Kenntnis der molekularen Funktion dieses Antigens gänzlich fehlte. Dies steht im Gegensatz zum EGF-Rezeptor (EGF-R) und zu Her/2neu, deren Funktion parallel zur Entwicklung von Therapeutika detailliert studiert wurde. Neben seiner Funktion als Ca^{2+} -unabhängiges Adhäsionsmolekül (Litvinov et al., 1994b) und einer Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern an der Membran (Kuhn et al., 2007; Le Naour et al., 2006) wurde gezeigt, dass EpCAM die Zellproliferation induziert und die Expression verschiedener Karzinom-assoziiierter Proteine verstärkt (Gires et al., 2001; Munz et al., 2004; Munz et al., 2005).

1.2.1 Das *epcam*-Gen und die GA-733 Familie

Das *epcam* Gen *TACSTD1*, auch unter den Synonymen CO17-14, GA733-2, EGP-2, EGP40, KSA bekannt, lokalisiert auf Chromosom 2 2p21 (Alberti et al., 1994; Calabrese et al., 2001; Szala et al., 1990). Es gehört zur Genfamilie GA-733, die zwei Typ-I-Transmembranproteine umfasst: EpCAM (CD326) und Trop-2 (GA733-1 oder *tacste2*) (Alberti et al., 1994; Baeuerle und Gires, 2007; Szala et al., 1990). Der Genlokus hat eine Größe von 17,69 kb. Der bis *dato* klonierte Promotorbereich des Gens umfasst 3,4 kb. In diesem Bereich konnten Konsensus-Sequenzen für Inr (Initiator), SP-1, Ap-1, Ap-2, Ets ESE-1 und E-pal-like (HLH) identifiziert werden (McLaughlin et al., 2004). Weder eine Ker-1, E-pal, TATA- noch eine CAAT-Box sind in diesem Bereich vorhanden (Denny, 2001; Linnenbach et al., 1993). Der Promotorbereich 687 bp 5' vor dem Startkodon vermittelt die Epithel-spezifische Expression des Gens, während der Bereich 177 bp vor der 5'-flankierenden Sequenz die höchste Promotoraktivität besitzt (McLaughlin et al., 2004). NF κ B, TNF α und INF α sind als negative Regulatoren des *TACSTD1* Promotors identifiziert worden (Gires et al., 2003). Diese negative Regulation wurde auf eine Kompetition von NF κ B mit bislang nicht identifizierten

Transkriptionsfaktoren um die Histonacetyltransferase Aktivität von CBP/p300 zurückgeführt.

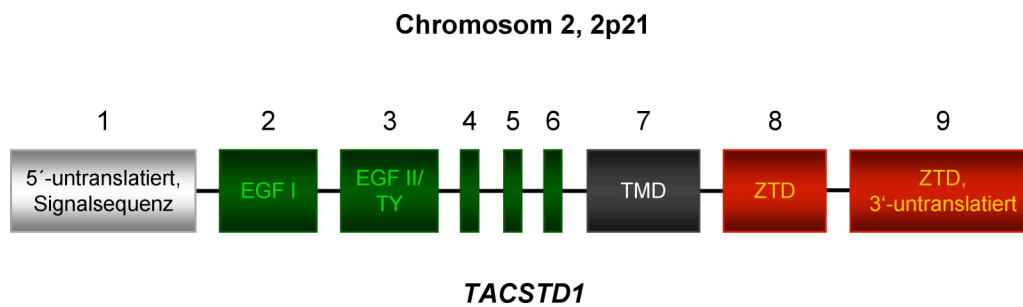


Abbildung 1.2: Struktur des *epcam* Gens. (EGF I/II = EGF-ähnliche Domäne; TY = Tyroglobulinähnliche Domäne; TMD = Transmembrandomäne; ZTD = zytoplasmatische Domäne)

Das *epcam*-Gen besteht aus neun Exons (Abb. 1.2; adaptiert von (Linnenbach et al., 1993)). Exon 1 kodiert für eine Signalpeptidsequenz, die für das Einschleusen des Moleküls in das endoplasmatische Retikulum (ER) und den anschließenden Golgi-vermittelten Transport an die Plasmamembran verantwortlich ist. Die extrazelluläre Domäne des Proteins wird von den Exons 2 bis 6 kodiert. Exon 2 und 3 kodieren für eine EGF-I- und EGF-II-ähnliche Domäne. Die Transmembrandomäne wird von Exon 7, die intrazelluläre Domäne von Exon 8 und 9 kodiert. Die EpCAM mRNA hat eine Größe von ca. 1,5 kb. Die kodierende Sequenz umfasst 945 bp, was 314 AS entspricht. Es sind keine pathogenen Mutationen des EpCAM-Gens und auch keine Spleiß-Varianten der mRNA bekannt (Balzar et al., 1999a). Ein Sequenzvergleich mit murinem EpCAM zeigt eine Homologie von 80% auf Nukleotid und 86% auf Aminosäurebasis (Bergsagel et al., 1992).

1.2.2 Das EpCAM-Protein

Die extrazelluläre Domäne des transmembranen Glycoproteins umfasst 265 AS. Die ersten 23 N-terminalen AS bilden ein Leaderpeptid mit 11 hydrophoben Resten, das vermutlich durch einen Signalpeptidaseverdau zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 abgespalten wird (Szala et al., 1990). AS 24 bis 265 bilden die eigentliche extrazelluläre Domäne des muren Moleküls. Im N-terminalen cysteinreichen Bereich der Sequenz sind zwei EGF-ähnliche Domänen enthalten, EGF-I (CX₁CX₈CX₇CX₁CX₁₀C; AS 27 bis 59) und EGF-II (CX₃₂CX₁₀CX₅CX₁CX₁₆C; AS 66 bis 135) (Mann et al., 1989) (Abb. 1.3). Es wurde gezeigt, dass beide EGF-ähnlichen Domänen an der Vermittlung homophiler Zelladhäsionen beteiligt sind (Balzar et al., 2001). Die Sequenz der EGF-II Domäne weist eine starke

Sequenzhomologie mit dem humanen Thyroglobulin Typ 1A (QCN_xCWCV) auf (Chong und Speicher, 2001; Linnenbach et al., 1989). Es ist bekannt, dass Thyroglobulin-Domänen häufig als EGF-ähnliche Domänen fehlgedeutet werden (Novinec et al., 2006). Je nachdem, welche Annahme für den Bereich der extrazellulären Domäne zutreffend ist, ergeben sich zwei unterschiedliche Proteinstrukturen (Abb. 1.3). In der extrazellulären Domäne befinden sich außerdem drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Asparagin⁷⁴ (Asp⁷⁴), Asp¹¹¹ und Asp¹⁹⁸). Im Gegensatz zur Expression von humanem EpCAM in Insektenzellen werden bei der Expression in humanen Epithelzellen alle drei N-Glykosylierungsstellen des Proteins genutzt (Chong und Speicher, 2001; Novinec et al., 2006). In Karzinomen können EpCAM-Moleküle mit unterschiedlichen Größen (34, 40 und 42 kDa) detektiert werden (Litvinov et al., 1994b), welche auf eine differentielle Glykosylierung zurückgehen. Aus Untersuchungen an Geweben des Hals-Kopf-Bereiches ist bekannt, dass EpCAM in gesundem Epithel hauptsächlich schwach glykosyliert, im Tumorgewebe dagegen hyperglykosyliert vorliegt (Pauli et al., 2003). Ob es Unterschiede in der Funktion der drei Glykosylierungsformen gibt, ist bis *dato* unerforscht. Klar ist jedoch, dass die Glykosylierung von Asp¹⁹⁸ eine stabilisierende Wirkung auf EpCAM hat. Die Punktmutation von Asp¹⁹⁸ zu einem Alanin hat eine dreifache Reduktion der Verweilzeit von EpCAM-Molekülen an der Plasmamembran zur Folge (Munz et al., 2008, im Druck).

Die Transmembrandomäne von EpCAM besteht aus 23 AS (AS 266 bis 288). Der intrazelluläre Anteil des EpCAM-Moleküls ist mit nur 26 AS (AS 289 bis 314) auffällig klein (Balzar et al., 1999b). Er besitzt neben einem Internalisierungsmotiv (NPXY), eine Konsensussequenzen (RKKRMAK), über die es mit α -Actinin in Wechselwirkung treten kann (Balzar et al., 1998).

Bei hoher EpCAM-Expression kommt es durch die Wechselwirkung von EpCAM mit α -Actinin zur Zerstörung der α -Actin-F-Actin Wechselwirkung (Winter et al., 2003) und somit zu einer Reduktion der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion von Zellen (Guillemot et al., 2001). Neben der Wechselwirkung mit α -Actinin sind weitere Interaktionspartner bekannt. So konnte gezeigt werden, dass EpCAM in Tumoren der Bauchspeicheldrüse einen Komplex mit CD44v4-v7, Tetraspanin D6.1A und Claudin-7 bildet (Kuhn et al., 2007; Le Naour et al., 2006). Durch Interaktion mit den genannten Proteinen des Tetraspanin-Netzwerkes („*tetraspanin web*“) kann EpCAM die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion, die Apoptose-Resistenz und vermutlich auch die Metastasierung auf unterschiedliche Weise beeinflussen (Ladwein et al., 2005; Trzpis et al., 2007a).

Aus funktionellen Analysen geht hervor, dass eine Hemmung der EpCAM-Expression in Brust- und Hypopharynxkrebszellen die Reduktion der Zellproliferation zur Folge hat (Osta et al., 2004), wohingegen die ektopische Expression des Moleküls in embryonalen Nierenzellen (HEK293) und die Überexpression in anderen Karzinomzelllinien die Zellproliferation induziert (Munz et al., 2004). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von EpCAM eine erhöhte Expression von c-Myc, Zyklin A und E sowie des c-Myc Targets eFABP zur Folge hat (Munz et al., 2004; Munz et al., 2005). Über die Art der Signalübertragung ist bislang nichts bekannt.

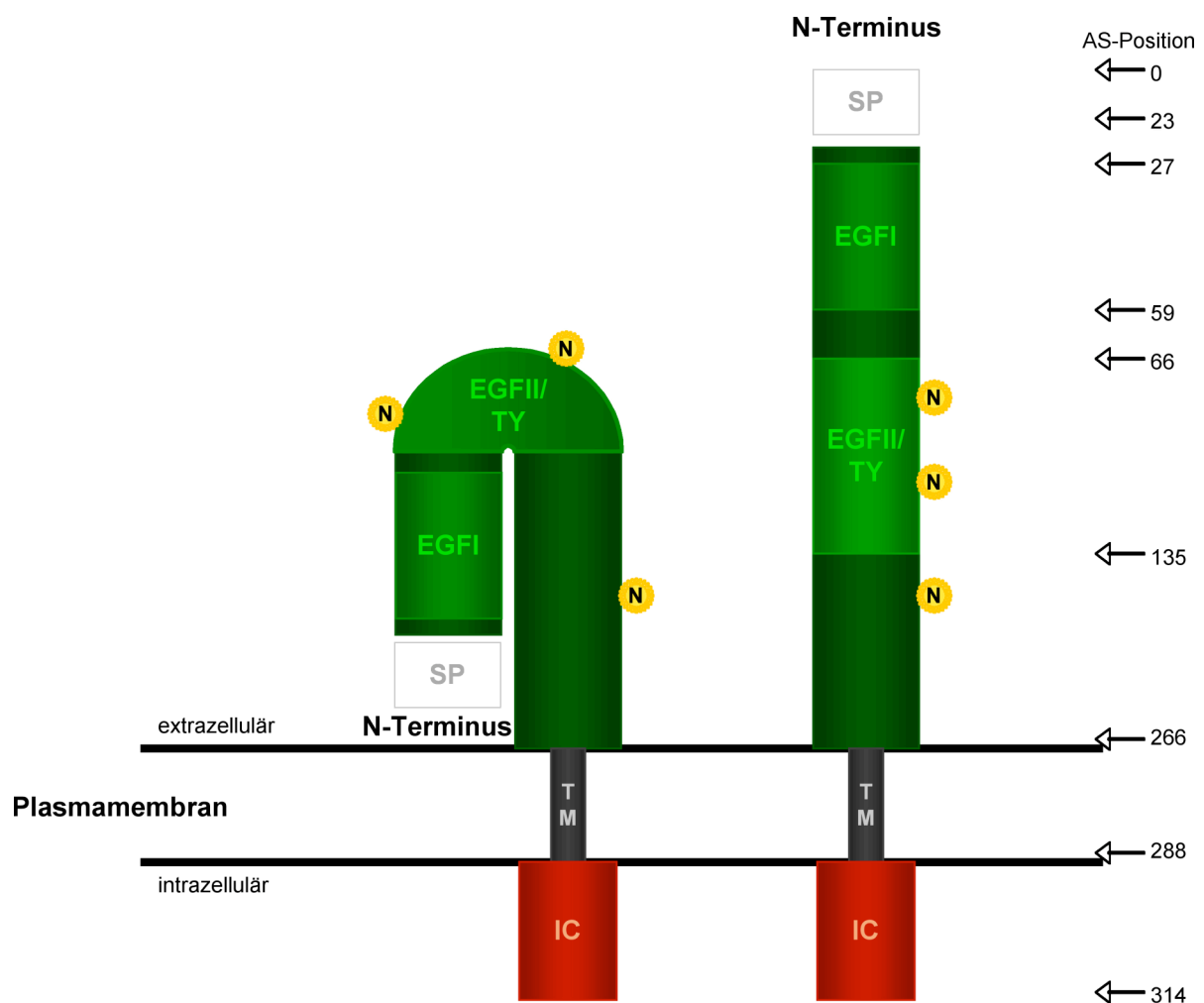


Abbildung 1.2: Struktur des EpCAM Proteins. EpCAM besteht aus 314 AS. Mit N sind die N-Glykosylierungsstellen (Asp⁷⁴, Asp¹¹¹ und Asp¹⁹⁸) gekennzeichnet. (SP= Signalpeptid, EGF= epidermal growth faktor-like repeat, TY= Thyroglobulin-type repeat, TM= Transmembrandomäne, IC= intrazelluläre Domäne). Das Signalpeptid wird vermutlich zwischen AS23 und 24 gespalten und ist aus diesem Grund als offenes Rechteck gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der funktionellen Analyse deuten darauf hin, dass EpCAM in der Lage ist, selbst Signale in den Kern zu vermitteln und somit die Expression von Genen zu regulieren (Munz et al., 2004). Das Protein hat somit einen direkten Einfluss auf den Metabolismus und

die Proliferation von Epithelzellen. Diese Fähigkeit von EpCAM wird durch Berichte über Hepatozyten-Vorläuferzellen unterstützt (Schmelzer et al., 2007).

1.2.3 Das EpCAM-Expressionsmuster

Es ist bekannt, dass Veränderungen im Expressionsmuster von EpCAM während der embryonalen Entwicklung und später beim adulten Individuum auftreten. Im Gegensatz zu anderen Zelladhäsionsmolekülen, die meist ubiquitär vorkommen, ist EpCAM in gesunden humanen Geweben im Wesentlichen nur auf einfachen Epithelien zu finden (Abb. 1.4). Bei Tumoren und auch bei inflammatorischen Krankheiten kommt es zu einer Veränderung des ursprünglichen Expressionsmusters. EpCAM ist in diesen Fällen häufig über- oder auch *de novo* exprimiert. Auf die Beobachtungen zum Expressionsmuster wird im Folgenden genauer eingegangen.

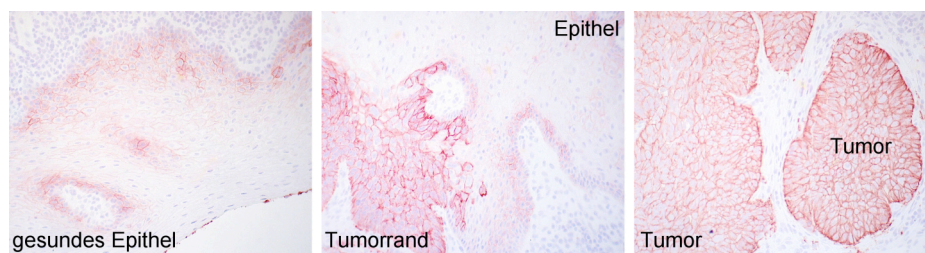


Abbildung 1.4: EpCAM-Expression in verschiedenen Geweben des Hals-Kopf-Bereiches

1.2.3.1 Die EpCAM-Expression in gesundem Gewebe

Im Verlauf der Embryogenese wird EpCAM in verschiedenen Geweben wie Lunge, Leber, Nieren, Pankreas, Milchdrüsen, Haut und Keimzellen exprimiert (Dan et al., 2006; Kasper et al., 1995; Stingl et al., 2001). Die Expression weist einen zeitabhängigen Verlauf auf. Beispielsweise unterscheidet sich die EpCAM-Expression in verschiedenen Stadien der Pankreas-Entwicklung und bleibt auch im Adulten erhalten (Cirulli et al., 1995). Anderson *et al.* beschreiben eine zeitlich eng begrenzte EpCAM-Expression während der Entwicklung der Gonaden (Anderson et al., 1999). Gut untersucht ist die EpCAM Expression in der fötalen Lunge. In der frühen Embryonalentwicklung kommt es zu einer starken Expression im primären Lungen- und Bronchialepithel. Im Adulten kann EpCAM nur noch in den alveolären Epithelien nachgewiesen werden (Kasper et al., 1995). Eine EpCAM-Expression konnte auch in embryonalen multipotenten Leber-Progenitorzellen nachgewiesen werden (Breuhahn et al.,

2006; Schmelzer et al., 2007). Hepatozyten exprimieren in der achten Woche der Embryogenese zunächst EpCAM und reduzieren mit fortschreitender Differenzierung die Expression wieder. Lediglich in den Gallengängen der adulten Leber ist noch eine EpCAM-Expression zu detektieren (de Boer et al., 1999b). Bei inflammatorischen Erkrankungen der Leber wird EpCAM *de novo* exprimiert und in der Mukosa hochreguliert (Breuhahn et al., 2006). Embryonale Stammzellen der Ratte (Anderson et al., 1999), der Maus und des Menschen (persönliche Mitteilung B. Gonzalez) weisen ebenfalls eine EpCAM-Expression auf.

In adulten Menschen wird EpCAM in epithelialen Geweben stringent exprimiert. Die Expression findet in der basolateralen Membran aller einfachen, unstratifizierten Epithelien statt, vor allem im Drüsengewebe, im Pseudo-Plattenepithel und im Übergangsepithelgewebe (Bumol et al., 1988; Moldenhauer et al., 1987). In mesenchyalem-, muskel-, neuroendokrinem- und Plattenepithelgewebe ist keine Expression nachweisbar. Humane Zellen lymphoiden Ursprungs sind ebenfalls negativ für EpCAM.

Die Stärke der EpCAM-Expression zeigt signifikante Unterschiede, insbesondere innerhalb unterschiedlicher Zelltypen eines Gewebes. Kolongewebe weist die höchste beobachtete Expression auf. Im Gastrointestinaltrakt exprimiert das Dünndarmepithel EpCAM intermediär und das Magenepithel nur schwach (Moldenhauer et al., 1987). In der Haut kommt es in Schweißdrüsen und der proliferativen Zone der Haarfollikel zur Expression von EpCAM, während Keratinocyten und Melanocyten kein EpCAM exprimieren (Moldenhauer et al., 1987; Tsubura et al., 1992). Die Expression von EpCAM in der Niere ist für proximale/distale Tubuli, das duktales Gewebe, Nierengänge und Inselzellen beschrieben (Cirulli et al., 1998; Trzpis et al., 2007b). Gewebe des weiblichen und männlichen Genitaltraktes (Ovarien, Zervix, Uterus, Testis und Prostata) exprimieren ebenfalls EpCAM in unterschiedlich starkem Maße (Litvinov et al., 1996; Tsubura et al., 1992). Des Weiteren weisen die Gallenblase, die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Hypophyse, adrenale Drüse), sowie Tracheen, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen des respiratorischen Traktes EpCAM-Expression auf (Moldenhauer et al., 1987; Pauli et al., 2003).

1.2.3.2 EpCAM-Expression in Karzinomen

Bei der Entwicklung von benignen Läsionen und malignen Tumoren in Epithelien kommt es häufig zu einer verstärkten oder *de novo* Expression von EpCAM (Zorzos et al., 1995). Sehr deutlich ist dies bei Plattenepithelkarzinomen. Gesundes Plattenepithel ist EpCAM-negativ.

Im frühen neoplastischen Stadium in der Zervix kommt es beispielsweise zu einer *de novo* Expression in atypisch dedifferenzierten Bereichen des Epithels, die mit dem Grad der Neoplasie weiter deutlich zunimmt. Zeigen zunächst nur die basalen und suprabasalen Zellen der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) eine zunehmende EpCAM-Expression (Grad I und II), so sind bei CIN III 100% der Zellen EpCAM-positiv (High et al., 1996; Litvinov et al., 1996; Pauli et al., 2003). Eine starke EpCAM-Expression wurde zudem bei Dünndarm-, Kolon-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebs detektiert (Litvinov et al., 1996; Spizzo et al., 2006; Spizzo et al., 2004; Went et al., 2005; Went et al., 2006; Went et al., 2004). Tumoren mesodermalen und ektodermalen Ursprungs - wie neuronale Tumoren, Melanome, Sarkome und Lymphome - weisen keine EpCAM-Expression auf, wodurch EpCAM zu einem streng epithelialen prognostischen und therapeutischen Marker wird (Chaubal et al., 1999; Moldenhauer et al., 1987; Went et al., 2006).

Untersuchungen der Stärke der EpCAM-Expression in Zusammenhang mit dem Erkrankungsverlauf haben gezeigt, dass eine starke Expression mit wenigen Ausnahmen stets mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Diese Beobachtung hat bei Brust-, Prostata-, Kolon-, Pankreas- und Oesophaguskarzinomen, so wie Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches Gültigkeit (Fong et al., 2006; Spizzo et al., 2004; Stoecklein et al., 2006; Varga et al., 2004; Went et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind Krebserkrankungen bekannt, bei denen die EpCAM-Expression mit einer guten Überlebensprognose korreliert. Dies ist für manche Lungenkarzinome beschrieben (Went et al., 2006).

1.2.4 Therapeutische Verwendung des EpCAM Moleküls

Auf Grund der starken Über- oder *de novo* -Expression von EpCAM in epithelialen Tumoren ist es ein viel verwendetes Zielmolekül für verschiedene Arten von Immuntherapien. Die Therapieansätze, bei denen EpCAM als Zielantigen verwendet wird, umfassen murine und humane monoklonale Antikörper, bispezifische Antikörper, Immunotoxine und Vakzine (Baeuerle und Gires, 2007; Di Paolo et al., 2003; Oberneder et al., 2006; Veronese und O'Dwyer, 2004). Sie befinden sich alle in klinischen oder präklinischen Testphasen. Bereits 10 Jahre nach der Entdeckung des Moleküls wurde der erste monoklonale Antikörper gegen EpCAM entwickelt und in einer klinischen Studie getestet (Riethmüller et al., 1998; Riethmüller et al., 1994). Die Behandlung mit 17-1A (Panorex®) führte zu einer erhöhten Überlebensrate bei Patienten mit Kolorektalkarzinomen (Hartung et al., 2005). Im Rahmen einer stratifizierten Studie konnte jedoch kein Nutzen einer Behandlung mit Panorex

gegenüber einer Chemotherapie nachgewiesen werden, so dass dieses Therapeutikum im Jahr 2000 vom deutschen Markt genommen wurde. Ein Beispiel für die Entwicklung eines Krebsimpfstoffes ist Edrecolomab (IGN-101), welcher eine Formulierung des 17-A1 Antikörpers und Aluminium ist. Die Impfung mit IGN-101 löste eine humorale Immunantwort aus und reduzierte die Zahl zirkulierender Krebszellen im Blut. Derzeit wird der Impfstoff in einer klinischen PhaseII/III-Studie getestet (Baeuerle und Gires, 2007). Ein vollständig humaner Antikörper (Adecatumomab®, MT201) wird in klinischen Studien an Brust- und Prostatakrebspatienten getestet (Baeuerle und Gires, 2007; Oberneder et al., 2006). Die Verwendung eines gänzlich humanen Antikörpers verspricht geringere Nebenwirkung, als jene, die auf der Immunantwort des Patienten auf den murinen Antikörper beruht (HAMA: human anti-mouse antibodies). Erste Ergebnisse zeigen, dass der TNF- α Spiegel im Serum nach Gabe von Adecatumomab® relativ schnell ansteigt. Welche Typen von Immunzellen für diesen Anstieg verantwortlich sind, konnte bislang nicht geklärt werden (Oberneder et al., 2006). Zur Behandlung von Eierstockkrebs laufen klinische Studien mit trispezifischen Antikörpern. Der trispezifische Antikörper Catumaxomab® ist spezifisch für EpCAM, CD3 und über den Fc-Teil für Fc-Rezeptor-positive antigenpräsentierende Zellen und andere cytotoxische Immunzellen (Ruf et al., 2007). Die klinischen Phase I/II/III zeigten, dass dieser Antikörper Tumorzellen bei Eierstockkrebspatienten effizient eliminiert (Burgess et al., 2007). Ein ganz neuartiger Therapieansatz wird mit der Kombination von Liposomen-gekoppelten EpCAM-Einzelstrang-Antikörpern verfolgt. Die Liposomen können dabei mit antiapoptotischen oder chemotherapeutischen Substanzen beladen werden. Im Mausmodell zeigten Liposomen-gekoppelte Einzelstrang-Antikörper antitumorale Aktivität (Baeuerle und Gires, 2007; Hussain et al., 2007).

Auf Grund der zunehmend wichtigen Rolle von EpCAM in der Krebstherapie, des heterogenen Expressionsmusters und der geringen Kenntnis der Funktion, ist die weitere Aufschlüsselung des EpCAM Signalweges von besonderem Interesse.

1.3 Zielsetzung

EpCAM wurde bereits vor 28 Jahren entdeckt und ist seitdem Thema vielfältiger Forschungs-, Diagnostik- und Therapieansätze. In der klinischen Anwendung ist EpCAM ein etablierter Tumor- und prognostischer Marker und dient als Zielantigen verschiedener Antikörper, die sich in klinischer Testung befinden. Trotz dieser großen klinischen Relevanz ist die Kenntnis über die Funktion und die damit verbundenen molekularen Grundlagen äußerst dürftig. Die einzigen bisher verfügbaren funktionellen Daten zeigen, dass EpCAM unter anderem für eine verstärkte c-Myc-, eFABP-, Zyklin A- und E-Expression und infolgedessen für eine erhöhte Proliferation der Zellen verantwortlich ist. Über die Initiation der Signale und ihre Transduktion, welche den beobachteten Phänotyp verursachen, ist *bis dato* nichts bekannt.

Das übergeordnete Ziel dieser Promotionsarbeit war die Aufschlüsselung der molekularen Grundlagen einer EpCAM-vermittelten Signaltransduktion. Zu diesem Zweck sollten eine Identifizierung und anschließende Validierung von intrazellulären EpCAM-Interaktionspartnern durchgeführt werden. Dies beinhaltete unter anderem die Überprüfung der Interaktionen von EpCAM mit Proteinen, die in einem Yeast-two-Hybrid-Screen in unserem Labor als mögliche Kandidaten bereits identifiziert wurden. Die potentiellen EpCAM-Liganden sollten mittels Ko-Immünpräzipitationen und konfokaler Mikroskopie in humanen Zelllinien untersucht werden. Zur Klärung, ob es sich um direkte oder indirekte Wechselwirkungen handelt, war die Verwendung eines *in vitro* Transkriptions/Translations-Systems (TNT) geplant. Anschließend sollte die Funktionalität identifizierter Liganden im Prozeß der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion und Proliferation mittels molekularer und biochemischer Ansätze detailliert untersucht werden. In diesem Zusammenhang war die Inhibition der Interaktionspartner durch die Verwendung von siRNAs geplant. Weitere experimentelle Vorgehensweisen sollten aus den erlangten Erkenntnissen abgeleitet werden.

2. Material

2.1 Antikörper und Detektionssysteme

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper.

Antikörper (Kat. Nr.)	Bezugsquelle
A20 (sc-23788)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -Actin (sc-1616)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -EpIC (1144)	Epitomics, Burlingame (USA)
α - β -Catenin (610153)	BD, Heidelberg
α -eFABP (sc-16060)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -EpCAM (HO-3)	TrionPharma, München
α -FHL2 (HM 2136)	Cell Science, Canton (USA)
α -GFP(sc-9996)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -HA 3F10 (1867423)	Roche, Mannheim
α -Lef (sc-8591)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -Lef (Na 64)	Calbiochem, CA (USA)
α -myc (9E10; sc-40)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
Avidin-Biotin-PO Komplex (Vectarstain)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
ABC-PO-Elite-Kit (PK 6100)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Alexa 488 Ziege- α -Maus (A-11001)	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin Alexa-488 Konjugat (S-11223)	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin Alexa-594 Konjugat (S-11227)	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin Alexa-647 Konjugat (S-21374)	Molecular Probes, Karlsruhe
HRP Ziege- α -Kaninchen (111-035-003)	Dianova, Hamburg
HRP Kaninchen- α -Ziege (P0449)	Dako, Glostrup (Dänemark)
HRP Kaninchen- α -Ratte (P0450)	Dako, Glostrup (Dänemark)
α -Kaninchen IgG, biotinyliert (BA-1000)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -Maus IgG, biotinyliert (BA-2000)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -Maus IgG, FITC-konjugiert(115-095-003)	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)
α -Ratte IgG, biotinyliert (BA-9400)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.2 Bakterien

Der verwendete Stamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

E. coli DH5 α (Hanahan, 1985):

F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, 1-, thi-1, gryA96, relA1

2.3 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Chemikalien und Kits

Alle nicht aufgeführten und in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Amersham Biosciences, Merck bzw. Sigma bezogen.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien.

Artikel	Bezugsquelle
AB Serum	Biotest, Dreieich
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
7-Actinomycin D (7-AAD)	Sigma, Taufkirchen
Agar, Bacto-	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Aminoethylcarbazol	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Aminosäure-Mix (-Leu/-Met)	Promega, Madison (USA)
Ammoniumbikarbonat	Sigma, Taufkirchen
Annexin-V-Biotin	Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, TetraZyclin)	Sigma, Taufkirchen; Roche, Mannheim
Bakterienmedienkomponenten (Trypton, Hefeextrakt)	Gibco BRL, Karlsruhe
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
β -Gal Reporter Gene Assay (chemiluminescent)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Carrier DNA	BD Biosciences Clontech, Heildeberg
DEPC	Merck, Darmstadt
Deoxyadenosine 5'-(alpha-32P)-triphosphate, (3000 Ci/mmol) (AA0004)	Amersham Biosciences, Freiburg
Dimethylpimelimidat (Crosslinker)	Sigma, Taufkirchen

Dithioerythreitol (DTE)	Sigma, Taufkirchen
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Roth New England Biolabs, Schwalbach
DNA QuiaShredder	Qiagen, Hilden
Dropout-Ergänzung für Hefe Medien	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMDM)	Seromed/Biochrom, Berlin
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Bedford (USA)
ECL Blotting Substrate	Pierce, Bonn
EMSA Kit	Panomics, Mailand (Italien)
Ethanolamin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylenediamintetraacetatdinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formamid (deionisiert)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed/Biochrom, Berlin
Glyzerol	Sigma, Taufkirchen
High Pure Nucleo Spin Extract II	Macherey & Nagel, Düren
High Pure Plasmid Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
High Pure RNA Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Hoechst 33342 (H1399)	Molecular Probes, Karlsruhe
Lachsspermin DNA	Stratagene, Amsterdam (NL)
Luciferase Assay Kit A/B	BioThema, Handen (Schweden)
Lyticase	Sigma, Taufkirchen
Mayers Hämalaun Lösung	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
NE-PER (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents)	Pierce, Bonn
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Roche, Mannheim
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka, Seelz
Nuclei preparation Kit	Sigma, Taufkirchen
Nukleotide (NTPs, dNTPs)	Boehringer Mannheim/Roche
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten (phosphate-buffered saline)	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicilin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Pfx-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmidpräparation „Jetstar“	Genomed, Bad Oeynhausen
Ploy dl-dC	Roche, Mannheim
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitoren: Compound E, Compound 34, Compound X	Alexis Biochemicals, San Diego (USA)

TAPI-0, TAPI-1 und TAPI-2	Biomol, Hamburg
Proteasomen Inhibitor MG-132	Calbiochem, San Diego (USA)
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteinase K	Dako, Glostrup (DK)
Protein G Sepharose „4 Fast Flow“	Amersham, Freiburg
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rabbit Reticuloeyct Lysate	Promega, Madison (USA)
RNAse Ihibitor	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
SD Basis Medium	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
siRNA	Eurogentec, Liège (Belgien)
HP validated siRNA	Qiagen, Hilden
T7 Polymerase	Ambion, Darmstadt
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	Roche, Mannheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	Amersham Biosciences, Freiburg
Triethanolamin	IBA, Göttingen
TriPure	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (TRIS)	Roche, Mannheim
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, Zellkultur	Biochrom AG, Berlin
Tween	Seromed/Biochrom, Berlin
	Serva, Heidelberg

2.3.2 Dienstleistungen

Tabelle 2.3: In Anspruch genommene Dienstleistungen.

Dienstleistung	Dienstleister
DNA-Sequenzierung	Sequiserie, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
siRNA-Synthese	Eurogentec, Liege (Belgien)

2.3.3 Geräte

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.

Artikel	Bezugsquelle
Agarosegel-Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Amersham, Freiburg
Blotting-Kammer	Bio-Rad, Richmond (USA)
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Richmond (USA)
ELISA-Reader ELx800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Filmentwicklungsmaschine	Optimax Laborgeräte, Heidelberg
Filmentwicklungskammer	Amersham, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“ mit hochauflösender Digital-Videokamera (Hamamatsu)	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren Schott	Roth, Karlsruhe
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, München
Konfokales Laserscan-Mikroskop (KLSM)	Leika, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Lyophilisator mit Speedvac	Bachofer, Reutlingen
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Bad Camberg
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	AEG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Halbergmoos
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
SLAB Gel Dryer GD2000 (Hoefer)	Amersham, Freiburg
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto (USA)
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Vortex Mixer	IKA Works, Inc., Wirmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Wallac Victor2 1420 Multilable counter	Wallac-ADL-GmbH, Freiburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach; GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Sorvall, Bad Homberg

2.3.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Bezugsquelle
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Chamber Slides (Glas, Permanox)	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Chambered Coverglass, 1.5 Borosilicate	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
Einmalküvetten	Brand, Wertheim
FACS-Röhrchen	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford (USA)
Kanülen	BD, Heidelberg
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Menasha (USA)
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg Biozym, Wien (Österreich)
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD, Le Pont de Claix (F); Nunc, Wiesbaden
QiaSchredder	Qiagen, Düsseldorf
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Spritzen, 5 ml/10 ml/20 ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, Palo Alto (USA)
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugensäulen (Mobicols)	MoBiTec, Göttingen

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 DNA-Sonden

Tabelle 2.6: Verwendete DNA-Sonden.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	GGTTCTGCCGGGCTTTGATCTTTGCTTAACAACA	CD1 EMSA
1b	GGTTTGTGTTAAGCAAAGATCAAAGCCCGGCAG	
2a	GGTTCTGCCGGCCTTTGATCTTTGCTTAACAACA	CD1-TOP EMSA
2b	GGTTTGTGTTAAGCAAAGATCAAAGCCCGGCAG	
3a	GGTTCTGCCGGGCTTTGGCCTTGCTTAACAACA	CD1-FOP EMSA
3b	GGTTTGTGTTAAGCAAAGGCCAAAGCCCGGCA	

2.4.2 Primer

Tabelle 2.7: Verwendete Primer.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	CGGACAAAATCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGCCG CCATGGAGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT	T7/HA Fusion
1b	TCACTATTAAGTGAAGTGCAGGAGGAGGAGGTTTTCAGTATCTACGAT	
2a	TGTCGCTCTTGAAGTCAGAGGAGA	GAPDH RT-PCR
2b	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG	
3a	ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCC	PSNE1
3b	TGATATAATAAGCCCAGGCATGGATGAC	
4a	ATGCTCACATTCATGGCCTCTGACAGC	PSNE2
4b	CACGATGACGCTGATCATGATGAGGGT	

2.4.3 siRNAs

Tabelle 2.8: Verwendete siRNAs. Angegeben sind die Sequenzen der verwendeten siRNAs. (*) HP validierte siRNAs bei denen teilweise die genaue Sequenz nicht bekannt ist.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	UGCCAGUGUACUUCAGUUG dTdT	EpCAM (Eurogentec)
1b	CAACUGAAGUACACUGGCA dTdT	
2a	CUGCUUCUGUGACUUGUAU dTdT	FHL2 (Eurogentec)
2b	AUACAAGUCACAGAAGCAG dTdT	
3a	GAGCUGACCCUCAAAUACG dTdT	PSEN2* (Ambion)
3b	CGUAUUUGAGGGUCAGCU dTdT	
4a	SI02662688	PSNE1* (Qiagen)
4b	SI02662688	
5a	Batch Nr. 219268	TACE* (Qiagen)
5b	Batch Nr. 219269	
6a	UCGUCCGUAUCAUUCAAU dTdT	Ktrl. siRNA
6b	AUUGAAAUGAUACGGACGA dTdT	

2.5 Plasmide

Tabelle 2.9: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung
pACT2-HEK293 cDNA	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycinresistenz; von Dr. T. Schröder zur Verfügung gestellt
141pCAG::EpCAM	EpCAM in 141pCAG-3SIP
pEYFP-N1	CMV, EYFP, SV40, Kanamycin/Neomycin, HSV TK, Clontech (CA, USA)
pEYFP-N1::EpCAM	EpCAM N-terminal fusioniert mit GFP-Tag in pEYFP-N1
pEYFP-N1::EpIC	EpIC N-terminal fusioniert mit GFP-Tag in pEYFP-N1
pIRES	CMV, T/, IHRES, HygromycinB-Resistenz, Addgene (Cambridge, USA)
pIRES::HA-FHL2	FHL2 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pIRES
pIRES::HA-CGI128	CGI-128 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pIRES
pIRES::HA-SNTA1	SNTA1 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pIRES
pIRES::HA-Galectin1	Glycin1 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pIRES
pcDNA3.1Hyg	CMV, Hygromycinresistenz, Invitrogen (Karlsruhe)
pDRIVE	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/

	Kanamycinresistenz, Qiagen (Hilden)
pDRIVE::T7/HA-FHL2	FHL2 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pDrive
pDRIVE::T7/HA-CGI128	CGI-128 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pDrive
pDRIVE::T7/HA-SNTA1	SNTA1 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pDrive
pDRIVE::T7/HA-Galectin1	Glycin1 C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pDrive
TOP-/FOP-Flasch (<i>super eight</i>) Reporter	Upstate Biotechnology, Lake Placid USA

2.6 Zelllinien

Tabelle 2.10: Verwendete Zelllinien. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die aufgeführten Zelllinien verwendet und etabliert (*).

Zelllinien	Herkunft	Referenz
HEK-293	Embyonale Niere	(Graham et al., 1977)
HEK-293::Δ	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG
HEK-293::EpCAM	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM
HEK-293::Δ/HA-FHL2 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG und Vektor pIRES::HA-FHL2
HEK-293::EpCAM/HA-FHL2 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM und Vektor pIRES::HA-FHL2
HEK-293::Δ/HA-CGI128 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG und Vektor pIRES::HA-CGI128
HEK-293::EpCAM/HA-CGI128 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM und Vektor pIRES::HA-CGI128
HEK-293::Δ/SNTA1 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG und Vektor pIRES::HA-SNTA1
HEK-293::EpCAM/HA-SNTA1 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM und Vektor pIRES::HA-SNTA1
HEK-293::Δ/HA-Galectin1 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG und Vektor pIRES::HA-Galectin1
HEK-293::EpCAM/HA-Galectin1 *	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM und Vektor pIRES::HA-Galectin1
HEK-293::GFP	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor pEYFP-N1
HEK293::EpIC-GFP	Embyonale Niere	Transfiziert mit Vektor

HEK293::EpCAM-GFP	Embryonale Niere	pEYFP-N1::EpIC Transfiziert mit Vektor
A549	Lungen-Karzinom	pEYFP-N1::EpCAM ATCC CCL-185
ANT-1	Hypopharynx-Karzinom	(Mayer et al., 2005)
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC HTB 43
HCT-8	Kolon-Karzinom	ATCC CCL 244
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom	ATCC HTB 22
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI-13	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
SkBr3	Mamma-Karzinom	ATCC HTB-30

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Aufbewahrung und Kultivierung von permanenten Zelllinien

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxyd und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Standardmedium für adhärente und Suspensionszellen war Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Zur Generierung und Kultivierung stabiler Transfektanten wurde das Kulturmedium mit [200 µg/ml] Hygromycin B, [1 µg/ml] Puromycin oder [1,25 mg/ml] Neomycin supplementiert. Bei zweifachen stabilen Transfektanten wurde dem Kulturmedium [200 µg/ml] Hygromycin B und [1 µg/ml] Puromycin hinzugefügt. Adhärenz Zellen wurden zur Subkultivierung zunächst mit PBS serumfrei gewaschen, mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst, einmal in Medium mit 10% FKS gewaschen und anschließend in gewünschter Dichte ausplattiert. Die Zentrifugation von eukaryontischen Zellen zum Zweck der Konzentrierung oder des Waschens erfolgte bei 350g für 5-10 min bei 20°C.

Für die Kryokonservierung wurden Zellen (10^6 - 10^7 pro Aliquot) in 1 ml Einfriermedium aufgenommen (10% v/v DMSO, 40% FKS, 50% DMEM) und in ein 1,8ml Kryogefäß (Nunc) überführt. Zur langsamen Abkühlung wurden die Zellen zunächst in einem verschließbaren Styroporbehälter oder einem verschließbaren Gefäß mit Isopropanol in ein -80°C Gefriergerät gestellt. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurde der Inhalt der Kryogefäßen durch Resuspension mit Kulturmedium (Raumtemperatur) zügig aufgetaut, in mindestens 20 ml Medium verdünnt und anschließend zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in entsprechendem Kulturmedium verdünnt und kultiviert.

3.1.2 Verwendung von Protease- und Proteasominhibitoren

Zur Inhibition der Aktivität von γ -Sekretasen wurden verschiedene Inhibitoren verwendet: [10 μ M] DAPT (Sigma Aldrich), [60 nM] compound E (Alexis Biochemicals), [100 nM] compound 34 und [150 nM] compound X (Calbiochem). Für die spezifische Inhibition von TACE wurden die verschiedenen Inhibitoren in getrennten Experimenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt: [100 nM] TAPI-0, [100 nM] TAPI-1 und [40 μ M] TAPI-2 (Biomol). Die Inhibition der Proteasomaktivität wurde durch die Verwendung von [10 μ M] MG-132 (Calbiochem) erreicht. Die verwendeten Zelllinien wurden je nach Versuchsansatz für 12, 24 oder 48 h mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert.

3.1.3 Stimulation des Signalweges durch Verwendung von rekombinantem EpEX

Um die Aktivierung der EpCAM-Signalkaskade durch intermolekulare Wechselwirkungen zu überprüfen, wurden transiente HEK293EpCAM-YFP-Transfektanten über 30min bis 5h oder Einzelzellklone von FaDu Karzinomzellen für 24 h mit 1 μ g/6-Loch EpEX_{rec} (in Hefe rekombinant exprimierter extrazellulärer Domäne von EpCAM, Trion Pharma) inkubiert. Als Negativkontrolle diente Hitze inaktiviertes EpEX_{rec} (20 min bei 95°C).

3.1.4 Bestimmung der Zellzahlen

Zellzahlen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde jeweils ein Zellaliquot (10 μ l) mit einem Volumen einer 0,2%igen Trypanblaulösung (in 1xPBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind im Mikroskop an ihrer Blaufärbung erkennbar. Anschließend wurde die Gesamt- oder n-fache Zellzahl berechnet.

3.1.5 Generierung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten der verwendeten Zelllinien wurden diese zunächst mit PBS gespült, durch 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst, in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in

PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 280g und 20°C für 5 min. Die so erhaltenen Zellpellets wurden in Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde wahlweise 10-20 min bei Raumtemperatur (RT) oder 30 min bis 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Mittels Zentrifugation (10 min bei 4800g, 4°C) wurde die unlösliche Fraktion entfernt.

Zur Gewinnung von Kernextrakten wurden die Zellen nach dem Waschen mit Hilfe eines Kernextraktionskits (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, PIERCE) nach den Angaben des Herstellers behandelt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der verschiedenen Lysate erfolgte mittels BCA-Test (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers.

– Triton-Lysispuffer: TBS pH7,4; 0,5 oder 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2Tabletten/50ml)

– RIPA-Lysispuffer: 10 mM Tris pH8; 150 mM NaCl; 1% NP40; 0,5% Deoxycholat; 0,1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Complete (Roche); immer frisch dazu gegeben: 5 mM EDTA; 2 mM Phenanthroline (Sigma)

3.1.6 Generierung von Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen wurde das Medium von kultivierten Zellen abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4800g für 15 min, um vorhandene Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden als Suspensionskultur in Luria Broth Medium (LB) oder zur Vereinzlung von Kolonien auf LB-Agar-Platten bei 37°C kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) zugefügt. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienflüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

– LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH7,2

– Bacto-Agar-Platten: 12,5% Bacto-Agar in 1l LB-Medium

– Endkonzentrationen der Antibiotika:

<i>Ampicillin</i>	100µg/ml
<i>Kanamycin</i>	30µg/ml

3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte durch Inkubation einer *E.coli* DH5α Kultur in TFBI- und TFBII-Puffer auf Eis (Hanahan, 1983). Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

– TFBI-Puffer: 100 mM KCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM KAc; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH5,8 (immer frisch)

– TFBII-Puffer: 10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH7,0 (bei 4°C aufbewahren)

3.2.3 Transformation von *E.coli*

Zu einem Aliquot (100 µl) der chemisch kompetenten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes oder 1 ng Plasmid-DNA pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec ausgesetzt und erneut für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium und einer 30- bis 45-minütigen Anzucht bei 37°C unter leichtem Schütteln wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Hefekultur

3.3.1 Vermehrung und Aufbewahrung transformierter Hefeklone

Hefezellen wurden als Suspensionskultur in SD- (Synthetic Dropout) Medium oder zur Vereinzelnung der Kolonien auf SD-Agarplatten bei 30°C über Nacht (Flüssigkultur) oder für zwei bis drei Tage auf Platten kultiviert. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks fehlten dem Medium -Trp/-Leu/-His/-Ade.

Zur Lagerung von Hefezellen über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Flüssigkultur mit 25% Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

– SD-Medium: 26,7 g/l Minimal SD Base -Trp/-Leu/-His/-Ade (DB Bioscience Clontech), 100 ml/l 10x Dropout-Ergänzung

3.3.2 Generierung von Lysaten

Zur enzymatischen Lyse der Hefezellwand wurden die Zellen für 2 h bei 37°C mit einer Lyticase-Lösung (5 U/μl) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen in einer 20% SDS-Lösung für 1min gevortext und auf -20°C schockgefroren.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Die Anwendung allgemein gängiger Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt werden, wie Phenol-Chloroform-Extraktion, Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren und deren Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase, Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über Affinitätsmatrices, Ligation freier DNA-Enden, *etc.* erfolgt in Anlehnung an Standardprotokolle (Maniatis et al., 1989) und nach Angaben der Hersteller entsprechender Kits.

3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Fragmente wurden, je nach ihrer Größe, in Agarose-Gelen geeigneter Konzentration (1 - 2,5%) und Zusammensetzung aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei dem Logarithmus der Fragmentgröße umgekehrt proportional. Die Laufbedingungen wurden durch die Spannung begrenzt, die sich aus dem Abstand der beiden Elektroden berechnet und etwa 3 V/cm betragen sollte. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,75 μg/ml) versetzt.

DNA:

- Agarose-Gel: Agarose (je nach Konzentration des Gels) in 1xTBE
- DNA-Laufpuffer: 45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA (1xTBE)
- 6x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin in Wasser
- Marker: Gene Ruler 1 kb DNA- Marker (250 bp - 10 kb), φX174 DANN/BsuRI (HaeIII) Marker (72-1353 bp), 50 bp DNA-Marker (50-1031 bp), Fermentas

RNA:

- Agarose-Gel: 1% Agarose, 10% MOPS, 4,4% Formaldehyd in dH₂O
- Laufpuffer: 1 M MOPS, 3 M NaAc, 0,5 M EDTA (5x)
- Ladepuffer: 50% Formamid, 15% Formaldehyd, 10% 10xMOPS-Puffer, 15% dH₂O

3.4.2 Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR-Reaktionen wurden nach einem Zwei-Stufen-Protokoll durchgeführt. Die reverse Transkription und die nachfolgende PCR fanden in separaten Reaktionsgefäßen statt. Die zunächst aus Zellen isolierte RNA wurde immer mit DNase behandelt und mittels PCR auf das Vorhandensein von genomischer DNA überprüft. 1 µg RNA wurde in einem 'Reverse Transcription System' (Promega) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Darin enthalten waren 2 µl des 10x PCR-Puffers, je 1 pmol des Sense- und Antisenseprimers, [2,5 mM] MgCl₂, [200 µM] dNTPs, 1 U Taq-Polymerase und 1 µl cDNA. Die Amplifikation erfolgte in 25-32 Zyklen mit jeweils einer 30 sec Denaturierungsphase bei 95°C, 30 sec Annealingphase bei 53-67°C und einer 30 sec Elongationsphase bei 72°C. Die quantitative Analyse der Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Plasmid-DNA wurde aus Hefezelllysaten mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (25:24) gewonnen und mit 100%igem Ethanol präzipitiert. Die Ausbeute an Plasmid-DNA war im Gegensatz zu genomischer DNA sehr gering, sodass die Konzentration weder im Photometer noch im Agarosegel bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Plasmid-DNA durch eine Transformation und anschließende Anzucht in *E.coli* (AH109) amplifiziert. Nach der Bakterienlyse wurde die Plasmid-DNA über adsorptive GFX-Säulen (Amersham Pharmacia) isoliert.

3.5 *In vitro* Transkriptions- und Translationssystem zum Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktionen

Als Matrize für die Transkription dienten enzymatisch verdaute, linearisierte Plasmid-DNA-Moleküle. Die DNA wurde nach der Linearisierung durch Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt. Transkription und Translation wurden in zwei getrennten Reaktionen durchgeführt.

3.5.1 Transkription

1 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde mittels T7-Polymerase transkribiert und in einem geeigneten Reaktionsansatz (10 mM dNTPs, 50 U RNase-Inhibitor, 30 U T7-Polymerase, 2x T7-Polymerase-Puffer) für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung der Transkriptionsreaktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Nach einer Aufreinigung mittels Ethanol-Fällung wurde die RNA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.2 Translation

1 µg RNA wurde in 70%igem Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega) translatiert. Der Reaktionsansatz enthielt zudem RNase-Inhibitor (80 U) und Aminosäuren (Amino Acid Mixture -Leu/-Met, [2 mM]). Die Translationsreaktion erfolgte durch Inkubation des Ansatzes (100 µl) für 90 min bei 30°C. Zum Nachweis der Translationsprodukte wurden 25 µl des Reaktionsansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen und die jeweiligen Proteine im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert (siehe Kapitel 3.9).

3.5.3 Protein-Protein-Bindungsanalyse

Zum Nachweis einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung wurden die Translationsansätze zweier Proteine mit einer Antikörper-Protein-G-Matrix (siehe Kapitel 3.8 Ko-Immünpräzipitation) über Nacht bei 4°C in Triton-Lysispuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Acrylamidgel und die Visualisierung im Western-Blot-Verfahren (siehe Kapitel 3.9).

– Lysispuffer: 0,1% NP40; 1% Glycerin; 0,1% Ethanol; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2 Tabletten/50 ml) in PBS

3.6 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA oder siRNA erfolgte unter Verwendung des MATra-A Reagenz (IBA). Zu diesem Zweck wurden Zellen für 24 h unter Standardbedingungen in 6-Loch-Platten bis zu einer Dichte von 70-80% kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Stabile Transfektanten wurden durch anschließende Selektion mit Hygromycin (max. Konz. 200 µg/ml), Puromycin (max. Konz. 1 µg/ml) oder Neomycin (1,25 mg/ml) gewonnen. Die Transfektanten konnten bei Bedarf 1 h nach der Transfektion trypsiniert und zur weiteren Kultivierung in Petrischalen oder Zellkulturflaschen umplattiert werden. Die spezifische Ziel-mRNA Erkennung der verwendeten siRNA wurde vorab mittels BLASTsearch (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) überprüft.

3.7 FACS-Analyse

3.7.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz verschiedener eukaryontischer Zelllinien mit Plasmid erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers (fluorescence-activated cell sorter, FACS). Dafür wurden Zellen mit einem „*Yellow Fluorescence Protein*“ (YFP)-Vektor (pEYFP-N1) transient transfiziert. Die Menge des gebildeten gelben Fluoreszenzproteins (YFP) wurde 24 h nach der Transfektion im FACS bei einer Wellenlänge von 492-525 nm (FL-1) bestimmt.

3.7.2 Bestimmung der Oberflächenexpression eines Proteins

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Membranproteinen verschiedener Zelllinien oder unterschiedlich behandelte Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Dazu wurden die trypsinierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in einer

1:50 Verdünnung des entsprechenden Primärantikörpers in FACS Puffer (1,1 mg/ml) für 10-15min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem entsprechenden α -IgG-FITC-markierten Sekundärantikörper (1 mg/ml), ebenfalls 1:50 in FACS Puffer verdünnt, für 10-15 min inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Sekundärantikörperbindung wurde ein Teil der Zellen nur mit diesem behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und je nach Zellmenge in 300-500 μ l FACS Puffer aufgenommen. Im FACS wurde die Oberflächenexpression des entsprechenden Moleküls mittels CellQuest (FACS-Analyseprogramm) bezogen auf die Kontrolle bestimmt. Um die Expression verschiedener Versuchsansätze untereinander zu vergleichen, wurden die von CellQuest angegebenen Mittelwerte der Fluoreszenz in Bezug zueinander gesetzt.

– FACS-Puffer: PBS mit 5% FKS (Maniatis et al., 1989)

3.7.3 Propidiumiodid-(PI)-Analyse

Für die PI-FACS-Analyse wurden die bereits antikörpermarkierten Zellen für 10-15 min bei RT und im Dunkeln mit PI-Färbelösung (2 μ l/ 500 μ l FACS Puffer) inkubiert. Die Färbung diente der Überprüfung der Zellvitalität.

– PI-Färbelösung: 10 U RNase (DNase frei), 50 μ g/ml Propidiumiodid, 2 mM EDTA in PBS

3.8 Ko-Immunpräzipitation

Die Antikörper wurden auf Protein-G-Sepharose immobilisiert (1,5 μ g Antikörper pro 30 μ l Sepharose, 30 min bei RT) und kovalent gekoppelt (Schneider et al., 1982). Die Antikörper-Protein-G-Matrix wurde bei 4°C mit Lysaten aus Zelllinien (siehe Kapitel 3.1.5), oder mit Zellkulturüberständen (siehe Kapitel 3.1.6), über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Matrix zur Entfernung unspezifischer Bindungen sechsmal mit Lysispuffer gewaschen. Die präzipitierten Proteine und Proteinkomplexe wurden im Proteinauffangpuffer durch Erhitzen (8 min bei 95°C) denaturiert und eluiert (Laemmli, 1970). Die Detektion der Immunpräzipitate und Ko-Immunpräzipitate erfolgte anschließend mittels Westen-Blot (siehe Kapittel 3.9).

– Lysispuffer: TBS pH7,4; 0,5 oder 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2Tabletten/50ml)

– Proteinauftrapuffer: 140 mM Tris-HCl pH7,0; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% Merkaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau

3.9 Western-Blot

Proteinlysate wurden in 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen oder 17,5%igen Tris-Tricin-Gelen in einer vertikalen Elektrophorese unter definierten Laufbedingungen (Fokussierung: 15 min bei 15 mA/Gel, 180 V; Trennung: 30 mA/Gel, 180 V) aufgetrennt. SDS-Polyacrylamidgele liefen bei RT, wohingegen Tris-Tricin-Polyacrylamidgele unter Kühlung liefen. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Western-Blot: 100 V, max. 500 mA, 45 min oder 3-5 h). Ein kurzes Schwenken der Membran in Methanol diente zur Fixierung der Proteine. Durch 20-minütige Inkubation der Membran im Blockpuffer wurden unspezifische Bindungen von Antikörpern verhindert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern (1:250 bis 1:2500 in Primärantikörper-Puffer) und entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:5000 in Block-Puffer). Die Detektion der Peroxidase-Reaktion erfolgte wahlweise mit dem 'Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate' (Millipore) oder dem 'ECL Blotting Substrate' (PIERCE).

- SDS-Polyacrylamidgel: Sammelgel (4%): 30% Acrylamid; 2 M Tris pH6,8; 0,5 M EDTA
 - Trenngel: 30% Acrylamid; 2 M Tris pH8,9, 0,5 M EDTA
- 10 x Laufpuffer: 250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
- Tris-Tricin-Gel: Sammelgel (4%): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH8,45; 0,3% SDS
 - Spacer Gel (10%): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH8,45; 0,3% SDS
 - Trenngel (15 ml): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH8,45; 0,3% SDS; 5,4 g Harnstoff
- 10x Tris-Tricin Kathoden-Puffer: 0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS
- 10x Tris-Tricin Anoden-Puffer: 0,2 M Tris pH8,9 (mit 6N HCl einstellen)
- 10 x Blotting-Puffer: 250 mM Tris, 1,26 M Glycin
- Waschpuffer: PBS mit 0,2 % Tween
- Blockpuffer: 5% w/v Magermilchpulver in Waschpuffer
- Primärantikörper-Puffer: 3% w/v BSA in Waschpuffer

3.10 Zweidimensionale native Gelelektrophorese

3.10.1 1. Dimension: Natives Gradientengel

Zellkerne von stabilen HEK293EpCAM-YFP-Transfektanten und FaDu Karzinomzellen wurden nach Angaben des Herstellers isoliert (Nuclei preparation Kit, Sigma) und in Lysispuffer aufgenommen. Zur Entfernung der unlöslichen Kernreste folgte eine

Zentrifugation bei 44000g und 4°C für 15 min. Die „*Blue native-PAGE*“ wurde mit leichten Veränderungen nach der Methode von Schagger und Jagow (1991) durchgeführt. Kernextrakte (300 µg) wurden in Ladepuffer aufgenommen und in einem 5-12%igen nativen Gradientengel unter definierten Bedingungen (2 mA; 4°C; über Nacht) aufgetrennt. Die Visualisierung nativer Protein-Komplexe erfolgte im Western-Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper.

- Lysispuffer: 750 mM α -Aminocarbonsäure; 0,5 mM EDTA in 50 mM Tris pH7; Protease Inhibitor Complete (Roche)

- Ladepuffer: 750 mM α -Aminocarbonsäure, 5% Coomassie G-250

3.10.2 2. Dimension: Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung nativer Komplexe wurde die entsprechende Spur des nativen Gels ausgeschnitten, um 90° gedreht und auf ein 17,5%iges Tris-Tricin-Acrylamidgel aufgelegt. Die Auftrennung des Komplexes erfolgte unter definierten Bedingungen (siehe Western-Blot Kapitel 3.9). Die einzelnen Proteine des Komplexes wurden anschließend im Western-Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert.

3.11 „Electromobility Shift Assay“ (EMSA)

Zur Identifizierung der Bindung eines Proteinkomplexes an spezifische DNA-Bindesequenzen wurden „*Electromobility Shift Assays*“ (EMSAs) durchgeführt. Der Nachweis dieser Bindungen erfolgte mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden: zum einen wurden DNA-Oligonukleotide radioaktiv markiert und unter entsprechenden Bedingungen mit Kernextrakten inkubiert, zum anderen wurde bereits biotinmarkierte Oligonukleotide verwendet (EMSA Kit, Panomics).

3.11.1 Band-Shift-Assay unter Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Einzelsträngige DNA-Oligonukleotide gewünschter Sequenz und entsprechende Kontroll-DNA wurden zunächst mit Hilfe des Klenow-Fragments (Fermentas) an den Enden radioaktiv markiert. Zu diesem Zweck wurden die komplementären DNA-Primer (200 µM je Primer) in

einem geeigneten Reaktionsansatz (1 U Klenow; 1x Klenow-Puffer; dNTP-Mix; 15000 Ci α dATP) 30 min bei 30°C inkubiert. In einer anschließenden Reaktion wurden die zwei komplementären Einzelstränge zu doppelsträngiger DNA verbunden und über *Nick*-Säulen (Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden dienten im „*Band-Shift-Assay*“ als Konsensussequenz für die Bindung geeigneter Proteinkomplexe.

Die Bindung der Proteinkomplexe an spezifische radioaktiv markierte DNA-Bindesequenzen erfolgte unter folgenden Bedingungen: es wurden 5-10 μ g Kernextrakt (siehe Kapitel 3.1.5) mit 1 μ g Poly dI-dC (Roche) und radioaktiv markierter DNA (60000 cpm) in 1x EMSA-Puffer für 20-30 min bei RT inkubiert. Zum Nachweis der Spezifität der gebildeten Komplexe wurde in einige Ansätze unmarkierte DNA-Probe der gleichen Sequenz titriert. Ebenso wurde mutierte DNA verwendet, um die Spezifität der Proteinbindung an die DNA nachzuweisen.

3.11.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie

DNA-Protein-Komplexe wurden in einem nativen 12%igem Polyacrylamid-Gel (0,5x TBE; 30% Acrylamid; 0,3% Glycerin) unter geeigneten Laufbedingungen (8-10 h; 20 mA; max.V; 4°C) aufgetrennt. Zur Durchführung der Autoradiographie wurden die Gele zunächst fixiert (10% Essigsäure; 10% Methanol in dH₂O) und anschließend getrocknet (80°C; 45 min). Die Belichtung der Filme (Hyperfilm ECL, Amersham) erfolgte bei -80°C über 12-96 h.

3.11.3 Verwendung biotinmarkierter DNA-Sonden

Alternativ zu Kapitel 3.11.2 wurde ein EMSA-Kit (Panomics) mit biotinmarkierten DNA-Sonden verwendet. 5-10 μ g Kernextrakt (siehe Kapitel 3.1.5) wurden mit biotinylierter DNA nach Angaben des Herstellers inkubiert. Für die Durchführung einer *Super-Shift*-Reaktion wurden die Kernextrakte wahlweise für 1 h vor der DNA-Bindungsreaktion oder für 5 min nach der Reaktion mit 10 μ g proteinspezifischem Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebildeten DNA-Proteinkomplexe erfolgte nach Auftrennung über ein natives Polyacrylamid-Gel (siehe Kapitel 3.11.2) und anschließender Chemilumineszenz-Detektion nach Angaben des Herstellers (Panomics).

3.12 Luziferase-Assay

$3 \cdot 10^5$ HCT-8-Kolonkarzinomzellen in 6-Lochplatten ausplattiert und 24h später mit 0,5 μg super-8 TOP- oder FOP-Flash-Reporterkonstrukten (Upstate Biotechnology, Lake Placid USA) und 200 pmol einer EpCAM- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Zur Überprüfung der Aktivität der Reporter wurden Zellen in einem parallelen Ansatz mit einer konstitutiv aktive Mutante von β -Catenin (S33Y) transfiziert. Zur Normierung der Luziferaseaktivität wurden alle Zellen zusätzlich mit 0,1 μg eines β -Galactosidase-Reporters transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der trypsiniert, ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend in 150 μl Lysispuffer (Roche) lysiert. Die β -Galactosidase- sowie die Luziferaseaktivität wurden mittels entsprechender Kits (Roche; Bio Thema) nach Angaben des Herstellers im bestimmt. Es wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. An Hand der Mittelwerte wurde anschließend die Top-Flasch-Luciferaseaktivität bestimmt.

3.13 Immunhistochemische Schnitffärbung

Gewebeproben von Karzinomen und gesundem Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt. Die 4 μm dicken Gefrierschnitte wurden auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen, getrocknet und mit Aceton fixiert (Brock et al., 1999). Für die Anwendung dieser Färbemethode dienen frisch angefertigte Schnitte. Die Gewebeschnitte wurden zunächst zweimal für 5 min in eiskaltem HBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurden sie einmal für 5 min bei 4°C und nachfolgend einmal für 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit Paraformaldehyd behandelt. Nach erneutem drei Mal 5-minütigem Waschen mit HBS-Puffer bei RT wurden die Proben für 1 min mit -20°C kaltem Methanol behandelt und danach erneut 5 min mit HBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss an die Fixierung nach Brock *et al.* (Brock et al., 1999) wurde direkt mit der immunhistochemischen Färbung fortgefahren.

Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde eine 0,3%ige Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) verwendet. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte 25 min mit Normalserum (1:100; Serum des Tieres in dem der Zweitantikörper produziert wurde) oder bei Verwendung eines Avidin-Biotin-Systems mit 100 μl Avidin-D-Lösung/1 ml Normalserum behandelt. Die Primärantikörper wurden in 1:10 bis 1:500 Verdünnungen eingesetzt und zwischen 1 bis 4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C

inkubiert. Als Negativkontrolle wurde PBS an Stelle des Primärantikörpers verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Triton wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (1-2 h) oder mit biotinyliertem Brückenantikörper (1 h) und Avididin-Biotin- oder für Immunfluoreszenz Fluorochrom-Streptavidin-Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Im Falle der Fluoreszenzfärbung wurden die Zellkerne mittels DAPI (Hoechst 33342) angefärbt. Anschließend wurden die Proben in Moviol fixiert. Bei der Immunhistologie diente Aminoethylkarbazol als Chromogen (Hsu et al., 1981). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Mayers Hämatoxin.

Bei Doppelfärbungen wird nach dem gleichen Schema verfahren. Antikörper verschiedener Spezies können simultan inkubiert werden. Eines der beiden verwendeten Detektionssysteme muss in diesem Fall direkt konjugiert sein. Bei dem ersten Detektionsschritt ist der Sekundärantikörper Fluorochrom-konjugiert z.B. Alexa 488 Sekundärantikörper detektiert. Das zweite Detektionssystem wird über einen biotinylierten Brückenantikörper verstärkt und anschließend über einen geeigneten Fluorochrom-konjugierten Streptavidin-Antikörper (Alexa 647) detektiert. Bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung erfolgt die Gegenfärbung ebenfalls mittels DAPI (Hoechst 33342). Die Einstellungen des konfokalen Mikroskops orientieren sich immer an der Negativkontrolle. Die Färbeintensität der einzelnen Proben wurde von zwei Experimentatoren unabhängig von einander bestimmt.

– HBS-Puffer (pH7.4): 78,8 g NaCl, 7,4 g KCl, 0,81 g MgCl₂, 1,1 g CaCl₂, 23,6 g Hepes auf 1 l A.dest

3.14 Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen wurden an adhärenenten, stabil transfizierten Zellen oder Karzinomzellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu auf Superfrost plus Objektträger in Quadriperm Kulturschalen ausplattiert und für 24 h bis 48 h kultiviert. Die Proben wurden nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, nach Brock fixiert und direkt gefärbt. Die Färbeschritte wurden, wie bereits in Kapitel 3.12 beschrieben, durchgeführt.

4. Ergebnisse

Wie einleitend bereits ausführlich dargestellt, ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ein Ca^{2+} unabhängiges Glykoprotein, das zahlreiche Tumore epithelialen Ursprungs überexprimieren. Auf Grund dessen ist das Molekül bevorzugtes Ziel für die Entwicklung verschiedener, auf Antikörpern basierenden, Therapeutika. Über die Funktion von EpCAM in Zusammenhang mit der Karzinogenese ist bis heute nicht viel bekannt. Die bisherigen Forschungsergebnisse sind größtenteils deskriptiv. Funktionelle Daten weisen darauf hin, dass die intrazelluläre Domäne des Moleküls (EpIC) bei der Induktion EpCAM-spezifischer Effekte (c-Myc-Induktion, Proliferation) essentiell ist (Munz et al., 2004). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Lokalisation des Moleküls in Karzinomzelllinien (Kapitel 4.1.1) und primärem Gewebe (Kapitel 4.3.1) detailliert untersucht. Anschließend wurden membranständige, zytoplasmatische und nukleäre Interaktionspartner identifiziert und ihre Interaktion mit EpCAM validiert (Kapitel 4.1.2; 4.4.1). Des Weiteren wurde die Rolle der EpCAM-spezifischen Interaktionen im Zusammenhang mit der Expression von c-Myc und der Proliferation funktionell analysiert. Zudem wurde die Möglichkeit der Induktion der EpCAM-Spaltung und somit der Aktivierung der Signaltransduktion durch intermolekulare Wechselwirkung endogenen EpCAMs mit einer rekombinanten Form der extrazellulären Domäne von EpCAM (EpEX_{rec}) untersucht.

4.1 Regulierte proteolytische Spaltung von EpCAM

Die Membranlokalisierung von EpCAM wurde bisher unter Verwendung verfügbarer Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne (EpEX) gerichtet waren, gezeigt. Es war bislang jedoch nicht möglich, die Lokalisation der intrazellulären Domäne von EpCAM (EpIC) in der Zelle zu bestimmen. Mit der Verfügbarkeit eines kommerziellen Antikörpers gegen EpIC (1144, Epitomics) konnte die Lokalisation der Domäne erstmals in Karzinomzelllinien untersucht werden.

Die Lokalisation von EpEX und EpIC wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien (FaDu, HCT-8, MCF-7, PCI) untersucht. Zu diesem Zweck wurden Doppelfärbungen mit EpEX- und EpIC-spezifischen Antikörpern in Kombination mit zwei unterschiedlichen immunfluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa-488- bzw. Alexa-647-konjugiert)

durchgeführt. Die Lokalisation der beiden Domänen wurde mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops visualisiert.

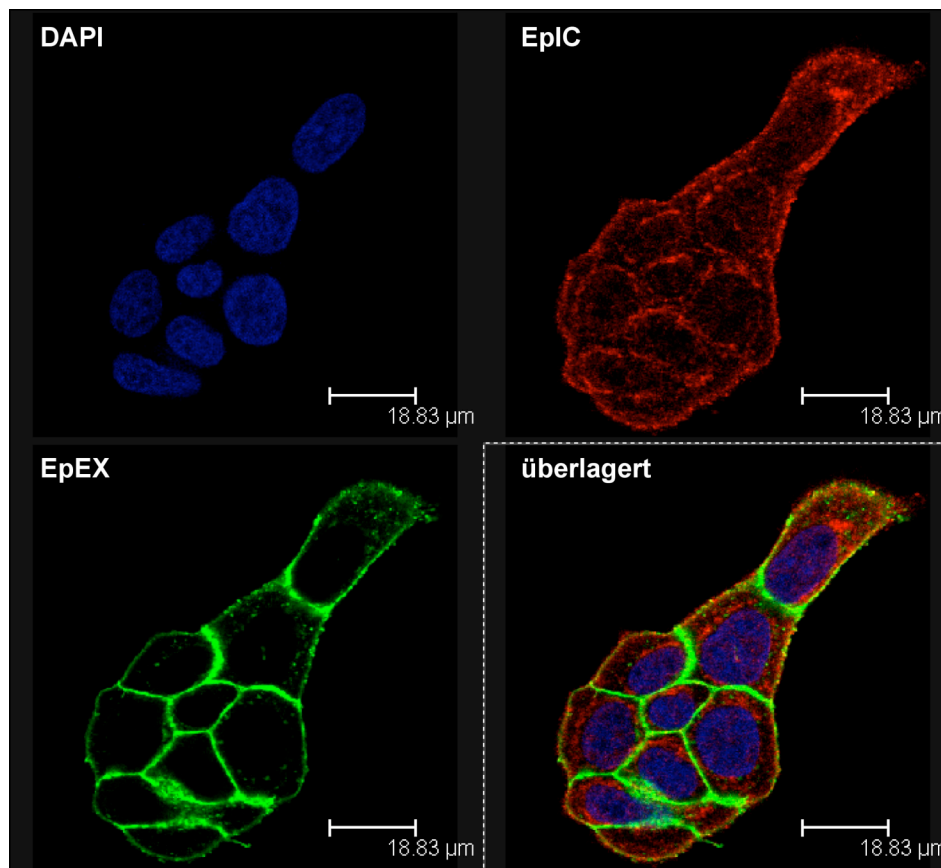


Abbildung 4.1: FaDu-Hypopharynx-Karzinomzellen wurden mit EpEX- und EpIC-spezifischen Antikörpern in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa-488 und Alexa 647) gefärbt. Die Lokalisation von EpIC (rot, oben rechts) und EpEX (grün, unten links) wurde durch Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen. Die Kerne wurden mit Hoechst 33342 (blau, oben links) gefärbt. Die Überlagerung der EpEX- und EpIC-Färbung zeigte eine Ko-Lokalisation der beiden Domänen an den äußeren Membranen (gelbe-orangene Färbung). In Zell-Zell Kontaktbereichen konnte nur EpEX detektiert werden. EpIC lokalisierte vorwiegend im Zytoplasma. Hier kommt es zu einer Akkumulation des Proteins im perinukleären Bereich. Zudem konnte EpIC mit einem punktuellen Muster im Kern detektiert werden.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, lokalisiert EpEX (grün) in FaDu-Hypopharynx-Karzinomzellen, wie erwartet, an der Zellmembran. In Zellaggregaten, in denen ein enger Zell-Zell-Kontakt besteht, kam es in den Kontaktbereichen zu einer starken EpEX-Färbung. Das Färbemuster von EpIC (rot) in diesen Zellen war nicht erwartungsgemäß. Eine Überlagerung der beiden Einzelfärbungen zeigte überraschenderweise, dass es nur in Teilbereichen der Membran zu einer Ko-Lokalisation von EpEX und EpIC kam. Auffällig war, dass an Zellmembranen, in denen Kontakt zu benachbarten Zellen bestand, nur EpEX detektiert wurde. EpCAM war demnach in diesen Bereichen nicht als intaktes Molekül vorhanden. Grund für diese Annahme war die negative EpIC-Färbung. In Membranbereichen,

in denen kein Kontakt zu anderen Zellen bestand, konnte eine Ko-Lokalisation der beiden Domänen gezeigt werden. Bei der Detektion von EpIC in Karzinomzelllinien zeigte sich eine weitere Besonderheit. Die EpIC-spezifische Färbung wies eine starke Konzentration des Moleküls in den perinukleären Bereichen des Zytoplasmas auf. Ebenso konnte eine deutliche, punktuelle Lokalisation von EpIC im Zellkern detektiert werden (Abb. 4.2, FaDu-Hypopharynx-Karzinomzellen).

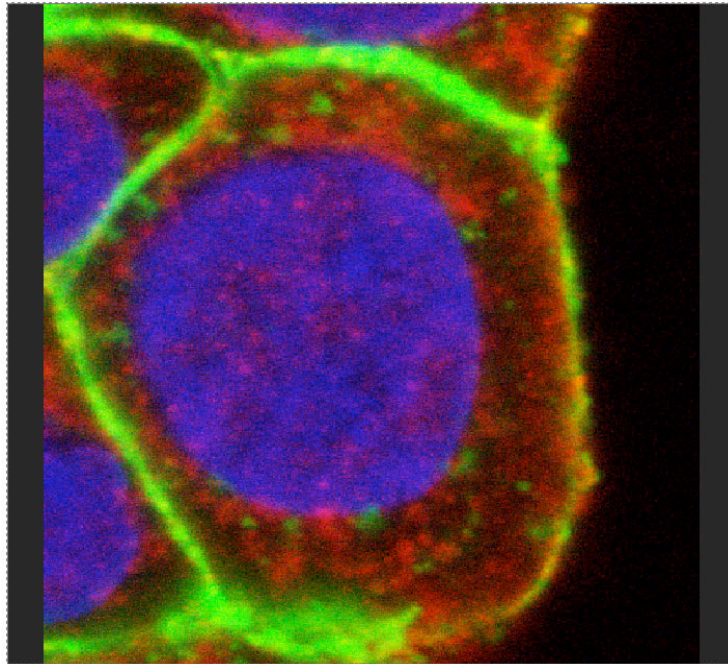


Abbildung 4.2: Vergrößerung einer FaDu-Karzinomzelle aus dem Zellverband in Abb. 4.1. EpIC (rot) lokalisiert deutlich sichtbar im Zytoplasma und als distinkte Sprenkel im Zellkern.

Die Spezifität des EpIC-Antikörpers in Immunfluoreszenzexperimenten war bisher noch unerforscht. Daher wurde diese in Präadsorptionsexperimenten überprüft. Hierzu wurde der Antikörper (AK) vor der Zellfärbung mit Peptid, bestehend aus den 26 Aminosäuren (AS) der EpIC-Domäne, präinkubiert. Anschließend wurden FaDu-Zellen in einem Parallelansatz mit präadsorbiertem und unbehandeltem EpIC-Antikörper gefärbt. Die Färbung der Zellen zeigte, dass nach Präadsorption des Antikörpers an das antigene Peptid die Detektion von EpIC nicht mehr möglich war (Abb. 4.3, links). In FaDu-Zellen, die mit unbehandeltem EpIC-AK gefärbt wurden, konnte EpIC bei gleichen Bedingungen in gewohnter Weise detektiert werden (Abb. 4.3, rechts).

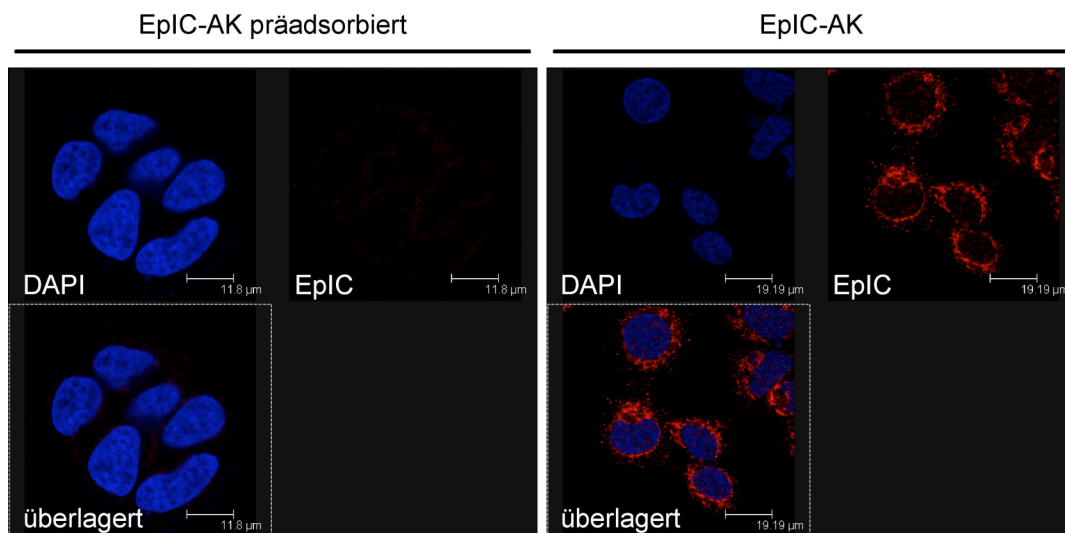


Abbildung 4.3: Analyse der Spezifität des EpIC-Antikörpers. FaDu-Karzinomzellen wurden mit präadsorbiertem oder unbehandeltem EpIC-spezifischem Antikörper in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa-647) gefärbt und durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt.

Die Detektion von EpEx und EpIC in verschiedenen Karzinomzelllinien wies eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Domänen auf, die auf eine Spaltung des EpCAM-Moleküls hindeutete. Eine Analyse von Zellysaten im Immunblot sollte zeigen, ob die beiden Domänen tatsächlich getrennt voneinander existieren. Zu diesem Zweck wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293, (Graham et al., 1977) stabil mit einem EpCAM-Expressionsvektor (pCAG-EpCAM, HEK293EpCAM-Zelllinie) oder mit dem entsprechenden Leervektor (pCAG, HEK293 Δ -Zelllinie) transfiziert (Munz et al., 2004). EpCAM-negative HEK293 Δ -Zellen dienten als Kontrolle für die spezifische Detektion von EpIC. In Lysaten dieser Zellen konnte im Immunblot kein Signal für EpCAM detektiert werden. In HEK293EpCAM-Zellysaten hingegen konnte das gesamte Molekül (EpCAM, 37 kDa) und ein weiteres EpIC-spezifisches Produkt mit einer Größe von ca. 5 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.4a, links). Die Möglichkeit der EpCAM-Spaltung wurde zusätzlich mit Hilfe eines EpCAM-YFP-Fusionsproteins überprüft. Lysate von HEK293EpCAM-YFP-Zellen (pEYFP-EpCAM) wurden mittels EpIC- und YFP-spezifischen Antikörpern im Immunblot untersucht (Abb. 4.4c). Neben EpCAM-YFP (63 kDa) konnte ein Protein in der Größe von EpIC-YFP (32 kDa) detektiert werden (Abb. 4.4c). Des Weiteren wurde ein zusätzliches Spaltprodukt (ca. 35-37 kDa) detektiert. Um die Proteingröße von EpIC-YFP überprüfen zu können, wurden Lysate von HEK293EpIC-YFP- (pEYFP-EpIC) und HEK293YFP-Zellen (pEYFP-N1) im Immunblot parallel aufgetragen. Diese beiden experimentellen Ansätze lieferten den biochemischen Beweis für die Abspaltung EpICs von ektopisch exprimiertem EpCAM.

Der Beweis der Existenz endogener Spaltprodukte in Karzinomzellen erfolgte durch die Analyse von FaDu-Zelllysaten. Zur Kontrolle des Laufverhaltens von EpIC wurde ein synthetisches Peptid, bestehend aus den 26 AS der EpIC-Domäne, im selben Immunblot aufgetrennt. Dieses Peptid hatte im Tris-Tricin-Gel ein nominelles Molekulargewicht von 5 kDa. Vorversuche mit dem spezifischen Peptid wiesen auf eine geringe Stabilität von EpIC im Zelllysate hin. Zur Verhinderung der Degradation wurden FaDu-Zellen vor der Analyse mit Proteasominhibitoren (MG-132) behandelt. Wie der Abbildung 4.4a zu entnehmen ist, konnten in diesen FaDu-Zellen EpIC-spezifische Proteine unterschiedlicher Größe detektiert werden: EpCAM (37 und 40 kDa), ein EpIC-spezifisches-Spaltprodukt (10 bis 14 kDa) und EpIC (ca. 5 kDa) (Abb. 4.4a rechst). Die Detektion des Spaltproduktes und die von EpIC waren erst nach längerer Belichtung möglich (Abb. 4.4a unten). In Zelllysaten unbehandelter FaDu-Zellen war EpIC nicht nachweisbar, sodass von einer raschen und effizienten Degradation EpICs durch das Proteasom ausgegangen werden musste. Mit Hilfe des EpEX-spezifischen Antikörpers konnte auf derselben Membran lediglich das Gesamtmolekül detektiert werden (Abb. 4.4a mitte).

Die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) ist bekannter Mechanismus der Rezeptoraktivierung, welcher bei einer Reihe von plasmamembranständigen Rezeptoren beschrieben wurde, so unter anderem bei Notch-1, APP, SorLA, CD44, und L1 (Hampe et al., 2000; Mumm et al., 2000; Stoeck et al., 2006) Eine proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne, Ektodomäne genannt, ist stets die Grundvoraussetzung für die folgende Spaltung der intrazellulären Domäne (Schroeter et al., 1998). Aus diesem Grund wurde ein Immunpräzipitationsexperiment (IP) aus Zellkulturüberständen EpCAM-positiver Zellen durchgeführt, das den Nachweis einer potentiellen Ektodomäne von EpCAM zum Ziel hatte. Durch die Verwendung eines EpEX-spezifischen Antikörpers konnte EpCAM aus Zellkulturüberständen isoliert werden (Abb. 4.4b oben, 2.Spur). Die isolierte EpCAM-Domäne stellte eine genuine Ektodomäne dar, die keinen intrazellulären Anteil umfasste (Abb. 4.4b unten). Zur Kontrolle wurden IPs gleichermaßen mittels EpIC-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Diese erlaubten keine Isolation von EpCAM oder der Ektodomäne (Abb.4.4b oben, 4.Spur). Eine Spaltung von endogenem EpCAM konnte somit biochemisch nachgewiesen werden. Bei dieser Spaltung entstehen eine lösliche Ektodomäne (EpEX), welche in den Kulturüberstand freigesetzt wird, und eine intrazelluläre Domäne (EpIC), welche ins Zytoplasma und anschließend in den Zellkern transloziert.

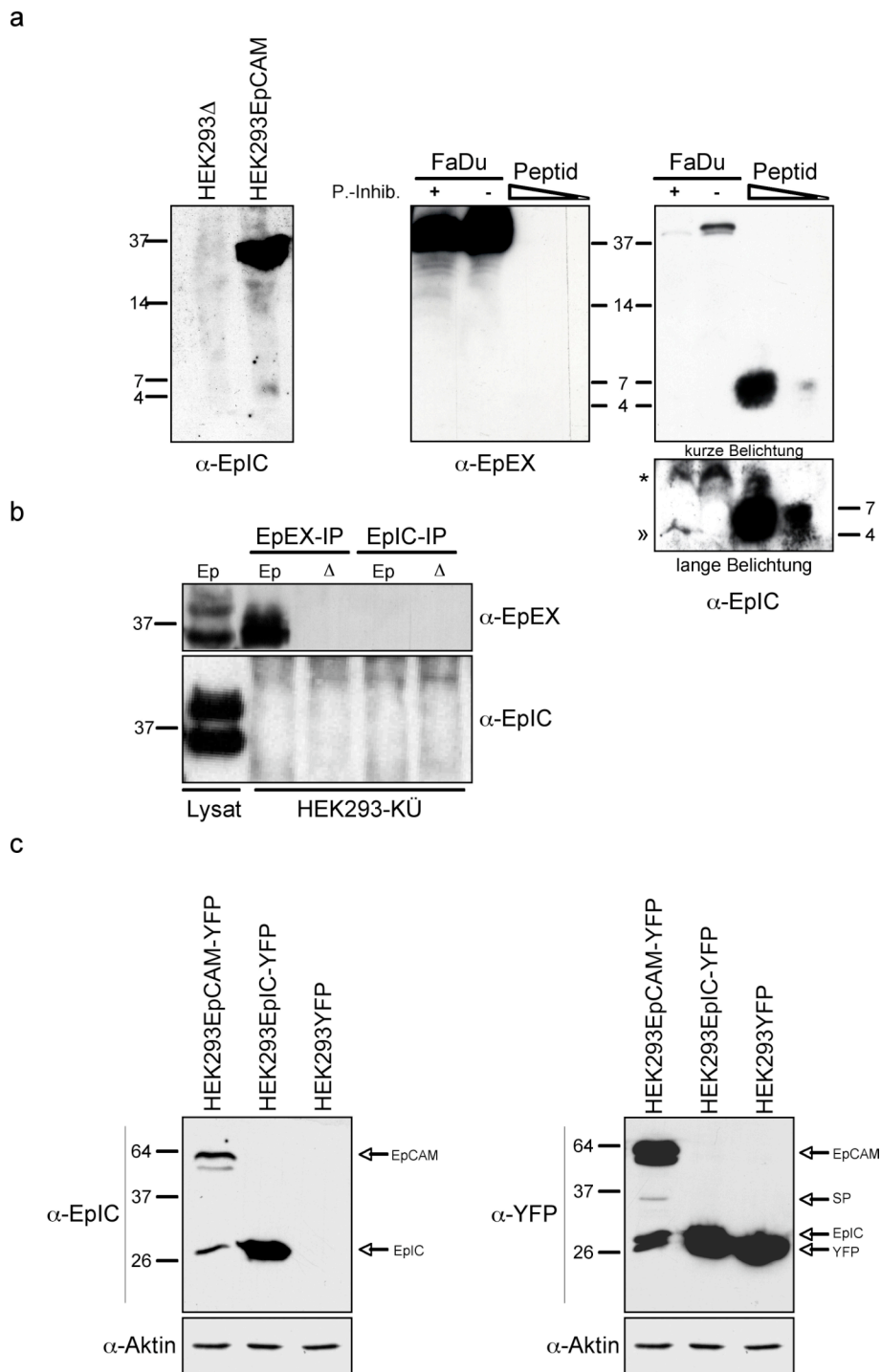


Abbildung 4.4: Nachweis von EpCAM-Spaltprodukten. Die Existenz von EpCAM-Spaltprodukten wurde mittels Immunblot nachgewiesen. (a) links: Lysate stabiler HEK293EpCAM-Transfektanten und die entsprechender Kontrollzellen (HEK293 Δ) wurden in einem 17,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Durch Verwendung eines EpIC-spezifischen Antikörpers (1144, Epitomics) konnte EpCAM (37 kDa) und EpIC (5 kDa) detektiert werden. rechts: Lysate von FaDu-Zellen, zuvor mit Protease-Inhibitor behandelt oder unbehandelt, wurden in einem harnstoffhaltigen 17,5%igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Durch Verwendung eines EpEX-spezifischen Antikörpers (AK) konnte EpCAM (37 kDa) in beiden Lysaten detektiert werden. Mit Hilfe des EpIC-spezifischen Antikörpers konnte bei kurzer Belichtung EpCAM und das Kontrollpeptid, bestehend aus den 26 Aminosäuren der EpIC-Domäne, bei 5kDa nachgewiesen werden. Durch längere Belichtung der Membran konnte endogen gebildetes EpIC (\gg) in Proteaseinhibitor-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren war in beiden Lysaten die Detektion eines EpIC-spezifischen Spaltproduktes (*) möglich.

(b) Immunopräzipitationen (IPs) aus Kulturüberständen (KÜ) von HEK293EpCAM-Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen (HEK293Δ) wurden mit einem EpEX (HO-3)- und einem EpIC-spezifischen Antikörper durchgeführt und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurde ein Lysat von HEK293EpCAM-Zellen geladen (linke Spur). Die Ektodomäne von EpCAM (EpEX) konnte ausschließlich nach IP mit EpEX-spezifischen AK detektiert werden. Die Detektion mit EpIC-spezifischem AK lieferte kein Signal. (c) Lysate stabiler HEK293EpCAM-YFP-, HEK293EpIC-YFP- und HEK293YFP-Transfektanten wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels EpIC- (links) oder YFP-spezifischem Antikörper (rechts) detektiert. Zur Kontrolle gleicher Mengen geladenen Proteins wurde Aktin detektiert. Dargestellt sind jeweils die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.1 Identifizierung beteiligter Proteasen

Basierend auf dem Nachweis einer regulierten proteolytischen Spaltung von EpCAM wurde eine Analyse der EpCAM-Proteinsequenz zur Identifizierung möglicher Proteaseschnittstellen durchgeführt. Ein Datenbankvergleich der EpCAM-Sequenz mit bekannten Rezeptormolekülen wies eine hohe Sequenzhomologie zwischen der Transmembrandomäne des EpCAM-Moleküls und der des Notch-1-Rezeptors auf (Abb. 4.5). Sechs von neun Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomäne sind in beiden Molekülen identisch. Die hohe Sequenzhomologie im Bereich der Transmembrandomäne beider Proteine und die Übereinstimmung an der Spaltstelle im Notch-Rezeptor (Valin¹⁷⁴³), legten die Vermutung nahe, dass EpCAM durch die gleichen oder ähnliche Proteasen, die auch für die Notch-Spaltung verantwortlich sind, prozessiert und damit aktiviert wird.

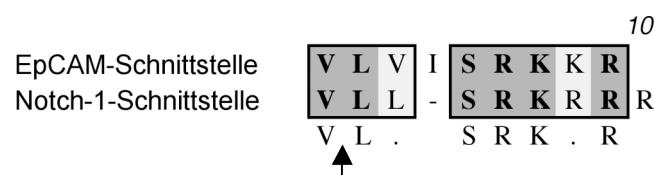


Abbildung 4.5: Sequenzvergleich der γ -Sekretase-Schnittstelle im Notch-1-Rezeptor und der potentiellen Schnittstelle in der EpCAM-Sequenz. Der Pfeil markiert die Stelle der Notch-Spaltung.

Die biochemischen Analysen von FaDu-, HEK293EpCAM und HEK293EpCAM-YFP-Zelllysaten deuteten darauf hin, dass es zur Spaltung von EpCAM in die beiden löslichen Untereinheiten EpEx und EpIC kommt. Diese Annahme wurde zusätzlich durch die unterschiedliche Lokalisation der beiden Domänen in Karzinomzelllinien gefestigt. Die Sequenzhomologie von EpCAM mit dem Notch-1-Rezeptor in der Transmembrandomäne suggeriert eine proteolytische Spaltung von EpCAM durch vergleichbare Proteaseaktivitäten. Diese Möglichkeit wurde im Folgenden experimentell untersucht.

4.2 Funktionelle Analyse der proteolytischen Spaltung von EpCAM durch Notch-assoziierte Proteasen

Aus Untersuchungen zur Proteolyse des Notch-1-Rezeptors ist bekannt, dass dieser durch die konzertierte Aktion des Tumornekrosefaktor- α -konvertierenden-Enzyms (TACE) und einer gamma-Sekretase der Presenilin-Familie gespalten wird (Schroeter et al., 1998). Die Spaltung der Notch-Ektodomäne durch TACE ist dabei eine Voraussetzung für die folgende Intramembranproteolyse durch Preseniline.

Aus unveröffentlichten Ergebnissen unseres Labors geht hervor, dass EpCAM in Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IPs) sowohl mit TACE als auch mit dem N-terminalen Fragment von Presenilin 2 (PS2) wechselwirkt, nicht aber mit Presenilin 1 (PS1). Zur Untermauerung dieser ersten Ergebnisse, die auf eine Beteiligung von TACE und Presenilin an der EpCAM-Spaltung hindeuteten, wurde der Einfluss einer Hemmung beider Proteasen mittels spezifischer ‘*small molecule*’ Inhibitoren oder spezifischer siRNAs auf die EpCAM-Spaltung untersucht.

4.2.1 Die Inhibition von TACE und Presenilin beeinflusst die proteolytische Spaltung von EpCAM

Ein Expressionsplasmid für eine N-terminale Fusion bestehend aus dem gelben Fluoreszenzprotein (YFP) und EpCAM (EpCAM-YFP) wurde transient in HEK293-Zellen transfiziert. YFP stabilisiert das Spaltprodukt EpIC-YFP und erhöht gleichzeitig dessen Molekulargewicht, so dass der Nachweis der EpIC-Domäne erleichtert wird. Nach der Transfektion wurden die Zellen 12 h bis 36 h mit verschiedenen „*small molecule*“ Inhibitoren von TACE oder Presenilin behandelt. Zur Untersuchung der Inhibition der EpCAM-Proteolyse wurden Zellen lysiert und die Expression von EpIC-YFP im Immunblot analysiert. Zur Inhibition der γ -Sekretase Aktivität wurden die spezifischen Inhibitoren *Compound E*, DAPT, *Compound 34* und γ -Sekretase Inhibitor X verwendet. Wie der Abbildung 4.6a zu entnehmen ist, war bei der Analyse der EpIC-YFP-Expression in ‘*compound E*’-behandelten Zellen schon nach 12 h eine Reduktion der EpIC-YFP Bildung im Vergleich zu Kontrollzellen erkennbar. Zudem kam es durch die γ -Sekretase-Inhibition zu einer Anhäufung von Spaltintermediaten, die nach 24 h gut nachweisbar wurden. Bei der Verwendung von DAPT war die Reduktion der EpIC-YFP Bildung am effektivsten (Abb. 4.6 b). Hier kam es nach 36 h zu einer signifikanten Anhäufung von Spaltintermediaten. Die Auftragung der

Proteinmengen wurde mit einem Immunblot gegen Aktin überprüft. Die Ergebnisse, die durch die Verwendung der beiden genannten Inhibitoren erzielt wurden, konnten durch den Einsatz von *Compound 34* und γ -Sekretase-Inhibitor X bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt).

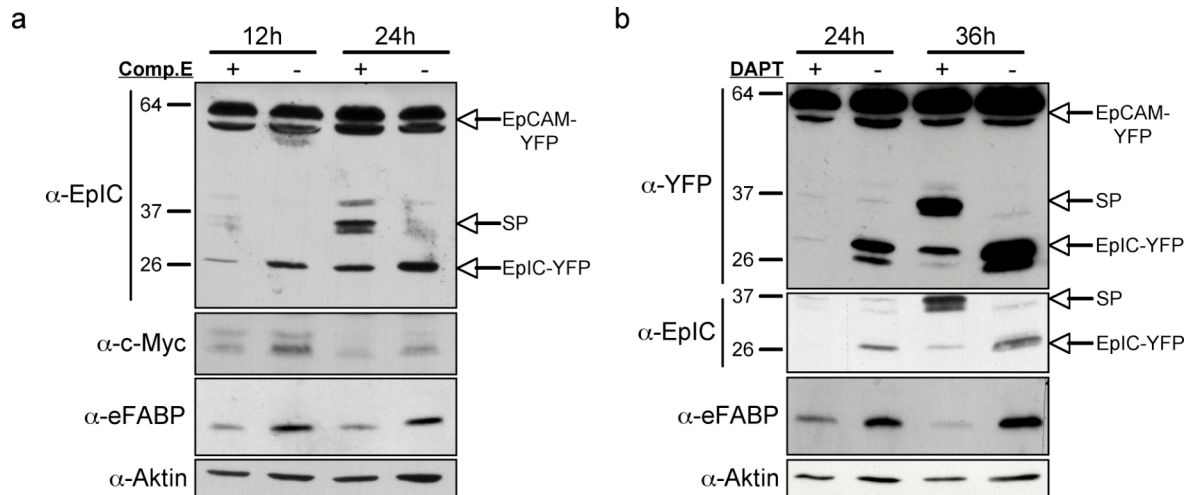


Abbildung 4.6: Die Behandlung von transienten HEK293EpCAM-YFP-Transfektanten mit γ -Sekretase-spezifischen Inhibitoren hemmt die Spaltung von EpCAM-YFP und die Induktion EpCAM-spezifischer Zielgene. (a) HEK293EpCAM-YFP-Zellen wurden für 12 bis 24 h mit 60 nM *Compound E* behandelt. Der EpIC-spezifische Immunblot (oben) zeigt die Reduktion der EpIC-Bildung und die Anhäufung von Spaltprodukten in *Compound E*-behandelten Zellen. Die Reduktion der c-Myc- und eFABP-Expression in diesen Proben wurde mit spezifischen AK auf derselben Membran nachgewiesen. (b) HEK293EpCAM-YFP-Zellen wurden für 12 bis 36 h mit 10 μ M DAPT behandelt. Der YFP- und der EpIC-spezifische Westernblot zeigte eine deutlich reduzierte EpIC-Bildung im Vergleich zu den Kontrollen. Zudem waren nach 36 h mehrere Spaltprodukten detektierbar. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde, neben der Proteinquantifizierung mittels BCA Test, ein Immunblot gegen Aktin durchgeführt. Es sind jeweils die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Für die Inhibition von TACE wurden die 'small molecule' Inhibitoren TAPI-0, TAPI-1 und TAPI-2 verwendet. Wie in Abbildung 4.7a dargestellt zeigte die TAPI-2-vermittelte TACE-Inhibition nach 12 h eine Reduktion der EpIC-YFP-Bildung, die auch nach 24 h anhielt. Eine Anhäufung von Spaltprodukten konnte hier erwartungsgemäß nicht beobachtet werden. In IPs gegen EpEX aus Kulturüberständen von stabilen HEK293EpCAM- und FaDu-Zellen konnte gezeigt werden, dass es durch eine 24-stündige TAPI-2- oder TAPI-2/DAPT-Behandlung der Zellen zu einer signifikanten Reduktion der EpEX-Freisetzung verglichen mit den entsprechenden Kontrollen kam (Abb. 4.7b, c). Die Ergebnisse der TACE-Hemmung konnten durch die Verwendung weiterer TACE-spezifischer-Inhibitoren (TAPI-0 und TAPI-1) bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt).

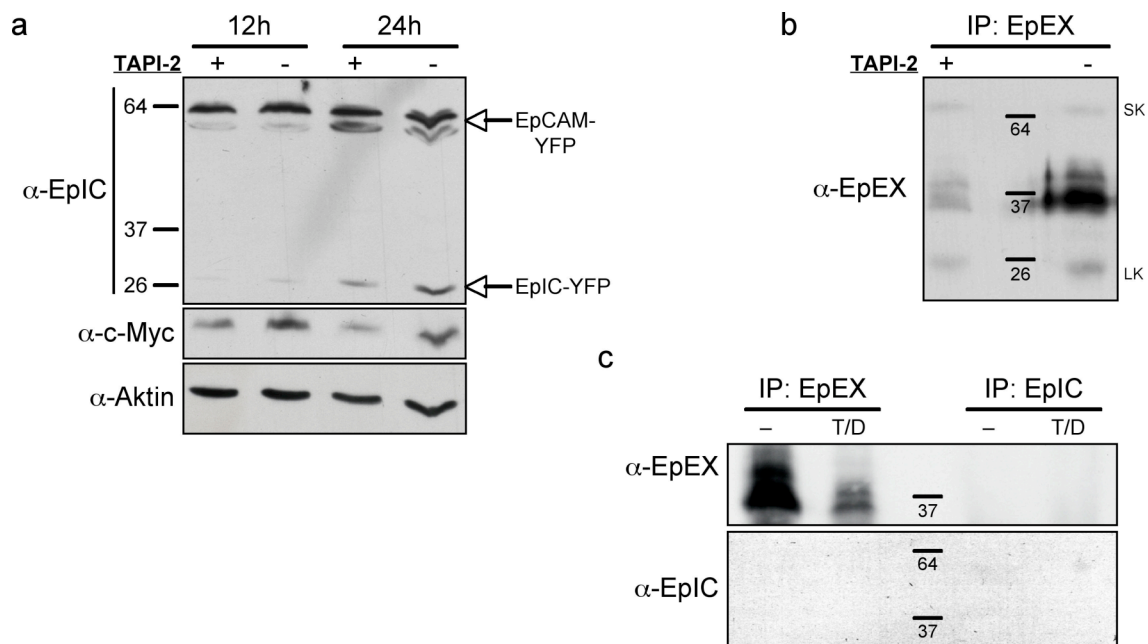


Abbildung 4.7: Die Inhibition von TACE durch die Verwendung von TAPI-2 hemmt die Spaltung von EpCAM. (a) HEK293EpCAM-YFP-Zellen wurden für 12 bis 24 h mit 40 μ M TAPI-2 behandelt. Im EpIC-spezifischen Immunblot wurde eine Reduktion der EpIC-YFP-Abspaltung bei behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen. Die Analyse der Lysate mit c-Myc-spezifischem AK zeigte zudem eine Reduktion des Proteins in TAPI-2-behandelten Zellen. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurden die Aktinmengen der Proben bestimmt. (b) EpEX-spezifische IPs wurden in Kulturüberständen (KÜ) der HEK293EpCAM-Zellen 24 h nach TAPI-2-Behandlung durchgeführt. Die Freisetzung von EpEX war in KÜ behandelter Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stark reduziert. SK: schwere Ketten des AKs; LK: leichte Ketten des AKs. (c) FaDu-Karzinomzellen wurden für 24 h mit 40 μ M TAPI-2 und 10 μ M DAPT behandelt. Mittels einer EpEX-spezifischen IP aus den KÜ konnte im EpEX-spezifischen Immunblot eine Reduktion der EpEX-Freisetzung nach Inhibition der Proteasen gezeigt werden (linke Spuren). Die IP gegen EpIC in den gleichen KÜ lieferte kein Signal. Der EpIC-spezifische Immunblot der IPs lieferte in keinem Fall Signale. In die IPs waren jeweils gleiche Mengen Protein enthalten (BCA-Test). Die in a, b und c gezeigten Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

4.2.2 Die Inhibition von TACE und Presenilin beeinflusst die EpCAM-vermittelte Genexpression und Zellproliferation

Zunächst wurden die Proteinmengen von c-Myc und eFABP in HEK293EpCAM-YFP-Transfektanten bestimmt, um den funktionellen Einfluss der Inhibition der TACE- und γ -Sekretase-vermittelten Spaltung auf die Signaltransduktion EpCAM zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die bereits vorhandenen Membranen nacheinander mit c-Myc- und eFABP-spezifischen Antikörpern inkubiert. In Verbindung mit der reduzierten EpIC-YFP-Bildung kam es nach 12 und 24 Stunden Inhibition der γ -Sekretasen zu einer verminderten

Expression der EpCAM-Zielgene *c-myc* und *efabp* (Abb. 4.6). Gleiches war bei der Inhibition der EpCAM-Spaltung durch TACE für das Zielgen *c-myc* zu beobachten (Abb. 4.7a).

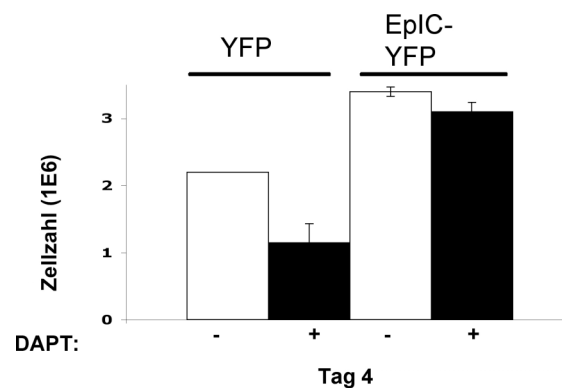


Abbildung 4.8: Reduktion des FaDu-Zellwachstums nach Inhibition der γ -Sekretasen. Zur Komplementierung der DAPT-vermittelten Inhibition ($10 \mu\text{M}$) von γ -Sekretasen in FaDu-Zellen wurden diese zusätzlich transient mit $1 \mu\text{g}$ EpIC-YFP-Expressionsplasmid transfiziert. Als Kontrollgruppe dienten mit pEYFP-N1 transfizierte FaDu-Zellen. Die Zellzahlen wurden an Tag 4 nach der Transfektion mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zudem wurde die Hemmung der EpCAM-vermittelten Proliferation nach Inhibition von γ -Sekretasen in einem Komplementationsexperiment untersucht. TACE und γ -Sekretasen sind für die Spaltung einer Vielzahl von Membranrezeptoren verantwortlich, sodass die alleinige Hemmung dieser Proteasen keine Angaben zur EpCAM-Spezifität der beobachteten Effekte erlaubten. Aus diesem Grund sollten die Effekte der TACE-/Presenilinhemmung durch eine gleichzeitige Überexpression von EpIC komplementiert werden. FaDu-Zellen wurden wahlweise mit einem YFP- oder mit EpIC-YFP-Expressionsplasmid transient transfiziert und vier Tage lang mit DAPT behandelt. Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, kam es in FaDu-Zellen, die mit DAPT behandelt und mit YFP transfiziert wurden, zu einer 50%-igen Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontroll-, i.e. DMSO-behandelte Zellen (Abb. 4.8, erster und zweiter Balken). Die Inhibition von Presenilinen hemmt demnach die Proliferation der Zellen. Bei der DAPT-Behandlung von FaDu-Zellen, die zusätzlich transient mit EpIC-YFP transfiziert wurden, konnte die Inhibitor-vermittelte Hemmung der Zellproliferation wieder aufgehoben werden (Abb. 4.8, dritter und vierter Balken). Somit wurde gezeigt, dass die Hemmung der Presenilin-vermittelten Spaltung von EpCAM für die Reduktion der Proliferation der FaDu-Zellen verantwortlich war.

Die proliferative Wirkung von EpIC wurde verdeutlicht durch den Vergleich des Wachstums von EpIC-YFP transfizierten FaDu-Zellen mit den YFP-Transfektanten (Abb. 4.8, erster und dritter Balken).

Die Verwendung von TACE-spezifischer siRNA sollte die beobachtete Reduktion der EpCAM-Spaltung durch den TACE-Inhibitor TAPI-2 bestätigen. Die Funktionalität der verwendeten TACE-spezifischen siRNA wurde mittels Immunblot nachgewiesen (Abb. 4.9a). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von TACE durch die Verwendung spezifischer siRNAs nach 2 Tagen um 52% reduziert war (Abb. 4.9c, Mitte). Die Transfektion von FaDu-Zellen mit der TACE-spezifischen siRNA hatte nach zwei Tagen eine Reduktion der Zellzahl um 60% zur Folge (Abb. 4.9b). Durch Ko-Transfektion von EpIC-YFP war die Proliferation nur noch um 10% reduziert (Abb. 4.9c). Es wurde somit gezeigt, dass die Hemmung der TACE-vermittelten Spaltung von EpCAM einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Zudem zeigt die Ko-Transfektion von EpIC-YFP, dass auch EpCAM-unabhängige Effekte durch die TACE-Hemmung verursacht werden. Die Hemmung von TACE resultierte aus einer reduzierten Spaltung der EpCAM-Ektodomäne. Folglich sollte nach TACE-Hemmung die Anzahl intakter Moleküle an der Zelloberfläche ansteigen und mit einem Antikörper gegen die Ektodomäne messbar sein. Die Oberflächenexpression von EpCAM in FaDu-Zellen aus demselben Experiment wurde daher mit dem HO.3 AK, welcher den ersten und zweiten EGF-ähnlichen Bereich in EpEX bindet, in der Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Die Zellen zeigten nach Transfektion mit TACE-spezifischer siRNA eine 35,9%-ige Erhöhung der EpCAM-Oberflächenexpression, verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 4.9d, mitte). Die gleichbleibende Expression von MHC-I in beiden Versuchsgruppen (Abb. 4.9d, rechts) diente als Kontrolle der unveränderten Expression TACE-unabhängiger Proteine. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der inhibitorische Effekt der TACE-spezifischen siRNA auf die Proliferation behandelter FaDu-Zellen unter anderem durch eine Hemmung der EpCAM-Signaltransduktion verursacht wird.

Durch die Inhibition von TACE und Presenilinen konnte die Funktion beider Proteasen bei der Spaltung von EpCAM nachgewiesen werden. Es wurde zudem deutlich, dass diese Inhibition negative Auswirkungen auf die EpCAM-vermittelten Signalwege und zellulären Effekte hatte. Die Expression von EpCAM-Zielgenen und die Zellproliferation waren nach Inhibition der Proteolyse des Moleküls signifikant reduziert.

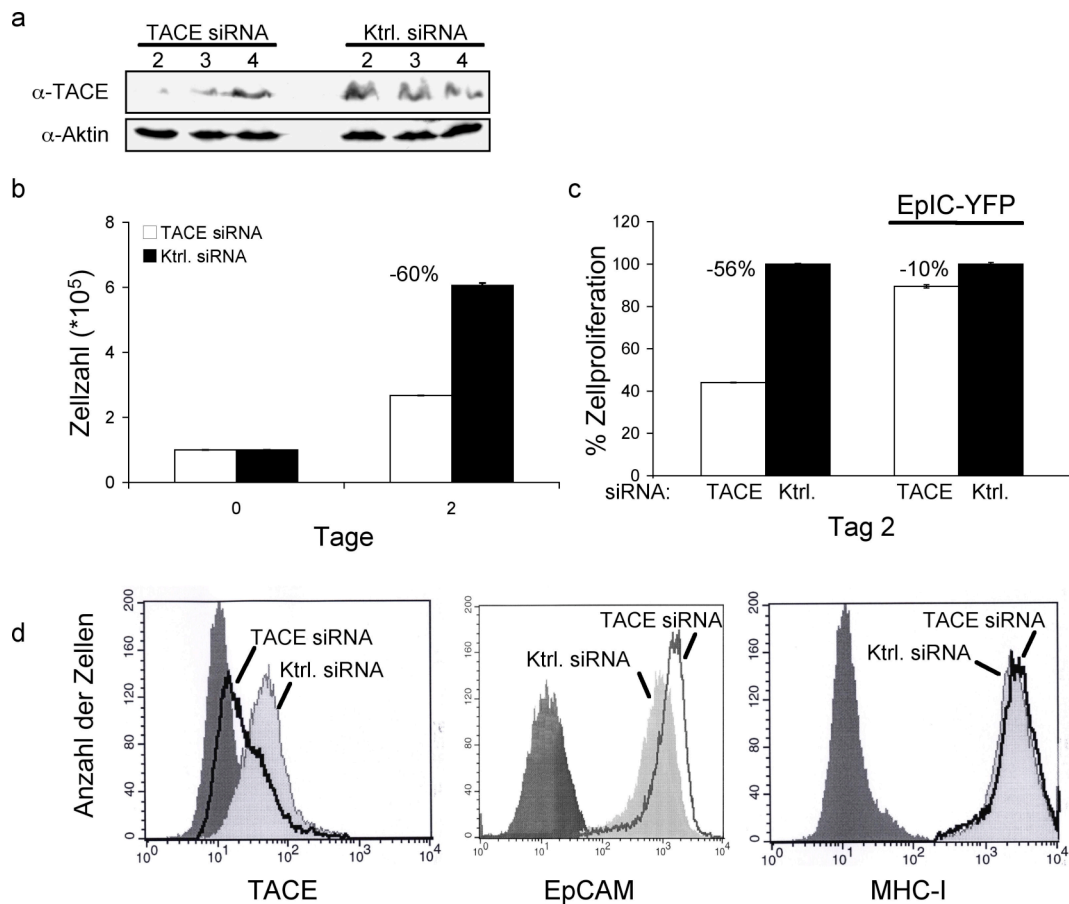


Abbildung 4.9: Die Inhibition von TACE mittels spezifischer siRNA hat eine Reduktion der EpCAM-Spaltung und der Zellproliferation zur Folge. FaDu-Zellen wurden mit TACE-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA (Kontr.) (100 nM/300.000 Zellen) transfiziert. (a) Die TACE-Expression in FaDu-Zellen wurde nach der siRNA-Behandlung an Tag 2 bis 4 bestimmt. Als Ladekontrolle wurde die Aktinmenge der Proben bestimmt. (b) Die Zellzahlen wurden an Tag 0 und 2 nach Transfektion der spezifischen siRNA mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Behandlung mit TACE-spezifischer siRNA führte zu 60%igen Reduktion der Proliferation der Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. (c) Die Inhibition der Proliferation konnte durch Ko-Transfektion von EpIC-YFP fast vollständig ausgeglichen werden. (d) Die TACE-Oberflächenexpression in FaDu-Zellen nach Transfektion TACE-spezifischer siRNA wurde nach 48 h mittels FACS bestimmt. Diese war um 52% reduziert. Die EpCAM-Oberflächenexpression in FaDu-Zellen nach Transfektion TACE-spezifischer siRNA wurde ebenfalls nach 48 h bestimmt. Diese war um 35,9% erhöht. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

4.3 EpIC transloziert in den Zellkern

Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass es in Karzinomzelllinien zu einer Spaltung von EpCAM kommt, die eine Freisetzung von EpEX in den Zellkulturüberstand und von EpIC ins Zytoplasma zur Folge hat. Durch Immunfluoreszenzfärbung und anschließende konfokale Mikroskopie konnte EpIC in Karzinomzellen im Zytoplasma detektiert werden. Hier wurde eine erhöhte Konzentration im

perinukleären Bereich beobachtet (Abb. 4.1). Die Vergrößerung einer Zelle des abgebildeten FaDu-Zellverbandes zeigte deutlich, das EpIC auch in den Zellkern translozierte (Abb. 4.2). Dieses Phänomen konnte in allen *bis dato* untersuchten humanen Karzinomzelllinien - Ant-1, HCT-8, MCF-7, PCI-1 und PCI-13 - beobachtet werden. In Abbildung 4.10 wurden die EpIC-spezifischen Fluoreszenzfärbungen von HCT-8 Zellen exemplarisch für weitere Karzinomzelllinien dargestellt.

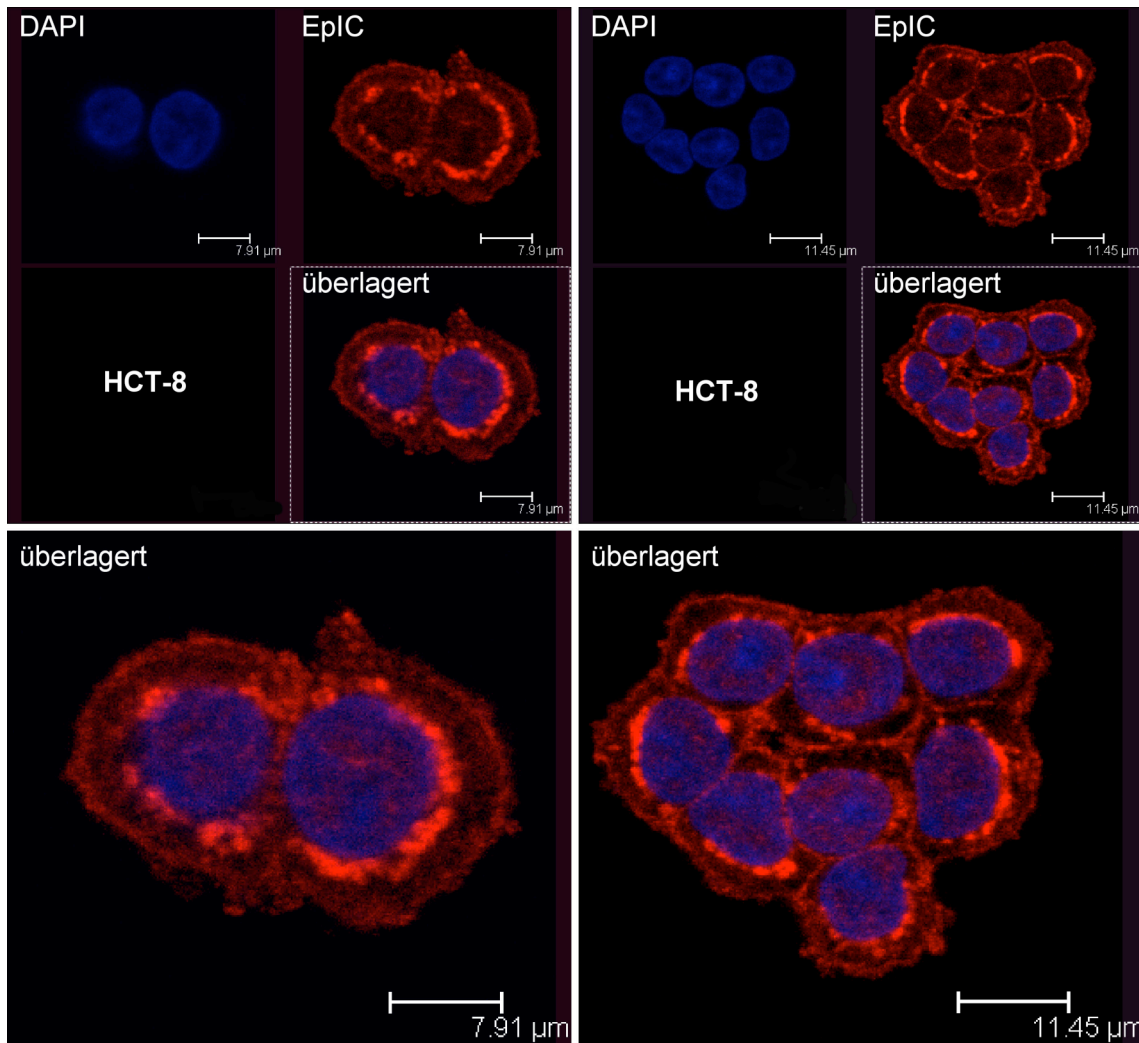


Abbildung 4.10: Lokalisation von endogenem EpIC in Karzinomzelllinien. HCT-8 (Kolonkarzinom) wurden mit EpIC-spezifischen Antikörpern in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa 647) detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) markiert. Die Lokalisation von EpIC wurde durch Laserscanning-Mikroskopie visualisiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie in Kapitel 4.2 bereits beschrieben, konnte die Spaltung des EpCAM-Moleküls durch die Hemmung von TACE und γ -Sekretasen mit Hilfe von proteasespezifischen Inhibitoren stark reduziert werden. FaDu-Zellen wurden mit einer Kombination aus DAPT und TAPI-2

behandelt, um den Einfluss der Proteolyseinhibition auf die EpIC-Lokalisation zu untersuchen. Nach 24 h wurden EpIC-Moleküle in diesen Zellen mit spezifischen Antikörpern in der Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Analyse des EpIC-Expressionsmusters zeigte, dass die Inhibition von TACE und γ -Sekretasen in FaDu-Zellen die Spaltung von EpCAM effektiv hemmt. EpIC lokalisierte in behandelten Zellen vorwiegend an der Zellmembran und nur in sehr geringer Menge im Zytoplasma (Abb. 4.11, links). Im Kern konnten keine EpIC-Moleküle detektiert werden. Zur Kontrolle wurden EpIC-Moleküle in einem parallelen Ansatz auch in unbehandelte FaDu-Zellen detektiert. EpIC zeigte in diesen Zellen die erwartete, starke Expression im Zytoplasma, vorwiegend kernnah, und eine punktuelle Lokalisation im Zellkern (Abb. 4.11, rechts).

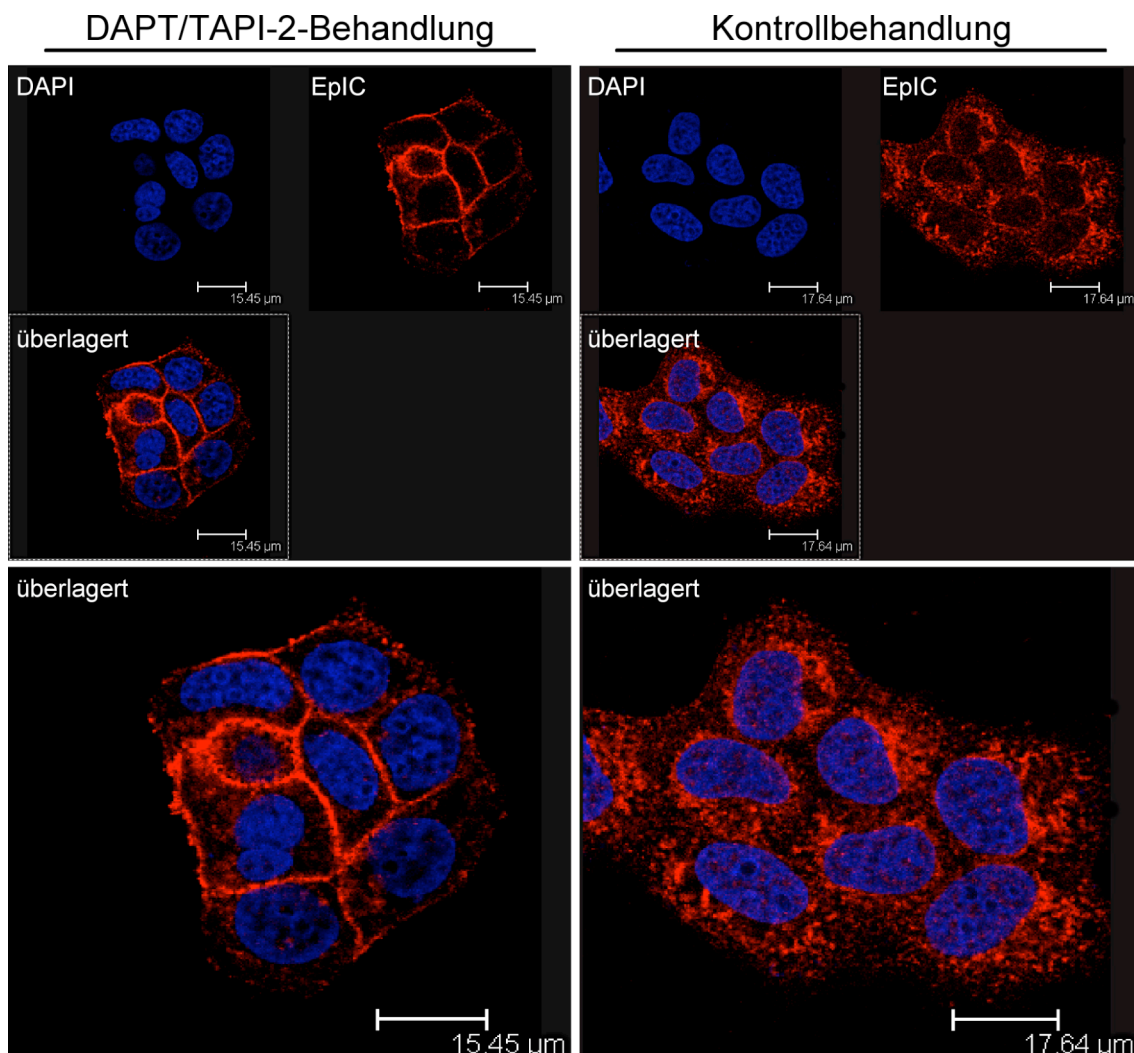


Abbildung 4.11: Membranlokalisierung von endogenem EpIC nach 24-stündiger Behandlung von FaDu-Zellen mit TACE und Presenilininhibitoren (links). Die Detektion von EpIC mittels eines spezifischen Antikörpers wurde über den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa 647) durch Laserscanning-Mikroskopie visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) markiert. Kontrolle (rechts): unbehandelte FaDu-Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

4.3.1 Unterschiede der EpIC-Lokalisation in gesundem Epithel und primären Karzinomen

Um die physiologische Relevanz der EpCAM-Spaltung zu studieren, war eine Untersuchung der EpIC-Lokalisation an Primärmaterial *ex vivo* essentiell. Zu diesem Zweck wurde EpIC in einem Kolonkarzinom-Gewebearray, der aus 26 Kolonkarzinomgewebeproben und fünf gesunden Kolongeweben verschiedener Patienten bestand, detektiert. Wie in Abbildung 4.12 anhand zweier repräsentativer Gewebeproben dargestellt, unterschieden sich die Lokalisationen von EpIC in Karzinomen und in gesundem Gewebe sehr deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass EpIC in Kolonkarzinomgeweben vorwiegend im Zytoplasma und als gesprenkeltes Muster im Zellkern vorkam (Abb. 4.12a). Im Gegensatz dazu lokalisierte EpIC in gesundem Gewebe an den Membranen und in geringerer Konzentration im Zytoplasma (Abb. 4.12b).

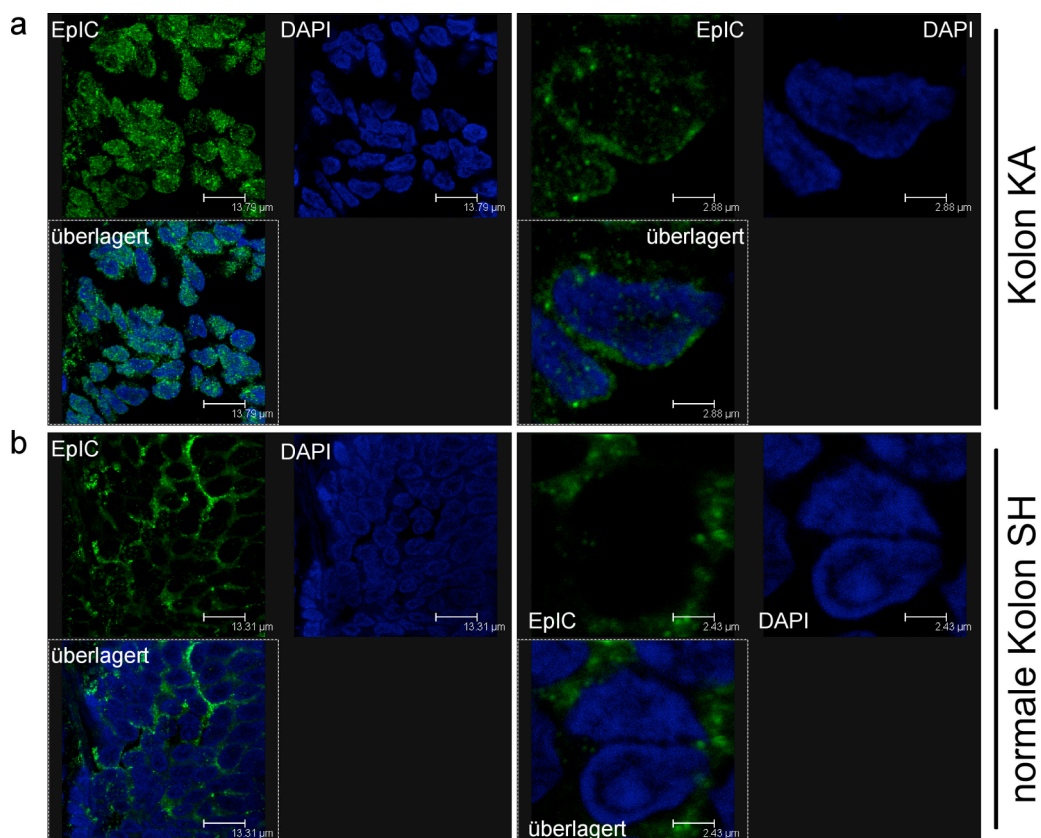


Abbildung 4.12: Lokalisation von endogenem EpIC in Kolonkarzinomen (Kolon KA) und in gesunder Kolonschleimhaut (Kolon SH). Kryoschnitte von Kolonkarzinomen (n=26) und gesundem Kolonepithel (n=5) wurden mit EpIC-spezifischen Antikörpern (1144, Epitomics) in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa 488) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Lokalisation von EpIC wurde durch Laserscanning-Mikroskopie visualisiert. (a) EpIC-Färbung im Kolon KA: Übersicht (links), Vergrößerung (rechts), (b) EpIC-Färbung in gesunder Kolon SH: Übersicht (links), Vergrößerung (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse der Färbung eines Arrays.

Die Auswertung des Gewebearrays ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Aus der Auswertung ging hervor, dass EpIC in allen Karzinomgeweben in unterschiedlicher Intensität im Kern nachweisbar war. Im Gegensatz dazu konnte EpIC in gesunder Schleimhaut ausschließlich an der Membran und im Zytoplasma, jedoch nie im Zellkern detektiert werden. Folglich existieren Unterschiede in der Spaltung und/oder Kerntranslokation von EpIC in gesundem und malignem Gewebe.

Intensität der EpIC-Kernlokalisierung	EpIC-Kernlokalisierung			
	-	+	++	+++
Normal (n=5)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Karzinom (n=26)	0/26 (0%)	6/26 (23%)	11/26 (42%)	9/26 (34%)

Tabelle 4.1: Kernlokalisierung von EpIC in gesunder Kolonschleimhaut und im Kolonkarzinom in einem Gewebearray.

4.3.2 EpIC ist für EpCAM-vermittelte onkogene Effekte essentiell und ausreichend

In einem ersten Schritt sollte der Einfluss von EpIC auf die Aktivierung des EpCAM-Zielgens *c-myc* untersucht werden, um einen ersten Einblick in den EpCAM-vermittelten Signalweg zu erhalten. Aus vorherigen Untersuchungen zur Aktivität von EpCAM war bereits bekannt, dass das Wildtyp-EpCAM-Protein in der Lage ist *c-myc* zu induzieren (Munz et al., 2004). Des Weiteren war bekannt, dass der intrazelluläre Anteil von EpCAM für diese Induktion essentiell ist (Munz et al., 2004). Im Folgenden wurde YFP, EpCAM-YFP und EpIC-YFP stabil in HEK293-Zellen exprimiert und die c-Myc-Proteinmenge der Transfektanten miteinander verglichen (Abb. 4.13). Es konnte gezeigt werden, dass es in HEK293EpCAM-YFP-Zellen erwartungsgemäß zu einer erhöhten c-Myc-Expression kam. Diese wurde in gleichem Maße auch in HEK293EpIC-YFP-Zellen nachgewiesen. Die c-Myc-Expression war in beiden Zelllinien höher als in der HEK293-YFP-Kontrollzelllinie. Untersuchungen c-myc-spezifischer mRNA-Mengen zeigten ebenfalls eine Anreicherung (persönliche Mitteilung S. Denzel). Somit erfolgt die Induktion von c-Myc durch EpCAM und EpIC auf transkriptioneller Ebene. Die Gesamtheit der Ergebnisse liefern den Nachweis, dass EpIC für die EpCAM-vermittelten onkogenen Effekte essentiell und ausreichend ist.

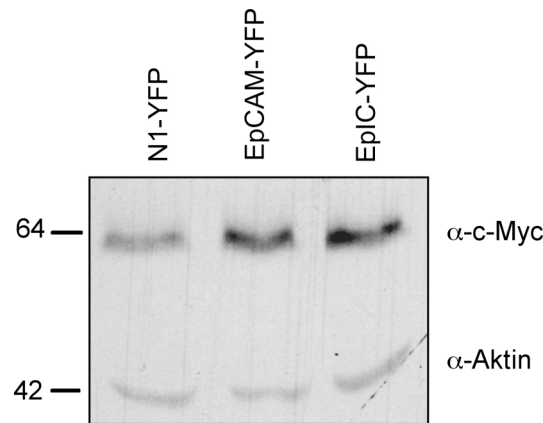


Abbildung 4.13: c-Myc-Expression in stabilen HEK293-Transfektanten. HEK293-Zellen wurden mit YFP(pEYFP-N1), EpCAM-YFP (pEYFP-N1:EpCAM) oder EpIC-YFP (pEYFP-N1:EpIC) stabil transfiziert. Anschließend wurde die c-Myc-Expression dieser Zellen verglichen. Pro Spur wurden 50 µg Protein des entsprechenden Zelllysates geladen. Die c-Myc-Expression wurde mit einem spezifischen Antikörper überprüft. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde die Aktinmenge der Proben überprüft. Repräsentativ dargestellt ist ein Immunblot aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EpIC an der Zellmembran aber auch im Zytoplasma und im Kern verschiedener Karzinomzelllinien lokalisiert. Eine solche komplexe Lokalisation konnte auch *in vivo* in Kolonkarzinomgeweben bestätigt werden. Zudem wurde ein gravierender Unterschied zur membranständigen Lokalisation in gesunden Epithelien gleichen Ursprungs festgestellt. Vergleiche der c-Myc-Aktivierung zeigten zudem, dass EpIC die signalvermittelnde Domäne des EpCAM-Moleküls ist.

4.4 Identifizierung und Validierung weiterer potentieller Interaktionspartner von EpIC

Anhand der bisher durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es durch proteolytische Spaltung von EpCAM zur Aktivierung des Signalweges kommt. EpIC wurde in diesem Zusammenhang als Teil des EpCAM-Moleküls identifiziert, der für die intrazelluläre Signalvermittlung verantwortlich ist. Bis jetzt war über die Regulation des EpCAM-Signalweges und über intrazelluläre Interaktionspartner von EpCAM wenig bekannt. Die bisher beschriebene Funktion EpCAMs, *i.e.* Zelladhäsionsmolekül (Balzar et al., 1999b; Litvinov et al., 1994b) und die Interaktion mit verschiedenen Proteinen (Kuhn et al., 2007; Ladwein et al., 2005; Litvinov et al., 1997) liefert keine Erklärung für die spezifische Aktivierung von Zielgenen, wie *c-myc*, *efabp*, *zyklin A* und *E*.

4.4.1 Isolierung und Identifizierung potentieller EpIC-Interaktionspartner in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten

Zur Identifikation von Interaktionspartnern der intrazellulären Domäne des EpCAM-Proteins wurden bereits im Vorfeld dieser Doktorarbeit *yeast-two-hybrid*-Experimente mit EpIC durchgeführt. Potentielle Interaktionspartner von EpIC wurden aus einer cDNA-Bank von HEK293-Zellen isoliert. Die DNA von 120 positiven Hefeklonen war bereits nach einer Retransformation isoliert und sequenziert worden. Mit Hilfe von BLASTsearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) wurden die cDNA-Sequenzen mit allen bekannten humanen cDNA-Sequenzen verglichen und bei hoher Identität einem potentiellen Interaktionspartner zugeordnet (Promotionsarbeit Dr. M. Benk). Auf die gleiche Art und Weise wurde im Rahmen der vorgelegten Doktorarbeit mit den verbliebenen, bisher noch nicht untersuchten 60 positiven Hefeklonen verfahren. Deren Sequenzanalyse führte zur Identifikation weiterer fünf potentieller EpIC-Interaktionspartner: Syntrophin-1 (SNTA1), ASF-1B, UMP-CMP Kinase, AP3D1 und MGC3040 (Tabelle 4.2).

Die Validierung der Wechselwirkung von EpIC mit den identifizierten potentiellen EpIC-Interaktionspartnern erfolgte mittels Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP). Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen aus der verwendeten cDNA-Bank zunächst mit einer T7-Polymerase-Bindungsstelle und der Sequenz des Hämagglutinin (HA)-Epitops versehen. Anschließend erfolgte die Klonierung der modifizierten Sequenzen in einen eukaryontischen Expressionsvektor.

identifizierte Interaktionspartner	Identität %	Klon Nr.	GenID	molekulare Funktion
SNTA1	100	NP003089	6640	<i>Non-motor</i> actinbindendes Protein
FHL2*	100	NP963850	2274	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor
ASF-1B	100		55723	Chromatin/Chromatin-bindendes Protein
Galektin-1*	100	NP002296	3956	Wachstumshinhibitor
UMP-CMP Kinase	100		51727	Nukleotidkinase
CGI-128 Protein*	100	NP057146	51647	Funktion nicht klassifiziert
AP3D1 Protein	100		8943	
MGC3040	70		66000	

* Im *yeast-two-hybrid* identifizierte Interaktionspartner (Promotionsarbeit M. Benk), deren Wechselwirkung mit EpIC validiert wurde.

Tabelle 4.2: Identifizierte und verwendete potentielle EpIC Interaktionspartner aus *yeast-two-hybrid* Screen.

4.4.2 Validierung der potentiellen Interaktionspartner FHL2, CGI-128, Galectin-1 und Syntrophin-1

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die Wechselwirkungen von EpCAM mit vier der identifizierten Proteine genauer untersucht. Alle vier wiesen eine 100%-ige Sequenzhomologie mit dem entsprechenden NCBI Genbankklon auf (Tab. 4.2). Die Wahl der Proteine erfolgte auf Grund der Funktion und/oder Lokalisation in der Zelle. Das „*four and a half LIM domain*“ Protein 2 (FHL2) war auf Grund der Lokalisation im Zytoplasma und im Kern der Zelle, *ergo* analog zu EpIC, von großem Interesse. Über die LIM-Domänen (Lin-11, Isl-1, Mec-3) ist FHL2 in der Lage, Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen zu vermitteln. Weiterhin war bereits bekannt, dass es in einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege eine regulatorische Rolle spielt (Johannessen et al., 2006). Das zweite ausgewählte Protein war Galectin-1. Das Molekül spielt eine Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen und hat dadurch einen Einfluss auf die Zellproliferation. Syntrophin-1 (SNTA1) lokalisiert an der peripheren Membran der Zelle und interagiert in Muskelzellen mit Dystrophin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Als eines der Proteine mit bisher unbekannter Funktion wurde die Wechselwirkung von EpIC mit CGI-128 näher untersucht.

Zur Validierung der Wechselwirkung von EpCAM mit den ausgewählten Proteinen wurden stabile Zellsysteme etabliert, in denen jeweils ein potentieller Interaktionspartner EpCAM ektopisch ko-exprimiert wurde. HEK293-Zellen wurden wahlweise mit 141pCAG::EpCAM oder dem Leervektor (141pCAG, Kontrolle) und respektive zusätzlich mit pIRES::HA-FHL2, pIRES::HA-CGI128, pIRSE::HA-Galectin-1 oder pIRES::HA-SNTA1 ko-transfiziert. Die Generierung stabiler Zellen erfolgte durch Zugabe von Puromycin (1 µg/ml) und Hygromycin (200 µg/ml) für die Selektion von pCAG bzw. pIRES Vektoren. Auf diese Weise wurden die in Tabelle 4.3 aufgelisteten Zellsysteme etabliert.

	141pCAG::EpCAM	141pCAG
pIRES::HA-FHL2	HEK293EpCAM/HA-FHL2	HEK293Δ/HA-FHL2
pIRES::HA-CGI128	HEK293EpCAM/HA-CGI128	HEK293Δ/HA-CG128
pIRSE::HA-Galectin-1	HEK293EpCAM/HA-Galectin1	HEK293Δ/HA-Galectin1
pIRES::HA-SNTA1	HEK293EpCAM/HA-SNTA1	HEK293Δ/HA-SNTA1

Tabelle 4.3 Stabile Doppeltransfektanten von HEK293-Zellen

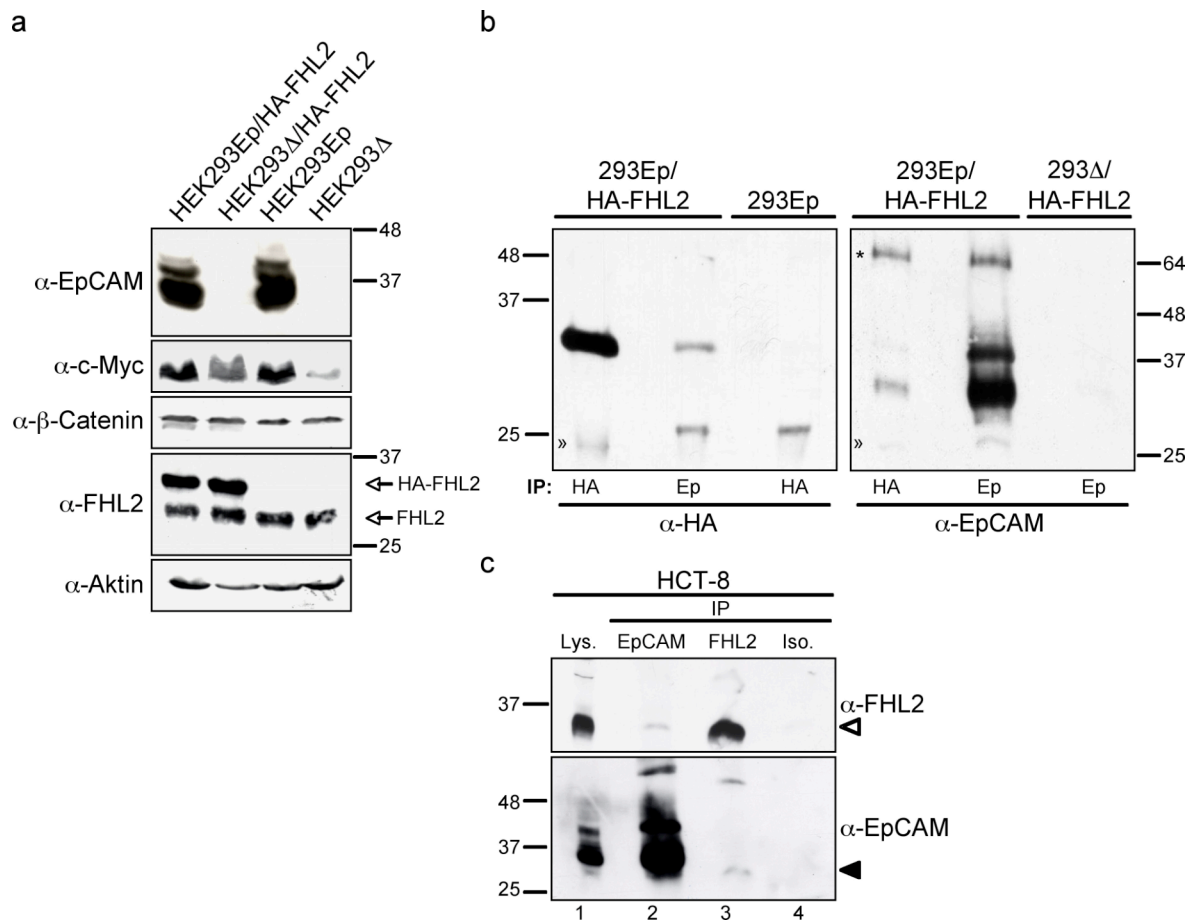


Abbildung 4.14: EpCAM interagiert mit HA-FHL2 und endogenem FHL2. (a) Der Nachweis der Expression von EpCAM, HA-FHL2 und FHL2 in den angegebenen Lysaten (jeweils 50 µg) im Immunblot erfolgte durch Verwendung der entsprechenden spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente die gleichmäßige Färbung von Aktin. **(b)** Stabile HEK293Ep/HA-FHL2 und HEK293Δ/HA-FHL2 Zellen wurden lysiert und Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IP) mit immobilisierten, spezifischen Antikörpern gegen EpCAM und das HA-FHL2-Fusionsprotein durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunblot mit spezifischen Antikörpern. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. **(c)** Zum Nachweis der endogenen Wechselwirkung wurde HCT-8 lysiert und Ko-IP mit immobilisierten, spezifischen Antikörpern gegen EpCAM und FHL2 durchgeführt. Zur Kontrolle der Spezifität wurde zudem parallel eine Isotypkontrolle durchgeführt. Das hier gezeigte Resultat ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (*) schwere AK-Kette, (») leichte AK-Kette

Die potentielle Wechselwirkung von HA-FHL2, HA-CGI128, HA-Galectin-1 und HA-SNTA1 mit EpCAM wurde in Lysaten der verschiedenen stabilen Zelllinien durch Ko-IPs bestimmt. Zuvor wurde die Expression der zu untersuchenden Proteine in den verwendeten Zelllinien nachgewiesen. Das Proteinexpressionsprofil der HEK293EpCAM/HA-FHL2- und HEK293EpCAM-Zellen so wie der entsprechenden Kontrollzelllinien ist in Abbildung 4.14a dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass HA-FHL2, endogenes FHL2 und β-Catenin in den entsprechenden Zelllinien gleich stark exprimiert wurden. EpCAM konnte erwartungsgemäß nur in EpCAM-Transfektanten detektiert werden. Zudem war der zuvor schon beobachtete Unterschied in der c-Myc-Expression EpCAM-positiver und EpCAM-negativer Zellen

ebenfalls detektierbar. Durch reziproke Ko-IP von EpCAM und HA-FHL2 in HEK293EpCAM/FHL2-Zelllysaten konnte eine Interaktion dieser beiden Proteine bestätigt werden. Wie in Abbildung 4.14b dargestellt, wurde HA-FHL2 mit EpCAM und auch umgekehrt ko-präzipitiert (Abb. 4.14b, linke Spur). Nachdem die Wechselwirkung der beiden überexprimierten Proteine gezeigt werden konnte, wurde die Interaktion von endogenem EpCAM mit endogenem FHL2 in HCT-8 Kolonakarzinomzellen überprüft. Bei der Immunpräzipitation von endogenem FHL2 konnte EpCAM ko-präzipitiert und nachgewiesen werden (Abb. 4.14c, 2. Spur). Umgekehrt konnte endogenes FHL2 bei der Immunpräzipitation von EpCAM ko-präzipitiert und detektiert werden (Abb. 4.14c, 3. Spur). Durch die Isotypkontrolle wurde keines der relevanten Proteine ko-präzipitiert (Abb. 4.14c, 4. Spur), was die Spezifität der Signale bestätigte.

CGI-128, Galectin-1 und SNTA1 konnten in Lysaten der entsprechenden Zelllinien (Tab. 4.3) nicht mit EpCAM ko-präzipitiert werden. Somit konnten die in Hefe gezeigten Interaktionen in höheren eukaryontischen Zellen nicht bestätigt werden. In Abbildung 4.15 ist exemplarisch das Ergebnis der Ko-Immunpräzipitation von EpCAM und HA-CGI-128 dargestellt. Aus Lysaten von stabilen HEK293Ep/HA-CGI-128-Zellen konnte sowohl EpCAM als auch das HA-Fusionsprotein gut präzipitiert werden. Eine Ko-Präzipitation des jeweiligen potentiellen Bindungspartners schlug jedoch fehl. Gleichmaßen konnte weder HA-Galectin noch HA-SNTA1 mit EpCAM in den geeigneten Zellsystemen ko-präzipitiert werden.

4.4.3 EpCAM und FHL2 interagieren direkt miteinander

Die im *yeast-two-hybrid* identifizierte Wechselwirkung von EpCAM und FHL2 konnte durch Ko-IPs bestätigt werden. Über die Art der Wechselwirkung konnte anhand dieser Untersuchungen bis jetzt keine Aussage getroffen werden. Es war nicht bekannt, ob es sich um eine direkte oder indirekte Wechselwirkung handelte. Diese Frage sollte durch Verwendung eines Transkriptions/Translationssystems (TNT) beantwortet werden, bei dem EpCAM und FHL2 *in vitro* synthetisiert wurden. Zu diesem Zweck wurden die EpCAM- und HA-FHL2-cDNA-Sequenzen im pDrive-Vektor verwendet. Der Vektor besitzt vor der jeweiligen cDNA eine T7-Polymerase Bindungsstelle. Die pDrive-Plasmide wurden für eine effizientere Reaktion zunächst linearisiert. Die Transkription wurde von der T7-RNA-Polymerase katalysiert. Anschließend erfolgte die Translation der gebildeten mRNA in Retikulocytenlysate aus dem Kaninchen. Retikulocytenlysate sind frei von endogener mRNA, enthalten Ribosomen und erlauben somit die ausschließliche Translation der eingesetzten

mRNA. Die erfolgreiche Translation der Proteine wurde durch eine Immunblotanalyse mit EpCAM- und HA-spezifischen Antikörpern bestätigt (Abb. 4.15 rechts).

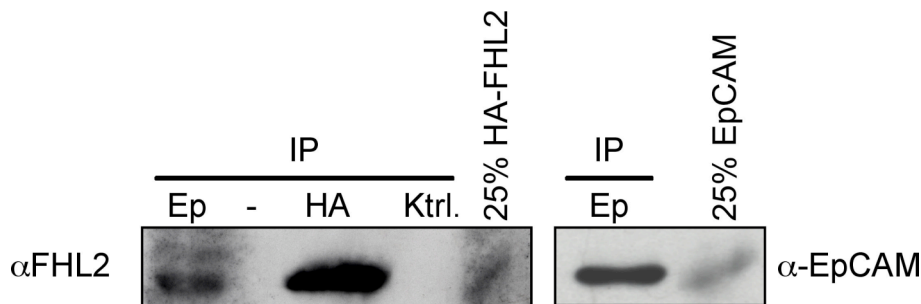


Abbildung 4.15: Direkte Wechselwirkung von EpCAM und HA-FHL2. Je 1 μg linearisierter Plasmid-DNA (pDrive::EpCAM, pDrive::HA-FHL2) wurden in getrennten Reaktionen durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert. 1 μg gebildeter RNA wurde anschließend im Kaninchen-Retikulocytenlysat translatiert. Die gebildeten Proteine (EpCAM, HA-FHL2) wurden *in vitro* gemischt und mit immobilisierten, spezifischen Antikörper gegen EpCAM und HA immunpräzipitiert. Die Detektion von FHL2 und von ko-präzipitiertem EpCAM erfolgte im Immunblot (α -FHL2). Als Kontrolle der Proteinexpression wurden 25% der gebildeten Proteinmenge geladen. Zur Kontrolle der Spezifität wurde eine IP gegen EpCAM in Retikolocytenlysat nur mit FHL2 durchgeführt. Die Detektion mittels FHL2-spezifischem Antikörper lieferte kein Signal (Ktrl.-IP). Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um eine direkte Wechselwirkung der beiden *in vitro* gebildeten Proteine zu untersuchen, wurden die separaten Ansätze von EpCAM und HA-FHL2 nach der Translationsreaktion gemischt. Die Immunpräzipitation von FHL2 (Abb. 4.15, 3. Spur von links) aus diesem Gemisch erlaubte eine Ko-Präzipitation von EpCAM (Abb. 4.15, linke Spuren). Dieses Ergebnis zeigt, dass beide Proteine direkt miteinander wechselwirken. Es fiel auf, dass FHL2 sehr gut präzipitiert werden konnte, die Menge an ko-präzipitiertem EpCAM jedoch geringer war. Die Unterschiede in der Ausgangsmenge des eingesetzten Proteins kommen auf Grund der unterschiedlichen Transkriptions-/Translationseffizienz zustande.

4.4.4 EpCAM, FHL2 und β -Catenin bilden einen trimeren Komplex

Aus Untersuchungen anderer Gruppen (Martin et al., 2002) war FHL2 als ein Ko-Aktivator von β -Catenin bekannt. Da β -Catenin als Komponente des Wnt-Signalweges auch an der Aktivierung des *c-myc* Gens beteiligt ist, lag die Vermutung nahe, dass EpCAM mit β -Catenin ebenfalls interagieren kann. Um diese Annahme zu testen, wurden die Wechselwirkungen von β -Catenin, HA-FHL2 und EpCAM in HEK293EpCAM/HA-FHL2-Zellen biochemisch untersucht (Abb. 4.16). Bei der IP von HA-FHL2 konnte die bereits publizierte Interaktion

mit β -Catenin bestätigt und eine Interaktion mit EpCAM detektiert werden (Abb. 4.16, dritte Spur). Umgekehrt war es möglich, mittels der Ko-IP von β -Catenin die Bindung von HA-FHL2 und EpCAM nachzuweisen (Abb. 4.16, erste Spur). Die spezifische Isolierung von EpCAM erlaubte eine Ko-Präzipitation sowohl von HA-FHL2 als auch β -Catenin (Abb. 4.17, zweite Spur). HA-FHL2 und β -Catenin wurden mit spezifischen Antikörpern auf derselben Membran detektiert. Es konnten keine unspezifischen Bindungen bei der Kontroll-IP in HEK293 Δ /HA-FHL2- oder HEK293EpCAM-Zellen detektiert werden.

An Hand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass EpCAM mit FHL2 und β -Catenin interagiert, so wie FHL2 mit β -Catenin. Somit wurde die Wechselwirkung von EpCAM mit einer wichtigen Komponente des Wnt-Signalweges erstmals aufgezeigt.

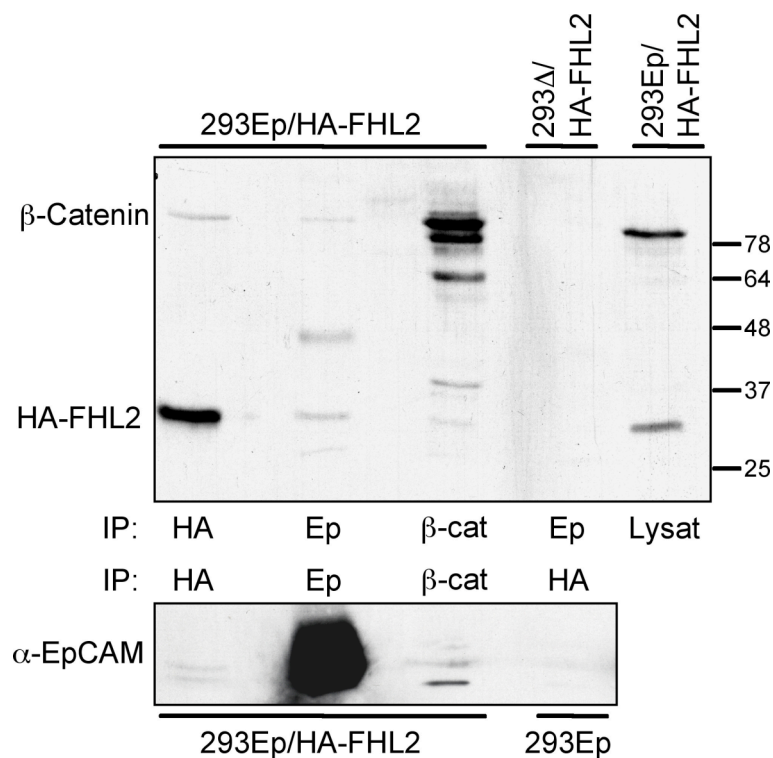


Abbildung 4.17: Nachweis der Interaktion von EpCAM, HA-FHL2 und β -Catenin. Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) mittels immobilisierter, spezifischer Antikörper gegen EpCAM, HA-FHL2 und β -Catenin wurden wechselseitig in Lysaten stabiler HEK293Ep/HA-FHL2-Zellen und entsprechender Kontrollzellen (HEK293Ep und HEK293 Δ /HA-FHL2) durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen EpCAM, HA und β -Catenin. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.4.5 Expressionsprofil von EpIC, FHL2 und β -Catenin im HEK293-Zellsystem und in Karzinomzelllinien

Nachdem die Wechselwirkungen von EpCAM, FHL2 und β -Catenin proteinbiochemisch nachgewiesen werden konnten, war die Lokalisation der unterschiedlichen Komponenten im HEK293-Zellsystem in An- und Abwesenheit von EpCAM und in Karzinomzellen von Interesse.

Die Immunfluoreszenzfärbung von FHL2 und β -Catenin in HEK293 Δ - und HEK293EpCAM-Zellen verdeutlichte Unterschiede in der Lokalisation beider Proteine. Waren FHL2 und β -Catenin in HEK293 Δ -Zellen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.17a/b, linke Seite), zeigte sich in HEK293EpCAM-Zellen eine verstärkte Translokation beider Proteine in den Zellkern (Abb. 4.17a/b, rechte Seite). In HEK293 Δ -Zellen war die typische Membran- und eine geringe zytoplasmatische Färbung von β -Catenin gut sichtbar (Abb. 4.17b, linke Seite). In HEK293EpCAM-Zellen kam es im Vergleich zu einer Verstärkung der zytoplasmatischen Expression des Moleküls. Zudem konnte eine Lokalisation von β -Catenin im Kern der Zellen detektiert werden (Abb. 4.17c, rechte Seite). Um sicherzustellen, dass beide Zelllinien gleiche Mengen der FHL2 und β -Catenin exprimierten, wurden HEK293EpCAM- und HEK293 Δ -Zelllysate im Immunblot analysiert. Wie bereits in Abbildung 4.15a (linke Seite) dargestellt, wurden die beiden Proteine in beiden Zelllinien gleichermaßen exprimiert.

Um die biochemisch nachgewiesenen Interaktionen von EpCAM/FHL2 und EpCAM/ β -Catenin *in vivo* zu bestätigen, wurde anschließend die Lokalisation von endogenem EpIC und FHL2 durch Doppelfärbungen in Karzinomzelllinien genauer untersucht. Zur Visualisierung von EpIC und FHL2 in Karzinomzellen wurden diese mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Proteine inkubiert und durch zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper im Laserscanning-Mikroskop detektiert. Wie der Abbildung 4.18a zu entnehmen ist, kommt es in allen drei FaDu-Karzinomzelllinien im Zytoplasma, vor allem in perinukleären Bereichen, aber auch im Zellkern zu Kolo-kalisationen von EpIC und FHL2. Gleiche Resultate wurden auch bei der Färbung weiterer Karzinomzelllinien erzielt. Bei der Doppelfärbung von FaDu-Zellen gegen EpIC und β -Catenin zeigte sich ebenfalls eine Kolo-kalisation der beiden Proteine (Abb. 4.18b). Diese war hauptsächlich im Zytoplasma und in vermindertem Maße im Kern zu sehen.

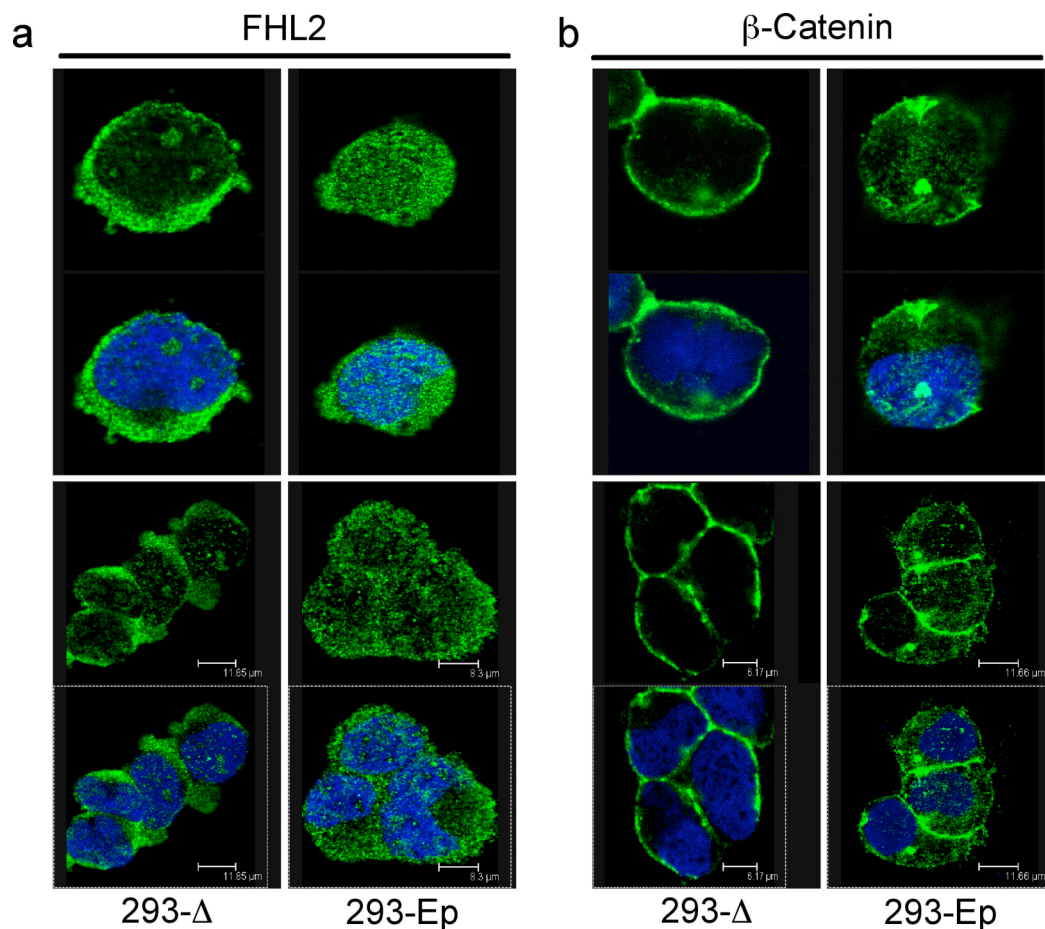


Abbildung 4.17: Lokalisation von FHL2 und β -Catenin in HEK293EpCAM- und HEK293 Δ -Zellen. Die FHL2- und β -Catenin-spezifische Detektion wurde über den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa 488) im Laserscanning-Mikroskop visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. (a) FHL2 Lokalisation in HEK293 Δ - (links) und HEK293EpCAM-Zellen (rechts). (b) β -Catenin Lokalisation HEK293 Δ - (links) und HEK293EpCAM-Zellen (rechts). Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Untersuchung der EpCAM-FHL2-Wechselwirkung ergab, dass die beiden Proteine direkt interagieren. Zusätzlich wurde β -Catenin als Interaktionspartner von EpCAM identifiziert. Durch Ko-Lokalisation von EpIC/FHL2 und EpIC/ β -Catenin im Zytoplasma und Zellkern wurden diese Resultate zusätzlich bestätigt. Die verstärkte Kernlokalisierung von FHL2 und β -Catenin im HEK293-Zellsystem in Anwesenheit von der EpCAM wies daraufhin, dass eine Interaktion der Moleküle eine Translokation des Komplexes in den Zellkern zur Folge hatte.

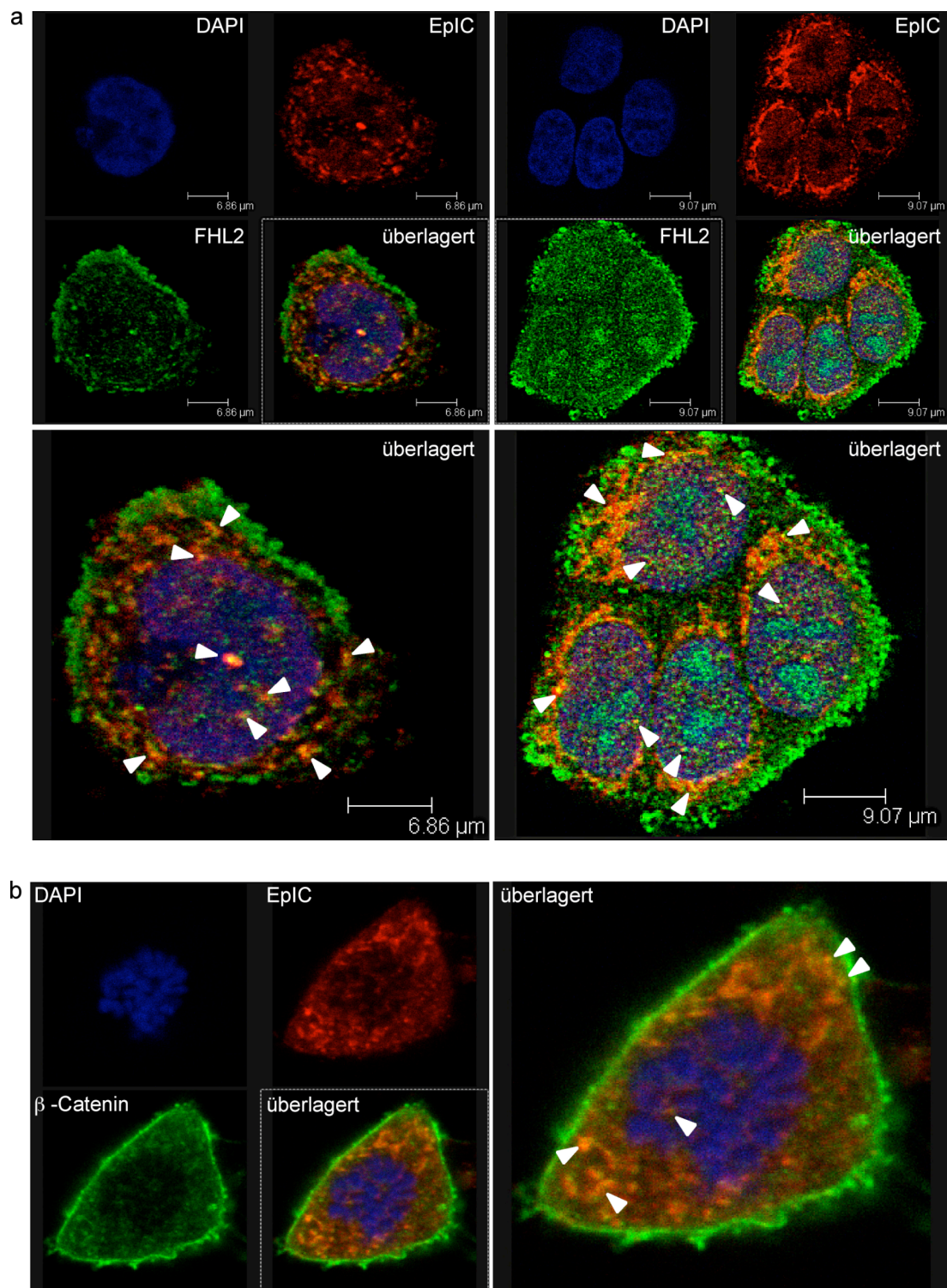


Abbildung 4.18: Ko-Lokalisation von EpIC und FHL2 bzw. β -Catenin in FaDu-Karzinomzellen. EpIC- und FHL2- bzw. β -Catenin wurden in den angegebenen Zelllinien mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa-488 und Alexa 647) markiert. Die Lokalisation von EpIC (rot) und FHL2 bzw. β -Catenin (grün) wurde durch Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Die Kerne (oben links) wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Ko-Lokalisationen (gelb-orange) wurden durch Überlagerung der Einzelfärbungen visualisiert. (a) Doppelfärbung von EpIC und FHL2 und (b) EpIC und β -Catenin in FaDu-Zellen. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.5 Funktionelle Analyse der EpCAM-FHL2 Interaktion

Es wurde bereits beschrieben, dass die *de novo* Expression von EpCAM die Hochregulation von c-Myc und eine verstärkte Zellproliferation zur Folge hat (Munz et al., 2004). Mit Hilfe der durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass zwischen EpCAM und FHL2 eine direkte Wechselwirkung besteht. Aus GST-pull-down Experimenten mit Mutanten von FHL2 geht hervor, dass für diese Wechselwirkung die vierte LIM-Domäne des Moleküls essentiell ist (Promotionsarbeit M. Benk).

Es stellte sich nun die Frage, welche Rolle die direkte Wechselwirkung von EpCAM und FHL2 auf die Expression von c-Myc und die Proliferation EpCAM-positiver Zellen hat. Im Folgenden soll diese Fragestellung experimentell untersucht werden.

4.5.1 Auswirkungen der Repression von FHL2 und EpCAM auf die Zellproliferation und Aktivierung von EpCAM-Zielgenen im HEK293-Zellsystem

Im HEK293EpCAM/ Δ -Zellsystem wurde wahlweise EpCAM und FHL2 durch Verwendung spezifischer siRNA (*small interfering RNAs*) transient reprimiert. Anschließend wurden die FHL2 und EpCAM spezifische Repression sowie die Auswirkung auf die c-Myc-Expression und die Zellproliferation in einer Zeitkinetik untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Effizienz jeweils drei verschiedener siRNAs untersucht, die unterschiedlichen Regionen der EpCAM- bzw. FHL2-mRNA entsprechen. Für die anschließenden Experimente wurde die jeweils effektivste siRNA verwendet (Daten nicht gezeigt). Die getesteten siRNAs wiesen laut BLAST-Sequenz-Analyse keine Homologie zu anderen humanen mRNA-Regionen auf. Die Spezifität der verwendeten EpCAM-siRNA wurde zusätzlich in EpCAM-negativen HEK293 Δ -Zellen überprüft. Hier sollte die siRNA weder einen Effekt auf c-Myc noch auf die Proliferation der Zellen zeigen.

HEK293EpCAM- und HEK293 Δ -Zellen wurden zu gleichen Zellzahlen ausplattiert und mit jeweils 100 nMol mRNA spezifischer siRNA (FHL2 oder EpCAM) oder 100 nMol Kontroll-siRNA transfiziert. Die Auswirkung der Repression von FHL2 und EpCAM auf c-Myc wurde über einen Zeitraum von vier Tagen im Immunblot analysiert. Parallel dazu wurde der Einfluss der Repression beider Proteine auf die Zellproliferation analysiert.

Die Ergebnisse der Repression von FHL2 oder EpCAM im Zusammenhang mit der c-Myc-Expression in HEK293EpCAM- und HEK293 Δ -Zellen sind in Abbildung 4.19b und c

gezeigt. Die Analyse der Auswirkungen der unterschiedlichen siRNA-Behandlung auf die EpCAM-, FHL2- und c-Myc-Proteinexpression wurden im Immunblot mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Detektion der verschiedenen Proteine erfolgte nacheinander auf derselben Proteinmembran. Dargestellt wurde der Effekt der siRNA-Behandlung von HEK293EpCAM- und HEK293Δ-Zellen an den Tagen zwei bis vier.

Wie in Abbildung 4.19b dargestellt ist, zeigte sowohl die verwendete FHL2 siRNA (linke Spalte, erste Reihe) als auch die EpCAM siRNA (mittlere Spalte, zweite Reihe) eine deutliche Reduktion der Expression des jeweiligen Zielproteins. Bei der Analyse der c-Myc-Proteinmenge der unterschiedlich behandelten Zellen wurde folgende Beobachtung gemacht: Die Inhibition der FHL2 Expression hatte eine lang anhaltende Repression der c-Myc-Expression zur Folge (Abb. 4.19b, linke Spalte, zweite Reihe). Die Inhibition der EpCAM Expression zeigte dagegen eine kürzer anhaltende Repression von c-Myc (Abb. 4.19b, mittlere Spalte, zweite Reihe). Die parallel durchgeführten Untersuchungen in HEK293Δ-Zellen sind im unteren Abschnitt der Abbildung 4.19c dargestellt. Wie diesem Teil der Abbildung zu entnehmen ist, hatte die Reduktion von FHL2 mittels spezifischer siRNA (Abb. 4.19c, linke Spalte obere Reihe) in HEK293Δ-Zellen keinen Effekt auf die c-Myc-Expression (Abb.4.19c, linke Spalte mittlere Reihe). Diese Aussage war auch für die Inkubation von HEK293Δ-Zellen mit EpCAM- oder Kontr.-siRNA zutreffend (Abb. 4.19c unten, mittlere und rechte Spalte). Somit konnte gezeigt werden, dass FHL2 eine essentielle Rolle in der EpCAM-vermittelten Induktion von c-Myc spielt und Teil der Signaltransduktionskette ist.

Die spezifische Reduktion der EpCAM- oder FHL2-Expression mittels siRNAs hatte zudem die Inhibition der Proliferation von EpCAM-positiven HEK293-Zellen zur Folge (Abb. 19a). Die Reduktion der Expression beider Proteine hemmt die Proliferation der Zellen in gleichem Maße und reduzierte diese um das 3,2 fache verglichen mit Kontrol-siRNA behandelten HEK293-EpCAM-Zellen. Eine Hemmung von EpCAM oder FHL2 in EpCAM-negativen Zellen hatte keinen messbaren Einfluss auf die Zellproliferation (Abb. 4.19a). Da EpCAM in diesen Zellen nicht exprimiert wird, war das Ergebnis erwartungsgemäß. Nicht so jedoch für FHL2, das an EpCAM-unabhängigen Prozessen ebenfalls beteiligt ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von EpCAM mit FHL2 auch für die EpCAM-vermittelte Zellproliferation von funktioneller Bedeutung war.

Die Inhibition der Expression durch spezifische siRNA hatte eine Hemmung der EpCAM-vermittelten Signale bezogen auf die c-Myc-Expression und Zellproliferation zur Folge. Somit konnte gezeigt werden, dass FHL2 bei der EpCAM-Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielen musste.

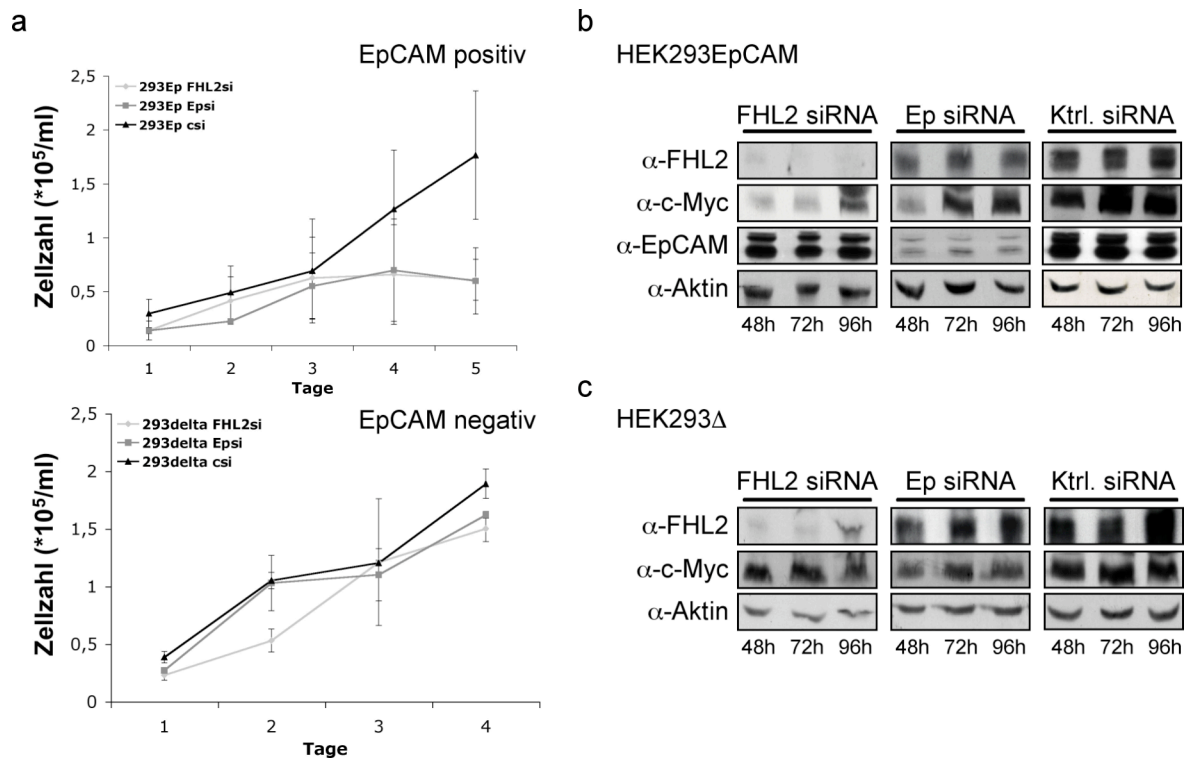


Abbildung 4.19: Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von EpCAM und FHL2 auf die Zellproliferation und Proteinexpression der Zielgene. HEK293EpCAM- und HEK293Δ-Zellen wurden mit EpCAM- oder FHL2-spezifischer oder Ktrl.-siRNA (100nMol/300.000 Zellen) behandelt. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer an den Tagen 1 bis 4 nach der Transfektion bestimmt. Die Menge gebildeten EpCAM-, FHL2- und c-Myc-Proteins wurde über einen Zeitraum von drei Tagen (Tag 2 bis 4) mittels spezifischer Antikörper gegen die entsprechenden Proteine im Immunblot semiquantitativ bestimmt. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde neben der BCA-Proteinquantifizierung ein Aktin-Immunblot durchgeführt. (a) Zellproliferation: Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. (b) Die Verwendung von FHL2- (1. Spalte), EpCAM-spezifischer (2. Spalte) und Ktrl.-siRNA (3. Spalte) zeigt eine Reduktion der c-Myc-Expression (2. Reihe) in HEK293EpCAM-Zellen. (c) Die Verwendung von FHL2- (1. Spalte), EpCAM-spezifischer (2. Spalte) bzw. Ktrl.-siRNA (3. Spalte) zeigt keine Auswirkung auf die c-Myc-Expression (2. Reihe) von HEK293Δ-Zellen.

4.6 EpIC, FHL2, β-Catenin und Lef-1 bilden einen nukleären Komplex

Aus Untersuchungen zum Wnt-Signalweg ist bekannt, dass β-Catenin mit FHL2 wechselwirkt, in den Zellkern transloziert und an TCF/Lef bindet (Shtutman et al., 1999). Über die Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes, bestehend aus β-Catenin und TCF/Lef, an spezifische DNA-Sequenzen im *c-myc*-Promotorbereich wird die Expression des Gens aktiviert oder verstärkt (He et al., 1998).

Der Nachweis der Wechselwirkung von EpCAM, FHL2 und β-Catenin sowie die Ko-Lokalisation von EpIC mit FHL2 und β-Catenin im Zellkern verschiedener

Karzinomzelllinien lieferte einen ersten Hinweis für eine EpIC-abhängige Aktivierung der c-Myc-Expression durch TCF/Lef vermittelte DNA-Bindung.

Aus Daten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass EpIC in Gesamtzelllysaten von HEK293EpCAM-YFP-Zellen mit Lef-1 wechselwirkte. Des Weiteren war bekannt, dass EpIC in Kernextrakten dieser Zellen neben Lef-1 auch mit β -Catenin interagiert. Untersuchungen in Kernextrakten von Karzinomzelllinien sollten darüber Aufschluss geben, ob ein endogener Komplex, bestehend aus EpIC, FHL2, β -Catenin und Lef, in Krebszellen vorkommt und hier in der Lage ist, an Lef-spezifische DNA Sequenzen zu binden.

4.6.1 Analyse von EpIC-Kernkomplexen aus Karzinomzelllinien in der nativen zweidimensionalen Gelelektrophorese

Zum Nachweis eines potentiellen EpIC-spezifischen Kernkomplexes, bestehend aus EpIC, FHL2, β -Catenin und Lef-1 im HEK293-Zellsystem und in Karzinomzelllinien, wurden zunächst Kerne aus HEK293EpIC-YFP- und FaDu-Zellen isoliert. Die Kerne wurden anschließend in Lysispuffer zur Gewinnung von nativen Proteinkomplexen inkubiert. Nach der Auftrennung der Extrakte in einem nativen Gradientengel (1. Dimension) konnte ein EpIC-spezifischer Komplex im Immunoblot detektiert werden (Abb. 4.20a, linker Teil). Das veränderte Laufverhalten des EpIC-Komplexes aus HEK293EpIC-YFP-Zellen im nativen Gradientengel lässt sich durch die Fusion an das YFP-Molekül erklären. Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte in der ersten Dimension bereits gezeigt werden, dass EpIC, FHL2, β -Catenin und Lef-1, jedoch nicht EpEX Teil des Multiproteinkomplexes sind (Abb. 4.20a rechter Teil).

Zum weiteren Nachweis der Beteiligung von EpIC, FHL2, Lef-1 und β -Catenin am Multiproteinkomplex wurde dieser in einer 2. Dimension aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde die gesamte Spur des FaDu-Kernextraktes aus dem nativen Gel ausgeschnitten, um 90° gedreht und auf ein denaturierendes Tris-Tricin-Gel aufgelegt. Die Proteine des Komplexes wurden unter geeigneten Bedingungen auf diese Weise der Größe nach aufgetrennt. Durch Inkubation derselben Membran mit spezifischen Antikörpern konnten alle Proteine nachgewiesen werden: EpIC (ca. 5 kDa), FHL2 (30 kDa), Lef (48 kDa) und β -Catenin (85 kDa) (Abb. 4.20b). Erwähnenswert ist die verbesserte Stabilität des EpIC-Moleküls im Multiproteinkomplex, welche in einer deutlich erleichterten Detektion resultiert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in FaDu-Karzinomzellen ein EpIC-spezifischer Komplex existierte, in dem FHL2, Lef und β -Catenin enthalten sind. Dieses Resultat lieferte

zudem die weitere Bestätigung dafür, dass die zuvor für EpCAM beschriebenen Wechselwirkungen mit FHL2 und β -Catenin auch für EpIC Gültigkeit besitzen.

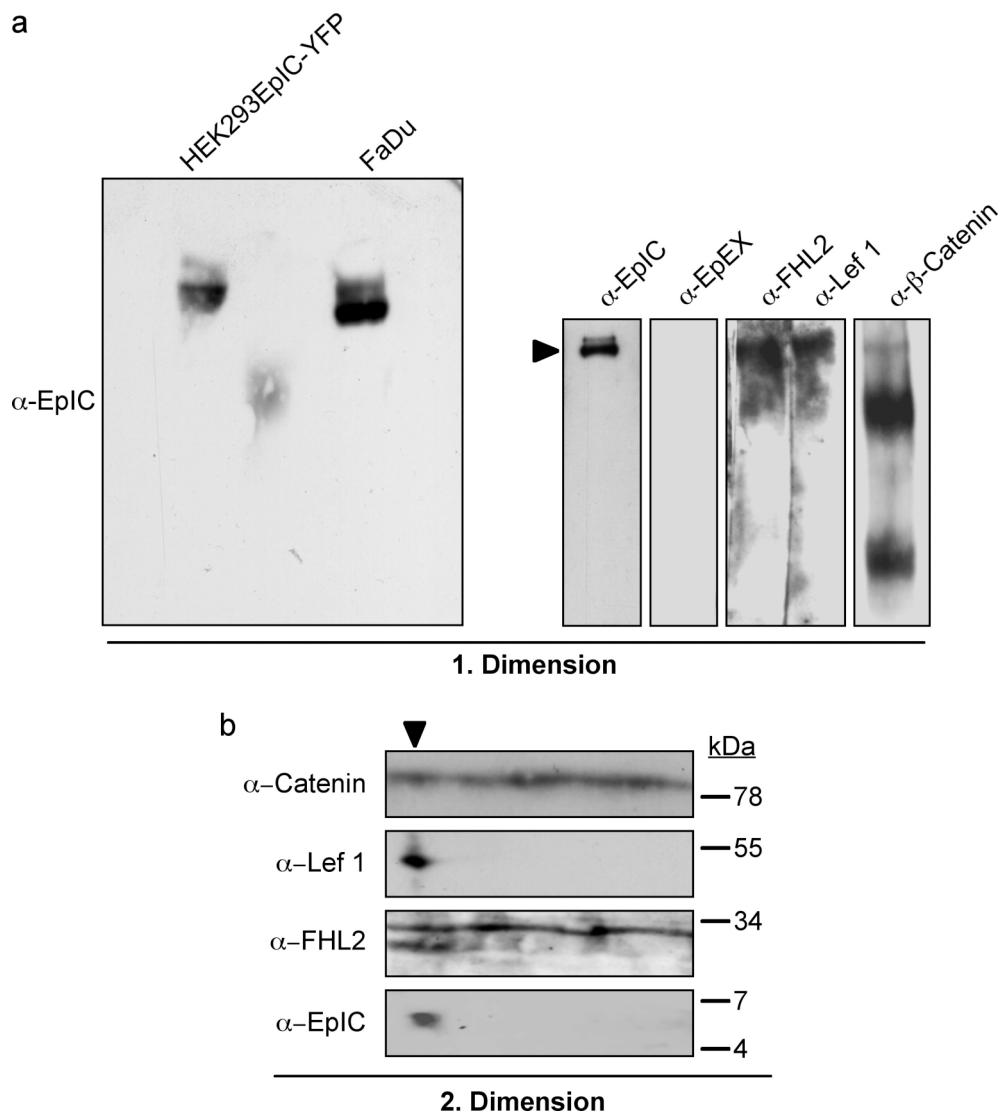


Abbildung 4.20: EpIC bildet einen nukleären Multiproteinkomplex mit FHL2, Lef-1 und β -Catenin. (a) Der Nachweis eines EpIC-spezifischen Komplexes in HEK293EpIC-YFP- und FaDu-Kernextrakten erfolgte durch Auftrennung in einem nativen Gradientengel (1. Dimension; 5-12%, links) und Detektion mittels EpIC-spezifischem Antikörper. In demselben Komplex wurden durch Verwendung der entsprechenden spezifischen Antikörper ebenso FHL2, Lef-1 und β -Catenin nachgewiesen (rechts). EpEX konnte hier nicht detektiert werden. (b) Die Spur des EpIC-spezifischen Komplexes wurde ausgeschnitten, um 90° gedreht und in einem denaturierenden 17,5%igen Tris-Tricin-Gel (2. Dimension) aufgetrennt. EpIC, FHL2, Lef-1 und β -Catenin wurden im Immunblot nachgewiesen. Die Proteinmarker sind jeweils eingezeichnet (kDa). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

4.6.2 Der EpIC spezifische Kernkomplex bindet Lef-1-DNA-Konsensussequenzen

Das Vorhandensein von EpIC in einem Komplex mit Lef-1 und das gesprenkelte Färbemuster EpICs im Zellkern waren ein erster Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung mit DNA. Die Wechselwirkung mit Lef-1 legte den Verdacht nahe, dass EpIC auf diese Weise Lef-Konsensussequenz innerhalb der chromosomalen DNA kontaktieren kann. Um diese Möglichkeit experimentell zu überprüfen, wurde ein Gelmobilitätsversuch („*electromobility shift assay*“, EMSA) durchgeführt. Im EMSA wurde radioaktiv markierte DNA-Proben, die eine bekannte Lef-1 DNA-Bindungssequenz repräsentierten (Shtutman et al., 1999), zusammen mit nativem Kernextrakt unterschiedlicher Zelllinien inkubiert. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte anschließend im nativen Polyacrylamidgel. Es war zu erwarten, dass bei der Inkubation mit Kernextrakten verschiedene Lef-1-spezifische Proteinkomplexe an die DNA binden würden. Um die Bindung eines potentiellen EpIC-spezifischen Komplexes zu identifizieren, wurden folgende Versuchsansätze gewählt: in einem Ansatz wurden Kernextrakte von FaDu-Zellen, die zuvor für 24 h mit spezifischen Protease-Inhibitoren (DAPT und TAPI-2, Abb. 4.21a, Spur 2-4) behandelt worden waren, mit unbehandelten Zellen verglichen. In einem zweiten Ansatz wurden Kernextrakte stabiler HEK293EpIC-YFP-Transfektanten mit HEK293-Wildtypzellen verglichen (Abb. 4.21a, Spur 9 und 10). Durch Zugabe unmarkierter DNA gleicher Sequenz konnte die Intensität des detektierten Protein-DNA-Komplexes in FaDu-Kernextrakten reduziert werden (Abb. 4.21a, Spur 5 bis 7). Dies war mit unmarkierter DNA, die eine Punktmutation innerhalb der Lef-Konsensussequenz enthielt, nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Die Titration unmarkierter DNA diente der Überprüfung der Spezifität der detektierten Protein-DNA-Komplexe.

Das Ergebnis der unterschiedlichen EMSA-Reaktionen ist in Abbildung 4.21a dargestellt. Bei der Inkubation der DNA mit Kernextrakten unbehandelter FaDu-Zellen konnten zwei prominente spezifische Protein-DNA-Komplexe visualisiert werden. Bei der Inkubation der gleichen DNA mit Kernextrakten von FaDu-Zellen, welche zuvor mit DAPT und TAPI-2 behandelt wurden, fehlte der untere der beiden Protein-DNA-Komplexe gänzlich (Abb. 4.21a, 2. und 3. Spur). Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem unteren der beiden Komplexe um einen Protein-DNA-Komplex, welcher EpIC beinhaltet, handelte. Das Ergebnis wurde durch den Vergleich der Protein-DNA-Komplexe von HEK293EpIC-YFP und HEK293-Wildtypzellen bestätigt (Abb. 4.21a, Spur 9 und 10). Der untere Protein-DNA-Komplex war in parentalen HEK293 abwesend, in HEK293-EpIC-YFP-Zellen jedoch vorhanden. In einem Folgeversuch wurden Kernextrakte von FaDu-Zellen 1 h vor oder aber

für 5 min nach der Inkubation mit biotinmarkierter DNA zusätzlich mit EpIC- (Abb. 4.21b, Spur 4 und 7) oder Lef-spezifischem Antikörper (Abb. 4.21b, Spur 5 und 8) inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an das spezifische Protein sollte eine sichtbare Größenzunahme des Komplexes oder die Verhinderung der Komplexbildung durch antikörpervermittelte Auflösung des Komplexes oder Blockade der DNA-Bindungsstelle zur Folge haben. Wie in der Abbildung 4.21b dargestellt, kam es bei Präinkubation mit dem EpIC-spezifischen Antikörper zur stark reduzierten Bildung des EpIC-spezifischen Protein-DNA-Komplexes (Abb. 4.21b, 4. Spur). Die Inkubation der Probe nach der Protein-DNA-Komplexbildung führte bei Zugabe des Lef-1-spezifischen Antikörpers zu einer Auflösung beider spezifischer Komplexe (Abb. 4.21b, 8. Spur). Ein Antikörper-vermittelter Super-Shift konnte aus bislang unbekanntem Gründen nicht gezeigt werden.

Zum Nachweis der Existenz des EpIC-spezifischen Protein-DNA-Komplexes in verschiedenen Karzinomzelllinien wurden EMSAs mit Kernextrakten und zytoplasmatischen Fraktionen der folgenden Zelllinien durchgeführt: A549, Ant-I, MCF-7 und HCT-8. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21c dargestellt. In allen untersuchten Kernextrakten konnten beide spezifischen Protein-DNA-Komplexe, analog zu FaDu-Kernextrakten, in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Eine Detektion des EpIC-spezifischen, DNA-bindenden Komplexes im Zytoplasma der Zellen war nicht möglich. In ANT-1-Zellen, die nur sehr schwach EpCAM positiv sind, war der EpIC-spezifische Komplex nicht detektierbar (Abb. 4.21c, 5. Spur). In A549, SkBr3, MCF-7 und HCT-8 wurde ein zusätzlicher, hochmolekularer DNA-bindender Proteinkomplex identifiziert. Ob es sich hierbei ebenfalls um einen EpIC-spezifischen Komplex handelte, muss in Folgeversuchen noch geklärt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass ein EpIC-spezifischer Kernkomplex, der FHL2, β -Catenin und Lef-1 enthält, in der Lage war, an TCF/Lef spezifische DNA-Konsensussequenzen zu binden.

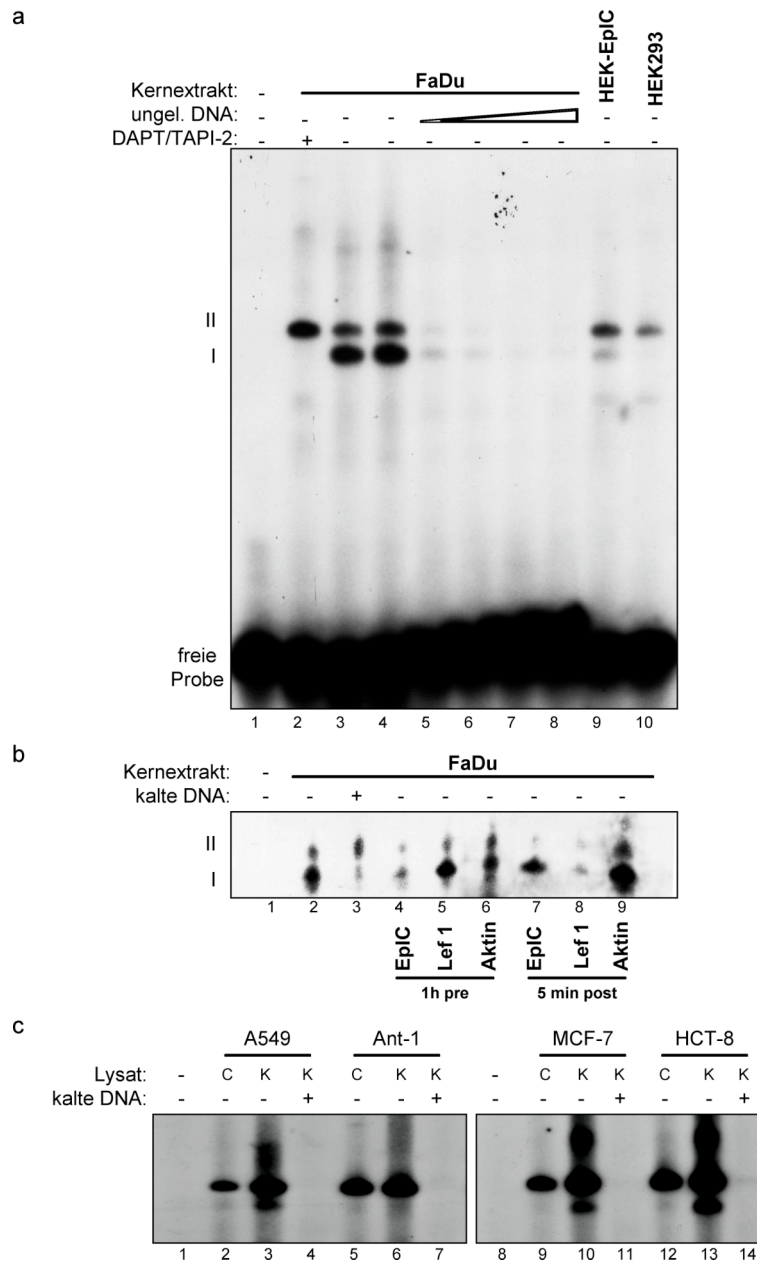


Abbildung 4.21: Ein EpIC-spezifischer Proteinkomplex bindet Lef-1-spezifische DNA-Bindesequenz. (a) FaDu-, HEK293EpIC-YFP- und HEK293-Kernlysate wurden mit radioaktivmarkiertem CD1-TOP-Oligonukleotid inkubiert und anschließend in einem nativen 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Wo angezeigt, wurde dem Reaktionsansatz zur Konkurrenz unmarkierte DNA in steigender Konzentration zugefügt. Zudem wurden Kernextrakte von FaDu-Zellen, die zuvor mit 10 μ g DAPT/ 40 μ M TAPI-2 behandelt wurden, verwendet (2. Spur). Als Kontrolle wurde radioaktivmarkierte DNA ohne Kernextrakt aufgetragen. Es konnten zwei Protein-DNA-Hauptkomplexe, hier als I und II markiert, identifiziert werden. In Spur 3 und 4 wurde der gleiche Kernextrakt in unterschiedlicher Konzentration (5 bzw. 7,5 μ g Protein) verwendet. **(b)** EpIC-, Lef-1- und Aktin-spezifische Antikörper wurden den entsprechenden Proben zu den angegebenen Zeitpunkten zugefügt. **(c)** Lysate von Zytoplasma und Kernextrakte weiterer Karzinomzelllinien (A549, Ant-1, MCF-7 und HCT-8) wurden auf Lef-1-spezifische DNA-bindende Komplexe hin untersucht. Wo angezeigt, wurde dem Reaktionsansatz zur Konkurrenz kalte DNA zugefügt.

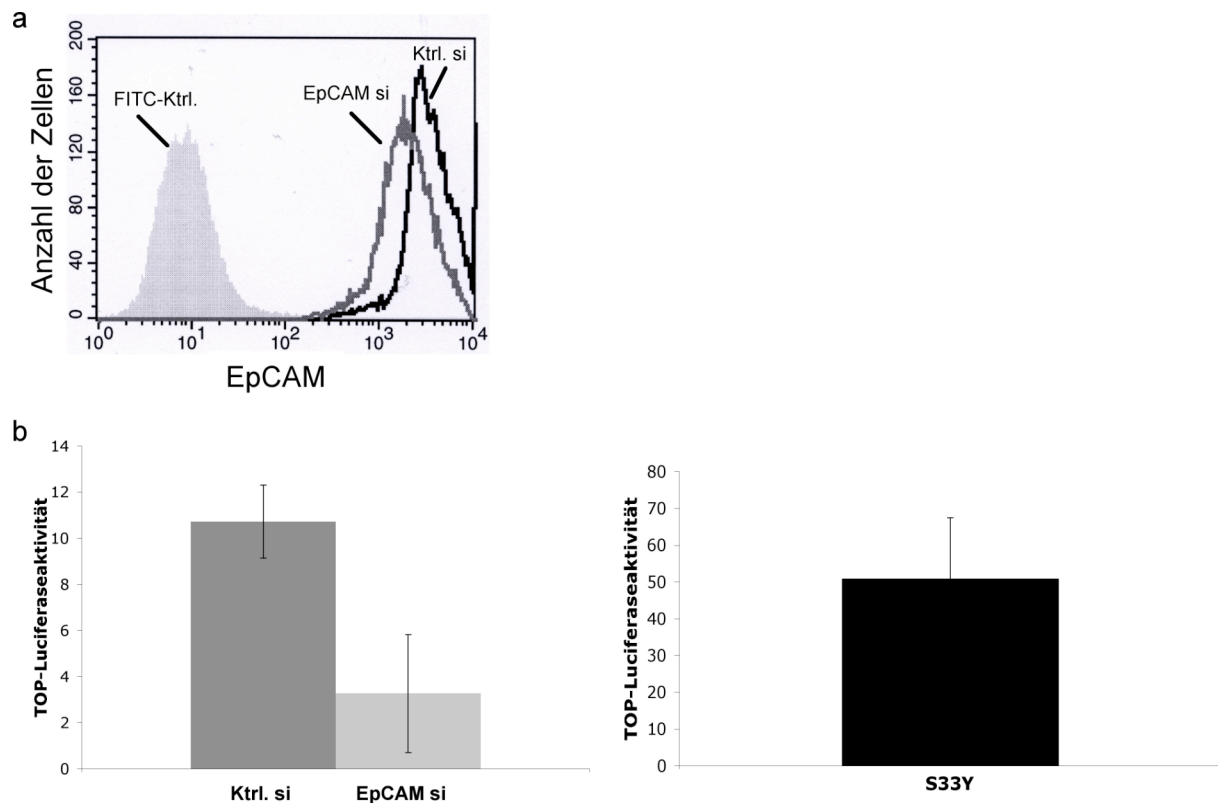


Abbildung 4.22: Relevanz der EpCAM-Expression für die Induktion Lef-1-spezifischer Luc-Reporter. (a) 24 h nach Transfektion von 200 pmol EpCAM-spezifischer siRNA kommt es zu einer 40%igen Reduktion der EpCAM-Oberflächenexpression. (b) Durch Reduktion der EpCAM-Expression wird die TOP-Luziferaseaktivität um 70% reduziert. Die konstitutiv aktive β -Catenin-Mutante sorgt für eine hohe TOP-Luziferaseaktivität (links).

4.6.3 Nachweis der funktionellen Relevanz der EpCAM-Expression für die Bindung Lef-1-spezifischer DNA-Sequenzen

Die funktionelle Relevanz der EpCAM-Expression für die Bindung des EpIC-Komplexes an Lef-1-spezifische Konsensussequenzen wurde durch den Einsatz von TOP- und FOP-Flash-Reporterkonstrukten (Upstate Biotechnology, Lake Placid USA) untersucht. Die Reporter enthielten die gleichen Lef-1-Konsensussequenzen, wie auch im EMSA verwendet, jedoch als Oktamere (super-8 TOP-FLASH). Zur Kontrolle wurde diese mutiert. Die erzielten Luziferasewerte dienten der Normierung der Lef-1-Aktivität (super-8 FOP-FLASH). 24 h nach Transfektion der Reporter in Kombination mit EpCAM- oder Kontroll-siRNA in HCT-8 Karzinomzellen wurden die jeweiligen Luziferaseaktivitäten bestimmt und normiert. Karzinomzellen, welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, zeigten eine 11-fache Aktivierung des Reporterplasmides. Die Behandlung der Zellen mit EpCAM-spezifischer siRNA führte nach 24 h zu einer Reduktion der EpCAM-Oberflächenexpression um 40% (Abb. 4.22a). Die verminderte EpCAM-Expression hatte eine 70%-ige Reduktion der TOP-

Luziferaseaktivität, verglichen mit Ktrl.-siRNA-behandelten Zellen zur Folge (Abb. 4.22b, links). Durch Transfektion einer konstitutiv aktiven Mutante von β -Catenin (S33Y) wurde die Funktionalität der verwendeten Reporter überprüft und eine 50-fache Aktivität bestimmt (Abb. 4. 22b, rechts). Die vorgelegten Ergebnisse untermauern somit die EpCAM-vermittelte Bindung von Lef-1 an DNA-Konsensussequenzen und dessen transkriptionelle Aktivität.

4.7 EpEX ist ein löslicher, extrazellulärer Ligand für intakte EpCAM Moleküle

Bei der Suche nach Liganden, die in der Lage waren die EpCAM-Spaltung zu induzieren und somit den Signalweg des Moleküls zu aktivieren, wurde an Hand von bereits gezeigten Daten (Kapitel 4.1 Abb. 4.1) folgende Hypothese entwickelt: Da es nur in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten zur Spaltung von EpCAM kam, wurden interzelluläre, intermolekulare Wechselwirkungen von EpCAM-Molekülen als Auslöser der proteolytischen Spaltung und Aktivierung des Signalweges postuliert.

Die Untersuchung dieser Hypothese erfolgte in zwei unterschiedlichen Ansätzen unter Verwendung rekombinant exprimierter, löslicher Ektodomäne von EpCAM (EpEX_{rec}).

4.7.1.1 EpExrec induziert die Spaltung von EpCAM-YFP nach ektopischer Expression in HEK293 Zellen

HEK293-Zellen wurden als Einzelzellen zu gleichen Zellzahlen ausplattiert und transient mit einem EpCAM-YFP-Expressionsplasmid (pEYFP-n1:EpCAM) transfiziert. In parallelen Ansätzen wurden diese Zellen mit nativem oder hitzeinaktiviertem EpEX_{rec} inkubiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und die Bildung von EpIC-YFP bestimmt. Aus den Resultaten der Versuche geht hervor, dass die Spaltung von EpCAM durch Zugabe von nativem EpEX_{rec} zeitabhängig aktiviert wird (Abb. 4.23a, oben). Nach 2 h ist EpIC-YFP erstmals nachweisbar. Bei der Behandlung mit hitzeinaktiviertem, also denaturiertem EpEX_{rec}, kommt es zu keiner Induktion der EpCAM-Spaltung.

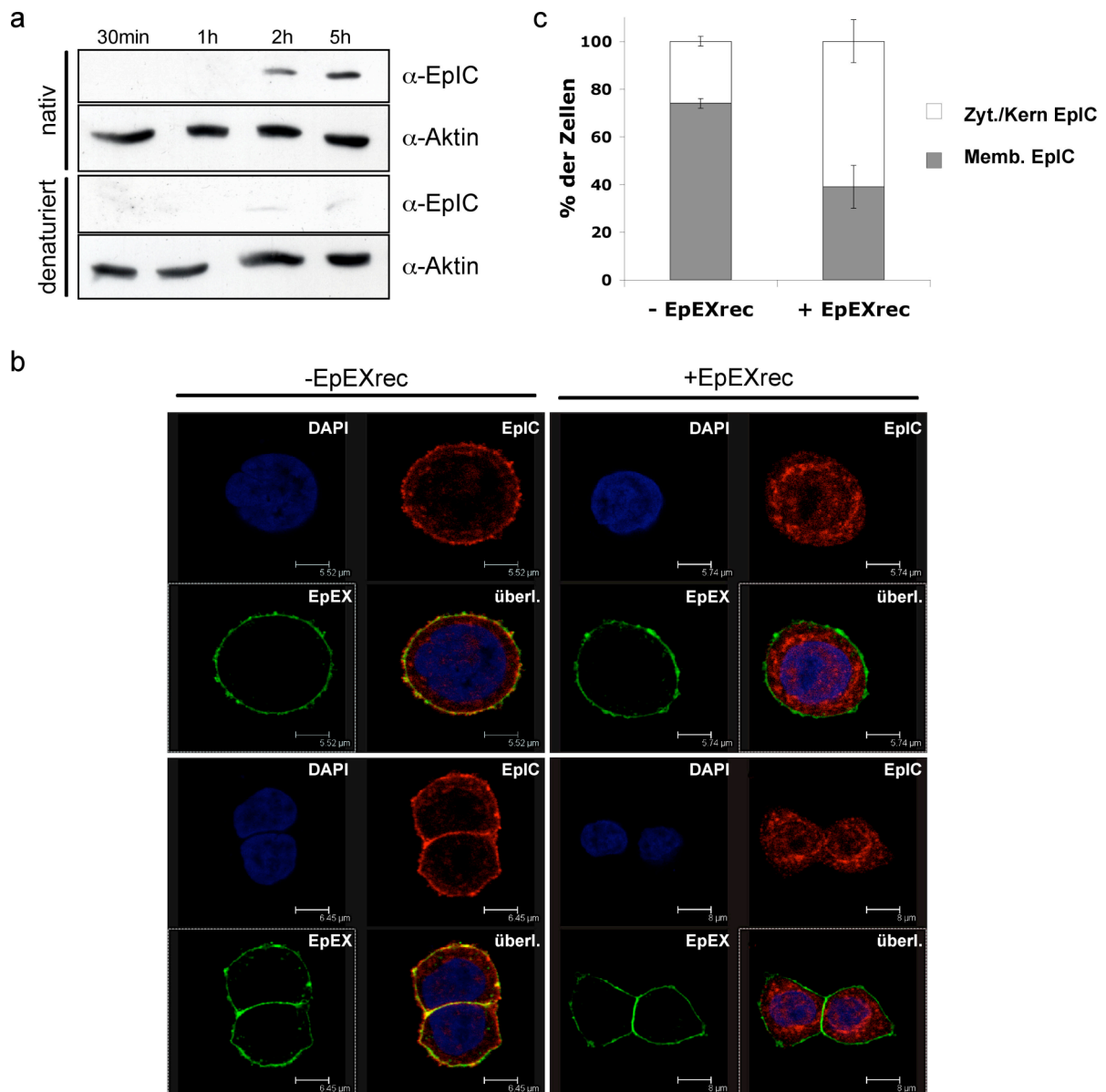


Abbildung 4.23: EpEX ist löslicher Ligand für EpCAM. (a) HEK293-Zellen wurden zunächst transient mit dem pEYFP-N1::EpCAM-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend mit rekombinant exprimiertem EpEX (EpEX_{rec}, in Hefen generiert) inkubiert. Die EpIC-Bildung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Immunblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurde Aktin auf der gleichen Membran nachgewiesen. Als Kontrolle der EpEX_{rec}-spezifischen Induktion der EpCAM-Spaltung wurden Zellen mit denaturiertem EpEX_{rec} (20 min, 95°C) behandelt. **(b)** FaDu-Zellen wurden als Einzelzellklone ausplattiert und mit EpEX_{rec} oder denaturiertem EpEX_{rec} inkubiert. Nach 24 h wurden EpEX- (grün) und EpIC- (rot) mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa 488 und Alexa 647) in diesen Zellen detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Lokalisation der Proteine wurde durch Laserscanning-Mikroskopie visualisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(c)** Statistische Analyse der EpIC-Lokalisation in FaDu-Zellen in Abhängigkeit von der EpEX_{rec}-Behandlung. Es wurde die EpIC-Lokalisation in 100 Zellen pro Versuchsgruppe bewertet.

4.7.2 EpEX induziert die Spaltung von endogenem EpCAM in FaDu-Karzinomzellen

Da es sich bei transienten HEK293EpCAM-YFP-Transfektanten um ein künstliches Zellsystem handelte, wurde die in 4.7 aufgestellte Hypothese durch einen weiteren Versuch in Karzinomzellen überprüft. Zu diesem Zweck wurden FaDu-Zellen als Einzelzellen ausplattiert und in parallelen Ansätzen für 24 h mit nativem oder denaturiertem EpEX_{rec} inkubiert. Anschließend wurde die EpCAM-Spaltung mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen gegen EpEX (grün) und EpIC (rot) überprüft (Abb. 4.23b). Die Inkubation von FaDu-Einzelzellen mit EpEX_{rec} führte zur Aktivierung der EpCAM-Spaltung. EpIC lokalisierte nicht mehr an der Plasmamembran und translozierte verstärkt ins Zytoplasma, hier besonders in den perinukleären Bereich und in den Zellkern (Abb. 4.23b, links). Im Gegensatz dazu war in den unbehandelten FaDu-Zellen bei einer Überlagerung der EpEX- und EpIC-Färbung eine Ko-Lokalisation an der Zellmembran zu sehen. Die Expression von EpIC im Zytoplasma war stark reduziert und im Kern nur sehr schwach nachweisbar (Abb. 4.23b, rechts). Eine quantitative Analyse von je 100 Zellen der beiden Versuchsgruppen ergab folgendes Resultat: Bei Behandlung der FaDu-Zellen mit denaturiertem EpEX_{rec} war lediglich in 21% der Fälle eine Kernlokalisierung von EpIC sichtbar. Bei Behandlung der Zellen mit nativem EpEX_{rec} war dahingegen in 61% der Fälle eine deutliche Kernlokalisierung zu detektieren (Abb. 4.23c).

Die Hypothese einer Aktivierung des EpCAM-Signalweges durch intermolekulare Wechselwirkung konnte somit in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen durch Verwendung von löslichem Ligand (EpEX_{rec}) bestätigt werden.

4.8 Abhängigkeit der Zellproliferation und der Aktivierung des EpCAM-Signalweges von der Zelldichte

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Spaltung von EpCAM in erster Linie in Zell-Zell-Kontaktbereichen stattfand und durch Behandlung von Zellen mit löslichem EpEX_{rec} aktiviert werden konnte, wurde postuliert, dass die Zelldichte ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation EpCAM-exprimierender Zellen und damit auf die Aktivität des Signalweges haben könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurden HEK293EpCAM- und FaDu-Zellen in unterschiedlichen Dichten ausplattiert. Die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche wurde an Tag drei und vier in der Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 4.24a; Es wurden jeweils 200000 Zellen pro Dichte [$1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^5$] untersucht).

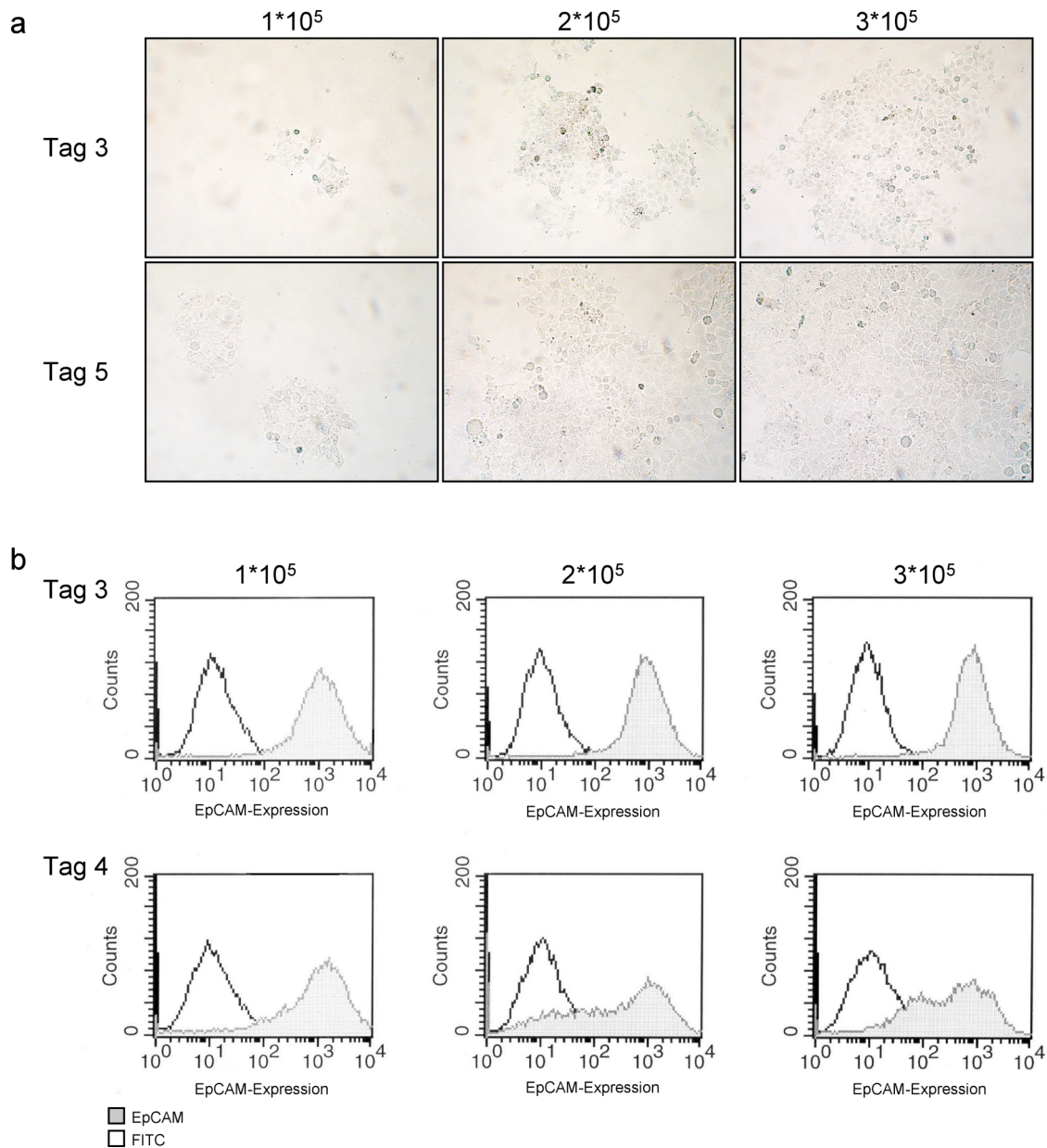


Abbildung 4.24: Erhöhte EpCAM-Spaltung in Abhängigkeit von der Zelldichte. HEK293EpCAM- und FaDu-Zellen wurden in drei unterschiedlichen Dichten ($1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ und $3 \cdot 10^5$ Zellen pro mittlere Zellkulturplatte) für sechs Tage ausplattiert. (a) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Zelldichten der HEK293EpCAM- und FaDu-Zellen an Tag drei und fünf. (b) Die EpCAM-Expression wurde mit Hilfe eines EpEX-spezifischen Antikörpers in Kombination mit FITC-markierten Sekundärantikörpern detektiert. Die EpCAM-Expression wurden anschließend in der Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von EpCAM-Molekülen an der Zelloberfläche, bei initial gleicher Ausgangsexpression am Tag 0 in beiden Zelllinien in Abhängigkeit von der Dichte über vier Tage unterschiedlich stark abnahm. Die Oberflächenexpression von EpCAM nahm in Zellen, welche anfänglich in höherer Dichte ausplattiert wurden, rascher ab. Dies wird beim Übergang von Tag drei auf Tag vier besonders deutlich (Abb. 4.24b). Die Oberflächenexpression von EpCAM war bei der geringsten Dichte unverändert (Faktor 1) und bei der höchsten Dichte um den Faktor 1,3 verringert (Tab. 4.5).

	1*10⁵	2*10⁵	3*10⁵	Zelldichte
Tag 3	75,1	73,2	73,9	EpCAM positive FaDu-Zellen in %
Tag 4	74,23	57,87	43,27	
Faktor der EpCAM-Abnahme	1	1,26	1,71	

Tabelle 4.5: Auswertung der FACS-Daten.

Diese ersten Ergebnisse zur Induktion der EpCAM-Spaltung und folglich des Signalweges weisen auf eine Autoaktivierung von EpCAM, welche durch eine Überexpression des Moleküls gefördert wird, hin. In Folgeexperimente werden die Auswirkungen, *i.e.* c-Myc-Induktion, Zellproliferation *etc.* einer solchen Aktivierung nach Zell-Zellkontakt detailliert untersuchen.

5. Diskussion

Im Verlauf der Karzinogenese kommt es durch die progressive Transformation gesunder Zellen zur Bildung maligner Tumorzellen. Ursache ist die Akkumulation von Mutationen in Genen, deren Produkte an der Zellzyklusregulation und Tumorsuppression beteiligt sind („*loss of function*“, „*gain of function*“ mutations) (Hanahan und Weinberg, 2000). Die betroffenen Gene kodieren für Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Eine Gruppe, die in diesem Zusammenhang eine essentielle Rolle spielt, sind die Membranproteine. Eine Veränderung der Funktion, Expression und/oder Lokalisation in Folge von Mutationen oder differentieller post-translationaler Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung) kann zur Deregulation mitogener Signale führen, welche als Folge nun permanent in den Zellkern gesendet werden. Diese konstitutiven Signale verschaffen den betroffenen Zellen einen Proliferationsvorteil. In diesem Zusammenhang zu nennen sind die Rezeptor-Tyrosinkinasen Her2/neu und der EGF-R, hervorragend charakterisierte Tumor-assoziierte Antigene und gleichermaßen Zielmoleküle bei der Krebstherapie (Bianco et al., 2005; Dhesy-Thind et al., 2007).

Dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM wird eine vergleichbar bedeutende Rolle bei der Karzinogenese zugesprochen, obschon die Kenntnis der eigentlichen Funktionsweise deutlich geringer ist. EpCAM wird in einer Vielzahl von Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe über- oder *de novo* exprimiert (de Boer et al., 1999a; Went et al., 2006). Eine starke Expression von EpCAM korreliert in vielen Fällen mit einer negativen Überlebensprognose (Kolon-, Brust-, Prostata, Pankreaskarzinom) (Fong et al., 2006; Spizzo et al., 2003; Stoecklein et al., 2006; Varga et al., 2004; Went et al., 2006). Auf Grund der Überexpression im Tumorgewebe bietet sich EpCAM als diagnostischer Marker und als Zielmolekül für verschiedene Antikörper-vermittelte Immuntherapien an (Armstrong und Eck, 2003; Baeuerle und Gires, 2007; Burges et al., 2007; Oberneder et al., 2006). Eine steigende maligne Veränderung von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) wird durch die *de novo* Expression in EpCAM-negativen Zellen und durch ansteigende Mengen EpCAM pro Zelle begleitet (Litvinov et al., 1994a). Gleichzeitig führt die Hemmung der EpCAM-Expression *in vitro* in Brust- und in HNO-Karzinomzelllinien zu einem deutlichen Verlust der Proliferationskapazität (Munz et al., 2004; Osta et al., 2004). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass ein Charakteristikum von Tumorstamm-/ Progenitorzellen bei Kolonkarzinomen die starke Expression von CD133, von EpCAM und das Vorhandensein dessen EpCAM-Interaktionspartners CD44 sind (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007b; O'Brien et al.,

2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Tumorstamm-/ Progenitorzellen werden als Ursprung von Tumoren *in vivo* in Betracht gezogen. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass EpCAM in diversen Vorläuferzellen (Schmelzer et al., 2006; Schmelzer et al., 2007), sowie in murinen und humanen embryonalen Stammzellen stark exprimiert ist. Mit der Differenzierung in verschiedene Zelltypen wird die Expression herunterreguliert. Eine mögliche funktionelle Rolle EpCAMs in Krebs-initiiierenden Zellen würde diesem ohnehin interessanten Zielantigen eine weitere Facette hinzufügen.

Die zentrale Rolle von EpCAM in Tumoren verschiedener Entitäten und in deren Stammzellen macht eine umfassende Kenntnis der Funktion und eine effiziente Hemmung des Moleküls zwingend erforderlich. Ähnlich wie die beiden bereits genannten Beispiele Her2/neu und dem EGF-R ist EpCAM in der Lage, Signale von der Plasmamembran in den Zellkern zu übertragen, welche letztlich zur Induktion von Zielgenen wie *c-myc*, *cyclin A* und *cyclin E*, *e-fabp* und anderen führt (Munz et al., 2004). Diese Effekte gehen einher mit gesteigerter Proliferation und Metabolismus, so wie einer verminderten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren.

Der Mechanismus der Signalübermittlung war zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit noch gänzlich unbekannt. Die Identifikation intrazellulärer Bindungspartner und der regulierten Intramembranproteolyse (RIP) als Grundlage einer Aktivierung des Signalweges, ermöglichen erstmalig einen detaillierten Einblick in die molekularen Mechanismen der EpCAM-Signaltransduktion.

5.1 EpCAM wird durch regulierte Intramembranproteolyse (RIP) aktiviert

Immunfluoreszenz- und biochemische Untersuchungen verschiedener EpCAM-exprimierender Zellen unter Verwendung von EpEX- und EpIC-spezifischen Antikörpern lieferten zum ersten Mal den Beweis einer proteolytischen Spaltung von EpCAM. Durch diese Spaltung wird EpEX in den Kulturüberstand freigesetzt. Zudem kommt es als Folge der Spaltung von EpCAM in der extrazellulären Domäne zur Spaltung von EpIC, welches im Zytoplasma, in perinukleären Bereichen und im Zellkern lokalisiert. Der experimentelle Nachweis der Existenz von EpEX und EpIC als zwei distinkte Spaltprodukte und die Notwendigkeit einer EpEX-Bildung zur Spaltung von EpIC weisen auf einen zweistufigen Prozess der EpCAM-Spaltung hin (Schema der EpCAMspaltung Abb. 5.1).

Der Mechanismus, der einer zweistufigen Spaltung von Transmembranproteinen zu Grunde liegt, wird als regulierte Intramembranproteolyse („**r**egulated **i**ntramembrane **p**roteolysis“, RIP) bezeichnet (Rawson, 2002). In diesem Zusammenhang wird zwischen der Klasse I-RIP bei Typ I-Transmembranproteinen (C-terminale Domäne zytoplasmatisch) und der Klasse II-RIP bei der Proteolyse von Typ II-Transmembranproteinen (N-terminale Domäne zytoplasmatisch) unterschieden (Rawson, 2002). Beispiele für die Klasse I-RIP sind der Notch-1-Rezeptor, APP („*Amyloid-beta Precursor Protein*“) (Conacci-Sorrell et al., 2005; De Strooper et al., 1998; Selkoe und Kopan, 2003), CD44, L1 (Stoeck et al., 2006), Nr-CAM (Conacci-Sorrell et al., 2005), SorLA (Bohm et al., 2006), gamma-Protokadherine (Frank und Kemler, 2002; Haas et al., 2005) und DCC („*deleted in colorectal cancer*“) (Taniguchi et al., 2003). SREBP („*sterol regulatory element-binding factor*“) und ATF6 („*activating transcription factor 6*“) sind Proteine, die durch die Klasse II-RIP prozessiert werden (Kopan und Ilagan, 2004). RIP wird durch die Interaktion mit einem extrazellulären rezeptorspezifischen Liganden aktiviert. Die erste Proteolyse in der extrazellulären Domäne wird von Proteasen der ADAM-Familie katalysiert und führt zur Freisetzung einer Ektodomäne, *i.e.* einer löslichen Form der extrazellulären Domäne. Sie ist Grundvoraussetzung für die zweite Proteolyse in der Transmembrandomäne. Die zweite Spaltung wird im Falle der Klasse I-RIP durch den γ -Sekretase-Komplex katalysiert und führt zur Freisetzung der signaltransduzierenden intrazellulären Domäne (Medina und Dotti, 2003; Rawson, 2002). Die Klasse II-RIP erfordert die Aktivität von S2P („*Site-2-protease*“) (Kopan und Ilagan, 2004).

Ein weiterer Hinweis, dass RIP für die Prozessierung von EpCAM verantwortlich ist, war die hohe Sequenzhomologie der Transmembrandomänen von EpCAM und Notch-1 im Bereich der Aminosäure Valin¹⁷⁴³, welche für die Notch-Spaltung essentiell ist (Schroeter et al., 1998). Auf Grund der Interaktion von EpCAM mit TACE (Tumornekrosefaktor- α -konvertierendes Enzym, ADAM17) und Presenilin 2 (PS2) (Daten Dr. M. Münz) wurde der funktionelle Einfluss der beiden Proteasen auf die EpCAM-vermittelte Signaltransduktion eingehend untersucht.

5.1.1 Die Spaltung durch TACE führt zur Freisetzung des agonistischen EpCAM-Liganden EpEX

Das Tumornekrosefaktor- α konvertierende Enzym (TACE, ADAM17) gehört zur Familie der ADAM-Metalloproteasen (*'A Disintegrin and Metalloprotease'* Familie). Diese Protease

wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Spaltung des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) identifiziert (Moss et al., 1997). TACE ist ein Typ I Transmembranprotein, dessen extrazellulärer Bereich aus einer zinkabhängigen katalytischen Domäne sowie einer disintegrin- und cysteinreichen Sequenz besteht. TACE wird zunächst als inaktives Protein im Zytoplasma exprimiert (Soond et al., 2005) und durch ERK („*extracellular signal-regulated kinase*“) vermittelte Phosphorylierung an Thr⁷³⁵ aktiviert. Nach der Abspaltung der Pro-Domäne kommt es zur Translokation des aktivierten TACE an die Plasmamembran (Black, 2000; Soond et al., 2005). Die Proteolyse von Substraten erfolgt in der extrazellulären Domäne meist *ca.* 12 Aminosäuren oberhalb der Zellmembran (Black, 2002). Die große Variabilität im Bereich der TACE-Schnittstellen verhindert jedoch die Definition einer Konsensussequenz. Zu den bereits identifizierten Substraten von TACE gehören in 5.1 schon erwähnte Membranproteine.

Die Inhibition von TACE durch die Verwendung spezifischer niedermolekularer („*small molecule*“) Inhibitoren und siRNA-Moleküle in verschiedenen Zelllinien zeigte, dass TACE für die Spaltung von EpCAM in der extrazellulären Domäne verantwortlich ist (Abb. 4.7; 4.8). Durch die Inhibition von TACE in FaDu-Zellen kam es zu einer reduzierten Bildung der löslichen Ektodomäne (EpEX) und folglich zu einer vermehrten Präsenz intakter EpCAM-Moleküle an der Oberfläche behandelter Zellen. Die Hemmung von TACE hatte zudem die Reduktion der intrazellulären EpIC-Freisetzung zur Folge. Die Detektion von Spaltintermediaten, welche Zwischenprodukte nach der 1. Spaltung durch TACE darstellen, war im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht möglich. Die Gesamtheit der Daten zeigt, dass die Proteolyse in der extrazellulären Domäne von EpCAM durch TACE, analog zu den meisten bis *dato* bekannten Substraten (Black, 2002), Voraussetzung für die folgende Proteolyse in der Transmembrandomäne ist. Durch die Reduktion der c-Myc Expression und eine geringere Zellproliferation nach TACE-Inhibition konnte der funktionelle Einfluss auf die EpCAM-Signaltransduktion gezeigt werden. Dies wurde zudem durch die Komplementierung der siRNA-vermittelten TACE-Hemmung durch EpIC-YFP untermauert. Die Spaltung der Ektodomäne von EpCAM ist somit eine mechanistische und funktionelle Grundvoraussetzung für die Spaltung von EpIC und die damit einhergehende Induktion von EpCAM-Effekten in Tumorzellen.

Nach der TACE-vermittelten Proteolyse kann die Ektodomäne EpEX als agonistischer Ligand intakter EpCAM-Moleküle fungieren (Abb. 4.23), was durch die Induktion der EpCAM-Spaltung nach Inkubation von Einzellzellen der FaDu-Karzinomzelllinie mit rekombinant exprimiertem EpEX (EpEX_{rec}) gezeigt werden konnte. Diese Art der Aktivierung der

Spaltung erinnert an die Rezeptoren L1 und Nr-CAM (Conacci-Sorrell et al., 2005; Gavert et al., 2005). Durch die Bindung von löslichem EpEX an intakte EpCAM-Moleküle entsteht ein positives *Feedback* und eine potentiell verstärkte Aktivierung der Proteolyse. Die EpCAM-Spaltung in Zell-Zell-Kontaktbereichen zeigt, dass intermolekulare Wechselwirkungen bei der Aktivierung der EpCAM-Signaltransduktion ebenfalls eine Rolle spielen und möglicherweise das initiale Signal darstellen. Die Analyse der Oberflächenexpression in Karzinomzellen zeigte, dass es bei gleicher Kultivierungsdauer von Zellen, welche initial dichter ausplattiert wurden, zu einer stärkeren Spaltung von EpCAM kam (Abb. 4.24). Über die Induktion der Signaltransduktion kann zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussage getroffen werden. Die funktionellen Analysen sind Gegenstand laufender Untersuchungen.

Die Kenntnis, dass TACE in verschiedenen Krebserkrankungen, wie beispielsweise Eierstock- (Tanaka et al., 2005), Dickdarm-, Dünndarm- (Blanchot-Jossic et al., 2005) und Brustkrebs (Santiago-Josefat et al., 2007), stark exprimiert wird, gewinnt im Zusammenhang mit der EpCAM-Spaltung an Bedeutung. In Karzinomen der genannten Entitäten konnte ebenfalls eine starke EpCAM-Expression nachgewiesen werden (Litvinov et al., 1996; Went et al., 2006; Went et al., 2004). Es wäre denkbar, dass es auf Grund der Überexpression beider Proteine zu einer erhöhten Übermittlung von EpCAM Signalen und somit zu einer Verstärkung onkogener Effekte, *i.e.* Proliferation und c-Myc Expression, kommt. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die Überexpression beider Proteine häufig auch mit einer negativen Überlebensprognose korreliert (Kenny und Bissell, 2007; Went et al., 2006; Went et al., 2004). Untersuchungen an Dün- und Dickdarmkarzinomen zeigten, dass es hier zu einem erhöhten Verlust von membranständigen EpCAM kommt (Gosens et al., 2007). Dieser korrelierte zudem mit einer signifikant stärkeren Tumorknospung (Gosens et al., 2007). In diesem Zusammenhang und unter Berücksichtigung der hier präsentierten Ergebnisse, könnte die erhöhte TACE-Aktivität eine mögliche Ursache für die reduzierte EpCAM-Oberflächenexpression und gleichzeitig auch für die Erhöhung der onkogenen Effekte sein.

5.1.2 Die Spaltung durch Presenilin führt zur Bildung der funktionellen, Signal-vermittelnden Domäne EpIC

Untersuchungen an EpCAM-exprimierenden Karzinomzellen zeigten, dass es in diesen zur Freisetzung der intrazellulären signalvermittelnden EpCAM-Domäne EpIC kommt. EpIC lokalisierte im Zytoplasma, vor allem im kernnahen Bereich, und in dem Zellkern. Das kalkulierte Molekulargewicht (M_r) des 26 Aminosäuren umfassenden Peptids beträgt 3,2 kDa.

Es zeigte sich jedoch, dass sowohl endogen gebildetes EpIC als auch ein synthetisches Kontrollpeptid bei der Auftrennung im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 5 kDa aufwies (Abb. 4.4). Der proteinbiochemische Nachweis endogen exprimierten EpICs war nur nach Behandlung der Zellen mit Proteasomen-Inhibitoren möglich. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine rasche und effektive Degradation von freiem EpIC im Zellysate durch das Proteasom. Dieses Phänomen ist bereits für die signaltransduzierenden Domänen von anderen Proteinen, beispielsweise des Notch-Rezeptors (NICD), von APP (APP-CTF γ) und DCC (DCC-ICD), bekannt. Der Nachweis der signaltransduzierenden Domänen ist in diesen Fällen trotz eines deutlich höheren Molekulargewichtes äußerst schwierig (Cupers et al., 2001; Oberg et al., 2001; Pahl und Baeuerle, 1996; Taniguchi et al., 2003). In dem Kernproteinkomplex ist EpIC deutlich stabiler und der Nachweis fällt in diesem Fall entsprechend leichter. Ein Grund könnte die potentielle Maskierung der zwei Lysinreste in EpIC und eine damit einhergehende Verhinderung der Kopplung von Ubiquitin an EpIC sein. Dies kann somit ein Schutz vor der gekoppelten Degradation durch das Proteasom darstellen. Auf Grund der Schwierigkeiten beim Nachweis von endogen exprimiertem EpIC wurde zusätzlich auf ein EpCAM-YFP-Fusionsprotein zurückgegriffen (Abb. 4.4). Durch die C-terminale Fusion von YFP wurde EpIC stabilisiert und ein verbesserter Nachweis ermöglicht. Die vergleichbar starke Induktion der c-Myc-Expression durch EpIC und EpCAM zeigte, dass EpIC für die Übertragung von EpCAM-Effekten notwendig und ausreichend ist (Abb. 4.13). Dieses Ergebnis zusammen mit bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass die Deletion der intrazellulären Domäne in einem Verlust der EpCAM-vermittelten Effekte resultiert (Munz et al., 2004), beweist, dass es sich bei EpIC um die signaltransduzierende Domäne von EpCAM handelt.

Für die Generierung von EpIC war, wie bereits erläutert, die Spaltung durch TACE in der extrazellulären EpCAM-Domäne Voraussetzung. Der TACE-vermittelten Spaltung folgt in der RIP eine zweite, durch den γ -Sekretase-Komplex katalysierte. Die EpCAM-Spaltung durch TACE sowie die hohe Sequenzhomologie der Transmembrandomäne von EpCAM mit der des Notch-1 Rezeptors wiesen auf eine γ -Sekretase-vermittelte Spaltung von EpCAM. Durch Hemmung von Presenilinen mit niedermolekularen Inhibitoren konnte die Beteiligung des γ -Sekretase-Komplexes an der EpCAM-Spaltung nachgewiesen werden (Abb. 4.6).

Der γ -Sekretase-Komplex ist ein Multiproteinkomplex, der die Intramembranproteolyse verschiedener Typ I Membranproteine katalysiert. Die Namensgebung erfolgt auf Grund der Identifikation der γ -Schnittstelle des Komplexes bei der Prozessierung von APP in Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung (Haass et al., 1992; Haass und Selkoe, 1993).

Der Komplex setzt sich aus vier integralen Membranproteinen zusammen: Aph-1 und Pen (Francis et al., 2002) besitzen sieben bzw. zwei Membrandomänen und sind für die Stabilisierung des Komplexes verantwortlich. Das stark glykosylierte Typ I Transmembranprotein Nicastrin ist für die Funktionalität des Komplexes essentiell (Esler et al., 2002). Presenilin 1 (PS1) oder alternativ Presenilin 2 (PS2), die durch Autoproteolyse innerhalb des Komplexes in das N-terminale (NTF)- und das C-terminale Fragment (CTF) gespalten werden (Ratovitski et al., 1997; Thinakaran et al., 1997), bilden das katalytisch aktive Zentrum des Komplexes (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Es sind sechs unterschiedliche γ -Sekretase-Komplexe bekannt, die sich lediglich durch die Integration von PS1 oder PS2, sowie einer der drei Aph-1 Proteine unterscheiden. Eine Identifikation des spezifischen Komplexes für das entsprechende Substrat ist daher sehr erschwert (Lai et al., 2003; Saura et al., 1999).

Die Hemmung von Presenilinen durch niedermolekulare Inhibitoren verursachte eine Reduktion der EpIC-Abspaltung und gleichzeitig die Akkumulation von Spaltintermediaten. Das mengenmäßig überwiegende Spaltintermediat entsprach in der Größe (M_r ca. 10 kDa) dem Protein, welches theoretisch durch die TACE-Spaltung generiert wurde (Abb. 4.6). Über die Natur der anderen Spaltintermediate kann derzeit nur spekuliert werden. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass EpCAM in der Transmembrandomäne zweimal gespalten wird. Eine zweifache Spaltung durch Presenilin1 wurde bei Analysen der Notch- (Chandu et al., 2006) und APP-Spaltung beschrieben (Okochi et al., 2002; Zhang et al., 2002). Bei Notch kommt es in der Transmembrandomäne neben der Proteolyse bei V¹⁷⁴³ (S3) (Schroeter et al., 1998) oberhalb dieser zu einer zweiten Spaltung (S4) (Okochi et al., 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass eine zweifache Spaltung durch Presenilin auch bei anderen Substraten der γ -Sekretasen, wie EpCAM, auftritt.

Die Inhibition von γ -Sekretasen sorgte zudem für eine Reduktion der c-Myc-, eFABP-Expression und der Zellproliferation (Abb. 4.6; 4.8). Die Komplementierung der Presenilininhibition durch gleichzeitige, exogene Expression der funktionell aktiven EpIC-Domäne revertierte die beobachtete Hemmung der Zellproliferation vollständig (Abb. 4.8). Somit konnte die EpCAM-Spezifität bei der Hemmung der Zellproliferation durch Presenilininhibitoren aufgewiesen werden. Der Nachweis einer Interaktion von EpCAM mit PS2, nicht aber mit PS1 (persönliche Mitteilung Dr. M. Münz) liefern einen ersten Hinweis auf die Beteiligung PS2-spezifischer γ -Sekretasekomplexe. Es bedarf hier jedoch noch weiterer funktioneller Analysen, die diese ersten Hinweise untermauern.

Die reduzierte EpIC-Bildung nach einer Hemmung von TACE und γ -Sekretasen war funktionell und kann als neuer Ansatz zur Therapie EpCAM-positiver Tumore in Betracht gezogen werden. So ist eine Kombination aus EpCAM-spezifischen Antikörpern und Inhibitoren für TACE und γ -Sekretasen eine vorstellbare Therapie für EpCAM-positive Karzinome, welche die deutliche Mehrheit darstellen. Dieses Konzept der multimodalen Therapie von Tumoren ist ein akzeptierter Ansatz. Er wurde für die Inhibition von EpCAM in dem Patentantrag N° 06011852.8 (*date of filing* 08/06/2006-EPA) an das europäische Patentamt hinterlegt.

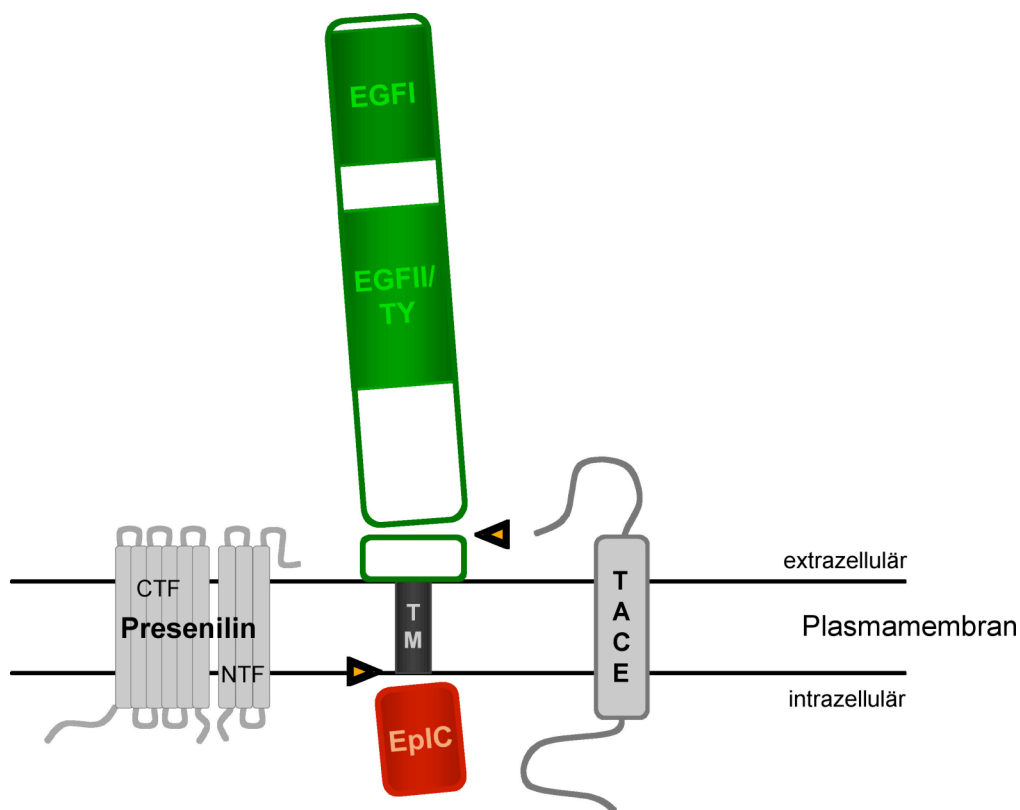


Abbildung 5.1: EpCAM-Spaltung durch regulierte Intramembranproteolyse.

5.2 Parallelen in der Prozessierung, Struktur und Funktion der EpCAM und Notch-Moleküle

Ein Vergleich der Struktur des Notch- und des EpCAM-Proteins zeigt, dass vielfach strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten vorliegen. Neben der bereits erwähnten Sequenzhomologie in der Transmembrandomäne bestehen auch Ähnlichkeiten im Aufbau der extrazellulären Domäne. Die extrazellulären Domänen beinhalten bei beiden Molekülen EGF-ähnliche Wiederholungen und besitzen N- und im Falle von Notch O-Glykosylierungsstellen

(Sakamoto et al., 2002; Wharton et al., 1985). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EpCAM, genau wie Notch, durch RIP prozessiert wird. Dies hat in beiden Fällen die Freisetzung der Signal-transduzierenden Domänen EpIC bzw. Notch-ICD (NICD) zur Folge (Schroeter et al., 1998). Durch eine Translokation in den Zellkern sind beide ICDs in der Lage, die Transkription von Zielgenen zu induzieren (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994; Struhl und Adachi, 1998). Für NICD wurde gezeigt, dass es erst im Zellkern mit seinen Interaktionspartnern in Wechselwirkung tritt. Im Falle von EpIC scheint die Bindung der Interaktionspartner bereits an der Membran und im Zytoplasma stattzufinden (s. Kapitel 5.4, 5.5). Des Weiteren ist ein ähnliches Expressionsprofil und eine ähnliche morphoregulatorische Funktion von EpCAM und Notch in hämatopoetischen Stammzellen und verschiedenen krebsinitiierenden Stammzellen beschrieben. Beide Moleküle werden zudem in differenzierenden Hepatozyten exprimiert (de Boer et al., 1999a; Duncan et al., 2005; Schmelzer et al., 2006). Hepatozyten exprimieren EpCAM während der Proliferation und Ausdifferenzierung der Zelle. Ist diese abgeschlossen, wird die EpCAM-Expression eingestellt. Bei einer Schädigung der Leber kommt es zur Regenerierung durch Hepatozytenvorläufer, welche erneut EpCAM exprimieren. Diese Art der EpCAM-Regulation wurde auch bei Retikulozyten und den Inselzellen der Pankreas beschrieben (Cirulli et al., 1995; Lammers et al., 2002). Folglich ist eine Deregulation der EpCAM-Expression oder eine erhöhte Aktivierung des Signalweges durch eine verstärkte Proteolyse als Ursache einer malignen Transformation in diesen Zellen durchaus vorstellbar. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass eine Deregulation von Notch bei der Entwicklung der akuten T-Zell-Lymphoblasten Leukämie eine wichtige Rolle spielt (Weng et al., 2004). In diesem Fall kommt es auf Grund von Mutationen zu einer verstärkten Bildung der NICD und somit zur dauerhaften Aktivierung des Signalweges (Aster, 2005).

5.3 Unterschiede in der Lokalisation von EpIC im gesunden und Karzinomgewebe

In den bisherigen Kapiteln wurde der Mechanismus, der zur EpCAM-Spaltung in Karzinomzellen führt, ausführlich beschrieben und an Hand der Ergebnisse deskriptiver und funktioneller Analysen belegt. Durch die proteolytische Spaltung von EpCAM kommt es zu einer Freisetzung der Signal-vermittelnden EpIC Domäne. Eine wichtige Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellte, war die biologische Relevanz der Spaltung *in vivo*. Der immunhistochemische Nachweis von EpIC in gesundem und im Kolonkarzinomgewebe

zeigte deutliche Unterschiede in der Lokalisation von EpIC, welche auf eine veränderte Prozessierung EpCAMs schließen lassen (Abb. 4.12). Ausschließlich in Karzinomgeweben konnten EpIC-Moleküle im Zellkern nachgewiesen werden. Über mögliche Gründe für diese Unterschiede kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Sie können zum einen direkt in Zusammenhang mit der Proteolyse von EpCAM stehen und/oder zum anderen durch Einschränkungen bei der Kerntranslokation von EpIC in gesunden Zellen verursacht werden. So wäre eine Hemmung der Interaktion mit Proteinen der Kerntranslokationsmaschinerie, *i.e.* Importine, in gesunden Zellen vorstellbar. Eine weitere denkbare Möglichkeit ist die Retention von gespaltenem EpIC im Zytoplasma durch einen zellulären Inhibitor, wie für den Transkriptionsfaktor NF- κ B beschrieben (Baeuerle und Baltimore, 1988).

EpCAM ist in Tumorzelllinien mit CD9, CD44, Claudin-7, Tetraspanin so wie ADAM-10 assoziiert (Claas et al., 2005; Ladwein et al., 2005; Le Naour et al., 2006). Über die Interaktionspartner von EpCAM in gesundem Gewebe ist bisher nichts bekannt. Eine Verschiebung des Verhältnisses der Bindungspartner durch eine EpCAM-Überexpression könnte die Interaktion mit anderen Proteinen modifizieren oder eine erleichterte proteolytische Aktivierung von EpCAM ermöglichen. Eine gleichzeitige Überexpression der beteiligten Proteasen, *i.e.* TACE (Santiago-Josefat et al., 2007), wäre als Grund für eine verstärkte Prozessierung ebenfalls denkbar. In diesem Zusammenhang ist bereits erwähnt worden, dass Tumore unterschiedlicher Entitäten neben einer Überexpression von EpCAM auch eine verstärkte TACE-Expression aufweisen (siehe Kapitel 5.1.1).

Der unterschiedliche Grad der Glykosylierung der extrazellulären EpCAM-Domäne in Karzinom- und gesundem Gewebe (Pauli et al., 2003) könnte ebenfalls ein Grund für eine veränderte Prozessierung sein. Veränderungen des Glykosylierungsmusters haben Einfluss auf die Prozessierung und damit die Aktivierung von Membranrezeptoren wie Notch und andere (Haines und Irvine, 2003). Kürzlich konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Glykosylierung von EpCAM an Asp¹⁹⁸ entscheidend ist für die Stabilität des Proteins. EpCAM-Mutanten, welche an dieser Aminosäure nicht mehr glykosyliert werden können, haben eine dreifach verminderte Retentionszeit an der Plasmamembran (Munz et al, 2008 in press). Diese verkürzte Verweilzeit an der Plasmamembran muss als ein zusätzlicher Aspekt bei der fehlenden Prozessierung von EpCAM in gesundem Gewebe in Betracht gezogen werden.

5.4 Validierung von potentiellen EpCAM-Interaktionspartnern

Die Identifikation von FHL2 als Interaktionspartner von EpCAM ermöglichte erstmals einen Einblick in die molekularen Mechanismen der intrazelluläre Signaltransduktion des Proteins (schematische Darstellung Abb. 5.2). Gleichzeitig war diese auch Grundlage der Identifikation weiterer Bindungspartner. Basierend auf den vielseitigen Funktions- und Interaktionsmöglichkeiten von FHL2 nimmt das Protein eine zentrale Rolle bei der EpCAM-Signaltransduktion ein.

5.4.1 FHL2 ist ein direkter Bindungspartner und spielt eine Schlüsselrolle bei der EpCAM-Signaltransduktion

In Karzinomen kommt es häufig zu einer Überexpression von FHL2 ('four-and a-half-LIM only protein') (Morgan und Whawell, 2000; Yan et al., 2003). Beispiele hierfür sind Melanome, Brust-, Eierstock-, Lungen-, Kolon- und Darmkrebs (Chen et al., 2003; Gabriel et al., 2004; Wang et al., 2007). Es wird vermutet, dass FHL2 in der Tumorentwicklung sowohl suppressive als auch progressive Effekte vermittelt (Johannessen et al., 2006). Eine Überexpression, gekoppelt mit einer verstärkten Kernlokalisation in Lungen- und Brustkarzinomen, korreliert mit einer negativen Überlebensprognose (Borcuk und Powell, 2007; Gabriel et al., 2006; Martin et al., 2007). FHL2 kann über die LIM-Domänen mit einer Vielzahl funktionell verschiedener Bindungspartner interagieren. Das Protein fungiert in vielen Fällen als Adapter- oder Strukturprotein und bildet auf Grund dessen eine Plattform zum Aufbau von Multiproteinkomplexen (Johannessen et al., 2006). Der Nachweis einer direkten Wechselwirkung von EpCAM mit FHL2, bei der die vierte LIM-Domäne essentiell ist (Promotionsarbeit Dr. M. Benk) und die Beobachtung, dass EpIC im Kern von Karzinomzellen mit FHL2 ko-lokalisiert, waren erste Hinweise für die zentrale Rolle der Interaktion bei der EpIC-Signaltransduktion (Abb. 4.15; 4.18). Die bereits bekannte Interaktion von FHL2 mit TACE und Presenilinen (Canault et al., 2006) ist ein zusätzliches und starkes Argument für eine zentrale Rolle von FHL2 beim Aufbau des EpCAM-Signalosoms (Abb. 5.2). Es ist zudem beschrieben, dass eine Inhibition von FHL2 eine Reduktion der TACE-Aktivität zur Folge hat (Canault et al., 2006). Die Interaktion von FHL2 mit Presenilinen wiederum erfolgt über das N-terminale Fragment (NTF) der Protease (Kang et al., 2005). Welche LIM-Domänen an der Interaktion mit den beiden Proteasen beteiligt sind, ist nicht bekannt. Es wäre vorstellbar, dass FHL2 durch die Bindung an EpIC die

Proteasen des RIP-Komplexes an den EpCAM rekrutiert und auf diese Weise die Spaltung initiiert und koordiniert (Abb. 5.2).

Die funktionelle Relevanz der EpCAM-FHL2-Interaktion wurde an Hand der Repression von FHL2 mit spezifischen siRNAs, die nur im Falle der Expression von EpCAM einen Einfluss auf die Proliferation und c-Myc-Bildung der Zellen hatte, nachgewiesen. Die Hemmung der FHL2- und der EpCAM-Expression hatte zudem qualitativ und quantitativ ähnliche Auswirkungen auf die Proliferation und den zellulären Metabolismus.

Auffällig war, dass es in Karzinomzellen zu einer starken EpIC-Akkumulation im kernnahen Zytoplasma kam und nur ein geringer Anteil des Proteins in den Zellkern gelangte. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass für die Kerntranslokation von EpIC andere zelluläre Faktoren limitierend sind. Eine vergleichbare Beobachtung wurde bei der Detektion der NICD gemacht (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994). In diesem Fall ist die Verfügbarkeit von CBF1 der begrenzende Faktor für die nukleäre Translokation. Ein vergleichbarer Wirkmechanismus ist für EpIC ebenfalls vorstellbar und bedarf zusätzlicher experimenteller Ansätze.

Im Zusammenhang mit der nukleären Translokation rückte eine Gruppe von Proteinen ins Zentrum des Interesses. Neben der Interaktion mit Rezeptoren, Enzymen und Strukturproteinen gehört ein großer Teil der FHL2-Interaktionspartner zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren und deren Ko-Faktoren (Johannessen et al., 2006). Beispiele für solche Proteine sind der Androgen-Rezeptor (AR) (Muller et al., 2000), β -Catenin (Martin et al., 2002), CBP und p300 (Labalette et al., 2004). Durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Bindungspartnern dieser Gruppe kommt es, wie eben für EpIC/FHL2 beschrieben, zur Translokation der FHL2-spezifischen Komplexe vom Zytoplasma in den Nukleus und somit zur Aktivierung spezifischer Zielgene (Johannessen et al., 2006; Labalette et al., 2004; Wei et al., 2003). Neben der bereits erwähnten nukleären Translokation von FHL2 in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression wurde diese auch für β -Catenin gezeigt (Abb. 4.17).

Es wurde bereits beschrieben, dass FHL2 einen Komplex mit β -Catenin und der Acetyltransferase CBP/p300 bildet (Labalette et al., 2004). In diesem Komplex kommt es über die erste bis vierte LIM-Domäne zu einer Interaktion mit β -Catenin. Die Bindung von CBP/p300 wird über die zweite und dritte LIM-Domäne vermittelt. FHL2 stabilisiert den Proteinkomplex als „*scaffold protein*“. Ein weiterer Aspekt ist, dass FHL2 und CBP/p300 bei der β -Catenin/TCF-abhängigen Transkription verschiedener Zielgene des Wnt-Signalweges als Ko-Aktivatoren agieren (Wei et al., 2003). Die erhöhte Acetylierung von β -Catenin in

Anwesenheit von FHL2 ermöglicht eine stärkere Bindung des Komplexes an die DNA (Levy et al., 2004). Biochemische und bildgebende Verfahren stellten eine Wechselwirkung von EpCAM und EpIC mit β -Catenin unter Beweis. Denkbar ist eine indirekte Interaktion durch die Bindung von EpIC und β -Catenin an FHL2. Durch diese Wechselwirkungen entsteht ein trimerer Komplex, der in der Lage ist, in den Zellkern zu translozieren (Abb. 5.2).

Eine zentrale Frage zur Wirkungsweise des EpCAM Signalosoms ist die nach dem Mechanismus der Induktion von EpCAM-Zielgenen. Diesbezüglich waren folgende Sachverhalte von Interesse: (i) FHL2 wechselwirkt mit β -Catenin/TCF und (ii) die Induktion der Transkription von *c-myc* erfolgt über den Transkriptionsfaktor TCF/Lef (T-Zell Faktor/Lymphoid-enhancer Faktor) (Barker et al., 2000; He et al., 1998; Omer et al., 1999). Diese Befunde führten zur Hypothese einer Translokation und Bindung des zytoplasmatischen EpIC-Komplexes an Lef-1 und somit auch an DNA.

5.5 Die nukleäre Translokation von EpIC führt zur Bindung an TCF/Lef-spezifische DNA-Sequenzen

Biochemische Analysen nativer Kernextrakte zeigten, dass EpIC im Zellkern in einem Komplex mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 vorliegt (Abb. 4.20). Im Gegensatz zum Nachweis von EpIC in Gesamtzelllysaten war das Molekül in nativen Kernextrakten, auch in Abwesenheit von Proteasomeninhibitor, im Immunblot detektierbar. Es wurde daher angenommen, dass EpIC durch die Interaktion mit seinen Bindungspartnern stabilisiert wird. Die Identifikation eines EpIC-spezifischen Komplexes in FaDu-Zellen, der in der Lage war, an Lef-1-Konsensussequenzen in EMSA Experimenten zu binden, lieferte erstmals den Beweis für die Bindung eines EpIC-spezifischen Kernkomplexes an DNA (Abb. 4.21). Die Bildung des DNA-Protein-Komplexes konnte durch Inhibition der EpCAM-Spaltung vollständig verhindert werden. Ein quantitativer Vergleich der Bildung eines EpIC-DNA-Komplexes an spezifische Lef-1-Konsensussequenzen zwischen EpCAM- und EpIC-exprimierenden Zellen zeigte zudem eine deutlich verbesserte Effektivität der Bindung bei Expression des Gesamtmoleküls. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte die Notwendigkeit einer koordinierten, gerichteten Bildung des EpCAM-Signalosoms an der Zellmembran sein. Die Bindung von Interaktionspartnern in Lösung und unter Diffusionsbedingungen erscheint entsprechend deutlich ineffizienter. Die Quantität EpIC-spezifischer DNA-bindender Proteinkomplexe korrelierte in unterschiedlichen Karzinomzelllinien mit der Menge des exprimierten EpCAMs. Bei geringer EpCAM-

Expression kam es zu einer geringen Bildung des EpIC-spezifischen DNA-Protein-Komplexes, bei starker EpCAM-Expression zu einer erhöhten Bildung des DNA-Protein-Komplexes (Abb. 4.21c). Dies lieferte zusätzlich einen indirekten Beweis für die Abhängigkeit der EpIC-Komplexbildung und somit der Zielgenaktivierung von der EpCAM-Expressionsstärke. Eine entsprechende Korrelation zwischen der Expressionshöhe von EpCAM und der Transkription des *c-myc* Gens ist bereits publiziert (Munz et al., 2004). Das vollständige Fehlen des EpIC-spezifischen Protein-DNA-Komplexes nach Behandlung der Tumorzellen mit TACE- und PS-Inhibitoren weist auf einen zusätzlichen Aspekt hin: EpIC erscheint für die Bildung dieses Komplexes essentiell, da nicht eine Reduktion, sondern eine gänzliche Unterdrückung der Komplexbildung die Folge ist.

Der direkte Beweis der Spezifität der jeweiligen Komplexe erfolgte durch die Reduktion des Komplexes in Folge der Inkubation mit spezifischem Antikörper (Abb. 4.21b). Ein 'Super-Shift' EpIC-spezifischer Komplexe an der DNA war nicht funktionell. Bei der Verwendung des EpIC-spezifischen Antikörpers ist vorstellbar, dass die Komplexbildung durch Bindung des Antikörpers an das *per se* sehr kleine Protein verhindert wird. Diese Annahme ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass ausschließlich die Behandlung von Kernextrakten mit EpIC-Antikörper vor der Inkubation mit DNA, jedoch nicht im Anschluss effektiv war. Im Falle von Lef-1 kam es ebenfalls zu einer Reduktion der Bildung des niedermolekularen, aber auch des höhermolekularen DNA-Protein-Komplexes. Ein 'Super-Shift' konnte in beiden Fällen nicht detektiert werden. Ein denkbarer Grund hierfür wäre die Auflösung des Komplexes durch die Bindung des Antikörpers an Lef-1 und darauf basierende Konformationsänderungen. Da ein 'Super-Shift' bisher nur bei einer Überexpression rekombinanter Proteine der Lef-Familie gezeigt wurde, ist die geringe Proteinkonzentration möglicherweise eine weitere Ursache für den fehlenden Nachweis eines DNA-Protein-Komplexes mit verändertem Migrationsverhalten (Mei et al., 2000).

Die substantielle Reduktion (70%) der Aktivierung des TCF/Lef-spezifischen Luciferasereporters durch die Inhibition der EpCAM-Expression mittels siRNA in Kolonkarzinomzellen (HCT-8) untermauerte die Annahme, dass der EpIC-spezifische Komplex an Lef-Konsensussequenzen bindet und an der Aktivierung TCF/Lef-spezifischer Zielgene beteiligt ist (Abb. 4.22). Die Induktion von EpCAM-Zielgenen, wie *c-myc*, cyclin *A* und *E*, durch den EpIC-spezifischen Komplex ist sehr wahrscheinlich, bedarf aber noch weiterführender Experimente zum definitiven Beweis. Durch *ChIP-on-Chip*-Experimente (Chromatin-IP in Kombination mit einem DNA-Array) soll geklärt werden, ob der EpIC-Komplex in der Lage ist, durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen die

Transkription der Zielgene zu aktivieren. Mit Hilfe dieser Technik ist sowohl die Bestätigung der Bindung an Konsensussequenzen bekannter Zielgene, als auch die Identifikation neuer DNA-Bindungsstellen (*ergo* Zielgene) möglich.

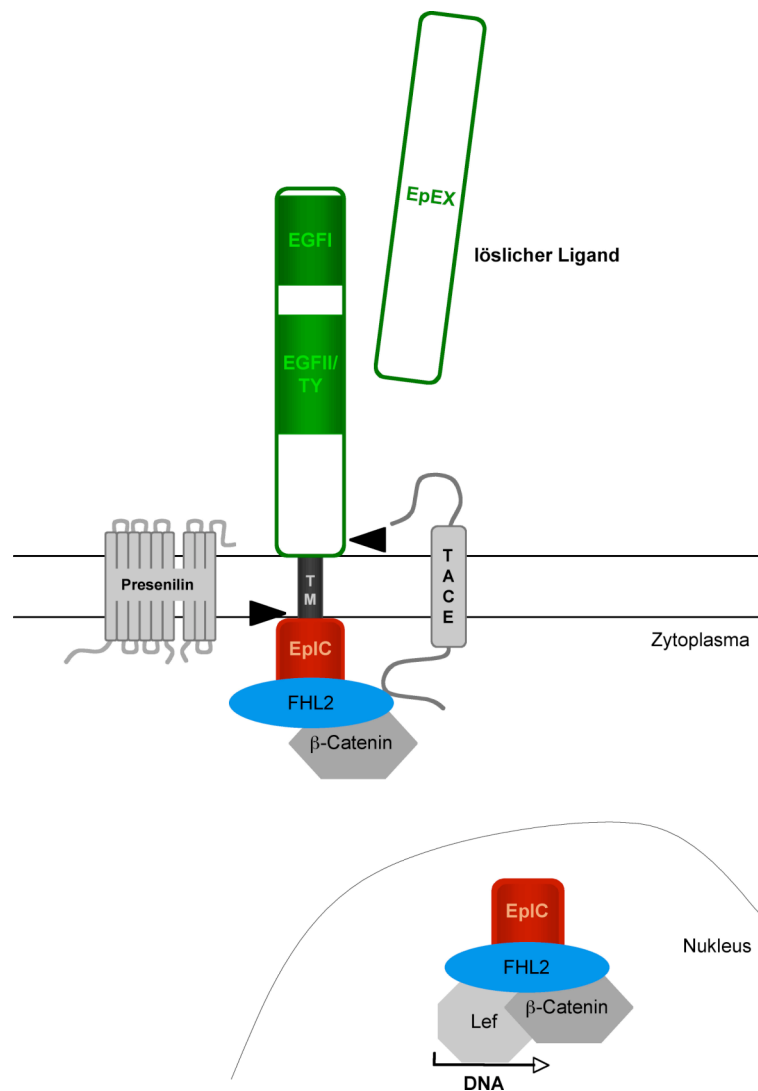


Abbildung 5.2: Das EpCAM-Signalsom

Mit β -Catenin und Lef verwendet EpCAM bei der Signaltransduktion zentrale Komponenten des Wnt-Signalweges, in dem FHL2 ebenfalls eine Rolle spielt (Clevers und van de Wetering, 1997; Hsu et al., 1998). Der Wnt-Signalweg ist, neben anderen, für die Regulation der transkriptionellen TCF/Lef-Aktivität verantwortlich (Barolo, 2006; Eastman und Grosschedl, 1999). Hinzu kommt, dass eine Deregulation des Wnt-Signalweges als eine der ersten und wichtigsten karzinogenen Veränderungen bei der Tumorentwicklung im Kolon beschrieben ist (Giles et al., 2003). Eine zentrale Rolle innerhalb dieses Signalweges spielt β -Catenin, welches die Zelladhäsion und die Regulation der TCF/Lef-vermittelten Transkription

koreguliert (Akiyama und Kawasaki, 2006; Brembeck et al., 2006). Im Falle einer simultanen Verwendung von Komponenten desselben Signalweges durch EpCAM und Wnt würde u.U. eine Konkurrenzsituation bei der Bindung von β -Catenin entstehen. Eine andere Möglichkeit wäre die Verstärkung von karzinogenen Effekten durch einen additiven oder gar synergistischen Effekt beider Signalwege. Dafür würde sprechen, dass die Expression von EpCAM die Reduktion membranständigen E-Cadherins und gleichzeitig die Erhöhung der zytoplasmatischen β -Catenin-Menge zur Folge hat (Litvinov et al., 1997). Es wäre vorstellbar, dass auf diese Weise für die Aktivität beider Signalwege ausreichend aktives β -Catenin durch EpCAM ins Zytoplasma freigesetzt wird. Das Vorhandensein von Tcf-4-Bindungssequenzen im EpCAM-Promotorbereich und die Reduktion der EpCAM-Genexpression durch Inhibition des Tcf/ β -Catenin-Komplexes liefert einen weiteren Hinweis auf eine Verknüpfung der beiden Signalwege (Yamashita et al., 2007).

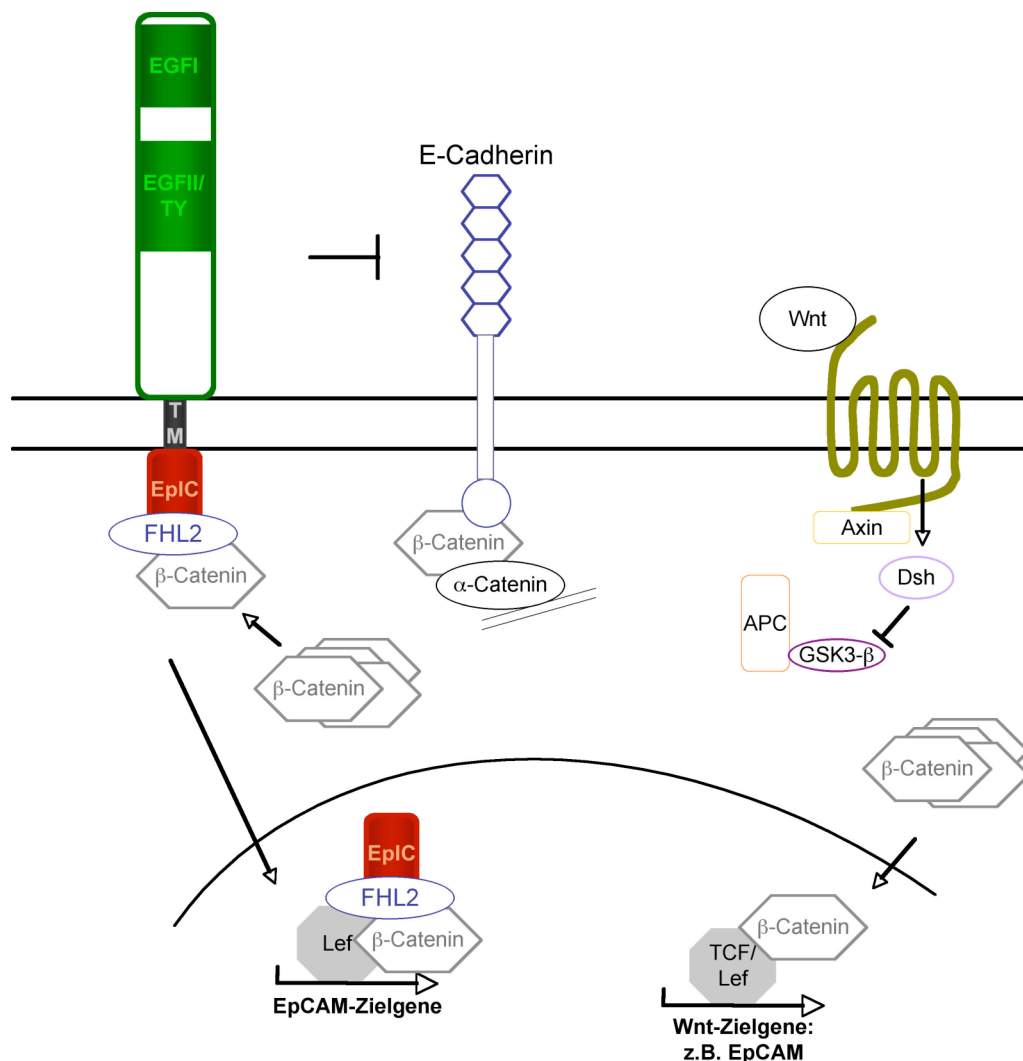


Abbildung 5.3: Modell von EpCAM als Teil des Wnt-Signalweges.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit dem Einfluss von EpCAM auf die Karzinogenese beachtet werden sollte, ist die aufkommende Rolle sogenannter Tumorstammzellen. Es ist bekannt, dass die Aktivität des Wnt-Signalweges für die Pluripotenz und Selbsterneuerungskapazität hämatopoetischer Stammzellen verantwortlich ist (Anderson et al., 1999; Fevr et al., 2007; Giles et al., 2003; Hoppler und Kavanagh, 2007; Radtke und Clevers, 2005; Reya und Clevers, 2005). Neueste Untersuchungen des Signalweges suggerieren, dass dieser bei der Etablierung von Tumorstammzellen eine zentrale Rolle spielt. Es wird angenommen, dass es durch eine unkontrollierte Aktivität des Wnt-Signalweges zur konstitutiven Erneuerung und anormalen Expansion der Tumorstammzellen kommt (Reya und Clevers, 2005). Eine weitere Möglichkeit, die als Folge einer unkontrollierten Wnt-Aktivität in Betracht gezogen wird, ist die Übertragung von Stammzeleigenschaften auf Progenitorzellen (Reya und Clevers, 2005). In Bezug auf die EpCAM-Expression ist bekannt, dass das Molekül sowohl in der Keimbahn (Anderson et al., 1999) als auch auf humanen Stammzellen (Stingl et al., 2005) stark exprimiert wird. Aus Untersuchungen an Tumorstammzellen geht hervor, dass eine starke EpCAM-Expression eine Signatur von tumorinitiierenden Zellen ist (Al-Hajj und Clarke, 2004; Dalerba et al., 2007b; Li et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). In experimentellen Ansätzen werden die Tumorstammzellen häufig anhand einer Überexpression von EpCAM in Kombination mit weiteren Markern (CD44, CD133) isoliert. Zu den Tumorentitäten, bei denen EpCAM-exprimierende Stammzellen detektiert wurden, gehören Brust (Al-Hajj et al., 2003), Prostata (Collins et al., 2005), Kolon (Li et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007), Pankreas (Li et al., 2007) und Dickdarm/Dünndarm (Dalerba et al., 2007b). Die beschriebene Rolle EpCAMs in Zellkultur und die häufige Überexpression auf Tumorstammzellen lässt eine Funktion des Moleküls bei tumorinitiierenden Zellen *in vivo* vermuten. Folglich gewinnt die Optimierung der Effizienz einer EpCAM-spezifischen Immuntherapie, z.B. durch eine Kombination mit Proteaseinhibitoren, zusätzlich an Bedeutung.

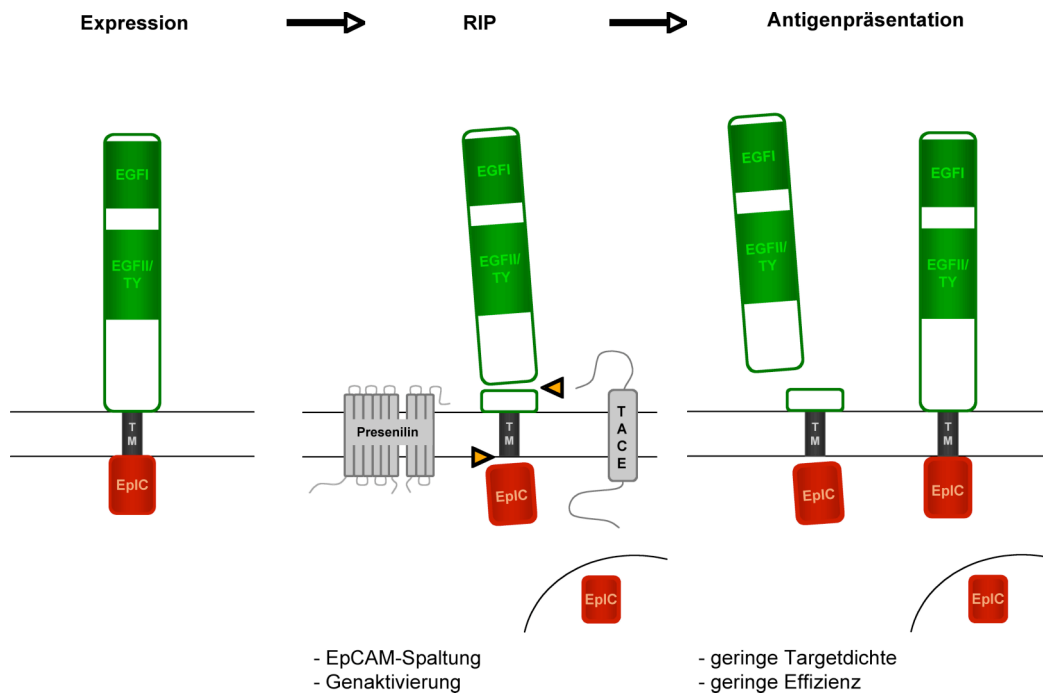
5.6 Therapeutische Nutzung von Proteaseinhibitoren zur Hemmung der EpCAM-Signaltransduktion

Die meisten Verfahren, die derzeit Gegenstand klinischer Studien sind, beruhen auf der Anwendung EpCAM-spezifischer monoklonaler, bi- und trispezifischer Antikörper (Morecki et al., 2006; Riethmüller et al., 1994; Ruf und Lindhofer, 2001; Schlereth et al., 2006). Diese sind in der Lage, eine EpCAM-spezifische Antikörper-abhängige Zytotoxizität zu vermitteln

(ADCC) (Abb. 5.4a). Durch RIP kann es, auf Kosten der therapeutischen Wirksamkeit der Antikörper, zu einer Reduktion der Oberflächenexpression intakter EpCAM-Moleküle kommen. Das Phänomen einer verstärkten EpCAM-Spaltung in Karzinomen wurde bereits in einem anderen Zusammenhang für Dünn- und Dickdarmkrebs beschrieben (Gosens et al., 2007). Zwei Erkenntnisse, die im Rahmen der vorgelegten Arbeit gewonnen wurden, sind Grundlage für die Entwicklung eines innovativen Therapieansatzes: zum einen die Kenntnis, dass RIP im Normalgewebe des Kolon im Gegensatz zum Karzinomgewebe stark reduziert oder inaktiviert ist; zum anderen die Identifikation der an der Spaltung beteiligten Proteasen und die Verfügbarkeit von niedermolekularen („*small molecule*“) Inhibitoren gegen diese. Durch die Kombination von TACE- und γ -Sekretase-Inhibitoren mit therapeutischen EpCAM Antikörpern kann ein dualer Effekt erzielt werden: (i) die Hemmung der EpCAM-Spaltung und somit eine Erhöhung der Zielmoleküldichte an der Zelloberfläche und dadurch (ii) eine Hemmung der EpCAM-vermittelten Proliferation von Tumorzellen (Abb. 5.4b). Die Effekte konnten bereits durch die Behandlung von FaDu-Karzinomzellen *in vitro* unter Beweis gestellt werden. Die spezifische Hemmung von TACE hatte eine Steigerung der EpCAM Oberflächenexpression zur Folge. Durch die höhere Dichte von EpCAM-Molekülen an der Zelloberfläche wäre eine effektivere Induktion der EpCAM-spezifischen ADCC denkbar. Eine solche Kombinationstherapie wurde zum Patent beim europäischen Patentamt angemeldet (N°/patent N° 06011852.8, date of filing 08/06/2006-EPA).

Es ist bekannt, dass die Hemmung von TACE in Brustkrebszelllinien eine Umkehr des malignen Phänotyps zur Folge hat (Kenny et al., 2007; McGowan et al., 2007). Bisher wurde angenommen, dass diese in erster Linie auf Grund der Inhibition des EGF-Rezeptor-Signalweges verursacht wird (Kenny und Bissell, 2007). Ein Einfluss der Inhibition der EpCAM-Spaltung bei der Umkehr des aggressiven Phänotyps ist an Hand der vorgestellten Daten ebenfalls vorstellbar. Die Anwendung der Kombinationstherapie aus EpCAM-spezifischen Antikörpern und den Inhibitoren der beiden Proteasen wäre somit bei Brustkrebs eine denkbare therapeutische Maßnahme.

a



b

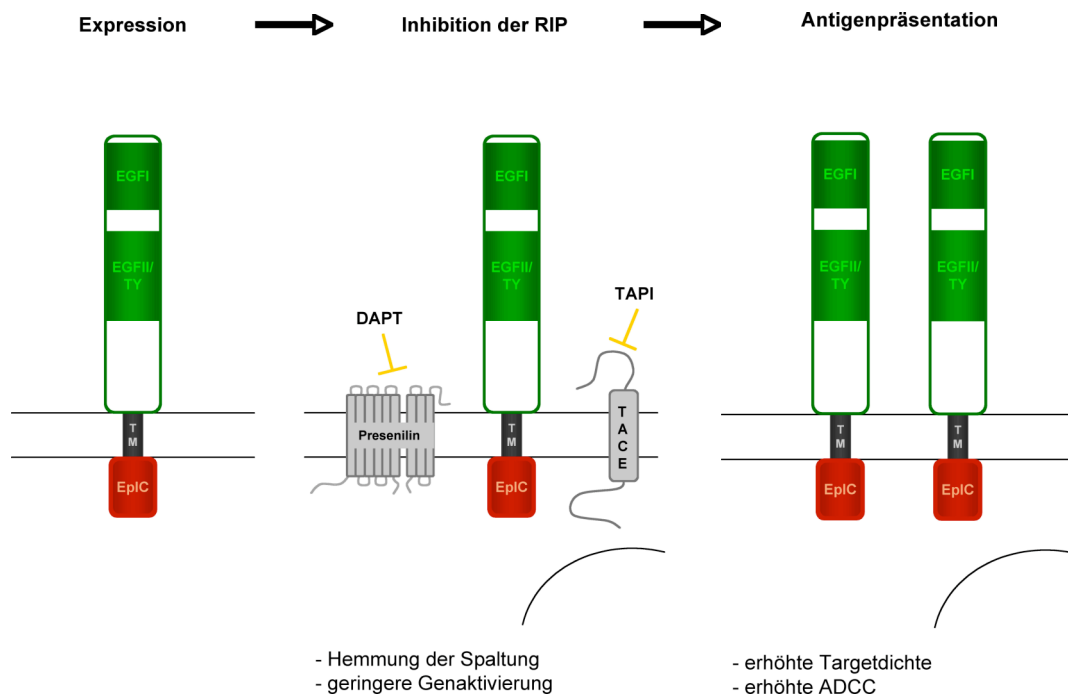


Abbildung 5.3: Modell der therapeutischen Nutzung von (a) EpCAM-spezifischen Antikörpern und (b) in Kombination mit spezifischen niedermolekularen Proteaseinhibitoren.

5.7 Ausblick

RIP

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) erstmals als Mechanismus der EpCAM-Spaltung identifiziert werden. Es ist bekannt, dass die Spaltung von Typ I-Transmembranproteinen häufig nicht nur von einer Protease der ADAM-Familie vermittelt wird (Gutwein et al., 2003; Mochizuki und Okada, 2007; Stoeck et al., 2006). So muss im Zusammenhang mit der regulierten Proteolyse der extrazellulären Domäne von EpCAM geklärt werden, ob neben TACE noch weitere Proteasen an diesem Prozess beteiligt sind. Eine Protease, die häufig zusammen mit TACE an der Proteolyse von Typ I-Membranproteinen beteiligt ist, ist ADAM10 (Hartmann et al., 2002), welche im Komplex mit EpCAM und Mitgliedern des „*tetraspanin web*“ vorliegt (Le Naour et al., 2006). Die Aktivität weiterer Proteasen bei der extrazellulären EpCAM-Spaltung soll zunächst mittels Ko-IPs und anschließend durch die Verwendung spezifischer siRNAs untersucht werden. Die TACE-vermittelte Spaltung erfolgt üblicherweise 12 AS oberhalb der Transmembrandomäne. Eine Konsensussequenz für die Proteolyse durch TACE ist dennoch nicht bekannt (Black, 2002). Die Aufreinigung des löslichen EpEX aus Kulturüberständen EpCAM-exprimierender Karzinomzellen, der tryptische Verdau und eine anschließende Edman-Sequenzierung könnten einen Hinweis auf die Lokalisation der TACE Proteaseschnittstelle bei EpCAM liefern.

Im Zusammenhang mit der PS2-vermittelten EpCAM-Proteolyse, die zur Freisetzung von EpIC führt, wird die funktionelle Inhibition von PS2 in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen detailliert überprüft: (i) Analyse der EpCAM Spaltung in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) von knock-out Zelllinien (Ps1^{-/-}, PS2^{-/-} und PS1^{-/-}/PS2^{-/-} doppel knock-out) und (ii) die funktionelle Analyse der siRNA-vermittelten Hemmung von PS2 in Karzinomzellen in Bezug auf die EpCAM-Spaltung. Zur Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstelle sind zudem Mutanten innerhalb der Transmembrandomäne von EpCAM generiert worden. Die Expression der Mutanten in geeigneten Zellsystemen soll eine detaillierte Analyse der EpCAM-Spaltung ermöglichen und so Aufschluss über die genaue Schnittstelle liefern.

Die Bestimmung der Relevanz der Proteaseinhibition in Bezug auf die Kapazität der Tumorformation und der Induktion einer ADCC ist ebenfalls Gegenstand laufender experimenteller Untersuchungen. Durch den Vergleich des Potentials der Tumorformation von Inhibitor-behandelten und -unbehandelten Karzinomzellen wird derzeit der Effekt auf die Tumorbildung *in vivo* in Xenotransplantationsmodellen in immundefizienten Mausstämmen

untersucht. Gleichzeitig soll die Effizienz der Induktion einer EpCAM-spezifischen ADCC bei Gabe von Proteaseinhibitoren in Kombination mit EpCAM-spezifischen Antikörpern analysiert werden.

Die weitere Analyse der Aktivierung des EpCAM-Signalweges und damit verbunden der EpCAM-Spaltung in Bezug auf die Zelldichte ist ebenfalls von besonderem Interesse. Die Analyse der EpEX-Freisetzung, der Zielgenexpression, so wie der Proliferation in initial unterschiedlich dicht wachsenden Zellen ist Gegenstand laufender experimenteller Untersuchungen.

Analyse der EpIC-spezifischen Kernkomplexe

Durch die proteolytische Spaltung von EpCAM kommt es zur Freisetzung von EpIC, das im Zellkern von Karzinomzelllinien in einen spezifischen Komplex integriert ist. Die massenspektrometrische Analyse stellt eine geeignete Technik dar, um einen detaillierten Einblick in die Zusammensetzung des Komplexes zu erhalten (Kocher und Superti-Furga, 2007; Witze et al., 2007). Ziele sind somit die Identifikation weiterer Bindungspartner und die Aussage über das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Proteine innerhalb dieses Kernkomplexes.

Die Verwendung von Lef-Konsensussequenzen zeigte, dass der EpIC-spezifische Komplex in der Lage ist, an DNA zu binden. Es kann zurzeit aber noch keine Aussage über die EpIC-Komplex-spezifischen DNA-Bindungsstellen getroffen werden. In weiterführenden Experimenten soll die Möglichkeit der Bindung an Promotorsequenzen von Zielgenen untersucht werden. Eine geeignete Methode zur Analyse von DNA-Bindungen ist die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit anschließender DNA-Chip-Analyse (Chip) (*ChIP-on-Chip* Experiment). Bei der Chromatin-IP werden DNA-Protein-Komplexe zunächst stabil vernetzt und anschließend mittels spezifischer Antikörper isoliert. Die Bindung dieser Komplexe an spezifische DNA-Sequenzen kann nachfolgend auf einem DNA-Array analysiert werden. Die Anwendung dieser Technik soll zudem die Identifizierung neuer EpCAM-Zielgene unter Verwendung humaner Promotor-Arrays ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Schätzungen zu Folge wird Krebs in den kommenden Jahren die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern sein. Trotz der Identifikation vieler tumorassoziierter Proteine ist die Diagnose und Therapie der meisten Tumorentitäten unverändert schlecht. Eines der ersten identifizierten tumorassozierten Antigene ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM). Dieses wird bei der Karzinogenese in Tumoren und auf Tumorstammzellen verschiedener Entitäten *de novo* oder stark überexprimiert. Es gehört heute zu den am häufigsten verwendeten prognostischen Markern und dient als Zielmolekül verschiedener immuntherapeutischer Ansätze. Über die Biologie von EpCAM ist *bis dato* lediglich bekannt, dass das Protein onkogenes Potential besitzt. Die Identifikation und Validierung von Interaktionspartnern des EpCAM-Moleküls im Rahmen dieser Arbeit erlaubte erstmals einen detaillierten Einblick in die Mechanismen des EpCAM-Signalweges und dessen molekularer Biologie.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) Basis der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion ist. Die proteolytische Spaltung EpCAMs in der extrazellulären Domäne erfolgt durch die TACE (Tumornekrosefaktor α konvertierendes Enzym) und ist Voraussetzung für die zweite Prozessierung des Moleküls durch den γ -Sekretase Komplex. Durch RIP kommt es zur Freisetzung von EpEX (extrazelluläre Domäne), welches *in vitro* als löslicher Ligand intakter EpCAM-Moleküle dient. Gleichzeitig wird die intrazellulär signaltransduzierende Domäne EpIC freigesetzt. Die Relevanz der EpCAM-Spaltung *in vivo* konnte durch Analysen *ex vivo* an humanem Kolonkarzinom- und gesundem Gewebe unter Beweis gestellt werden.

Die Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner von EpCAM ermöglichte eine weitere Aufschlüsselung des Signalweges. EpIC ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern mit FHL2 und β -Catenin assoziiert. Untersuchungen zur EpCAM/FHL2 Interaktion zeigten eine direkte Wechselwirkung. Es wird angenommen, dass FHL2 als Plattform für die koordinierte Bildung eines Multiproteinkomplexes dient. Die nachfolgende Analyse eines EpIC-spezifischen Kernkomplexes ergab, dass in diesem, neben FHL2 und β -Catenin, auch Lef-1 enthalten war. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Komplex an spezifische TCF/Lef DNA-Sequenzen bindet und zur Induktion des Zielgens *c-myc* ausreichend ist. Die Menge des gebildeten EpIC-spezifischen Kernkomplexes konnte zudem positiv mit der Expression EpCAMs korreliert werden.

Die Identifikation von RIP als Mechanismus der Aktivierung der EpCAM-Signaltransduktion führte zur Entwicklung eines innovativen Therapieansatzes. Dieser beinhaltet die Kombination aus spezifischen Inhibitoren zur Hemmung der EpCAM-spezifischen RIP Proteasen und therapeutisch wirksamen EpCAM-Antikörpern. Auf Grund der erhöhten Dichte intakter EpCAM-Moleküle an der Zelloberfläche werden eine höhere Effizienz der immunologischen Zytotoxizität und eine funktionelle Inhibition von Tumor-/Tumorstammzellen erwartet. Dieses Konzept der multimodalen Therapie wird derzeit im Mausmodell untersucht.

7. Literaturverzeichnis

- Adhikary, S. and Eilers, M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 635-645.
- Akiyama, T. and Kawasaki, Y. (2006) Wnt signalling and the actin cytoskeleton. *Oncogene*, **25**, 7538-7544.
- Al-Hajj, M. and Clarke, M.F. (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, **23**, 7274-7282.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3983-3988.
- Alberti, S., Nutini, M. and Herzenberg, L.A. (1994) DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5833-5837.
- Amati, B., Alevizopoulos, K. and Vlach, J. (1998) Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, **3**, d250-268.
- Anderson, R., Schaible, K., Heasman, J. and Wylie, C. (1999) Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil*, **116**, 379-384.
- Armstrong, A. and Eck, S.L. (2003) EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther*, **2**, 320-326.
- Aster, J.C. (2005) Deregulated NOTCH signaling in acute T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights, questions, and opportunities. *Int J Hematol*, **82**, 295-301.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546.
- Baeuerle, P.A. and Gires, O. (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, **96**, 417-423.
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C. and Larsson, L.G. (2000) c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood*, **95**, 2104-2110.
- Balzar, M., Bakker, H.A., Briaire-de-Bruijn, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. and Litvinov, S.V. (1998) Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, **18**, 4833-4843.
- Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I.H., Rees-Bakker, H.A., Prins, F.A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S.O., Fleuren, G.J. and Litvinov, S.V. (2001) Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol*, **21**, 2570-2580.
- Balzar, M., Prins, F.A., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. and Litvinov, S.V. (1999a) The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res*, **246**, 108-121.
- Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J. and Litvinov, S.V. (1999b) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med*, **77**, 699-712.
- Barker, N., Morin, P.J. and Clevers, H. (2000) The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res*, **77**, 1-24.
- Barolo, S. (2006) Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? *Oncogene*, **25**, 7505-7511.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. and Beier, C.P. (2007) CD133(+) and CD133(-)

- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, **67**, 4010-4015.
- Bergsagel, P.L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C.R., Trepel, J. and Kuehl, W.M. (1992) A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol*, **148**, 590-596.
- Bianco, R., Troiani, T., Tortora, G. and Ciardiello, F. (2005) Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*, **12 Suppl 1**, S159-171.
- Bishop, J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.
- Black, D.L. (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*, **103**, 367-370.
- Black, R.A. (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1-5.
- Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M.G., Labois, C.L. and Mosnier, J.F. (2005) Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol*, **207**, 156-163.
- Bohm, C., Seibel, N.M., Henkel, B., Steiner, H., Haass, C. and Hampe, W. (2006) SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem*, **281**, 14547-14553.
- Borcuk, A.C. and Powell, C.A. (2007) Expression profiling and lung cancer development. *Proc Am Thorac Soc*, **4**, 127-132.
- Boveri, T. (1912) Anton Dohbn. *Science*, **36**, 453-468.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **5**, 744-749.
- Brembeck, F.H., Rosario, M. and Birchmeier, W. (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 51-59.
- Bremer, E., Kuijlen, J., Samplonius, D., Walczak, H., de Leij, L. and Helfrich, W. (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**, 281-290.
- Breuhahn, K., Baeuerle, P.A., Peters, M., Prang, N., Tox, U., Kohne-Volland, R., Dries, V., Schirmacher, P. and Leo, E. (2006) Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, **34**, 50-56.
- Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbues, R., Offner, S., Locher, M., Urbig, T., Raum, T., Kleindienst, P., Wimberger, P., Kimmig, R., Fichtner, I., Kufer, P., Hofmeister, R., da Silva, A.J. and Baeuerle, P.A. (2006) MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol*, **43**, 1129-1143.
- Brock, R., Hamelers, I.H. and Jovin, T.M. (1999) Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry*, **35**, 353-362.
- Bumol, T.F., Marder, P., DeHerdt, S.V., Borowitz, M.J. and Apeltgren, L.D. (1988) Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the KS1/4 monoclonal antibody. *Hybridoma*, **7**, 407-415.
- Burges, A., Wimberger, P., Kumper, C., Gorbounova, V., Sommer, H., Schmalfeldt, B., Pfisterer, J., Lichinitser, M., Makhson, A., Moiseyenko, V., Lahr, A., Schulze, E., Jager, M., Strohhlein, M.A., Heiss, M.M., Gottwald, T., Lindhofer, H. and Kimmig, R. (2007) Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer

- by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. *Clin Cancer Res*, **13**, 3899-3905.
- Calabrese, G., Crescenzi, C., Morizio, E., Palka, G., Guerra, E. and Alberti, S. (2001) Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **92**, 164-165.
- Canault, M., Tellier, E., Bonardo, B., Mas, E., Aumailley, M., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. and Peiretti, F. (2006) FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *J Cell Physiol*.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, **401**, 616-620.
- Chandu, D., Huppert, S.S. and Kopan, R. (2006) Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase. *J Neurochem*, **96**, 228-235.
- Chaubal, S., Wollenberg, B., Kastenbauer, E. and Zeidler, R. (1999) Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res*, **19**, 2237-2242.
- Chen, D., Xu, W., Bales, E., Colmenares, C., Conacci-Sorrell, M., Ishii, S., Stavnezer, E., Campisi, J., Fisher, D.E., Ben-Ze'ev, A. and Medrano, E.E. (2003) SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res*, **63**, 6626-6634.
- Chen, P.L., Chen, Y.M., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580.
- Chino, O., Kijima, H., Shimada, H., Nishi, T., Tanaka, H., Kise, Y., Kenmochi, T., Himeno, S., Machimura, T., Tanaka, M., Inokuchi, S., Tajima, T., Osamura, R.Y. and Makuuchi, H. (2001) Accumulation of p53 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*, **8**, 359-363.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Chong, J.M. and Speicher, D.W. (2001) Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem*, **276**, 5804-5813.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G.M., Mally, M.I., Lopez, A.D., Fannon, A., Ptasznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., Ellisman, M., Reisfeld, R.A. and Hayek, A. (1998) KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol*, **140**, 1519-1534.
- Cirulli, V., Ricordi, C. and Hayek, A. (1995) E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc*, **27**, 3335.
- Claas, C., Wahl, J., Orlicky, D.J., Karaduman, H., Schnolzer, M., Kempf, T. and Zoller, M. (2005) The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem J*, **389**, 99-110.
- Clevers, H. (2004) Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell*, **5**, 5-6.
- Clevers, H. and van de Wetering, M. (1997) TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet*, **13**, 485-489.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J. and Maitland, N.J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, **65**, 10946-10951.
- Conacci-Sorrell, M., Kaplan, A., Raveh, S., Gavert, N., Sakurai, T. and Ben-Ze'ev, A. (2005) The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res*, **65**, 11605-11612.

- Cooper, J.A. and Whyte, P. (1989) RB and the cell cycle: entrance or exit? *Cell*, **58**, 1009-1011.
- Coughlin, S.R., Lee, W.M., Williams, P.W., Giels, G.M. and Williams, L.T. (1985) c-myc gene expression is stimulated by agents that activate protein kinase C and does not account for the mitogenic effect of PDGF. *Cell*, **43**, 243-251.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W. and De Strooper, B. (2001) The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem*, **78**, 1168-1178.
- Curigliano, G., Spitaleri, G., Dettori, M., Locatelli, M., Scarano, E. and Goldhirsch, A. (2007) Vaccine immunotherapy in breast cancer treatment: promising, but still early. *Expert Rev Anticancer Ther*, **7**, 1225-1241.
- Dalerba, P., Cho, R.W. and Clarke, M.F. (2007a) Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, **58**, 267-284.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C. and Clarke, M.F. (2007b) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10158-10163.
- Dan, Y.Y., Riehle, K.J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J.S. and Fausto, N. (2006) Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9912-9917.
- Dang, C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 1-11.
- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M. and Litvinov, S.V. (1999a) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*, **188**, 201-206.
- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M. and Litvinov, S.V. (1999b) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*, **188**, 201-206.
- de la Guardia, C., Casiano, C.A., Trinidad-Pinedo, J. and Baez, A. (2001) CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, **23**, 104-112.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, **391**, 387-390.
- Denny, W.A. (2001) Prodrug strategies in cancer therapy. *Eur J Med Chem*, **36**, 577-595.
- DePinho, R.A. (1998) Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection. *Nature*, **391**, 533, 535-536.
- Dhesy-Thind, B., Pritchard, K.I., Messersmith, H., O'Malley, F., Elavathil, L. and Trudeau, M. (2007) HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Fleming, T.P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C.R., Schlessinger, J. and Aaronson, S.A. (1987) Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, **51**, 1063-1070.
- Di Paolo, C., Willuda, J., Kubetzko, S., Lauffer, I., Tschudi, D., Waibel, R., Pluckthun, A., Stahel, R.A. and Zangemeister-Wittke, U. (2003) A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. *Clin Cancer Res*, **9**, 2837-2848.

- Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N. and Reya, T. (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, **6**, 314-322.
- Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 233-240.
- Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Diehl, T.S., Selkoe, D.J. and Wolfe, M.S. (2002) Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2720-2725.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L.L. and Harel-Bellan, A. (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep*, **2**, 794-799.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. and Huelsken, J. (2007) Wnt/ β -catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol*.
- Foley, K.P. and Eisenman, R.N. (1999) Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim Biophys Acta*, **1423**, M37-47.
- Fong, D., Steurer, M., Obrist, P., Barbieri, V., Margreiter, R., Amberger, A., Laimer, K., Gastl, G., Tzankov, A. and Spizzo, G. (2006) Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol*.
- Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994) The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*, **79**, 273-282.
- Foulds, L. (1954) *The Experimental Study of Tumor Progression*. Academic Press, London.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiesch, R., Ruble, C., Nye, J.S. and Curtis, D. (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, **3**, 85-97.
- Frank, M. and Kemler, R. (2002) Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 557-562.
- Gabriel, B., Fischer, D.C., Orłowska-Volk, M., zur Hausen, A., Schule, R., Müller, J.M. and Hasenburger, A. (2006) Expression of the transcriptional coregulator FHL2 in human breast cancer: a clinicopathologic study. *J Soc Gynecol Investig*, **13**, 69-75.
- Gabriel, B., Mildenerger, S., Weisser, C.W., Metzger, E., Gitsch, G., Schule, R. and Müller, J.M. (2004) Focal adhesion kinase interacts with the transcriptional coactivator FHL2 and both are overexpressed in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*, **24**, 921-927.
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T. and Ben-Ze'ev, A. (2005) L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol*, **168**, 633-642.
- Giaccia, A.J. and Kastan, M.B. (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*, **12**, 2973-2983.
- Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1653**, 1-24.
- Gires, O., Eskofier, S., Lang, S., Zeidler, R. and Munz, M. (2003) Cloning and characterisation of a 1.1 kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter. *Anticancer Res*, **23**, 3255-3261.
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Munz, M., Wollenberg, B. and Zeidler, R. (2001) Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer*, **92**, 620-628.
- Gosens, M.J., van Kempen, L.C., van de Velde, C.J., van Krieken, J.H. and Nagtegaal, I.D. (2007) Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol*, **20**, 221-232.
- Gottlieb, T.M. and Oren, M. (1998) p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*, **8**, 359-368.

- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Guillemot, J.C., Naspetti, M., Malergue, F., Montcourrier, P., Galland, F. and Naquet, P. (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**, 371-378.
- Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M. and Altevogt, D.P. (2003) ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J*, **17**, 292-294.
- Haas, I.G., Frank, M., Veron, N. and Kemler, R. (2005) Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *J Biol Chem*, **280**, 9313-9319.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y. and Selkoe, D.J. (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, **357**, 500-503.
- Haass, C. and Selkoe, D.J. (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, **75**, 1039-1042.
- Haber, D. and Harlow, E. (1997) Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet*, **16**, 320-322.
- Haines, N. and Irvine, K.D. (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 786-797.
- Hampe, W., Riedel, I.B., Lintzel, J., Bader, C.O., Franke, I. and Schaller, H.C. (2000) Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J Cell Sci*, **113 Pt 24**, 4475-4485.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for Transformation of E.coli. *IRL Press, Oxford*.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harari, P.M., Allen, G.W. and Bonner, J.A. (2007) Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*, **25**, 4057-4065.
- Harris, C.C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1442-1455.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. and Saftig, P. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, **11**, 2615-2624.
- Hartung, G., Hofheinz, R.D., Dencausse, Y., Sturm, J., Kopp-Schneider, A., Dietrich, G., Fackler-Schwalbe, I., Bornbusch, D., Gonnermann, M., Wojatschek, C., Lindemann, W., Eschenburg, H., Jost, K., Edler, L., Hochhaus, A. and Queisser, W. (2005) Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study. *Onkologie*, **28**, 347-350.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509-1512.
- Henriksson, M. and Luscher, B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, **68**, 109-182.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. and Koprowski, H. (1979) Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1438-1442.
- Herrera, R.E., Chen, F. and Weinberg, R.A. (1996) Increased histone H1 phosphorylation and relaxed chromatin structure in Rb-deficient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11510-11515.

- High, A.S., Robinson, P.A. and Klein, C.E. (1996) Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias. *J Oral Pathol Med*, **25**, 10-13.
- Hoppler, S. and Kavanagh, C.L. (2007) Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci*, **120**, 385-393.
- Hsu, S.C., Galceran, J. and Grosschedl, R. (1998) Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol*, **18**, 4807-4818.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, **75**, 816-821.
- Hussain, S., Pluckthun, A., Allen, T.M. and Zangemeister-Wittke, U. (2007) Antitumor activity of an epithelial cell adhesion molecule targeted nanovesicular drug delivery system. *Mol Cancer Ther*, **6**, 3019-3027.
- Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U. and Van Ghelue, M.c.-r.p.-p. (2006) The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 268-284.
- Juang, S.H., Lung, C.C., Hsu, P.C., Hsu, K.S., Li, Y.C., Hong, P.C., Shiah, H.S., Kuo, C.C., Huang, C.W., Wang, Y.C., Huang, L., Chen, T.S., Chen, S.F., Fu, K.C., Hsu, C.L., Lin, M.J., Chang, C.J., Ashendel, C.L., Chan, T.C., Chou, K.M. and Chang, J.Y. (2007) D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *Mol Cancer Ther*, **6**, 193-202.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., Busse, T., Yermian, N., Ie, L. and Koo, E.H. (2005) Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem*, **280**, 31537-31547.
- Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D. and Muller, M. (1995) Distribution of E-cadherin and EpCAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol*, **103**, 281-286.
- Kastrinakis, W.V., Ramchurren, N., Rieger, K.M., Hess, D.T., Loda, M., Steele, G. and Summerhayes, I.C. (1995) Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene*, **11**, 647-652.
- Katoh, M. and Katoh, M. (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*, **13**, 4042-4045.
- Kenny, P.A. and Bissell, M.J. (2007) Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest*, **117**, 337-345.
- Kenny, P.A., Lee, G.Y. and Bissell, M.J. (2007) Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci*, **12**, 3468-3474.
- Kocher, T. and Superti-Furga, G. (2007) Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. *Nat Methods*, **4**, 807-815.
- Kopan, R. and Ilagan, M.X. (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 499-504.
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D. and Fuhrer, P. (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*, **5**, 957-971.
- Kuhn, S., Koch, M., Nubel, T., Ladwein, M., Antolovic, D., Klingbeil, P., Hildebrand, D., Moldenhauer, G., Langbein, L., Franke, W.W., Weitz, J. and Zoller, M. (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*, **5**, 553-567.

- Labalette, C., Renard, C.A., Neuveut, C., Buendia, M.A. and Wei, Y. (2004) Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol*, **24**, 10689-10702.
- Ladwein, M., Pape, U.F., Schmidt, D.S., Schnolzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G. and Zoller, M. (2005) The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res*, **309**, 345-357.
- Lai, M.T., Chen, E., Crouthamel, M.C., DiMuzio-Mower, J., Xu, M., Huang, Q., Price, E., Register, R.B., Shi, X.P., Donoviel, D.B., Bernstein, A., Hazuda, D., Gardell, S.J. and Li, Y.M. (2003) Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities. *J Biol Chem*, **278**, 22475-22481.
- Lammers, R., Giesert, C., Grunebach, F., Marxer, A., Vogel, W. and Buhring, H.J. (2002) Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Exp Hematol*, **30**, 537-545.
- Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.F., Lanza, F., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2006) Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 845-857.
- Levy, L., Wei, Y., Labalette, C., Wu, Y., Renard, C.A., Buendia, M.A. and Neuveut, C. (2004) Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction. *Mol Cell Biol*, **24**, 3404-3414.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K. and et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, **269**, 973-977.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F. and Simeone, D.M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, **67**, 1030-1037.
- Liao, D.J. and Dickson, R.B. (2000) c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **7**, 143-164.
- Linnenbach, A.J., Seng, B.A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyrc, J.J., Druck, T. and Huebner, K. (1993) Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol*, **13**, 1507-1515.
- Linnenbach, A.J., Wojcierowski, J., Wu, S.A., Pyrc, J.J., Ross, A.H., Dietzschold, B., Speicher, D. and Koprowski, H. (1989) Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 27-31.
- Litvinov, S.V., Bakker, H.A., Gourevitch, M.M., Velders, M.P. and Warnaar, S.O. (1994a) Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun*, **2**, 417-428.
- Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1997) Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*, **139**, 1337-1348.
- Litvinov, S.V., van Driel, W., van Rhijn, C.M., Bakker, H.A., van Krieken, H., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1996) Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol*, **148**, 865-875.
- Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1994b) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, **125**, 437-446.
- Liu, J. and Levens, D. (2006) Making myc. *Curr Top Microbiol Immunol*, **302**, 1-32.
- Lozano, G. and Elledge, S.J. (2000) p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*, **404**, 24-25.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Mann, K., Deutzmann, R., Aumailley, M., Timpl, R., Raimondi, L., Yamada, Y., Pan, T.C., Conway, D. and Chu, M.L. (1989) Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *Embo J*, **8**, 65-72.
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., von der Mark, K., Starzinski-Powitz, A. and Wixler, V. (2002) The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol*, **159**, 113-122.
- Martin, B.T., Kleiber, K., Wixler, V., Raab, M., Zimmer, B., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. (2007) FHL2 regulates cell cycle-dependent and doxorubicin-induced p21Cip1/Waf1 expression in breast cancer cells. *Cell Cycle*, **6**, 1779-1788.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 2066-2076.
- Mayer, A., Andratschke, M., Pauli, C., Graefe, H., Kristina, K. and Wollenberg, B. (2005) Generation of an autologous cell system for immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*, **25**, 4075-4080.
- McGowan, P.M., Ryan, B.M., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N. and Duffy, M.J. (2007) ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res*, **13**, 2335-2343.
- McLaughlin, P.M., Trzpis, M., Kroesen, B.J., Helfrich, W., Terpstra, P., Dokter, W.H., Ruiters, M.H., de Leij, L.F. and Harmsen, M.C. (2004) Use of the EGP-2/Ep-CAM promoter for targeted expression of heterologous genes in carcinoma derived cell lines. *Cancer Gene Ther*, **11**, 603-612.
- McMurray, H.R. and McCance, D.J. (2004) Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7. *J Virol*, **78**, 5698-5706.
- Medina, M. and Dotti, C.G. (2003) RIPPed out by presenilin-dependent gamma-secretase. *Cell Signal*, **15**, 829-841.
- Mei, J.M., Hord, N.G., Winterstein, D.F., Donald, S.P. and Phang, J.M. (2000) Differential formation of beta-catenin/lymphoid enhancer factor-1 DNA binding complex induced by nitric oxide in mouse colonic epithelial cells differing in adenomatous polyposis coli (Apc) genotype. *Cancer Res*, **60**, 3379-3383.
- Mochizuki, S. and Okada, Y. (2007) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci*, **98**, 621-628.
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R. and Hammerling, G.J. (1987) Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer*, **56**, 714-721.
- Morecki, S., Lindhofer, H., Yacovlev, E., Gelfand, Y. and Slavin, S. (2006) Use of trifunctional bispecific antibodies to prevent graft versus host disease induced by allogeneic lymphocytes. *Blood*, **107**, 1564-1569.
- Morgan, M.J. and Whawell, S.A. (2000) The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 776-783.
- Mosolits, S., Markovic, K., Frodin, J.E., Virving, L., Magnusson, C.G., Steinitz, M., Fagerberg, J. and Mellstedt, H. (2004) Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, **10**, 5391-5402.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Becherer, J.D., Bickett, D.M., Burkhart, W., Chen, W.J., Hassler, D., Leesnitzer, M.T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T.,

- Schoenen, F., Warner, J. and Willard, D. (1997) Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol*, **72**, 127-129.
- Muller, J.M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R. and Schule, R. (2000) FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J*, **19**, 359-369.
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J. and Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*, **5**, 197-206.
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R. and Gires, O. (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, **23**, 5748-5758.
- Munz, M., Zeidler, R. and Gires, O. (2005) The tumor-associated antigen EpCAM up-regulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Letters*, **225**, 151-157.
- Novinec, M., Kordis, D., Turk, V. and Lenarcic, B. (2006) Diversity and evolution of the thyroglobulin type-1 domain superfamily. *Mol Biol Evol*, **23**, 744-755.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. and Dick, J.E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, **445**, 106-110.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M. and Lendahl, U. (2001) The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem*, **276**, 35847-35853.
- Oberneder, R., Weckermann, D., Ebner, B., Quadt, C., Kirchinger, P., Raum, T., Locher, M., Prang, N., Baeuerle, P.A. and Leo, E. (2006) A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur J Cancer*, **42**, 2530-2538.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M. and Haass, C. (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J*, **21**, 5408-5416.
- Omer, C.A., Miller, P.J., Diehl, R.E. and Kral, A.M. (1999) Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 584-590.
- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J. and Gillanders, W.E. (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res*, **64**, 5818-5824.
- Pahl, H.L. and Baeuerle, P.A. (1996) Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 340-347.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R. and Gires, O. (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, **193**, 25-32.
- Radtke, F. and Clevers, H. (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, **307**, 1904-1909.
- Ratovitski, T., Slunt, H.H., Thinakaran, G., Price, D.L., Sisodia, S.S. and Borchelt, D.R. (1997) Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem*, **272**, 24536-24541.
- Rawson, R.B. (2002) Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Essays Biochem*, **38**, 155-168.
- Renan, M.J. (1993) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*, **7**, 139-146.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843-850.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. and Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414**, 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. and De Maria, R. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**, 111-115.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. and Collins, A.T. (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, **117**, 3539-3545.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H. and Lindhofer, H. (2001) Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem*, **49**, 911-917.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J. and Pichlmayr, R. (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*, **16**, 1788-1794.
- Riethmüller, G., Schneider Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R. and et al. (1994) Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet*, **343**, 1177-1183.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. and et al. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, **376**, 775-778.
- Ross, A.H., Herlyn, D., Iliopoulos, D. and Koprowski, H. (1986) Isolation and characterization of a carcinoma-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 297-303.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, **18**, 6135-6144.
- Ruf, P., Gires, O., Jager, M., Fellingner, K., Atz, J. and Lindhofer, H. (2007) Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer*, **97**, 315-321.
- Ruf, P. and Lindhofer, H. (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*, **98**, 2526-2534.
- Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S. and Katsube, K. (2002) Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev Biol*, **241**, 313-326.
- Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Bech-Serra, J.J. and Arribas, J. (2007) Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors. *J Biol Chem*, **282**, 8325-8331.
- Saura, C.A., Tomita, T., Davenport, F., Harris, C.L., Iwatsubo, T. and Thinakaran, G. (1999) Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem*, **274**, 13818-13823.
- Schlereth, B., Kleindienst, P., Fichtner, I., Lorenczewski, G., Brischwein, K., Lippold, S., Silva, A., Locher, M., Kischel, R., Lutterbuse, R., Kufer, P. and Baeuerle, P.A. (2006) Potent inhibition of local and disseminated tumor growth in immunocompetent mouse models by a bispecific antibody construct specific for Murine CD3. *Cancer Immunol Immunother*, **55**, 785-796.
- Schmelzer, E., Wauthier, E. and Reid, L.M. (2006) The Phenotypes of Pluripotent Human Hepatic Progenitors. *Stem Cells*.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N.,

- Furth, M.E. and Reid, L.M. (2007) Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*, **204**, 1973-1987.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. and Greaves, M.F. (1982) A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem*, **257**, 10766-10769.
- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A. and Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, **393**, 382-386.
- Selkoe, D. and Kopan, R. (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 565-597.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. and et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, **375**, 754-760.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5522-5527.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W. and Murphy, G. (2005) ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci*, **118**, 2371-2380.
- Spizzo, G., Gastl, G., Wolf, D., Gunsilius, E., Steurer, M., Fong, D., Amberger, A., Margreiter, R. and Obrist, P. (2003) Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer*, **88**, 574-578.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G. and Zeimet, A.G. (2006) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., von Castelberg, B., Bart, R., Stopatschinskaya, S., Kochli, O.R., Haas, P., Mross, F., Zuber, M., Dietrich, H., Bischoff, S., Mirlacher, M., Sauter, G. and Gastl, G. (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **86**, 207-213.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I. and Emerman, J.T. (2001) Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, **67**, 93-109.
- Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J.T. and Eaves, C.J. (2005) Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **10**, 49-59.
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E. and Altevogt, P. (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J*, **393**, 609-618.
- Stoecklein, N.H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A.M., Erbersdobler, A., Verde, P.E., Eisenberger, C.F., Peiper, M., Rehders, A., Schulte Am Esch, J., Knoefel, W.T. and Hosch, S.B. (2006) EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*, **6**, 165.
- Struhl, G. and Adachi, A. (1998) Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell*, **93**, 649-660.
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Linnenbach, A.J. (1990) Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3542-3546.

- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, **404**, 42-49.
- Tanaka, Y., Miyamoto, S., Suzuki, S.O., Oki, E., Yagi, H., Sonoda, K., Yamazaki, A., Mizushima, H., Maehara, Y., Mekada, E. and Nakano, H. (2005) Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 4783-4792.
- Taniguchi, Y., Kim, S.H. and Sisodia, S.S. (2003) Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J Biol Chem*, **278**, 30425-30428.
- Temin, H.M. (1990) Retroviruses and cancer. *Mol Carcinog*, **3**, 183-184.
- Thinakaran, G., Harris, C.L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H.H., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. (1997) Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem*, **272**, 28415-28422.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., de Leij, L.M. and Harmsen, M.C. (2007a) Epithelial Cell Adhesion Molecule. More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *Am J Pathol*.
- Trzpis, M., Popa, E.R., McLaughlin, P.M., van Goor, H., Timmer, A., Bosman, G.W., de Leij, L.M. and Harmsen, M.C. (2007b) Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol*, **107**, e119-131.
- Tsubura, A., Senzaki, H., Sasaki, M., Hilgers, J. and Morii, S. (1992) Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol*, **19**, 73-79.
- Varga, M., Obrist, P., Schneeberger, S., Muhlmann, G., Felgel-Farnholz, C., Fong, D., Zitt, M., Brunhuber, T., Schafer, G., Gastl, G. and Spizzo, G. (2004) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res*, **10**, 3131-3136.
- Varley, J.M., Brammar, W.J., Lane, D.P., Swallow, J.E., Dolan, C. and Walker, R.A. (1991) Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene*, **6**, 413-421.
- Veronese, M.L. and O'Dwyer, P.J. (2004) Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **40**, 1292-1301.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, **10**, 789-799.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Wang, J., Yang, Y., Xia, H.H., Gu, Q., Lin, M.C., Jiang, B., Peng, Y., Li, G., An, X., Zhang, Y., Zhuang, Z., Zhang, Z., Kung, H.F. and Wong, B.C. (2007) Suppression of FHL2 expression induces cell differentiation and inhibits gastric and colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, **132**, 1066-1076.
- Wang, J.C. and Dick, J.E. (2005) Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*, **15**, 494-501.
- Wei, Y., Renard, C.A., Labalette, C., Wu, Y., Levy, L., Neuveut, C., Prieur, X., Flajolet, M., Prigent, S. and Buendia, M.A. (2003) Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin. *J Biol Chem*, **278**, 5188-5194.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T. and Aster, J.C. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, **306**, 269-271.

- Went, P., Dirnhofer, S., Salvisberg, T., Amin, M.B., Lim, S.D., Diener, P.A. and Moch, H. (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol*, **29**, 83-88.
- Went, P., Vasei, M., Bubendorf, L., Terracciano, L., Tornillo, L., Riede, U., Kononen, J., Simon, R., Sauter, G. and Baeuerle, P.A. (2006) Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer*, **94**, 128-135.
- Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G. and Dirnhofer, S. (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, **35**, 122-128.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S. (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, **43**, 567-581.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I. and Laird, P.W. (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet*, **39**, 157-158.
- Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E., Rees-Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H. and Litvinov, S.V. (2003) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*, **285**, 50-58.
- Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A. and Ahn, N.G. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, **4**, 798-806.
- Yamamoto, T. (1993) Molecular basis of cancer: oncogenes and tumor suppressor genes. *Microbiol Immunol*, **37**, 11-22.
- Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M. and Wang, X.W. (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, **67**, 10831-10839.
- Yan, J.H., Ye, Q.N., Fang, Y., Zhu, J.H. and Huang, C.F. (2003) [Mapping of FHL2 transcription activation domain]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **35**, 643-648.
- Zhang, J., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M.S., Greenberg, B.D. and Selkoe, D.J. (2002) Proteolysis of chimeric beta-amyloid precursor proteins containing the Notch transmembrane domain yields amyloid beta-like peptides. *J Biol Chem*, **277**, 15069-15075.
- Zorzos, J., Zizi, A., Bakiras, A., Pectasidis, D., Skarlos, D.V., Zorzos, H., Elemenoglou, J. and Likourinas, M. (1995) Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol*, **28**, 251-254.

8. Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional, zwei-dimensionale Gelelektrophorese
17-1A	Panorex®
α	anti
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AK	Antikörper
AP3D1	<i>Adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit</i>
APC	<i>adenomatosis polyopsis coli</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ASF1B	<i>ASF1 anti-silencing function 1 homolog B</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CBP	<i>cAMP-response-element-binding-protein-binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD44	<i>cell surface glycoprotein</i>
CD133	<i>Prominin 1</i>
Cdk	<i>Zyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Chr.	Chromosom
Ci	Curie
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CMV	Cytomegalovirus
C-terminal	carboxyterminal
CTF	C-terminales Fragment
	γ -Sekretaseinhibitor, N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylgly cine
DAPT	t-butyl ester,
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythriol
E2F	<i>transcription factor E2F</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
eFABP	<i>fatty acid binding protein 5</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF/III	<i>Epidermal growth factor like repeat</i>
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EpIC	<i>EpCAM intracellular domain,</i>
EpEX	<i>EpCAM extracellular domain</i>
EpEXrec	<i>EpCAM extracellular domain, recombinant expressed</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FHL2	<i>four and a half LIM domains 2</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAMA	human anti-mouse antibody
Her2/neu	<i>v-erb-b2, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
IC	<i>intra-cellular domain</i>
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>
Ig	Immunglobulin
IGN-101	Edrecolomab®
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INF α	<i>interferon alpha</i>
IP	Immunopräzipitation
Jak	<i>Janus-kinase</i>
KA	Karzinom

Kat.Nr.	Katalog Nummer
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLMS	Konvokales Laserscan-Mikroskop
Ko-IP	Ko-Immünpräzipitation
Ktrl.	Kontrolle
Ktrl. siRNA	Kontroll <i>small interfering RNA</i>
Kü	Kulturüberstand
l	Liter
L1	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
LB	Luria Broth
Lef	<i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LIM	Lin-14, Isl-1, Mec-3
Lk	leichte Antikörperkette
M	Molar
m	milli
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP-Kinase	<i>mitogene-activated protein kinase</i>
max.	maximal
max. Konz.	maximale Konzentration
mg	Milligramm
MG-132	Proteasom Inhibitor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
M _r	Molekulargewicht
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NF κ B	<i>nuclear factor of kappa</i>
ng	Nanogramm
NICD	<i>NOTCH intracellular domain</i>
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
Nr-CAM	<i>neuronal cell adhesion molecule</i>
N-terminal	Amino-terminal
NTF	N-terminales Fragment
OD	optische Dichte
p53	<i>tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrom)</i>
p300	<i>E1A binding protein 300</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI	Propidiumiodid
PS1	<i>Presenilin 1</i> , PSEN1
PS2	<i>Presenilin 2</i> , PSEN2
PVA	Polyvinylalkohol
Rb	<i>retinoblastoma protein</i>
RIP	regulated intramembran proteolysis
RNA	Ribonukleinsäure
RNR	Ribonukleotid-Reduktase
RT	Raumtemperatur
S3 / S4	Schnittstelle 3 / 4
SCC	<i>squamous cell carcinoma antigen</i>
sec	Sekunde
SD	<i>Synthetic Dropont</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH	Schleimhaut
SK	schwere Antikörperkette
STAT1/3	<i>signal transducer and activator of transcription 1/3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNTA1	<i>Syntrophin 1</i>
SorLA	<i>sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing</i>
SP	Signalpeptid
SV40	<i>simian virus 40</i>
TACE	<i>tumor necrosis factor, alpha, converting enzym, ADAM17</i> N-(R)-(2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl)-4-methylpentanoyl-L-t-butyl- glycine-L-alanine 2-aminoethyl amide, TACE-Inhibitor,
TAPI-2	
TCF	<i>T-cell factor</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TNT	<i>in vitro</i> Transkriptions/Translations-System
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TY	<i>tyroglobulin-type repeat</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
überl.	überlagert
UMP-CMP-Kinase	<i>cytidylate kinase</i>
UV	ultraviolett
V	Volt

v.Chr.	Vor Christus
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNT	<i>wingless-type MMTV integration site family protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während meiner Arbeit unterstützend zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Olivier Gires für die Vergabe des Themas, die gute Betreuung und anregende Diskussionen,

Herrn Dr. Markus Münz für die Betreuung und Unterstützung, besonders zu Beginn der Doktorarbeit,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick für die Übernahme der Rolle des Doktorvaters und seine konstruktive Kritik,

Herrn Prof. Alexander Berghaus für die guten Arbeitsbedingungen in der HNO-Forschung,

Herrn Wolfgang Hammerschmidt und seiner Arbeitsgruppe für Anregungen und Kritik in den Seminaren, sowie die Bereitstellung verschiedener Geräte,

der gesamten Arbeitsgruppe für ein einzigartiges Arbeitsklima und abwechslungsreiche Unterhaltung im „Kaffee Kuschel“; Piri Mack für die Unterstützung bei „Immunhisto und Konfokal“, so wie für die herzlichen und aufmunternden Worte in nervenaufreibenden Phasen; Barbara Gonzalez für die zahlreichen Diskussionen, das gemeinsame Durchschreiten von Höhen und Tiefen und die vielen „spanischen Momente“; Jens Rauch für viele anregende Diskussionen und Cuong Kieu für zahlreiche Maxipräps.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Mutter und meinem Bruder danken, die mir durch ihre humorvolle Begleitung und Unterstützung vieles erleichtert haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Dorothea Maetzel
Akad. Grad: Diplombiologin
e-mail: dorothea.maetzel@med.uni-muenchen.de
Geburtsdatum: 18.02.1979
Geburtsort: Bonn-Duisdorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung/Studium

1985-1987: Clemens August Grundschule
1987-1989: Waldschule, Grundschule
1989-1998: Gymnasium der Ursulinenschule Hersel, Abitur
1998-2003: Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2003-2004: Diplomarbeit am Lehrstuhl für medizinische Parasitologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bei Prof. Dr. W.A. Maier
seit November 2004: Promotion in der klinischen Kooperationsgruppe „Molekulare Onkologie“ der LMU und GSF, München
Thema: Identifikation und Validierung EpCAM-assoziiierter Interaktionspartner: Das EpCAM-Signalsom