

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

---

# **Untersuchungen zur Signaltransduktion des tumorassoziierten Antigens EpCAM**

---



vorgelegt von Sabine Nicole Denzel

---

München, im Januar 2010

*für meinen Papa*

## PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit war es mir möglich zu folgenden Publikationen beizutragen:

Maetzel D, **Denzel S**, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.*;11(2):162-71.

González B, **Denzel S**, Mack B, Conrad M, Gires O. (2009) EpCAM is involved in maintenance of the murine ES cell phenotype. *Stem Cells* 23; 27(8):1782-1791.

**Denzel S.**, Maetzel D., Mack B., Eggert C., Bähr G., Gires O. (2009) Initial activation of EpCAM signalling *via* cell-to-cell contact. *BMC Cancer*; 19;9:402

Dissertation eingereicht am: 19. Januar 2010  
Betreuer: Herr PD Dr. Olivier Gires  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Ackmann  
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß  
Mündliche Prüfung am: 5. Juli 2010

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>3</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 Krebs.....	7
1.1.1 Karzinogenese .....	7
1.1.2 Gewebeinvasion und Metastasierung .....	9
1.1.3 <i>Cancer-initiating-cells</i> (CICs) .....	9
1.2 Tumorassoziierte Antigene.....	10
1.3 EpCAM.....	11
1.3.1 Das EPCAM-Gen.....	11
1.3.2 Das EpCAM Protein.....	12
1.3.3 EpCAM-Expressionsmuster .....	13
1.3.4 Therapeutische Verwendung .....	16
1.3.5 Die Funktion von EpCAM .....	17
1.3.6 EpCAM und Stammzellen .....	19
1.4 Zielsetzung .....	20
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.1 Chemikalien und Kits .....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Geräte .....	24
2.1.4 Dienstleistungen.....	25
2.2 Puffer und Stammlösungen .....	25
2.3 Antikörper .....	27
2.4 Oligonukleotide.....	28
2.4.1 Primer .....	28
2.4.2 siRNA.....	30
2.5 Plasmide .....	30
2.6 Bakterien.....	31
2.7 Zelllinien.....	31
2.8 Tiermodell .....	31
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	32
3.1.1 Agarose Gelelektrophorese .....	32
3.1.2 Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) .....	32
3.2 Bakterienkultur .....	33
3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung .....	33
3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	33
3.2.3 Transformation von <i>E.coli</i> .....	34

3.3	Zellkultur .....	34
3.3.1	Zellkulturbedingungen: Kultivierung und Aufbewahrung permanenter Zelllinien.....	34
3.3.2	Verwendung des Proteasominhibitors MG-132.....	34
3.3.3	Induktion der Kerntranslokation mit 4-OHT.....	35
3.3.4	Bestimmung der Zellzahl.....	35
3.3.5	Generierung von Zelllysaten .....	35
3.4	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	35
3.5	FACS-Analyse.....	36
3.5.1	Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen.....	36
3.5.2	Propidiumiodid-(PI) FACS-Analyse.....	36
3.6	Migrationsassays .....	36
3.6.1	Boydenkammer.....	36
3.6.2	Migration-Slide (Ibidi).....	37
3.7	Western Blot.....	38
3.7.1	SDS-Polyacrylamidgele.....	38
3.7.2	Tris-Tricin-Gele .....	38
3.8	Immunopräzipitation.....	38
3.9	Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray .....	39
3.10	Xenotransplantation in SCID-Mäuse .....	39
3.11	Immunhistochemie .....	39
3.12	Immunocytochemie.....	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
4.1	Nachweis von EpICD.....	41
4.1.1	Versuche mit kommerziellen Antikörpern.....	41
4.1.2	Generierung von polyklonalen EpICD-spezifischen Antikörpern.....	43
4.1.3	Nachweis von EpICD mit dem Antikörper 1775 .....	46
4.2	EpICD als signaltransduzierender Teil von EpCAM.....	47
4.2.1	Einfluss von EpICD auf die Migration.....	48
4.2.2	EpICD hat Einfluss auf die Zellzahl .....	49
4.2.3	Einfluss von EpCAM und EpICD auf die Apoptose.....	50
4.2.4	EpICD beeinflusst die Proliferation.....	51
4.2.5	Einfluss von EpICD auf das Zielgen MYC .....	52
4.2.6	Onkogenes Potential von EpCAM in vivo .....	54
4.3	Initiale Aktivierung des EpCAM Signalweges durch Zell-Zell-Kontakt.....	56
4.3.1	Gespaltenes EpICD ist ohne Zell-Zell-Kontakt funktionell.....	56
4.3.2	Kerntranslokation von EpICD ist erforderlich für EpCAM vermittelte Effekte.....	59
4.4	Transkriptomanalyse in Abhängigkeit der EpCAM-Expression.....	61
4.4.1	Bestimmung der Ausgangsparameter für den cDNA-Array.....	62
4.4.2	Auswertung differentiell regulierter Gene.....	63
4.4.3	Fokussierung auf ausgewählte deregulierte Genen.....	65
4.4.4	MMP7 als Zielgen .....	68
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
5.1	EpICD als signaltransduzierende Domäne .....	73

5.1.1	EpICD .....	73
5.1.2	EpICD vermittelte Effekte .....	74
5.2	Initiale Aktivierung des EpCAM Signalweges durch Zell-Zell-Kontakt .....	76
5.2.1	Mechanismus .....	76
5.2.2	In vivo Relevanz .....	78
5.3	Vergleich von EpCAM mit anderen RIP-prozessierten Molekülen .....	79
5.4	Genexpressionsanalyse .....	82
5.4.1	Biologische Prozesse .....	82
5.4.2	Signalwege und mögliche Wechselwirkungen .....	83
5.4.3	Ausgewählte potentielle Zielgene von EpCAM .....	85
5.4.4	MMP7 als Zielgen des EpCAM Signalweges .....	88
5.5	Ausblick .....	89
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>

# 1 □ EINLEITUNG

## 1.1 Krebs

Krebs ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2007 waren 13% (7,9 Millionen) aller Todesfälle auf eine Krebserkrankung zurückzuführen. Nach Schätzungen der WHO wird die Anzahl der krebsbedingten Todesfälle bis zum Jahr 2030 bis auf 12 Millionen steigen (<http://www.who.int/cancer/en/>).

Aufgrund der hohen Komplexität und einer Vielzahl molekularer Ursachen für die Erkrankung Krebs, gestaltet sich die Behandlung sehr schwierig. Neben einer verbesserten Diagnostik ist vor allem die Neu- und Weiterentwicklung spezifischer Therapien eine Grundvoraussetzung für die Senkung der Mortalitätsrate bei dieser Erkrankung. Das Verständnis für die molekularen Mechanismen, die den unterschiedlichen Pathogenesen zu Grunde liegen, ist dabei von essentieller Bedeutung.

### 1.1.1 Karzinogenese

Die Entstehung von Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess, der auch zum heutigen Stand der Forschung nicht vollständig geklärt ist. Als Karzinogenese bezeichnet man dabei den komplexen Prozess der zur Entwicklung von Tumoren epithelialen Ursprungs führt. Für diese progressive Transformation einer gesunden Epithelzelle zu einer hoch malignen Tumorzelle, sind genomische Mutationen verantwortlich, welche der Zelle einen eindeutigen Selektionsvorteil verschaffen. Die sequenzielle Akkumulation verschiedener Mutationen und chromosomaler Aberrationen führt schließlich zu einer unkontrollierten zellulären Expansion. Als Krebs bezeichnet man die Endstufe dieses Prozesses, der sich über einen Zeitraum von Jahrzehnten erstrecken kann. Allerdings wird die Mehrzahl der täglich entstehenden Mutationen erkannt und die betroffenen Zellen durch einen programmierten Zelltod beseitigt.

Krebs ist durch zwei Haupteigenschaften charakterisiert: zum einen durch unkontrollierte Zellproliferation und zum anderen durch die Fähigkeit der Krebszellen in umliegendes Gewebe einzudringen. Nach heutigem Wissensstand gibt es sechs essentielle Veränderungen der Zellphysiologie, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung malignen Wachstums verantwortlich sind (Hanahan and Weinberg, 2000):

- Sensitivitätsverlust gegenüber proliferationsinhibierenden Signalen und Differenzierungssignalen
- Induktion von autokrinen Wachstumssignalen
- uneingeschränktes replikatives Potential
- Resistenz gegenüber Apoptose
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- verstärkte Angiogenese/Neoangiogenese

Im Wesentlichen spielen dabei zwei Gruppen von Proteinen eine Rolle: (1) Proto-Onkogene, welche im Tumor vermehrt exprimiert werden und (2) Tumor-Suppressor-Gene, welche reprimiert sind (Vogelstein et al., 2000; Vogelstein and Kinzler, 2004).

Bei Proto-Onkogenen kommt es durch Mutation oder deregulierter Expression zu einer Verstärkung ihrer Funktion, was als „*gain of function*“ bezeichnet wird. Diese Veränderungen können durch Genmutationen, Genamplifikationen, chromosomale Translokationen oder retrovirale Insertionen ausgelöst werden (Temin, 1990; Yamamoto, 1993) und das Gen selbst sowie dessen regulatorische Signalwege betreffen. Beispiele hierfür sind Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (EGF-Rezeptor (c-erb-B), HER2/c-neu (c-erb-B2)), nukleäre Rezeptoren (Steroid- und Thyroid-Hormon-Rezeptoren), Transkriptionsfaktoren (c-Myc, Fos/Jun, NF- $\kappa$ B), intrazelluläre Signalüberträger (Src, Ras, Raf, STAT1 und 3), Zellzyklusregulatoren (Zykline) und Gene, die bei der Apoptose eine Rolle spielen (Bcl2, Bcl-x) (Vogelstein et al., 2000; Vogelstein and Kinzler, 2004). c-Myc ist ein sehr bekanntes, gut erforschtes Proto-Onkogen, welches in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert ist (Liao and Dickson, 2000; de la Guardia et al., 2001). Es nimmt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation ein und kann durch Punktmutationen, chromosomale Translokationen oder Veränderungen in c-Myc regulierenden Molekülen dereguliert werden (Di Fiore et al., 1987; Bahram et al., 2000; Vogelstein and Kinzler, 2004). Dies führt unter anderem zu einer veränderten Zellproliferation und Zelldifferenzierung.

Tumor-Suppressor-Gene weisen sich dagegen durch eine „*loss of function*“ Mutation aus. Ein Funktionsverlust dieser Proteine, zumeist Transkriptionsfaktoren oder Zellzyklusregulatoren, hat oft schwerwiegende Auswirkungen auf den Zellzyklus sowie das Zellwachstum. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist das Protein p53 (Harris, 1996). In normalen Zellen wird p53 bei Schädigung der DNA durch Phosphorylierung aktiviert. Ziel dabei ist, die DNA-Reparatur zu ermöglichen und eine Vermehrung der mutierten Zellen zu verhindern (Giaccia and Kastan, 1998). p53 aktiviert Zielgene welche einen Zellzyklusarrest auslösen (p21) und DNA-Reparaturmechanismen aktivieren (p53R2) (Lozano and Elledge, 2000; Tanaka et al., 2000). Falls der DNA-Schaden nicht behoben werden kann, kommt es zu einer Akkumulation von p53 in der Zelle, welche zur Aktivierung von Genen der Bcl2-Familie führt, woraufhin Apoptose in den betroffenen Zellen ausgelöst wird (Gottlieb and Oren, 1998). Falls dieser Mechanismus in einer Zelle außer Kraft gesetzt wurde, kommt es zu einer Anhäufung von Mutationen, welche zur Transformation führen können.

Eine weitere wichtige Gruppe, welche häufig durch Mutationen zur Tumorentstehung beiträgt, sind die DNA-Reparatur-Gene. Wie bereits erwähnt kommt es im Genom ständig zu Mutationen, welche jedoch durch DNA-Reparatur-Proteine möglichst gering gehalten werden (Rotman and Shiloh, 1999). Der Funktionsverlust dieser Gene führt zu einer Akkumulation von Mutationen und zu einer erhöhten genomischen Instabilität. In diesen Zellen sind Kontrollmechanismen, welche einen geordneten Zellzyklus ermöglichen, außer Kraft gesetzt. Dadurch kommt es zu chromosomalen Aberrationen die letztendlich zur Aneuploidie von Tochterzellen führen und somit eine Tumorentstehung ermöglichen (Chan et al., 1999).

Zusammengefasst kommt es bei der Entwicklung zur Tumorzelle durch verschiedene Mutationsereignissen zu einer (Über-)Funktion von Proto-Onkogenen und einem Verlust von Tumorsuppressor- bzw. DNA-Reparatur-Genen, welche den Zellzyklus außer Kontrolle geraten lassen.

### 1.1.2 Gewebeinvasion und Metastasierung

Tumorzellen besitzen nicht nur einen entarteten Zellzyklus, welcher dazu führt, dass ein Primärtumor entsteht, sondern es kommt auch zu einem Abwandern aus dem Tumorzellverbund, welcher von der umgebenden extrazellulären Matrix zusammengehalten wird. Normale epitheliale Zellen können sich nicht aus diesem „Kollektiv“ lösen, abwandern, in der Blutzirkulation überleben und an anderen Orten lokalisieren und wieder beginnen zu wachsen (Liotta, 2004; Joyce and Pollard, 2009). Dies wird in Tumorzellen, neben den bereits erwähnten Mechanismen, durch Regulierung von Zell-Adhäsionsmolekülen sowie durch eine Umschichtung und/oder einen Abbau der extrazellulären Matrix bewirkt. Nachdem sich eine Tumorzelle aus dem Primärtumor gelöst hat, wandert sie durch Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) durch das sie umgebende Stroma, bis sie auf ein Lymph- oder Blutgefäß trifft, welches sie durchwandern kann. Durch diesen Eintritt in ein zirkulierendes System kann die Zelle nun an entlegene Stellen im Körper wandern. Die Tumorzellen bleiben sodann an Endothelien oder subendothelialen Basalmembranen haften und dringen dort in das umgebende Stroma ein. Tumorzellen können dort erst einmal ruhen oder kleine Metastasen (Mikrometastasen) bilden, welche meist der primären Diagnostik entgehen. Jahre später können diese Zellen das Wachstum wieder aufnehmen und makroskopische, ertastbare Metastasen bilden (Mareel et al., 2009).

### 1.1.3 *Cancer-initiating-cells* (CICs)

Derzeit existieren zwei Theorien, welche die Entstehung von Tumoren zu erklären versuchen: die klonale Selektionstheorie und die Tumorstammzelltheorie. Bei beiden Theorien wird davon ausgegangen, dass es zu Mutationen der unter 1.1.1 beschriebenen Genklassen kommt. Die klonale Selektionstheorie besagt, dass alle dabei entstandenen Tumorzellen das gleiche tumorigene Potential besitzen (Boveri, 1912). In den letzten Jahren gewinnt jedoch die Hypothese der Tumorstammzelltheorie immer mehr an Gewicht, welche besagt, dass es lediglich eine spezialisierte Subpopulation von Zellen innerhalb der großen Tumormasse gibt, welche tumorigen ist. Diese Zellen werden *Cancer-initiating-cells* (CICs), oder auch Tumorstammzellen, genannt und weisen ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen (ES Zellen) auf. Zum einen haben sie das Potential zur Selbsterneuerung, zum anderen sind sie fähig in spezialisierte Zellen zu differenzieren (Reya et al., 2001; Terskikh et al., 2006). Zudem bedienen sich ES Zellen und CICs ähnlicher Signalwege. Darunter sind zu nennen: Wnt-Signalweg, Notch-Signalweg, Sonic Hedgehog-Signalweg (Shh), BMI-1-Signalweg und der Smad-Signalweg (Reya et al., 2001; Reya and Clevers, 2005; Blank et al., 2008). Tumorstammzellen können durch bestimmte Marker auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert werden (Visvader and Lindeman, 2008). Zelloberflächenmoleküle, welche zu dieser Signatur gehören, sind z.B. CD34, CD44, EpCAM und CD133 (Atlasi et al., 2007; Dalerba et al., 2007; Prince et al., 2007; Yin et al., 2007; Visvader

and Lindeman, 2008; Gires et al., 2009b). Ein wichtiger Punkt ist, dass Tumorstammzellen eine hohe Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemo- und Radiotherapien aufweisen (Bao et al., 2006; Lu and Shervington, 2008). Somit wird davon ausgegangen, dass Tumorstammzellen eine gewöhnliche Therapie überleben und in der Lage sind eine neue Tumormasse zu bilden. In der Tat kommt es zu einer proportionalen Anreicherung von CICs in Tumormodellen in immundefizienten Mäusen nach Standardtherapie mit Chemotherapeutika (Dylla et al., 2008). Dies könnte der Grund für das Auftreten von lokoregionären Rezidiven und Metastasen sein. Die Theorie ist auf Experimente verschiedener Gruppen gestützt, welche zeigen, dass geringste Mengen dieser Tumorstammzellen genügen, um in Mäusen Tumorstammzellen auszulösen, während ein Vielfaches von CIC-Markern-negativen Zellen nicht tumorigen ist (Beier et al., 2007; Li et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Visvader and Lindeman, 2008; Rosen and Jordan, 2009). Ob Tumorstammzellen jedoch aus einer differenzierten Zelle oder einer Stammzelle hervorgehen, sowie die Frage, ob sie in vivo der Ursprung von Malignomen sind, konnte noch nicht geklärt werden (Mimeault et al., 2007; Visvader and Lindeman, 2008).

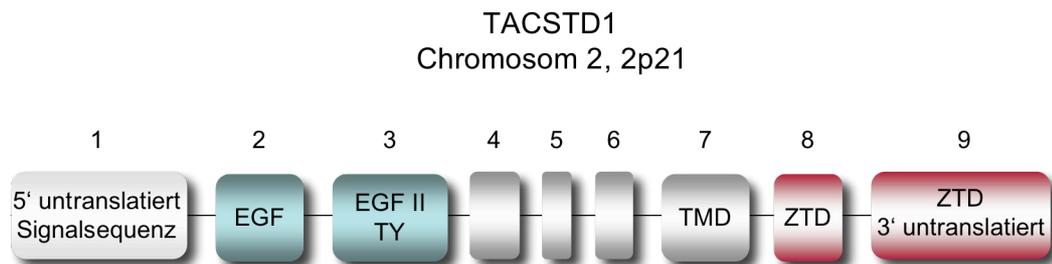
## 1.2 Tumorassoziierte Antigene

Bei einer Vielzahl von Karzinomen besteht eine starke Korrelation zwischen der Überlebensrate und dem Tumorstadium (Ausdehnung und Lage des Tumors) bei der Erstdiagnose. Die Überlebensrate sinkt mit zunehmender Größe des Tumors und mit dem Auftreten von Metastasen. Daher ist eine Früherkennung von Tumoren in einem möglichst frühen Stadium eine Grundvoraussetzung für eine Verbesserung der Prognose von Tumorpatienten. Über die letzten Jahre hinweg fokussierte sich die Krebsforschung auf die Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern und Zielmolekülen für die (Früh-) Diagnose und Therapie. Solche Marker können eine frühe, verbesserte Diagnostik ermöglichen und als Zielmoleküle für immuntherapeutische Ansätze in der Krebsbekämpfung genutzt werden. Grundidee dabei ist es, eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor zu provozieren. Ideal dafür sind sogenannte tumorspezifische Antigene, welche ausschließlich auf Tumorzellen und nicht in normalen Zellen exprimiert werden (z.B. bakterielle oder virale Proteine). Daneben findet sich eine große Gruppe der tumorassoziierten Antigene, welche Differenzierungs- oder Amplifizierungsantigene sind und in Tumoren deutlich überexprimiert werden. Um solche Marker zu isolieren und anschließend zu identifizieren, werden häufig krebsspezifische Serum-Antikörper aus dem Blut von Patienten verwendet. Die am meisten angewandten Techniken sind dabei SEREX, Proteomex und AMIDA (Rauch et al., 2004). Ein solches tumorassoziiertes Antigen, welches sowohl in Diagnostik wie auch in Antikörpertherapien verwendet wurde, ist EpCAM (Herlyn et al., 1979a; Mosolits et al., 1999).

## 1.3 EpCAM

### 1.3.1 Das EPCAM-Gen

Das EPCAM-Gen *TACSTD1* lokalisiert auf dem Chromosom 2 2p21 und ist auch unter den Synonymen CO17-14, GA177-2, EGP-2, EGP-40 und KSA bekannt (Szala et al., 1990; Alberti et al., 1994; Calabrese et al., 2001). *TACSTD1* steht für „*tumour-associated calcium-dependent signal transducer 1*“, ein Akronym, welches inkorrekt gewählt wurde, da EpCAM Kalzium-unabhängig wirkt. EpCAM gehört der GA-733-Genfamilie an, welche die beiden Typ-I-Transmembranproteine EpCAM und Trop-2 (GA-733-1) umfasst (Szala et al., 1990; Alberti et al., 1994; Baeuerle and Gires, 2007). Der gesamte Genlocus erstreckt sich über 17,69 kb. Im Promotorbereich konnte weder eine TATA- noch eine CAAT-Box nachgewiesen werden (Linnenbach et al., 1993), jedoch wurden Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren (Inr (Initiator), SP-1, Ap-1, Ap-2, Ets ESE-1 und E-pal-like (HLH)) identifiziert (McLaughlin et al., 2004). Die Transkription des EPCAM-Gens kann durch NFκB, TNFα und IFNγ negativ reguliert werden (Gires et al., 2001; Gires et al., 2003), TCF4 dagegen, ein Transkriptionsfaktor der TCF/Lef Familie, wurde als positiver Regulator identifiziert (Yamashita et al., 2007).



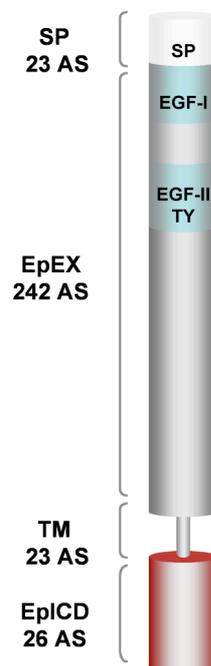
**Abbildung 1.1: Das EPCAM-Gen.** EPCAM besteht aus 9 Exons. Exon 1 kodiert für das Signalpeptid, Exon 2 bis 6 für die extrazelluläre Domäne (EpEX), Exon 7 für die Transmembrandomäne und Exon 8 und 9 für die intrazelluläre Domäne (EpICD). (EGF: EGF(*epidermal growth factor*)-ähnliche Domäne; TY: Thyroglobulin Domäne; TMD: Transmembrandomäne; ZTD: Zytoplasmatische Domäne). Abbildung adaptiert von Linnenbach (Linnenbach et al., 1993).

Das EPCAM-Gen besteht aus neun Exons wie in Abbildung 1.1 dargestellt. Das erste Exon kodiert für ein Signalpeptid, welches zum Einschleusen des Moleküls in das endoplasmatische Retikulum (ER) benötigt wird. Die fünf folgenden Exons (2-6) kodieren für den extrazellulären Teil EpCAMs. Die Exons enthalten EGF (*epidermal growth factor*) und Thyroglobulin (TY) ähnliche Domänen. Die Transmembrandomäne wird von Exon 7 kodiert, die intrazelluläre Domäne von den Exons 8 und 9. Die mRNA von EPCAM umfasst 1,5 kb, der kodierende Bereich nimmt davon 945 bp ein (Balzar et al., 1999b). Bisher konnte eine einzige pathogene Mutation des EPCAM-Gens identifiziert werden. Durch eine homozygote G→A Substitution, an der Donor-Spleißstelle von Exon 4 entsteht durch Deletion von Exon 4 eine Isoform von EpCAM, welche eine entzündliche Darmerkrankung (*Congenital tufting enteropathy* (CTE)) auslöst (Sivagnanam et al., 2008).

EpCAM ist stark konserviert, was auf eine essentielle Funktion des Moleküls hinweist (Linnenbach et al., 1993). Ein Sequenzvergleich mit EpCAM der Maus zeigt eine Homologie von 80% (Nukleotide) bis 86% (Aminosäuren) (Bergsagel et al., 1992).

### 1.3.2 Das EpCAM-Protein

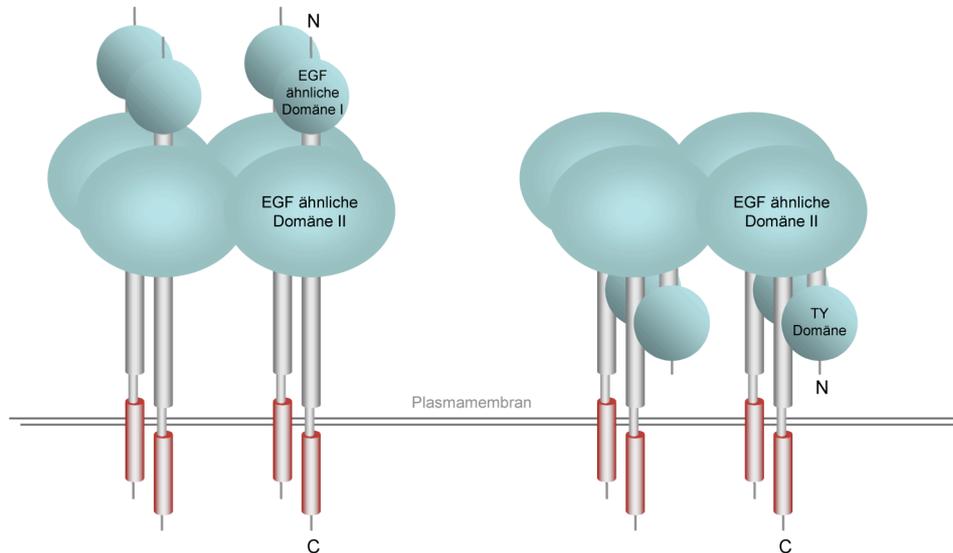
Das EpCAM-Protein umfasst 314 AS (Abb.1.2). Die ersten 23 Aminosäuren am N-Terminus bilden das Signalpeptid, welches vermutlich nach dem zielgerichteten Transport an die Plasmamembran abgespalten wird (Szala et al., 1990). Die darauffolgenden 242 Aminosäuren bilden die extrazelluläre Domäne.



**Abbildung 1.2: Struktur des EpCAM-Moleküls:** EpCAM besteht aus 314 Aminosäuren. (SP: Signalpeptid, EGF: epidermal growth factor-like repeat, EpEX: extrazelluläre Domäne, TM: Transmembran-Domäne, EplCD: zyttoplasmatische Domäne)

EpCAM gehört zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle (CAM). Es wurde beschrieben, dass durch EpCAM eine  $Ca^{2+}$  unabhängige homophile Zell-Zell-Adhäsion vermittelt wird (Balzar et al., 1999a; Balzar et al., 1999b). Ursprünglich wurde angenommen, dass ein Tetramer aus EpCAM-Molekülen mit einem weiteren Tetramer der angrenzenden Zelle interagiert (Balzar et al., 2001). Dabei sollen die beiden EGF-ähnlichen Domänen die homophile Zelladhäsion ermöglichen. Neuere Arbeiten zeigen, dass die zweite EGF-ähnliche Domäne eine Thyroglobulin (TY) Domäne ist (Baeuerle and Gires, 2007). Es ist bekannt, dass Thyroglobulin-Domänen häufig als EGF-ähnliche Domänen fehlgedeutet werden (Novinec et al., 2006). Die strukturelle Analyse vieler TY-Domänen von verschiedenen Molekülen zeigte, dass sich der N- und C-Terminus in unmittelbarer Nähe zueinander befindet. Dadurch kommt es zu einem neuen Modell für die Struktur von EpEX (Abb.1.3). Die Transmembrandomäne von EpCAM besteht aus 23 hydrophoben Aminosäuren. Daran schließt sich eine 26 Aminosäuren umfassende intrazelluläre Do-

mäne an. Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne konnten ein Internalisierungsmotiv (NPXY) und zwei Konsensussequenzen (RKKRMAK) für die Bindung des Aktin-bindenden Proteins  $\alpha$ -Aktinin identifiziert werden (Position 289-296 und 304-314) (Balzar et al., 1998).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung zweier EpCAM-Modelle.** Abgebildet sind jeweils EpCAM-Tetramere. Links ist die herkömmliche Sichtweise mit zwei EGF-Domänen zu sehen. Rechts die überarbeitete schleifenförmige Version mit den Thyroglobulin-domänen. In Anlehnung an Bauerle und Gires 2007.

EpCAM-Moleküle mit drei unterschiedlichen nominellen Molekulargewichten (34, 40 und 42 kDa) wurden in Karzinomen detektiert (Litvinov et al., 1994). Die unterschiedlichen Größen kommen durch differentielle Glykosylierung der extrazellulären Domäne zustande. EpCAM besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asparagin<sup>74</sup> (N<sup>74</sup>), N<sup>111</sup> und N<sup>198</sup>), welche alle benutzt werden. Aus Untersuchungen an Geweben des Hals-Kopf-Bereiches ist bekannt, dass EpCAM in normalem Epithel hauptsächlich schwach glykosyliert, im Tumorgewebe dagegen hyperglykosyliert vorliegt (Pauli et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung von N<sup>198</sup> eine stabilisierende Wirkung auf EpCAM hat, was die Halbwertszeit angeht (Munz et al., 2008).

### 1.3.3 EpCAM-Expressionsmuster

#### 1.3.3.1 Expression von EpCAM während der Embryogenese

Im Verlauf der Embryogenese wird EpCAM in verschiedenen Geweben wie Lunge, Leber, Nieren, Pankreas, Milchdrüsen, Haut und Keimzellen unterschiedlich stark exprimiert (Kasper et al., 1995; Stingl et al., 2001; Dan et al., 2006). Dabei ist die Expression von EpCAM bei Prozessen der Entwicklung und Morphogenese essentiell (Trzpis et al., 2007b; Trzpis et al., 2008a) und bereits im Zweizellstadium der Morulation exprimiert (Tarmann et al., 1990). In der frühen Embryonalentwicklung kommt es zu einer starken Expression von EpCAM in Leber, Lunge und Pankreas. Mit fortschreitender Differenzierung wird die Expression in Hepatozyten wieder ver-

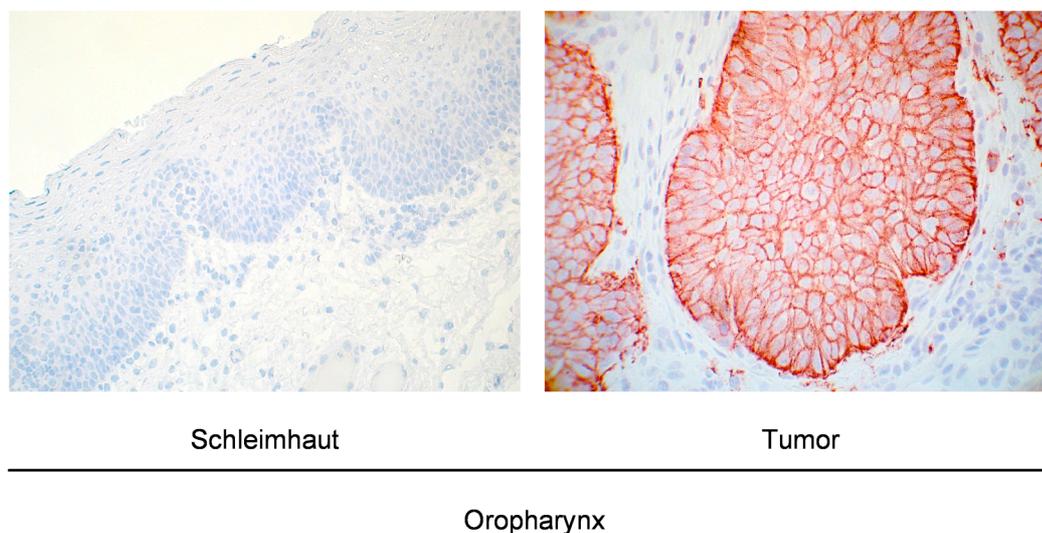
mindert, so dass differenzierte Hepatozyten kein EpCAM mehr exprimieren. Lungenepithel ist durch eine geringe und das Pankreas durch eine hohe EpCAM-Expression im adulten Menschen charakterisiert (Cirulli et al., 1995; Kasper et al., 1995; de Boer et al., 1999; Breuhahn et al., 2005; Schmelzer et al., 2007). In Keimbahnzellen ist EpCAM während der Embryogenese stark exprimiert, während dies in ausdifferenzierten Zellen nicht mehr der Fall ist (Anderson et al., 1999). Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Ratte (Anderson et al., 1999), der Maus (Gonzalez et al., 2009) und des Menschen (Ng et al., 2009) sind ebenfalls EpCAM-positiv.

### 1.3.3.2 Expression von EpCAM in nicht malignem Gewebe

In adulten Menschen wird EpCAM ausschließlich an der Basolateralmembran von Epithelzellen exprimiert. Dabei findet die Expression in allen einfachen, unstratifizierten Epithelien statt, vor allem aber im Drüsengewebe, im Pseudo-Plattenepithel und im Übergangsepithelgewebe (Moldenhauer et al., 1987; Bumol et al., 1988; Balzar et al., 1999b). In mesenchyalem, Muskel-, Neuro-, endokrinen und Plattenepithelgewebe ist keine Expression nachweisbar. Humane Zellen lymphoiden Ursprungs sind, im Gegensatz zu Lymphozyten der Maus, ebenfalls negativ für EpCAM (Borkowski et al., 1996; Nelson et al., 1996). Die Stärke der EpCAM-Expression zeigt signifikante Unterschiede, abhängig von der Lokalisation und der unterschiedlichen Zelltypen eines Gewebes. Während im Dünndarmepithel EpCAM intermediär und im Magenepithel nur schwach exprimiert wird, weist das Kolongewebe die höchste beobachtete Expression auf (Moldenhauer et al., 1987). 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., 2007a) und auch die Pankreaszellen sind EpCAM positiv (Momburg et al., 1987; Cirulli et al., 1998). Die Leber ist größtenteils EpCAM negativ und weist nur in den Gallengängen eine Expression auf (Momburg et al., 1987; de Boer et al., 1999). Des Weiteren weisen die Gallenblase, die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Hypophyse, adrenale Drüse), sowie Tracheen, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen des respiratorischen Traktes eine Expression von EpCAM auf (Moldenhauer et al., 1987; Pauli et al., 2003). In der Haut kommt es in Schweißdrüsen und der proliferativen Zone der Haarfollikel zur Expression von EpCAM, während Keratinozyten und Melanozyten wiederum kein EpCAM exprimieren (Moldenhauer et al., 1987; Tsubura et al., 1992). Gewebe des weiblichen (Ovarien, Zervix, Uterus) und männlichen Genitaltraktes (Testis, Prostata) exprimieren EpCAM ebenfalls in unterschiedlich starkem Maße (Tsubura et al., 1992; Litvinov et al., 1996).

Arbeiten von Schmelzer und Kollegen zeigten, dass EpCAM auf Leberstammzellen und Hepatoblasten exprimiert ist, nicht jedoch auf differenzierten Hepatozyten (Schmelzer et al., 2006; Schmelzer and Reid, 2008). Bei inflammatorischen Erkrankungen der Leber wird EpCAM, wie auch andere CAMs, hochreguliert (Breuhahn et al., 2005). Analysen von de Boer und Kollegen (de Boer et al., 1999) zeigten, dass nach einem Leberschaden EpCAM<sup>+</sup> Progenitorzellen das Organ repopulieren. Nachdem das Gewebe regeneriert und die Zellen zu Hepatozyten differenziert waren, konnte wiederum keine EpCAM-Expression detektiert werden. Ein ähnliches Expressionsmuster von EpCAM wurde nach einer Ischämie bei einer Regeneration der Niere in Ratten beschrieben (Trzpis et al., 2007b; Trzpis et al., 2008b).

### 1.3.3.3 EpCAM-Expression in Karzinomen



**Abbildung 1.4: EpCAM-Expression in normalem und malignem Gewebe.** Mit einem spezifischen Antikörper gegen den extrazellulären Anteil von EpCAM (HO-3), in Kombination mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex sowie AEC, wurde EpCAM immunhistochemisch angefärbt. Während im normalen Gewebe keine Expression zu sehen ist oder nur die Basalzellschicht eine schwache EpCAM-Expression aufweist, ist das Tumorgewebe stark EpCAM positiv. (Färbungen wurden von Brigitte Mack, HNO-Forschung AG Gires, LMU München durchgeführt.)

EpCAM-Expression korreliert häufig mit der Ausbildung von benignen und malignen Tumoren in Epithelien. Dabei kommt es zu einer verstärkten oder *de novo* Expression des Oberflächenmoleküls (Abb. 1.4) (Zorzos et al., 1995; Litvinov et al., 1996). Da Tumore mesodermalen und ektodermalen Ursprungs sowie neuronale Tumore, Melanome, Sarkome und Lymphome stets EpCAM-negativ sind, ist EpCAM ein streng epithelialer, prognostischer und therapeutischer Marker (Moldenhauer et al., 1987; Chaubal et al., 1999; Armstrong and Eck, 2003; Went et al., 2004; Went et al., 2006; Baeuerle and Gires, 2007).

Gerade bei Dünndarm-, Kolon-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebs konnte eine hohe EpCAM-Expression detektiert werden (Litvinov et al., 1996; Spizzo et al., 2004; Went et al., 2004; Went et al., 2005; Spizzo et al., 2006; Went et al., 2006). Untersuchungen zeigten, dass eine starke Expression von EpCAM in der Mehrheit von Karzinomentitäten mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Diese Beobachtung konnte bei Brust-, Prostata-, Kolon-, Pankreas- und Oesophaguskarzinomen, so wie Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches gemacht werden (Varga et al., 2004; Fong et al., 2006; Stoecklein et al., 2006; Went et al., 2006). Dagegen sind nur wenige Krebserkrankungen bekannt, bei denen die Expression von EpCAM mit einer guten Überlebensprognose korreliert. Dies wurde beispielsweise für Nierenkarzinome beschrieben (Seligson et al., 2004). Bei der Tumorprogression der Zervix konnte eine stetige Zunahme der EpCAM-Expression zusammen mit dem Grad der Neoplasie beobachtet werden (High et al., 1996; Litvinov et al., 1996).

Im Hinblick auf die metastasierungsfördernden Eigenschaften von EpCAM sind die Beobachtungen nicht eindeutig. Es gibt sowohl Publikationen welche zeigen, dass EpCAM auf dissemi-

nierten Karzinomzellen sowie Metastasen vermehrt exprimiert wird (Momburg et al., 1987; Chaubal et al., 1999; Kuhn et al., 2007), sowie auch gegenteilige Veröffentlichungen (Takes et al., 2001; Winter et al., 2003b). Rao und Kollegen konnten zeigen, dass die Anzahl der präsentierten EpCAM-Moleküle auf der Zelloberfläche von im Blutkreislauf zirkulierenden Karzinomzellen, etwa 10-fach erhöht ist im Vergleich zu untersuchtem Gewebe aus Primärtumor sowie Metastasen (Rao et al., 2005).

### 1.3.4 Therapeutische Verwendung

Da EpCAM in epithelialen Tumoren stark über- oder *de novo*-exprimiert wird, wurde es als Zielmolekül für verschiedene Arten von Immuntherapien häufig verwendet. Die Erforschung von aktiven wie auch passiven Immuntherapeutika umfassen monoklonale und bispezifische Antikörper (Sindelar et al., 1986; Riethmüller et al., 1994; Riethmüller et al., 1998; Braun et al., 1999; Ruf and Lindhofer, 2001; Morecki et al., 2006) Antikörper-ähnliche Moleküle gegen EpCAM (Schlereth et al., 2005; Schanzer et al., 2006; Schlereth et al., 2006), rekombinante Fusionsproteine mit TRAIL oder Fas-L Funktionen (Bremer et al., 2004; Bremer et al., 2008a; Bremer et al., 2008b), Toxine (Zimmermann et al., 1997; Zangemeister-Wittke, 2005; Winkler et al., 2009) Vakzinierungsprotokolle und anti-idiotypische Antikörper (Herlyn et al., 1986a; Herlyn et al., 1986b; Ullenhag et al., 2003; Mosolits et al., 2004). Derzeit werden mehrere klinische Studien, in welchen EpCAM als Zielmolekül verwendet wird, durchgeführt.

Der erste monoklonale, EpCAM spezifische Antikörper aus der Maus wurde als 17-1A (Edrecolomab, Panorex®) bezeichnet und führte zu einer erhöhten Überlebensrate bei Patienten mit Kolorektalkarzinomen (Riethmüller et al., 1994; Riethmüller et al., 1998; Hartung et al., 2005). Die Behandlung konnte jedoch im Rahmen einer stratifizierten Studie keinen Nutzen gegenüber einer Chemotherapie aufweisen, so dass dieses Therapeutikum im Jahr 2000 vom deutschen Markt genommen wurde. Eine abschließende Studie bestätigte die fehlende Effizienz von Edrecolomab (anti-EpCAM mAb) in einer großen, randomisierten Studie, bei der jedoch keine Stratifizierung der Patienten anhand der Stärke der EpCAM-Expression vorgenommen wurde (Fields et al., 2009). Von dem therapeutischen Zielantigen HER2 beim Mammakarzinom ist hinlänglich bekannt, dass eine Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Herceptin® von der Antigendichte auf der Zelloberfläche im Primärtumor abhängt (Cobleigh et al., 1999; Tedesco et al., 2004). Ein vollständig humaner Antikörper gegen EpCAM (Adecatumumab®, MT201) wird derzeit in klinischen Studien der Phase I und II an Brust-, Kolorektal- und Prostatakrebspatienten getestet (Oberneder et al., 2006; Baeuerle and Gires, 2007). Aufgrund der Humanisierung dieses Antikörpers verspricht man sich geringere Nebenwirkungen wie z.B. die Vermeidung einer HAMA -(*human anti mouse antibodies*) Antwort. Auch bei diesem Antikörper war die Effizienz stark mit der Expressionshöhe des Zielantigens EpCAM korreliert (Schmidt et al., 2009). Während man bei den beiden eben genannten Antikörpern auf eine Immunreaktion mittels ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) und CDC (*complement dependent cytotoxicity*) baut, soll bei bi- und trispezifischen Antikörpern die Tumorzelle zusätzlich an Immunzellen gekoppelt werden, um eine spezifische und schnelle Immunreaktion auszulösen. Der trifunktionale Antikörper Catumaxomab (Removab®) hat 2009, als erster EpCAM-spezifischer bispezifischer An-

tikörper überhaupt, die Zulassung für die intraperitoneale Behandlung von malignem Aszites, welcher häufig mit Ovarial-, Uterus- oder Pankreaskarzinomen einhergeht, bekommen. Dieser trispezifische Antikörper bindet an EpCAM auf Krebszellen, über CD3 an T-Zellen und über den Fc $\gamma$ -Rezeptor an akzessorische Immunzellen (Burges et al., 2007; Ruf et al., 2007; Kiewe and Thiel, 2008). Eine neue Klasse von therapeutischen Antikörpern, die sogenannten BiTE's („*bispecific T-cell engager*“), bestehen aus 2 Fab-Fragmenten, welche über ein Gelenkstück kovalent verbunden sind. BiTEs sind in der Lage T-Zellen über CD3 Bindung mit Tumorzellen über spezifische Antigene zu verbinden und damit eine Immunreaktion gegen die Tumorzelle auszulösen. Mit dem ersten EpCAM-spezifischen BiTE MT110 konnten bereits erste Erfolge in vitro erzielt werden (Witthauer et al., 2008; Haas et al., 2009). Derzeit wird mit MT110 eine Phase I Studie an Patienten mit Lungen- oder Gastrointestinalkrebs durchgeführt.

### 1.3.5 Die Funktion von EpCAM

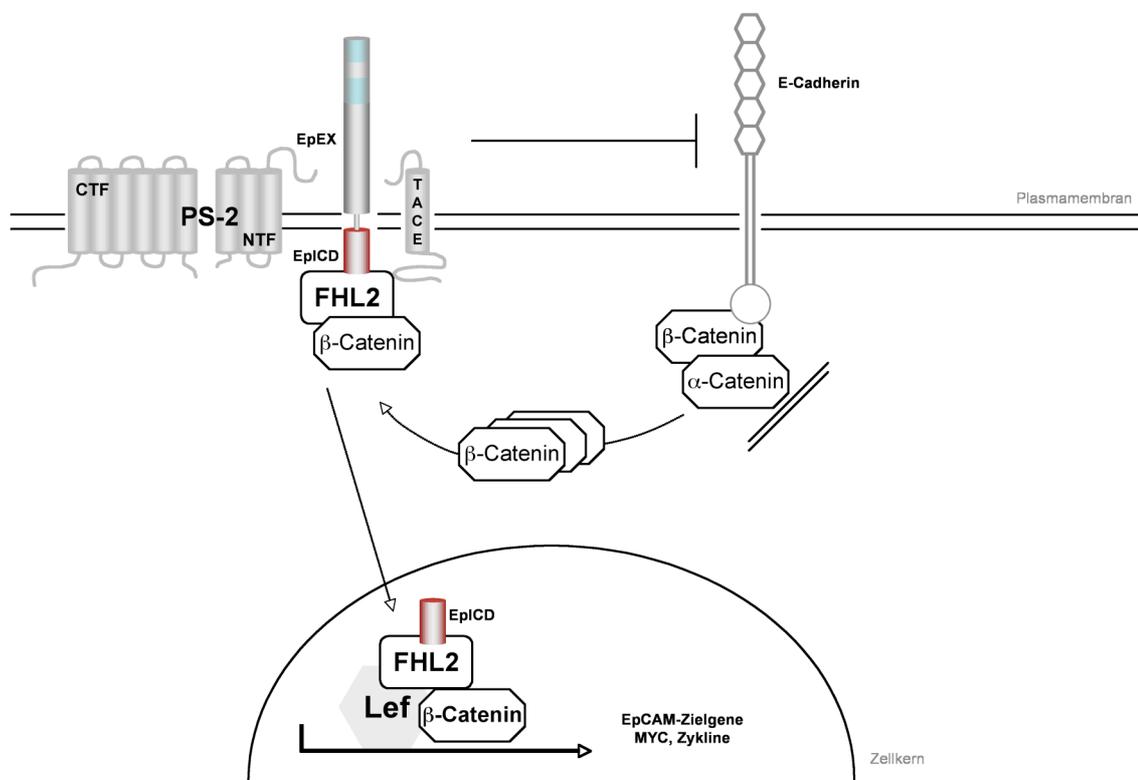
Obwohl EpCAM bereits seit 30 Jahren bekannt ist und fast solange auch als Zielantigen für Immuntherapien verwendet wurde, war über seine Funktion lange Zeit nichts bekannt. Erste Arbeiten dazu zeigten, dass EpCAM eine homophile Zell-Zell-Adhäsion vermittelt. EpCAM bindet dabei mit seiner extrazellulären Domäne andere EpEX Domänen und mit seinem intrazellulären Teil über  $\alpha$ -Aktinin an das Aktin-Zytoskelett (Balzar et al., 1998). Eine Überexpression von EpCAM führt zu einer Reduktion der Cadherin-vermittelten Adhäsion. Dadurch wird eine starke Bindung zwischen zwei Zellen (Cadherin-vermittelt) in eine schwache Bindung (EpCAM-vermittelt) umgewandelt (Litvinov et al., 1997). Die Anzahl der E-Cadherin Moleküle wird dabei jedoch nicht reduziert, vielmehr wird die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett gestört. Es kommt zu einer Anreicherung von „freiem“  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und einer Reduzierung der Proteinmenge von  $\alpha$ -Catenin. Diese Beeinflussung von Cadherin-vermittelten Bindungen durch EpCAM wird vermutlich über einen Signalweg, der die Phosphoinositol-3-Phosphat-Kinase (PI3K) involviert, reguliert (Winter et al., 2007).

EpCAM befindet sich auf der Zelloberfläche nicht ausschließlich in homophilen Interaktionen, sondern es kommt zu einer Komplexbildung bestehend aus mehreren Interaktionspartnern. Le Naour und Kollegen zeigten, dass EpCAM zusammen mit Mitgliedern des sogenannten „*tetraspanin webs*“ kolokalisiert und interagiert (Le Naour et al., 2006). Darunter sind CD9, CD44, Membranproteasen wie ADAM10 und heteromere G-Proteine zu finden. Die Tetraspanine begünstigen Zellereignisse wie Signalkaskaden, Proliferation, Migration, Adhäsion und Immunantwort (Hemler, 2001; Yunta and Lazo, 2003; Hemler, 2005). Durch weitere Interaktionspartner (D6.1A, CD9P-1, Typ-I-Phosphatidylinositol 4-Kinase) konnten diese Ergebnisse ergänzt werden (Claas et al., 2005). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass ein Komplex bestehend aus EpCAM, CD44, Claudin-7 und Tetraspaninen die Metastasierung von Kolonkarzinomen begünstigt (Kuhn et al., 2007).

2004 wurde für das Adhäsionsmolekül EpCAM erstmals gezeigt, dass es in den Zellzyklus eingreifen kann. Arbeiten von Munz und Kollegen zeigten, dass EpCAM in der Lage ist c-Myc, e-FABP und Cyclin A und E zu aktivieren und damit Proliferation zu induzieren (Munz et al., 2004; Munz et al., 2005). Dies wurde durch weitere Ergebnisse untermauert, welche zeigten, dass

eine EpCAM-Repression in Brustkrebszellen die Proliferation, Migration und Invasion negativ beeinflusst (Osta et al., 2004). In einer Genom-umfassenden Expressionsanalyse konnte ein Netzwerk von EpCAM-induzierten Zellzyklusregulatoren identifiziert werden (Maaser and Borlak, 2008). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse zum erstenmal, dass EpCAM in der Lage ist Zielgene zu aktivieren und somit Einfluss auf die Proliferation und den Metabolismus der Zelle zu nehmen. EpCAM gliedert sich damit in die Reihe einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, wie Cadherine oder Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, ein, welchen es möglich ist sowohl Adhäsion also auch Signaltransduktion zu vermitteln (Juliano, 2002; Cavallaro and Christofori, 2004).

Bei der Erforschung der EpCAM vermittelten Signalkaskade (Abb.1.5), konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen sowie proteinbiochemische Methoden eine Spaltung des Moleküls nachgewiesen werden. Experimente mit spezifischen Proteaseinhibitoren konnten diese Vermutung bestätigen und die beteiligten Proteasen wurden identifiziert. Die proteolytische Spaltung EpCAMs erfolgt sequentiell zuerst durch das Enzym TACE (Tumornekrosefaktor  $\alpha$  konvertierendes Enzym) und anschließend durch einen Presenilin2-beinhaltenden  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch regulierte Intramembranproteolyse (RIP) zur Freisetzung der Ektodomäne EpEX als löslicher Faktor und zur Abspaltung und Freisetzung der intrazellulären Domäne EpICD in das Zytoplasma kommt (Carpenter and Red Brewer, 2009; Maetzel et al., 2009).



**Abbildung 1.5: EpCAM-Signaltransduktionskaskade.** Die vermittelte Signaltransduktion von EpCAM basiert auf einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP). Die proteolytische Spaltung erfolgt durch TACE und den PS2/Sekretase Komplex. (EpEX: extrazelluläre Domäne von EpCAM, EpICD: intrazelluläre Domäne von EpCAM, PS2: Presenilin 2, TACE: tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme; FHL-2: four and a half LIM domains 2)

Zudem konnten Interaktionspartner von EpICD identifiziert werden. Neben dem FHL2 (*four and a half LIM domain*) Protein als direkter Interaktionspartner von EpCAM wurde  $\beta$ -Catenin sowie Lef-1 in einem Kernkomplex mit EpICD nachgewiesen. Unveröffentlichten Ergebnissen zufolge (persönliche Mitteilung Dr. Dierk Niessing) bindet die vierte LIM-Domäne von FHL2 an EpICD, während die zweite und dritte LIM-Domäne  $\beta$ -Catenin und Lef-1 binden (Martin et al., 2002; Labalette et al., 2004). EMSAs (*electro mobility shift assay*) und Reporter-Assays zeigten, dass dieser Komplex an TCF/Lef-spezifische DNA-Bindemotive bindet und diese aktiviert (Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009).

Die unterschiedlichen Funktionen von EpCAM in gesundem und malignem Gewebe konnten bisher nicht gänzlich geklärt werden. EpCAM liegt in Karzinomen, im Gegensatz zu gesundem Gewebe, hauptsächlich hyperglykosyliert vor (Pauli et al., 2003) und wird dadurch stabilisiert (Munz et al., 2009). Im Zusammenhang mit RIP (regulierte Intramembranproteolyse) konnte interessanterweise gezeigt werden, dass EpICD in gesundem Darmgewebe ausschließlich an der Membran oder im Zytoplasma lokalisierte, während in Kolonkarzinomgeweben EpICD im Nukleus zu finden war (Maetzel et al., 2009). Es gibt demnach offensichtliche Unterschiede in der Aktivierung von EpCAM zwischen gesundem und transformiertem Epithel. Die molekulare Basis für diese Unterschiede bedarf weiterer Erforschung.

### 1.3.6 EpCAM und Stammzellen

Pluripotenz und Selbsterneuerung sind die Haupteigenschaften einer Stammzelle (Reya et al., 2001; Liu et al., 2007). Verschiedene Schlüsselmoleküle und Signalwege, wie der Wnt-Signalweg (Reya et al., 2003; Reya and Clevers, 2005; Clevers, 2006), LIF/STAT3 und c-Myc (Matsuda et al., 1999; Cartwright et al., 2005) oder Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4, Nanog, Klf4, Sox2 (Tada, 2006; Pan and Thomson, 2007; Wernig et al., 2007), sind in die Aufrechterhaltung dieses Phänotyps involviert. Interessanterweise verwendet der EpCAM-Signalweg Komponenten aus dem Wnt-Signalweg ( $\beta$ -Catenin, TCF/Lef-DNA-Bindung), kann c-Myc aktivieren und damit die Zellproliferation antreiben (Munz et al., 2004; Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009). Wie bereits in Kapitel 1.3.3.1 beschrieben spielt EpCAM während der Embryogenese eine Rolle und ist häufig in Progenitorzellen hochreguliert, jedoch in terminal differenzierten Zellen nicht mehr exprimiert. EpCAM ist zudem auf embryonalen Stammzellen exprimiert (Brandenberger et al., 2004; Lian et al., 2007; Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2009). In ES-Zellen der Maus konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Differenzierung EpCAM, zusammen mit Stammzellmarkern wie Oct3/4, cMyc oder SSEA-1, herunterreguliert wird und die Proliferation abnimmt. Der gleiche Phänotyp konnte erzielt werden, indem EpCAM durch siRNA reprimiert wurde. Dieser Induktion eines differenzierten Phänotyps konnte durch EpCAM-Überexpression entgegengewirkt werden (Gonzalez et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden für humane ES-Zellen beschrieben (Ng et al., 2009).

Wie in Kapitel 1.1.3. beschrieben, geraten sogenannte Tumorstammzellen, welchen ebenso Fähigkeiten wie Pluripotenz und Selbsterneuerung zugeschrieben werden, immer mehr ins Zentrum des Interesses. Neuere Forschungsarbeiten zeigten, dass EpCAM auf diesen CICs (*cancer initiating cells*) in verschiedenen Entitäten wie Brust-, Pankreas- und Kolonkarzinomen

stark exprimiert ist (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Dies ist vor allem in Zusammenhang mit den Ergebnissen, welche EpCAM eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps zuschreiben, interessant, da sie eine Funktion von EpCAM beim Phänotyp von CICs suggerieren (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2009). Trotz allem kann nicht davon ausgegangen werden, dass EpCAM ein entscheidender Marker für CICs ist, da EpCAM auf fast jeder Karzinomzelle exprimiert ist. CICs weisen sich jedoch durch eine erhöhte EpCAM-Expression im Vergleich zur breiten Tumormasse aus (Dalerba et al., 2007). Darüberhinaus kann EpCAM zur Aufrechterhaltung des Phänotyps beitragen, indem es Proliferation vermittelt, spezifische Gene und Signalwege reguliert und eine Unabhängigkeit von der Verankerung an die extrazelluläre Matrix vermitteln kann (Munz et al., 2004; Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009).

## 1.4 Zielsetzung

EpCAM wurde seit seiner Entdeckung eine große klinische Relevanz zugesprochen. Das tumorassoziierte Antigen wurde als diagnostischer Marker eingesetzt und es wurden immuntherapeutische Ansätze mit EpCAM als Zielmolekül entwickelt. Die ersten Ergebnisse, welche das Protein EpCAM als solches beschrieben, waren rein deskriptiv und zeigten, dass EpCAM in der homophilen Zell-Zell-Adhäsion eine Rolle spielt. Erst in den letzten Jahren wurden funktionelle Daten erhoben, welche zeigten, dass EpCAM in der Lage ist Zielgene zu aktivieren und Proliferation sowie Migration/Invasion zu vermitteln. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass EpCAM durch eine regulierte Intramembranproteolyse prozessiert und damit in seine Untereinheiten aufgespalten wird. Der intrazelluläre Teil bindet an FHL2 und bildet zusammen mit  $\beta$ -Catenin und Lef1 einen Komplex im Zellkern, welcher an TCF/Lef-DNA-Bindestellen bindet und diese aktiviert.

Das übergeordnete Ziel dieser Promotionsarbeit war es den Signaltransduktionsweg genauer zu verstehen und neue Zielgene von EpCAM zu identifizieren. Zunächst sollte EpICD in seiner Funktion näher untersucht werden. Durch die Etablierung von Überexpressionsystemen sollte dieser Fragestellung nachgegangen werden. Dazu war die Entwicklung eines konstitutiven wie auch eines induzierbaren Systems für EpICD vorgesehen. Des Weiteren war die Repression von EpCAM mittels spezifischer siRNA mit anschließender Kotransfektion von EpICD geplant. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines cDNA-Arrays neue Zielgene von EpCAM zu identifizieren und zu validieren. Weitere experimentelle Vorgehensweisen sollten aus den erlangten Erkenntnissen abgeleitet werden.

## 2 □ MATERIAL

### 2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 2.1 Verwendete Kits und Chemikalien

Artikel	Firma
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics Stuttgart
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Aminoethylcarbazol	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Ammoniumbicarbonat	Sigma, Taufkirchen
Annexin-V-FLUOS	Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma, Taufkirchen
Avidin-Biotin-PO Komplex (Vectorstain)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
DEPC	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Dimethylpimelimidat	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Roth New England Biolabs, Schwalbach
DNA Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
ECL Blotting Substrate	Pierce, Bonn
Ethanolamin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
FACS Flow	Becton Dickensen, Heidelberg
Formamid (deionsiert)	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Glyzerol	Sigma, Taufkirchen
High Pure Nucleo Spin Extract II	Macherey & Nagel, Düren

High Pure Plasmid Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Hoechst 33342 (H1399)	Molecular Probes, Karlsruhe
4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Taufkirchen
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Bedford (USA)
Matrigel	BD Pharmingen, Heidelberg
Mayer's Hämalalaun Lösung	Merck, Darmstadt
MG-132 (Proteasominhibitor)	Calbiochem, San Diego (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
NE-PER (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents)	Pierce, Bonn
Nukleotide (dNTP's)	MBI Fermentas, St.Leon-Roth
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pfx-Polymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Roth
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteasominhibitor MG-132	Calbiochem, San Diego (USA)
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Roth New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
RNAse A	MBI Fermentas, St.Leon-Roth
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
siRNAs	Eurogentec, Liège (Belgien)
Taq-Polymerase, PCR Reagenzien	MBI Fermentas, St.Leon-Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Biosciences, Freiburg
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	IBA, Göttingen
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin

Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween	Serva, Heidelberg

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2 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)
FACS-Röhrchen	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire
Immobilon-P Membran (0,45 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Immobilon-P <sup>SQ</sup> Membran (0,2 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Kanülen	BD, Heidelberg
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Migrationskammern (Chemotaxis µ-Slide)	Ibidi, Martinsried
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Menasha (USA)
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym, Wien (Österreich)
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
	Nunc, Wiesbaden
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Inserts (8,0 µm)	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße 1,5 ml (Nucleasefrei)	Costar, New York (USA)
Zentrifugensäulen (Mobicols)	MoBiTec, Göttingen

## 2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3 Verwendete Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Agarose-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 EI <sub>x</sub> 800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Filmentwicklungsmaschine	Optimax, Laborgeräte, Heidelberg
Filmentwicklungskammer	Amersham, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren Schott	Roth, Karlsruhe
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus, München
Konfokales Laserscan-Mikroskop (KLSM)	Leika, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroliter-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	AEG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Halbergmoos
pH-Meter	WTW, Weilheim
RoboCycler Gradient 96	Stratagene, La Jolla (USA)
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Vortex Mixer	IKA Works, Inc., Wirmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen	Sorvall, Bad Homburg
-------------	----------------------

## 2.1.4 Dienstleistungen

Tabelle 2.4 In Anspruch genommene Dienstleistungen

Dienstleistung	Dienstleister
Antikörperherstellung	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg
DNA-Sequenzierung	Sequiserie, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
Peptidsynthese	Metabion, Martinsried
siRNA Synthese	Eurogentec, Liège (Belgien)
Microarray Hybridisierung	Indivicon Diagnostics, Ochtrup

## 2.2 Puffer und Stammlösungen

Die bei der Arbeit mit Bakterien und Nukleinsäuren verwendeten Lösungen und Medien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Aufbewahrung der Lösungen bei Raumtemperatur (RT).

### Agarosegelelektrophorese

#### **DNA:**

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

#### **RNA:**

Agarose-Gel:	1% Agarose, 10% 10x MOPS, 4,4% Formaldehyd in dH <sub>2</sub> O
Laufpuffer (pH 7,0):	0,2 M MOPS, 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, in DEPC dH <sub>2</sub> O
Ladepuffer:	50% Formamid, 15% Formaldehyd, 10% 10x MOPS-Puffer, 1% Bromphenolblau, 15% dH <sub>2</sub> O

### Western Blot

Lysispuffer:	PBS pH 7,4; 0,5 oder 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2 Tabletten / 50 ml)
--------------	--

#### **SDS-Polyacrylamidgel:**

Sammelgel (4%):	30% Acrylamid; 2 M Tris pH 6,8; 0,5 M EDTA
-----------------	--

Trenngel (10-17%): 30% Acrylamid; 2 M Tris pH 8,9, 0,5 M EDTA  
 10x Laufpuffer: 250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS

### **Tris-Tricin-Gel:**

Sammelgel (4%): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH 8,45; 0,3% SDS  
 Spacer Gel (10%): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH 8,45; 0,3% SDS  
 Trenngel (17%): 30% Acrylamid; 3 M Tris pH 8,45; 0,3% SDS; 5,4 g Harnstoff  
 10x Kathoden-Puffer: 0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS  
 10x Anoden-Puffer: 0,2 M Tris pH 8,9 (mit 6 N HCl einstellen)

Ladepuffer (Lämmli): 140 mM Tris-HCl pH 7,0; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau  
 10x Blotting-Puffer: 250 mM Tris, 1,26 M Glycin  
 Waschpuffer (PBST): PBS mit 0,2 % Tween  
 Blockpuffer: 5% w/v Magermilchpulver in Waschpuffer  
 Primärantikörper-Puffer: 3% w/v BSA in Waschpuffer

### **Herstellung kompetenter Bakterien**

TFBI-Puffer: 100 mM KCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM KAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin; pH 5,8 (stets frisch)  
 TFBII-Puffer: 10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin; pH 7,0 (bei 4°C aufbewahren)

### **Bakterienkultivierung**

LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,2  
 Agar-Platten: 1,5% Agar in 1 l LB-Medium  
 Antibiotikakonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml  
 Kanamycin 30 µg/ml

### **Zellkultur**

Einfriermedium: 10% v/v DMSO, 40% FKS, 50% DMEM

### **FACS-Analyse**

FACS-Puffer: PBS mit 5% FKS (Maniatis et al., 1989)  
 Fixierungslösung: 30% PBS, 70% EtOH  
 PI-Färbelösung: 10 µg/ml RNase A (DNase frei), 1 µg/ml Propidiumiodid

## 2.3 Antikörper

Tabelle 2.5 Verwendete Primärantikörper

Antikörper (Kat.Nr.)	Bezugsquelle
A20 (sc23788), Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ -Aktin (sc-1616), Ziege polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ - $\beta$ -Catenin (610153), Maus monoklonal	BD, Heidelberg
$\alpha$ -eFABP (sc-16060), Ziege polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ -EplCD (1144), Kaninchen monoklonal	Epitomics, Burlingame (USA)
$\alpha$ -EplCD (1775-1, 1775-2), Meerschweinchen polyklonal	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg
$\alpha$ -EpCAM (HO-3), Maus monoklonal	TrionPharma, München
$\alpha$ -ER $\alpha$ (F-10), Maus monoklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ -FHL2 (HM2136), Maus monoklonal	Cell Science, Canton (USA)
$\alpha$ -GFP (sc9996), Maus monoklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ -HA 3F10 (1867423), Ratte monoklonal	Roche, Mannheim
$\alpha$ -MMP7 (AB19135), Kaninchen polyklonal	Chemicon (Millipore) Billerica (USA)
$\alpha$ -Myc (9E10; sc-40), Maus monoklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
$\alpha$ -Ki67 (M7240), Maus monoklonal	Dako, Glostrup (Dänemark)
Annexin-V-FITC	Roche, Mannheim
Avidin-Biotin-PO Komplex (Vectorstain)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
ABC-PO-Elite-Kit (PK 6100)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Alexa 488 Ziege- $\alpha$ -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- $\alpha$ -Kaninchen (111-035-003)	Dianova, Hamburg
HRP Kaninchen- $\alpha$ -Ziege (P0449)	Dako, Glostrup (Dänemark)
HRP Kaninchen- $\alpha$ -Ratte (P0450)	Dako, Glostrup (Dänemark)
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG biotinyliert (BA-1000)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Pferd- $\alpha$ -Maus IgG FITC-konjugiert (115-095-003)	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)
Kaninchen- $\alpha$ -Ratte IgG biotinyliert (BA-9400)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

## 2.4 Oligonukleotide

### 2.4.1 Primer

Tabelle 2.6 Verwendete Primer

Nr.	Sequenz5'-3'	Gen	Verwendung
1a	TCTCCACACATCAGCACAACACTACG	c-Myc	RT-PCR
1b	TCCCGCAACAAGTCCTCTTCAG	c-Myc	RT-PCR
2a	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA	GAPDH	RT-PCR
2b	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG	GAPDH	RT-PCR
3a	ACTGTCATTTGCTCAAAGCTGGCTGCC	EpEX	RT-PCR
3b	CAGTTGTTCCCATTTACTGTCAGGTC	EpEX	RT-PCR
4a	ATGGCAAAGTATGAGAAGGCTGAG	EpICD	RT-PCR
4b	TGCATTGAGTCCCTATGCATCTC	EpICD	RT-PCR
4c	AGCGTAATCTGGAACATCGTATGG	EpICD-HA	RT-PCR
4d	GGTAGGATCATACTCGGAATAGAG	EpICD-ER <sup>T</sup>	RT-PCR
5a	GAGTGCCAGATGTTGCAGAA	MMP7	RT-PCR
5b	GTGAGCATCTCCTCCGAGAC	MMP7	RT-PCR
6a	AACAATTGTCTCTGGACGGC	MMP7	RT-PCR
6b	TTCTGCAACATCTGGCACTC	MMP7	RT-PCR
7a	TGCTCACTTCGATGAGGATG	MMP7	RT-PCR
7b	ATGGAGTGGAGGAACAGTGC	MMP7	RT-PCR
8a	GGAATATTAAGCCCAGGAGT	Wnt5a	RT-PCR
8b	AGTGGCACAGTTTCTTCTGT	Wnt5a	RT-PCR
9a	GTATGCCACGGTTTCTTCGT	Spondin1	RT-PCR
9b	GCAGTAGCCCTCTGACTTGG	Spondin1	RT-PCR
10a	TTGCCTGAGGCTGTAAGTGA	SPARC	RT-PCR
10b	GGGAGGGTGAAGAAAAGGAG	SPARC	RT-PCR
11a	TGTGAAGGTGATCAAGGCTG	Wnt9a	RT-PCR
11b	TGCTCTCGCAGTTCTTCTCA	Wnt9a	RT-PCR
12a	AGTACCCGCTGCAATAATGG	DKK2	RT-PCR
12b	GAAATGACGAGCACAGCAAA	DKK2	RT-PCR
13a	ACACCTGACATGAACCGTGA	MMP12	RT-PCR
13b	AGCAGAGAGGCGAAATGTGT	MMP12	RT-PCR
14a	AGGTATGGCAGAGGTGCAAG	WISP2	RT-PCR
14b	AAACTCCAGAAAAGGCAGCA	WISP2	RT-PCR

15a	TGGAGCCCAGAAAAAGAAGA	SFRP5	RT-PCR
15b	GCAGGGGTAGGAGAACATGA	SFRP5	RT-PCR
16a	ACGGAAGCATTGTTGTCCAAC	PCDH10	RT-PCR
16b	CTCTCCCTTCACGCAGTTTC	PCDH10	RT-PCR
17a	GTTTGTGACCGTCCTCCACT	MMP24	RT-PCR
17b	AGGAACTCCTGCTGGAGACA	MMP24	RT-PCR
18a	ATGCCTTCTTCCCAAGACT	MMP11	RT-PCR
18b	TCACCGTCGTACCCCAGTA	MMP11	RT-PCR
19a	ATAGCCATCACCCACTCTGG	MYST3	RT-PCR
19b	GTGCTATTCGCCAGGATTA	MYST3	RT-PCR
20a	AGTGAAATTGGACACAGCCC	ErbB4	RT-PCR
20b	GTTGGCAAAGGTGTTGAGGT	ErbB4	RT-PCR
21a	TCTTAACCCAGACCAGAGA	NANOS1	RT-PCR
21b	ATACTCTCCTGCCCTCAAGA	NANOS1	RT-PCR
22a	GTACATGCTTCGGTCAGGGT	Fibronectin1	RT-PCR
22b	ATACCACACCAGGCTTCAGG	Fibronectin1	RT-PCR
23a	AATTCGGTTTGAATTTCCC	DACT3	RT-PCR
23b	CCATCTTCCTTCCCCTCTC	DACT3	RT-PCR
24a	GCCTTGAGTGGTAGCCATA	Wnt2b	RT-PCR
24b	GCGACCACAGCGTTATTAT	Wnt2b	RT-PCR
25a	AGGAGCTAAGGGACAACCTCCA	APC2	RT-PCR
25b	TCCAGCAGCTCCTTGTCAT	APC2	RT-PCR
26a	TGGCTGCTGTAGAGGATGTG	$\alpha$ -Catenin 2	RT-PCR
26b	TGCAAGGTCTTGCTCATTG	$\alpha$ -Catenin 2	RT-PCR
27a	TGAGAATTCGCCGCCACCATGTCCAGAAAGAAGA-GAA	EpICD-ER <sup>T</sup>	Klonierung in pCAG
27b	ACTGCTAGCTCAGACTGTGGCAGGGAAACC	EpICD-ER <sup>T</sup>	Klonierung in pCAG
28a	AAAGGTACCGCCGCCACCATGTCTGCTGGAGACATGAGA	ER <sup>T</sup>	Klonierung
28b	AAACTCGAGTCAGACTGTGGCAGGGA-AACCCTCTGCCTC	ER <sup>T</sup>	Klonierung
29a	GAGCTAGCACCACCATGTCCAGAAAGAAGAGAA	EpICD-ER <sup>T</sup>	Klonierung (EpICD in pEGFP-C1)
29b	TCCCCCTCTAGATCCTGCATTGAGTTCCTATG	EpICD-ER <sup>T</sup>	Klonierung (EpICD in pEGFP-C1)

## 2.4.2 siRNA

Tabelle 2.7 Verwendete siRNAs

Sequenz 5'-3'	Verwendung (Bezugsquelle)
UGCCAGUGUACUUCAGUUG dTdT	EpCAM (Eurogentec)
CAACUGAAGUACACUGGCA dTdT	EpCAM (Eurogentec)
UCGUCCGUAUCAUUUCAAU dTdT	Kontrolle (Eurogentec)
AUUGAAAUGAUACGGACGA dTdT	Kontrolle (Eurogentec)

## 2.5 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die durch mehrere Klonierungsschritte unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken generiert wurden (Maniatis et al., 1989). Alle Konstrukte wurden unter Zuhilfenahme des Klonierungsvektors pDRIVE generiert. Einige der verwendeten Plasmide waren in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die Herkunft der Plasmide ist in der Spalte „Referenz“ angegeben.

Tabelle 2.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycinresistenz	Dr. T. Schröder
141pCAG::EpCAM	EpCAM in 141pCAG-3SIP	in unserem Labor kloniert
141pCAG::EpICD	EpICD in 141pCAG-3SIP	vorliegende Arbeit
141pCAG::EpICD-HA	EpICD-HA in 141pCAG-3SIP	vorliegende Arbeit
141pCAG::EpICD-ER <sup>T</sup>	EpICD-ER <sup>T</sup> in 141pCAG-3SIP	vorliegende Arbeit
141pCAG::-ER <sup>T</sup>	ER <sup>T</sup> in 141pCAG-3SIP	vorliegende Arbeit
141pCAG::-hmyc-hER <sup>T</sup>	hmyc-hER <sup>T</sup> in 141pCAG-3SIP	Prof. G. Bornkamm
pEYFP-N1	CMV, EYFP, SV40, Kanamycin/Neomycin, HSV TK	Clontech (CA, USA)
pEYFP-N1::EpCAM	EpCAM in pEYFP-N1 (N-terminal)	in unserem Labor kloniert
pEYFP-N1::EpICD	EpICD in pEYFP-N1 (N-terminal)	in unserem Labor kloniert
pDRIVE	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/ Kanamycinresistenz	Oiagen (Hilden)

## 2.6 Bakterien

### *E. coli* DH5 $\alpha$ (Hanahan, 1983):

F<sup>-</sup>, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44, 1<sup>-</sup>, thi-1, gryA96, relA1. Der verwendete Stamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

### *E. coli* DH10B:

F<sup>-</sup>, endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL,  $\Delta$ lacX74,  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, araD139,  $\Delta$ (ara, leu)7697, mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\lambda$ <sup>-</sup>. Der Ausgangsbakterienstamm wurde von der Firma Invitrogen („MAX Efficiency DH10B“) bezogen.

## 2.7 Zelllinien

**Tabelle 2.9** Verwendete Zelllinien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet bzw. etabliert (mit \* gekennzeichnet)

Zelllinie	Herkunft	Referenz
HEK-293	Humane embryonale Niere	(Graham et al., 1977)
HEK-293:: $\Delta$	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG
HEK-293::EpCAM	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG::EpCAM
HEK-293::EpICD *	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG::EpICD
HEK-293::EpICD-HA *	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG::EpICD-HA
HEK-293::IC-ER <sup>T</sup> *	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG:: IC-ER <sup>T</sup>
HEK-293::ER <sup>T</sup> *	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pCAG:: ER <sup>T</sup>
HEK-293::N1	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pEYFP-N1
HEK-293::6.1	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pEYFP-N1::EpCAM
HEK-293::15a	Humane embryonale Niere	transfiziert mit Vektor pEYFP-N1::EpICD
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC HTB-43
HCT-8	Kolon-Karzinom	ATCC CCL-244
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC CCL-2
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom	ATCC-HTB-22

ATCC: American Tissue Culture Collection

## 2.8 Tiermodell

Für Xenotransplantationsexperimente wurden 6 Wochen alte SCID (*severe combined immunodeficient*) Mäuse verwendet. Die ausschließlich männlichen Tiere wurden im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums (Direktor: Prof. Ulrich Pohl) gehalten.

## 3 □ METHODEN

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Beim Umgang mit Nukleinsäuren wurden allgemein gängige Techniken angewandt, wie 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. Die Protokolle erfolgten in Anlehnung an Standardprotokolle (Maniatis et al., 1989) oder nach Angaben der Hersteller entsprechender Kits.

#### 3.1.1 Agarose Gelelektrophorese

Die Fragmente von DNA und RNA wurden je nach Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration (1-2%) und Zusammensetzung aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer). Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und betrug etwa 3 V/cm. Zur Visualisierung der aufgetrennten Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) versetzt.

#### 3.1.2 Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Alle RT-PCR-Reaktionen wurden in zwei Schritten durchgeführt, d.h. die reverse Transkription und die nachfolgende PCR fanden in separaten Reaktionen statt. Die RNA wurde stets mit DNase behandelt und mittels spezifischer PCR gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) auf das Vorhandensein von kontaminierender, genomischer DNA überprüft.

Die Reverse Transkriptase schreibt einsträngige RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) um. Dies erfolgte mit Hilfe des Reverse Transkription Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers. Für jede Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Daraufhin erfolgte die Amplifikation der cDNA mittels spezifischer Primer. Diese semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte wie in untenstehendem Reaktionsansatz (Tab. 3.1) und Protokoll (Tab. 3.2) angegeben. Die Temperaturprofile der PCR richteten sich nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Für problematische PCR-Produkte wurde die optimale Schmelztemperatur mittels Temperaturgradienten im Robocycler ermittelt. Die Analyse des Amplifikationsansatzes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 3.1 PCR Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen
10x Taq Puffer mit KCl	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTP (2 mM)	2 µl
Primer sense (1-100 µM)	1 µl
Primer antisense (1-100 µM)	1 µl
Taq Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA/RNA	1-5 µl
Mit H <sub>2</sub> O auf 20 µl Endvolumen auffüllen	

Tabelle 3.2 PCR-Protokoll

Temperatur	Zeit	Zyklen	Reaktion
95°C	5 min	1	Denaturierung
95°C	30s	23-40	Denaturierung
54-64°C	30s		Annealing
72°C	30s		Elongation
72°C	10 min	1	Elongation
4°C	∞	1	Kühlung

## 3.2 Bakterienkultur

### 3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung

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

### 3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB angeimpft. Am nächsten Tag wurden 200 ml LB mit der Vorkultur beimpft. Sobald die OD der Kultur 0,3 - 0,6 erreicht hatte, wurde die Zellsuspension auf Eis heruntergekühlt und durch aufeinanderfolgende Inkubation in den Puffern TfbI und TfbII auf Eis (Hanahan, 1983) kompetent gemacht. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation der chemisch kompetenten Bakterien mit DNA, wurde je ein 100 µl Aliquot der Zellen und ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. ca. 1 ng Plasmid-DNA verwendet. Die kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und im Anschluss die DNA hinzupipettiert. Daraufhin erfolgte eine 30 minütige Inkubation des Ansatzes auf Eis. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 45 - 90 s ausgesetzt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB Medium konnte der Ansatz bei 37°C unter leichtem Schütteln 30 - 45 min anwachsen. Die so angezüchtete Zellsuspension wurde auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 Zellkulturbedingungen: Kultivierung und Aufbewahrung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Standardmedium für alle adhären Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin), verwendet. Zur Generierung und Kultivierung stabiler Transfektanten wurde diesem Medium der geeignete Selektionsmarker (Puromycin 1 µg/ml; G418 1,25 mg/ml) hinzugefügt. Adhären Zellen wurden alle 2-3 Tage zur Subkultivierung zunächst mit PBS serumfrei gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA von der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde sodann 1:10 mit frischem Medium verdünnt bzw. für weitere Versuche in gewünschter Dichte ausplattiert. Alle nötigen Zentrifugationsschritte z.B. zum Waschen der Zellen wurden bei 280g für 5 min durchgeführt.

Zur Aufbewahrung der Zelllinien wurden jeweils 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein 1,8 ml Kryogefäß überführt und in einem verschließbaren Styroporbehälter oder Gefäß mit Isopropanol in einem -80°C Gefriergerät langsam eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagertank überführt.

Zur Reaktivierung eingefrorener Zellen wurde der Inhalt eines Kryogefäßes durch Resuspension mit frischem Kulturmedium zügig aufgetaut. Die Zellen wurden einmal abzentrifugiert und anschließend zur Kultivierung mit frischem Medium verdünnt in eine Kulturflasche gegeben.

### 3.3.2 Verwendung des Proteasominhibitors MG-132

Um den schnellen Abbau von zytoplasmatischem EpICD zu verhindern, wurde der Proteasominhibitor MG-132 verwendet. Der Inhibitor wurde mit Medium auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt und die Zellen für 5 h damit behandelt.

### 3.3.3 Induktion der Kerntranslokation mit 4-OHT

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Plasmid (pCAG141::IC-ER<sup>T</sup>) war es möglich die Lokalisation von EpICD in der Zelle zu bestimmen. Nachdem der Vektor in Zellen transfiziert wurde, konnte das exprimierte Konstrukt (EpICD-ER<sup>T</sup>) mit 4-OHT angeregt werden in den Kern zu translozieren. Dazu war eine Konzentration von 100 nM nötig. Je nach Versuch wurde die Induktion über verschiedene Zeiträume durchgeführt.

### 3.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen 1:1 mit einer 0,2%-igen Trypanblaulösung gemischt. Nur tote Zellen nehmen den blauen Farbstoff auf, während lebende Zellen farblos bleiben. Anschließend wurde die gesamte oder n-fache Zellzahl berechnet.

### 3.3.5 Generierung von Zelllysaten

Um Gesamtzelllysate für Western Blot oder Immunopräzipitation zu gewinnen, wurden adhären-ten Zellen erst mit PBS gewaschen, mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 280 g für 5 min. Das so entstandene Zellpellet wurde erst mit PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde je nach Versuch entweder 10 min bei Raumtemperatur (RT) oder 30 min auf Eis (Nachweis von EpICD) inkubiert. Mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 16000 g konnte die unlösliche Fraktion entfernt werden.

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

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten erfolgte mittels BCA-Test (BCA Protein Assay Reagent Kit) nach Angaben des Herstellers.

## 3.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA oder siRNA erfolgte unter Verwendung des MATRa-A Reagenz (IBA). Zu diesem Zweck wurden Zellen bis zu einer Dichte von 70-80 % unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Transfektion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Generierung von stabilen Transfektanten wurde den Zellen nach der Transfektion 12 h später ein Medium mit Selektionsmarker zugesetzt.

## 3.5 FACS-Analyse

### 3.5.1 Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Membranproteinen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Dazu wurden die Zellen trypsiniert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in einer 1:50 Verdünnung des entsprechenden Primärantikörpers in FACS-Puffer für 10-15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden  $\alpha$ -IgG-FITC-markierten Sekundärantikörper ebenfalls 1:50 in FACS-Puffer verdünnt für 10-15 min. Zur Kontrolle der Spezifität der Sekundärantikörperbindung wurde die Hälfte der Zellen nur mit diesem behandelt. Zuletzt wurden die Zellen erneut gewaschen und je nach Zellmenge in 300-500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen wurden 2  $\mu$ l Propidiumiodid (PI) (0,5 mg/ml in PBS) zu der Suspension gegeben.

Im FACS wurde die Oberflächenexpression des entsprechenden Moleküls gemessen (10.000-100.000 Zellen/Ansatz) und mittels CellQuest (FACS-Analyseprogramm) quantifiziert. Um die Expression verschiedener Versuchsansätze untereinander zu vergleichen, wurden die von CellQuest angegebenen Mittelwerte der Fluoreszenz in Bezug zueinander gesetzt, nachdem eine Normalisierung durch die Zweitantikörperkontrolle erfolgte. Die PI positiven Zellen wurden bei dieser Auswertung ausgeschlossen.

### 3.5.2 Propidiumiodid-(PI) FACS-Analyse

Die PI FACS-Analyse wurde durchgeführt um den Anteil an apoptotischen Zellen in einer Probe zu bestimmen. Dafür wurden die trypsinierten Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und 1 h in Fixierungslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation 5 min bei 280 g) wurden die Zellen anschließend in PI-Färbelösung inkubiert (30 min, bei 20°C, im Dunklen). Die Menge an Propidiumiodid pro Einzelzelle wurde im Durchflusszytomter gemessen (20.000 Zellen/Ansatz). Die Auswertung erfolgte ebenfalls über CellQuest.

## 3.6 Migrationsassays

### 3.6.1 Boydenkammer

Um die Migration von Zellen zu bestimmen wurden Zellkultur-Einsätze (Falcon) mit einer Porengröße von 8,0  $\mu$ m verwendet. Diese wurden in 12 oder 24 Loch-Platten eingesetzt. In die so entstandene untere Kammer wurde normales Zellkulturmedium (10% FCS) gegeben. In den Einsatz wurden  $2,5 \times 10^5$  bzw.  $2,5 \times 10^4$  Zellen, welche in Hungermedium (kein FKS) resuspendiert wurden, pipettiert (alle Volumina richteten sich nach den Angaben des Herstellers). Die Zellen wurden zusätzlich über Nacht gehungert, um einen besseren Effekt zu erzielen. Der Ansatz wurde 5 h im Brutschrank inkubiert und anschließend einer Färbeprozedur unterzogen. Dazu wurden die Membranen zuerst 3-5 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die

Zellen 2 min in Methanol fixiert und wiederum mit PBS gewaschen. Die nun fixierten Zellen wurden 20 Minuten in Trypanblau gefärbt und anschließend die überschüssige Farbe mit H<sub>2</sub>O weggespült. Die Membranen wurden mit einem Skalpell aus ihrer Halterung herausgeschnitten und auf einem Objektträger in Kaisers Glyzerine eingedeckelt. Die so entstandenen Präparate konnten dann unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

### 3.6.2 Migration-Slide (Ibidi)

Eine weitere Technik, welche angewandt wurde, um die Migration von Zellen zu bestimmen, war der  $\mu$ -Slide von der Firma Ibidi (Abb. 3.1). Mit dieser Technik ist es möglich Zellen auf einer definierten Fläche über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dazu werden Zellen in eine 1 mm breite, 70  $\mu$ m hohe Kammer („observation area“) eingebracht. An diese schließen sich zwei Reservoirs an welche mit verschiedenen Flüssigkeiten (Abb. 3.1: rot und blau) befüllt werden können. Um das Migrationsverhalten von Tumorzellen zu untersuchen wurden die Reservoirs zunächst beide mit Hungermedium gefüllt. Anschließend wurde in einem der Reservoirs ein Gradient mit Vollmedium aufgebaut (die Volumina richteten sich nach den Angaben des Herstellers). Die Zellen wurden am Abend vor dem Versuch, unter Hungerbedingungen, in die Kammer eingebracht und hatten damit Zeit auf dem Slide anzuwachsen. Sobald alle Kammern befüllt waren, wurde der Slide auf ein Mikroskop mit einer Lebendzellkammer (Temperatur und CO<sub>2</sub>- Versorgung wie im Inkubator) gestellt und alle 10 Minuten fotografiert. Der Versuch wurde über 60 Stunden dokumentiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte zunächst mit Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und anschließend mit einer Firmen-eigenen Software (<https://ibidi.com>, „Chemotaxis Tool“).

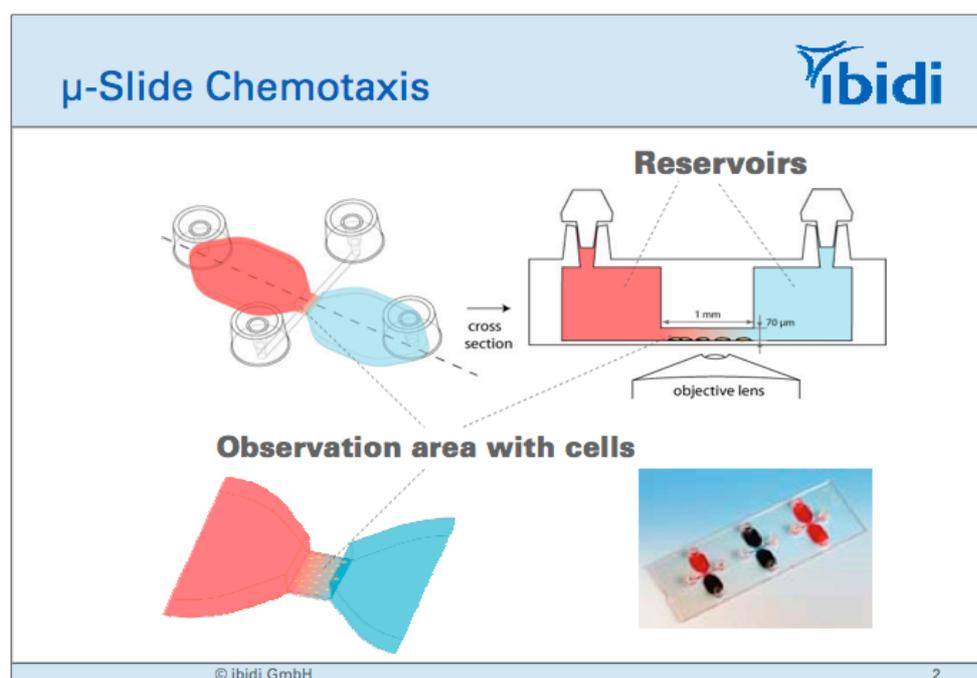


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des  $\mu$ -Slides von Ibidi. Rot: Flüssigkeit A (hier: DMEM mit FKS Gradient 10% - 3,3%) Blau: Flüssigkeit B (hier: DMEM ohne FKS)

## 3.7 Western Blot

### 3.7.1 SDS-Polyacrylamidgele

Um die Expression von Proteinen in Zellen nachzuweisen wurden Western Blots durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate (25-50 µg Gesamtproteinmenge) mit reduzierendem Ladepuffer (Lämmli) versetzt (Endverdünnung 1:5), bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht und anschließend in 10-15 %-igen SDS Polyacrylamidgelen unter definierten Laufbedingungen (Fokussierung: 15 min bei 15 mA/Gel, 180 V; Auftrennung: 30 mA/Gel, 180 V) aufgetrennt. Als Standard diente der „BenchMark“ Proteingrößenstandard (Invitrogen). Anschließend wurden die Proteine auf eine durch Methanol aktivierte Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (100 V, max. 500 mA, 50 min). Die Membran wurde anschließend in Methanol geschwenkt, um die Proteine zu fixieren und den Hintergrund zu vermindern, und getrocknet. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Blockpuffer, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermindern. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (1:250 - 1:10000 in Primärantikörperpuffer, 1 h) und entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:5000 in Blockpuffer, 30 min - 1,5 h). Die Detektion der Peroxidase-reaktion erfolgte wahlweise mit dem Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) oder dem ECL Blotting Substrate (Pierce). Die Umsetzung dieses Substrates durch die Peroxidase erzeugt eine Lichtreaktion welche auf lichtempfindlichen Filmen visualisiert wurde. Die semi-quantitative Auswertung der Bandenintensitäten (abzüglich der Hintergrundintensität) erfolgte mit der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### 3.7.2 Tris-Tricin-Gele

Zum Nachweis sehr kleiner Proteine (EpicD) wurde ein Tris-Tricin-Gel verwendet. Dieses Polyacrylamidgel weist eine bessere Auftrennung sowie eine gesteigerte Sensitivität in diesem Proteingrößenbereich auf. Mit den Proben wurden wie unter 3.7.1. beschrieben verfahren, allerdings wurde das Gel unter Kühlung laufen gelassen. Der Transfer der Proteine auf eine Membran weicht ebenfalls etwas vom Standardprotokoll ab. Hierbei wurden zwei Membranen hintereinander verwendet (Immobilon P (Porengröße 0,45 µm) und dahinter Immobilon P<sup>SQ</sup> (Porengröße 0,2 µm)) für den Fall, dass kleine Proteine durch die 0,45 µm Poren transferiert werden. Es wurde 4 h bei 100 V unter gekühlten Bedingungen geblottet und der Blottingpuffer wurde nach 2 h einmal gewechselt. Anschließend erfolgte alles wie unter 3.7.1 beschrieben.

## 3.8 Immunopräzipitation

Um ein bestimmtes Protein für einen Western Blot anzureichern wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper (ca. 1 µg auf 100 µg Gesamtprotein) rotierend inkubiert. Die Tritonkonzentration sollte bei dieser Inkubation 0,25%-ig sein. Am nächsten Tag wurde Protein-G-Sepharose (30 µl) zu dem Ansatz gegeben und weitere 3 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach anschließen-

der Zentrifugation (500 g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und die Sepharose mit Lade-  
puffer (20-25 µl) versetzt. Die Proben wurden aufgekocht und auf ein Polyacrylamidgel geladen.  
Die Detektion der Immunpräzipitate erfolgte sodann mittels Western Blot.

### 3.9 Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray

Der cDNA Array wurde von der Firma Invivicon Diagnostics durchgeführt. Es wurde zuerst die  
Qualität der RNA im Bioanalyzer überprüft. Dann wurden aus den eingeschickten Proben Son-  
den hergestellt und auf Agilent Whole Human Genome 4x44 K Microarrays hybridisiert, wobei  
43377 Gene und Transkripte untersucht wurden. Die Auslesung und Auswertung der Arrays  
wurde ebenfalls von der Firma übernommen. Die von der Firma übermittelten Rohdaten wurden  
zunächst nach dem Regulationsfaktor (EpCAM siRNA/Kontroll siRNA) sortiert. Der Schwellen-  
wert für eine signifikante Regulation eines Gens wurde auf den Faktor (fold change) +/- 2 fest-  
gelegt. Dadurch ergab sich eine Reduktion auf 1685 signifikant regulierte Gene. Die weitere  
Klassifizierung der Gene erfolgte mit der Software PANTHER  
(<https://panther.appliedbiosystems.com>). Die Analyse erfolgte zunächst mit dem Unterpro-  
gramm „Gene Expression Tools/Analyze a list of genes with expression values“. Hier erfolgte  
dann die Klassifizierung nach „Signalweg“ oder „biologischer Prozess“.

### 3.10 Xenotransplantation in SCID-Mäuse

Für die Xenotransplantation wurden HEK293-Transfektanten (pEYFP-N1, pEYFP-N1::EpCAM ,  
pEYFP-N1::EplCD) in SCID-Mäuse injiziert. Die Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und jeweils  
 $6 \times 10^6$  Zellen in 100 µl DMEM aufgenommen. Zur besseren Lokalisation im Tier wurde die Zell-  
suspension mit 100 µl Matrigel (BD Pharmingen) vermischt und anschließend den Tieren sub-  
kutan in die linke Flanke injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Gas getötet. Die  
Tumore wurden entnommen und das Tumorgewicht mit einer Präzisionswaage bestimmt. An-  
schließend wurden die Tumore in TissueTek eingebettet, im Gefriermikrotom in 4 µm dünne  
Schnitte geschnitten und mit spezifischen Antikörpern gefärbt.

### 3.11 Immunhistochemie

Gewebeproben von Karzinomen und gesundem Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff  
schockgefroren und bei -25°C gelagert. Anschließend wurden die Gewebe am Gefriermikrotom  
zu 4 µm dicke Schnitte verarbeitet und auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen. Nachdem  
die Gefrierschnitte getrocknet waren, wurden sie mit Azeton fixiert und bis zur Verwendung bei -  
25°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde eine Nachfixierung mit Azeton durchgeführt und die  
Schnitte anschließend in PBS 10 min rehydriert.

Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde eine 0,3%-ige Wasserstoffperoxidlösung (in  
PBS) verwendet. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden  
die Schnitte mit Normalserum (1:100; Serum des Tieres in dem der Zweitantikörper produziert

wurde) für 30 min 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 (Endkonzentration 0,1%) wurden die Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Brückenantikörper und dem Avidin-Biotin-PO-Komplex bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit AEC visualisiert und die Zellkerne mit Mayers Hämatoxin gegengefärbt

Im Falle von Fluoreszenz-Einzelfärbungen wurde ein Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper verwendet, bei Doppelfärbungen ein weiterer spezifischer Primärantikörper, ein biotinylierter Brückenantikörper und ein Fluorochrom-Streptavidin-Sekundärantikörper. Die Kerne wurden mittels DAPI (Hoechst 33342) angefärbt.

Die Färbeintensität der einzelnen Proben wurde von zwei Experimentatoren unabhängig voneinander bestimmt.

### **3.12 Immunocytochemie**

Immunocytochemische Färbungen wurden an adhärenenten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu auf Superfrost plus Objektträger in Quadriperm Kulturschalen ausplattiert und für 24 h kultiviert. Nach Entfernen des Mediums und mehreren Waschschritten in HBS-Puffer wurden die Proben in 3,5%-igem Paraformaldehyd für 10 min inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Proben mit -20°C kaltem Methanol für 20 s behandelt und danach erneut gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte nach Brock et al (Brock et al., 1999) fixiert und dann wie unter 3.11. beschrieben behandelt. Die Auswertung erfolgte im konfokalen oder Durchlicht-Mikroskop. Die Einstellungen des konfokalen Mikroskops orientierten sich immer an Kontrollzellen, welche negativ für das zu untersuchende Epitop waren.

## 4 □ ERGEBNISSE

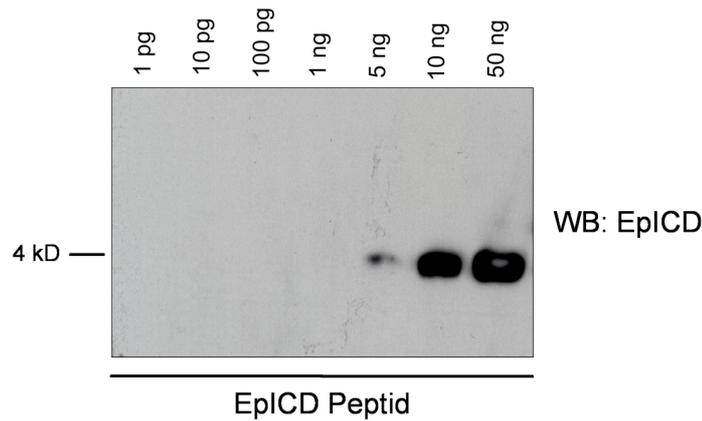
Wie einleitend bereits ausführlich beschrieben ist EpCAM seit nunmehr 30 Jahren als tumor-assoziiertes Antigen bekannt. Seine Funktion wurde zunächst als Adhäsionsmolekül beschrieben. Erst in den letzten 5 Jahren konnte durch Arbeiten unseres Labors gezeigt werden, dass EpCAM neben den adhäsiven Fähigkeiten an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt ist. Erste Arbeiten von Munz et. al 2004 zeigten, dass EpCAM in der Lage ist Zielgene zu aktivieren und damit Veränderungen des Phänotyps (z.B. Proliferation) einer Zelle zu bewirken. In späteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Prinzip der EpCAM übermittelten Signaltransduktion auf einer Spaltung des Moleküls in den extrazellulären (EpEX) und in den intrazellulären Teil (EpICD) beruht. Vorliegende Arbeit widmete sich hauptsächlich den funktionellen Untersuchungen der intrazellulären Domäne. Dies schließt den Nachweis sowie die Funktion EpCAMs bei der Signaltransduktion ein. Zudem wurde eine cDNA-Array-Analyse in Auftrag gegeben, um neue Zielgene von EpCAM zu identifizieren.

### 4.1 Nachweis von EpICD

Der intrazelluläre Teil von EpCAM besteht aus nur 26 Aminosäuren woraus ein nominelles Molekulargewicht von ca. 3 kD resultiert. Dieses besonders kleine Protein ist nur schwer über proteinbiochemische Methoden wie Western Blot nachzuweisen. Die Existenz und Spaltung von EpICD konnte aber durch diverse Immunfärbungen, sowie in Experimenten mit Fusionskonstrukten bereits bewiesen werden (Maetzel et al., 2009). Im Folgenden wurde ein proteinbiochemischer Nachweis der EpICD-Expression angestrebt.

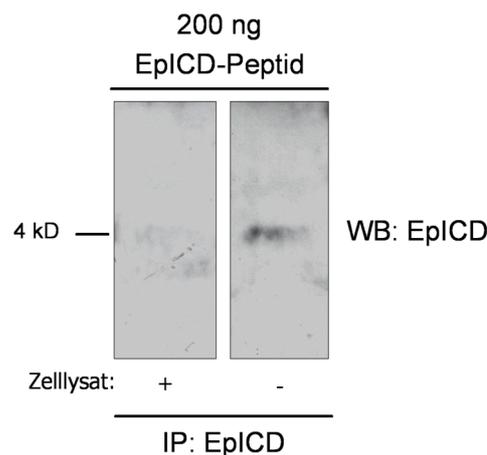
#### 4.1.1 Versuche mit kommerziellen Antikörpern

Da ein Peptid der Größe von EpICD nur schwer in einem normalen SDS-Gel nachzuweisen ist, wurde hierfür ein 17,5%-iges Tris-Tricin-Gel verwendet, welches sowohl eine bessere Auftrennung als auch eine sensitivere Detektion in diesem Proteinbereich ermöglicht. Um das Laufverhalten von EpICD besser untersuchen zu können, wurde ein synthetisches Peptid (Metabion) hergestellt. Damit sollte zunächst die Nachweisgrenze von EpICD bestimmt werden (Abb. 4.1). Es wurden Konzentrationen von 1 pg bis 50 ng auf ein Gel geladen und anschließend mit dem EpICD spezifischen Antikörper 1144 (Epitomics) detektiert. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, lag die Detektionsgrenze von EpICD mit diesem Antikörper und synthetischen Peptiden bei 5 ng. Das apparente Molekulargewicht des synthetischen Peptids lag bei ca. 4 kD.



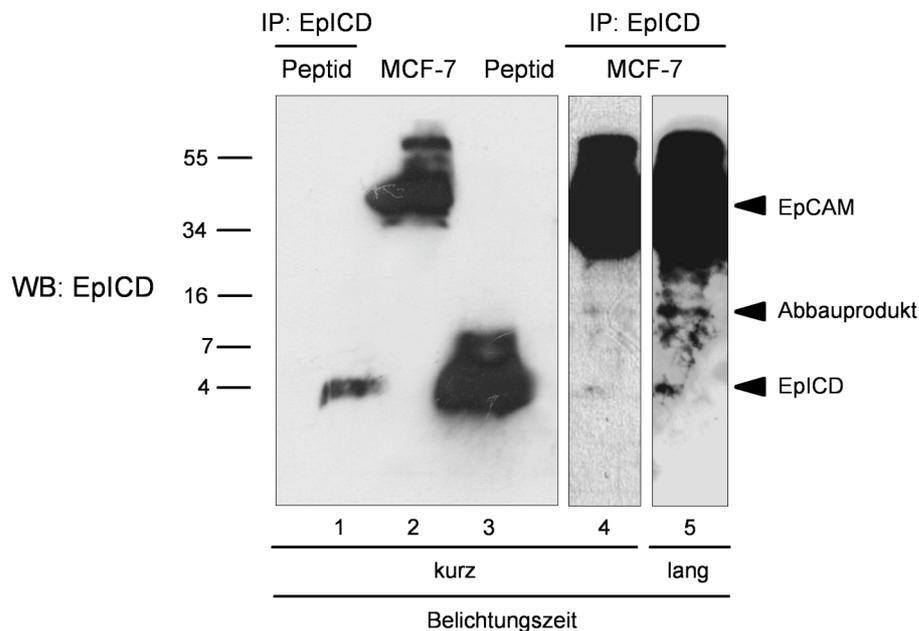
**Abbildung 4.1: Nachweisgrenze von EpICD Peptiden.** Verschiedene Mengen des synthetischen EpICD-Peptids wurden auf einem 17,5%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot mit einem EpICD spezifischen Antikörper (1144) in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL nachgewiesen. Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis aus drei Experimenten.

Verschiedene Vorversuche zeigten, dass EpICD im Zelllysate unter Standardbedingungen auf einem Tris-Tricin-Gel nicht detektiert werden konnte. Die geringe Größe von EpICD gab Anlass zu der Vermutung, dass das Peptid *in vivo* sehr instabil ist. Deshalb sollte der Einfluss von zellulären Komponenten auf die Stabilität von EpICD untersucht werden. Dazu wurde mit je 200 ng synthetischem EpICD-Peptid eine Immunopräzipitation durchgeführt, wobei das Peptid einmal mit Zelllysate und einmal mit Lysepuffer inkubiert wurde. Wie das Ergebnis in Abbildung 4.2 zeigt, sind Komponenten des Zelllysates in der Lage den intrazellulären Teil von EpCAM zu degradieren. Dies führte wiederum zu der Vermutung, dass es zu einer raschen und effizienten Degradation durch das Proteasom kommt.



**Abbildung 4.2: Auswirkung von Tumorzelllysate auf die Stabilität von EpICD.** Synthetisch hergestelltes EpICD Peptid (200 ng) wurde mit und ohne Zugabe von MCF-7-Zelllysate (Negativkontrolle = Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren) immunopräzipitiert. Es erfolgte eine Auftrennung auf einem 17,5%-igen Tris-Tricin-Gel und eine anschließende Detektion des präzipitierten EpICD mit einem spezifischen Antikörper (1144) in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Detektion von EpICD erforderte also große Mengen an lysierten Zellen, da anzunehmen war, dass ein Großteil des Peptids entweder *in vivo* oder während der Durchführung des Experimentes abgebaut wird. Deshalb wurde eine Immunopräzipitation aus Zelllysate durchgeführt, um die Menge an EpICD anzureichern. Um die Sensitivität zu steigern wurde durch verschiedene Optimierungen das herkömmliche Protokoll modifiziert. So wurde von nun an 4 Stunden bei 4°C geblottet anstatt 50 Minuten bei Raumtemperatur. Trotz aller Verbesserungen und dem Versuch, das Peptid so gut wie möglich anzureichern, konnte nur in einem einzigen Experiment eine Bande bei 4 kD sowie eine Spaltprodukt von EpCAM auf einem Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Hierzu wurde EpICD aus 200 µg eines MCF-7-Zelllysates mit dem EpICD spezifischen Antikörper 1144 präzipitiert und auf einem Tris-Tricin-Gel mit dem gleichen Antikörper nachgewiesen.

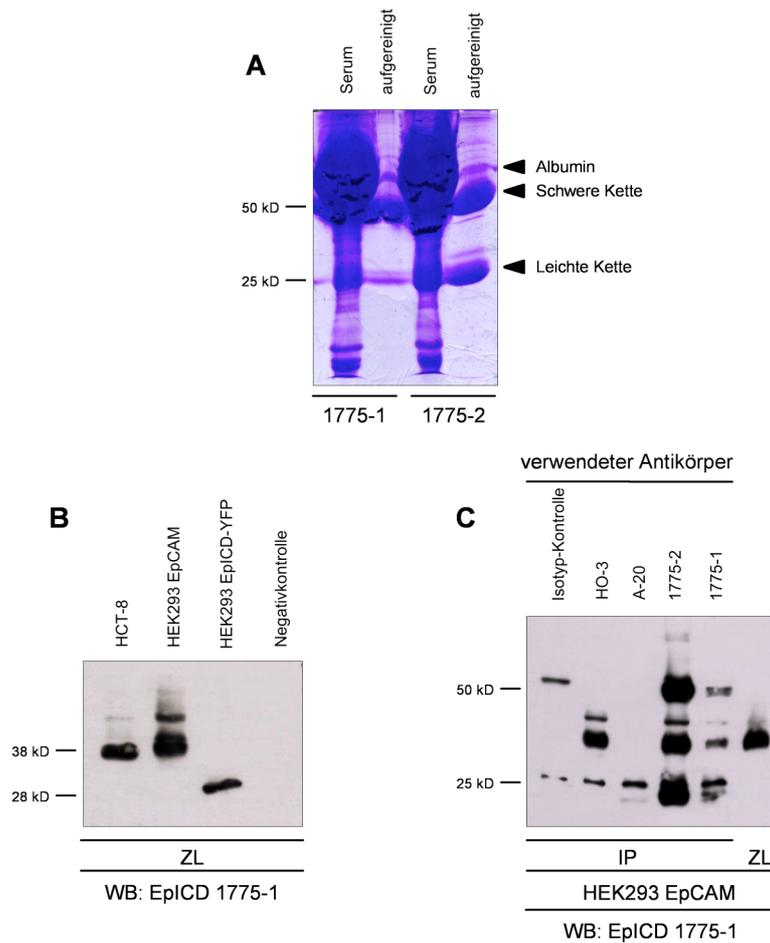


**Abbildung 4.3: Versuch des Nachweises von endogenem EpICD in einem MCF-7-Zelllysate.** Eine Immunopräzipitation mit dem EpICD spezifischen Antikörper 1144 (Epitomics) wurde aus 200 µg MCF-7-Zelllysate durchgeführt (Spur 4 und 5). Als Positivkontrolle wurde 200 ng synthetisches EpICD Peptid unter gleichen Bedingungen immunopräzipitiert (Spur 1). Zusätzlich wurden 70 µg MCF-7-Zelllysate (Spur 2) und 100 ng synthetisches EpICD (Spur 3) geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem Tris-Tricin-Gel. EpICD wurde mit dem gleichen spezifischen Antikörper (1144, Epitomics) in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL im Western Blot nachgewiesen.

#### 4.1.2 Generierung von polyklonalen EpICD-spezifischen Antikörpern

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde, konnte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern der intrazelluläre Teil von EpCAM auf einem Western Blot nur unzureichend und nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Deshalb betrauten wir die Firma PSL (Peptide Specialty Laboratories) mit der Aufgabe einen EpICD spezifischen Antikörper in Meerschweinchen zu generieren. EpICD wurde synthetisch hergestellt und, an KHL (*Keyhole-Limpet-Hemocyanin*) gekoppelt, in

komplettem Freundschens Adjuvans emulgiert. Damit wurden 2 Tiere immunisiert. Wir erhielten das Serum beider Meerschweinchen (1775-1 und 1775-2), welches sodann über eine Peptidgekoppelte Matrix-Säule aufgereinigt wurde. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde der saubere Antikörper daraufhin zusammen mit komplettem Serum auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie visualisiert. Wie in Abbildung 4.4 A zu sehen ist, sind nach der Aufreinigung hauptsächlich die schweren und leichten Ketten des Antikörpers zu sehen, während Albumin und weitere Bestandteile von Serum nahezu vollständig entfernt wurden.



**Abbildung 4.4: Neu generierter EpICD Antikörper 1775. (A)** Aufreinigung des EpICD-Antikörpers aus Meerschweinchenserum. Komplettes Serum sowie der aufgereinigte EpICD-Antikörper (je 6µg Gesamtprotein) wurden auf ein SDS Gel geladen und Proteine mit einer Coomassie-Färbung visualisiert. 1775-1: Meerschweinchen 1; 1775-2: Meerschweinchen 2. **(B)** Spezifität des Antikörpers 1775 im Western Blot. Zelllysate (ZL) verschiedener EpCAM bzw. EpICD exprimierender Zelllinien (HCT-8, HEK293 EpCAM, HEK 293 EpICD-YFP) wurden auf einem SDS Gel aufgetrennt und mit dem EpICD spezifischen Antikörper 1775-1 in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL in einem Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten EpCAM-negative HEK293 Zellen. Es wurde je 50 µg Gesamtprotein geladen. **(C)** Effektivität verschiedener EpICD Antikörper in der Immunopräzipitation (IP). Verschiedene EpCAM (HO-3) bzw. EpICD (A-20, 1775-1, 1775-2) spezifische Antikörper wurden verwendet, um EpCAM in Zelllysaten von HEK293 EpCAM Zellen (100 µg) zu präzipitieren. Die Isotypkontrolle bezog sich auf die beiden Meerschweinchen-Antikörper. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde ein Western Blot mit dem EpICD spezifischen Antikörper 1775-1 in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL durchgeführt. Als Positivkontrolle für den Western Blot diente HEK293 EpCAM Zelllysate (ZL = 50 µg). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es wurden nun verschiedene Experimente durchgeführt, um die Qualität des Antikörpers zu überprüfen. Zunächst sollte die Spezifität im Western Blot getestet werden. Es wurden Gesamtzelllysate aus verschiedenen Zelllinien (HCT-8, HEK293 EpCAM, HEK 293 EpICD-YFP, HEK 293 (= Negativkontrolle)) auf ein SDS-Gel geladen und mit dem spezifischen EpICD-Antikörper 1775-1 detektiert (Abb. 4.4 B). Der Antikörper konnte in den EpCAM exprimierenden Zelllinien (HCT-8, HEK293 EpCAM) eine spezifische Bande, auf der Höhe von 38 kD nachweisen, sowie eine etwas größere Bande, welche die glykosylierte Form von EpCAM darstellt. Das HEK293 EpICD-YFP Zellysat zeigte die Spezifität des Antikörpers für den intrazellulären Teil von EpCAM an, da auch hier eine klare, spezifische Bande auf erwarteter Höhe (28 kD) zusehen war. In Wildtyp HEK293-Zellen (Spur ganz rechts), welche als Negativkontrolle dienten, konnte erwartungsgemäß kein EpCAM/EpICD detektiert werden. Somit konnte im Western Blot die Funktionalität wie auch die Spezifität des neu generierten Antikörpers nachgewiesen werden. (Hier ist exemplarisch die Austestung des 1775-1 Antikörpers gezeigt. Der 1775-2 Antikörper wurde in gleicher Weise getestet und zeigte vergleichbare Ergebnisse.)

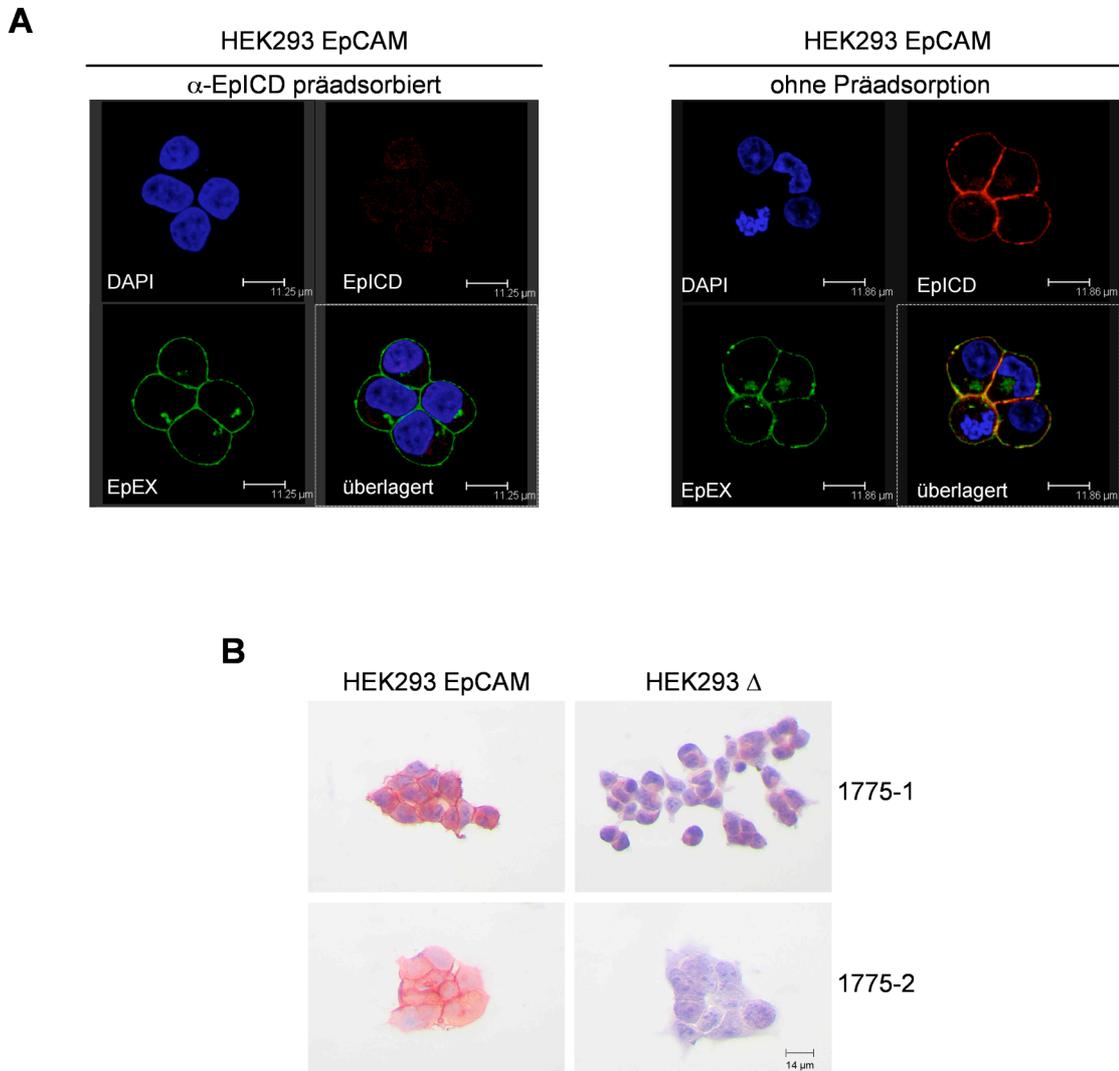
Da der Antikörper auch für Immunopräzipitationen verwendet werden sollte, wurde auch diese Anwendung ausgetestet. Für die Präzipitation wurde Zellysat aus HEK293 EpCAM Zellen in Kombination mit verschiedenen EpCAM (HO-3) oder EpICD (1775-1, 1775-2, A20) spezifischen Antikörpern verwendet. Hier zeigten die Antikörper, trotz Einsatz gleicher Mengen (1 µg), enorme Unterschiede in ihrer Fähigkeit EpCAM zu präzipitieren (Abb. 4.4 C). Während der kommerziell erhältliche Antikörper A20 (Santa Cruz) gar kein EpCAM präzipitieren konnte, zeigte sich bei dem neu generierten Antikörper 1775-1 eine Bande. Der Antikörper 1775-2 aus dem anderen Meerschweinchen, konnte EpCAM noch besser aus dem Lysat präzipitieren, und zwar in gleichem Maße wie der HO-3 Antikörper, welcher an den extrazellulären Teil von EpCAM bindet.

Somit wurde in folgendem für Immunopräzipitationen mit dem Antikörper 1775-2 gearbeitet, während zur Detektion im Western Blot der 1775-1 Antikörper verwendet wurde, da die Austestung beider Antikörper hier beinahe identische Ergebnisse lieferte.

Neben der Austestung der Antikörper auf SDS-Gelen wurde auch die Funktionalität in immunzytochemischen Färbungen untersucht. Hierzu wurde zuerst die Spezifität des Antikörpers in FaDu Hypopharynxkarzinomzellen getestet. Dazu wurde der Antikörper (1775-2) vor der Zellfärbung mit synthetischem EpICD Peptid präinkubiert. So behandelt wurde er dann für eine Immunfluoreszenzfärbung benutzt. Wie in Abbildung 4.5 A links zu sehen ist, kann der Antikörper nach Präadsorption an das antigene EpICD-Peptid auf FaDu-Zellen kein endogenes EpICD mehr detektieren, da er bereits mit dem synthetischem Peptid abgesättigt war. Als Kontrolle wurde die Zelle mit HO-3 Antikörper (gegen die extrazelluläre Domäne) gegengefärbt, was in einer klaren membranständigen Färbung (grün) resultierte. Abbildung 4.5 A rechts zeigt die gleiche Färbung ohne vorherige Präadsorption. Hier konnte sowohl EpICD (rot) wie auch EpEX (grün) detektiert werden.

Zur weiteren Austestung der Antikörper bei Färbungen, wurden HEK293 EpCAM bzw. delta (als Negativkontrolle) mit 1775-1 und 1775-2 Antikörper gefärbt (Abb. 4.5 B). Dabei zeigte sich, dass die Antikörper in den EpCAM exprimierenden Zellen sowohl randständiges wie auch zy-

toplasmatisches und nukleäres EpICD anfärbten. Die Kontrollzellen wiesen bei der Färbung mit 1775-2 im Gegensatz zu 1775-1 keine Hintergrundfärbung auf. Deshalb wurde der EpICD spezifische Antikörper 1775-2 für immunzytochemische Färbungen verwendet.

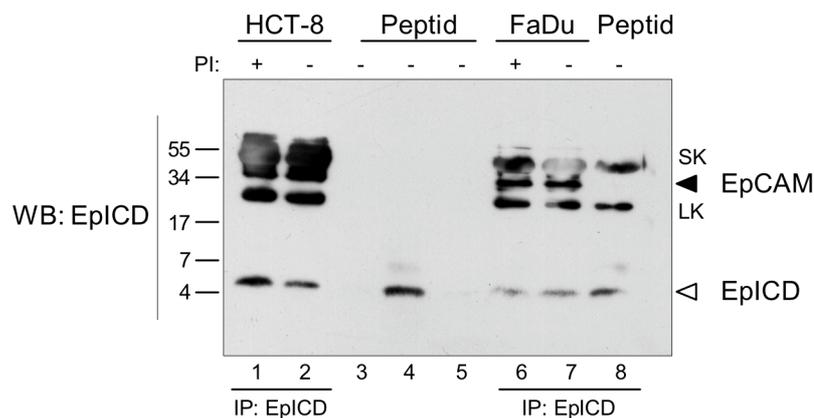


**Abbildung 4.5: Der EpICD spezifische Antikörper 1775 in der Immunzytochemie. (A)** Der EpICD spezifische Antikörper 1775-2 wurde mit synthetischem EpICD Peptid präadsorbiert (links) oder nicht (rechts) und in Kombination mit einem spezifischen, biotinylierten Zweitantikörper sowie einem Straptavidin-Alexa-647-Konjugat für die Detektion von EpICD in FaDu-Zellen verwendet (rot). Zudem wurde der Antikörper HO-3 in Verbindung mit einem Alexa-488 konjugierten Zweitantikörper für die Detektion der extrazellulären Domäne (EpEX) als Positivkontrolle verwendet (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **(B)** Spezifität des Antikörpers 1775 in immunzytochemischen Färbungen. HEK293 EpCAM als Positivkontrolle und HEK293 Δ als Negativkontrolle wurden mit dem EpICD spezifischen Antikörper (rot) gefärbt. Die Detektion erfolgte über einen spezifischen, biotinylierten Zweitantikörper in Kombination mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex sowie AEC. Die Kerne wurden mit Mayers Hämatoxilin blau visualisiert. Der Größenskalen bezieht sich auf alle vier Abbildungen.

### 4.1.3 Nachweis von EpICD mit dem Antikörper 1775

Nach den in 4.1.1 vorgestellten Vorversuchen mit herkömmlichen Antikörpern und der Austestung der beiden neuen Antikörpern 1775, wurde ein weiterer Versuch gestartet, um EpICD auf

einem Western Blot nachzuweisen. Dazu wurden sowohl HCT-8 als auch FaDu-Zellen mit Proteasominhibitor (MG-132) behandelt, um dem schnellen Abbau des EpICD Proteins durch das Proteasom vorzubeugen. Als Kontrolle wurden die Zellen lediglich mit DMSO, dem Solvent für MG-132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und jeweils bis zu 4000 µg für eine Immunopräzipitation eingesetzt. Zur Immunopräzipitation wurde der Antikörper 1775-2 verwendet. Das Antikörper-gebundene Peptid wurde mittels G-Protein-Sepharose aus dem Lysat angereichert und auf einem Tris Tricin-Gel aufgetrennt. Wie in Abbildung 4.6. zu sehen ist, konnte EpICD bei der erwarteten Größe von ca. 4 kD detektiert werden. Als Größenkontrolle diente das rekombinante EpICD. Der Einsatz von Proteasominhibitoren bewirkte nur bei HCT-8 Zellen eine leichte Stabilisierung von EpICD. Auch die Präzipitation von nicht vollständig gespaltenem EpCAM Vollängenmolekül konnte auf dem Gel nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde synthetisches EpICD präzipitiert (Spur 8), bei welchem erwartungsgemäß zusätzlich zu EpICD nur die schweren und leichten Ketten des Antikörpers detektiert wurden und nicht, wie in den Zellysaten, endogenes EpCAM.



**Abbildung 4.6: Nachweis von EpICD.** EpICD wurde mit spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Dazu wurde Zelllysate aus HCT-8 (Spur 1 und 2) und FaDu (Spur 6 und 7) Zellen verwendet. Die Zellen wurden entweder mit Proteasominhibitor (PI +) behandelt oder blieben unbehandelt (PI -). Als Kontrolle wurde synthetisches EpICD Peptid geladen (Spur 4: 100 ng, Spuren 3 und 5: 10 ng) oder unter gleichen Bedingungen immunopräzipitiert (Spur 8, 200 ng). SK: Schwere Kette; LK: Leichte Kette. Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Für die Immunopräzipitation wurde der Antikörper 1775-2 verwendet, für den Western Blot der Antikörper 1775-1 in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL.

Auf diese Weise gelang erstmals der biochemische Nachweis von endogen generiertem EpICD in zwei verschiedenen Karzinomzelllinien. Das endogene Molekül weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 4 kD und eine geringe Stabilität in Lösung auf.

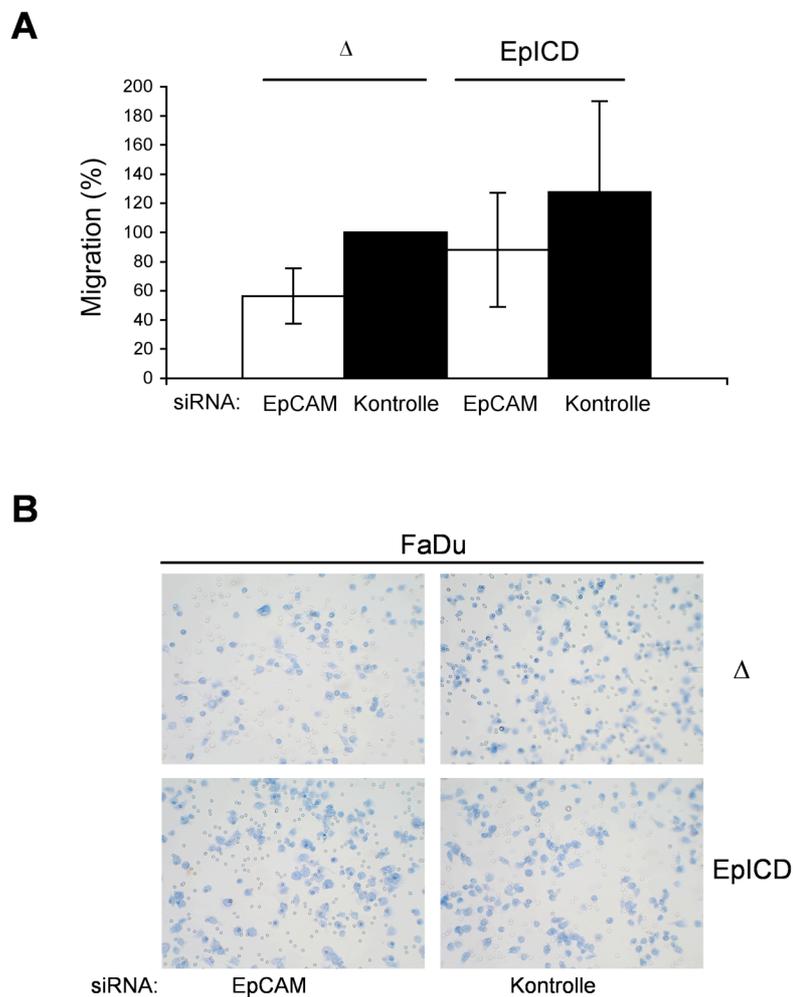
## 4.2 EpICD als signaltransduzierender Teil von EpCAM

Nachdem der intrazelluläre Teil von EpCAM sowie dessen Spaltung in verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden konnte, sollte die funktionelle Komponente von EpICD näher untersucht werden. Um die Beteiligung von EpICD an den Signalprozessen herauszufinden, wurden zum größten Teil bekannte Funktionen von EpCAM genauer aufgeschlüsselt.

Dies wurde zum einen durch Überexpression von EpCAM und EpICD, wie auch durch eine Repression von EpCAM und eine gleichzeitige Komplementierung mit EpICD bewerkstelligt.

### 4.2.1 Einfluss von EpICD auf die Migration

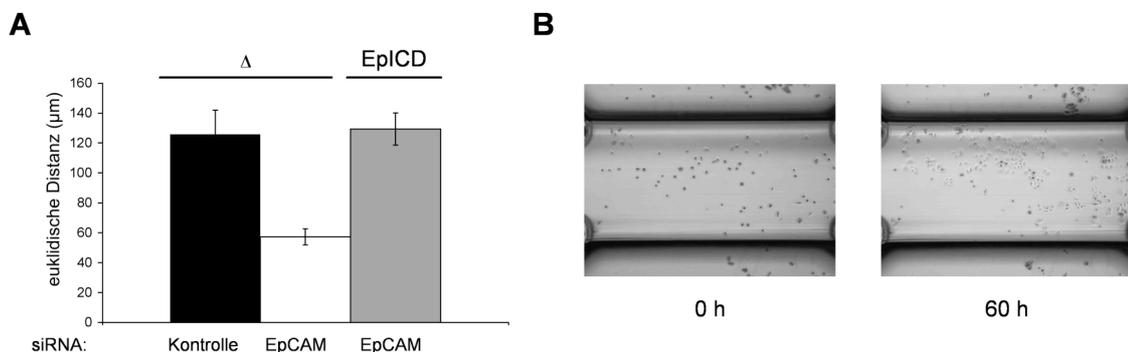
Es ist bekannt, dass EpCAM als tumorassoziiertes Antigen auch an der Migration von Tumorzellen beteiligt ist. Dies konnte bereits in Versuchen mit einer EpCAM spezifischen siRNA gezeigt werden (Osta et al., 2004). Dabei spielt jedoch die Lokalisation des Tumors eine große Rolle (Dr. Will Gillanders, EpCAM meeting 2008). In folgendem sollte nun zum Einen gezeigt werden, ob EpCAM in einer HNO-Karzinomzelllinie die Migration beeinflussen kann. Zum anderen wurde untersucht, inwiefern EpICD hierbei eine Rolle spielt.



**Abbildung 4.7: EpCAM beeinflusst die Migrationsfähigkeit von Zellen und EpICD spielt dabei eine Rolle.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer siRNA (Tab.2.7) behandelt und gleichzeitig mit pCAG141::Δ (Kontrolle) oder pCAG::EpICD ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen mit der Boyden Kammer bestimmt. **(A)** Die Anzahl der migrierten Zellen wurde im Mikroskop ausgezählt. Der prozentuale Anteil wurde durch Normalisierung mit der Kontrolle (Kontroll-siRNA/Kontroll-Plasmid (Δ) = 100 %) bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen (beziehen sich auf die prozentuale Migration in den verschiedenen Versuchen) stammen aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) der gefärbten Zellen auf der Membran.

Zu diesem Zweck wurden Versuche mit Boyden Kammern durchgeführt, um die Migrationsfähigkeit von FaDu-Zellen nach EpCAM-Repression zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM reprimierte Zellen durch eine signifikant verminderte Migration charakterisiert waren (Abb. 4.7 A). Abbildung 4.7 B zeigt exemplarisch die gefärbten Membranen eines Versuches. Hier ist zu sehen, dass deutlich weniger Zellen auf der Unterseite des Filters angefärbt werden konnten, wenn zuvor eine EpCAM siRNA Behandlung erfolgt war. Wenn jedoch EpICD zusammen mit der EpCAM spezifischen bzw. Kontroll siRNA transfiziert wurde, konnte diese Verminderung der Wanderfähigkeit zum Teil aufgehoben werden.

Da die Versuche mit der Boyden Kammer zwar eine Tendenz zeigten, die Standardabweichungen jedoch in diesem Assay hoch sind, wurde eine weitere Technik hinzugezogen, um die Migrationsfähigkeit zu untersuchen. Dazu wurde der  $\mu$ -Slide der Firma Ibidi verwendet. Damit konnten FaDu-Zellen nach unterschiedlicher Behandlung über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. In Abbildung 4.8 A ist die mittlere euklidische Distanz zu sehen, welche die Zellen innerhalb von 60 h zurückgelegt hatten. Dabei ist zu sehen, dass nach Repression von EpCAM in FaDu-Zellen, die zurückgelegte euklidische Distanz um 50% reduziert war. Eine gleichzeitige Ko-Transfektion der siRNA mit einem Expressionsplasmid für EpICD komplementierte jedoch diesen Verlust der Migration. Abbildung 4.8 B zeigt exemplarische Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 und nach 60 h.



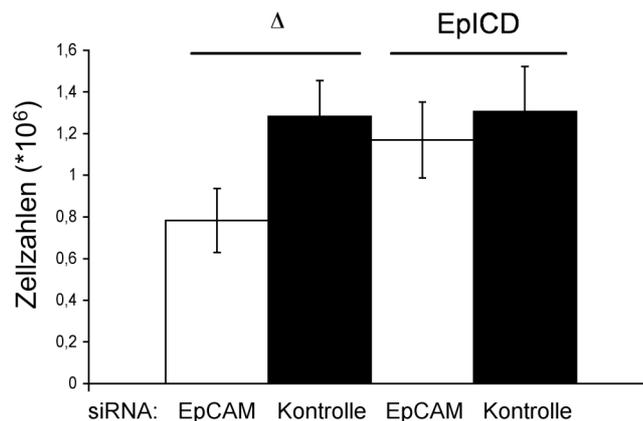
**Abbildung 4.8: EpCAM-Repression führt in FaDu-Zellen zu einer Verringerung der zurückgelegten Distanz und kann durch EpICD Kotransfektion komplementiert werden.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer siRNA behandelt und gleichzeitig mit pCAG141:: $\Delta$  (Kontrolle) oder pCAG::EpICD ko-transfiziert. Nach Transfektion wurde eine definierte Anzahl der Zellen in den  $\mu$ -Slide von Ibidi eingebracht und über 60 h beobachtet. **(A)** Mit der Software Image J konnte die zurückgelegte Strecke einzelner Zellen bestimmt werden. Über ein Firmen eigenes Programm konnte sodann die mittlere euklidische Distanz aus zwei unabhängigen Versuchen berechnet werden. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die gemittelte euklidische Distanz aus beiden Versuchen. **(B)** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen in der Beobachtungs-Kammer des  $\mu$ -Slides zu Beginn und am Ende des Experiments.

#### 4.2.2 EpICD hat Einfluss auf die Zellzahl

Ein Anstieg der Zellproliferation ist neben der erhöhten Migrationsfähigkeit eine weitere essentielle EpCAM-vermittelte Eigenschaft. Durch Hochregulation von Zellzyklus-beeinflussenden Faktoren wie c-Myc, Cyclin A und E, kann EpCAM positiv auf die Zellteilung einwirken. Diese Funktion konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe ausreichend belegt wer-

den. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Zellzahl in EpCAM exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, um ein zweifaches so schnell anstieg.

Hier konnte in FaDu-Zellen gezeigt werden, dass die Repression von EpCAM durch siRNA eine Abnahme der Zellzahlen verursacht. 48 h nach Transfektion mit EpCAM siRNA wurden die Zellen gezählt und zeigten im Mittel eine 39%-ige Reduktion der Zellzahlen gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4.9) Wenn nun EpICD kotransfiziert wurde, konnte dieser Effekt größtenteils aufgehoben werden und die Zellzahlen waren vergleichbar mit der Kontrollgruppe.



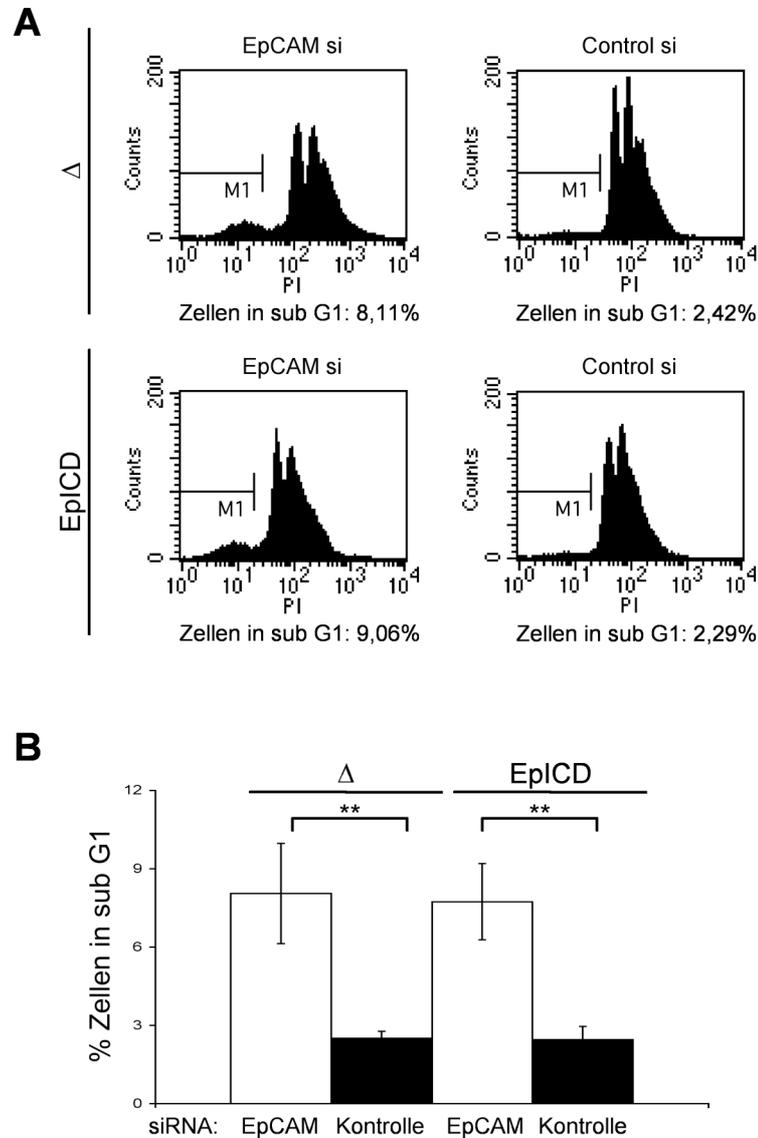
**Abbildung 4.9: Verringerung der Zellzahlen durch EpCAM spezifische siRNA und Komplementation durch EpICD.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer siRNA behandelt und gleichzeitig mit pCAG141::Δ (Kontrolle) oder pCAG::EpICD ko-transfiziert.  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch wurden ausplattiert und die Zellzahl 2 Tage nach Transfektion bestimmt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

### 4.2.3 Einfluss von EpCAM und EpICD auf die Apoptose

Wie in Kapitel 4.2.2. gezeigt, bewirkt die Herunterregulation von EpCAM eine Verringerung der Zellzahlen um 39%, welche durch EpICD komplementiert werden konnte. Um zu klären ob es sich bei diesem Effekt um verhinderte Apoptose oder vermehrte Proliferation handelte, wurden zunächst Versuche durchgeführt bei denen der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt wurde (dieses Kapitel). Um apoptotische Zellen zu detektieren wurde ein Propidiumiodid FACS durchgeführt, welches eine Zuordnung der Zellen nach DNA-Inhalt erlaubt. Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus sind anhand von zwei prominenten Peaks im FACS Diagramm erkennbar. Apoptotische Zellen sind in diesem Experiment durch einen subG1-Peak, bestehend aus degradierter DNA, charakterisiert.

HCT-8 Zellen wurden mit EpCAM spezifischer oder Kontroll siRNA transfiziert und einer Propidium Iodid Färbung unterzogen. In Abbildung 4.10 A sind die FACS Diagramme zu sehen. Diese zeigten deutlich, dass unabhängig von einer Kotransfektion mit EpICD die Apoptoserate in den EpCAM supprimierten Zellen leicht anstieg im Gegensatz zu Kontroll-behandelten Zellen. Der beschriebene Effekt, welcher in Abb. 4.10 A für einen durchgeführten Versuch exemplarisch dargestellt wurde, konnte auch in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt werden. Die Apoptoserate stieg leicht von ca. 2% auf 8% an, dieser Effekt konnte jedoch nicht mit

einer EpICD Kotransfektion umgekehrt werden. Auch in anderen Zelllinien (z.B. FaDu, HeLa) war diese Auswirkung zu sehen (Daten hier nicht gezeigt).

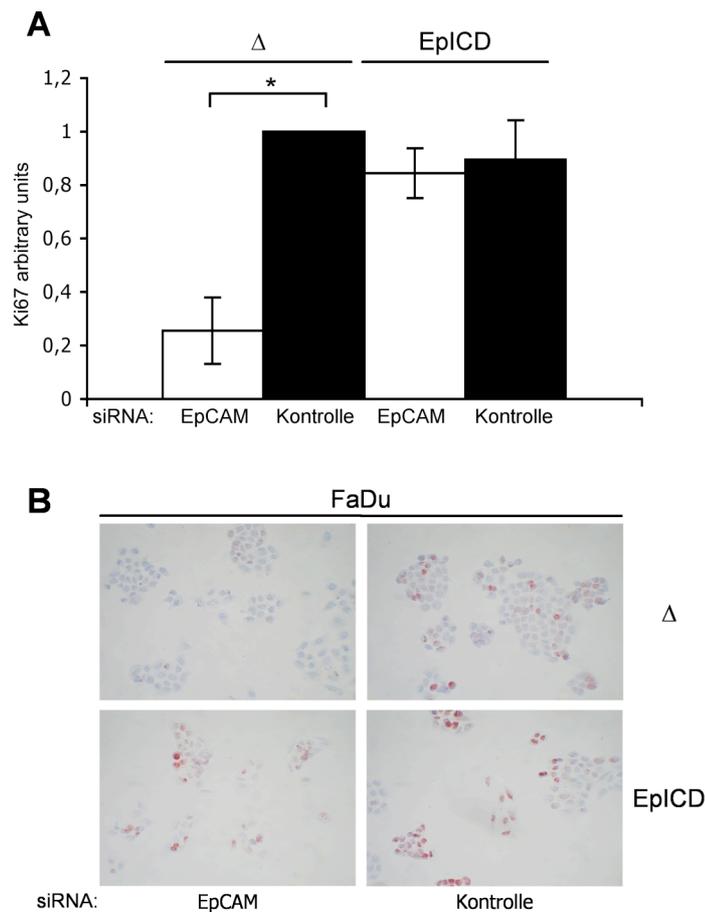


**Abbildung 4.10: Die Suppression der EpCAM-Expression induziert eine schwache Apoptose, die EpICD unabhängig ist. (A)** HCT-8 Zellen wurden mit EpCAM oder Kontroll-siRNA transfiziert und der prozentuale Anteil an Zellen in der subG1 Phase bestimmt (Marker M1). Das PI-FACS wurde zwei Tage nach Transfektion (50% EpCAM-Repression) durchgeführt. Es wurden EpICD oder Kontrollplasmid ( $\Delta$ ) kotransfiziert. **(B)** Mittelwerte und Standardabweichungen der apoptotischen Zellen nach EpCAM Herunterregulation und EpICD Komplementierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.2.4 EpICD beeinflusst die Proliferation

Untersuchungen zur Apoptoserate (Kapitel 4.2.3) zeigten, dass der Zellzahl verringernde Effekt nach EpCAM-Repression nicht oder nur wenig in einer Verhinderung der Apoptose begründet ist. Deshalb wurde nun die Induktion der Proliferation durch EpICD untersucht. Nach einer Inhibition der EpCAM-Expression durch siRNA und gleichzeitiger EpICD Komplementierung wurde

der Proliferationsmarker Ki67 in behandelten Zellen gefärbt (rot) (Abb. 4.11). Die EpCAM Herunterregulation ging mit einem Verlust von Ki67 einher. Wenn dagegen der intrazelluläre Teil von EpCAM kotransfiziert wurde, blieb die Expression von Ki67 stabil. In Abbildung 4.11 A sind exemplarisch Aufnahmen der Ki67 Färbungen nach unterschiedlichen Behandlungen gezeigt, während 4.11 B eine Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Balkendiagramm zeigt. Abschließend lässt sich sagen, dass der Abfall der Zellzahlen nach EpCAM siRNA Transfektion einem proliferativen Effekt zuzuschreiben ist und nicht einer Verhinderung der Apoptose.



**Abbildung 4.11: EpICD kann die Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 nach EpCAM-Repression kompensieren.** HCT-8 Zellen wurden mit EpCAM spezifischer oder Kontroll siRNA behandelt. EpICD (p141CAG::EpICD) oder Kontrollplasmid (p141CAG:: $\Delta$ ) wurden kotransfiziert und die Zellen nach 48h mit Ki67-spezifischen Antikörpern gefärbt, um proliferierende Zellen zu detektieren. **(A)** Positive Zellen wurden gezählt, der prozentuale Anteil bestimmt und anhand der Kontrolle (Kontroll-siRNA und Kontroll-Plasmid ( $\Delta$ ) transfiziert) normalisiert. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) der gefärbten Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

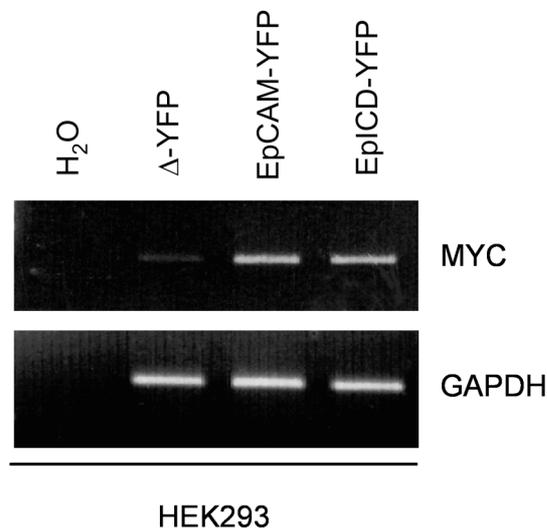
#### 4.2.5 Einfluss von EpICD auf das Zielgen MYC

Die Aktivierung der EpCAM vermittelten Signaltransduktionskaskade führt zur verstärkten Transkription von Zielgenen wie MYC. Dies konnte in verschiedenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden. MYC ist das erste Zielgen welches identifiziert wurde und

spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und bei der Proliferation. Im Folgenden wurde die Fähigkeit von EpICD, die Expression des EpCAM Zielgens MYC zu induzieren, untersucht.

#### 4.2.5.1 MYC Transkription

Um den Einfluss von EpICD auf die Transkription des Gens MYC zu untersuchen, wurde ein HEK 293 Überexpressionssystem verwendet. HEK 293 Zellen wurden stabil mit den Fusionskonstrukten EpCAM-YFP, EpICD-YFP und dem Leerplasmid  $\Delta$ -pEYFP transfiziert. Anschließend wurde die Menge an MYC mRNA in den verschiedenen Zelllinien bestimmt. Wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist, haben EpCAM und EpICD eine vergleichbare Fähigkeit die Menge an MYC-mRNA in den Zellen zu erhöhen.

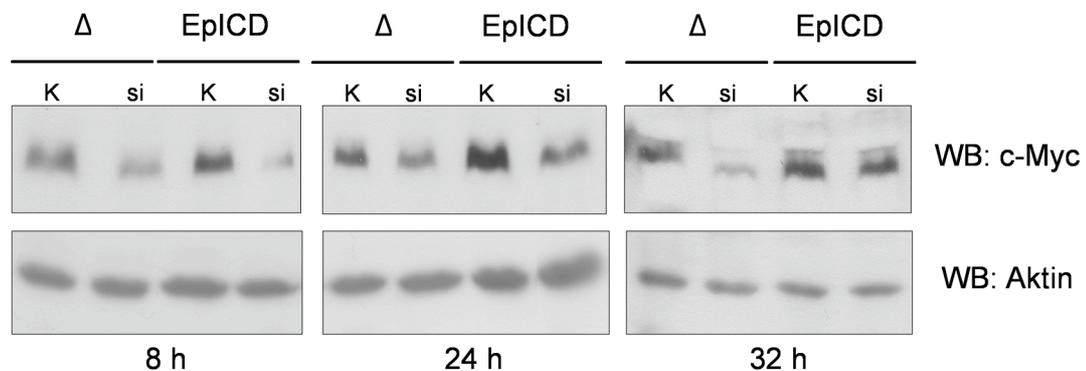


**Abbildung 4.12: EpCAM und EpICD induzieren die Transkription des MYC Gens.** HEK 293 Zellen wurden mit  $\Delta$ -YFP, EpCAM-YFP und EpICD-YFP transfiziert. Die Menge an MYC mRNA wurde mittels RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle wurden parallel die die Menge an GAPDH untersucht. Das Ergebnis repräsentiert eines von drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.2.5.2 Protein-Ebene

Ergebnisse aus unserem Labor zeigten, dass der in Kapitel 4.2.5.1 beschriebene Versuch auch auf Ebene der Proteine reproduzierbar war. Auch hier konnte in der Zelllinie, welche lediglich den intrazellulären Teil von EpCAM exprimierte, ein Anstieg der Menge an c-Myc beobachtet werden. Um diesen Effekt auf Proteinebene etwas eingehender zu untersuchen, wurde RNA-Interferenz verwendet. Die Expression von EpCAM wurde in FaDu-Zellen mittels spezifischer siRNA reprimiert. Dies resultierte in der Herunterregulation des c-Myc Proteins (Abb. 4.13 jeweils Spur 1 und 2). Der Effekt war bereits nach 8 h zu sehen und hielt bis zu 32 h nach Transfektion an (spätere Messwerte wurden nicht untersucht). Zeitgleich mit der Behandlung der Zellen mit siRNA wurde ein Leervektor oder ein EpICD-Expressionsplasmid kotransfiziert. Zu frühen Zeitpunkten der Untersuchung (*i.e.* 8h) hatte die exogene Expression von EpICD keine

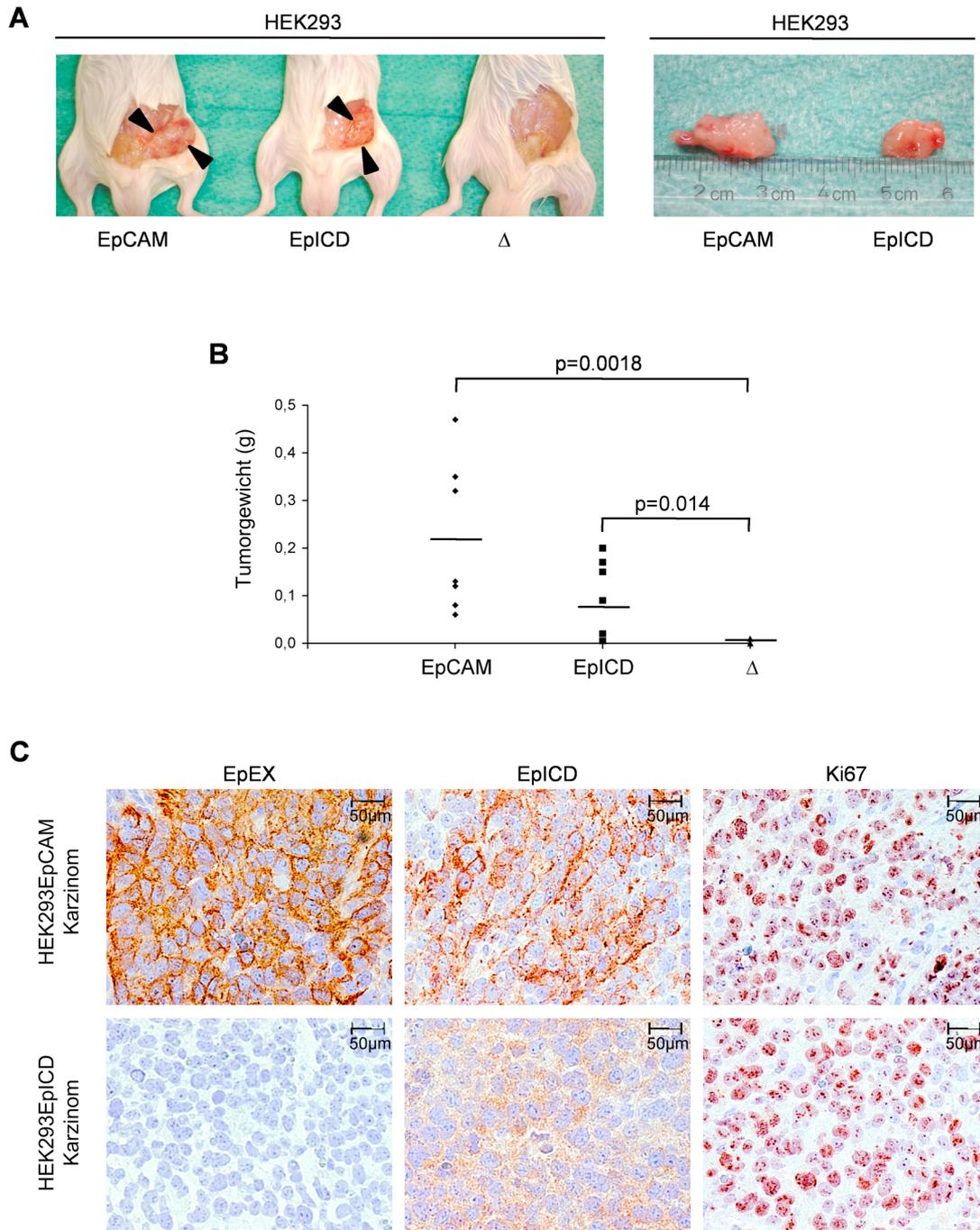
Wirkung auf die Expression von c-Myc. Zu späteren Zeitpunkten (*i.e.* 32h) war EpICD jedoch in der Lage die Expression von c-Myc zu stabilisieren, so dass eine Hemmung der EpCAM-Expression keinen Einfluss auf die Menge an c-Myc mehr hatte (Abb. 4.13 Spuren 3 und 4 jeweils).



**Abbildung 4.13: EpICD kann die Herunterregulation von c-Myc nach EpCAM-Repression kompensieren.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer (si) oder Kontroll (K) siRNA behandelt. pCAG141:: $\Delta$  bzw. pCAG141::EpICD wurden ko-transfiziert wie angegeben. Die Menge an c-Myc wurde anschließend mit einem spezifischen Primärantikörper in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL im Western Blot ermittelt. Neben der Ladung gleicher Proteinmengen (ermittelt mit BCA-Kit) wurde Aktin als Ladekontrolle detektiert. Das Ergebnis repräsentiert einen von drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.2.6 Onkogenes Potential von EpCAM in vivo

Um das tumorigene Potential von EpCAM und EpICD *in vivo* zu bestimmen, wurden stabile HEK 293-Transfektanten, welche EpCAM-YFP, EpICD-YFP oder YFP exprimierten, subkutan in die linke Flanke von immundefizienten SCID-Mäusen injiziert. Nach zwei Wochen wurden die Mäuse geopfert und die tastbaren Tumore entnommen. Während alle Tiere, denen EpCAM oder EpICD exprimierende Zellen gespritzt wurden, große tastbare Tumore bildeten ( $n=8/8$ ) konnte in der Kontrollgruppe ( $\Delta$ -YFP) lediglich ein kleiner Tumor (0,01g) in einem Tier ertastet werden. Das Tumorgewicht entsprach für die EpCAM Transfektanten  $0,2 \pm 0,15$  g und für die EpICD Transfektanten  $0,085 \pm 0,08$  g (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (Abb. 4.14 A). Die Tumore waren kompakt und wiesen eine starke Vaskularisierung auf (Abb. 4.14 B). Das entnommene Gewebe wurde zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend am Gefriermikrotom geschnitten und mit EpICD, EpEX und Ki67 spezifischen Antikörpern gefärbt (Abb. 4.14 C). Die Färbung von EpCAM Tumoren (oben) lieferte wie erwartet eine randständige EpEX- und EpICD Färbung, während die Tumore der EpICD Transfektanten erwartungsgemäß nicht mit EpEX angefärbt werden konnten, allerdings eine definierte EpICD Färbung aufwiesen. Alle Tumore zeigten eine starke Ki67 Färbung (50,8% EpCAM; 60,6 % EpICD) was auf eine hohe proliferative Aktivität hinwies.



**Abbildung 4.14: EpCAM und EplCD sind onkogen in vivo. (A)** Stabile HEK293 Transfektanten (pEYFP::Δ, pEYFP::EpCAM, pEYFP::EplCD) wurden subkutan in die linke Flanke von 6 Wochen alten männlichen SCID Mäusen (n=8 pro Gruppe, in zwei unabhängigen Experimenten) injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumore entnommen. Links: Mäuse vor Entnahme der Tumore (mit Pfeilen gekennzeichnet). Rechts: präparierte Tumore. **(B)** Tumorgewichte wurden mit einer Präzisionswaage bestimmt. pEYFP::EpCAM (n=8/8, mittleres Gewicht: 0.2 ± 0.15 g), pEYFP::EplCD (n=8/8, mittleres Gewicht: 0.085 ± 0.08 g), pEYFP::Δ (n=1/8, Gewicht: 0.001 g). Signifikanz wurde markiert (p). **(C)** Konsekutive Kryoschnitte der Tumore (aus pEYFP::EpCAM und pEYFP::EplCD Zellen) wurden mit EpEX (HO3)-, EplCD (1775-2)-, und Ki67 spezifischen Antikörpern, in Kombination mit spezifischen, biotinylierten Zweitantikörpern und einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex sowie AEC, detektiert. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin visualisiert.

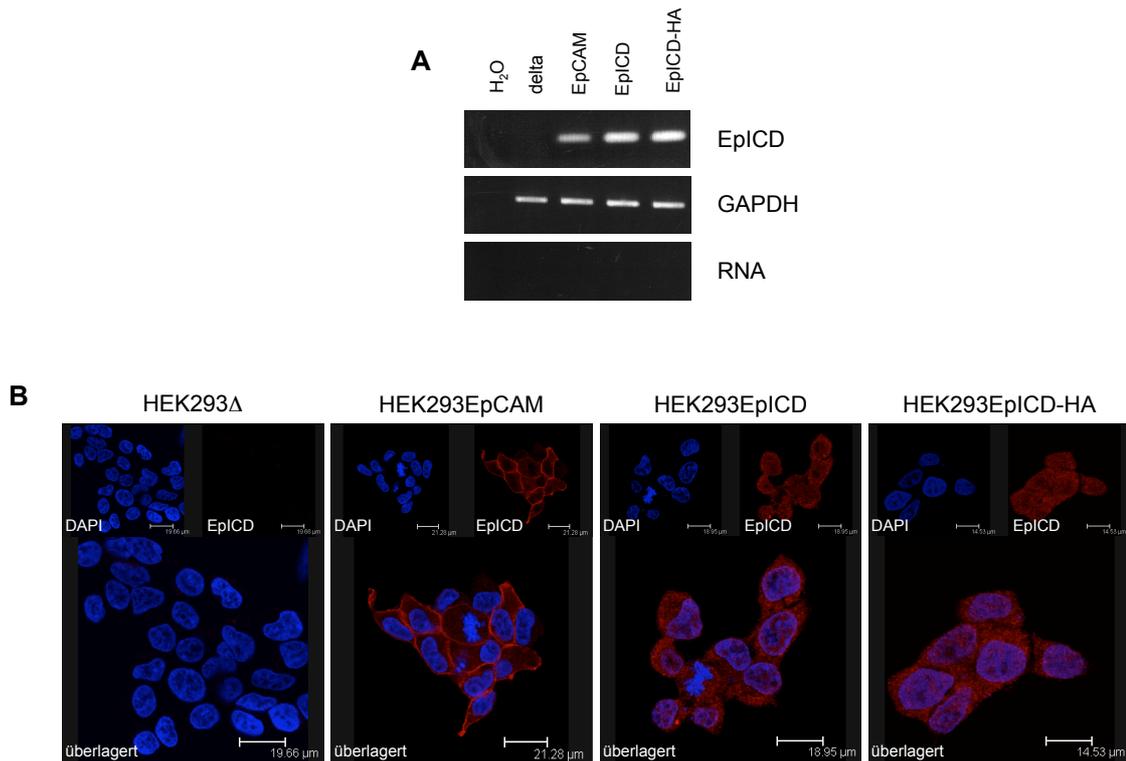
### 4.3 Initiale Aktivierung des EpCAM Signalweges durch Zell-Zell-Kontakt

Wie in vorangegangenen Abschnitten aufgezeigt ist EpICD der signalvermittelnde Teil von EpCAM. Für die Freisetzung dieser Domäne muss das intakte EpCAM-Molekül gespalten werden, wie bereits in der Einleitung beschrieben. Der initiale Auslöser für diese Spaltung ist bislang noch unbekannt. Immunfluoreszenzfärbungen von EpEX und EpICD zeigten, dass EpICD an Zonen von Zell-Zell-Kontakt in geringerem Maße an der Membran zu finden war. Diese Beobachtung führte gemeinsam mit frühen Befunden einer homophilen Interaktion von EpCAM-Molekülen zu der Hypothese, dass EpCAM-Moleküle in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten wechselwirken und auf diese Weise eine initiale Spaltung induziert wird. In der Folge würde es nicht nur zu einer Abspaltung von EpICD, sowie dessen Freisetzung in das Zytoplasma kommen, sondern auch zu einer Abspaltung der EpEX Domäne außerhalb der Zelle. Diese Annahme konnte durch weitere Experimente bestätigt werden. Arbeiten aus unserem Labor zeigten, dass mit zunehmender Dichte mehr EpEX in Zellkulturüberständen zu finden war und EpCAM vermittelte Effekte wie Proliferation und Zielgenaktivierung in verstärktem Maße stattfanden. Diese Beobachtung wurde durch Versuche mit löslichem EpEX untermauert. Dabei wurde rekombinantes EpEX auf Zellen gegeben und die Spaltung sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz beobachtet. In beiden Methoden konnte ein deutlicher Anstieg an gespaltenem EpCAM beobachtet werden.

Somit scheint zum einen der Zellkontakt ein initialer Auslöser für die Spaltung zu sein und im Folgenden die lösliche EpEX-Komponente zur weiteren Spaltung der EpCAM-Moleküle beizutragen. Um dieses Thema weitergehend zu untersuchen, wurden zwei *in vitro* Zellsysteme entwickelt.

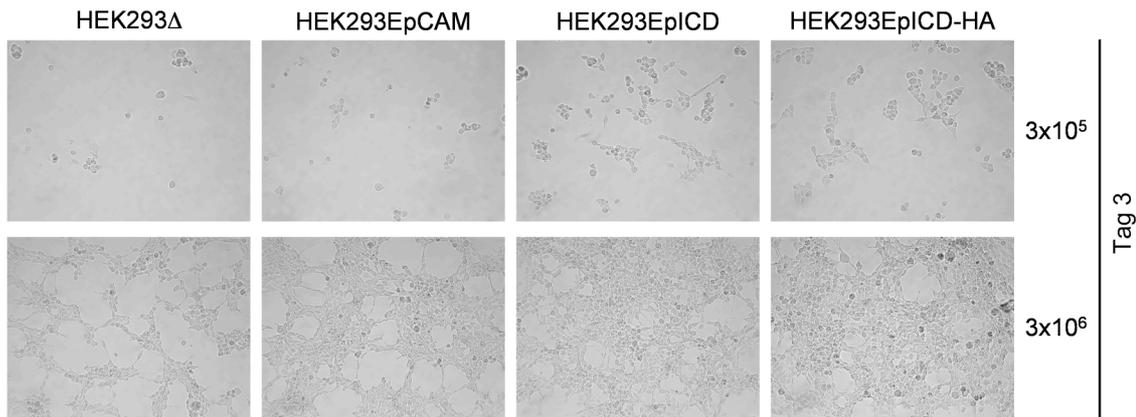
#### 4.3.1 Gespaltenes EpICD ist ohne Zell-Zell-Kontakt funktionell

Vorangegangene und zeitgleich durchgeführte Versuche wiesen auf eine Rolle von Zell-Zell-Kontakten und/oder löslichem EpEX bei der Initiierung der EpCAM-Spaltung und Freisetzung von EpICD. Im Umkehrschluss würden Zellen bei denen EpICD bereits in gespaltenen Form vorliegt keinen Zell-Zell-Kontakt benötigen, um EpCAM vermittelte Effekte auszulösen. Um dies zu untersuchen wurden EpCAM negative HEK293 Zellen mit einem Kontrollplasmid ( $\Delta$ -pCAG), einem EpCAM-Expressionsplasmid oder einem Plasmid, welches für EpICD oder EpICD-HA kodiert, transfiziert. Eine RT-PCR wurde anschließend durchgeführt, um die EpICD spezifische mRNA in den einzelnen HEK293 Transfektanten nachzuweisen (Abb.4.15 A). Zum Nachweis der Expression der einzelnen Proteine in den stabilen Klonen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und Aufnahmen im Laserscanningmikroskop gemacht (Abb. 4.15 B). Wie erwartet, zeigten Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden keine EpICD Färbung. Die EpCAM exprimierenden Zellen wiesen eine membrandständige und zytoplasmatische Lokalisation des intrazellulären Teils auf. In EpICD exprimierenden Zelllinien (HEK293 EpICD, HEK293 EpICD-HA) lokalisierte EpICD im Zytoplasma, in perinukleären Bereichen und im Zellkern, jedoch nicht an der Membran.

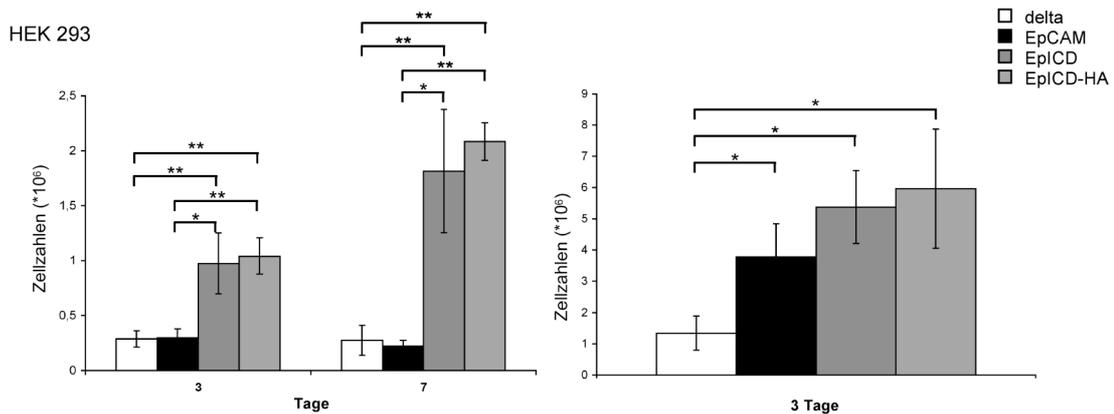


**Abbildung 4.15: Nachweis der Expression von 141pCAG:: Δ; EpCAM; EpICD; EpICD-HA in HEK293 Zellen. (A)** HEK293 Zellen wurden stabil mit den Expressionsplasmiden 141pCAG::Δ, EpCAM, EpICD, EpICD-HA transfiziert. Gesamt-mRNA wurde aus den stabilen Transfektanten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die mRNA Expression von EpICD und GAPDH (Kontrolle) wurde mit spezifischen Primern in einer PCR überprüft. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche **(B)** Die unter (A) beschriebenen HEK293 Transfektanten wurden mit einem EpICD spezifischen Antikörper in Kombination mit einem spezifischen, biotinylierten Zweitantikörper sowie einem Straptavidin-Alexa-647-Konjugat (rot) gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) visualisiert. Die so behandelten Zellen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen Experimenten.

EpCAM und EpICD exprimierende HEK293 Transfektanten wurden in unterschiedlichen Zelldichten ausplattiert. In der niedrigen Zelldichte ( $3 \times 10^5$ /Petrischale) lagen die Zellen als Einzelzellen vor. In der hohen Dichte ( $3 \times 10^6$ /Petrischale) wiesen die Zellen ein 20-30 %-ige Konfluenz bei Beginn des Experimentes auf. Abbildung 4.16 zeigt durchlichtmikroskopischen Aufnahmen welche drei Tage nach Aussäen der Zellen gemacht wurden. In Abbildung 4.17 ist die Quantifizierung der Zellzahlen aller Transfektanten 3 und 7 Tage nach Ausplattierung unter beiden Ausgangsdichten zu sehen. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die HEK293 EpCAM Transfektanten deutliche Unterschiede zeigten, welche auf die Ausgangsdichte zurückzuführen sind. Unter niedriger Ausgangsdichte ( $3 \times 10^5$ /Petrischale) verhielten sich EpCAM exprimierende Zellen genauso wie die Kontrollzellen und zeigten keinen Anstieg in den Zellzahlen. Wenn HEK293 EpCAM Transfektanten jedoch unter Bedingungen ausplattiert wurden, welche Zellkontakt erlaubten ( $3 \times 10^6$ /Petrischale), konnte ein 2-facher Anstieg in den Zellzahlen im Vergleich zu den HEK293 Δ Zellen beobachtet werden. EpICD exprimierende Zellen dagegen konnten unabhängig von ihrer Aussaatdichte um ein 3-faches besser wachsen als die Kontrollgruppe am Tag 3. Am Tag 7 verstärkte sich dieser Effekt noch deutlicher und es kam zu einem 7-fachen Anstieg der Zellzahlen in EpICD exprimierenden Zellen.

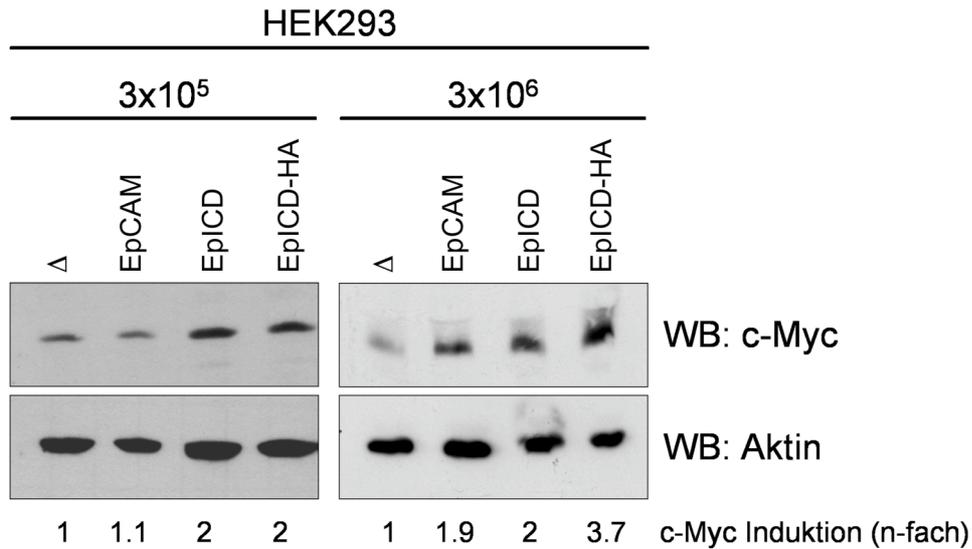


**Abbildung 4.16: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der HEK293 Transfektanten nachdem sie unter niedriger ( $3 \times 10^5$ /Platte) und hoher ( $3 \times 10^6$ /Platte) Dichte ausgesät wurden.** Es sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen am dritten Tag nach Aussäen gezeigt. Die Bilder sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.



**Abbildung 4.17: Lösliches EpiCD kann Proliferation unabhängig von Zell-Zell-Kontakten vermitteln.** Die HEK293 Transfektanten wurden unter niedriger ( $3 \times 10^5$ /Platte) und hoher ( $3 \times 10^6$ /Platte) Dichte ausplattiert. 3 bzw. 7 Tage nach Aussäen der Zellen wurde die Zellzahlen mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Hier gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden markiert (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ).

Im Folgenden wurde die Kapazität von EpCAM und EpiCD Zielgene unter verschiedenen Zelldichten zu aktivieren gemessen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben unter zwei verschiedenen Zelldichten ausgesät und nach 3 Tagen in einem Western Blot auf die Expression des c-Myc Proteins untersucht (Abb. 4.16 C). Unter niedrigen Aussaatdichten hatte die ektopische Expression von EpCAM keinen Einfluss auf die Menge an c-Myc Protein (Verhältnis EpCAM / Kontrolle: 1,1-fach). Wenn die Zellen jedoch Zell-Zell-Kontakt hatten ( $3 \times 10^6$ /Petrischale), kam es zu einem Anstieg der c-Myc Expression (Verhältnis EpCAM/Kontrolle: 1,9-fach). EpiCD exprimierende Zellen waren unbeeinflusst von der Dichte der Zellen in der Lage die c-Myc Menge hochzuregulieren (Verhältnis EpiCD und EpiCD-HA / Kontrolle: 2-fach in niedriger Dichte; 2- bzw. 3,7-fach in hoher Dichte).



**Abbildung 4.18: EpICD kann die Induktion von Zielgenen unabhängig von Zell-Zell-Kontakten vermitteln.** HEK293 Zellen wurden stabil mit den Expressionsplasmiden 141pCAG:: $\Delta$ , EpCAM, EpICD, EpICD-HA transfiziert. Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Dichten ( $3 \times 10^5$  oder  $3 \times 10^6$ /Platte) ausplattiert. Es wurde die c-Myc Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Parallel dazu wurde Aktin mit spezifischen Antikörpern als Ladekontrolle nachgewiesen. Die spezifischen Primärantikörper wurden in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL verwendet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

### 4.3.2 Kerntranslokation von EpICD ist erforderlich für EpCAM vermittelte Effekte

Die Notwendigkeit einer Kerntranslokation von EpICD zur Induktion von Zielgenen und Zellproliferation wurde in einem *in vitro* Zellsystem, welches eine Steuerung der Lokalisation von EpICD in der Zelle erlaubt, untersucht. Dazu wurde die intrazelluläre Domäne von EpCAM mit der Ligandenbindedomäne des Estrogenrezeptors fusioniert. Diese Domäne war insofern mutiert, dass lediglich das natürlich nicht vorkommende 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) daran binden kann. Das so entstandene Fusionskonstrukt wurde in HEK293 Zellen transfiziert. Die Induktion des Zellsystems sollte folgendermaßen ablaufen: Das Protein IC-ER<sup>T</sup> lokalisiert nach Expression im Zytoplasma und wird dort durch verschiedene Chaperone (z.B. HSP70) an der Translokation in den Kern gehindert. Erst nach Zugabe von 4-OHT wird das Konstrukt freigesetzt und kann in den Nukleus zu wandern (Schema Abb. 4.19).

Das Fusionskonstrukt EpICD-ER<sup>T</sup> und die Kontrolle ER<sup>T</sup> wurden in HEK293 Zellen stabil transfiziert. Die Expression der Konstrukte wurde im Western Blot mit EpICD und ER-spezifischen Antikörpern bestätigt (Abb. 4.20 A). Zum Nachweis der Kerntranslokation des Konstrukts nach Zugabe von 4-OHT wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abb. 4.20 B). In Abwesenheit von 4-OHT wurde das Fusionskonstrukt EpICD-ER<sup>T</sup> in HEK293 Zellen im Zytoplasma zurückgehalten. Bereits eine Stunde nach Zugabe von 4-OHT translozierte das Protein vollständig in den Kern.

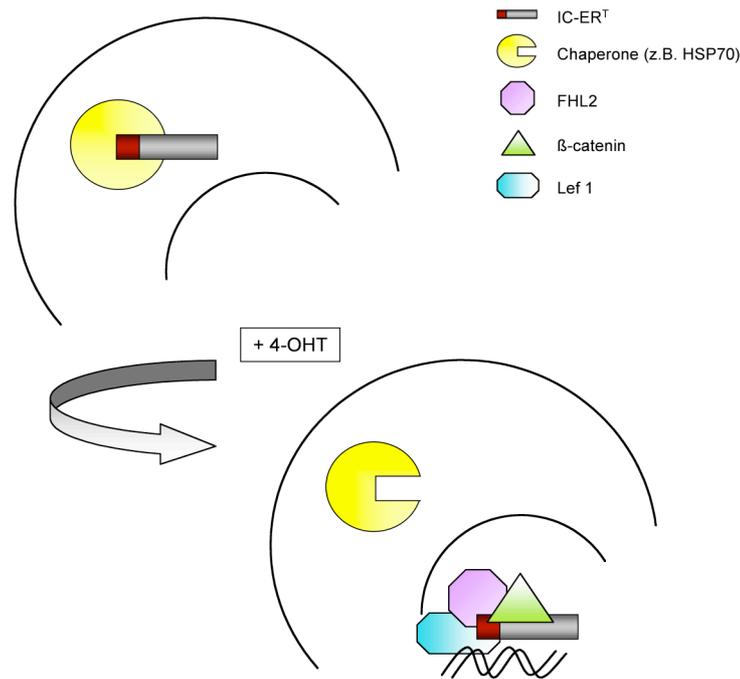


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung des induzierbaren HEK293 Zellsystems.

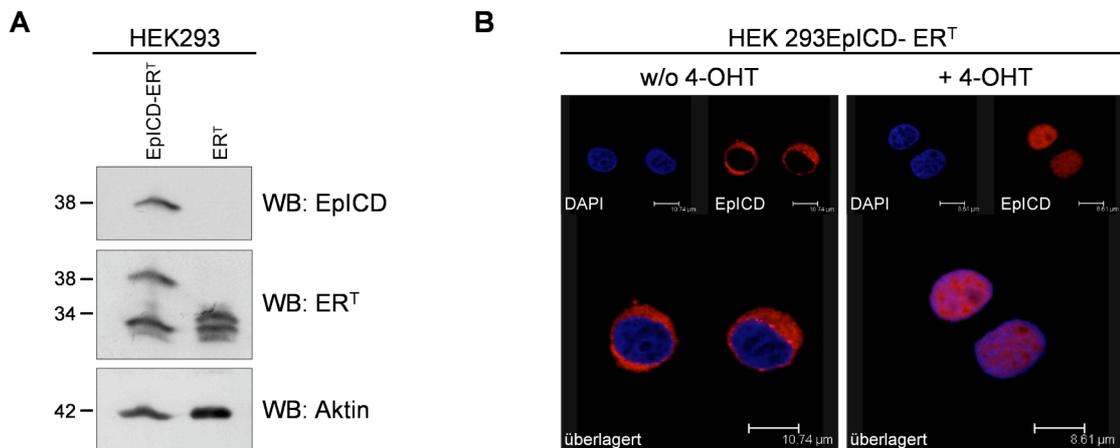
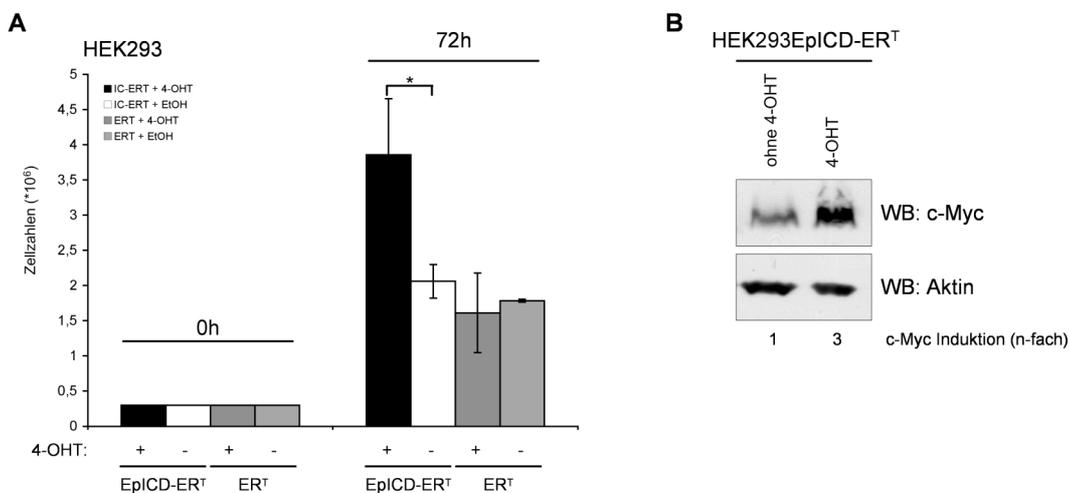


Abbildung 4.20 Nachweis der Proteinexpression und Induzierbarkeit von EpICD-ER<sup>T</sup>. (A) HEK293 Zellen wurden stabil mit 141pCAG::EpICD-ER<sup>T</sup> und 141pCAG::ER<sup>T</sup> Expressionsplasmiden transfiziert. Die Expression der Proteine wurde anhand eines Western Blots mit EpICD und ER<sup>T</sup> spezifischen Antikörpern in Kombination mit einem HRP-markierten Sekundär-Antikörper und ECL nachgewiesen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) HEK293 Zellen wurden transient mit dem Expressionsplasmid 141pCAG::IC-ER<sup>T</sup> transfiziert und mit 4-OHT (100 nM) oder 100% Ethanol (Kontrolle) für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit EpICD spezifischem Antikörper, in Kombination mit einem spezifischen, biotinylierten Zweitantikörper sowie einem Straptavidin-Alexa-647-Konjugat (rot), und DAPI (blau) gefärbt und mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen Experimenten.

Somit konnte gezeigt werden, dass die transfizierten Konstrukte zur Expression der gewünschten Proteine führen und nach Zugabe von 4-OHT EpICD wie erwartet in den Kern translozieren. Im Folgenden wurde untersucht, ob EpICD-vermittelte Effekte von einer Translokation von EpICD in den Zellkern abhängen. Dazu wurden die Zellzahlen von EpICD-ER<sup>T</sup> und ER<sup>T</sup> HEK293

Transfektanten in Ab- und Abwesenheit von 4-OHT bestimmt. Es zeigte sich, dass vier Tage nach Induktion, die Zellen welche das EpICD-ER<sup>T</sup> Konstrukt enthielten, einen signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber nicht-induzierten EpICD-ER<sup>T</sup> Zellen und gegenüber Kontrollzellen (ER<sup>T</sup>-Transfektanten) hatten (Abb. 21 A). Nicht-induzierte EpICD-ER<sup>T</sup> Zellen, nicht-induzierte und induzierte ER<sup>T</sup>-Transfektanten proliferierten zu gleichen Zellzahlen, während induzierte EpICD-ER<sup>T</sup> Zellen eine zweifache Zellzahl im Vergleich aufwiesen. Des Weiteren wurde die Proteinmenge von c-Myc unter induzierten Bedingungen beeinflusst. So zeigten HEK293 EpICD-ER<sup>T</sup> Zellen, welche mit 4-OHT über 8 h behandelt wurden, einen dreifachen Anstieg an c-Myc (Abb. 4.21 B).



**Abbildung 4.21: Die Translokation von EpICD in den Kern ist für die Funktion notwendig.** (A) HEK293 EpICD-ER<sup>T</sup> und HEK293 ER<sup>T</sup> Zellen wurden ausplattiert ( $3 \times 10^5$ /Platte) und in An- und Abwesenheit von 4-OHT (100 nM) kultiviert. Nach 72 h wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von zwei unabhängigen Experimenten (\*  $p < 0,05$ ) (B) HEK293 EpICD-ER<sup>T</sup> wurden mit 4-OHT (100 nM) oder 100% Ethanol (Kontrolle) behandelt. Die Menge des c-Myc Proteins wurde 8 h nach Zugabe von 4-OHT mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde die Expression von Aktin nachgewiesen. Es wurde mit spezifischen Primärantikörpern in Kombination mit HRP-markierten Sekundär-Antikörpern und ECL gearbeitet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

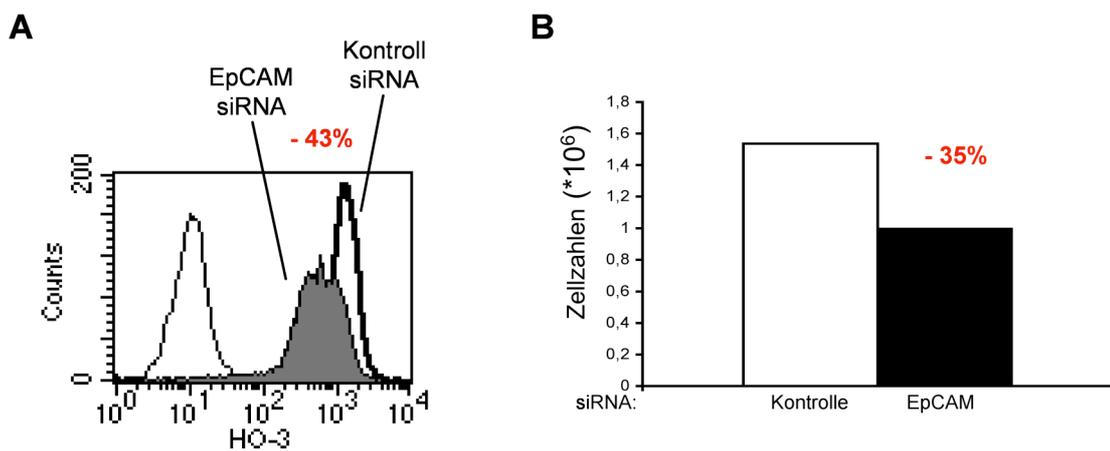
#### 4.4 Transkriptomanalyse in Abhängigkeit der EpCAM-Expression

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass EpICD die Signaldomäne von EpCAM ist, dessen Kerntranslokation Grundvoraussetzung zur Weiterleitung von Signalen unabdinglich ist. Im Zellkern kann die Signaldomäne sodann zusammen mit anderen Interaktionspartnern ( $\beta$ -Catenin, FHL2 und LEF1) an DNA binden. Wie Arbeiten unserer Gruppe zeigten handelt es sich bei der DNA-Kontaktstelle um TCF/LEF-spezifische DNA-Sequenzen (Maetzel et al., 2009). Um nun herauszufinden, welche Zielgene dieser Kernkomplex aktiviert, wurde eine Genexpressionanalyse mittels eines Oligonukleotid-Microarrays (Agilent, Whole Human Genome 4x44 K) durchgeführt. Dabei sollten die Transkriptome von FaDu-Karzinomzellen in Abhängigkeit der EpCAM-Repression verglichen werden. Die gewählten Agilent Arrays erlaubten eine parallele

Analyse von 43377 Genen und Transkripten. Ziel dieser experimentellen Reihe war es weitere Zielgene von EpCAM zu identifizieren.

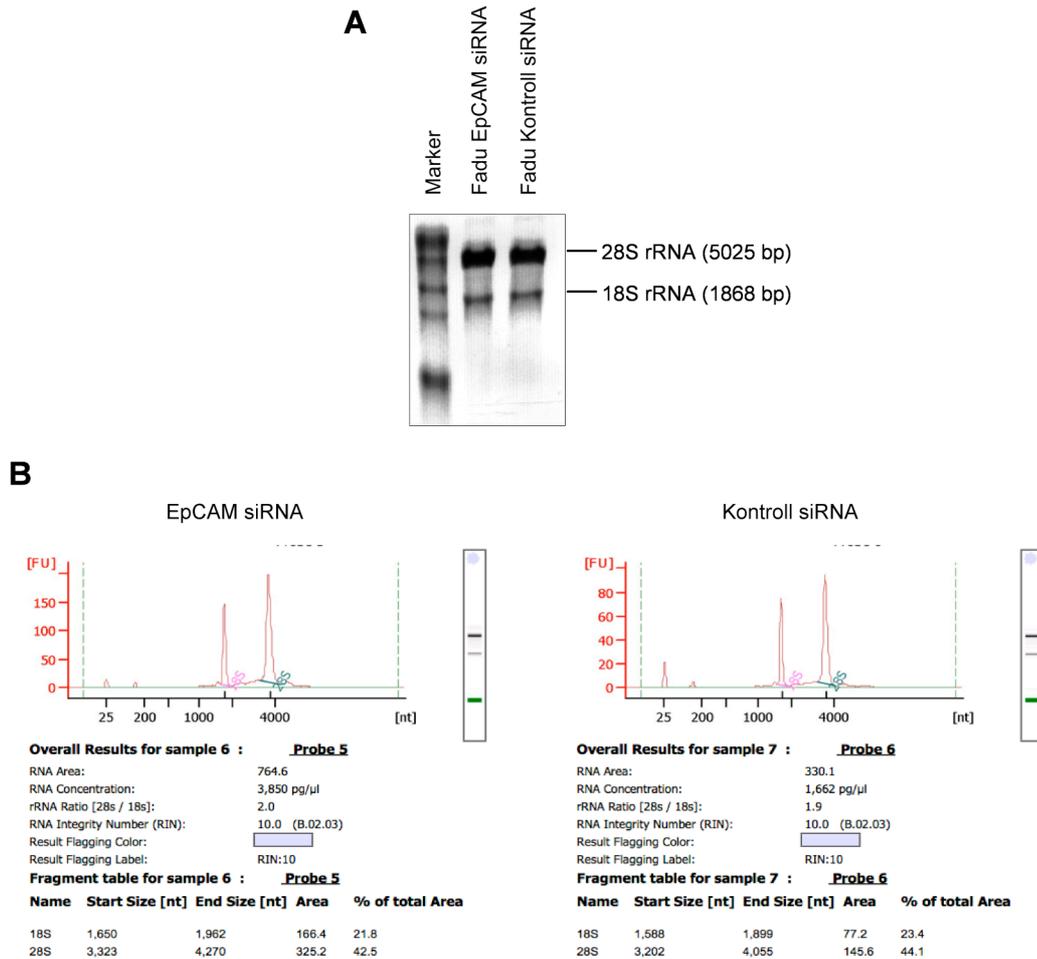
#### 4.4.1 Bestimmung der Ausgangsparameter für den cDNA-Array

Für den cDNA Array wurden FaDu-Zellen mit einer spezifischen EpCAM siRNA (Tab.2.7) oder einer Kontroll siRNA über 48 h behandelt. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, weil hier die Effekte im Phänotyp am eindeutigsten waren. Wie in einer FACS-Analyse gezeigt werden konnte, war die Expression von EpCAM an der Zelloberfläche 2 Tage nach Transfektion mit der EpCAM spezifischen siRNA um 43% reduziert im Vergleich zu den Kontroll siRNA transfizierten Zellen (Abb. 4.22 A). Neben dieser Beobachtung wurden die Zellen auch auf einen funktionellen Phänotyp überprüft. Dazu wurden die Zellzahlen in beiden Ansätzen bestimmt. Auch hier war eine Reduktion um 35% in den EpCAM siRNA behandelten im Verhältnis zu Kontroll siRNA behandelten Zellen zu beobachten (Abb. 4.22 B).



**Abbildung 4.22: Ausgangsparameter der Proben für den cDNA-Array: FaDu-Zellen 48h nach Behandlung mit spezifischer EpCAM oder Kontroll siRNA.** (A) Zur Überprüfung der Herunterregulation von EpCAM wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Färbung wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen den extrazellulären Teil von EpCAM durchgeführt. (B) Zur Überprüfung der Effektivität der siRNA wurden die Zellen (wie unter (A) beschrieben behandelt) zusätzlich in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt.

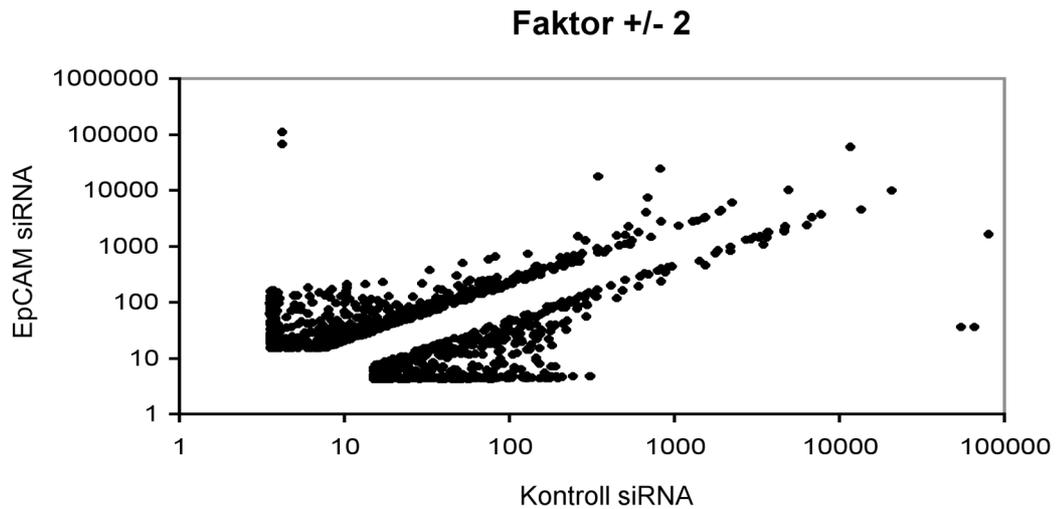
Aus diesen Proben wurde die Gesamt-RNA für die Transkriptomanalyse isoliert. Um die Qualität der RNA im Vorfeld zu bestimmen wurde ein Teil davon auf ein RNA Gel geladen, um das Verhältnis von 28 zu 18S rRNA zu bestimmen. Wie in Abbildung 4.23 A zu sehen ist, befindet sich ungefähr zweimal soviel 28S als 18S rRNA in den Proben, was ein Beweis für die Integrität der RNA war, und konnte somit an die Firma Indivicon Diagnostics geschickt werden. Dort wurde mittels eines Bioanalyzers die Qualität der RNA ein zweites Mal bestimmt. Hier wurde das Verhältnis von 28 zu 18S rRNA mittels automatisierter Kapillar-Elektrophorese bestimmt, wodurch der RIN (RNA Integrität) - Wert berechnet werden konnte. Dadurch war es möglich die RNA-Qualität in einer standardisierten Weise zu beurteilen. Dieser befand sich bei beiden untersuchten Proben bei dem Maximalwert von 10 (Abb. 4.23 B).



**Abbildung 4.23: Überprüfung der Qualität der Gesamt-RNA.** (A) Zur Überprüfung der RNA-Qualität (28S:18S rRNA Ratio, optimal = 2) wurde diese auf ein RNA-Agarosegel geladen und mit Ethidium Bromid angefärbt. (B) Mittels eines Bioanalyzers wurden weitere Parameter (e.g. RNA Integrität, 28S:18S rRNA Ratio, Gesamt-RNA Profile) gemessen, um die qualitativen Eigenschaften der RNA zu überprüfen.

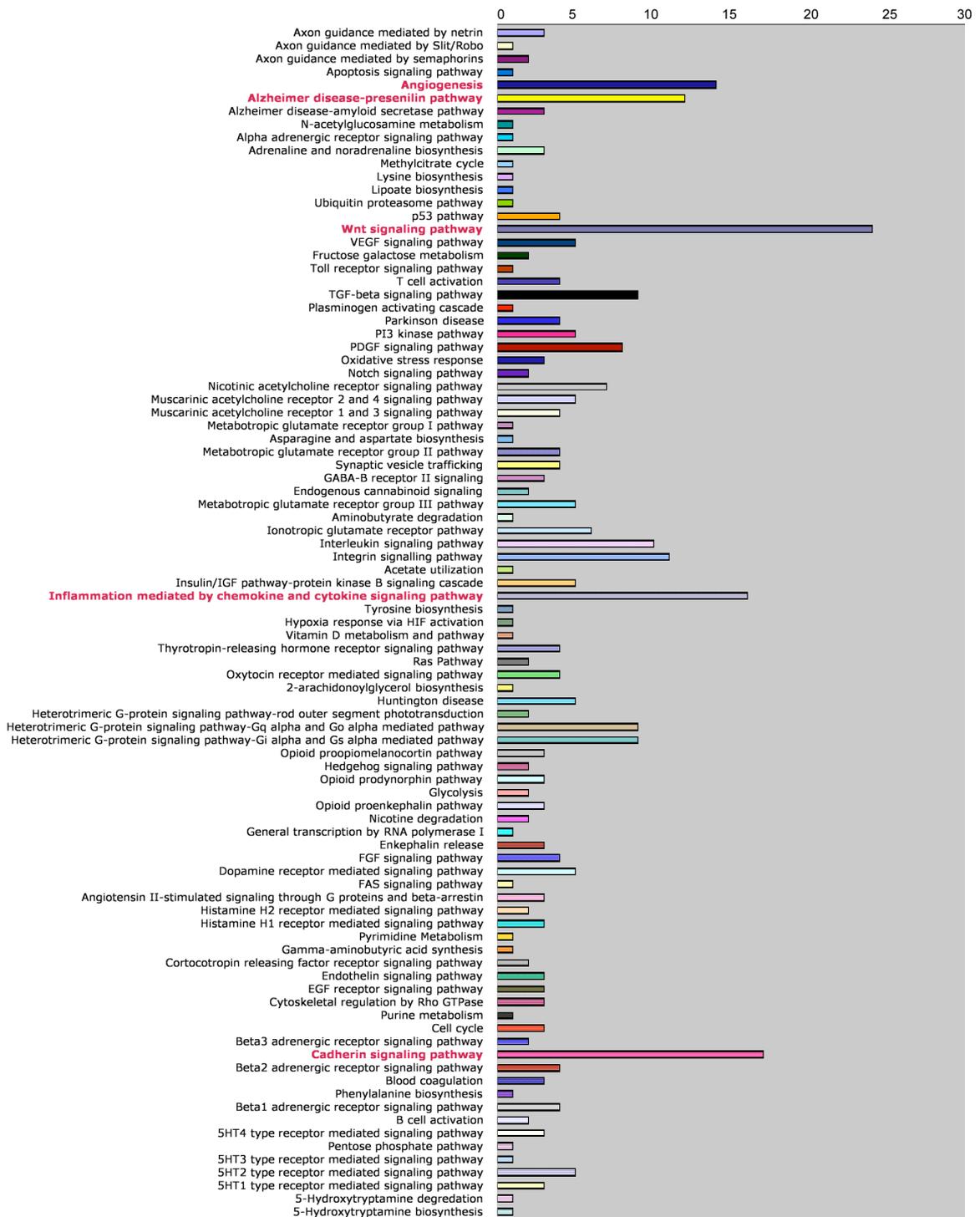
#### 4.4.2 Auswertung differentiell regulierter Gene

Nachdem die Qualität der eingesendeten RNA wie oben beschrieben überprüft wurde, konnte der Microarray durchgeführt werden. Die Herstellung der Sonden mittels in vitro Transkription, die Hybridisierungsreaktionen auf den Arrays, das Auslesen der Chips und die Primäranalyse erfolgte durch die Firma Indvicon Diagnostics. Es wurde eine Qualitätskontrolle (Boxplot der Signalintensitäten, Pearson Korrelation, MvA Plot) sowie eine Normalisierung (median scaling) durchgeführt. Die daraus resultierende Liste an regulierten Genen wurde durch die Höhe der Unterschiede in den Expressionen weiter eingeschränkt. Dabei wurde eine Grenze der Unterschiede von („Fold Change“) FC=2 angenommen. Das bedeutet, dass die Expression eines deregulierten Genes in EpCAM siRNA zu Kontroll siRNA behandelten Zellen einem Verhältnis von >2 oder <0,5 entsprechen musste. Daraus resultierte eine Liste von 1268 deregulierten Genen. Davon sind nach EpCAM-Repression 522 Gene reprimiert und 716 Gene induziert worden (Abb. 4.24)



**Abbildung 4.24: Differenziell regulierte Gene aus dem Microarray.** Aus den Rohdaten wurden die differenziell regulierten Gene (Faktor +/-2) sortiert. Nach EpCAM-Repression wurden 1268 Gene um mindestens Faktor 2 herauf- oder herunterreguliert. Dabei wurden 522 Gene herunter- und 716 Gene heraufreguliert. Das Diagramm zeigt die normalisierten Messwerte (*arbitrary units*) aus dem cDNA-Array.

Die weitere Analyse dieser 1286 Gene erfolgte mit Hilfe der Panther Software (<https://panther.appliedbiosystems.com>). Die Klassifizierung der deregulierten Gene erfolgte hinsichtlich ihrer molekularen Funktion, ihrer Zugehörigkeit zu Proteinfamilien, zu biologischen Prozessen oder zu Signaltransduktionswegen. In Abbildung 4.25 ist die Verteilung der Gene über die zugehörigen Signaltransduktionswege zu sehen. Dabei war auffällig, dass bestimmte Signalwege überrepräsentiert waren. So konnten die meisten Gene dem Wnt Signalweg zugeordnet werden, was interessant erschien, da der EpCAM Signalweg einige Parallelen zu dieser Signalkaskade aufweist. Zudem konnten vier weitere Signalwege identifiziert werden, denen besonders viele Gene (>12) zugehörig waren. Dazu zählen der Angiogenese Signalweg, der Alzheimer Presenilin-Signalweg, Entzündungssignale und der Cadherin Signalweg. Aus diesen 5 Signalwegen wurden 20 vielversprechende Gene herausgesucht und näher untersucht.

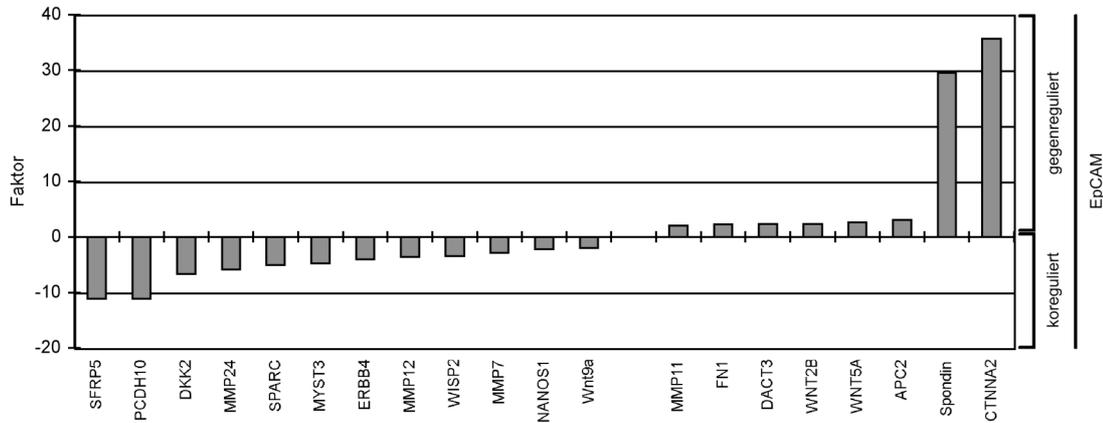


**Abbildung 4.25: Deregulierte Signalwege nach EpCAM-Repression.** Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels PANTHER-Software. Regulierte Gene wurden nach Signalwegen sortiert. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Gene angegeben welche dem jeweiligen Signalweg (x-Achse) zugehören. Rot markiert wurden alle Signalwege denen mehr als 12 deregulierten Gene zugehörten.

### 4.4.3 Fokussierung auf ausgewählte deregulierte Genen

Aufgrund der oben beschriebenen Einteilung in Signalwege konnten überrepräsentierte Signalwege herausgefiltert werden. Daraus wurden 20 vielversprechende Gene ausgewählt. Diese sind in Abbildung 4.26 mit ihren Regulationsfaktoren (FC) zu sehen. Es wurden 8 Gene ausge-

wählt, welche nach EpCAM-Repression induziert und 12 Gene welche reprimiert wurden. Dabei variierten die Regulationsfaktoren unter den induzierten Genen von 2,03- bis zu 35,7-fach, während die reprimierten Gene zwischen -11,1- und - 2,04-fach reguliert waren.



**Abbildung 4.26: Ausgewählte deregulierte Gene nach EpCAM-Repression.** Das Diagramm zeigt den Regulationsfaktor für die einzelnen Gene, die einer detaillierteren Untersuchung unterzogen wurden.

In nachfolgender Abbildung sind die ausgewählten Gene näher beschrieben (Abb. 4.27). Unter den Genen finden sich einige Wnt Liganden wie SFRP5, DKK2, Wnt9a, Wnt2b und Wnt5a. Während die ersten drei erwähnten Liganden mit EpCAM koreguliert sind, weisen Wnt2b und Wnt5a eine gegenläufige Regulation auf. Auch konnte keine einheitliche Expression von inhibitorischen oder aktivierenden Liganden des Wnt Signalweges beobachtet werden. Zudem fanden sich weitere dem Wnt Signalweg zugehörige Proteine wie WISP2, DACT3 und APC2, unter den deregulierten Genen. Beispielsweise wird DACT3, ein negativer Regulator des Wnt-Signalweges, ist nach EpCAM-Repression induziert. WISP2, eine essentielle Komponente des Wnt1 Signalweges, ist in EpCAM reprimierten Zellen herunterreguliert.

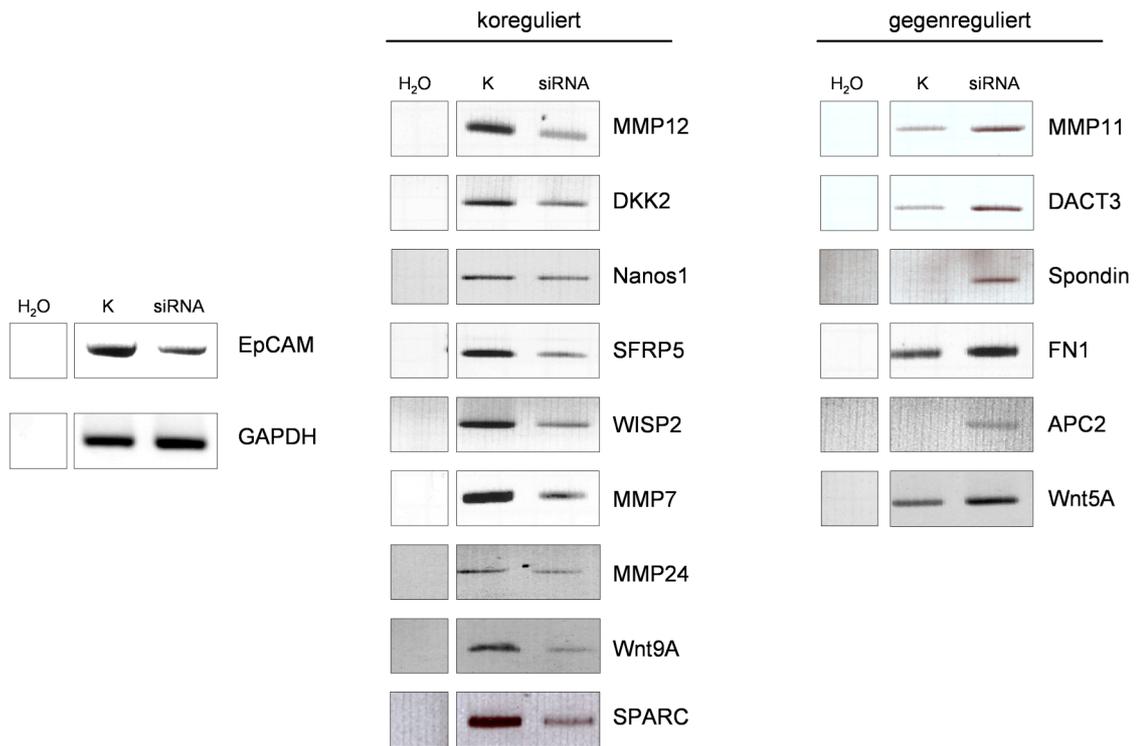
Neben den Liganden und Komponenten des Wnt Signalweges konnte auch MMP7 als Wnt Zielgen in der Liste EpCAM regulierter Gene identifiziert werden. Weitere Matrixmetalloproteinasen wie MMP11, MMP12 und MMP24 werden in ihrer Expression ebenfalls durch EpCAM beeinflusst. Während alle anderen Matrixmetalloproteinasen zusammen mit EpCAM reprimiert wurden, zeigte MMP11 nach EpCAM-Repression eine Induktion. Zu diesen extrazelluläre Matrix abbauenden Proteinen wurden auch extrazelluläre Matrix Proteine selbst unter den deregulierten Genen gefunden, wie Fibronectin1 (FN1) und Spondin1 (SPON1), welche beide gegenläufig zu EpCAM reguliert wurden. Weitere reprimierte Gene waren PCDH10, ERBB4, MYST3 und NANOS1. Alpha-Catenin2 zeigte eine starke Induktion nach Repression von EpCAM.

	Gen-Symbol	Gen-Name	Funktion	P	F	H
koreguliert	SFRP5	secreted frizzled-related protein 5;SFRP5	Wnt Ligand (inhibitorisch)	x	x	
	PCDH10	protocadherin 10;PCDH10	Protocadherin	x		x
	DKK2	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis); DKK2	Ligand von LRP (agonistisch/antagonistisch)	x	x	
	MMP24	matrix metallopeptidase 24 (membrane-inserted);MMP24	membrangebundene MMP	x	x	
	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); SPARC	Matrix assoziiertes Protein	x	x	
	MYST3	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3;MYST3	Transkriptioneller Koaktivator	x	-	
	ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian);ERBB4	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor			
	MMP12	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase); MMP12	MMP	x	x	
	WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2;WISP2	Downstream des Wnt1 Signalweges	x	x	
	MMP7	matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine);MMP7	MMP; Zielgen des Wnt Signalweges	x	x	
NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila); NANOS1	Keimzellentwicklung; fördert Invasion	x	x		
WNT9A	wingless-type MMTV integration site family, member 9A;WNT9A	Ligand der frizzled 7TM Rezeptorfamilie	x	x		
gegenreguliert	MMP11	matrix metallopeptidase 11 (stromelysin 3); MMP11	MMP; schwache extrazelluläre Matrixdegradation	x	x	x
	FN1	fibronectin 1	Glykoprotein; Zelladhäsion; Migration	x	x	
	DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (Xenopus laevis);DACT3	Neg. Regulator des Wnt Signalweges	x	x	x
	WNT2B	wingless-type MMTV integration site family, member 2B;WNT2B	Ligand der frizzled 7TM Rezeptorfamilie			
	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A;WNT5A	Trigger des nicht-kanonischen Wnt Signalweges	x	x	
	APC2	adenomatosis polyposis coli 2;APC2	Schnelle Degradation von $\beta$ -catenin	x	x	x
	Spondin	spondin 1, extracellular matrix protein; SPON1	Extrazelluläres Matrix Protein	x	x	x
	CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2;CTNNA2	Catenin			

**Abbildung 4.27: Ausgewählte deregulierte Gene nach EpCAM-Repression.** Nach Eingliederung der deregulierten Gene in Signalwege mit Hilfe der PANTHER-Software, wurden 20 Gene ausgewählt welche näher untersucht wurden. Die Tabelle zeigt jeweils Gen-Symbol, Gen-Name und Funktion. Die farbige Tabelle (rechts) gibt Informationen über die Validierung der Gene mittels RT-PCR. P: PCR, x = etabliert, leer = nicht etabliert; F: FaDu-Zellen, H: HCT-8 Zellen; x = bestätigt, - = konnte nicht bestätigt werden, leer = keine Aussage möglich.

Um die in obenstehender Tabelle zusammengefassten deregulierten Gene zu validieren, wurde für jedes Gen eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden FaDu-Zellen wie bereits für den cDNA-Microarray mit EpCAM spezifischer oder Kontroll siRNA behandelt und nach 48 h die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde mit spezifischen Primern eine PCR durchgeführt um die Menge an mRNA in den unterschiedlich behandelten Zellen zu ermitteln. Mit Ausnahme von ErbB4, WNT2B und CTNNA2 konnte ein Produkt für jedes potenzielles EpCAM Zielgene amplifiziert werden (Abb. 4.27 Spalte P). Es wurden alle deregulierten Gene bei denen eine PCR Amplifikation funktionell war in FaDu-Zellen untersucht (Abb. 4.27 Spalte F). Für einzelne Gene wurde die Regulation auch in HCT-8 Zellen überprüft (Abb. 4.27 Spalte H).

Abbildung 4.28 zeigt repräsentative RT-PCR Ergebnisse aller deregulierten Gene, welche unter Abb. 4.27 Spalte F mit einem Kreuz gekennzeichnet sind. Während manche Gene nur eine schwache Regulation vermuten ließen, wie z.B. MMP24 oder NANOS1, konnte z.B. für FN1 und MMP7 eine eindeutige Regulierung nach EpCAM-Repression bestätigt werden. Für die eher schwach regulierten Gene konnten diese Effekte jedoch in unabhängigen Versuchen und über mehrere Versuchstage hinweg belegt werden (Daten hier nicht gezeigt).

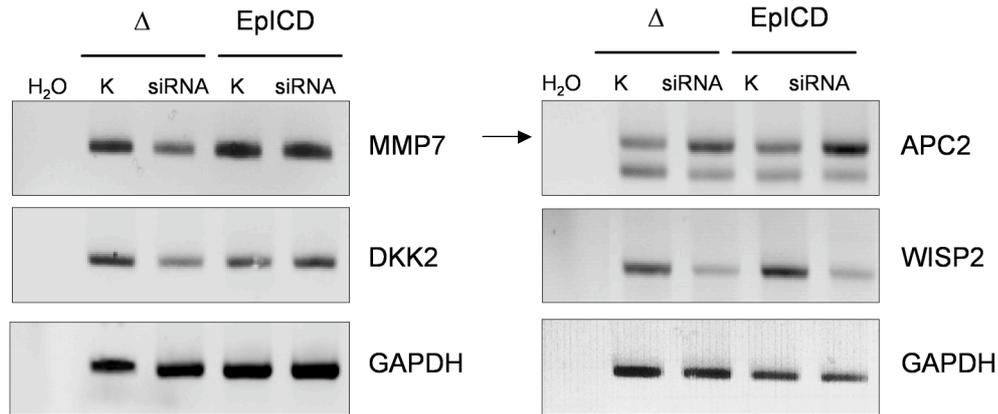


**Abbildung 4.28: Validierung ausgewählter, deregulierter Gene mittels RT-PCR nach EpCAM-Repression.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer (siRNA) oder Kontroll (K) siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Expression der Gene mittels RT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Analyse ausgewählter reprimierter und induzierter Gene. Als Kontrolle wurde die Repression von EpCAM überprüft sowie die Menge an GAPDH bestimmt, um nachzuweisen, dass mit vergleichbaren Mengen an mRNA gearbeitet wurde. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche.

#### 4.4.4 MMP7 als Zielgen

Durch die Transkriptomanalyse konnten Gene identifiziert werden, welche nach EpCAM-Repression in FaDu-Zellen ihre Expression veränderten. Um herauszufinden, ob es sich hierbei um einen Signaltransduktions-vermittelten Effekt handelt, bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen. Dazu wurde die Analyse der Gene auf ein paar wenige eingeschränkt und endete letzten Endes bei einem deregulierten Gen nämlich MMP7.

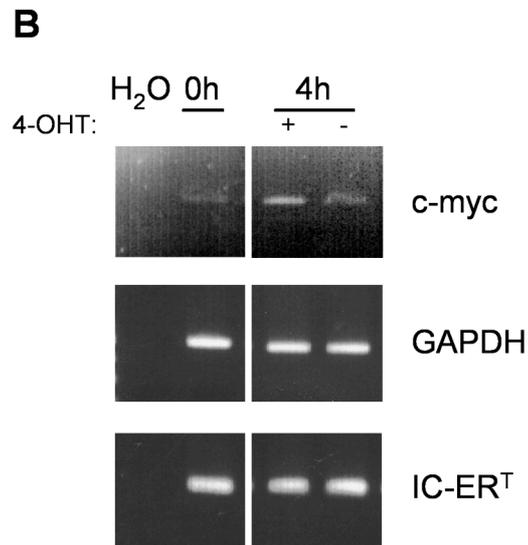
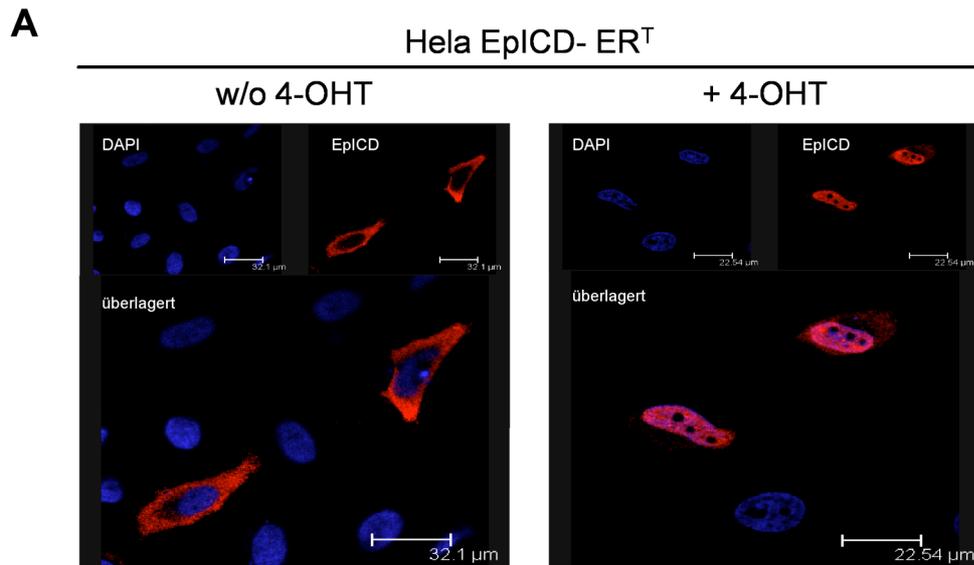
Um einen Effekt der Signaltransduktion von EpCAM, *i.e.* von EpICD, auf die Regulation von Genen zu untersuchen, wurden vier deregulierte Gene ausgesucht. FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer oder Kontroll siRNA behandelt und zusätzlich mit einem EpICD exprimierenden (EpICD-pCAG) oder einem Kontroll Plasmid ( $\Delta$ -pCAG) transfiziert. Nach 48 h wurde die Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für APC2, WISP2, MMP7 (Primer 5a/b) und DKK2 wurde die Menge an vorhandener mRNA in den unterschiedlich behandelten Zellen überprüft (Abb. 4.29). Die Repression von MMP7 und DKK2 nach einer Hemmung der Expression von EpCAM konnte durch die Kotransfektion von EpICD ausgeglichen werden. Dagegen konnten die Effekte welche nach EpCAM-Repression in der WISP2 und APC2 mRNA zu sehen waren, durch Koexpression von EpICD nicht komplementiert werden.



**Abbildung 4.29: Komplementierung der Repression von Zielgenen durch EpICD.** FaDu-Zellen wurden mit EpCAM spezifischer (siRNA) oder Kontroll siRNA (K) transfiziert. Dies resultierte in einer Repression verschiedener Zielgene (MMP7, DKK2, APC2, WISP2) auf mRNA Ebene. Durch Kotransfektion mit EpICD konnte dieser Effekt bei MMP7 und DKK2 wieder aufgehoben werden, während bei APC2 und WISP2 keine Auswirkungen zu sehen waren. Die Abbildungen zeigen jeweils eines von drei unabhängigen Experimenten.

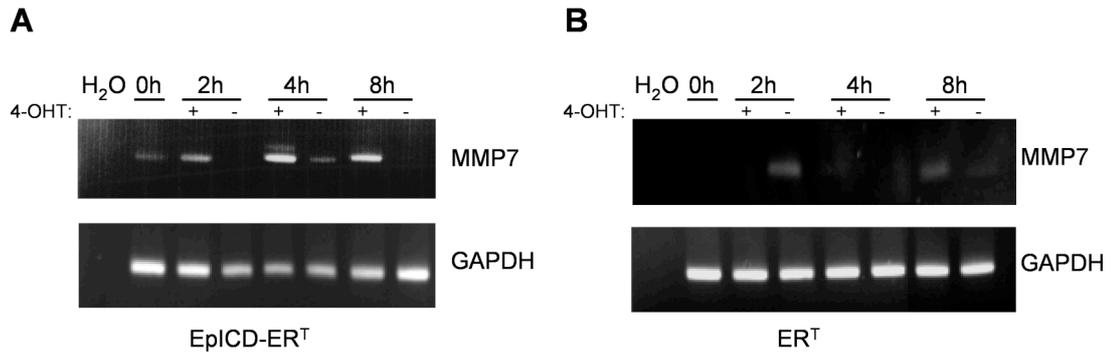
Alle weiteren Untersuchungen fokussierten sich von nun an auf MMP7. MMP7 wurde herausgepickt, da es nach EpCAM-Repression stark herunterreguliert wurde und dieser Effekt durch EpICD komplementiert werden konnte. Zudem ist MMP7 ein interessantes Gen, da es ein direktes Zielgen des Wnt Signalweges ist.

Um einen weiteren Beweis zu bekommen, dass MMP7 tatsächlich durch EpCAM reguliert ist, wurde das induzierbare EpICD-ER<sup>T</sup> Konstrukt, dessen Funktionsweise bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurde, verwendet. Dazu wurde das Fusionsprotein EpICD-ER<sup>T</sup> sowie das Kontrollplasmid ER<sup>T</sup> in HeLa Zellen transfiziert. Diese Zelllinie wurde ausgewählt da es sich um eine Karzinomzelllinie handelt, welche nur sehr geringe Mengen an EpCAM exprimiert, und somit ausschließlich schwache endogene Einflüsse zu erwarten waren. Zuerst wurde die Funktionalität des Systems in HeLa Zellen überprüft. Dazu wurde 20 h nach Transfektion des Konstruktes EpICD-ER<sup>T</sup> 4-OHT oder ein Kontrollreagenz (EtOH) zu den Zellen gegeben. Für den Nachweis der Translokation in den Kern wurden die Zellen eine Stunde nach Induktion fixiert und mit einem EpICD spezifischen Antikörper gefärbt. Unter Zugabe von 4-OHT konnte das Fusionsprotein in den Nukleus translozieren während es in den kontrollbehandelten Zellen zu einer Retention im Zytoplasma kam (Abb. 4.30 A). Zudem wurde überprüft ob es zu einer Induktion von bekannten Zielgenen kommt. 4 h nach Induktion konnte eine Hochregulation von MYC beobachtet werden, während das GAPDH Level, sowie das Level an EpICD-ER<sup>T</sup> gleich blieb (Abb. 4.30 B).



**Abbildung 4.30: Kerntranslokation und Funktionalität des Fusionskonstruktes EpICD-ER<sup>T</sup> in HeLa Zellen.** HeLa Zellen wurden mit dem Konstrukt pCAG141::EpICD-ER<sup>T</sup> transfiziert. **(A)** 1 h nach Induktion mit 4-OHT bzw. ohne Induktion wurden die Zellen fixiert und mit einem EpICD spezifischen Antikörper in Kombination mit einem spezifischen, biotinylierten Zweitantikörper sowie einem Straptavidin-Alexa-647-Konjugat (rot) angefärbt. DAPI wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Die Abbildung zeigt eine von mehreren Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Für die Detektion der mRNA wurden die Zellen 4 h mit bzw. ohne 4-OHT inkubiert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern wurde die Menge von MYC, GAPDH und IC-ERT mRNAs bestimmt. Das hier gezeigte Ergebnis repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten.

Unter Anwendung der gleichen Bedingungen konnte nun überprüft werden, ob MMP7 durch die Translokation von EpICD in den Zellkern induziert wird. Wie in Abbildung 4.31 A zu sehen ist, stieg das MMP7 mRNA Level bereits 2 h nach Induktion des Konstruktes EpICD- ER<sup>T</sup> an. 4 und 8 h nach Zugabe von 4-OHT stieg die Menge der MMP7 mRNA weiter an. HeLa Zellen in welche lediglich das Kontrollplasmid mit ER<sup>T</sup> transfiziert wurde, zeigten zu keinem Zeitpunkt nach Zugabe von 4-OHT eine signifikante Induktion der MMP7 mRNA (Abb. 4.31 B).



**Abbildung 4.31: Kerntranslokation von EpICD bewirkt einen Anstieg des MMP7 mRNA Levels. (A)** HeLa Zellen wurden mit dem induzierbaren Konstrukt pCAG141::EpICD-ER<sup>T</sup> transfiziert. Einen Tag danach wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume mit 4-OHT behandelt, um eine Translokation von EpICD-ER<sup>T</sup> in den Kern zu bewirken. Mit MMP7 spezifischen Primern wurde die mRNA Menge bestimmt. Als Kontrolle wurde die Menge an GAPDH mRNA überprüft. **(B)** HeLa Zellen wurden wie unter A beschrieben behandelt, allerdings wurde anstelle von pCAG141::EpICD-ER<sup>T</sup> das Kontrollplasmid pCAG141::ER<sup>T</sup> transfiziert. Es wurde die Transkription von MMP7 und GAPDH untersucht. Die hier gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils eines von drei Experimenten.

Somit konnte in zwei unterschiedlichen Zelllinien (FaDu, HeLa) unter zu Hilfenahme zweier verschiedener Methoden der EpICD abhängige Einfluss von EpCAM auf die MMP7 mRNA nachgewiesen werden.

## 5 □ DISKUSSION

EpCAM war lange Zeit als tumorassoziiertes Antigen bekannt, welches in einer Vielzahl von Karzinomen überexprimiert ist (Went et al., 2006). EpCAM wurde erstmals im Jahr 1979 beschrieben. Zunächst als tumorassoziiertes Antigen beschrieben, wurde es als eines der ersten Zielproteine für Antikörper assoziierte Tumortherapien verwendet (Herlyn et al., 1979b; Riethmüller et al., 1994). Über die Funktion des Proteins war lange Zeit lediglich bekannt, dass es homophile Adhäsion zwischen Zellen vermittelt und die E-Cadherin vermittelte Adhäsion unterdrückt (Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2003a). Erst in den letzten Jahren, nicht zuletzt durch Arbeiten unserer Gruppe, konnte gezeigt werden, dass EpCAM in einer Vielzahl weiterer Bereiche involviert ist. Mit der Suche nach Markern für sogenannte „*cancer initiating cells*“ (CIC), oder auch Tumorstammzellen genannt, kam die Hypothese auf, dass eine hohe EpCAM-Expression, neben Proteinen wie CD133 und CD44, zur Signatur dieser Zellen, zumindest in Kolon-, Brust- und Pankreaskarzinomen, beiträgt (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; Visvader and Lindeman, 2008; Gires et al., 2009a). Ein weiteres, relativ neues Forschungsgebiet umfasst die Funktion von EpCAM in normalen Stammzellen. Es war bereits bekannt, dass EpCAM in der Keimbahn (Anderson et al., 1999) in den ersten Entwicklungsstadien (Tarmann et al., 1990), wie auch auf humanen Stammzellen (Stingl et al., 2005) stark exprimiert ist. Nun konnte jedoch in murinen wie auch humanen Stammzellen gezeigt werden, dass EpCAM zur Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps beiträgt (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2009). Zudem wurde EpCAM eine morphoregulatorische Rolle bei der Embryo- sowie Organogenese zugeordnet (Trzpis et al., 2007b; Trzpis et al., 2008a), sowie eine Beteiligung bei der Repopulation von verletztem Gewebe aufgezeigt (Trzpis et al., 2008b). Im Jahre 2004 (Munz et al., 2004; Osta et al., 2004) wurde zum ersten Mal publiziert, dass EpCAM-Proliferation vermittelt und Zielgene wie MYC, CCNA und CCNE sowie FABP5 (Munz et al., 2005) aktiviert. 5 Jahre später gelang es unserer Gruppe den kompletten Signaltransduktionsweg von EpCAM aufzuschlüsseln (Carpenter and Red Brewer, 2009; Maetzel et al., 2009). Dabei wurde gezeigt, dass EpCAM durch regulierte Intramembranproteolyse (RIP) (Rawson, 2002; Hass et al., 2009) prozessiert und damit aktiviert wird. Bei dieser Prozessierung kommt es zu einem zweistufigen Mechanismus, welcher zunächst den extrazellulären und darauf folgend den intrazellulären Teil von EpCAM abspaltet. Die freie intrazelluläre Domäne kann sodann an seine Interaktionspartner FHL2 und  $\beta$ -Catenin binden und im Nukleus, zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Lef1, TCF/Lef-spezifische DNA-Sequenzen targetieren.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das grundlegende Prinzip des EpCAM-Signalweges bereits postuliert (RIP, Interaktionspartner), es mussten jedoch noch detaillierte Beweise für diese Theorie erbracht werden. Gerade der intrazelluläre Teil EpCAM's, welcher als signalübermittelnde Domäne essentiell für die Signaltransduktion ist, sollte noch eingehender in seiner Funktion untersucht werden. Daneben wurde der Weg von EpiCD in den Zellkern weiterverfolgt und nach neuen Zielgenen gesucht.

## 5.1 EpICD als signaltransduzierende Domäne

### 5.1.1 EpICD

Membranständiges EpCAM wird durch die beiden Proteasen TACE und  $\gamma$ -Sekretase in einen löslichen extrazellulären Part (EpEX) sowie einen zytoplasmatischen intrazellulären Part (EpICD) gespalten. EpICD besteht aus 26 Aminosäuren, was einem errechneten Molekulargewicht von 3,2 kD entspricht. Bei Auftrennung des Peptids auf einem SDS-Gel zeigte sich jedoch, dass es ein apparentes Molekulargewicht von ca. 4 kD hat (Abb. 4.1). Solch kleine Peptide sind oft schwer zu detektieren. Ein Grund dafür ist die methodische Schwierigkeit des Nachweises auf einem SDS-Gel. Die Auftrennung von Proteinen mit geringem Molekulargewicht wird durch überschüssiges SDS welches im elektrischen Feld mit ähnlicher Geschwindigkeit läuft beeinträchtigt (Fish et al., 1970). Mit dem verwendeten Gel- und Puffersystem nach Schagger und Jagow kann dieser SDS bedingte Effekt teilweise umgangen werden (Schagger and von Jagow, 1987). Das geringe Molekulargewicht ist jedoch nicht alleine für die hohe Instabilität von ICDs verantwortlich. Ebenso sind auch andere zytoplasmatische Domänen wie die von NOTCH (NICD), DCC (DCC-ICD) und APP (AICD), welche ein weitaus höheres Molekulargewicht aufweisen, nur schwer nachzuweisen (Pahl and Baeuerle, 1996; Cupers et al., 2001; Oberg et al., 2001; Taniguchi et al., 2003). Neben den technischen Problemen kommt hinzu, dass Peptide im Zytoplasma oft vom Proteasom als Substrat erkannt und abgebaut werden. Untersuchungen mit synthetisch hergestelltem EpICD konnten zeigen, dass im Zelllysate enthaltene Proteasen die Nachweisbarkeit des EpICD-Peptids klar beeinträchtigten (Abb. 4.2). Die Behandlung von EpCAM positiven Zellen mit Proteasominhibitoren führte zu einer Stabilisierung von EpICD (Maetzel et al., 2009), so dass von einer raschen und effizienten Degradation von EpICD durch das Proteasom ausgegangen wird. Dieses Phänomen ist auch bei anderen Rezeptoren, die durch RIP prozessiert werden, bekannt (Hass et al., 2009). Der N-Terminus des durch Proteolyse entstandenen ICD-Fragments bestimmt dabei die Stabilität des Peptids. ICD-Fragmente, welche mit einem Methionin oder Valin beginnen, können einer Ubiquitinierung und somit einem raschen Abbau durch das Proteasom entkommen (Mogk et al., 2007; Tasaki and Kwon, 2007). Die Aminosäuresequenz von EpICD beginnt mit einem Serin und sollte folglich nicht vor dem proteasomalen Abbau geschützt sein. In nativen Kernextrakten konnte EpICD jedoch ohne Probleme detektiert werden (Maetzel et al., 2009), was auf eine Stabilisierung der Signaldomäne in Kernkomplexen hinweist.

Eine wesentliche Rolle von EpICD bei zellulären Vorgängen wird durch eine evolutionäre Konservierung eines Motives (nYnKAEnKEN) innerhalb der 26 Aminosäuren über verschiedene Spezies bis hin zum Zebrafisch untermauert (laufende Untersuchungen von B. Gonzalez und PD Dr. O.Gires). Zum einen beinhaltet EpICD Lysinreste, welche für eine Ubiquitinierung notwendig sind und somit eine Regulierung der Stabilität von EpICD als Signaldomäne erlauben. Zum anderen ist das konservierte Motiv durch negative Ladungen charakterisiert und könnte somit prinzipiell mit positiv-geladenen, DNA-bindenden Proteinen wechselwirken.

### 5.1.2 EpICD vermittelte Effekte

Durch verschiedene Versuche konnte belegt werden, dass EpICD die signalübermittelnde Domäne von EpCAM ist. Auf die untersuchten Effekte soll in Folgendem eingegangen werden.

Eine EpCAM-Überexpression in Krebszellen zerstört die E-Cadherin vermittelten, festen Zell-Zell-Kontakte (Winter et al., 2003a) und ermöglicht somit, dass Zellen sich aus dem Zellverband lösen und migrieren können. Dies lässt vermuten, dass die Expression von EpCAM die Metastasierung von Tumoren fördert, was bereits in Experimenten und Studien an Mensch und Tier bestätigt wurde (Tandon et al., 1990; Wurfel et al., 1999; Seligson et al., 2004; Spizzo et al., 2004; Kuhn et al., 2007; Brunner et al., 2008; Aktas et al., 2009). In vitro konnte gezeigt werden, dass es nach einer Repression von EpCAM in Brustkrebszellen zu einer Minderung der Migration und der Invasivität dieser Zellen kommt (Osta et al., 2004). Eine Verminderung der EpCAM-Expression korreliert jedoch nicht stets mit einer reduzierten Migration und Invasivität. Bei gastrointestinalen Karzinomzelllinien wurde der umgekehrte Effekt beobachtet (Will Gillanders, EpCAM meeting 2008), so dass offensichtlich Entitäten-spezifische Unterschiede bestehen. Diese Ergebnisse stehen in Kontradiktion zu Befunden, welche eine Rolle von EpCAM bei der Invasion und Metastasierung in Kolorektalkarzinomen aufwiesen (Basak et al., 1998; Kuhn et al., 2007; Nubel et al., 2009).

Die soeben erwähnten in vitro Versuche (Osta et al., 2004) wurden unter Zuhilfenahme der Boyden-Chamber durchgeführt, wie die in dieser Arbeit unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen Versuche an FaDu-Zellen. In der verwendeten Hypopharynx-Karzinom-Zelllinie zeigten die Zellen nach einer Repression von EpCAM eine verringerte Bereitschaft zur Migration. Dieser Effekt konnte teilweise durch die Komplementation von EpICD revertiert werden. Boyden-Chamber Migrationsversuche sind durch eine verhältnismäßig hohe Streuung gekennzeichnet und wurden deshalb durch eine zusätzliche Technik der Firma Ibidi zur Bestimmung des Migrationsverhaltens der Zellen ergänzt (Zengel, 2009). Auf diese Weise konnte das oben beschriebene Ergebnis mit einer verlässlicheren Aussage in Anbetracht der Standardabweichungen reproduziert werden. Somit kann gesagt werden, dass EpCAM und EpICD in Karzinomzellen des Kopfhals-Bereiches die Migrationsfähigkeit erhöhen.

Neben der Zell-Adhäsion ist eine Steigerung der Proliferation, indem Zielgene wie z.B. MYC hochreguliert werden (Munz et al., 2004; Maaser and Borlak, 2008; Maetzel et al., 2009), einer der ersten beschriebenen Effekte von EpCAM. In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden, dass diese Funktion von EpCAM auf EpICD zurückzuführen ist. EpCAM-Repression bewirkte einen Rückgang der Zellzahlen, welcher durch eine ektopische Komplementation des intrazellulären Anteils nahezu ausgeglichen wurde. Folgerichtig bewirkte eine Überexpression von EpICD in HEK293-Zellen eine Zunahme der Zellzahlen im Verhältnis zu Kontrollzellen. Eine erhöhte Zellzahl kann auf verschiedene Mechanismen basieren: erhöhte Proliferation, verminderte Apoptose oder ein Zusammenspiel beider Vorgänge. Nach einer si-RNA-vermittelten Repression der endogenen EpCAM-Expression konnte eine leichte Erhöhung apoptotischer Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt konnte jedoch nicht durch eine Komplementation mit EpICD revertiert werden. Damit kann der Anstieg an apoptotischen Zellen

nach Herunterregulation von EpCAM nicht auf die EpICD vermittelte Signalübertragung zurückgeführt werden, sondern vielmehr auf verminderte Zelladhäsion oder Anoikis (Chiarugi and Giannoni, 2008). Weitere „*off-target*“ Effekte der siRNA, die sich auf die Apoptoserate auswirken, können nicht ausgeschlossen werden. Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 war nach EpCAM-Repression eindeutig vermindert, konnte durch EpICD-Ko-Expression jedoch stabilisiert werden. Demnach kann von einem direkten Effekt der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion auf die Proliferation, jedoch nicht auf die Apoptose ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch den Befund einer Abhängigkeit von EpICD bei der Induktion von c-Myc bestärkt. EpCAM und EpICD beeinflussen nicht nur die Menge an MYC mRNA, sondern auch die Proteinmenge. Experimente über 36 Stunden zeigten, dass nach EpCAM-Repression der c-Myc Proteinspiegel stetig abfiel, jedoch erst nach einer gewissen Zeitspanne von EpICD komplementiert werden konnte (Abb. 4.13). Dies ist zu erklären, da EpICD nach Transfektion erst Transkriptions-Translations-Maschinerie durchlaufen muss, während die zugegebene Nukleinsäure direkt an seine Ziel-RNA binden und EpCAM reprimieren kann.

In Xenotransplantationsversuch in Mäusen konnte zusätzlich zu den zellspezifischen Effekten *in vitro* das onkogene Potential von EpICD *in vivo* nachgewiesen werden. EpICD- und EpCAM-exprimierende Zellen induzierten in 100% aller Fälle nach subkutaner Injektion in die Flanke von SCID Mäusen die Formation eines Tumors. Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrollzell-Gruppe in nur einem Tier ein Tumor, welcher zudem nur ein Zehntel der Größe von EpCAM Tumoren aufwies, isoliert werden. Die EpICD Tumore unterschieden sich von den EpCAM Tumoren lediglich durch eine geringere Größe, welche jedoch nicht signifikant war. Es ist anzunehmen, dass die Bedingungen für die Formierung des Signal-Komplexes in EpICD exprimierenden Zellen nicht optimal sind. Wie in EMSA Experimenten gezeigt wurde, wird der Kernkomplex in EpCAM exprimierenden Zellen stärker als in EpICD exprimierenden Zellen gebildet (Maetzl et al., 2009). Möglicherweise kann die Bildung des Signalkomplexes nur an der Plasmamembran geordnet und zielgerichtet ablaufen, während dies im Zytoplasma in Lösung zwar möglich, jedoch erschwert ist. In der *in vivo* Situation können weitere Faktoren eine Rolle spielen. So kommen vermutlich auch adhäsionsbedingte Effekte zum tragen, welche durch die homophile Verbindung zweier EpCAM-Moleküle an der Oberfläche von Zellen bewirkt werden. Zudem spielt im Tier auch die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen und die Wechselwirkung mit extrazellulärer Matrix eine Rolle, wobei der extrazelluläre Anteil von EpCAM eine Rolle spielen könnte.

Bei der Suche nach einer Signatur für CICs konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen mit einer hohen EpCAM-Expression, neben der Expression anderer Proteine wie CD44 und CD133, bei Injektion in NOD/SCID Mäuse Tumor initiierende Eigenschaften haben (Marhaba et al., 2005; Dalerba et al., 2007; Gires et al., 2009b; Xu et al., 2009). In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung der EpCAM-Spaltung und der Kerntranslokation in CICs *in vivo* von großem Interesse. Eine zentrale Rolle von EpCAM in humanen und murinen embryonalen Stammzellen (ES) wurde kürzlich publiziert (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2009). In murinen ES-Zellen führte eine siRNA-vermittelte Hemmung der EpCAM-Expression zu einem Verlust der Proliferation und induzierte einen differenzierten Phänotyp (Gonzalez et al., 2009). Dieser Phänotyp war

mit einer Regulation von Stammzellmarkern wie SSEA-1, c-Myc und Oct3/4 durch EpCAM assoziiert. Eine deregulierte Funktion von EpCAM, welche die verstärkte Malignität von CICs bedingt, ist folglich vorstellbar. CICs werden als vielversprechende Zielzellen zur Therapie von Tumoren betrachtet (Zhou et al., 2009), da sie als Quelle für Primärtumore, Metastasen und Rezidiven *in vivo* betrachtet werden. Die Kenntnis um eine solche Funktion von EpCAM ist daher im Rahmen innovativer Therapieansätze, die eine Ausrottung von CICs zum Ziel hat, von Bedeutung.

## 5.2 Initiale Aktivierung des EpCAM Signalweges durch Zell-Zell-Kontakt

### 5.2.1 Mechanismus

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, ist der zytoplasmatische Teil von EpCAM für die Signaltransduktion essentiell und ausreichend. Da EpICD durch eine regulierte intramembrane Proteolyse generiert wird, stellt sich die Frage nach dem initialen Auslöser dieser Spaltung. Erste Hinweise konnten durch unterschiedliche Immunfluoreszenzfärbungen der intrazellulären und extrazellulären Domäne von EpCAM an Karzinomzellen erbracht werden. Bei Betrachtung von angefärbten Fadu Zellagglomerate war auffällig, dass gespaltene EpCAM-Moleküle vermehrt in Zonen von Zell-Zell-Kontakt zu finden waren (Maetzel et al., 2009). In diesen Bereichen konnte EpICD vermehrt im Zytoplasma und weniger oder gar nicht an der Zellmembran gefunden werden. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Proteolyse durch Interaktionen der EpEX Domänen ausgelöst wird. Um diese Vermutung zu untermauern wurden Versuche mit rekombinantem, löslichem EpEX an Einzelzellen der FaDu Karzinomzelllinie durchgeführt. Auch hier konnte eine vermehrte Spaltung der intakten EpCAM-Moleküle nach Zugabe des Liganden zu einzeln gewachsenen Zellen beobachtet werden (Maetzel et al., 2009). Die Aktivierung von Rezeptoren durch abgespaltene Ektodomänen konnte bereits für andere Proteine wie L1, NrCAM, TNF-R und EGF-R gezeigt werden (Fagotto and Gumbiner, 1996; Mechttersheimer et al., 2001; Conacci-Sorrell et al., 2005; Gavert et al., 2005; Stoeck et al., 2007) und erscheint somit als gemeinsames Merkmal von RIP-induzierten Rezeptoren. Auf diesen Punkt wird in Kapitel 3 der Diskussion näher eingegangen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Notwendigkeit eines Zell-Zell Kontaktes zur Induktion der EpCAM-Spaltung näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM bei zunehmender Dichte in Kultur verstärkt gespalten wird (Denzel et al., 2009). Damit verbunden, wurden auch Zielgene unter höherer Dichte vermehrt induziert und die Proliferation der Zellen gesteigert. Bei einer maximalen Dichte kam es jedoch erwartungsgemäß zu einer Kontaktinhibition und zu einer verminderten Proliferationsrate (Fagotto and Gumbiner, 1996). Unter geringer Dichte (Einzelzellen) zeigte eine Domänen-spezifische Färbung eine deutliche membranassoziierte Färbung von EpEX und EpICD, welche auf intakte EpCAM-Moleküle hinwies. Sobald die Dichte auf ca. 20% Konfluenz erhöht wurde, sodass Zell-Zell-Kontakt ermöglicht wurde, kam es zu einer Spaltung von EpCAM-Molekülen und EpICD war mehrheitlich im Zytoplasma und im

Zellkern lokalisiert. Interessanterweise konnte eine abermals veränderte Lokalisation von EpICD beobachtet werden, wenn Zellen mit 80-90% Konfluenz ausplattiert wurden. Unter dieser hohen Dichte lag EpCAM zwar ausschließlich gespalten vor, jedoch konnte EpICD nur in verminderter Menge im Zellkern detektiert werden und akkumulierte vorrangig perinukleär (Denzel et al., 2009). Es ist zu vermuten, dass hier ein aktiver Mechanismus greift, welcher die Kerntranslokation verhindert. Wie es von Nfκb (Baeuerle and Baltimore, 1988) und Östrogenrezeptoren (McDonnell and Norris, 2002) bekannt ist, könnte beispielsweise ein Inhibitor EpICD im Zytoplasma zurückhalten. Es wäre auch vorstellbar, dass Kernporenkomplexe blockiert werden oder die Bindung an Importine gestört wird. Die Beantwortung dieser Fragestellung soll Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Um die soeben beschriebenen Ergebnisse nun eindeutig mit EpCAM-spezifischen Effekten zu verbinden, wurde in dieser Arbeit ein artifizielles HEK293 Zellsystem etabliert, in dem EpCAM oder EpICD bzw. EpICD-HA überexprimiert wurden. Es zeigte sich, dass EpCAM exprimierende Zellen lediglich unter hoher Dichte einen Proliferationsvorteil gegenüber Kontrollzellen besitzen, einhergehend mit einer verstärkten Expression von c-Myc. Dagegen zeigten EpICD exprimierende HEK293 Zellen sowohl unter niedriger als auch unter zehnfach erhöhter Dichte einen Wachstumsvorteil sowie eine erhöhte c-Myc Expression gegenüber Kontrollzellen. In HEK293 EpICD bzw. EpICD-HA Zellen liegt der signalvermittelnde Anteil EpCAMs bereits in gespaltenen Form im Zytoplasma vor und kann somit unabhängig von Zell-Zell-Kontakten Signale vermitteln. Um die Frage zu klären, ob die Kerntranslokation von EpICD für die Funktion essentiell ist, wurde ein induzierbares HEK 293 Zellsystem generiert. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Retention von EpICD im Zytoplasma die Funktion der Signaldomäne verhindert und, dass eine Kerntranslokation unabdinglich ist. Dies spielt vor allem in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen von HCT-8 und MCF-7 Zellen eine Rolle (Denzel et al., 2009). Da unter hoher Dichte in diesen Zellen nur wenig EpICD im Kern zu finden war und sich der Großteil perinukleär anreichterte, wirft dies im Umkehrschluss die Hypothese auf, dass dabei keine Signale vermittelt werden. Diese Hypothese kann auch durch die verlängerten Verdopplungsraten bei zu hoher Dichte bestätigt werden (Denzel et al., 2009).

Wie gezeigt wurde, kann die EpCAM-Spaltung bzw. die EpCAM Signaltransduktionskaskade durch interzellulären Kontakt ausgelöst werden (Abb. 4.16 - 4.18 und (Denzel et al., 2009)). Es ist bekannt, dass EpCAM-Moleküle in Lösung Dimere und Tetramere bilden (Trebak et al., 2001). Zudem konnte in einer humanen Karzinomzelllinie gezeigt werden, dass EpCAM-Moleküle in einer Einzelzellsuspension als Dimer, in einem Monolayer als Tetramer vorliegt (Trebak et al., 2001). Es ist daher vorstellbar, dass der Kontakt zweier EpCAM-Moleküle auf derselben Zelle konstitutiv stattfindet, der primäre Auslöser für die Spaltung jedoch der interzelluläre Kontakt und damit eine Tetramerisierung der Moleküle ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass EpEX Moleküle in Lösung nicht aneinander binden, jedoch die Oligomerisierung von EpCAM Vollängenmolekülen nicht behindern (Trebak et al., 2001). Es wäre denkbar, dass monomeres EpEX direkt an die intrazellulär ausgebildeten EpCAM-Dimere bindet und damit die Spaltung auslöst. Dies würde erklären warum das gespaltene EpEX in dichten Kulturen nicht oligomerisiert, sondern für die weitere Initiierung von Spaltungen als Monomer zur Verfügung

stehen kann. Die Signalvermittlung würde somit ähnlich wie bei TNF-Rezeptoren, erst nach Oligomerisierung des Rezeptors (Tetramer bestehend aus zwei EpCAM Dimeren oder einem EpCAM Dimer und 2 EpEX Monomeren) initiiert werden (Wallach et al., 1999; Hehlhans and Pfeffer, 2005).

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass EpCAM aufgrund einer juxtakrinen Initiierung bei welcher mindestens zwei, wahrscheinlich jedoch vier, EpCAM-Moleküle extrazellulär interagieren, aktiviert wird. Zusätzlich findet eine sekundäre parakrine Aktivierung in einer Art positiven Rückkopplungsschleife statt. Dabei kann das bereits gespaltene EpEX als löslicher Ligand die Proteolyse weiter vorantreiben, was die Aktivierung der EpCAM-Spaltung noch flexibler gestaltet. Der Aufbau eines Gradienten von löslichem EpEX im Gewebe würde eine Feinabstimmung der Aktivierung ermöglichen.

### 5.2.2 In vivo Relevanz

Diese Art der Aktivierung erlaubt eine feine Modulation EpCAM vermittelter Effekte in vivo. Man könnte sich z.B. vorstellen, dass EpCAM in disseminierten Tumorzellen andere Effekte vermittelt als in bereits etabliertem Tumorgewebe. Einzelne disseminierte Tumorzellen besitzen keine EpCAM exprimierenden Nachbarzellen und gleichen somit Zellen unter Einzelzellbedingungen. In diesem Zustand liegen die EpCAM-Moleküle intakt vor, d.h. EpICD kann nicht als Signalvermittelnder Anteil agieren. Deshalb wird von EpCAM in diesen Zellen keine Proliferation induziert und sie befinden sich in einem quieszenten Zustand. Eine Dichte in der sich jeweils wenige Zellen zu Kolonien zusammenfinden ist vergleichbar mit Mikrometastasen oder Stammzellen bzw. Vorläuferzellen in verletzten Organen. Dort befinden sich die Zellen nicht in einer komplexen Anordnung, haben aber Kontakt zu anderen EpCAM exprimierenden Zellen. Hier ist es essentiell, dass EpCAM Proliferation und Migration vermittelt. Das Expressionsmuster in solch kleinen Zellagglomeraten unterstreicht diese Hypothese, da hier am meisten EpICD im Zellkern gefunden wurde (Denzel et al., 2009). In bereits etablierten Tumoren sind EpICD vermittelte Effekte nicht zwangsläufig notwendig, da diese Tumore oft nicht mehr wachsen bzw. nur noch an der invasiven Front Proliferation aufweisen. Somit kann hier durchaus ein Mechanismus zum Tragen kommen, welcher EpICD an der Signalübermittlung durch Translokation in den Zellkern hindert.

Die Aktivierung von EpCAM kann zudem durch die unterschiedliche Lokalisation in gesundem Gewebe und Karzinomen moduliert werden. Anfärbungen von normaler Schleimhaut aus dem Darm und von Kolonkarzinomen zeigten, dass EpICD ausschließlich in malignem Gewebe im Kern vorlag (Maetzel et al., 2009). Eine signaltransduzierende Funktion von EpCAM ist daher in normaler, differenzierter Kolonschleimhaut nur schwach oder gar nicht zu erwarten. Diese Beobachtung kann nun entweder in direktem Zusammenhang mit der Proteolyse stehen und/oder wie oben bereits erwähnt mit einer beeinflussten Kerntranslokation von EpICD einhergehen.

Zudem spielt für die Aktivierung von EpCAM der Glykosylierungsgrad von EpEX eine Rolle. Es wurde beobachtet, dass im Vergleich zu Karzinomen EpCAM in gesundem Gewebe weniger bis gar nicht glykosyliert ist (Pauli et al., 2003). Diese Modifikation hat bedeutende Auswirkungen

auf die Stabilität des Moleküls, da gezeigt werden konnte, dass die Glykosylierung an Asp<sup>198</sup> die Retentionszeit von EpCAM an der Plasmamembran um das Dreifache steigert (Munz et al., 2008). Diese Stabilisierung des Moleküls an der Oberfläche einer Zelle könnte die Wahrscheinlichkeit einer Aktivierung durch Kontakt mit anderen EpCAM-Molekülen erhöhen.

EpCAM befindet sich an der Zellmembran in einem Netzwerk von assoziierten Proteinen (Claas et al., 2005; Ladwein et al., 2005; Le Naour et al., 2006; Nubel et al., 2009). Darunter befinden sich Claudin-7, Tetraspanine und CD44, ein Transmembranprotein welches selbst gespalten wird. Der Auf- und Abbau solcher Multiprotein Komplexe könnte ebenfalls die Aktivierung von EpCAM *in vivo* beeinflussen. Assoziierte Proteine könnten einerseits die inter- und/oder intrazelluläre Interaktion von EpCAM-Molekülen sterisch behindern. Andererseits wäre es aber auch denkbar, dass durch Bindung von Korezeptoren die Interaktion von EpCAM-Molekülen erleichtert oder sogar erst ermöglicht wird. Ein Beispiel für eine interaktionsabhängige Regulation von Transmembranproteinen ist CD44. CD44 kommt in zwei Aktivierungszuständen vor. Wenn CD44 Wachstumsfaktoren bindet und den eigentlichen Rezeptoren präsentiert, vermittelt CD44 Proliferation und Invasivität. Dann ist der zytoplasmatische Teil an Ezrin oder Moesin gebunden und kann so eine Verbindung zum Zytoskelett schaffen. Der Wechsel in den zweiten Aktivierungszustand von CD44 wird dann induziert, wenn Zellen konfluent werden. Dann kann die ECM Komponente Hyaluronat an den Rezeptor binden, was wiederum dazu führt dass Merlin, ein Tumor-Supressor-Protein, an den zytoplasmatischen Teil von CD44 binden kann. Diese Interaktion mit Merlin vermittelt einen Wachstumsstopp und wird somit als Mechanismus im Zuge der Kontakt-Inhibierung angesehen (Herrlich et al., 2000). Ähnliche Mechanismen könnten auch bei EpCAM in den unterschiedlichen Dichten eine Rolle spielen.

### 5.3 Vergleich von EpCAM mit anderen RIP-prozessierten Molekülen

Der Mechanismus, welcher der EpCAM Prozessierung zu Grunde liegt, wurde bereits für viele Proteine beschrieben und wird als RIP („*regulated intramembrane proteolysis*“ = regulierte Intramembranproteolyse) bezeichnet. Es handelt sich hierbei um Klasse-I-RIP, da EpCAM zu den Typ-I-Transmembranproteinen zählt, welche durch einen zytoplasmatischen C-Terminus charakterisiert sind. Die Klasse-II-RIP bezieht sich entsprechend auf Membranrezeptoren, deren zytoplasmatische Domäne der N-Terminus des Proteins ist. Die zu prozessierende Transmembranproteine durchlaufen dabei zwei sequenziell aufeinanderfolgende Spaltungen. Die erste Spaltung wird meist durch eine Membran-assoziierte ADAM-Metalloprotease durchgeführt, was zur Freisetzung der extrazellulären Domäne (Ektodomäne) führt. Die Freisetzung der Ektodomäne ist eine Grundvoraussetzung für die zweite Spaltung, welche durch einen  $\gamma$ -Sekretase-Komplex gewährleistet wird und die intrazelluläre Domäne in das Zytoplasma freisetzt (Medina and Dotti, 2003). Der Mechanismus der RIP kann entweder zur Aktivierung des Moleküls führen, indem die „aktive“ zytoplasmatische Domäne freigesetzt wird (z.B. Notch (Schroeter et al., 1998), EpCAM (Maetzel et al., 2009), L1 (Riedle et al., 2009)), oder aber Funktionen, welche normalerweise vom Vollängenmolekül ausgehen, werden inhibiert (e.g.

DCC, (Parent et al., 2005)). Im Fall von ErbB4 konnte gezeigt werden, dass sowohl das membrangebundene Protein (Phosphorylierung seines Substrates) als auch das abgespaltene intrazelluläre Fragment (nukleärer Transkriptionskomplex) in der Zelle Signalfunktionen besitzt. (Zhou and Carpenter, 2000; Arasada and Carpenter, 2005; Hass et al., 2009).

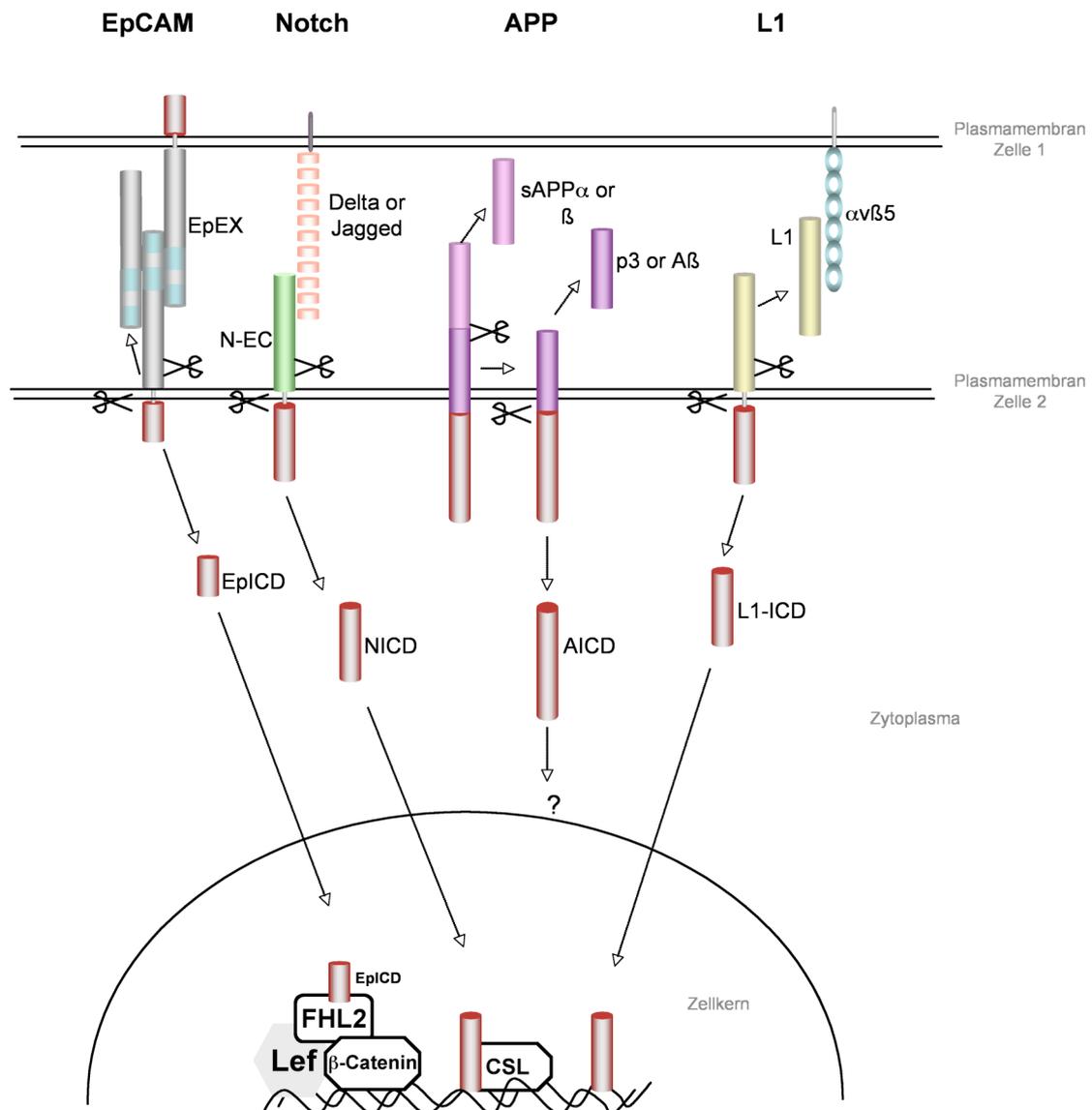
Bei EpCAM wird die Spaltung durch TACE und Presenilin-2, als aktive Proteasen, bewerkstelligt. Die membrangebundene extrazelluläre Domäne wie auch die lösliche Ektodomäne, fungieren dabei als Aktivator für die Spaltung (Denzel et al., 2009; Maetzel et al., 2009).

In folgendem sollen die RIP assoziierten Mechanismen, welchen EpCAM unterliegt, mit anderen in gleicher Weise prozessierten Proteinen verglichen werden. Es sollen Parallelen wie auch Unterschiede aufgezeigt werden. In Abbildung 5.1 sind die wichtigsten Merkmale der Proteolyse der betrachteten Proteine aufgezeigt.

Notch ist ein Paradebeispiel, welches zu den ersten identifizierten RIP-I prozessierten Transmembranproteinen gehört (Chan and Jan, 1998). Durch die Metalloprotease ADAM10 oder TACE (ADAM17) wird in einem ersten Schritt die extrazelluläre Domäne abgespalten. Diese Spaltung wird durch Bindung eines Liganden ausgelöst, welcher entweder der Delta oder Jagged Familie angehört und ebenfalls wie Notch durch Proteolyse aktiviert wird (Klug et al., 1998; Qi et al., 1999). Die daraufhin durch einen Presenilin1- $\gamma$ -Sekretase-Komplex freigesetzte intrazelluläre Domäne wandert in den Kern und bindet dort an das DNA-Bindeprotein CSL (CBF-1/Suppressor of Hairless/Lag-1), woraufhin weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden und den CSL Komplex bilden (Schroeter et al., 1998; Bray, 2006). Somit unterliegen Notch und EpCAM sehr ähnlichen Mechanismen, insbesondere was die Kerntranslokation und DNA-Bindung der intrazellulären Domäne über Transkriptionsfaktoren betrifft. In ihrer Aktivierung unterscheiden sie sich jedoch, da EpCAM durch eine homophile Adhäsion aktiviert werden kann, während Notch eine Ligandenbindung benötigt. Die beiden Moleküle weisen innerhalb der Transmembrandomäne eine hohe Sequenzhomologie auf und stimmen an der Spaltstelle im Notch-Rezeptor (Valin<sup>1743</sup>) überein (Schroeter et al., 1998). Dennoch wurde bei Notch Presenilin1 und bei EpCAM Presenilin2 als aktive  $\gamma$ -Sekretasen beschrieben (Schroeter et al., 1998; Maetzel et al., 2009).

APP (Amyloid-Precursor-Protein) ist ein weiteres hervorragend erforschtes RIP-I prozessiertes Molekül. Die Abspaltung der extrazellulären Domäne (sAPP $\alpha$  oder sAPP $\beta$ ) erfolgt konstitutiv, Liganden unabhängig und wird entweder durch eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase vermittelt. Obwohl Liganden für APP identifiziert wurden, wird vermutet, dass diese lediglich die konstitutive Spaltung in einer quantitativen Weise modulieren und nicht an der initialen Aktivierung beteiligt sind (Ho and Sudhof, 2004; Ma et al., 2008). Das besondere bei APP ist, dass je nach Sekretase ein unterschiedlich großes Fragment in der Membran zurückbleibt. Dieses Bruchstück wird anschließend durch einen Presenilin1- $\gamma$ -Sekretase-Komplex weiter gespalten und das lösliche p3 Peptid ( $\alpha$ -Sekretase) oder A $\beta$  ( $\beta$ -Sekretase) generiert. Beide Ereignisse werden von der Freisetzung der intrazellulären Domäne von APP (AICD) begleitet (Selkoe and Kopan, 2003). Es wird vermutet, dass A $\beta$  toxisch ist und eine Anhäufung mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang steht (Small et al., 2001). Für AICD wird eine Translokation in den Nukleus, mit anschließender Funktion als Transkriptionsfaktor und Aktivierung von Zielgenen, vermutet (Cao

and Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004). Dies konnte bisher jedoch zumeist nur in Systemen gezeigt werden, welchen AICD artifiziell exprimieren (Hass et al., 2009). Zu EpCAM können somit, bis auf die Prozessierung des Moleküls, wenig Parallelen gezogen werden, da sowohl der Initiator der Spaltung wie auch die Funktion der freigesetzten intrazellulären Domäne noch zu wenig erforscht sind.



**Abbildung 5.1: Vergleich von EpCAM mit ausgewählten RIP-I prozessierten Rezeptoren.** Schematische Darstellung der Prozessierung von EpCAM, Notch, APP (Amyloid-Precursor-Protein) und L1. ICD: intrazelluläre Domäne des jeweiligen Rezeptors, CSL: *CBF-1/Suppressor of Hairless/Lag-1*, FHL2: *four and a half LIM domains 2*

L1 ist ein Adhäsionsmolekül, welches zur Immunglobulin Superfamilie der CAM's (*cell adhesion molecules*) gehört. EpCAM ähnelt diesem Molekül in vielerlei Hinsicht. Neben der offensichtlichen Funktion beider Moleküle bei der Entstehung von interzellulärer Adhäsion, ist L1 ebenfalls über Proteine an das Zytoskelett gebunden. Der intrazelluläre Teil von L1 wird über Ankyrin an das Aktin-Spektrin Zytoskelett gekoppelt (Garver et al., 1997; Herron et al., 2009). EpICD bindet über  $\alpha$ -Actinin an das Aktin-Zytoskelett (Balzar et al., 1998). Es kommt bei L1 zu einer sequen-

ziellen Spaltung des Moleküls durch ADAM10 und einem  $\gamma$ -Sekretase-Komplex, mit Presenilin1 als aktiver Komponente. Durch die darauf folgende Kerntranslokation des intrazellulären Anteils werden Zielgene aktiviert (Maretzky et al., 2005; Gast et al., 2008; Riedle et al., 2009). Artifiziiell exprimiertes L1-ICD konnte wie EpICD die Funktionen des Vollängenmoleküls ersetzen (Riedle et al., 2009). Auch die Ektodomäne von L1 spielt, im Vergleich zu EpEX, eine ähnliche wenn auch nicht identische Rolle. Die freigesetzte, lösliche Ektodomäne von L1 kann durch autokrine und/oder parakrine Stimulation des Integrins  $\alpha\beta 5$  Rezeptors spezifische Effekte (z.B. Migration, Proliferation) auslösen (Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003). Das zur gleichen Familie gehörende Transmembranprotein Nr-CAM wird in ähnlicher Weise prozessiert. Es scheint vergleichbare Funktionen wie L1 zu haben und kann ebenfalls über seine Ektodomäne Integrine und damit den ERK und AKT Signalweg ansteuern und aktivieren (Conacci-Sorrell et al., 2005). Beide Proteine, L1 und NrCAM, wurden als Zielgene des  $\beta$ -Catenin-TCF-Signalwegs identifiziert. Auch hier sind Parallelen zu EpCAM zu ziehen, da in hepatozellulären Karzinomen gezeigt wurde, dass EpCAM ebenfalls ein direktes Zielgen der TCF- $\beta$ -Catenin Signaltransduktion ist. Dies konnte durch den Nachweis der Bindung von TCF4 an den EpCAM Promotor gezeigt werden (Yamashita et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RIP-I prozessierte Proteine zwar alle den gleichen Weg der Prozessierung teilen, jedoch häufig Unterschiede zeigen, was die Liganden und die weiteren Funktionen der abgespaltenen Domänen anbelangt.

## 5.4 Genexpressionsanalyse

Experimente aus unserem Labor zeigten, dass der freigesetzte intrazelluläre Teil von EpCAM zusammen mit FHL2,  $\beta$ -Catenin und Lef1 einen Kernkomplex bildet, welcher an TCF/Lef-spezifischen DNA-Konsensussequenzen binden (Maetzel et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass EpCAM in der Lage ist, Zielgene wie MYC, FABP5, CCNA und CCNE zu aktivieren und, dass EpICD für diese Funktion essentiell und ausreichend ist ((Munz et al., 2004; Maetzel et al., 2009) und vorliegende Arbeit Kapitel 4.2 und 4.3). Um weitere Zielgene zu identifizieren, wurde eine Genexpressionanalyse mit Hilfe eines cDNA-Arrays (*Whole genome microarray*; Agilent) durchgeführt. Es wurde das Transkriptom von FaDu-Zellen in Abhängigkeit von der Repression von EpCAM analysiert. Die Extraktion der RNA aus den Zellen wurde 48h nach Transfektion der EpCAM spezifischen siRNA durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die stärkste Repression von EpCAM beobachtet. Die Analyse wurde durchgeführt, um einen Pool an Zielgenkandidaten zu erhalten, welche anschließend weiteren Untersuchungen unterzogen werden konnten.

### 5.4.1 Biologische Prozesse

Unter zu Hilfenahme der PANTHER Software wurden alle mindestens zweifach regulierten Gene zunächst nach biologischen Prozessen geordnet. Der Großteil der Gene gehörte zu den funktionellen Prozessen Signaltransduktion, Entwicklung, Zellkommunikation, Proteinmetabo-

ismus und -modifikation, Zellstruktur und Motilität (Daten nicht gezeigt). In einer publizierten Genom-übergreifenden Analyse, welche EpCAM gesteuerte Einflüsse untersuchte, waren die biologischen Prozesse Zellzyklus, Zelltod, Zellwachstum, Proliferation und Krebs überrepräsentiert (Maaser and Borlak, 2008). Diese heterogene Verteilung über die biologischen Prozesse ist zu erklären, da kein direkter Vergleich zwischen beiden Untersuchungen gezogen werden kann. Zum einen wurde mit verschiedenen Auswertungsprogrammen gearbeitet, welche die biologischen Prozesse unterschiedlich definierten. Zum anderen unterscheidet sich der experimentelle Ansatz bei Maaser und Borlak essentiell von dem hier Beschriebenen. Maaser und Borlak behandelten Lungen- und Kolonkarzinomzelllinien mit EpCAM spezifischen Antikörpern und führten mit kontroll- und antikörperbehandelten Zellen einen cDNA Array durch. Die Behandlung mit Antikörper führte zu einem Anstieg der Proliferation in den Zellen. In vorliegender Arbeit wurde EpCAM in einer Hypopharynx-Karzinomzelllinie reprimiert, was eine Reduktion der Proliferation bewirkte. Trotz der unterschiedlichen Vorgehensweise konnte eine übereinstimmende Regulation in den Bereichen Signaltransduktion/Zellzyklusregulatoren beobachtet werden.

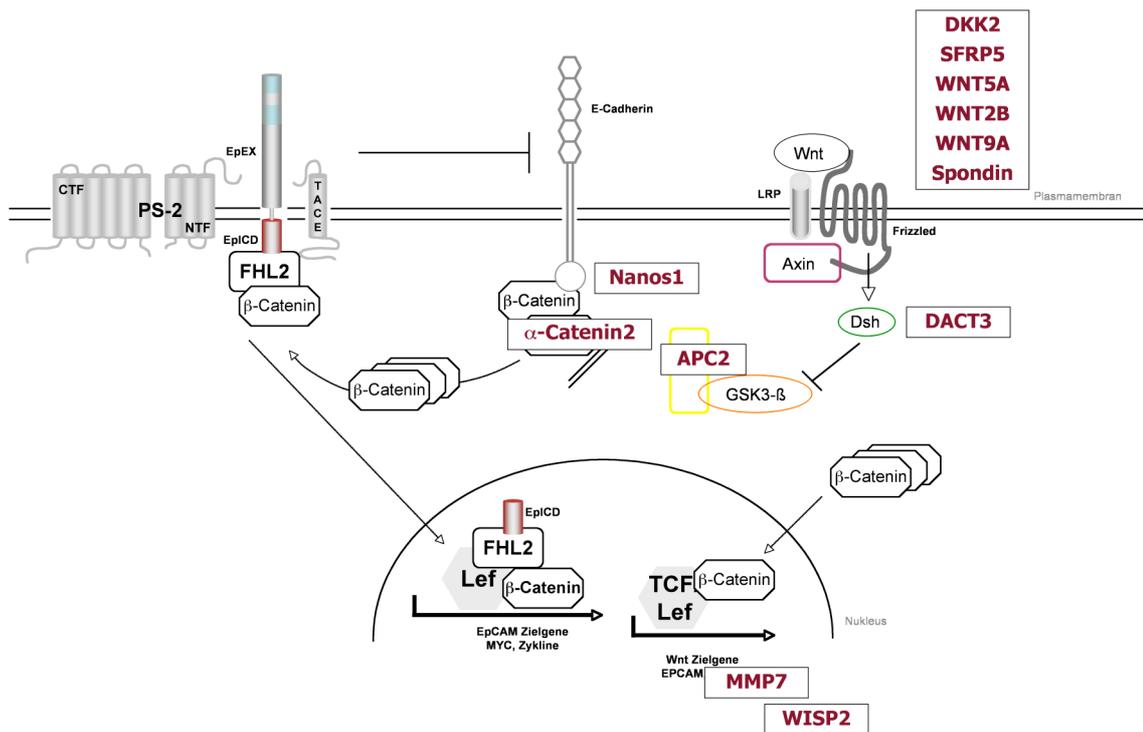
#### 5.4.2 Signalwege und mögliche Wechselwirkungen

Nach Eingruppierung der differentiell regulierten Gene in Signalwege, mittels der PANTHER Software, zeigte sich, dass Proteine bestimmter Signalwege vermehrt dereguliert waren (Abb. 4.25). Proteine aus dem Wnt- und dem Cadherin-Signalweg waren am stärksten überrepräsentiert (Abb. 4.25). Die Signaltransduktionskaskade von EpCAM zeigt Parallelen zu Wnt. Beide Signalwege münden in der Bindung von Kernkomplexen, welche die zentrale Komponente  $\beta$ -Catenin enthalten, an TCF/Lef-spezifische DNA-Sequenzen (Eastman and Grosschedl, 1999; Barolo, 2006; Brembeck et al., 2006; Maetzel et al., 2009). Auf der anderen Seite ist  $\beta$ -Catenin als Bindeglied zwischen E-Cadherin und dem Aktin-Zytoskelett an der Zelladhäsion beteiligt und wurde deshalb schon früher mit EpCAM in Verbindung gebracht (Litvinov et al., 1997). Da diese drei Signalwege scheinbar eng miteinander verknüpft sind, soll dies im Folgenden genauer diskutiert werden (siehe auch Abb. 5.2).

Während der Entwicklung von Karzinomen unterziehen sich Zellen einer sogenannten epithelialen-zu-mesenchymalen Transition (EMT), welche durch den Verlust von Zell-Zell-Adhäsion und einer erhöhten Zellmotilität charakterisiert ist (Hay and Zuk, 1995; Thiery, 2002; Birchmeier, 2005). Ein wesentliches Merkmal dabei, ist der Verlust der E-Cadherin Funktion, durch Dissoziation des E-Cadherin- $\beta$ -Catenin- $\alpha$ -Catenin Komplexes von der Membran (Perl et al., 1998; Brabletz et al., 2001). Der Verlust von E-Cadherin vermittelter Adhäsion korreliert mit einer vermehrten  $\beta$ -Catenin abhängigen Transkription (Orsulic et al., 1999; Gottardi et al., 2001). Damit wird E-Cadherin als Tumorsuppressor betrachtet, da es der Kerntranslokation und damit der Signalkaskade von  $\beta$ -Catenin entgegenwirken kann (Gottardi et al., 2001). Die Signalfunktion von  $\beta$ -Catenin wird hauptsächlich durch Veränderung der Proteinstabilität und -lokalisation reguliert. Der Wnt-Signalweg bewirkt eine Stabilisierung des zytoplasmatischen „freien“  $\beta$ -Catenins. In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird  $\beta$ -Catenin durch einen Proteinkomplex beste-

hend aus APC, Axin, GSK3 $\beta$  und Casein Kinase I gebunden, phosphoryliert und mit Hilfe einer E3-Ubiquitin-Ligase ( $\beta$ TrCP) über das Proteasom abgebaut (Behrens et al., 1998; Kishida et al., 1998). Durch die Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzeld-LRP5/6 Rezeptorkomplex kann, unterstützt durch das Protein *dishevelled*, der Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindert werden, was dazu führt, dass  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Kern transloziert. Dort kann zusammen mit TCF/Lef-DNA-Bindeproteinen die Transkription von Zielgenen aktiviert werden (Behrens et al., 1998; Hoppler and Kavanagh, 2007). Der Wnt-Signalweg ist besonders in Tumoren und während der Embryogenese bzw. in adulten Stammzellen aktiv (Clevers, 2006).

EpCAMs Rolle in dem Zusammenspiel von E-Cadherin und Wnt-Signalweg ist bis dato nur angerissen worden. Die Expression von EpCAM führt zu einer Verschiebung der E-Cadherin-vermittelten starken Adhäsion zu einer EpCAM-vermittelten schwachen Adhäsion zwischen Zellen (Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2003a). Dadurch werden enge Zell-Zell Kontakte gelöst und Funktionen wie Migration oder Invasion begünstigt (siehe dazu auch Kapitel 5.1.2). Eine Implikation der Phosphatidylkinase-3 an der Hemmung von E-Cadherin durch EpCAM wurde publiziert (Winter et al., 2007). Diese Modulation der Adhäsion wird jedoch nicht durch Herunterregulation von E-Cadherin Molekülen bewirkt, sondern durch eine verringerte Interaktion von Cadherinen mit dem Aktin-Zytoskelett.  $\beta$ -Catenin Moleküle, welche zusammen mit  $\alpha$ -Catenin an Cadherine gebunden sind, werden bei einer Expression von EpCAM in das Zytoplasma freigesetzt. Da EpCAM nicht über  $\beta$ -Catenin sondern über  $\alpha$ -Actinin an das Aktin-Zytoskelett bindet, entsteht eine Anhäufung von „freiem“, löslichem  $\beta$ -Catenin. Diese Moleküle können nun entweder durch den Abbaukomplex gebunden und degradiert werden oder über die Induktion des Wnt- und/oder EpCAM Signalweges in den Kern wandern, um dort als Transaktivator zu wirken. Ob diese beiden Signalwege parallel oder in Konkurrenz zueinander ablaufen, ist noch gänzlich unbekannt. Es wäre ebenso denkbar, dass es zu einem additiven oder synergistischen Effekt kommt, indem beide Signalkaskaden ineinandergreifen oder sich gegenseitig regulieren. Dafür würde die Tatsache sprechen, dass sich im Bereich des EpCAM Promotors zwei TCF4-Bindestelle befinden, welche in hepatozellulären Karzinomen durch den Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg gebunden werden (Yamashita et al., 2007). Die Tatsache, dass EpCAM offensichtlich dem Wnt- und Cadherin-Signalweg zugehörige Proteine verwendet und reguliert, trägt zu der Hypothese bei, dass sich die Signalketten gegenseitig beeinflussen. Zudem konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin als Inhibitor des Wnt-Signaltransduktionsweges agiert (Fagotto and Gumbiner, 1996), was auf überlappende Bindestellen von E-Cadherin und TCF-Faktoren mit  $\beta$ -Catenin zurückzuführen ist (Behrens et al., 1998). Die Tatsache, dass die EpCAM und Wnt Signalwege an der Erhaltung des Stammzell-Phänotyps beteiligt (Clevers, 2006; Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2009) und in Tumoren aktiv sind (Spizzo et al., 2004; Went et al., 2006; Maetzel et al., 2009), weist auf die enge Beziehung zwischen beiden Signalwegen hin. Erst kürzlich konnte eine Familie von microRNA's (miR181) identifiziert werden, welche in EpCAM positiven hepatozellulären Karzinomzellen hochreguliert ist. Diese Beobachtung ist in dem hier diskutierten Zusammenhang interessant, da spekuliert wird, dass Wnt/ $\beta$ -Catenin miR181 in Leberstammzellen hochreguliert und damit in einer positiven Rückkopplungsschleife zur Erhaltung des Stammzellphänotyps beiträgt (Ji et al., 2009).



**Abbildung 5.2: Zusammenspiel von EpCAM, E-Cadherin und Wnt-Signalweg.** Die ausgewählten deregulierten Gene wurden an ihren potentiellen Positionen eingefügt: Wnt-Liganden (DKK2, SFRP5, WNT5A, WNT2B, WNT9A, Spondin), Wnt-Signalwegkomponenten (DACT3, APC2), Wnt-Zielgene (MMP7, WISP2), Cadherin-Signalweg-assoziierte Gene (Nanos1,  $\alpha$ -Actinin).

Neben diesen beiden ausführlich besprochenen Signalwegen, konnte ein weiterer, potentiell stark regulierter Signalweg mit Hilfe der Transkriptomanalyse identifiziert werden: der durch Chemokine- und Zytokine-vermittelte Entzündungssignalweg. Wie auch andere CAMs wird EpCAM während einer Entzündungsantwort hochreguliert. So zum Beispiel in entzündlichen Lebererkrankungen (z.B. HBV und HCV Hepatitis) wo EpCAM *de novo* exprimiert wird, was möglicherweise an eine regenerative Aktivität gekoppelt ist (Breuhahn et al., 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass nach Verletzung von Epithelien, EpCAM in den regenerierenden Bereichen von geschädigter Leber oder in Nieren nach einer Ischämie *de novo* oder verstärkt exprimiert wurde (de Boer et al., 1999; Trzpis et al., 2008b). Da chronische Entzündungsreaktionen häufig die Vorläufer einer späteren Hyper- und Dysplasie sind, kann somit spekuliert werden, dass EpCAM nicht nur in bereits ausgebildeten Karzinomen, sondern schon an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist.

### 5.4.3 Ausgewählte potentielle Zielgene von EpCAM

Nachdem eine Eingliederung aller deregulierten Gene in die verschiedenen Signalwege vorgenommen wurde (Abb. 4.25), wurden aus den überrepräsentierten Signalwegen 20 vielversprechende Gene selektiert, validiert und näher untersucht (Kapitel 4.4.3). Dabei hoben sich vor allem zwei Gruppen an Proteinen hervor. Dies sind zum einen Komponenten des Wnt-Signalweges, darunter viele Liganden, und zum anderen extrazelluläre Matrixproteine sowie Matrix-Matelloproteinasen (MMPs).

Tab 5.1: Durch EpCAM deregulierte Gene des Wnt-Signalweges

Name	Funktion im Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg	Rezeptor	zu EpCAM	Literatur
Wnt2b	aktivierend	Frizzled	gegenreguliert	(Katoh, 2005; Katoh and Katoh, 2009)
Wnt9a	aktivierend	Frizzled	koreguliert	(Person et al., 2005)
SFRP5	inhibierend	Frizzled	koreguliert	(Zou et al., 2005; Roman-Gomez et al., 2007; Zhao et al., 2009)
DKK2	aktivierend/ inhibierend	LRP6	koreguliert	(Mao and Niehrs, 2003; Niehrs, 2006)
F-Spondin	evtl. aktivierend	LRP5/6	gegenreguliert	(Kamata et al., 2004; Hendrickx and Leyns, 2008)
Wnt5a	aktivierend/ inhibierend	Frizzled	gegenreguliert	(Torres et al., 1996; Mikels and Nusse, 2006; McDonald and Silver, 2009)
APC2	inhibierend	-	gegenreguliert	(van Es et al., 1999)
WISP2	Zielgen	-	koreguliert	(Pennica et al., 1998)
DACT3	inhibierend	-	koreguliert	(Jiang et al., 2008)
MMP7	Zielgen	-	koreguliert	(Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; Li et al., 2006)

Wie Tabelle 5.1 zu entnehmen ist, werden Wnt-Liganden (Wnt5a, DKK2, SFRP5, Wnt9a, Wnt2b, F-Spondin) durch EpCAM heterogen reguliert.

Das in Tumoren häufig durch Promotormethylierung herunterregulierte SFRP5 ist mit EpCAM koreguliert (Zou et al., 1997; Roman-Gomez et al., 2007; Zhao et al., 2009). Arbeiten von Johanna Gostner zeigen (EpCAM meeting 2008), dass SFRP1, ebenfalls ein inhibierender Wnt Ligand, zu EpCAM gegenreguliert ist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass die primäre Funktion des Wnt-Liganden durch Kofaktoren moduliert wird. Dies wurde z.B. für DKK2 und Wnt5a, weitere durch EpCAM deregulierte Wnt-Liganden, postuliert. Es wird angenommen, dass DKK2, in Abhängigkeit von Kremen2, sowohl aktivierend wie auch inhibierend auf den  $\beta$ -Catenin-Wnt-Signalweg einwirken kann (Mao and Niehrs, 2003; Niehrs, 2006). Ebenso konnte für das nicht-kanonische Wnt5a gezeigt werden, dass es primär Funktionen der kanonischen Wnt-Liganden (e.g. Wnt2b, Wnt9a, SFRP5) antagonisieren kann (Torres et al., 1996), dies jedoch in Abhängigkeit spezifischer Rezeptoren umgekehrt wird (Mikels and Nusse, 2006; McDonald and Silver, 2009). Für Wnt5a wurde zudem gezeigt, dass es durch  $TNF\alpha$  hochreguliert wird (Saitoh and Katoh, 2002), während die EpCAM-Expression durch  $TNF\alpha$  negativ reguliert ist (Gires et al., 2001). Somit wäre denkbar, dass durch  $TNF\alpha$  die EpCAM-Expression reprimiert und dadurch Wnt5a hochreguliert wird.

Zusammengefasst ist die Regulation der Wnt-Liganden durch EpCAM heterogen und erlaubt zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage über die Aktivierung oder Inhibierung des Wnt Signalweges. Die Aufklärung dieser Fragestellung wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Unter den näher betrachteten deregulierten Genen fanden sich nicht nur Wnt-Liganden, sondern auch zytoplasmatische Komponenten und Zielgene des Wnt-Signalweges. Ein zentrales Protein des  $\beta$ -Catenin Abbaukomplexes ist APC. APC2 wurde als Homolog von APC identifiziert und es wurden vergleichbare Funktionen während Embryonalentwicklung und Karzinogenese postuliert (van Es et al., 1999). Ein weiteres Protein dieser Gruppe ist WISP2. WISP2 wurde als hochreguliertes Zielgen des Wnt-1 vermittelten Signalweges beschrieben (Pennica et al., 1998). Die mRNA von APC2 wie auch WISP2 konnte zwar durch EpCAM-Repression reguliert werden, allerdings scheint diese Beobachtung nicht mit der EpICD vermittelten Signaltransduktion in Zusammenhang zu stehen, da eine EpICD Kotransfektion die vermittelten Effekte nicht wieder komplementieren konnte (Abb. 4.29). Somit wird vermutet, dass es sich hierbei um einen Sekundäreffekt handelt. Neben WISP2 befand sich ein weiteres direktes Zielgen des Wnt-Signalweges unter den deregulierten Genen, nämlich MMP7. Dieses Zielgen wird in dem sich anschließenden Kapitel ausführlich diskutiert.

Wie bereits beschrieben wurde, sind EpCAM-, E-Cadherin- und Wnt-Signalwege eng miteinander verwoben, da bei allen Dreien  $\beta$ -Catenin eine zentrale Komponente darstellt. E-Cadherin kann an  $\beta$ -Catenin binden und zusammen mit  $\alpha$ -catenin an das Aktin-Zytoskelett binden (Nagafuchi et al., 1991; Hirano et al., 1992; Hinck et al., 1994). Durch EpCAM-Expression wird dieser Komplex zerstört (Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2003a; Winter et al., 2007). Osta et al. konnten 2004 zeigen, dass nach EpCAM-Repression, die  $\alpha$ -Catenin Protein Level stark anstiegen (Osta et al., 2004). Dieses Phänomen konnte für das Familienmitglied  $\alpha$ -Catenin2 in dem durchgeführten cDNA Array nachgewiesen werden.

NANOS1 ist ein weiteres interessantes Protein, welches im Zusammenspiel von EpCAM und E-Cadherin eine Rolle spielen könnte. NANOS1 ist ein Protein mit einem Zink-Finger Motiv, welches durch eine RNA Bindungskapazität und eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung von Zellen der Keimbahn gekennzeichnet ist. Die Expression von NANOS1 wird durch E-Cadherin reprimiert (Strumane et al., 2006) und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist es mit EpCAM koreguliert. Somit könnte spekuliert werden, dass NANOS1 durch ein Zusammenspiel von E-Cadherin und EpCAM reguliert wird. Je nachdem welches der Moleküle überwiegt, können Invasionsfähigkeit und Motilität der Zelle gesteigert oder reduziert werden. Das Zinkfingerprotein NANOS1 ist stark homolog zu den Nanos Orthologen in der Maus und Drosophila. Bei diesen Spezies konnte gezeigt werden, dass Nanos eine evolutionär konservierte Funktion in der Keimbahnentwicklung und der embryonalen Musterung hat (Wang and Lehmann, 1991; Forbes and Lehmann, 1998; Clark et al., 2000; Haraguchi et al., 2003; Tsuda et al., 2003). Dies wirft einen weiteren interessanten Aspekt auf, da auch EpCAM in humanen wie auch murinen ES-Zellen bei der Erhaltung des Stammzellphänotyps eine Rolle spielt (Gonzalez et al., 2009; Munz et al., 2009; Ng et al., 2009). Folglich ist NANOS1 ein sehr interessantes Zielgen, auf welches in weiterführenden Arbeiten näher eingegangen werden soll.

Interessanterweise konnte unter den EpCAM regulierten Genen einige extrazelluläre Matrix Proteine (SPARC, Spondin, Fibronectin1) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP7, MMP11, MMP12, MMP24) identifiziert werden. Die extrazellulären Matrix Proteine Fibronectin1 und

Spondin wurden durch EpCAM-Repression heraufreguliert. Dies lässt vermuten, dass EpCAM Signale eine Reduktion der extrazellulären Matrix (EZM) bzw. eine Umschichtung der Komponenten induziert. Dadurch würde die Invasionfähigkeit der Zelle begünstigt, was wiederum bereits als EpCAM-vermittelte Funktion beschrieben wurde (Osta et al., 2004). Für diese Hypothese würde auch die Koregulation mehrerer Matrix-Metalloproteinasen sprechen (MMP7, 12, 24), was zu einem zusätzlichem Abbau von EZM in EpCAM exprimierenden Zellen führen würde. All diese Faktoren würden eine Situation schaffen welche eine Metastasierung begünstigt (siehe dazu Kapitel 1.1.2).

#### 5.4.4 MMP7 als Zielgen des EpCAM Signalweges

Ziel des cDNA Arrays war es, neue Targets von EpCAM zu identifizieren. MMP7 wurde aus mehreren Gründen aus den validierten Genen selektiert. MMP7 zeigte eine stetige Koregulation mit EpCAM (Abb. 4.27 - 4.29, nicht gezeigte Daten). Eine Hemmung der EpCAM-Expression mittels siRNA induzierte eine verminderte Expression von MMP7 in Karzinomzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von MMP7 nach EpCAM-Repression, im Gegensatz zu APC2 und WISP2, durch EpICD komplementiert werden konnte (Abb. 4.29). Die rasche Induktion der Transkription von MMP7 mRNA bereits 2h nach Induktion der EpICD Kerntranslokation, weist auf einen direkten Effekt der EpCAM Signaltransduktion auf die *mmp7* Genexpression hin (Abb. 4.31) und würde somit das erste direkte Zielgen von EpCAM identifizieren. Die durchgeführten Versuche zeigten zudem, dass die Kerntranslokation von EpICD nötig und ausreichend ist, um MMP7 zu regulieren, so dass EpICD möglicherweise an den Promotor des *mmp7* Gens bindet. Dies soll in zukünftigen Experimenten unter Verwendung der Chromatin Immunopräzipitation untersucht werden.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) spielen eine wesentliche Rolle in der Tumorprogression. Diese Zink-abhängigen Endopeptidasen regulieren durch ihre proteolytische Aktivität die Komposition der Tumorumgebung und weisen in nahezu allen Tumorentitäten eine erhöhte Expression und Aktivität auf (Egeblad and Werb, 2002). Die über 21 MMPs können in 8 strukturelle Klassen unterteilt werden, 3 davon sind membranständig. MMP7 gehört der sogenannten „*minimal domain*“ oder Matrilysin-Klasse an und wird zunächst als inaktives Zymogen (Proenzym) sekretiert, kann aber durch Proteolyse in die aktive Form umgewandelt werden (Li et al., 2006). Aufgrund seiner Eigenschaft extrazelluläre Matrix abzubauen, spielt MMP7 eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Krebszellen (Powell et al., 1993; Yamamoto et al., 1995; Miyata et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass MMP7 in allen großen Tumorentitäten überexprimiert wird, darunter Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Pacheco et al., 2002), Mammakarzinome (Heppner et al., 1996), Lungenkarzinome (Bolon et al., 1997), Prostatakarzinome (Lynch et al., 2005), Ösophaguskarzinome (Yamamoto et al., 1999), Magenkarzinome (Adachi et al., 1998), Endometriale Karzinome (Graesslin et al., 2006), Ovarialkarzinome (Tanimoto et al., 1999) und Kolorektalkarzinome (Soreide et al., 2006). Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen MMP7 und der Metastasierung in Kolonkarzinomen beobachtet werden (Kioi et al., 2003). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Transfektion des

MMP7 Gens in Prostata- und Kolonkarzinomzellen eine erhöhte Invasivität in vitro sowie in vivo hervorruft (Powell et al., 1993; Witty et al., 1994). Die meisten MMP's sind nicht konstitutiv exprimiert, sondern werden auf der Ebene der Transkription stark reguliert und durch komplexe Interaktionen zwischen Zytokinen, Zelloberflächenmolekülen und extrazellulärer Matrix induziert (Westermarck and Kahari, 1999). Somit wäre denkbar, dass auch das Oberflächenmolekül EpCAM, welches ebenfalls in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert wird, durch die Regulation der Expression von MMP7, zu einem verstärkt invasiven Phänotyp und damit zur Metastasierung beiträgt (siehe auch Kapitel 1.1.2, 5.1.2).

Neben dem Abbau von extrazellulärer Matrix kann MMP7 auch durch proteolytische Spaltung der Ektodomäne von E-Cadherin die Tumorzell-Invasion fördern (Noe et al., 2001). Durch einen parakrinen Mechanismus kann die lösliche Ektodomäne von E-Cadherin seine eigenen Funktionen inhibieren (Noe et al., 1999). Dies ist gekennzeichnet durch eine Hemmung der Aggregation der Moleküle, eine Zerstörung der regelrechten, epithelialen Morphologie und eine Induktion der Invasion. Unter diesem Aspekt kann MMP7 als weiteres Bindeglied im Zusammenspiel zwischen EpCAM und E-Cadherin betrachtet werden. Durch die EpCAM-vermittelte Hochregulation von MMP7 werden E-Cadherin Bindungen in Tumoren geschwächt, die epitheliale-mesenchymale Transition gefördert und dadurch den Zellen ein erhöhtes Migrationspotential übertragen.

MMP7 ist zudem ein sehr interessantes Protein, da es, wie auch EpCAM (Yamashita et al., 2007) als Target des  $\beta$ -Catenin/TCF Komplexes im murinen wie auch humanen System beschrieben wurde (Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999). Durch EMSA und Reporteragen Experimente konnte eine Bindung des TCF4/ $\beta$ -Catenin-Komplexes an den MMP7-Promotor, welcher 2 optimale TCF4 Bindestellen besitzt, sowie dessen Aktivierung nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass MMP7 mit einer nukleäre Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in vivo korreliert (Brabletz et al., 1999). In genetisch heterozygoten Mäusen für das  $Apc^{Min}$  Allel (Min/+) (Punktmutation in einem Apc-Allel), konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP7 erhöht ist und dies in Zusammenhang mit der Tumorbildung steht (Wilson et al., 1997). Ob Wnt- und/oder EpCAM vermittelte Signale diesen Phänotyp auslösen, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5.5 Ausblick

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass EpICD für die Signalübermittlung im EpCAM vermittelten Signalweg zuständig ist. Weitere Experimente sollen zeigen an welche Promotorsequenzen der Kernkomplex bindet. Dieser Frage soll durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) mit anschließender DNA-Chip Analyse (*ChIP-on-Chip*) nachgegangen werden. Dabei können Promotorsequenzen identifiziert werden an welche die im Kernkomplex enthaltenen Proteine binden. Ob EpICD direkt, über TCF/Lef oder andere Transkriptionsfaktoren an die DNA bindet, könnte sodann durch EMSA's (*electro-mobility-shift-assay*) mittels der identifizierten Promotorsequenzen und unter Verwendung von rekombinantem EpICD Peptid getestet werden.

In diesem Zusammenhang soll auch der Frage nachgegangen werden, ob EpICD die Expression von EpCAM induzieren kann. In hepatozellulären Karzinomen wurde beschrieben, dass EpCAM ein Target des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweges ist und zwei TCF-4 Bindestellen in der Promotorregion besitzt (Yamashita et al., 2007). Da EpCAM selbst jedoch auch in der Lage ist den  $\beta$ -Catenin-TCF/Lef vermittelten Signalweg zu aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass es seine eigene Expression steuern kann. Vorläufige Experimente gaben Hinweise darauf, dass das EpCAM-Expressionsniveau nach EpICD Transfektion erhöht war. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch bestätigt und in einer standardisierten Weise wiederholt werden.

Die Aktivierung des EpCAM Signalweges ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Wie bereits diskutiert, ist eine der zu beantwortenden Fragen, warum sich EpICD ab einer bestimmten Dichte in perinukleären Bereichen anreichert (siehe dazu Punkt 5.2.1). In diesem Zusammenhang stellt sich eine weitere Frage von besonderem Interesse: Haben Antikörper einen Einfluss auf die EpCAM-Spaltung und die damit vermittelte Signalkaskade? Falls spezifische Antikörper in der Lage sind EpCAM-Moleküle zu oligomerisieren, und damit das Signal der Nachbarzelle bzw. der Ektodomäne ersetzen, könnten EpCAM spezifische therapeutische Antikörper unerwünschte Effekte auslösen. Dieser Frage kann zunächst in *in vitro* Versuchen nachgegangen werden. Durch Zugabe von Antikörpern zu Tumorzellen können anschließend die Spaltung sowie spezifische Effekte von EpCAM verfolgt werden. Denkbar ist auch eine Kopplung der Versuche mit spezifischen Proteaseinhibitoren, da diese in der Lage sind der Spaltung von EpCAM entgegenzuwirken (Maetzel et al., 2009). Anschließend sollen die gewonnenen Ergebnisse im Tiermodell überprüft werden.

Wie der cDNA-Array zeigte, ist EpCAM in der Lage verschiedene extrazelluläre Matrixproteine sowie Matrixmetalloproteinasen zu regulieren. Die Umschichtung sowie der Abbau von extrazellulärer Matrix, ist Grundvoraussetzung für die Einwanderung von Tumorzellen in umliegendes Gewebe (Stetler-Stevenson et al., 1993). Da bereits bekannt ist, dass EpCAM Migration und Invasion vermittelt (vorliegende Arbeit, (Osta et al., 2004)), soll diesem Aspekt weiter nachgegangen werden. Die deregulierten MMPs und EZM Proteine sollen validiert und eingehend charakterisiert werden. In Verbindung mit spezifischen Anfärbungen von Tumor-Gewebeschnitten, soll sich ein Überblick über die EpCAM vermittelte EZM Regulation verschafft werden.

Die Matrixmetalloproteinase 7 wurde bereits näher betrachtet und es konnte gezeigt werden, dass sie im Zusammenhang mit dem EpCAM vermittelten Signalweg hochreguliert ist. Ein zentraler Punkt zukünftiger Projekte wird die Analyse des Zusammenwirkens von EpCAM und MMP7 sein. Zum einen sollen sich Experimente, welche die Regulation von MMP7 durch EpCAM betreffen, anschließen. Dazu zählen MMP7 Promotorassays in An- und Abwesenheit spezifischer EpCAM siRNA sowie Koftransfektion von EpICD, und Chromatin-IP's, um die direkte Bindung von EpICD an den Promotor zu untersuchen. Daneben sollen auch funktionelle Aspekte der MMP7 Induktion durch EpCAM betrachtet werden. So könnte mit Invasionsassays *in vitro* nachgewiesen werden, dass Tumorzellen durch EpCAM-Expression und der damit verbundenen MMP7 Hochregulation ein erhöhtes invasives Potential aufweisen. In Tumor-Gewebeschnitten könnte sodann überprüft werden, ob und wenn in welchen Bereichen EpCAM und MMP7 kolokalisieren.

Wie bereits ausführlich beschrieben, verwenden der Wnt- und EpCAM Signalweg gleiche Komponenten. Um den Zusammenhang zwischen beiden Signalwegen näher bestimmen zu können, sollen sogenannte PCR-Arrays für Wnt-Zielgene durchgeführt werden (Biomol). Durch Zugabe von Wnt-Liganden, Modulation der Signalwegkomponenten durch RNA Interferenz und Einsatz von Inhibitoren (z.B. GSK-3 Inhibitor), soll die Beziehung der beiden Signalwege näher charakterisiert werden.

In diesem Zusammenhang könnte auch geklärt werden, inwiefern Wnt-Liganden den EpCAM Signalweg beeinflussen können. Durch die Transkriptomanalyse konnte gezeigt werden, dass EpCAM die Expression verschiedener Wnt-Liganden reguliert. Es wäre denkbar, dass EpCAM damit seine eigene Aktivierung oder Signaltransduktion beeinflusst. Dies gilt es in zukünftigen Projekten herauszufinden.

## 6 □ ZUSAMMENFASSUNG

EpCAM ist ein Transmembranprotein, welches zunächst als tumorassoziiertes Antigen beschrieben und in erster Linie für diagnostische und therapeutische Zwecke benutzt wurde. Es wird auf verschiedenen Tumorentitäten *de novo* oder stark überexprimiert und vermittelt sowie reguliert Zelladhäsion. Zudem kann EpCAM Zielgene (MYC, FABP5, CCNA, CCNE) aktivieren und Proliferation vermitteln. Zur Übertragung von Signalen von der Membran in den Zellkern wird EpCAM gespalten, so dass der intrazelluläre Anteil EpICD mit FHL2,  $\beta$ -Catenin und Lef1 einen Kernkomplex bildet. Dieser kann TCF/Lef Zielsequenzen binden und die Transkription von Zielgenen aktivieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EpICD der essentielle Proteinanteil für die von EpCAM vermittelten Effekte ist. EpICD ist ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 5 kD, welches rasch über das Proteasom degradiert wird. EpICD ist notwendig und ausreichend, um Migration, Proliferation und c-Myc Induktion *in vitro* zu vermitteln. Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war der Nachweis eines vergleichbaren onkogenen Potentials von EpCAM und EpICD *in vivo* in Xenotransplantationsmodellen. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Notwendigkeit eines Zell-Zell-Kontaktes bei der aktivierenden Spaltung von EpCAM nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass EpCAM-Moleküle nur bei einer Interaktion ihrer extrazellulären Domänen gespalten werden und damit ihre Signalkaskade aktivieren sowie Proliferation vermitteln können. Die Notwendigkeit der Kerntranslokation von EpICD für die Übermittlung von Signalen konnte durch ein konditionales System ebenfalls erstmals nachgewiesen werden.

Mit der Durchführung eines cDNA-Arrays wurden potentielle Zielgene von EpCAM identifiziert. Dabei wurde die Genexpression in Karzinomzellen mit einer reprimierten Expression von EpCAM mit einer Kontroll-behandelten Population verglichen. Unterschiede in den Expressionsmustern zeigten sich bei beiden Gruppen vorrangig im Wnt- und Cadherin-Signalweg. Beide Signalwege zeigen Überschneidungen zum EpCAM-Signalweg durch die Benutzung gleicher Komponenten und Zielgene. Die mRNA-Expression von 20 deregulierten Genen wurde mittels RT-PCR untersucht und MMP7 als Zielgen von EpCAM validiert. MMP7 erwies sich als interessantes Zielgen, da es durch  $\beta$ -Catenin-TCF/Lef reguliert wird und durch den Abbau extrazellulärer Matrix die Möglichkeit einer Zelle zur Migration und Invasion erhöht.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit EpICD als die genuine Signaldomäne von EpCAM eingehend charakterisiert und ein Expressionsprofil von EpCAM-Zielgenen in Hypopharynx-Karzinomzellen erstellt.

## 7 □ LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y., Itoh, F., Yamamoto, H., Matsuno, K., Arimura, Y., Kusano, M., Endoh, T., Hinoda, Y., Oohara, M., Hosokawa, M. and Imai, K. (1998) Matrix metalloproteinase matrilysin (MMP-7) participates in the progression of human gastric and esophageal cancers. *Int J Oncol*, **13**, 1031-1035.
- Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R. and Kasimir-Bauer, S. (2009) Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, **11**, R46.
- 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.
- 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.
- Arasada, R.R. and Carpenter, G. (2005) Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J Biol Chem*, **280**, 30783-30787.
- Armstrong, A. and Eck, S.L. (2003) EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther*, **2**, 320-326.
- Atlasi, Y., Mowla, S.J., Ziaee, S.A. and Bahrami, A.R. (2007) OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer*, **120**, 1598-1602.
- 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.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. and Rich, J.N. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**, 756-760.
- Barolo, S. (2006) Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? *Oncogene*, **25**, 7505-7511.

- Basak, S., Speicher, D., Eck, S., Wunner, W., Maul, G., Simmons, M.S. and Herlyn, D. (1998) Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue [see comments]. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 691-697.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, **280**, 596-599.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brauwanski, 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.
- Birchmeier, W. (2005) Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. *EMBO Rep*, **6**, 413-417.
- Blank, U., Karlsson, G. and Karlsson, S. (2008) Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*, **111**, 492-503.
- Bolon, I., Devouassoux, M., Robert, C., Moro, D., Brambilla, C. and Brambilla, E. (1997) Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol*, **150**, 1619-1629.
- Borkowski, T.A., Nelson, A.J., Farr, A.G. and Udey, M.C. (1996) Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells. *Eur J Immunol*, **26**, 110-114.
- Boveri, T. (1912) Anton Dohbn. *Science*, **36**, 453-468.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (1999) beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*, **155**, 1033-1038.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. and Kirchner, T. (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10356-10361.
- Brandenberger, R., Wei, H., Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G.J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M.S., Mandalam, R., Lebkowski, J. and Stanton, L.W. (2004) Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol*, **22**, 707-716.
- Braun, S., Hepp, F., Kantenich, C.R., Janni, W., Pantel, K., Riethmuller, G., Willgeroth, F. and Sommer, H.L. (1999) Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res*, **5**, 3999-4004.
- Bray, S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 678-689.
- 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., de Bruyn, M., Samplonius, D.F., Bijma, T., ten Cate, B., de Leij, L.F. and Helfrich, W. (2008a) Targeted delivery of a designed sTRAIL mutant results in superior apoptotic activity towards EGFR-positive tumor cells. *J Mol Med*, **86**, 909-924.
- 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 pancarcinoma-associated antigen EGP2. *Int J Cancer*, **109**, 281-290.
- Bremer, E., ten Cate, B., Samplonius, D.F., Mueller, N., Wajant, H., Stel, A.J., Chamuleau, M., van de Loosdrecht, A.A., Stieglmaier, J., Fey, G.H. and Helfrich, W. (2008b) Superior activity of fusion protein scFvRit:sFasL over cotreatment with rituximab and Fas agonists. *Cancer Res*, **68**, 597-604.

- Breuhahn, K., Baeuerle, P.A., Peters, M., Prang, N., Tox, U., Kohne-Volland, R., Dries, V., Schirmacher, P. and Leo, E. (2005) Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*.
- 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.
- Brunner, A., Schaefer, G., Veits, L., Brunner, B., Prelog, M. and Ensinger, C. (2008) EpCAM overexpression is associated with high-grade urothelial carcinoma in the renal pelvis. *Anticancer Res*, **28**, 125-128.
- Bumol, T.F., Marder, P., DeHerdt, S.V., Borowitz, M.J. and Apelgren, 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., Strohle, 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.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.
- Carpenter, G. and Red Brewer, M. (2009) EpCAM: Another Surface-to-Nucleus Missile. *Cancer Cell*, **15**, 165-166.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. and Dalton, S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, **132**, 885-896.
- Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 118-132.
- 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.
- Chan, Y.M. and Jan, Y.N. (1998) Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. *Cell*, **94**, 423-426.
- 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.
- Chiarugi, P. and Giannoni, E. (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*, **76**, 1352-1364.
- 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., Scholzer, M., Kempf, T. and Zoller, M.h. (2005) The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem J*, **389**, 99-110.
- Clark, I.E., Wyckoff, D. and Gavis, E.R. (2000) Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr Biol*, **10**, 1311-1314.

- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127**, 469-480.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. and Slamon, D.J. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, **17**, 2639-2648.
- 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.
- Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P. and Matrisian, L.M. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, **18**, 2883-2891.
- 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.
- 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. (2007) 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.
- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M. and Litvinov, S.V. (1999) 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.
- Denzel, S., Maetzel, D., Mack, B., Eggert, C., Barr, G. and Gires, O. (2009) Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer*, **9**, 402.
- 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.
- Dylla, S.J., Bevilgia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., Clarke, M.F., Hoey, T., Lewicki, J. and Gurney, A.L. (2008) Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS ONE*, **3**, e2428.
- 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.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-174.
- Fagotto, F. and Gumbiner, B.M. (1996) Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol*, **180**, 445-454.
- Fields, A.L., Keller, A., Schwartzberg, L., Bernard, S., Kardinal, C., Cohen, A., Schulz, J., Eisenberg, P., Forster, J. and Wissel, P. (2009) Adjuvant therapy with the monoclonal antibody Edercolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve overall survival of patients with stage III colon cancer. *J Clin Oncol*, **27**, 1941-1947.
- Fish, W.W., Reynolds, J.A. and Tanford, C. (1970) Gel chromatography of proteins in denaturing solvents. Comparison between sodium dodecyl sulfate and guanidine hydrochloride as denaturants. *J Biol Chem*, **245**, 5166-5168.

- 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*.
- Forbes, A. and Lehmann, R. (1998) Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. *Development*, **125**, 679-690.
- Garver, T.D., Ren, Q., Tuvia, S. and Bennett, V. (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol*, **137**, 703-714.
- Gast, D., Riedle, S., Kiefel, H., Muerkoster, S.S., Schafer, H., Schafer, M.K. and Altevogt, P. (2008) The RGD integrin binding site in human L1-CAM is important for nuclear signaling. *Exp Cell Res*, **314**, 2411-2418.
- 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.
- 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.
- Gires, O., Klein, C.A. and Baeuerle, P.A. (2009a) On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer*.
- Gires, O., Klein, C.A. and Baeuerle, P.A. (2009b) On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer*, **9**, 143; author reply 143.
- Gonzalez, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M. and Gires, O. (2009) EpCAM Is Involved in Maintenance of the Murine Embryonic Stem Cell Phenotype. *Stem Cells*, **27**, 1782-1791.
- Gottardi, C.J., Wong, E. and Gumbiner, B.M. (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*, **153**, 1049-1060.
- Gottlieb, T.M. and Oren, M. (1998) p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*, **8**, 359-368.
- Graesslin, O., Cortez, A., Uzan, C., Birembaut, P., Quereux, C. and Darai, E. (2006) Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer*, **16**, 1911-1917.
- 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.
- Gutwein, P., Mechtersheimer, 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, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P. and Baeuerle, P.A. (2009) Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*, **214**, 441-453.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Haraguchi, S., Tsuda, M., Kitajima, S., Sasaoka, Y., Nomura-Kitabayashid, A., Kurokawa, K. and Saga, Y. (2003) nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev*, **120**, 721-731.

- 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.
- 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.
- Hass, M.R., Sato, C., Kopan, R. and Zhao, G. (2009) Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 201-210.
- Hay, E.D. and Zuk, A. (1995) Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis*, **26**, 678-690.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K. (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, **115**, 1-20.
- Hemler, M.E. (2001) Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*, **155**, 1103-1107.
- Hemler, M.E. (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 801-811.
- Hendrickx, M. and Leyns, L. (2008) Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Dev Growth Differ*, **50**, 229-243.
- Heppner, K.J., Matrisian, L.M., Jensen, R.A. and Rodgers, W.H. (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*, **149**, 273-282.
- Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z. and Koprowski, H. (1979a) Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol*, **9**, 657-659.
- Herlyn, D., Ross, A.H. and Koprowski, H. (1986a) Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science*, **232**, 100-102.
- Herlyn, D., Sears, H., Iliopoulos, D., Lubeck, M., Douillard, J.Y., Sindelar, W., Tempero, M., Mellstedt, H., Maher, M. and Koprowski, H. (1986b) Anti-idiotypic antibodies to monoclonal antibody CO17-1A. *Hybridoma*, **5 Suppl 1**, S51-58.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. and Koprowski, H. (1979b) Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1438-1442.
- Herrlich, P., Morrison, H., Sleeman, J., Orian-Rousseau, V., Konig, H., Weg-Remers, S. and Ponta, H. (2000) CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci*, **910**, 106-118; discussion 118-120.
- Herron, L.R., Hill, M., Davey, F. and Gunn-Moore, F.J. (2009) The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem J*, **419**, 519-531.
- 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.
- Hinck, L., Nathke, I.S., Papkoff, J. and Nelson, W.J. (1994) Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol*, **125**, 1327-1340.
- Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. and Takeichi, M. (1992) Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*, **70**, 293-301.
- Ho, A. and Sudhof, T.C. (2004) Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2548-2553.
- Hoppler, S. and Kavanagh, C.L. (2007) Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci*, **120**, 385-393.

- li, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., Maruyama, Y. and Shinomura, Y. (2006) Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, **231**, 20-27.
- Ji, J., Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., Jia, H.L., Li, C., Deng, C., Wauthier, E., Reid, L.M., Ye, Q.H., Qin, L.X., Yang, W., Wang, H.Y., Tang, Z.Y., Croce, C.M. and Wang, X.W. (2009) Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*, **50**, 472-480.
- Jiang, X., Tan, J., Li, J., Kivimae, S., Yang, X., Zhuang, L., Lee, P.L., Chan, M.T., Stanton, L.W., Liu, E.T., Cheyette, B.N. and Yu, Q. (2008) DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell*, **13**, 529-541.
- Joyce, J.A. and Pollard, J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, **9**, 239-252.
- Juliano, R.L. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **42**, 283-323.
- Kamata, T., Katsube, K., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S. and Mizusawa, H. (2004) R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta*, **1676**, 51-62.
- 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.
- Katoh, M. (2005) WNT2B: comparative integromics and clinical applications (Review). *Int J Mol Med*, **16**, 1103-1108.
- Katoh, M. and Katoh, M. (2009) Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. *Int J Oncol*, **34**, 1411-1415.
- Kiewe, P. and Thiel, E. (2008) Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*, **17**, 1553-1558.
- Kioi, M., Yamamoto, K., Higashi, S., Koshikawa, N., Fujita, K. and Miyazaki, K. (2003) Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse model. *Oncogene*, **22**, 8662-8670.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S. and Kikuchi, A. (1998) Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem*, **273**, 10823-10826.
- Klueg, K.M., Parody, T.R. and Muskavitch, M.A. (1998) Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell*, **9**, 1709-1723.
- 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.
- 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.

- 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.
- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T.M., Palanisamy, N., El Oakley, R.M., Lee, E.H., Lim, B. and Lim, S.K. (2007) Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*, **25**, 425-436.
- 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., Pycr, J.J., Druck, T. and Huebner, K. (1993) Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol*, **13**, 1507-1515.
- Liotta, L.A. (2004) Tumor invasion and metastasis: getting more basic to come closer to the patient. An interview with Lance A. Liotta. *Int J Dev Biol*, **48**, 559-562.
- 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. (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, **125**, 437-446.
- Liu, N., Lu, M., Tian, X. and Han, Z. (2007) Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, **211**, 279-286.
- Lozano, G. and Elledge, S.J. (2000) p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*, **404**, 24-25.
- Lu, C. and Shervington, A. (2008) Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem*, **312**, 71-80.
- Lynch, C.C., Hikosaka, A., Acuff, H.B., Martin, M.D., Kawai, N., Singh, R.K., Vargo-Gogola, T.C., Begtrup, J.L., Peterson, T.E., Fingleton, B., Shirai, T., Matrisian, L.M. and Futakuchi, M. (2005) MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell*, **7**, 485-496.
- Ma, Q.H., Bagnard, D., Xiao, Z.C. and Dawe, G.S. (2008) A TAG on to the neurogenic functions of APP. *Cell Adh Migr*, **2**, 2-8.
- Maaser, K. and Borlak, J. (2008) A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer*, **99**, 1635-1643.
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M. and Gires, O. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, **11**, 162-171.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Mao, B. and Niehrs, C. (2003) Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signalling. *Gene*, **302**, 179-183.
- Mareel, M., Oliveira, M.J. and Madani, I. (2009) Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. *Virchows Arch*, **454**, 599-622.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P. and Reiss, K. (2005) L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, **25**, 9040-9053.
- Marhaba, R., Bourouba, M. and Zoller, M. (2005) CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases. *Cell Signal*, **17**, 961-973.
- 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 inte-

- acts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol*, **159**, 113-122.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. and Yokota, T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J*, **18**, 4261-4269.
- McDonald, S.L. and Silver, A. (2009) The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer*, **101**, 209-214.
- McDonnell, D.P. and Norris, J.D. (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science*, **296**, 1642-1644.
- 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.
- Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V. and Altevogt, P. (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol*, **155**, 661-673.
- Medina, M. and Dotti, C.G. (2003) RIPped out by presenilin-dependent gamma-secretase. *Cell Signal*, **15**, 829-841.
- Mikels, A.J. and Nusse, R. (2006) Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*, **4**, e115.
- Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, P.P. and Batra, S.K. (2007) Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*, **11**, 981-1011.
- Miyata, Y., Iwata, T., Ohba, K., Kanda, S., Nishikido, M. and Kanetake, H. (2006) Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis. *Clin Cancer Res*, **12**, 6998-7003.
- Mogk, A., Schmidt, R. and Bukau, B. (2007) The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol*, **17**, 165-172.
- 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.
- Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J. and Moller, P. (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res*, **47**, 2883-2891.
- 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.
- Mosolits, S., Harmenberg, U., Ruden, U., Ohman, L., Nilsson, B., Wahren, B., Fagerberg, J. and Mellstedt, H. (1999) Autoantibodies against the tumour-associated antigen GA733-2 in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, **47**, 315-320.
- 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.
- Munz, M., Baeuerle, P.A. and Gires, O. (2009) The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res*.
- Munz, M., Fellinger, K., Hofmann, T., Schmitt, B. and Gires, O. (2008) Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci*, **13**, 5195-5201.

- 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.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M. and Tsukita, S. (1991) The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*, **65**, 849-857.
- Nelson, A.J., Dunn, R.J., Peach, R., Aruffo, A. and Farr, A.G. (1996) The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*, **26**, 401-408.
- Ng, V.Y., Ang, S.N., Chan, J.X. and Choo, A.B. (2009) Characterization of Epithelial Cell Adhesion Molecule as a Surface Marker on Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.
- Niehrs, C. (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, **25**, 7469-7481.
- Noe, V., Chastre, E., Bruyneel, E., Gespach, C. and Mareel, M. (1999) Extracellular regulation of cancer invasion: the E-cadherin-catenin and other pathways. *Biochem Soc Symp*, **65**, 43-62.
- Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M. and Mareel, M. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*, **114**, 111-118.
- 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.
- Nubel, T., Preobraschenski, J., Tuncay, H., Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L. and Zoller, M. (2009) Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res*, **7**, 285-299.
- 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.
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. and Kemler, R. (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*, **112** (Pt 8), 1237-1245.
- 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.
- Pacheco, M.M., Kowalski, L.P., Nishimoto, I.N. and Brentani, M.M. (2002) Differential expression of c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head Neck*, **24**, 24-32.
- Pahl, H.L. and Baeuerle, P.A. (1996) Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 340-347.
- Pan, G. and Thomson, J.A. (2007) Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*, **17**, 42-49.
- Parent, A.T., Barnes, N.Y., Taniguchi, Y., Thinakaran, G. and Sisodia, S.S. (2005) Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *J Neurosci*, **25**, 1540-1549.

- 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.
- Pennica, D., Swanson, T.A., Welsh, J.W., Roy, M.A., Lawrence, D.A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L.A., Deuel, B., Lew, M., Watanabe, C., Cohen, R.L., Melhem, M.F., Finley, G.G., Quirke, P., Goddard, A.D., Hillan, K.J., Gurney, A.L., Botstein, D. and Levine, A.J. (1998) WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14717-14722.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. and Christofori, G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, **392**, 190-193.
- Person, A.D., Garriock, R.J., Krieg, P.A., Runyan, R.B. and Klewer, S.E. (2005) Frzb modulates Wnt-9a-mediated beta-catenin signaling during avian atrioventricular cardiac cushion development. *Dev Biol*, **278**, 35-48.
- Powell, W.C., Knox, J.D., Navre, M., Grogan, T.M., Kittelson, J., Nagle, R.B. and Bowden, G.T. (1993) Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*, **53**, 417-422.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F. and Ailles, L.E. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 973-978.
- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S. (1999) Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science*, **283**, 91-94.
- Rao, C.G., Chianese, D., Doyle, G.V., Miller, M.C., Russell, T., Sanders, R.A., Jr. and Terstappen, L.W. (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol*, **27**, 49-57.
- Rauch, J., Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., Andratschke, M., Zeidler, R., Lang, S. and Gires, O. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 156-162.
- Rawson, R.B. (2002) Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Essays Biochem*, **38**, 155-168.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843-850.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I.L. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, **423**, 409-414.
- 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.
- Riedle, S., Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S., Gutwein, P. and Altevogt, P. (2009) Nuclear translocation and signaling of L1-CAM in human carcinoma cells requires A-DAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J*.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegell, 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., Schmiegell, 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.

- Roman-Gomez, J., Cordeu, L., Agirre, X., Jimenez-Velasco, A., San Jose-Eneriz, E., Garate, L., Calasanz, M.J., Heiniger, A., Torres, A. and Prosper, F. (2007) Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **109**, 3462-3469.
- Rosen, J.M. and Jordan, C.T. (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*, **324**, 1670-1673.
- 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*.
- Ruf, P. and Lindhofer, H. (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*, **98**, 2526-2534.
- Saitoh, T. and Katoh, M. (2002) Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Mol Med*, **10**, 345-349.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schanzer, J.M., Baeuerle, P.A., Dreier, T. and Kufer, P. (2006) A human cytokine/single-chain antibody fusion protein for simultaneous delivery of GM-CSF and IL-2 to Ep-CAM overexpressing tumor cells. *Cancer Immun*, **6**, 4.
- Schlereth, B., Fichtner, I., Lorenczewski, G., Kleindienst, P., Brischwein, K., da Silva, A., Kufer, P., Lutterbuese, R., Junghahn, I., Kasimir-Bauer, S., Wimberger, P., Kimmig, R. and Baeuerle, P.A. (2005) Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Res*, **65**, 2882-2889.
- 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. and Reid, L.M. (2008) EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci*, **13**, 3096-3100.
- 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.
- Schmidt, M., Scheulen, M.E., Dittrich, C., Obrist, P., Marschner, N., Dirix, L., Ruttinger, D., Schuler, M., Reinhardt, C. and Awada, A. (2009) An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*.
- 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.
- Seligson, D.B., Pantuck, A.J., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, M.H., Han, K.R., Correa, A.J., Eeva, M., Tze, S., Beldegrun, A.S. and Figlin, R.A. (2004) Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **10**, 2659-2669.
- Selkoe, D. and Kopan, R. (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 565-597.

- Sindelar, W.F., Maher, M.M., Herlyn, D., Sears, H.F., Steplewski, Z. and Koprowski, H. (1986) Trial of therapy with monoclonal antibody 17-1A in pancreatic carcinoma: preliminary results. *Hybridoma*, **5 Suppl 1**, S125-132.
- Sivagnanam, M., Mueller, J.L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S.F., Turner, D., Zlotkin, S.H., Pencharz, P.B., Ngan, B.Y., Libiger, O., Schork, N.J., Lavine, J.E., Taylor, S., Newbury, R.O., Kolodner, R.D. and Hoffman, H.M. (2008) Identification of EpCAM as the Gene for Congenital Tufting Enteropathy. *Gastroenterology*.
- Small, D.H., Mok, S.S. and Bornstein, J.C. (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 595-598.
- Soreide, K., Janssen, E.A., Korner, H. and Baak, J.P. (2006) Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol*, **209**, 147-156.
- 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.
- Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A. and Kleiner, D.E., Jr. (1993) Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J*, **7**, 1434-1441.
- 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., Gast, D., Sanderson, M.P., Issa, Y., Gutwein, P. and Altevogt, P. (2007) L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, **104**, 461-469.
- 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.
- Strumane, K., Bonnomet, A., Stove, C., Vandenbroucke, R., Nawrocki-Raby, B., Bruyneel, E., Mareel, M., Birembaut, P., Berx, G. and van Roy, F. (2006) E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion. *Cancer Res*, **66**, 10007-10015.
- 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.
- Tada, T. (2006) Toti-/pluripotential stem cells and epigenetic modifications. *Neurodegener Dis*, **3**, 32-37.
- Takes, R.P., Baatenburg de Jong, R.J., Wijffels, K., Schuurin, E., Litvinov, S.V., Hermans, J. and van Krieken, J.H. (2001) Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol*, **194**, 298-302.
- 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.
- Tandon, A.K., Clark, G.M., Chamness, G.C. and McGuire, W.L. (1990) Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res*, **50**, 3317-3321.

- 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.
- Tanimoto, H., Underwood, L.J., Shigemasa, K., Parmley, T.H., Wang, Y., Yan, Y., Clarke, J. and O'Brien, T.J. (1999) The matrix metalloprotease pump-1 (MMP-7, Matrilysin): A candidate marker/target for ovarian cancer detection and treatment. *Tumour Biol*, **20**, 88-98.
- Tarmann, T., Dohr, G., Schiechl, H., Barth, S. and Hartmann, M. (1990) Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel)*, **137**, 141-145.
- Tasaki, T. and Kwon, Y.T. (2007) The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends Biochem Sci*, **32**, 520-528.
- Tedesco, K.L., Thor, A.D., Johnson, D.H., Shyr, Y., Blum, K.A., Goldstein, L.J., Gradishar, W.J., Nicholson, B.P., Merkel, D.E., Murrey, D., Edgerton, S. and Sledge, G.W., Jr. (2004) Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol*, **22**, 1071-1077.
- Temin, H.M. (1990) Retroviruses and cancer. *Mol Carcinog*, **3**, 183-184.
- Terskikh, A.V., Bryant, P.J. and Schwartz, P.H. (2006) Mammalian stem cells. *Pediatr Res*, **59**, 13R-20R.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 442-454.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L. and Moon, R.T. (1996) Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol*, **133**, 1123-1137.
- Trebak, M., Begg, G.E., Chong, J.M., Kanazireva, E.V., Herlyn, D. and Speicher, D.W. (2001) Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (EpCAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, **276**, 2299-2309.
- Trzpis, M., Bremer, E., McLaughlin, P.M., de Leij, L.F. and Harmsen, M.C. (2008a) EpCAM in morphogenesis. *Front Biosci*, **13**, 5050-5055.
- Trzpis, M., McLaughlin, P., van Goor, H., Brinker, M., van Dam, G., de Leij, L., Popa, E. and Harmsen, M. (2008b) Expression of EpCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol*.
- 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.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. and Saga, Y. (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, **301**, 1239-1241.
- Ullenhag, G.J., Frodin, J.E., Mosolits, S., Kiaii, S., Hassan, M., Bonnet, M.C., Moingeon, P., Mellstedt, H. and Rabbani, H. (2003) Immunization of colorectal carcinoma patients with a recombinant canarypox virus expressing the tumor antigen Ep-CAM/KSA (ALVAC-KSA) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor induced a tumor-specific cellular immune response. *Clin Cancer Res*, **9**, 2447-2456.
- van Es, J.H., Kirkpatrick, C., van de Wetering, M., Molenaar, M., Miles, A., Kuipers, J., Destree, O., Peifer, M. and Clevers, H. (1999) Identification of APC2, a homologue of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor. *Curr Biol*, **9**, 105-108.

- 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.
- Visvader, J.E. and Lindeman, G.J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, **8**, 755-768.
- 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.
- von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M. and Konietzko, U. (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*, **117**, 4435-4448.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. and Boldin, M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, **17**, 331-367.
- Wang, C. and Lehmann, R. (1991) Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila. *Cell*, **66**, 637-647.
- 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.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E. and Jaenisch, R. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, **448**, 318-324.
- Westermarck, J. and Kahari, V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J*, **13**, 781-792.
- Wilson, C.L., Heppner, K.J., Labosky, P.A., Hogan, B.L. and Matrisian, L.M. (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1402-1407.
- Winkler, J., Martin-Killias, P., Pluckthun, A. and Zangemeister-Wittke, U. (2009) EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins. *Mol Cancer Ther*, **8**, 2674-2683.
- Winter, M.J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I.H. and Litvinov, S.V. (2007) Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem*, **302**, 19-26.
- Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E., Rees-Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H. and Litvinov, S.V. (2003a) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*, **285**, 50-58.
- Winter, M.J., Nagtegaal, I.D., van Krieken, J.H. and Litvinov, S.V. (2003b) The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol*, **163**, 2139-2148.
- Witthauer, J., Schlereth, B., Brischwein, K., Winter, H., Funke, I., Jauch, K.W., Baeuerle, P. and Mayer, B. (2008) Lysis of cancer cells by autologous T cells in breast cancer pleural effusions treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110. *Breast Cancer Res Treat*.
- Witty, J.P., McDonnell, S., Newell, K.J., Cannon, P., Navre, M., Tressler, R.J. and Matrisian, L.M. (1994) Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. *Cancer Res*, **54**, 4805-4812.

- Wurfel, J., Rosel, M., Seiter, S., Claas, C., Herlevsen, M., Weth, R. and Zoller, M. (1999) Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314. *Oncogene*, **18**, 2323-2334.
- Xu, W., Cao, L. and Yin, Z.F. (2009) [Progress and prospects in cancer stem cell research for hepatocellular carcinoma.]. *Ai Zheng*, **28**, 1004-1008.
- Yamamoto, H., Adachi, Y., Itoh, F., Iku, S., Matsuno, K., Kusano, M., Arimura, Y., Endo, T., Hinoda, Y., Hosokawa, M. and Imai, K. (1999) Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, **59**, 3313-3316.
- Yamamoto, H., Itoh, F., Hinoda, Y. and Imai, K. (1995) Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion in vitro. *Int J Cancer*, **61**, 218-222.
- 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.
- Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S. and Gu, J. (2007) CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, **120**, 1444-1450.
- Yunta, M. and Lazo, P.A. (2003) Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal*, **15**, 559-564.
- Zangemeister-Wittke, U. (2005) Antibodies for targeted cancer therapy -- technical aspects and clinical perspectives. *Pathobiology*, **72**, 279-286.
- Zengel, P. (2009) *Manuskript in Vorbereitung*.
- Zhao, C., Bu, X., Zhang, N. and Wang, W. (2009) Downregulation of SFRP5 expression and its inverse correlation with those of MMP-7 and MT1-MMP in gastric cancer. *BMC Cancer*, **9**, 224.
- Zhou, B.B., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K.G., Grindley, J.C. and Dirks, P.B. (2009) Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **8**, 806-823.
- Zhou, W. and Carpenter, G. (2000) Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4. *J Biol Chem*, **275**, 34737-34743.
- Zimmermann, S., Wels, W., Froesch, B.A., Gerstmayer, B., Stahel, R.A. and Zangemeister-Wittke, U. (1997) A novel immunotoxin recognising the epithelial glycoprotein-2 has potent antitumoural activity on chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*, **44**, 1-9.
- 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.
- Zou, H., Molina, J.R., Harrington, J.J., Osborn, N.K., Klatt, K.K., Romero, Y., Burgart, L.J. and Ahlquist, D.A. (2005) Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer*, **116**, 584-591.
- Zou, J., Presky, D.H., Wu, C.Y. and Gubler, U. (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem*, **272**, 6073-6077.

## 8 □ ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	zwei-dimensionale Gelelektrophorese
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
17-1A	Panorex®
α	anti
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AK	Antikörper
APC	<i>adenomatosis polyopsis coli</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl2	B-cell lymphoma protein 2
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>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Chr.	Chromosom
CMV	Cytomegalovirus
csi	Kontroll siRNA
CSL	CBF-1/Suppressor of Hairless/Lag-1
C-terminal	carboxyterminal
CTF	C-terminales Fragment
DAPT	γ-Sekretaseinhibitor, N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester,
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

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>
e.g.	<i>exempli gratia</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>
EpICD	<i>EpCAM intracellular domain</i>
EpEX	<i>EpCAM extracellular domain</i>
EpEXrec	<i>EpCAM extracellular domain, recombinant expressed</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER <sup>T</sup>	<i>Estrogen receptor ligand binding domain</i> (durch 4-OHT induzierbar)
et al.	<i>et alia</i>
etc.	<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
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAMA	<i>human anti-mouse antibody</i>
Her2/neu	<i>v-erb-b2, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
ICD	<i>intra-cellular domain</i>
i.e.	<i>id est</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF $\alpha$	<i>interferon alpha</i>
IP	Immunopräzipitation
KA	Karzinom
Kat.Nr.	Katalog Nummer
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KHL	<i>Keyhole-Limpet-Hemocyanin</i>

KLMS	Konvokales Laserscan-Mikroskop
Ko-IP	Ko-Immünpräzipitation
Ktrl.	Kontrolle
Ktrl. siRNA	Kontroll <i>small interfering RNA</i>
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
max.	maximal
mg	Milligramm
MG-132	Proteasom Inhibitor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NFκB	<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</i> (Li-Fraumeni syndrom)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PS1	Presenilin 1, PSEN1
PS2	Presenilin 2, PSEN2
PVA	Polyvinylalkohol
Rb	<i>retinoblastoma protein</i>

RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
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> (hier für EpCAM)
SP	Signalpeptid
SV40	<i>simian virus 40</i>
TACE	<i>tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme, ADAM17</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCF	<i>T-cell factor</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TY	<i>tyroglobulin-type repeat</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZL	Zellysate
$\mu$ l	Mikroliter

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Olivier Gires für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten, für seine Unterstützung und Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die Möglichkeit an nationalen sowie internationalen Kongressen teilzunehmen, die kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie für seine menschliche und humorvolle Art. Danke!

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

Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus für die guten Arbeitsbedingungen in der HNO-Forschung und allen „Klinikern“ für die Beschaffung von Primärmaterial,

Unserer Königin aller Färbungen: Piri Mack. Vielen Dank für ALLES!!

dem gesamten Laborteam für das einzigartige Arbeitsklima und die Zusammenarbeit, die interessanten und hilfreichen Diskussionen, die große Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen und motivierenden Momente im Kaffee-Kuschel. Besonders möchte ich mich bei meiner Labornachbarin Bárbara González bedanken für das gemeinsame Durchschreiten von Höhen und Tiefen: die vielen Gespräche fachlicher wie auch privater Natur: du bist die Beste ;-)

Abschließend möchte ich mich ganz speziell bei Alex und meiner Mama bedanken, für das Ertragen meiner Launen, ihre Unterstützung und ihr Verständnis für vieles für sie nicht Begreifbares. DANKE!

Hiermit versichere ich, Sabine Denzel, ehrenwörtlich, dass meine Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission eingereicht.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

.....

Sabine Denzel

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Angaben

---

Name	Sabine Nicole Denzel
Akad. Grad	Diplom-Biologin
e-mail	sabine.denzel@med.uni-muenchen.de
Geburtsdatum	14.11.1980
Geburtsort	Augsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnort	Adelmannstr.62 86199 Augsburg

## Universität

---

Seit März 2006	Promotion in der HNO-Forschung des Klinikums Großhadern (LMU München) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Olivier Gires Thema: „Untersuchungen zur Signaltransduktion des tumorassoziierten Antigens EpCAM“
11/2005-02/2006	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Mikrobiologie (LMU München)
10/2004 - 10/2005	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Overmann-(LMU München) Thema: „Molekularbiologische und kulturabhängige Untersuchungen zur funktionellen Diversität von Bodenbakterien“
10/2000 – 09/2004	Studium der Biologie an der LMU München (Diplomnote: 1,2)

## Schulische Ausbildung

---

09/1991 – 06/2000	Gymnasium Maria Stern in Augsburg
09/1987 – 07/1991	Grundschule Inningen