

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**„Charakterisierung EpCAM- und ERas- defizienter Stammzellen- Effekte auf
Pluripotenz, Differenzierung und Proliferation“**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Niedermeyer
aus München
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires
Mitberichterstatter:	PD Dr. E. Deindl Prof Dr. A. Brändli
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	1.10.2020

Eidesstattliche Versicherung

Niedermeyer, Sebastian

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung EpCAM- und ERas- defizienter Stammzellen – Effekte auf Pluripotenz, Differenzierung und Proliferation“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.10.2020

Ort, Datum

Sebastian Niedermeyer

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	5
1.1. Embryonalentwicklung von Maus und Mensch bis zur Organogenese	5
1.2. Die Entwicklung des Herzens	8
1.3. Stammzellen	10
1.4. EpCAM.....	12
1.4.1. EpCAM-Gen	12
1.4.2. EpCAM Protein	12
1.4.3. EpCAM Funktionen	14
1.5. ERas	17
1.5.1. ERas Gen.....	17
1.5.2. ERas-Protein	17
1.5.3. ERas Funktionen	18
2. Zielsetzung.....	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Verwendete Chemikalien.....	23
3.1.2. Verwendete Kits	24
3.1.3. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.4. Verwendete Geräte	25
3.1.5. Verwendete Primärantikörper	26
3.1.6. Verwendete Sekundärantikörper	26
3.1.7. Verwendete Primer.....	27
3.1.8. Verwendete Plasmide.....	28
3.1.9. Verwendete Zelllinien	28
3.1.10. Verwendete Dienstleistungen	28
3.2. Methoden	29
3.2.1. Zellkultur	29
3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
3.2.3. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen	30
3.2.4. Bestimmung der Zellzahl	30

3.2.5. Hanging Drops zur Generierung von Embryoid Bodies	31
3.2.6. Herstellung von Tumorsphäroiden.....	31
3.2.7. Zweidimensionale mesodermale Differenzierung.....	32
3.2.8. Zweidimensionale endodermale Differenzierung.....	32
3.2.9. Fixierung für Elektronenmikroskopie	33
3.2.10. Transfektion von Stammzellen durch Nukleofektion.....	33
3.2.11. Untersuchung der Oberflächenproteine in der Durchflusszytometrie	33
3.2.12. CRSIPR-Cas9	34
3.2.13. CFSE-Färbung	36
3.2.14. Western Blot.....	37
3.2.15. Immunhistochemie	39
3.2.16. Semi-quantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen	39
3.2.17. Präparation genomischer DNA.....	40
3.2.18. RNA-Isolierung.....	40
3.2.19. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
3.2.20. Reverse Transkription von mRNA	41
3.2.21. PCR, Polymerase Ketten Reaktion.....	41
3.2.22. Nested PCR (verschachtelte PCR).....	42
3.2.23. Agarosegelelektrophorese für PCR - Produkte.....	43
3.2.24. Quantitative Real Time PCR.....	43
3.2.25. Berechnung der statistischen Signifikanz	44
4. Ergebnisse	46
4.1. Effekte des EpCAM-Verlusts auf die endodermale Differenzierung.....	46
4.1.1. Verminderte endodermale Differenzierung von EpCAM KO Klonen nach direkter endodermaler Differenzierung	46
4.1.2. Immunhistochemischer Nachweis endodermaler Marker bei spontaner dreidimensionaler Differenzierung.....	52
4.1.3. Mesodermale Differenzierung in Ko-Kulturen von wildtypischen und EpCAM KO Zelllinien.....	56
4.2. Effekte des EpCAM-Verlustes auf die mesodermale Differenzierung.....	61
4.2.1. Knockout von EpCAM inhibiert die mesodermale Differenzierung	61
4.2.2. EpCAM-KO hat einen gemischten Einfluss auf die Vimentin-Expression von Zellen im pluripotenten Zustand.	64

4.2.3. EBs aus EpCAM defizienten Stammzellen unterscheiden sich nicht von Wildtypischen in der Vimentin Expression.....	65
4.3. Expression der Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog in EpCAM-defizienten embryonale Stammzellen.....	67
4.4. Generierung von EpCAM/ERas Doppelknockouts (DKOs).....	70
4.5. Auswirkung des EpCAM-Verlustes auf die Proliferation von ESC	79
4.5.1. Untersuchung der Proliferation durch Zellzählung.....	80
4.5.2. Untersuchung der Proliferation mittels CFSE Färbung	83
4.5.3. Quantifizierung der EB-Größe	84
4.6. Effekte des EpCAM-Verlusts auf die EB-Struktur.....	89
4.6.1. EpCAM Expression bei spontaner Differenzierung in EBs	89
4.6.2. Veränderung der Oberflächenstruktur von EBs aus EpCAM-defizienten E14TG2a ESC Zelllinien.....	91
4.6.3. Vergleich der EpCAM-negativen 4T1-CTC und EpCAM-positiven 4T1 Tumorzelllinie	95
5. Diskussion und Ausblick	99
5.1. EpCAM hat einen Einfluss auf die forcierte endodermale Differenzierung von ESC.....	99
5.2. Mischkulturen von EpCAM-positiven und -negativen Stammzellen	101
5.3. EpCAM hat einen Einfluss auf die forcierte mesodermale Differenzierung von Stammzellen	102
5.4. EpCAM-Verlust vermindert die Expression von Pluripotenzmarkern in der qPCR	104
5.5. EpCAM/ERas DKO inhibiert die spontane kardiomyozytäre Differenzierung.	104
5.6. EpCAM-Verlust verursacht eine Hemmung der Proliferation in 2D- und 3D-Kulturen.....	106
5.7. Auswirkung der Proliferation auf die Differenzierung	107
5.8. EpCAM- KO verursacht Oberflächenveränderungen an EBs, die an die CTE erinnern.....	108
6. Zusammenfassung:.....	111
7. Summary	113
8. Literaturverzeichnis.....	115
9. Abbildungsverzeichnis	128

10. Tabellenverzeichnis.....	131
11. Abkürzungsverzeichnis	132
12. Danksagung	134
13. Publikation	135

1. Einleitung

1.1. Embryonalentwicklung von Maus und Mensch bis zur Organogenese

Die Entwicklung von Wirbeltieren beginnt in den Gonaden der Eltern mit der Entstehung der Keimzellen. In den Gonaden der Mutter, den Ovarien reifen die Oozyten heran, in den Gonaden des Vaters, dem Hoden, die Spermatozyten. Bei der Befruchtung entsteht durch die Fusion der haploiden Keimzellen die Zygote mit diploidem Chromosomensatz. Nach Befruchtung und metabolischer Aktivierung der Eizelle beginnt die embryologische Entwicklung (Schultz, 1993). Wenn das 2-Zellen-Stadium erreicht ist, beginnen die Furchungsteilungen. Die entstehende Blastomere bildet bis zur dritten Furchungsteilung nur einen lockeren Zellverband. Kennzeichen der Furchungsteilungen ist das fehlende Zellwachstum zwischen den Zellteilungen, dadurch entstehen zunehmend kleinere Tochterzellen. Nach etwa 3 Tagen ist das 16-Zellen Stadium erreicht und die Blastomere verliert bis zum 4. Tag die *Zona pellucida*, eine extrazelluläre Matrix, die die Oozyte und das frühe Embryo umgibt und an der Befruchtung der Oozyte beteiligt ist (Sinowatz, Topfer-Petersen, Kollé, & Palma, 2001). Die Zygote hat sich durch diesen Prozess zur Morula entwickelt. Starke Zell-Zell Verbindungen, *Tight Junctions*, zwischen den innenliegenden Zellen führen zur Bildung einer inneren Zellmasse (*inner cell mass* / Embryoblast), welche von der äußeren Zellmasse (*outer cell mass* / Trophoblast) zu unterscheiden ist. Flüssigkeit aus den Interzellularräumen konfluiert und bildet die Blastocystenöhle (Abbildung 1.1). Aus der inneren Zellmasse, dem Embryoblasten können pluripotente Stammzellen gewonnen und *in vitro* kultiviert werden. Aus dem Embryoblasten entsteht der eigentliche Embryo. Die Zellen des Trophoblasten und des primitiven Entoderms bilden größtenteils extraembryonale Gewebe wie die Plazenta. Inmitten der inneren Zellmasse entsteht die Amnionöhle.

Vor Beginn der Gastrulation, also der Differenzierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC) in die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm, geht aus dem Embryoblasten die zweiblättrige Keimscheibe hervor, die sich aus Epiblast und Hypoblast zusammensetzt.

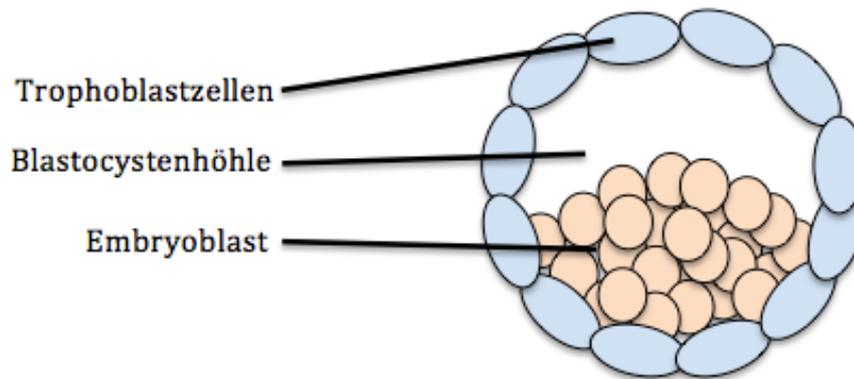


Abbildung 1. 1: Schema einer Blastocyste: Man unterscheidet den Embryoblasten (orange) vom Trophoblasten (blau). Die Trophoblasten des embryonalen Pols heften sich an die Uterusschleimhaut an.

Im Mäuseembryo beginnt die Gastrulation an Tag 6.5 nach Befruchtung (E6.5). Zu diesem Zeitpunkt ist der Epiblast umgeben von einer Schicht aus Viszeralem Endoderm, aus dem der endodermale Teil des Dottersacks hervorgeht (Wells & Melton, 1999).

Gastrulation und Neurulation laufen in allen Vertebraten sehr ähnlich ab. Am Boden der Amnionhöhle liegt der Epiblast, auf dem zu Beginn der Gastrulation der zur Primitivrinne eingesunkene Primitivstreifen entsteht. Dort verlieren Zellen, durch einen Prozess der als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird, ihre Polarität und ihren epithelialen Phänotyp und wandern als Mesendoderm zum Primitivstreifen. Ein Protein das bereits in dieser frühen mesodermalen Zellpopulation exprimiert wird, die aus dem Epiblasten entsteht, ist das neural cell adhesion molecule NCAM (Evseenko et al., 2010). Die Expression von NCAM korreliert auch mit einer EMT in Tumorzellen, wie zum Beispiel in Mammakarzinom-Zellen (Lehembre et al., 2008).

Die Entstehung eines Mesendoderms wurde in der murinen Embryogenese (Tada et al., 2005), dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in Zebrafischen etabliert (Rodaway & Patient, 2001). Die Existenz eines Mesendoderms im Verlauf der humanen Gastrulation ist umstritten (Evseenko et al., 2010).

Nachdem die Zellen des Embryoblasten in den Primitivstreifen eingewandert sind und sich im Raum zwischen Epiblast und viszeralem Endoderm befinden, differenzieren sie in ein Foxa2-positives Endoderm und ein Brachyury (T)-positives Mesoderm (Burtscher & Lickert, 2009). Endodermale Zellen gewinnen wieder an Polarität, flachen ab und reihen sich in einen epithelialen Verband ein. Der essentielle Transkriptionsfaktor FoxA2 ist an der Epithelialisierung endodermaler Zellen beteiligt und folglich können

FoxA2-defiziente Zellen keinen epithelialen Zellverband bilden (Burtscher & Lickert, 2009). Die Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct-4 und Sox2 werden als Pluripotenzfaktoren bezeichnet, da ihre hohe Expression für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status von ESC notwendig ist (D. J. Rodda et al., 2005). Nanog, Oct4 und Sox2 regulieren die Expression von Eomes (Eomesodermin), indem sie an die Enhancer-Region von Eomes binden. Nanog kann dadurch die frühe Expression von Eomes induzieren, während Sox2 und Oct-4 eine reprimierende Wirkung haben, Eomes induziert über den SMAD2/3-Signalweg die Expression von endodermalen Genen wie Sox17 (S. Brown et al., 2011; Teo et al., 2011). Im Verlauf der endodermalen Differenzierung nimmt die Nanog Expression ab und es kommt zu einer Endoderm-spezifischen Expression von Sox 17 (Niakan et al., 2010). Die zentrale Rolle von Sox17 in der endodermalen Differenzierung wurde in Sox17-defizienten Mäusen nachgewiesen und Knockout Tieren fehlt das Endoderm, aus dem der Darm entsteht (Kanai-Azuma et al., 2002). Das Alpha-Fetoprotein (AFP) wiederum wird stark im viszeralem Endoderm und dem daraus entstehenden Dottersack exprimiert, sowie in fetalen Leberzellen und im Darmepithel (Kwon et al., 2006).

Mesodermale Zellen haben einen mesenchymalen Phänotyp mit schmalen Zellkörper und langen Zellausläufern und sind im Vergleich zu epithelialen Zellen mit erhöhter Migrationsfähigkeit assoziiert (Kalluri & Weinberg, 2009). Der Transkriptionsfaktor Brachyury ist ein früher Marker und Regulator der mesodermalen Differenzierung. Durch die Bindung an SMAD1 kann er die Expression mesodermaler Gene induzieren (Faial et al., 2015). Endodermale und mesodermale Progenitorzellen differenzieren dann zu den verschiedenen Körperzellen (Abbildung 1.2 und 1.3).

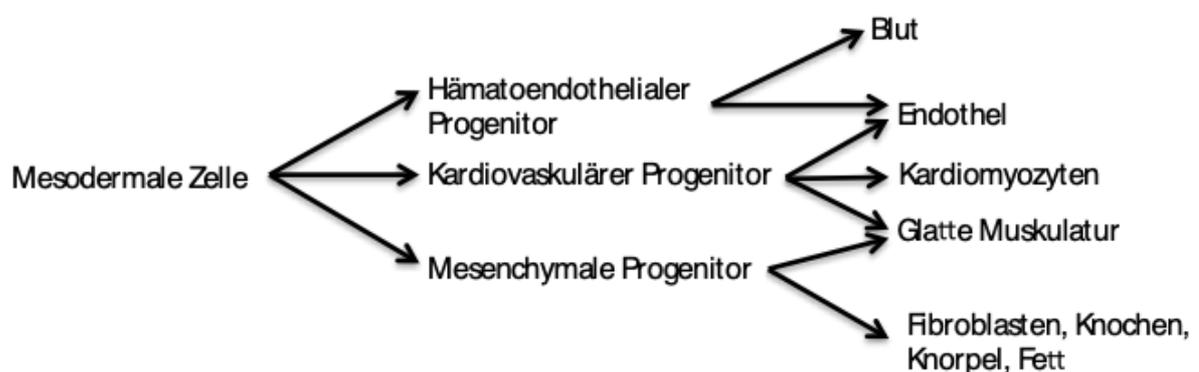


Abbildung 1. 2: Schema zur Differenzierung mesodermaler Zellen (angepasst von Evseenko et al. 2010)

Zellen, die nicht an der Wanderungsbewegung teilnehmen werden zum Ektoderm, so dass letztendlich drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm entstehen (Beddington & Robertson, 1999). Nachdem sich die Neuralfalten aufgestellt haben, beginnen säugerspezifische Veränderungen. Vorne stößt die Chorda auf die Prächordalplatte, aus der die Rachenmembran und ein Teil der Kopfmuskulatur hervorgehen. Nachdem sich die Neuralfalten zum Neuralrohr schließen, bleiben *Neuroporus anterior* und *posterior* noch lange Zeit mit der Amnionhöhle in Verbindung. Der Neurulation folgt die Organogenese, eine Phase in der alle wesentlichen inneren und äußeren Organe gebildet werden.

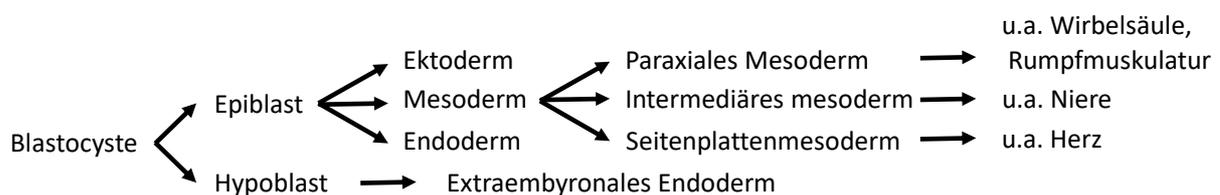


Abbildung 1. 3: Beispielhaft ist die Entstehung einiger mesodermaler Organe gezeigt. (Bianchi, Wilkins-Haug, Enders, & Hay, 1993; Linask & Lash, 1993; Sweetman, Wagstaff, Cooper, Weijer, & Munsterberg, 2008; Takasato & Little, 2015)

1.2. Die Entwicklung des Herzens:

Das Herz-Kreislauf-System ist das erste funktionsfähige Organsystem. Im Menschen beginnt das Herz bereits am 21. Tag *post conceptionem* zu schlagen (Sissman, 1970). Zu Beginn der Neurulation liegt die kardiogene Zone als verdickte Mesenchymplatte vor und seitlich der Neuralplatte. Durch kraniokaudale Krümmung und laterale Abfaltung kommt die Herzanlage unterhalb des Vorderdarmes zu liegen (Descensus des Herzens), außerdem vereinigen sich die paarigen Herzanlagen zu einem Herzschlauch. In situ-Hybridisierung zeigen in der Maus an Tag 7/8 *post conceptionem* eine Expression des Aktins α -CAA (alpha cardiac actin) im Herzschlauch (Sassoon, Garner, & Buckingham, 1988). Dieser verlängert und krümmt sich zur Herzschleife. Die Septierung des Herzens erfolgt mit der Entstehung des *septum interventriculare* und des *septum interatriale*. Daraufhin findet die innere Untergliederung des Herzes und die Septierung des Ausflusstraktes statt. Störungen der Entwicklung der Herzsepten und andere Herzfehlbildungen sind bei Menschen mit einer Prävalenz von 1,08% (Lindinger, Schwedler, & Hense, 2010) die häufigste angeborene Erkrankung. In Deutschland

werden 6000 Kinder pro Jahr mit einem Herzfehler geboren (Pathologie Böcker, 5. Auflage, Urban und Fischer, 2012).

Das Herz entsteht durch ein Zusammenspiel von herzinduzierenden Faktoren, die vom Endoderm sezerniert werden (u.a. die Liganden bone morphogenic protein 2 BMP2 und der fibroblast growth factor 8 FGF8) und herzinhibierenden Signalen aus Mesoderm (Chordin, Noggin, WNT 1,3,8, Serrate) und Neuroektoderm (kanonische WNT-Signalwege). Durch diese gegenseitige Regulation von Endo- und Mesoderm kommt es zu einer Mesoderm-spezifischen Differenzierung, welche unter anderem Kardiomyozyten generiert. In Mäuseexperimenten konnte gezeigt werden, dass aus explantiertem Herzmesoderm der Entwicklungsstufe E7.5 in der Gegenwart von viszeralem Endoderm und Primitivstreifen, Herzmuskel entsteht (Arai, Yamamoto, & Toyama, 1997). *In vivo* befindet sich das Herzmesoderm in unmittelbarer Nähe des vorderen Endoderms, welches im Laufe der Entwicklung zu pharyngealem Endoderm weiter differenziert.

Während in Zebrafischen (*Danio rerio*) und den Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) das BMP2 eine herausragende Rolle als vom Endoderm sezernierter Induktor zukommt, spielen in der Maus mehrere Mitglieder der BMP-Familie eine Rolle (Kishimoto, Lee, Zon, Hammerschmidt, & Schulte-Merker, 1997; Shi, Katsev, Cai, & Evans, 2000). Für die WNT-Signalwege kann man im Allgemeinen feststellen, dass kanonischen Signalwege (Signalweg über β -catenin) die Herzentwicklung hemmen, nicht-kanonische hingegen, wie der WNT-11-Signalweg, die Entstehung von Herzmesoderm begünstigen. Letzteres aktiviert die Protein Kinase C (PKC) und die Calmodulin Kinase II (CamKII) über G-Proteine (Kuhl, Sheldahl, Malbon, & Moon, 2000)). Ferner wirkt WNT-11 möglicherweise auch als Gegenspieler kanonischer WNT-Signalwege durch eine Hemmung von β -Catenin. Es lassen sich also drei große Proteinfamilien abgrenzen, die bei der Entwicklung von Herzmesoderm eine Rolle spielen: Die FGF-, die BMP- (FGF-8 und BMP-2 spielen eine synergistische Rolle während der Kardiogenese) und die WNT-Familie. Unter den Transkriptionsfaktoren, die die Herzentwicklung steuern, gibt es Homöoboxgene wie NKX2.5 (Nirenberg und Kim X2.5), dessen Promotor GATA-Sequenzen enthält (Lien et al., 1999; Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998). Ein weiteres Beispiel sind Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren wie GATA4, ein Mitglied einer Familie an Transkriptionsfaktoren, die an die DNA-Sequenz GATA binden.. In Wirbeltieren existieren drei GATA-Gene: GATA4, 5, 6. GATA4-defiziente embryonale Stammzellen können zu kontraktile Kardiomyozyten differenzieren, allerdings zeigt sich *in vivo* eine *cardia bifida*

(Entstehung separater Herzschräuche, was embryonal letal ist) und eine reduzierte Zahl kontrahierender Herzmuskelzellen (Kuo et al., 1997; Molkentin & Olson, 1997). Umgekehrt verstärkt eine Überexpression von GATA 4 die Kardiogenese.

1.3. Stammzellen:

Der Begriff „Stammzelle“ wird erstmals von dem Zoologen August Weismann in seiner Abhandlung über „Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydromedusen“ (Weismann, Leipzig 1883, Fischer) verwendet. Dieser beschreibt Stammzellen als „indifferenzierte Zellen“ und Vorläufer der Keimzellen. Definitionsgemäß besitzen Stammzellen zwei Eigenschaften: Die Selbsterneuerung, d.h., dass aus jeder Zellteilung mindestens eine Stammzelle hervorgeht, und die Potenz, das heißt, die Fähigkeit zu verschiedenen Zellen zu differenzieren. Pluripotente Zellen sind dabei in der Lage zu Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Im Gegensatz hierzu sind totipotente Zellen auch dazu in der Lage extraembryonales Gewebe zu bilden (Singh, Saini, Kalsan, Kumar, & Chandra, 2016). In dieser Arbeit wurden pluripotente embryonale Stammzellen verwendet. Aufgrund dieser Eigenschaften spielen Stammzellen bei der Entstehung und dem Wachstum von Organen, sowie der Regeneration von Geweben im Erwachsenen eine zentrale Rolle.

Der Einsatz von Stammzellen zu therapeutischen Zwecken, z.B. bei Verletzungen des Rückenmarks oder neurodegenerativen Erkrankungen (Kikuchi et al., 2017), ist daher ein zentrales Forschungsgebiet. Ein wiederkehrendes Problem bei der medizinischen Nutzung von Stammzellen liegt in der gerichteten und vollständigen Differenzierung von Stammzellen in die gewünschte Zellart. Eine Gefahr ist, dass embryonale Stammzellen (ESC) nach Implantation embryonale Tumoren, sog. Teratome bilden. Teratome enthalten Zellen aller drei Keimblätter in ungeordneter Weise. Tatsächlich gibt es eine Reihe von Eigenschaften, die ESC mit Tumorzellen gemeinsam haben. Dazu gehört v.a. das Wachstum, das ohne Kontaktinhibition, ohne Verankerung der Zellen und ohne Seneszenz abläuft.

Im Vergleich zu EC (embryonic carcinoma) Zellen, die aus Teratokarzinomen isoliert werden (G. R. Martin, 1981), zeigen ESC keine genetischen Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen oder chromosomale Anomalien, die diese Eigenschaften erklären könnten. Die Mechanismen die zu unkontrolliertem Wachstum von ESC und zu einer Teratombildung führen sind also nicht offensichtlich und müssen noch aufgeklärt werden.

Auf der Suche nach Genen, welche spezifisch in ESC exprimiert werden und die Teratogene Kapazität von ESC regulieren, entdeckten Takahashi et al. unter anderem das ERas Gen (embryonic stem cell-expressed Ras), auf welches später genauer eingegangen wird (Takahashi, Murakami, & Yamanaka, 2005).

Außerdem gibt es Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, welche bei der Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps eine besondere Bedeutung haben, darunter Oct3/4, Klf4 und Sox2. Durch retrovirale Transfektion von vier Faktoren (Sox2, Oct3/4, Klf4 und c-Myc) in differenzierte Zellen ist es gelungen sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) herzustellen (Takahashi & Yamanaka, 2006). Oct 4 kann einen Komplex mit Sox2 bilden und als Kernkomplex über die Bindung an spezifische Promotersequenzen die Expression von weiteren für die Entwicklung relevante Gene regulieren (Boyer et al., 2005). Homozygot Oct4-defiziente Embryonen bilden *in vitro* eine Blastozyste, allerdings sind die Zellen der inneren Zellmaße nicht pluripotent und differenzieren zu Zellen des Trophoblasten (Nichols et al., 1998). Durch retrovirale Transduktion von ES Zellen mit dem Transkriptionsfaktor Klf4 bleiben ES-Zellen auch unter LIF-Entzug länger pluripotent, (Y. Li et al., 2005), was unter anderem an einer erhöhten Oct4-Expression gezeigt wurde. Klf-4 kann vermutlich die Expression des Tumorsuppressors p53 supprimieren. P53 bindet während der Differenzierung der Zellen an den Promotor von Nanog und unterdrückt dessen Expression (T. Lin et al., 2005). Auch Nanog ist an der Erhaltung der Pluripotenz von Zellen beteiligt, kann allerdings die Pluripotenz der Zellen unter LIF-Entzug nicht aufrechterhalten (Chambers et al., 2003). Durch Expression einer stabilen, nicht degradierbaren Form von c-Myc (mit phosphoryliertem Theronin 58) können ESC unabhängig von LIF-haltigem Medium pluripotent bleiben (Cartwright et al., 2005). Auch Sox 2-defiziente Zellen differenzieren wie Oct4-defiziente Zellen zu trophoblastären Zellen (Avilion et al., 2003).

Die Expression dieser Gene wiederum kann durch membranständige Rezeptoren, über Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Darunter gibt es G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Callihan, Mumaw, Machacek, Stice, & Hooks, 2011), aber auch Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Redmer et al., 2011). Ein weiteres Membranproteine ist EpCAM, welches die Migration und die Proliferation von Zellen direkt beeinflussen kann (Munz et al., 2004). Das extrazelluläre Spaltprodukt von EpCAM, EpEX kann durch Aktivierung des STAT3 Signalweges die Selbsterneuerung von Stammzellen steuern kann (Kuan et al., 2017). Es wurde außerdem vermutet, dass das intrazelluläre Spaltprodukt von EpCAM, EPICD in den Nucleus translozieren kann

und an die Promotoren von c-Myc, Oct-4, Nanog, Sox2 und KLf4 binden kann (T. Y. Lu et al., 2010).

1.4. EpCAM

1.4.1. EpCAM-Gen:

Das EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 2, bei der Maus auf Chromosom 17. Die DNA-Sequenzen zeigen eine hohe Konservierung und eine Homologie von ca. 81% zwischen Mensch und Maus (Dolle et al., 2015). Das Gen umfasst ca. 14kb und 9 Exons (Balzar, Winter, de Boer, & Litvinov, 1999). Die Regulation der Expression des EpCAM Proteins erfolgt auf mehreren Ebenen ab. Aus Tumorzellen und gesunden Epithelzellen ist bekannt, dass unmethylierte CpG-Dinukleotide in der Promotorregion mit einer erhöhten EpCAM-Expression einhergehen. Methylierung der CpG-Inseln dagegen reprimiert die EpCAM-Expression. Eine Demethylierung führte in diesen Fällen nicht zu einer Zunahme der Expression, was auf zusätzliche Regulationsmechanismen hinweist (G. Yu et al., 2008). Ein solcher Mechanismus ist die Trimethylierung des Lysin 4 im Histon 3, die zur Aktivierung der Transkription durch die Polymerase II führt.

Eine Trimethylierung des Lysin 27 im Histon 3 dagegen reprimiert die Transkription (Sarrach et al., 2018). Neuere Daten aus unserem Labor zeigen außerdem eine Veränderung der EpCAM-Expression bei der Differenzierung in Zelllinien, in denen die EpCAM-cDNA von einem CMV-Promotor transkribiert wird. Das lässt auf eine Regulation auf Protein-Ebene schließen.

1.4.2. EpCAM Protein:

Die erste Beschreibung von EpCAM in Kolonkarzinomen fällt auf das Jahr 1979 zurück (Herlyn, Steplewski, Herlyn, & Koprowski, 1979). Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül, auch bekannt als tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1), trophoblast cell-surface antigen 1 (TROP1), in Mäusen auch CD326, ist ein Typ1 transmembranes Glykoprotein. EpCAM besitzt eine 265 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne (EpEX), eine 23 Aminosäuren lange Transmembrandomäne und eine kurze, 26 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne (EpICD). Diese besitzt zwei alfa-Actinin-bindende Domänen (Balzar et al., 1999). Drei N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne bestimmen die Stabilität des Proteins. In Kopf-Hals Plattenepithel-Karzinomen ist EpCAM meist hyperglykosyliert

(Pauli et al., 2003). Dabei führt die N-Glykosylierung des Asparagin 198 zu einer längeren Halbwertszeit von EpCAM (Munz, Baeuerle, & Gires, 2009; Munz, Fellingner, Hofmann, Schmitt, & Gires, 2008).

Die Aktivität von EpCAM bei der Regulation von intra- und interzellulären Vorgängen wird durch verschiedene molekulare Mechanismen bewerkstelligt. Ein solcher Mechanismus ist die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) (Maetzel et al., 2009), die bereits als ein zentraler Prozess bei der Entstehung der Alzheimer-Plaques identifiziert wurde. Hierbei wird nach einer Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) das A β Fragment generiert, das sich mit anderen A β Fragmenten zu Plaques zusammenlagert (Lichtenthaler, Haass, & Steiner, 2011). Die RIP ist stets ein zweistufiger Prozess (M. S. Brown, Ye, Rawson, & Goldstein, 2000): Zunächst wird das Transmembranprotein außerhalb der Membran gespalten, wodurch es zur Freisetzung einer löslichen Ektodomäne und zur Bildung eines C-terminalen Fragments (CTF) kommt. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass eine zweite Protease das CTF-Protein innerhalb der Membran spalten kann. Der extrazelluläre Teil EpCAMs wird durch eine Metalloprotease der ADAM-Familie, TACE-1 (ADAM-17) gespalten. Die extrazelluläre Domäne EpEX wird freigesetzt und übrig bleibt das EpCAM-CTF. In einem zweiten Schritt spaltet die γ -Sekretase den transmembranen Teil des EpCAM-CTF, wodurch ein extrazelluläres, lösliches A β -like Fragment und EpICD, das intrazellulär freigesetzt wird, generiert werden. EpICD wird dann mit anderen Molekülen Teil eines Proteinkomplexes, welcher neben EpICD, das an die vierte LIM Domäne von FHL 2 (four and a half LIM domains) gebunden ist, β -catenin und Lef-1, die an der zweiten und dritten LIM-Domäne von FHL2 gebunden sind (B. Martin et al., 2002), beinhaltet. Der Komplex kann an die Promotoren verschiedener Gene binden, u.a. Nanog, Oct4, Klf4, Sox2, Myc (Huang et al., 2011; T. Y. Lu et al., 2010; T. Yu, Ma, & Wang, 2017). EpCAM reguliert außerdem die Expression von Cyclin D1, welcher als Ko-Faktor von CDK4 (cyclin dependent kinase 4) und CDK6 (cyclin dependent kinase 6) den Übertritt von der G1 zur S-Phase des Zellzyklus ermöglicht und damit die Proliferation beeinflusst (Chaves-Perez et al., 2013).

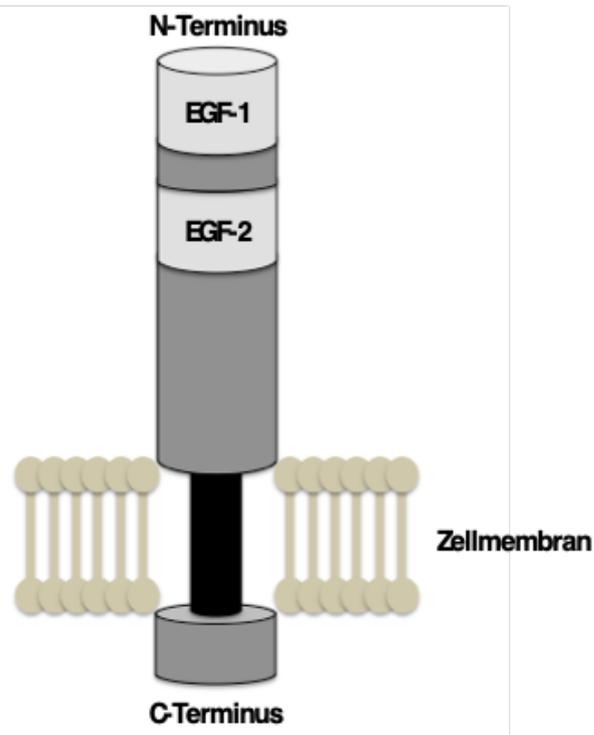


Abbildung 1. 4: Struktur des humanen EpCAM Proteins (nach Schnell et al., 2013): Das humane EpCAM-Protein besteht aus 314 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des murinen EpCAM ist der des Menschen zu 81% identisch (Bergsagel, Victor-Kobrin, Timblin, Trepel, & Kuehl, 1992).

Alternativ kann EpCAM durch die Aspartylprotease BACE-1 (beta amyloid precursor converting enzyme) oder β -Sekretase gespalten werden (Tsaktanis et al., 2016). Nach Endozytose kann das Enzym BACE-1 EpCAM in saurem Milieu spalten. Alternativ wird das endozytierte EpCAM von sauren Hydrolasen in Lysosomen prozessiert.

In manchen Zellen existieren auch modifizierte EpCAM-Proteine. In Pankreastumoren wurde eine Variante des EpCAM Proteins mit fehlender intrazellulärer Domäne identifiziert, welches eine hohe Expression zeigte und mit schlechter Prognose korrelierte (Fong et al., 2014).

1.4.3. EpCAM Funktionen

Zelladhäsion

EpCAM wird in embryonalen Stammzellen und Epithelzellen (Plattenepithelien und Drüsenepithelien) exprimiert. Durch Transfektion von EpCAM-negativen L-Zellen (murine Fibroblasten), die keine klassischen, E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte ausbilden, mit EpCAM, konnte gezeigt werden, dass EpCAM Zelladhäsionen ermöglicht (Litvinov, Velders, Bakker, Fleuren, & Warnaar, 1994). In gemischten

EpCAM-positiven und -negativen L-Zell-Kulturen stellte sich EpCAM als homotypisches Adhäsionsmolekül heraus, welches eine Aggregatbildung und Segregation von EpCAM-positiven Zellen vermittelt (Litvinov, Velders, et al., 1994).

Der Aufbau des EpCAM Proteins unterscheidet sich jedoch von anderen Adhäsionsproteinen wie den Cadherinen, Nektinen, NCAM (auf Nervenzellen), PeCAM (CAM = cell adhesion molecule), Selektinen und Integrinen. Nur die EGF-like-repeats der extrazellulären Domäne hat EpCAM mit Selektinen und Mitgliedern der lin12/notch/GLP-1-Rezeptorfamilie gemeinsam (Balzar et al., 1999). EpCAM ist in epithelialen Zellverbänden weder in Tight Junctions, noch in Desmosomen, noch in Hemidesmosomen zu finden, sondern an der basolateralen Membran mit E-Cadherin kolokalisiert (Balzar et al., 1999; S. K. Wu & Yap, 2013). Im Vergleich zu E-Cadherin ist EpCAM ein schwaches Adhäsionsprotein (Litvinov, Bakker, Gourevitch, Velders, & Warnaar, 1994; Litvinov et al., 1997). Es gibt jedoch Daten, die suggerieren, dass EpCAM die Stärke der E-Cadherin-vermittelten Bindung verringert (Litvinov et al., 1997). Ist EpCAM mit E-Cadherin kolokalisiert, dann schwächt es die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion, indem es die Bindung von E-Cadherin an das Zytoskelett stört (Litvinov et al., 1997). Das könnte für die Mobilität von Zellen bei der Metastasierung oder im Rahmen der embryonalen Entwicklung von Bedeutung sein.

Embryonale Entwicklung und Morphogenese

Mehrere Publikationen haben gezeigt, dass EpCAM für die normale embryonale Entwicklung der Maus notwendig ist. EpCAM-defiziente Mäuse (EpCAM $-/-$) sind nicht lebensfähig und sterben *in utero* aufgrund plazentarer Anomalien (Nagao et al., 2009), oder erkranken postnatal an CTE, der chronic tufting enteropathy (Guerra et al., 2012; Lei et al., 2012; Sivagnanam et al., 2008). Diese seltene Erkrankung ist charakterisiert durch wässrige Diarrhö mit Störungen des Elektrolythaushaltes sowie Gedeihstörungen. Sivagnanam *et al.* erkannten einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism; SNP) an der Donor Splice Stelle des Exon4 von EpCAM als ursächlich für die CTE (Sivagnanam et al., 2008). Andere mögliche Ursachen einer verkürzten Aminosäuresequenz und dadurch Proteinstruktur sind Rasterschubmutationen durch Insertion eines Basenpaares und folgendem frühzeitigem Stop-Codon (Al-Mayouf, Alswaied, Alkuraya, Almehaidib, & Faqih, 2009). Die verkürzten EpCAM-Proteine werden endozytiert und abgebaut oder werden nicht an die Zellmembran transportiert (Schnell, Kuipers, & Giepmans, 2013). In den Epithelzellen der Darmschleimhaut von EpCAM-Knockout-Mäusen mit CTE zeigte sich,

dass E-Cadherin und β -catenin vermehrt im Zellinneren lokalisiert waren und nicht an der Zellmembran. EpCAM spielt also auch für die epitheliale Architektur eine wichtige Rolle (Guerra et al., 2012).

Regeneration

In der Leber erfüllt EpCAM die Funktion eines molekularen Schalters und ermöglicht die Regeneration hepatischer Zellen (z.B. Hepatocyten, Cholangiocyten) aus den hepatischen Stamm-/Progenitorzellen (HSPC) (Miyajima, Tanaka, & Itoh, 2014). Die Progenitorzellen der Leber haben eine hohe EpCAM-Expression, während diese in differenzierten Zellen abnimmt (Gires, 2012; Schmelzer et al., 2007; Yoon et al., 2011). Der Mechanismus, dem die Differenzierung der HSPC unterliegt ist bisher nicht bekannt. Aus der embryonalen Entwicklung der Leber von Zebrafischen ist bekannt, dass EpCAM die Differenzierung von Hepatozyten aus endodermalen Zellen ermöglicht, indem es WNT-2bb Signale dereprimiert. Dabei bindet EpCAM an Kremen-1 und verhindert die Interaktion von Kremen-1 und Dickkopf 2. Dadurch wird der WNT (Wingless-related integration site) - Rezeptor Lrp6 (lipoprotein receptor-related protein) an der Zellmembran stabilisiert und ermöglicht als Korezeptor des Wnt2bb-Signalweges dessen Aktivierung (H. Lu, Ma, Yang, Shi, & Luo, 2013). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch bei Regenerationsprozessen der Leber vorgeschlagen (H. Lu et al., 2013). Während der Phagozytose untergegangener Hepatozyten durch Makrophagen werden WNT3a-Signalwege aktiviert, die die Differenzierung von hepatischen Progenitorzellen zu Hepatozyten anstoßen (Boulter et al., 2012). EpCAM könnte auch hier als Derepressor des WNT-Signalweges funktionieren (H. Lu et al., 2013).

Tumoren

In vielen Tumoren (u.a. Brustkrebs, Ovarialkarzinom, Gallenblasenkarzinom) korreliert die EpCAM-Expression mit einer schlechten Prognose (Spizzo et al., 2011; Spizzo et al., 2006; Spizzo et al., 2004). Das trifft aber nicht immer zu. In gastrointestinalen Tumoren korreliert EpCAM mit guter Prognose (Akita et al., 2011), das gleiche gilt für Nierenzellkarzinome, Schilddrüsenkarzinome und Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region (Baumeister et al., 2018; Ralhan et al., 2010; Seligson et al., 2004). Molekulare Mechanismen, welche diese Diskrepanz im prognostischen Wert von EpCAM in Bezug auf den klinischen Verlauf erklären, wurden bislang nicht identifiziert. Da EpCAM in die Regulation der Zelladhäsion involviert ist, könnte man vermuten, dass dessen Expression bei der Induktion einer EMT und im Verlauf der Metastasierung,

ähnlich wie E-Cadherin, abnimmt. Zwar findet man in Mikrometastasen eine Herunterregulation von EpCAM und eine vergleichbar hohe Expression in Primärtumoren und overten Metastasen (Jojovic, Adam, Zangemeister-Wittke, & Schumacher, 1998), jedoch kann eine Überexpression von EpCAM auch mit einer Induktion von EMT (epithelial-mesenchymal-transition) einhergehen, z.B. in Nasopharynxkarzinomen (M. H. Wang et al., 2018). Die exakte molekulare Funktion von EpCAM bei der Regulation der EMT und in der metastatischen Kaskade ist daher bislang noch unzureichend erforscht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Verwendung von EpCAM in der Onkologie ist dessen Expression in systemischen Tumorzellen. EpCAM dient neben CD 40, 24, 34, 44, 90, 117, 133, 166, ALDH als Anker-molekül bei der Isolierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) aus dem Blut von Tumorpatienten. Die Präsenz von ≥ 5 EpCAM-positiven CTC in metastatischen Mamma-Karzinompatienten und von ≥ 1 EpCAM-positiver CTC in nicht-metastatischen Mamma-Karzinompatienten ist mit einer signifikant verschlechterten Prognose verbunden (Cristofanilli et al., 2004; Janni et al., 2016).

1.5. ERas

1.5.1. ERas Gen

Das murine ERas (ES-cell expressed Ras)-Gen liegt auf dem X-Chromosom und hat eine Gesamtlänge von 4332 Basenpaaren. Es ist zwischen Maus und Mensch hoch konserviert. Im menschlichen Genom ist die Gensequenz des murinen *ERAS* dem menschlichen HRas (Ha-Ras2) am ähnlichsten. Dieses kodiert für ein Protein, das dem murinen ERas zu 76% identisch ist, weshalb es als orthologes Gen im Menschen betrachtet wird (Takahashi, Mitsui, & Yamanaka, 2003). Die für das 233 Aminosäuren lange Protein kodierende ERas-Sequenz befindet sich auf dem zweiten von insgesamt zwei Exons (Abbildung 1.5).

1.5.2. ERas Protein

Die Aminosäure-Sequenz von ERas stimmt zu etwa 40% mit der von HRas, KRas und NRas überein (Takahashi et al., 2005). Die für kleine G-Proteine typischen Domänen, die GTP-bindende G-Domäne und das terminale CAAX-Motiv, finden sich auch im ERas Protein wieder (Nakhaei-Rad et al., 2016; Vetter & Wittinghofer, 2001). Damit ERas den Akt-Signalweg aktivieren kann, muss ERas an der Membran lokalisiert sein (Takahashi et al., 2005). Zu diesem Zweck ist ERas mit 3 modifizierten Cysteinen

(Cys²²⁰ und Cys²²² in der HVR, Cys²²⁴ im CAAX-Motiv) ausgestattet. Bei der Proteinbiosynthese wird zuerst der Cysteinrest Cys²²⁴ farnesyliert. Anschließend wird das Protein in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, in dem die letzten drei Aminosäuren des CAAX-Motivs durch Endoproteasen abgespalten werden. Anschließend wird das nun C-Terminal lokalisierte Prenylcystein (Cys²²⁴) methyliert. Hierdurch und durch die Palmytoilierung der anderen beiden Cysteinreste in der Hypervariablen Region (HVR) wird die Hydrophobizität des C-Terminus erhöht. Das ermöglicht eine Anhaftung an die Plasmamembran und die sequenzielle Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs. In der Regel gehen Ras Proteine durch die Hydrolyse von GTP in den inaktiven Zustand über. Das ERas Protein hat drei substituierte Aminosäuren an Positionen, die für die GTPase Aktivität entscheidend sind, und ist folglich hyperaktiv (Takahashi et al., 2005).

1.5.3. ERas Funktionen

Embryonale Entwicklung

Im Gegensatz zu anderen Ras Proteinen bindet ERas nur die PI3K, nicht aber Raf-1 oder RalGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator). Bis vor kurzem wurde ERas in Stammzellen nur eine Funktion in Proliferation und Teratombildung zugeschrieben (Takahashi et al., 2005). Yu et al. (2013) zeigten aber, dass die Überexpression von ERas und Akt sowohl die Expression der Reprogrammierungsfaktoren Oct-4, Sox-2, Klf4, c-Myc, als auch die Bildung von induzierten Stammzellkolonien aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) deutlich potenzieren konnte. Allerdings konnten ERas und Akt die Faktoren Oct4, Sox2 oder Klf4 zur Generierung von iPSC nicht ersetzen.

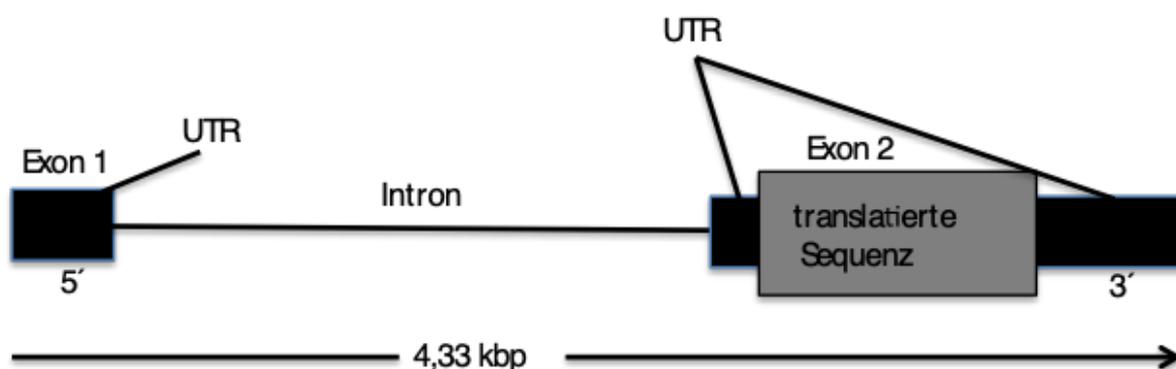


Abbildung 1. 5: ERas wird auf dem X-Chromosom kodiert. Das Gen besteht aus 2 Exons, die von einem Intron getrennt werden. Die Gesamtlänge des Gens beträgt 4332 Basenpaare. Exon1 hat eine Länge von 139 bp, das Intron eine Länge von 3255 bp, Exon2 hat eine Länge von 938 bp. Nach Spleißen der Prä-mRNA hat die mRNA nur noch eine Länge von 1077bp.

Ein bedeutendes Zielmolekül des Akt-Signalweges ist FoxO1 (forkhead transcription factor1). Durch Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors wird es aus dem Zellkern entfernt und führt zu einer Entthemung zellreprogrammierender Signalwege durch Zunahme der Transkription Zellzyklus- und Apoptose- regulierender Gene (wie Cdkn1a, Bim1, Ccng2, Ddb1).

In vivo ist ERas im Vergleich zu EpCAM aber nicht notwendig für die embryonale Entwicklung des Organismus. ERas defiziente Mäuse entwickeln sich normal und sind fruchtbar (Takahashi et al., 2003).

Wie oben erwähnt aktiviert ERas den AKT/PI3K/mTor-Signalweg. mTOR ist wichtig für die Proliferation von ES Zellen und die normale Entwicklung von Mäusen (Murakami et al., 2004). Eine weitere Funktion von PI3K ist neben Proliferation und Tumorigenität die Selbsterneuerung. Die Kinase GSK3 β wird von PI3K gehemmt. GSK3 β wiederum kann einen Serinrest (Ser³¹⁵) von p53 phosphorylieren (Qu & Koromilas, 2004). Lin et al. (2005) zeigten, dass p53 Nanog herunterregulieren kann und dadurch die Differenzierung von ES Zellen induziert (T. Lin et al., 2005). Diese Wirkung von p53 ist aber abhängig vom Phosphorylierungszustand des Ser³¹⁵. Folglich könnte die Hemmung von GSK3 β durch PI3K die Selbsterneuerung von Stammzellen unterstützen (Takahashi et al., 2005).

Es gibt auch dafür Hinweise, dass ERas an der frühen Differenzierung von Embryonen, nämlich bereits an der Bildung der dreiblättrigen Keimscheibe beteiligt ist (Z. A. Zhao et al., 2015). ESC mit einer erhöhten oder verminderten ERas Expression bildeten, unter dem Lichtmikroskop betrachtet, strukturell normale EBs. Quantitative PCR Analysen von spezifischen Markern der verschiedenen Keimblätter zeigten eine viel höhere ERas Expression in Endoderm und Epiblast als im Mesoderm an Tag 7.5. Durch in-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass an Tag 7.5 die ERas Expression im anterioren viszeralen Endoderm und im Epiblasten erhöht ist, wobei innerhalb des Epiblasten die Expression im Neuroektoderm am höchsten war. Die dynamische Expression von ERas wird in dieser Phase der Entwicklung wahrscheinlich von β -Catenin gesteuert, welches ERas inhibiert. Durch den Knockdown von ERas wurde vermehrt Mesoderm (Foxf1, Flk1) und Primitivstreifen (T, Mixl1) gebildet (Z. A. Zhao et al., 2015).

ERas-Funktion in der Rattenleber

Kürzlich berichteten Nakhaei-Rad et al. (2016) von der Rolle des ERas-Proteins in der Leber von Ratten. Die Expression zeigte sich dabei als besonders hoch in quieszenten hepatischen Sternzellen. Diese Zellen gelten als mesenchymale Stammzellen der Leber, die Vitamin A speichern und immunmodulatorische Funktion haben. Damit einhergehend war eine Aktivierung des Akt-Signalweges sowie des STAT3-, mTOR- und Hippo-Signalweges und Hemmung von FoxO1 und YAP zu beobachten. Bei Leberschäden sinkt die ERas Expression durch DNA-Methylierung des Promotors und die Zellen proliferieren und differenzieren (Nakhaei-Rad et al., 2016).

Bedeutung von ERas im Menschen

Die Bedeutung von ERas im Menschen ist noch unklar (Kameda & Thomson, 2005). Bisher galt das *ERAS* Gen im Menschen als Pseudogen. Die Bestimmung der Menge an ERas messenger RNA (mRNA) mittels quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) konnte keine ERas Expression in humanen Stammzellen (H1 und H9) nachweisen. Nur ein Teil des nicht kodierenden Abschnittes des Gens wird tatsächlich im Menschen transkribiert. Doch auch dieser Teil wird im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung reprimiert. Da die Expression von ERas in verschiedenen Säugern wie Mäusen, Hunden, Kühen, aber nicht in Schimpansen und Menschen zu verzeichnen ist, vermuteten Kameda und Thomson (2005), dass die Inaktivierung des Gens ein relativ kurz zurückliegendes Ereignis der Säugarentwicklung ist. Dafür machen sie unter anderem Polyadenylierungssignale im *ERAS* Gen vom Menschen verantwortlich, die vor dem kodierenden Exon liegen. Zusätzlich enthält das menschliche *ERAS* Gen Insertionen von Alu-S Retrotransposons, die die Expression in diesem Locus verändern können (Kameda & Thomson, 2005).

Tumoren

2009 zeigten Kaizaki et al., dass ERas teilweise in Magentumoren des Menschen exprimiert wird (Kaizaki et al., 2009). Wenig später stellte sich heraus, dass die ERas-Expression in Magentumoren mit Leber- und Lymphknotenmetastasen assoziiert ist (Kubota et al., 2010). In Bezug auf histologische Differenzierung der Magentumoren konnte keine Korrelation zur ERas-Expression gefunden werden. Um die Bedeutung von ERas in Magentumoren weiter zu untersuchen wurden MKN-28- und BGC-823-Zellen mit ERas siRNAs transfiziert. Das führte zu einer Verminderung der Proliferation, Klonalität und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen (Y. Liu et al., 2013).

2. Zielsetzung

Um künftig EpCAM als einen Marker physiologischer (Entwicklung, Regeneration) und pathologischer Prozesse (Tumorstadium, Metastasierung) nutzen zu können, ist es notwendig mehr über dessen Rolle in embryonalen Stammzellen in Erfahrung zu bringen. In Gefrierschnitten von Mäuseembryonen der Entwicklungsstufe E9.5 bleibt nach Färbung mit EpCAM-Antikörpern das Herz ausgespart. Die dem Herzen benachbarten Epithelzellen des Verdauungstraktes und des pharyngealen Epithels weisen hingegen eine starke Expression von EpCAM auf. EpCAM ist also im Epithel endodermalen Ursprungs vorhanden, welches über Induktionsprozesse die Entwicklung des Herzens steuert (Arai et al., 1997; Lewis & Tam, 2006). Die Rolle EpCAMs in diesem Induktionsprozess ist jedoch noch unbekannt, genauso wie der Stellenwert EpCAMs bei der frühen Entstehung von Endo- und Mesoderm im Rahmen der Gastrulation noch unklar ist.

Vorarbeiten aus unserem Labor zeigten bei Überexpression von EpCAM in ESC eine verminderte mesodermale und kardiomyozytäre Differenzierung, aber verstärkte endodermale Differenzierung (Sarrach et al., 2018). Bei einem genetischen Knockout von EpCAM dagegen zeigte sich ein gemischter Effekt auf die kardiomyozytäre Differenzierung. Ein Teil der Zelllinien wurde in der Bildung von Kardiomyozyten gehemmt, ein Anderer war unbeeinflusst. Da die Überexpression der Spaltprodukte von EpCAM keinen Einfluss auf die kardiomyozytäre Differenzierung hatte wurde nach anderen Signalwegen und Interaktionspartnern von EpCAM gesucht. Dabei brachten massenspektrometrische Untersuchungen das ERas-Protein als Interaktionspartner von EpCAM hervor. Beide, EpCAM und ERas, setzen den AKT-Signalweg in ESC in Gang. Eine Überexpression von ERas oder membranständigem/aktivem AKT führte zu einer Hemmung der kardiomyozytären Differenzierung, genauso wie die Überexpression EpCAMs (Sarrach et al., 2018).

Ziel der Arbeit war es daher die Funktion von EpCAM und ERas in Stammzellen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten

- aus EpCAM-defizienten Zelllinien EpCAM/ERas Doppelknockouts (DKO) hergestellt werden, mit der Frage, ob der Verlust von ERas zu einer weiteren Inhibierung der kardiomyozytären Differenzierung führt.
- die Auswirkung von EpCAM KO bzw. EpCAM/ERas DKO auf die Proliferation untersucht werden.

- die Auswirkung von EpCAM KO auf endo- und mesodermale Differenzierung untersucht werden.
- schließlich sollte auch die Bedeutung von EpCAM und ERas für die Struktur von Embryoid Bodies ermittelt werden.

3.Material und Methoden

3.1.Material

3.1.1. verwendete Chemikalien

Tabelle 1: verwendete Chemikalien

Artikel	Hersteller	Produktnummer/Bestellnummer/ Katalognummer
Basen	Merck KGaA, Darmstadt	110784, 111615, 101960
Antikörperverdünnungspuffer	Systeme GmbH & Co. KG, Hamburg	HK156-5K
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Kalifornien (USA)	1610700
Aqua dest.	Braun, Melsungen	387875
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	M3148
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	A9418
Brij-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	B4184
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg	15375.02
CHIR 99021	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	SML1046
Corning® Costar® Stripette	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	CLS4100 , CLS4250 , CLS4050
Cryomold Intermediate 4566	Sakura Finetek, Staufen	SA62534-10, SA62534-15, SA62534
Cycloamine	Selleckchem.com, München	S1146
Dimethylsulfoxid (DMSO) EDTA	Karlsruhe	4720.1
EGTA	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0878,0100
Eosinlösung 0,5%	Apotheke Klinikum Großhadern	
ESGRO® LIF	Millipore, Schwalbach	ESG1107
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg	342003
FACSafe	Becton Dickinson, Heidelberg	340345
FACSRinse	Biochrom AG, Berlin	340346
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	F7524
bFGF	Thermo Fisher, Waltham (USA)	PHG0367
Gelatine	Serva GmbH, Heidelberg	22151.02
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	G8898
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	G2289
Handschuhe Peha-Soft Latex	Hartmann, Heidenheim	9421615
3401	Merck KGaA, Darmstadt	105175
Kaisers Glycingelatine	Merck KGaA, Darmstadt	109242
Kollagenase Typ1	Stemcell, Vancouver (CAN)	7902
Mayer`s Hämalun Lösung	Millipore, Schwalbach	109249
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A2263,0500
Organische Lösungsmittel,	Merck KGaA, Darmstadt	492016
Alkohole	Karlsruhe	5054.1
Paraformaldehyd	Apotheke Klinikum Großhadern	

3.Material und Methoden

PBS Lösung	Apotheke Klinikum Großhadern	
PBS-Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe	18912014
Pipetboy® Comfort	Integra Biosciences, Fernwald	14222-180
Probes Mastermix	Roche, Mannheim	4707494001
Proteinase K	Thermo Fisher, Waltham (USA)	EO0491
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	P4864
Complete	Roche, Mannheim	11836170001
Puromyzin	invivogen, Toulouse France	ant-pr-1
Retinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	R2625
Stempan E14 GMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach	P08-50600
Master (Temed)	Roche, Mannheim BioRad, Kalifornien (USA)	4707516001 1610800
TissueTek® O.C.T Compound	Sakura Finetek (USA)	4583
aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt	108382
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt	111732
Trypsin/ EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach	P10-024100
Tween	Serva GmbH, Heidelberg	37470.02
Vectamount®	Linaris, Bettingen am Main	H-5000
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Merck KGaA, Darmstadt	107209

3.1.2. verwendete Kits

Tabelle 2: verwendete Kits

Kit	Hersteller	Produktnummer/Bestellnummer/ Katalognummer
Amata™ Mouse ES Cell Nucleofector™ Kit	Lonza Ltd, Basel	VPH-1001
BCA Protein assay	Pierce, Rockford (USA)	23225
DNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden	69504
NucleoSpin Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel, Düren	740609.50
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden	74104
QiaShredder	Qiagen, Hilden	79654
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden	205311

3.1.3. verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Produktnummer/Bestellnummer/ Katalognummer
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)	CORN4487, CORN4488, CORN4489
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	352006
Kryoröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	43012

3.Material und Methoden

Objektträger „Super Frost“	Nunc, Wiesbaden	J1800AMNZ
Parafilm	CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck-Renshausen	701611
Pipettenspitzen	American National Can, Menasha (USA)	732008, 732112, 732202, 732206
Safe Seal Tips Professional	Starlab, Hamburg	S1111-3810, S1111-0816, S1180-1810, S1180-1840
Reagenzreservoir	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	LC0011, LC0031
Skalpelle	Feather/PFM, Köln	200130010
Spritzen	Feather/ PFM, Köln	LPE05, LPE10
Sterilfilter	Braun, Melsungen	4099206
Zellkulturflaschen und schalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	83.3910.302, 833911.302, 83.3912.302

3.1.4. verwendete Geräte

Tabelle 4: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Gel und Western Blot Dokumentation	BioRad, Kalifornien (USA)
Branson Sonifier W-250 D	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Durchflusszytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipette „Transferpette“	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren	Schott AG, Jena
Inkubator für Zellkultur, CO2-begast	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kryostat Modell CM 1900	Leica, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Microplate Reader „MRX“	Dynatech Laboratories, Bad Nauheim
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrophotometer „GeneQuantPro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/ Sieg
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektionssystem „Nucleofector“	Amaxa, Köln
Vortex	IKA Works Inc., Wirmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 46 R	Sorvall, Bad Homberg

3.1.5. verwendete Primärantikörper

Tabelle 5: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Produktnummer/Bestellnummer/ Katalognummer
Anti-alpha CAA	Maus IgG1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	A7811
Anti-EpCAM	Ratte IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg	552370
Anti-EpCAM	Meerschweinchen	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)	sc-25308
Anti-ERas	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)	sc-393268
Anti-Vimentin	Kaninchen IgG1	Abcam, Cambridge (USA)	ab92547
Anti-FoxA2	Kaninchen IgG1	Novus Biologicals, Centennial (USA)	NBP1-30966
Anti-GATA4	Ratte IgG2a	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	14-9980-82

3.1.6. verwendete Sekundärantikörper

Tabelle 6: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer/Bestellnummer/ Katalognummer
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	PK-6100
Biotinylated Kaninchen Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	BA-4001-.5
Biotinylated Pferd-anti- Maus IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	BA-2000-1.5
Biotinylated Ziege-anti-Kaninchen IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	BA-1000-1.5
FITC Ziege-anti-Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-516140
Fluorescein Kaninchen-anti-Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	FI-4000-1.5
Isotyp Kontrolle -Ratte IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-2026
PO Kaninchen-anti-Meerschweinchen IgG	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	A5545
PO Kaninchen-anti-Ziege IgG	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	P0449
PO Ziege-anti-Kaninchen IgG (H&L)	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)	AB_2313567
PO Ziege-anti- Maus IgG	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	P0447

3.1.7. verwendete Primer

Tabelle 7: verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
FW aCAA	CTGGATTCTGGCGATGGTGTA	Metabion International AD (Planegg)
BW aCAA	CGGACAATTTACGTTTCAGCA	
FW Afp	CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC	
BW Afp	ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG	
FW Brachyury	GCTTCAAGGAGCTAACTAACGAG	
BW Brachyury	CCAGCAAGAAAGAGTACATGGC	
FW Eomes	GCGCATGTTTCCTTTCTTGAG	
BW Eomes	GGTCGGCCAGAACCACTTC	
BW EpCAM	CTAGGCATTAAGCTCTCTGTGGATCTCACC	
FW EpCAM	CAGTGTACTIONCTATGGTACACAGAATACT	
FW ERas	TGCCTACAAAGTCTAGCATCTTG	
BW ERas	CTTTTACCAACACCACTTGAC	
FW FoxA2	CCCTACGCCAACATGAACTCG	
BW FoxA2	GTTCTGCCGGTAGAAAGGGA	
FW GATA4	CCCTACCCAGCCTACATGG	
BW GATA4	ACATATCGAGATTGGGGTGTCT	
FW_Gusb	CAACCTCTGGTGGCCTTACC	
BW_Gusb	GGGTGTAGTAGTCAGTCACAGAC	
FW Nanog	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT	
BW Nanog	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA	
FW NCAM	ACCACCGTCACCACTAACTCT	
BW NCAM	TGGGGCAATACTGGAGGTCA	
FW Oct3/4	ATCGGACCAGGCTCAGAGGTATTG	
BW Oct3/4	GTTCTCATTGTTGTGGCTTCC	
FW Pax6	ACGTATCCAACGGTTGTGTGA	
BW Pax6	GGAGCCAGTCTCGTAATACCT	
FW Sox2	GACAGCTACGCGCACATGA	
BW Sox2	GGTGCATCGGTTGCATCTG	
FW Sox17	GATGCGGGATACGCCAGTG	
BW Sox17	CCACCACCTCGCCTTTCAC	
FWVimentin	ACCGGAGCTATGTGACCACG	
BW Vimentin	CAAGGATTCCACTIONTCCGTTCA	

3.1.8. verwendete Plasmide

Tabelle 8: verwendete Plasmide

Artikel	target site	Hersteller
ERas CRISPR-Cas-9 Plasmid1	GAGGAAAGTCACGAGGCTTGGG	Sigma Aldrich, München
ERas CRISPR-Cas-9 Plasmid2	GTAGGAATCTTGATAGTGGGG	Sigma Aldrich, München
mCherry pCAG	--	M.Hachmeister
YFP pCAG	--	M.Hachmeister

3.1.9. verwendete Zelllinien

Tabelle 9: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
E14TG2afla Wildtyp	von Dr. Markus Conrad zur Verfügung gestellt
4T1 Wildtyp	von Dr. Sebastian Kobold zur Verfügung gestellt
4T1-CTC Wildtyp	CTC aus dem Blut von 4T1 injizierten Balb/c Mäusen
E14TG2 -YFP	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-YFP
E14TG2 -mCherry	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-mCherry

3.1.10. verwendete Dienstleistungen

Tabelle 10: verwendete Dienstleistungen

Dienstleistung	Dienstleister
DNA-Sequenzierung	GATC, Köln

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Embryonale Stammzellen der Linie E14TG2 α wurden in einer Sicherheitswerkbank passagiert. Für die Zellkultur wurden sterile Pipettenspitzen, Gefäße und Lösungen verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit.

Auf die gleiche Weise wurden die murine Mamma-Karzinomlinie 4T1 und die 4T1CTC#1 Linie kultiviert.

3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um adhärenente E14TG2 α , 4T1 und 4T1-CTC#1 Zellen aus der Kulturflasche zu ernten, wurden diese zuerst mit Kalzium- und Magnesium-freiem PBS gewaschen. Anschließend wurde der Monolayer aus Zellen mit 0,5% Trypsin überschichtet, um adhärenente Zellen von der Zellkulturschale zu lösen. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale und voneinander wurde mikroskopisch kontrolliert und die Zellen anschließend für 5 min bei 300g durch Zentrifugation pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium gelöst (Gemisch aus 0,1 ml DMSO und 0,9 ml –LIF-Medium), in Kryogefäße überführt und langsam bei einer Umgebungstemperatur von -80°C eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C. Durch sofortige Zugabe des fünffachen Volumens Kulturmedium wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) verdünnt. Die Suspension wurde dann zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Nach 12h Inkubation wurden tote Zellen durch Erneuerung des Mediums entfernt.

3.2.3. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Tabelle 11: Stammlösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Stempan E14 GMEM	FKS
	L-Glutamin
	2,75g/l NaHCO ₃
	60000 U/ml ESGRO® LIF
PBS	8,0 g NaCl
	0,2g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ HPO ₄ in 1l H ₂ O

Um E14TG2 α Zellen in einem pluripotenten Zustand zu erhalten, wurde das Medium mit LIF/leukemia inhibitory factor, einem Zytokin der IL-6 Familie (Nicola & Babon, 2015), versetzt. LIF bindet an den LIF-Rezeptor auf Stammzellen, was zur Aktivierung der JAK/Stat und MAPK Kaskade führt. *In vivo* wird LIF von den Zellen des Trophoektoderms gebildet und bindet an den LIF-Rezeptor auf den Zellen des Embryoblasten.

Wenn eine 70-80%ige Konfluenz der Zellen erreicht war, wurden die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen (PBS) und anschließend mit 0,5% Trypsinlösung inkubiert (5 min bei 37°C). Die Aktivität des Enzyms Trypsin wurde mit FKS (fetales Kälberserum)-haltigem Medium gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 300 g) wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Zur Gewinnung der Zellen wurden diese nach Trypsineinwirkung geerntet und 20 μ l der Zellsuspension in einer separaten Kammer mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau kann nicht von Zellen mit intakter Membran aufgenommen werden, weshalb sich nur tote/apoptotische Zellen blau anfärben. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet: Zellzahl/ μ l = ausgezählte Zellen in 5 Gruppenquadraten / (5 x 0,2mm³ Kammervolumen)

3.2.5. Hanging Drops zur Generierung von Embryoid Bodies

Die verwendete Methode wurde von Wang und Yang (2008) beschrieben und dient der Generierung dreidimensionaler Zellaggregate (Embryoid Bodies; EBs), die die frühe embryonale Entwicklung nachahmen (X. Wang & Yang, 2008). Dazu wurden Zellen geerntet und danach mit Differenzierungsmedium in Einzelzellsuspension gebracht. Ohne Zugabe von LIF differenzieren ES spontan und bilden dreidimensionale mehrzellige Aggregate. Nach Anfärbung mit Trypanblau und Zellzählung mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde durch Verdünnung eine Konzentration von 500 Zellen pro 20 µl hergestellt. Auf den Deckel einer Zellkulturschale wurden mit einer Multikanalpipette Zellkultur-Tropfen mit einem Volumen von 20 µl pipettiert. Dann wurde der Deckel vorsichtig gedreht, sodass die Tropfen über dem mit PBS benetzten Boden der Zellkulturschale hingen. Drei Tage lang wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, um dann in „ultra-low Attachment“ Multiwellplatten in frisches Differenzierungsmedium transferiert zu werden. Dort wurden sie für mindestens 96 h inkubiert. Je nach Experiment wurden die so gebildeten EBs entweder in den Platten belassen oder in Gelatine-beschichtete Multiwellplatten übertragen, um an Tag 10 der Differenzierung die Zahl kontrahierender EBs, als Maß für die Bildung von Kardiomyozyten, zu quantifizieren.

3.2.6. Herstellung von Tumorsphäroiden

Zur Herstellung von Tumorsphäroiden wurden 4T1 Zellen und 4T1-CTC#1 Zellen trypsinisiert und geerntet. Nach Zellzählung in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer, wurde die gewünschte Zellzahl zentrifugiert und in DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. Vor Beginn der Trypsinierung wurden flache 96well plates mit 100µl 1%-iger Agarose beschichtet. 100 µl Zellsuspension wurden anschließend mit der Multikanalpipette in jedes well pipettiert (Ertongur et al., 2004). Die verwendete Zellkonzentration variierte je nach Verwendungszweck zwischen 500 und 25.000 Zellen/well. Tumorsphäroide, die für die Immunhistochemie (IHC) hergestellt wurden, wurden mit der Hanging Drop Methode generiert.

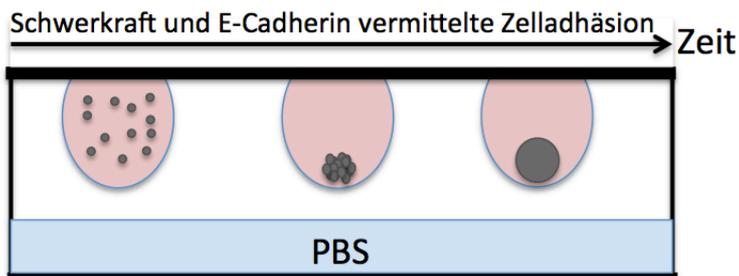


Abbildung 3. 1: Hanging drop (HD) Methode: Innerhalb von drei Tagen bilden embryonale Stammzellen ein dichtes Zellaggregat und durchlaufen die frühembryonalen Phasen, die in der Embryogenese der Maus der Präimplantationsphase entsprechen.

3.2.7. Zweidimensionale mesodermale Differenzierung

Zur forcierten mesodermalen Differenzierung in zweidimensionaler Zellkultur wurde ein an Kanke et al. (2014) orientiertes Protokoll verwendet. Zur Vorbereitung wurden 200.000 E14TG2 α Zellen unter +LIF-Bedingungen ausplattiert. Am Folgetag (Tag 0) des Experiments wurde das +LIF-Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit -LIF-Medium bedeckt, das CHIR 99021 in der Konzentration 30 μ M und Cyclopamine in der Konzentration 5 μ M enthielt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen geerntet und deren RNA extrahiert.

3.2.8. Zweidimensionale endodermale Differenzierung

Durch Zugabe von all-trans Retinsäure und bFGF (basic fibroblast growth factor) können ESC zu endodermalen Zellen differenziert werden. Es wurde ein an Kim et al. (2010) angelehntes Protokoll verwendet (Kim et al., 2010).

Zur forcierten endodermalen Differenzierung wurden ESC unter +LIF-Bedingungen kultiviert. Wenn eine 70-80% Konfluenz der Zellen erreicht war, wurden sie nach oben beschriebenem Vorgehen mit Trypsin geerntet. Nach Zellzählung wurden 200.000 ES Zellen in einem Nährmedium ohne LIF, mit 10^{-7} M all-trans-Retinsäure und 25ng/ml bFGF ausplattiert. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert, wobei nur bFGF in einer Konzentration von 25ng/ml hinzugefügt wurde. Zur Untersuchung der Genexpression wurden Zellen an Tag0, 5 und 12 des Experiments geerntet.

3.2.9. Fixierung für Elektronenmikroskopie

EBs zur weiteren Analyse mittels Elektronenmikroskopie wurden an Tag 5 isoliert. Die Fixierung erfolgte in einer Lösung mit 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Paraformaldehyd. Als Puffer wurde 0,15 M Natriumkacodylat bei pH 7,4 verwendet. In dieser Fixationslösung verblieben die Präparate für den Transport nach San Diego (USA), wo die Elektronenmikroskopie erfolgte.

3.2.10. Transfektion von Stammzellen durch Nukleofektion

Im Allgemeinen stehen zur Transfektion chemische, biologische und physikalische Verfahren zur Auswahl. Ein physikalisches Verfahren ist die Elektroporation.

Ein Vorteil der Elektroporation ist, dass keine möglicherweise toxischen Substanzen verwendet werden. Daher ist diese Methode für eine Vielzahl von Zelltypen geeignet (Neumann, Schaefer-Ridder, Wang, & Hofschneider, 1982). Für die Transfektion wurden E14TG2 α Zellen mit niedriger Passagenzahl verwendet. Die Zellen wurden geerntet, gezählt und die benötigte Zahl ($2-5 \times 10^6$) zentrifugiert. Die Nukleofektionslösung wurde auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Für jede einzelne Transfektion wurden die Zellen in 100 μ l Nukleofektionslösung resuspendiert (Amaxa Cell Line Nucleofector Kit).

Anschließend wurden 2 μ g Plasmid DNA und zur Positivkontrolle Expressionsplasmid für das grüne Fluoreszenzprotein GFP hinzugefügt. Die Suspension wurde anschließend in Amaxa Küvetten übertragen, die in der Seitenwand Elektroden besitzen. Dadurch wurde im Elektroporator (Amaxa Nucleofector) eine kurze Spannung angelegt. Diese führt über eine Konformationsänderung von Membranproteinen zur Porenbildung in der Zellmembran (Neumann et al., 1982) und erlaubt somit ein Eindringen der DNA in den Zellkern. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit Nährmedium resuspendiert.

Die erfolgte Transfektion konnte anschließend über die Expression von GFP in der Durchflusszytometrie überprüft werden.

3.2.11. Untersuchung der Oberflächenproteine in der Durchflusszytometrie

Tabelle 12: Puffer und Färbelösung

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS mit 5% FKS
Propidiumiodid (PI)-Färbelösung	PBS mit 5% FKS 1 μ g/ml Propidiumiodid

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting; FACS) zur Analyse von Proteinexpressionen beruht auf der Emission von optischen Signalen von Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren (1968 erfunden von Dittrich und Göhde). Durch Anfärbung von Oberflächenproteinen mit Fluoreszin-markierten Antikörpern können bestimmte Zelltypen bei passieren eines Laserstrahls detektiert werden und quantitative Aussagen über verschiedene Zellpopulationen gemacht werden. Vor Beginn der Durchflusszytometrie wurden die gewünschten Zellen gezählt, in PBS gewaschen und aliquotiert, so dass etwa 300.000-500.000 Zellen pro Probe vorlagen. Die Inkubation mit dem Antigen-spezifischen EpCAM-Primärantikörper (1:50 in 50 µl FACS-Puffer) erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und jeweils zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat) - konjugierten Sekundärantikörper (1:50 in 50 µl FACS-Puffer) für 15 min bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Propidiumiodid inkubiert (50 µl PI in 500µl FACS-Puffer), um die Zellviabilität zu bestimmen. PI kann nur die Membran zugrunde gegangener Zellen überwinden und interkaliert in deren DNA. Zum Nachweis unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurden Zellen ohne vorherige Inkubation mit dem Primärantikörper direkt mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem „Cell Quest™“ Programm, das neben der Fluoreszenz auch Aussagen über Granularität (SSC=Side Scatter) und Volumen der Zellen (FSC=Forward Scatter) ermöglicht.

3.2.12. CRSIPR-Cas9

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) sind 23-47bp lange, palindromische, wiederkehrende Sequenzen, die von Spacern mit 21-72bp Länge getrennt werden und Teil des Abwehrsystems von Bakterien und Archäa gegen fremde DNA sind (Jinek et al., 2012). Durch Transkription entsteht zunächst eine precursor cr (CRISPR)RNA und durch Spaltung die crRNA. crRNA-repeat Sequenzen bilden durch Selbsthybridisierung eine Sekundärstruktur, binden eine tracrRNA (trans-acting CRISPR RNA) und dann die Cas9 Endonuklease. Die crRNA-spacer Sequenz sind komplementär zur Ziel-DNA Sequenz im Genom und fungieren als Lotse für die Endonuklease. Alternativ gibt es auch single guide RNAs, die diese Funktionen

verbinden, indem sie teilweise selbsthybridisierend sind und zur Ziel-DNA komplementäre Sequenzen enthalten (Karvelis et al., 2013). Damit die fremde DNA geschnitten werden kann, muss eine dreibasige (NGG) PAM (protospacer adjacent motif) -Sequenz neben der Zielsequenz liegen (Sternberg, Redding, Jinek, Greene, & Doudna, 2014). Durch die Cas9 Endonuklease werden Doppelstrangbrüche induziert, die durch homologe oder nicht homologe Mechanismen repariert werden (Pardo, Gomez-Gonzalez, & Aguilera, 2009).

Durch die CRSIPR/Cas9-Methode ist es möglich gezielt DNA-Mutationen hervorzurufen (Jinek et al., 2012).

Dazu wurden nach der oben beschriebenen Transfektionsmethode embryonale Stammzellen mit Plasmiden (*Sigma-Aldrich*) transfiziert. Diese Plasmide enthalten neben den Gen-spezifischen CRISPR Sequenzen, die Cas9 Endonuklease mit den Proteindomänen HNH (Homing-Endonuclease mit der typischen Aminosäuresequenz HNH und RuvC (eine Endonukleasedomäne, die in E.coli an DNA Reparatur beteiligt ist). Die Nuklease HNH schneidet den an der sgRNA gebundenen DNA-Strang, die RuvC schneidet den gegenüberliegenden Strang (Jinek et al., 2014). Neben Cas9 befindet sich zwischen 2 Sequenzen für das Restriktionsenzym HpaI die 2A-GFP-Sequenz. Durch die gleichzeitige Expression von GFP können mit dem Plasmid erfolgreich transfizierte Zellen im FACS detektiert werden. Zum Knockout des ERas Gens wurden zwei verschiedene guide RNAs gegen das Exon 2 von ERas verwendet (siehe Abbildung 3.2.).

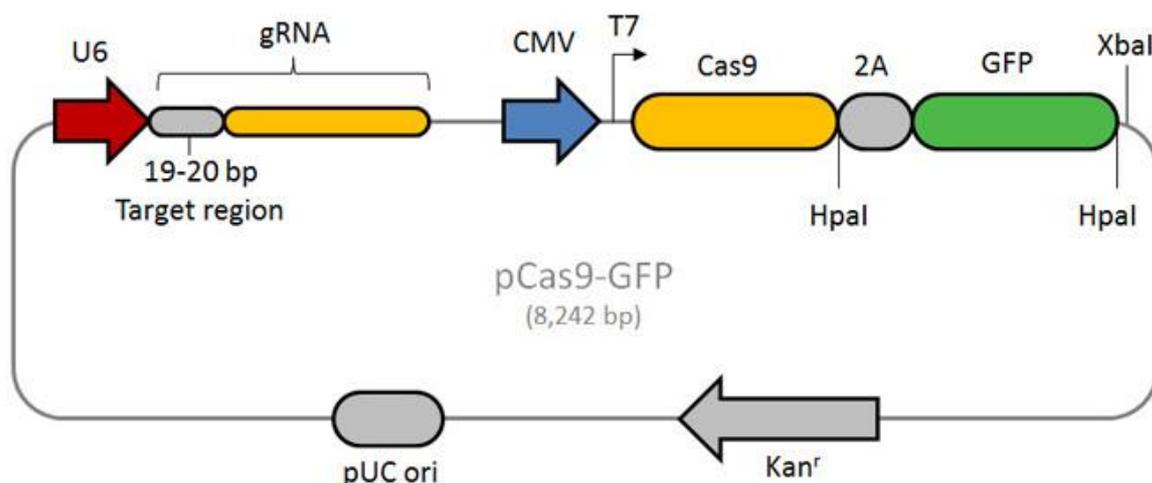


Abbildung 3.2: Das verwendete CRISPR-Cas9 Plasmid von SigmaAldrich GmbH

Die Target sites hatten folgende Sequenzen in 5'-3'-Orientierung: GAGGAAAGTCACGAGGCTTGGG und GTAGGAATCTTGGATAGTGGG.

(<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/tips-for-cell-engineering-crispr-cas9.html>)

3.2.13. CFSE-Färbung

Carboxyfluorescein Diacetat Succimidylester ist aufgrund der Diacetatgruppen ein hydrophobes Molekül, welches passiv die Plasmamembran von Zellen passieren kann. In der Zelle werden die Diacetat-Gruppen von Esterasen abgespalten und Carboxyfluorescein kann über Succimidylester an quartäre Aminogruppen intrazellulärer Proteine binden. Ohne die Diacetat-Gruppen ist der Farbstoff in der Zelle gefangen und fluoresziert. Da er theoretisch homogen im Zytoplasma verteilt ist, enthalten die Tochterzellen nach jeder Zellteilung die Hälfte des in der Mutterzelle gespeicherten Farbstoffes. Anhand des Fluoreszenzverlustes ist es möglich die Proliferation von Zellen zu verfolgen (Parish, 1999; Weston & Parish, 1990). Um die richtige Farbstoffkonzentration zu ermitteln wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet mit 0,5, 1, 2, 3 und 4 μM CFSE. Schließlich wurde eine 3 μM Konzentration für die Proliferationsexperimente verwendet. Nach Ernte der Zellen und Trypanblau-Färbung wurden nur vitale Zellen mit der Neubauer Zählkammer gezählt und auf 1×10^6 Zellen pro Zelllinie verdünnt. Dann wurden die Zellen in PBS mit 0,1 % FCS und 3 μM CFSE inkubiert. Nach „Ablöschen“ des CFSE durch eiskaltes serumfreies Medium und mehreren Waschschritten mit PBS, wurden die Zellen in 6-Well Platten gesät. Die Kontrollgruppe wurde der gleichen Behandlung unterzogen, nur ohne Färbung mit CFSE. Nach Vorbereitung der Zellen wurden diese zu 30.000 pro Well ausplattiert und täglich gemessen. Am ersten Tag der Messung wurden die Einstellungen festgelegt, die für alle Messungen eines Versuchs beibehalten wurden.

3.2.14. Western Blot

Tabelle 13: Reagenzien für Western Blot

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer	1% Triton X100 in 50ml PBS
	Roche Protease inhibitor
Laemmlipuffer	140 mM Tris pH6,8
	4% SDS
	30% Glycerin
	16% β -mercaptoethanol
	0,1% Bromophenolblau
4% Sammelgel	13,3ml 30% Acrylamid
	16,6ml 2M Tris pH 6,8
	0,663ml 0,5M EDTA
	69,44ml bidestilliertes H ₂ O
15% Trenngel	50ml 30% Acrylamid
	16,6ml 2M Tris pH 8,9
	0,663ml 0,5M EDTA
	32,74ml bidestilliertes H ₂ O
Laufpuffer	250mM Tris
	2M Glycin
	1%SDS
Blotting-Puffer	250 mM Tris,
	1,26M Glycerin in bidestilliertem H ₂ O
Waschpuffer	8 Tabletten PBS
	4ml Tween-20
	in 4l bidestilliertem H ₂ O
Lösung für Primärantikörper	3% BSA in Waschpuffer
Lösung für Sekundärantikörper	5% Milchpulver in Waschpuffer

Nach Ernte der Zellen wurde durch Zentrifugation ein Zellpellet aus $5-6 \times 10^6$ Zellen hergestellt (s.o.), das anschließend in 30-50 μ l Lysepuffer resuspendiert wurde. Auf einem Rotor wurde das Gemisch bei 4°C für 10min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (16,1 rcf, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und auf Eis gelagert. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Proteine wurde mit dem BCA (Bicinchoninsäure) – Test gemessen. Hierbei bilden die Proteine in alkalischer Lösung Komplexe mit Kupferionen (Biuret-Reaktion). Die Kupfer(2+)-Ionen werden zu Kupfer(+)-Ionen reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex. Bei einer Wellenlänge von 562 nm kann die Absorption der violetten Lösung gemessen werden. Dadurch kann man auf die Proteinkonzentration schließen. Durch entsprechende Verdünnungen mit PBS wurde eine Proteinkonzentration von 1 μ g/ μ l erreicht. Schließlich wurde zur Denaturierung der

Proteine des Proteinlysats-PBS-Gemisch (enthält zwischen 20 und 30 µg Protein) mit Lämmli-Puffer im 1:1 Verhältnis versetzt und diese bei 95°C für 5 min inkubiert. Das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine. Da sich die negativen Ladungen abstoßen, kommt es zu einer Entfaltung der Proteine und zu einer negativen Ladung aller Proteine, sodass sie später bevorzugt nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Längere Proteine wandern langsamer durch das Gel als Kürzere. Durch Erhitzen der Proteine auf 95°C werden auch Sekundär- und Tertiärstruktur aufgelöst.

Vor dem Blotting wurde das Proteingemisch mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Für das Trenngel gilt, dass mit zunehmender Größe der aufzutrennenden Proteine, die Konzentration des Gels abnehmen sollte. Da EpCAM ein Molekulargewicht von ca. 34,5 kDa hat, wurde ein Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 12-15% hergestellt. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aufgetragen (siehe Tabelle 13). Zur Polymerisation der Gele wurden der Radikalstarter APS (Ammoniumpersulfat, 10 µl 10 % APS für 10 ml Gel), dann der Katalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin, 5 µl für 10 ml Gel) hinzugegeben. Zu Beginn der Polymerisation des Sammelgels wird ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingesetzt. In diese Taschen werden die Proben aufgeladen. Nach Vorbereitung der Kammer wurden die Proben in separate Taschen des Sammelgels aufgeladen. Die ersten 15 min wurde eine Spannung von 180 V und eine Stromstärke von 15 mA gewählt, damit sich die Proben in den Taschen sammeln. Dann wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht, so dass die Proben je nach Molekülgröße ca. 2 h zum Durchlaufen des Trenngels benötigen. Wenn die Proteine das Ende des Gels erreicht haben, werden sie auf eine PVDF-Membran übertragen (Blotting), die in Methanol aktiviert wurde. Dazu wurde eine zur Membran senkrechte Spannung angelegt (100 V, 500 mA, 50 min), so dass die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wandern. Durch Blockpuffer (5% Milchpulver in Waschpuffer) wurde die Membran blockiert (30 min, RT). Dadurch konnten keine weiteren Proteine an der Membran binden und die Antikörperfärbung verfälschen. Nach Inkubation mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:1000-5000, 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C) und dreimaligem Waschen in Waschpuffer für jeweils 10 min erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Verdünnung 1:1000-5000, 1 h bei RT). Der Zweitantikörper ist mit Merretichperoxidase verknüpft. Das ermöglicht die Sichtbarmachung durch Chemilumineszenz. Durch Zugabe von Luminolreagenz und Peroxidaselösung wurde das Luminol in Anwesenheit der Peroxidase oxidiert. Nach Benetzen mit ECL-Reagenz

konnte die Membran im Chemidoc XRS+ Imaging System (BioRad) ausgewertet werden (Renart, Reiser, & Stark, 1979).

3.2.15. Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurde die Immunhistochemie zur Identifizierung bestimmter Zelltypen innerhalb von EBs durch die Anfärbungen Zelltyp-spezifischer Antigene verwendet.

EBs wurden wie oben beschrieben hergestellt, in Cryomolds® übertragen und mit Tissue-Tek® bedeckt. Anschließend wurden die Cryomolds® in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem Kryostat wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte aufgetaut und nach Inkubation für 10min in Aceton luftgetrocknet. Aceton führt ähnlich wie die Lufttrocknung zu einer Stabilisierung des Gewebes, weil es das Wasser entzieht, was zu einer Denaturierung der Proteine führt. Das Gewebe haftet dann außerdem an der Glasunterlage.

Daraufhin wurden die Präparate zwei Waschschritten in PBS für 5 min unterzogen, um sie dann für 25 min in Normalserum (1:20-1:200 in PBS) zu inkubieren. Normalserum ist Nicht-Immuneserum, das aus dem Blut derjenigen Spezies gewonnen wurde, in dem auch der Sekundärantikörper produziert wurde. Dadurch wurde eine unspezifische Bindung Antigen-spezifischer Primärantikörper verhindert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur in einer für jeden Antikörper ausgetesteten Verdünnung (1:50-1:1000). Die Negativkontrolle wurde nicht mit Primärantikörper, sondern nur mit PBS behandelt. Als Zweitantikörper (für 1-2 Stunden) wurde ein biotinylierter Brückenantikörper (Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT)) verwendet. Dabei handelt es sich um einen biotinmarkierten Sekundärantikörper, an dessen Biotinteil das Avidin (im Hühnereiweiß enthalten) binden kann. Davor und danach wurden die Objektträger jeweils erst mit reinem PBS, dann mit einer 50%-igen Brij-Lösung (in PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in der Avidin-Biotin-PO-Komplex Lösung erneut für 30 min bei RT inkubiert. Als Substrat für die Reaktion wurde das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol eingesetzt. Die Kerne wurden mit Mayer's Hämalaun Lösung angefärbt. Abschließend wurden die angefärbten Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine bedeckt und eingedeckelt.

3.2.16. Semi-quantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Zur Auswertung von immunhistochemischen Färbungen wurde der semiquantitative Quick Score (Q) eingesetzt. Dazu wurde die Anzahl der gefärbten Zellen in Prozent (P)

mit der Intensität der Färbung (I) multipliziert. $Q = P \times I$. I kann die Werte 0 (keine Expression), 1 (schwache Färbung), 2 (moderate) oder 3 (starke Färbung) annehmen, P einen Wert zwischen 0 und 100%. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das gesamte Präparat beurteilt wird (Detre, Saclani Jotti, & Dowsett, 1995). Der Quick Score Q nimmt Werte lineare Werte zwischen 0 und 300 an.

3.2.17. Präparation genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit von QIAGEN verwendet. Als Anleitung wurde das entsprechende Handbuch (DNeasy Blood & Tissue Handbook) verwendet. 10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Zentrifugation (5 min, 300 g) pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 200µl PBS resuspendiert und dann 20µl der Serinprotease Proteinase K (40mAU/mg Protein) hinzugefügt, die zur Freisetzung der DNA führt. Zur Spaltung von in der Probe enthaltener RNA wurden 4µl der RNase A hinzugefügt und nach Durchmischung auf einem Vortex für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 200µl des guanidinhydrochloridhaltigen AL-Puffers resuspendiert und 10 min bei 56°C inkubiert. Um die DNA zu präzipitieren wurden 200µl Ethanol hinzugegeben und die Lösung auf dem Vortex durchmischt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Suspension wurde auf eine Ionenaustauschersäule (DNeasy Mini spin column) aufgetragen und die DNA in mehreren Schritten aus der Lösung separiert. Die DNA bleibt aufgrund des negativ geladenen Rückgrates an dem Filter gebunden. Im letzten Schritt wird durch den Elutionspuffer (AE Puffer) die DNA aus der Säule gewaschen.

Tabelle 14: Puffer und Zentrifugationsschritte zur DNA-Extraktion

Puffer	Drehzahl	Dauer
200µl AL Puffer	8000	1min
500 µl AW1 Puffer	8000	1min
500µl AW2 Puffer	14000	3min
200µl AE Puffer	8000	1min

3.2.18. RNA-Isolierung

Zur RNA-Extraktion wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet sowie das entsprechende Handbuch (RNeasy Mini Handbook, Qiagen).

10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen und pelletiert. β -Mercaptoethanol wurde im Verhältnis 1:100 zum RLT Puffer hinzugegeben. Das Zellpellt wurde mit 600µl des Puffers resuspendiert bis sich ein homogenes Gemisch ergibt. Nach Lysierung der

Zellen wurden die RNAsen durch β -Mercaptoethanol deaktiviert. Die Nukleinsäuren wurden mit Ethanol gefällt. Daraufhin wurde die Suspension auf eine Säule des „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen aufgeladen, in der die RNA gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit zweimal 500 μ l Elutionspuffer (RPE Puffer) herausgelöst.

Tabelle 15: Puffer und Zentrifugationsschritte zur RNA-Extraktion

Puffer	Drehzahl	Dauer
600 μ l RLT Puffer	13000	2min
600 μ l Ethanol	13000	15sec
700 μ l RW1 Puffer	13000	15sec
500 μ l RPE Puffer	13000	15sec
500 μ l RPE Puffer	12000	2min
kein	13000	1min
RNAse freies H ₂ O	13000	1min

3.2.19. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei 260 nm konnte im Spektrophotometer (Gene Quant Pro) die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmt werden. Da Proteine bei 280 nm absorbieren gibt der Quotient der Absorption bei 260 nm/280 nm eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure. Eine DNA-Lösung wurde bei einem Quotienten von 1,8 als „rein“, eine RNA-Lösung bei 2,0 als „rein“ betrachtet.

3.2.20. Reverse Transkription von mRNA

Nach Isolierung der RNA und Eliminierung genomischer DNA konnte durch Zugabe eines Primer-Mixes, Puffer und Reverser Transkriptase aus dem Kit „QuantiTect Reverse Transcription“ (invitrogen), die mRNA bei 42°C in cDNA umgeschrieben werden. Standardmäßig wurde 1 μ g mRNA zur Konversion eingesetzt. Nach 30 Minuten wurde die Reverse Transkriptase bei 95°C für 3 min inaktiviert.

3.2.21. PCR, Polymerase Ketten Reaktion

Zur Vorbereitung der PCR Reaktion werden Puffer, dNTPs, passende Oligonukleotid-Primer, DNA-Template und thermostabile Polymerase benötigt. Zur Amplifikation des gewünschten Gens wurde das Gerät LIFE ECO® (*Biozym*) verwendet. Bei der PCR besteht jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und

einem Elongationsschritt. Im ersten Schritt wird die Temperatur auf 94°C angehoben, sodass die DNA-Stränge voneinander getrennt werden. Durch Absenken der Temperatur auf ca. 55° können die im Überschuss vorliegenden synthetischen Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge binden. Im letzten Schritt eines Zyklus wird die Temperatur wieder auf 72°C angehoben, da dort das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt. Dadurch wird anschließend die 5´- 3´ DNA-Synthese katalysiert und der DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang komplementiert. Die Wiederholung dieser Zyklen führt zu einer exponentiellen Zunahme der DNA. Am Ende des Programms wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Tabelle 16: Reagenzien für PCR

Reagenz	Volumen
Taq Polymerase (1U/µl)	1µl
Taq Puffer	2µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl
dNTPs (2mM)	2µl
forward primer	1µl
reverse primer	1µl
DNA	1µl
H ₂ O	10µl

Tabelle 17: PCR-Protokoll

PCR Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94°C	5min
Denaturierung	25-40	94°C	30sec
Annealing		55°C	30sec
Elongation		72°C	30sec
Elongation	1	72°C	10min
Kühlung	1	4°C	∞

3.2.22. Nested PCR (verschachtelte PCR)

Um Fehlhybridisierungen bei hohen Zykluszahlen zu vermeiden wurde die nested PCR durchgeführt. Dabei wurde das PCR Produkt einer ersten Amplifikationsrunde als Template für eine zweite Amplifikationsrunde verwendet. Die Primer der zweiten Runde binden innerhalb der in der ersten PCR Runde amplifizierten Sequenz. Die Wahrscheinlichkeit von Fehlhybridisierung ist dadurch vermindert.

Tabelle 18: Nested PCR-Protokoll

1.Amplifikationsrunde	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94°C	5min
Denaturierung	20	94°C	30sec
Annealing		55°C	30sec
Elongation		72°C	30sec
Elongation	1	72°C	10min
Kühlung	1	4°C	∞
2.Amplifikationsrunde	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94°C	5min
Denaturierung	35	94°C	30sec
Annealing		55°C	30sec
Elongation		72°C	30sec
Elongation	1	72°C	10min
Kühlung	1	4°C	∞



Abbildung 3. 2: Schema der nested PCR

3.2.23. Agarosegelelektrophorese für PCR - Produkte

1 µl des PCR-Produktes wurde mit 10 µl DNA Ladepuffer gemischt und je nach erwarteter Molekülgröße in die Taschen eines 1,5-5% Agarosegels aufgetragen. Nach 40-60 min Laufzeit bei einer Spannung von 100 V waren die PCR Produkte aufgetrennt. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in das Agarosegel (finale Konzentration 5µg/ml) konnten die PCR Produkte unter UV-Licht visualisiert werden.

3.2.24. Quantitative Real Time PCR

Die Quantifizierung spezifischer mRNA Transkripte bei der quantitativen RT-PCR beruht auf Fluoreszenzmessungen während der Amplifizierung der cDNA. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der doppelstrangspezifische Mastermix „Light Cycler® 480 SYBR Green I Master“ (Roche) verwendet. SYBR Green I ist ein Cyaninfarbstoff, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert (Zipper, Brunner, Bernhagen, & Vitzthum, 2004). Der entstehende Komplex emittiert grünes Licht. Das Fluoreszenzsignal ist damit proportional zur vorhandenen cDNA Menge.

Tabelle 19: Reagenzien für qPCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green I Master Mix	5µl
forward primer	1µl
reverse primer	1µl
cDNA	1µl
H ₂ O	2µl

Tabelle 20: qPCR-Protokoll

qPCR-Schritt	Zyklen	Temperatur	Ramp rate (°C/s)	Dauer	Detektionsmodus
Vorinkubation	1	95°C	4,4	10min	--
Amplifikation	45	95°C	4,4	10sec	--
		65°C	2,2	10sec	--
		72°C	4,4	15sec	single
Schmelzkurve	1	95°C	4,4	5sec	--
		65°C	2,2	1min	--
		97°C	0,11		kontinuierlich
Kühlung	1	40°C		30sec	--

Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz der Probe erstmals über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt, entspricht dem Ct (cycle threshold) -Wert oder Cp (crossing point) -Wert. Dadurch lässt sich auf die initiale Konzentration der cDNA (und dadurch der mRNA) schließen, denn je früher der Ct-Wert überschritten wird, desto größer muss die initiale cDNA Menge gewesen sein. Zur Standardisierung unterschiedlicher Proben wurde eine relative Quantifizierung mit einem internen Standard durchgeführt. Als Standard wurde das Haushaltsgen GAPDH gemessen und zur Normalisierung der gemessenen Proben verwendet (Apostolakos, Schuermann, Frampton, Utell, & Willey, 1993; Z. Zhao, Francis, Welch, Loscalzo, & Ravid, 1997). Für alle Experimente wurde der Plattencycler LightCycler® 480 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Light Cycler® 480 SW 1.5 (Roche).

3.2.25. Berechnung der statistischen Signifikanz

Die statistische Signifikanz der Experimente wurde mit dem Programm GraphPad Prism Version 8.4.2 der *GraphPad Software, Inc.* berechnet.

Die statistische Signifikanz bei zwei Proben wurde mit dem zweiseitigen t-test berechnet. Bei mehr als zwei Proben wurde eine Einweg-Varianzanalyse („one way“ Anova) angewendet. Da in diesen Fällen immer auf eine Referenzgruppe bezogen

wurde, erfolgte als post-hoc-Test zur Korrektur des α -Fehlers der Dunnett's Test. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt abgebildet:

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Ergebnisse wurden bei $p > 0,05$ als nicht signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Effekte des EpCAM Verlusts auf die endodermale Differenzierung

Untersuchungen unseres Labors haben sich mit der Fähigkeit EpCAM-defizienter embryonaler Stammzellen (ESC) kontrahierende Kardiomyozyten zu bilden beschäftigt. Zu diesem Zweck wurden ESC 10 Tage spontan in 3D differenziert und die kontrahierenden EBs in 96-well Platten gezählt. Die Bildung von Kardiomyozyten war in 4 von 6 Zelllinien eingeschränkt: CC-#56, CC-#62, CC-#114, CC-#138 (Sarrach et al., 2018).

Folgende Erklärungen für diese unterschiedlichen Phänotypen sind möglich:

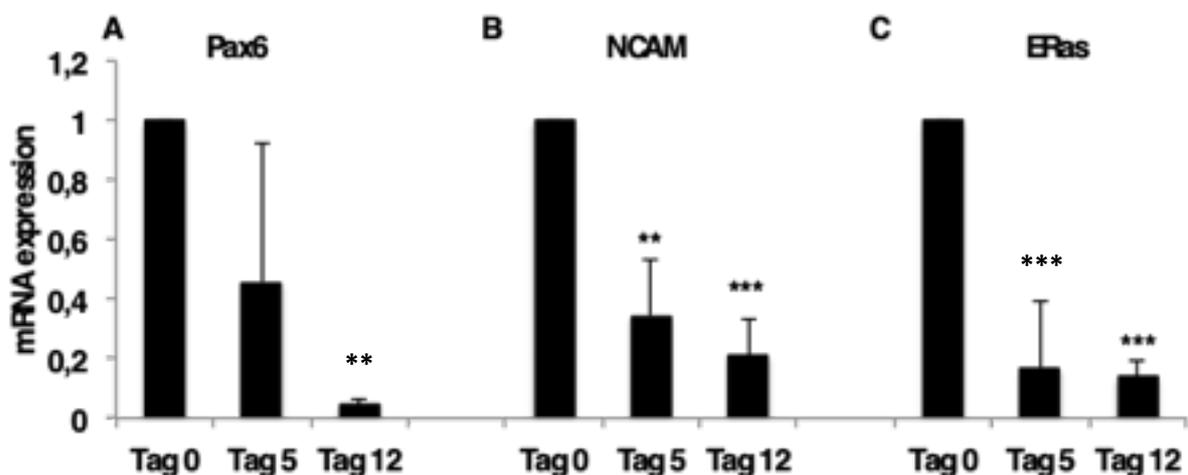
- Der Knockout von EpCAM könnte einen allgemeinen Verlust der Differenzierungskapazität von ESC bedingen und somit auch die Bildung von Kardiomyozyten einschränken.
- Alternativ könnten nur vereinzelte Differenzierungswege durch den Verlust von EpCAM beeinflusst sein, welche letztlich für die Bildung von Kardiomyozyten notwendig sind. Besonders die endodermale Differenzierung könnte betroffen sein, da EpCAM in endodermalen Zellen selektiv exprimiert wird. Aber auch die frühe mesodermale Differenzierung könnte eingeschränkt sein, was in einem späteren Kapitel behandelt wird. Die Entstehung ektodermaler Zellen wurde bisher nicht untersucht.

2010 wurde von Kim et al. ein Protokoll erstellt, mit dem es möglich ist aus ESC endokrine pankreatische Vorläuferzellen herzustellen (Kim et al., 2010). Da der epitheliale Anteil der Pankreasanlage aus dem definitiven Endoderm entsteht, kann das Protokoll auch dazu genutzt werden mithilfe von Retinsäure und FGF2 definitives Endoderm aus ESC herzustellen.

4.1.1. Verminderte endodermale Differenzierung von EpCAM KO Klonen nach direkter endodermaler Differenzierung

In zweidimensionaler Zellkultur wurden ESC unter Zugabe von FGF 2 und Retinsäure kultiviert. An Tag 0, 5 und 12 des Differenzierungsexperiments wurden die Zellen geerntet und die Genexpression ausgewählter Marker analysiert. Um Sicherzustellen, dass während des Experiments tatsächlich endodermale Zellen entstehen, wurden als

Marker des Ektoderms Pax 6 (Poh et al., 2014) und als Marker des frühen Mesoderms NCAM herangezogen (Evseenko et al., 2010). Zur Bestätigung der endodermalen Differenzierung wurden die Marker Eomes, AFP, Foxa2, GATA4, Sox17 und EpCAM verwendet (Burtscher & Lickert, 2009; Kuo et al., 1997; Kwon et al., 2006; Niakan et al., 2010; Sarrach et al., 2018; Teo et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor Pax 6 ist an der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems beteiligt und im Mausembryo erstmals an E8.0 exprimiert (Curto et al., 2014). Bezogen auf die Genexpression zu Beginn des Experiments an Tag 0 in pluripotenten ESC zeigten die Zellen nach 12 Tagen eine 21,3-fache Abnahme der Pax 6-Expression und eine 4,8-fache Abnahme der NCAM-Expression. Die ERas Expression zeigt in diesem Zeitintervall eine 7,1-fache Abnahme der Expression. Die Expression der endodermalen Marker nahm hingegen zu. In 12 Tagen nahm die Eomes-Expression um das durchschnittlich 71,8-fache, die Expression von AFP um das durchschnittlich 45,8-fache, die FoxA2-Expression um das durchschnittlich 54,5-fache, die Gata4-Expression um das durchschnittlich 12,2-fache, die Sox17-Expression um das durchschnittlich 4-fache zu. EpCAM, welches in pluripotenten ESC hoch exprimiert wird, zeigt zunächst eine Abnahme der Expression um das 12,4-fache bis Tag5, um dann wieder um das 12,2-fache auf den Ursprungswert anzusteigen (Abbildung 4.1).



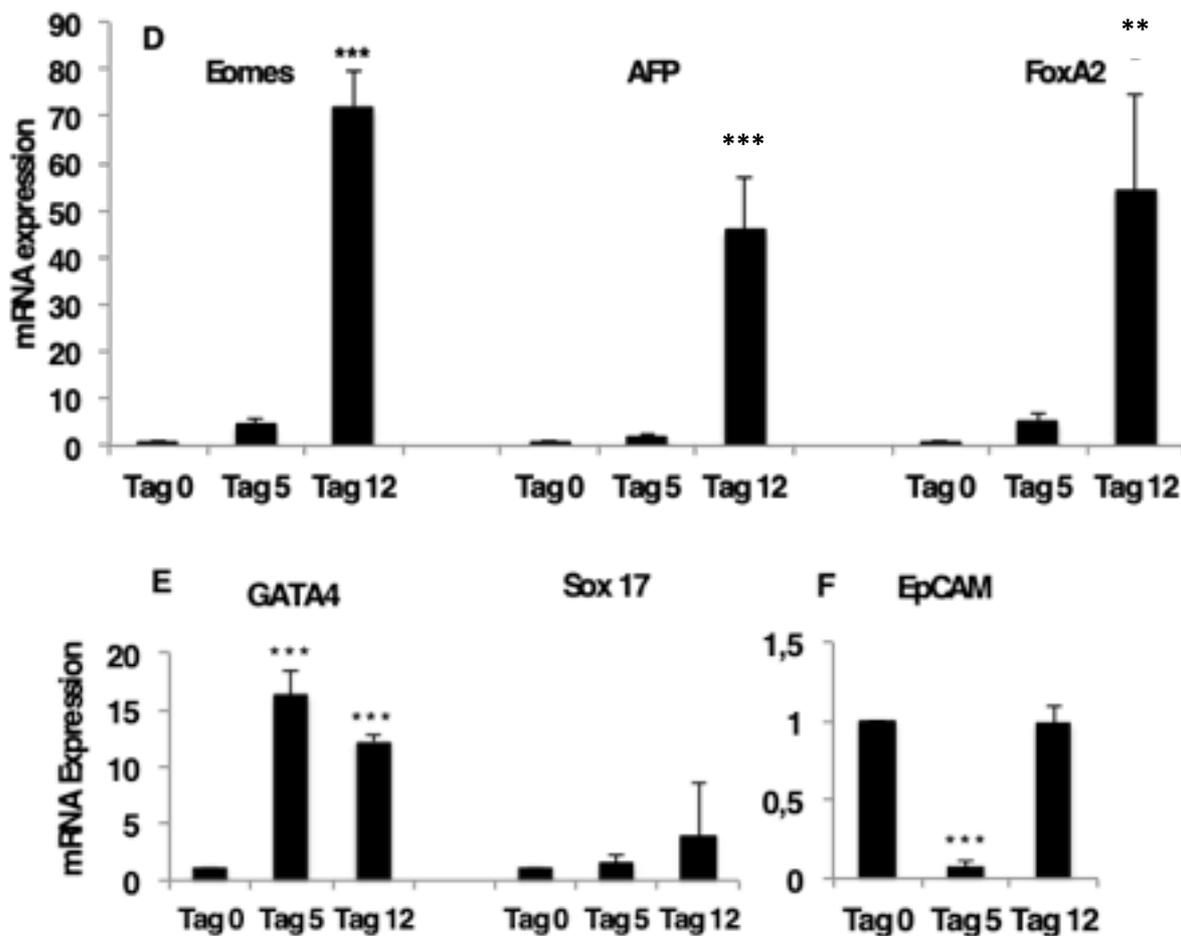


Abbildung 4. 1: Kultivierung unter FGF2 und Retinsäure steuert die endodermale Differenzierung von ES Zellen. In zweidimensionaler Zellkultur wurden ESC unter Zugabe von FGF 2 und Retinsäure kultiviert. An den angegebenen Tagen (0, 5, 12) wurden die Zellen geerntet und die Genexpression analysiert: (A) Pax 6, (B) NCAM, (C) ERas, (D) Eomes, AFP, FoxA2, (E) GATA4, Sox17 und (F) EpCAM. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Veränderung der Genexpression des jeweiligen Markers an Tag 5 bzw. 12 gegen Tag 0 berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Im Verlauf des Differenzierungsprotokolls zeigte sich auch eine morphologische Veränderung der Zellen (Abbildung 4.2).

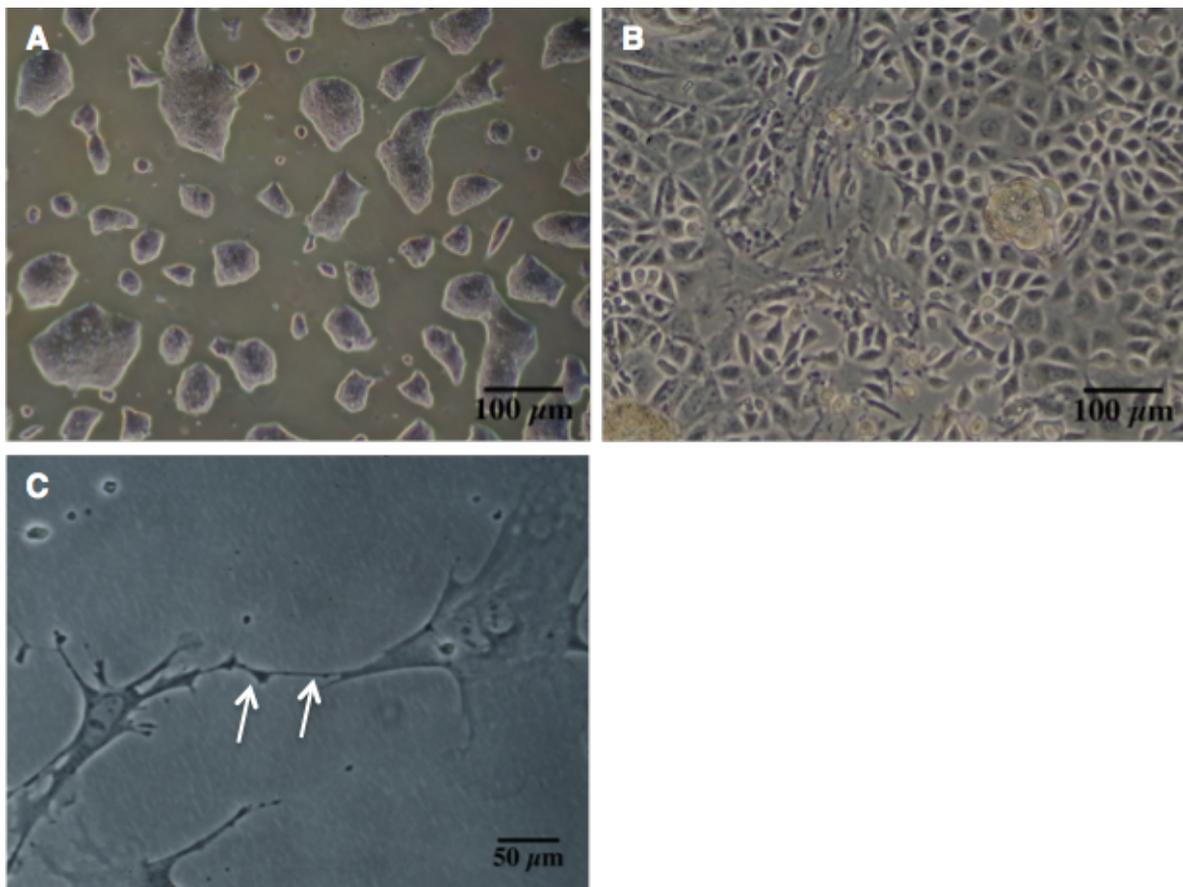


Abbildung 4. 2: Morphologie von E14TG2 α ESC nach endodermaler *in vitro* Differenzierung.

Die Aufnahmen zeigen: (A) Stammzellen unter Pluripotenzbedingungen, 100-fach. (B) Endodermale Zellen mit epithelialem Phänotyp, 100-fach (C) Endodermale Zellen bei geringer Konfluenz. (→) Filopodien

ESC zeigen sich in Kultur typischerweise als große runde Zellen, die wiederum runde, kuppelförmige Kolonien bilden. Endodermale Zellen hingegen bilden zahlreiche Fortsätze (Protrusionen), die Adhäsion an Oberflächen ermöglichen und ein Hinweis auf Migrationsfähigkeit sind.

Nun stellte sich die Frage, ob EpCAM für die Entstehung des Endoderms in pluripotenten Zellen exprimiert werden muss. Dazu wurden die oben beschriebenen EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC unter denselben Bedingungen kultiviert, wie wildtypischen Zellen. Nach 12 Tagen Kultivierung in Anwesenheit von Retinsäure und FGF 2 wurden die Zellen geerntet und nach RNA-Isolierung die Genexpression derselben Markergene mittels Real-Time qRT-PCR analysiert.

EpCAM-defiziente E14TG2 α ESC exprimierten signifikant weniger endodermale Marker als die wildtypische Zelllinie (Abbildung 4.3).

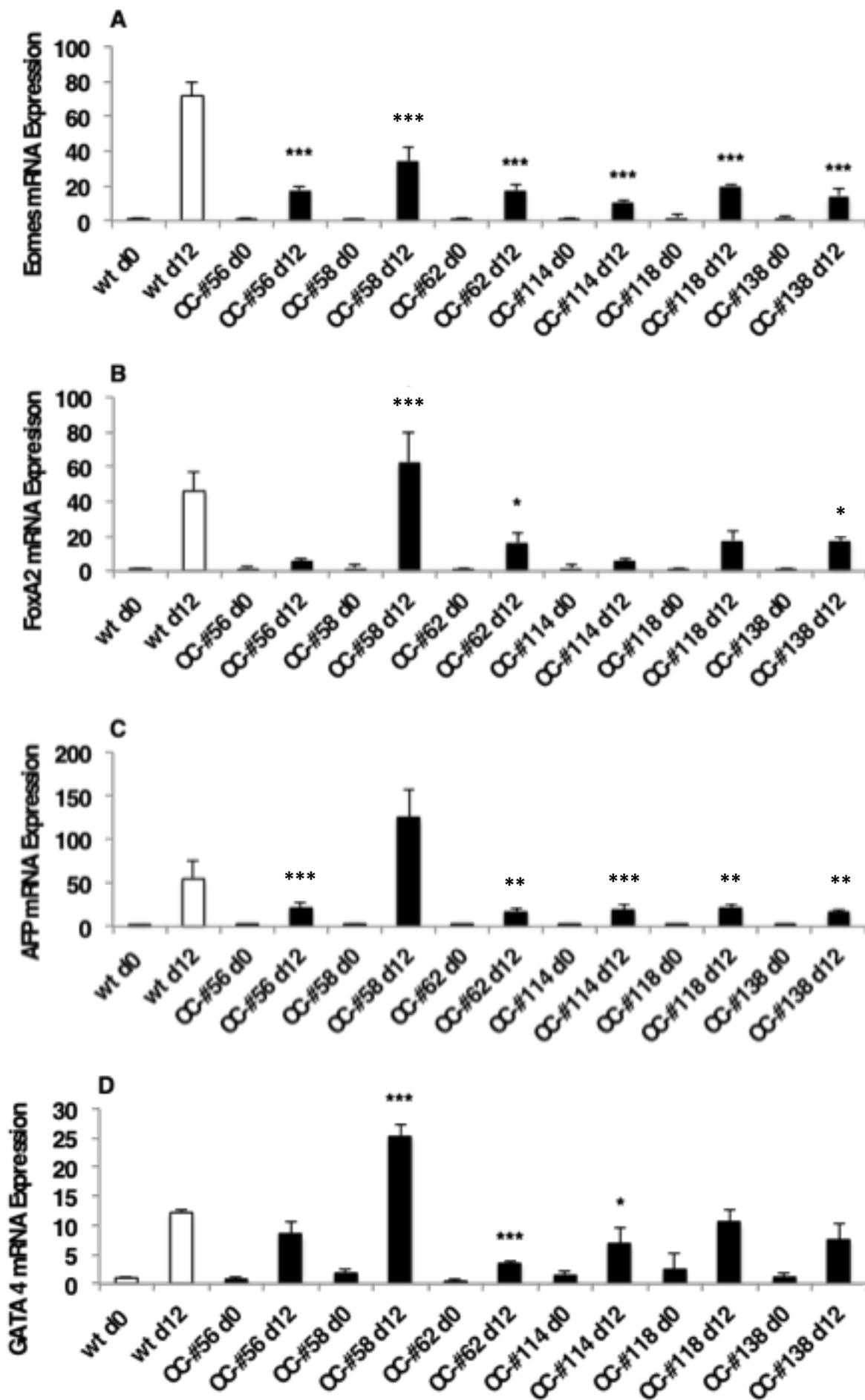


Abbildung 4. 3: EpCAM KO, die keine Kardiomyozyten bilden, weisen eine geringere endodermale Differenzierung auf. Die Diagramme zeigen die Expression von vier endodermalen Markern für jede Zelllinie zu zwei Zeitpunkten des Experiments, Tag 0 und Tag 12. Dabei wurden alle Werte auf die Expression des Gens an Tag 0 im WT bezogen. (A) Eomesodermin, (B) AFP, (C) Foxa2, (D) GATA4. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Veränderung der Expression der Markergene in den verschiedenen Zelllinien an Tag 0 und 12 gegen WT an Tag 0 und 12 berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

An den Säulendiagrammen der Abbildung 4.3 ist zu sehen, dass die Expression von Eomes in allen sechs EpCAM-KO-Klonen vermindert ist. Der Anstieg der Expression in den EpCAM-KOs ist maximal die Hälfte des Anstiegs der Expression in den wildtypischen Zellen. Um einen besseren Vergleich der absoluten Werte zu erlangen wurden alle RT-PCR-Ergebnisse auf einen Basalwert bezogen. Dazu diente die Expression des jeweiligen Markers an Tag 0 in wildtypischen Zellen. Bezogen auf die Eomes-Expression an Tag 0 in wildtypischen Zellen stieg die Expression im WT um das durchschnittlich 71,83-fache, in CC-#56 um das durchschnittlich 17,7-fache, in CC-#58 um das durchschnittlich 34,2-fache in CC-#62 um das durchschnittlich 17,6-fache, in CC-#114 um das durchschnittlich 10,3-fache, in CC-#118 um das durchschnittlich 20,05-fache, in CC-#138 um das durchschnittlich 14,5-fache nach 12 Tagen an. Die Expression von FoxA2 stieg im WT um das durchschnittlich 54,5-fache, in CC-#56 um das durchschnittlich 21,5-fache, in CC-#58 um das durchschnittlich 124,6-fache, in CC-#62 um das durchschnittlich 17-fache, in CC-#114 um das durchschnittlich 18,7-fache, in CC-#118 um das durchschnittlich 21,4-fache und in CC-#138 um das durchschnittlich 16,4-fache. Die AFP-Expression stieg innerhalb von 12 Tagen in WT um das durchschnittlich 45,8-fache, in CC-#56 um das durchschnittlich 5,9-fache, in CC-#58 um das durchschnittlich 62,6-fache, in CC-#62 um das durchschnittlich 16,3-fache, in CC-#114 um das durchschnittlich 5,4-fache, in CC-#118 um das durchschnittlich 17,6-fache, in CC-#138 um das durchschnittlich 17,5-fache. Weniger stark ausgeprägt waren die Unterschiede bei der Expression von GATA 4. Die Expression stieg im WT um das durchschnittlich 12,2-fache, in CC-#56 um das durchschnittlich 8,5-fache, in CC-#58 um das durchschnittlich 25,3-fache, in CC-#62 um das durchschnittlich 3,5-fache, in CC-#114 um das durchschnittlich 6,9-fache, in CC-#118 um das durchschnittlich 10,5-fache, in CC-#138 um das durchschnittlich 7,6-fache.

4.1.2. Immunhistochemischer Nachweis endodermaler Marker bei spontaner dreidimensionaler Differenzierung

Um sich dem *in vivo* Zustand anzunähern, wurde eine spontane endodermale Differenzierung in 3D durchgeführt. An Tag 5 der 3D-Differenzierung *in vitro*, was dem Ende der Gastrulation in etwa entspricht, wurden EBs isoliert und immunhistochemisch untersucht. In Abbildung 4.4 sind exemplarisch drei konsekutive Schnitte eines EBs gezeigt, die mit Antikörpern gegen EpCAM, FoxA2 und GATA4 gefärbt wurden. Im Vergleich sieht man, dass EpCAM als Transmembranprotein nur im Bereich der Zellmembran durch die Antikörper gefärbt wird, während GATA4 und FoxA2 als Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert sind.

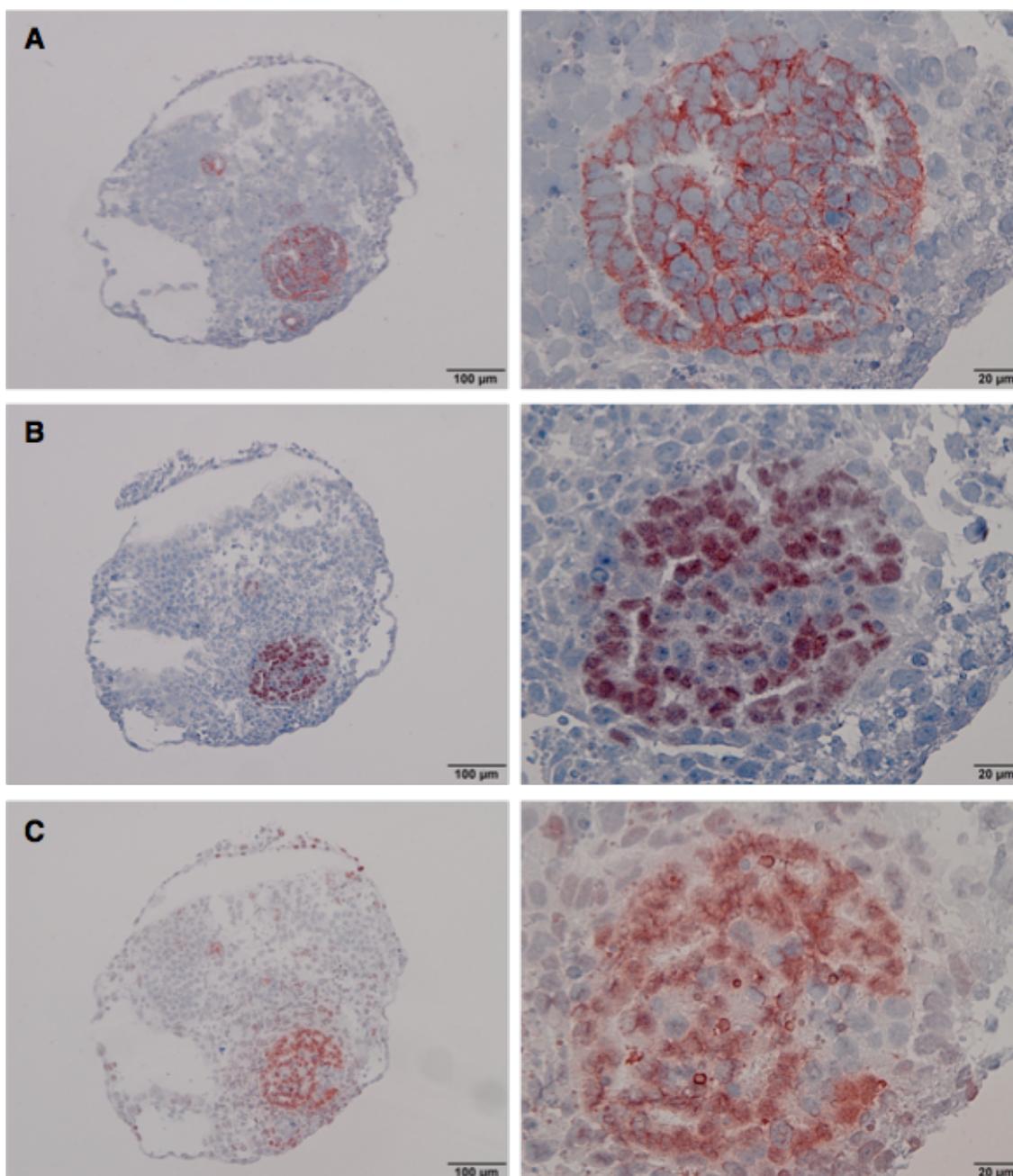


Abbildung 4. 4: EpCAM, FoxA 2 und GATA 4 weisen eine Kollokalisierung in differenzierten EBs auf. An Tag 5 der spontanen Differenzierung wurden EBs isoliert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Sphäroide in 5µm dicke Serienschnitte bearbeitet und mit den verschiedenen Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind sequenzielle Schnitte desselben Sphäroids. Färbungen mit Primärantikörpern gegen (A) EpCAM, (B) FoxA 2 und (C) GATA4.

Nach Färbung mit einem FoxA2-spezifischen Primärantikörper wurde zur statistischen Auswertung der gefärbten Sphäroide der Quick Score herangezogen (Detre et al., 1995; Varghese, Bukhari, Malhotra, & De, 2014). Hierfür wurde der Anteil gefärbter Zellen (0-100) mit der Intensitätsstufe (0-3) multipliziert. Der theoretische Höchstwert würde damit 300 betragen. Wie in Abbildung 4.5. zu sehen ist, zeigen wildtypische EBs FoxA2-positive Zellbereiche. Die Ergebnisse zeigen eine tendenziell verminderte FoxA2 Expression in EpCAM KOs verglichen mit Wildtypen. Die geringste durchschnittliche FoxA2-Expression zeigten CC-#56 und CC-#114, mit einer Reduktion des Quick Score Wertes im Vergleich zu WT um das 5,18- bzw. 9,5-fache. CC-#58, CC-#62, CC-#118 und CC-#138 zeigten eine nur gering verminderte Expression von FoxA2. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, eine Tendenz ist aber erkennbar. Die mit „one way“ ANOVA und Dunnett´s test adjustierten p-Werte betragen für CC-#56 $p=0,1253$, für CC-#58 $p= 0,9177$, für CC-#62 $p= 0,3799$, für CC-#114 $p= 0,0856$, für CC-#118 $p= 0,9502$, für CC-#138 $p= 0,9502$.

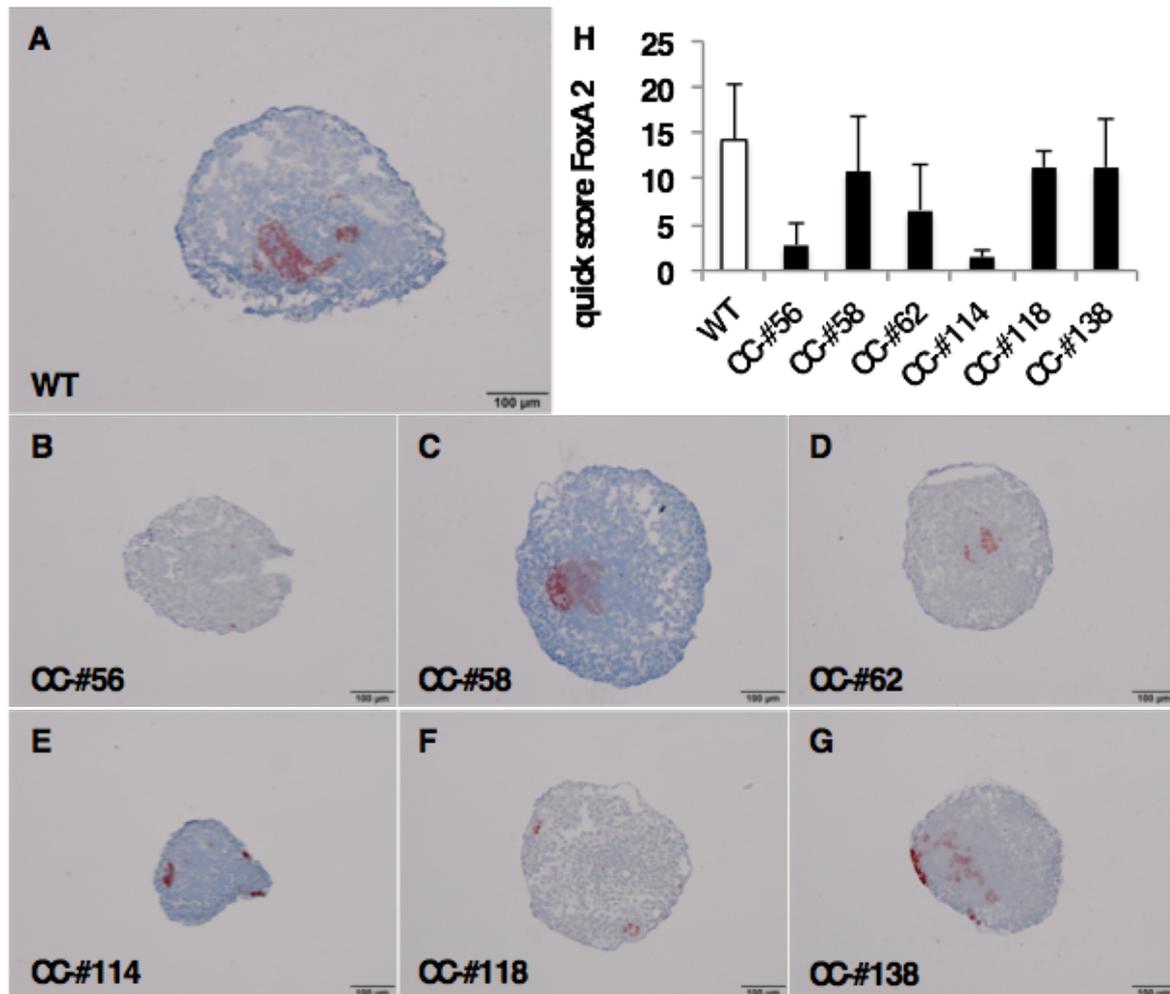


Abbildung 4. 5: 5 von 6 EpCAM KOs zeigen eine geringere FoxA2 Expression als wildtypische EBs. An Tag 5 der EB Differenzierung wurden die EBs isoliert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Anfertigung von Serienschnitten wurden die EBs mit Antikörpern gegen FoxA2 gefärbt. Von jeder Zelllinie ist beispielhaft ein EB gezeigt: (A) WT, (B) CC-#56, (C) CC-#58, (D) CC-#62, (E) CC-#114, (F) CC-#118, (G) CC-#138. (H) Eine Quantifizierung wurde mit dem Quick-Score vorgenommen. Es wurden pro Zelllinie 4-5 EBs aus 2 unabhängigen Versuchen analysiert (n=2). Es wurde der quick score der einzelnen EpCAM-defizienten Zelllinien mit dem quick score von WT verglichen. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

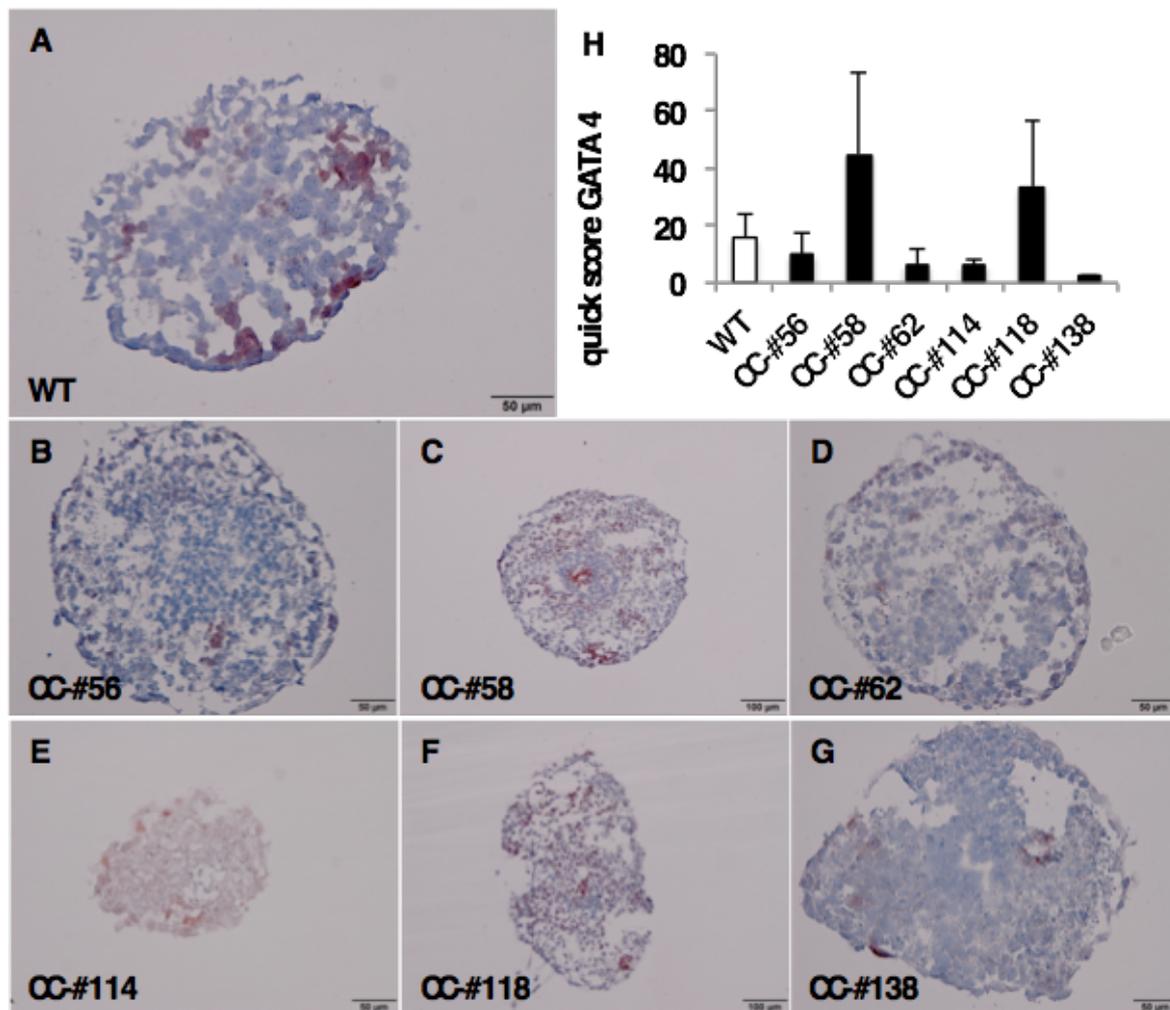


Abbildung 4. 6: 4 von 6 EpCAM KOs zeigen eine tendenziell geringere GATA 4 Expression: Nach 5 Tagen spontaner Differenzierung wurden EBs isoliert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Anfertigung von Serienschritten wurden die Präparate mit Antikörpern gegen GATA-4 gefärbt. Von jeder Zelllinie ist beispielhaft ein EB gezeigt: (A) WT, (B) CC-#56, (C) CC-#58, (D) CC-#62, (E) CC-#114, (F) CC-#118, (G) CC-#138. (H) Wie oben erfolgte die Auswertung mit dem Quick-Score. Es wurden pro Zelllinie 4-5 EBs aus 2 unabhängigen Versuchen analysiert (n=2). Es wurde der quick score der einzelnen EpCAM-defizienten Zelllinien mit dem quick score von WT verglichen. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Beim Vergleich der Quick-Scores der GATA-4 Expression in EBs zeigte sich die stärkste Reduktion bei CC-#138 mit einer 7-fachen Verminderung, allerdings auch hier ohne statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Quick score in wildtypischen Zellen, sodass nur eine Tendenz erkennbar ist. Die mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test adjustierten p-Werte betragen für CC-#56 $p = 0,9957$, für CC-#58 $p = 0,2865$, für CC-#62 $p = 0,9535$, für CC-#114 $p = 0,9582$, für CC-#118 $p = 0,6794$, für CC-#138 $p = 0,8500$.

Im Überblick der Experimente zeigte sich also eine verminderte Expression endodermaler Gene bei EpCAM-KO E14TG2 α ESC Zelllinien, die bei spontaner Differenzierung weniger Kardiomyozyten bildeten. Diese Hemmung endodermaler Differenzierung konnte sowohl bei forcierter Differenzierung in vitro, als auch bei spontaner Differenzierung in den EBs gezeigt werden. Bei letzterer ohne Signifikanz.

4.1.3. Mesodermale Differenzierung in Ko-Kulturen von wildtypischen und EpCAM KO-Zelllinien

Nachdem sich in einem Großteil der EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zelllinien eine Störung der endodermalen Differenzierung gezeigt hatte, stellte sich nun die Frage ob es möglich ist durch Mischkulturen aus WT und EpCAM-KO E14TG2 α ESC Zelllinien diese Differenzierungsstörung zu kompensieren. Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Inhibierung der endodermalen Differenzierung in den EpCAM-KOs auf, während in der Entstehung der anderen beiden Keimblätter, Mesoderm und Ektoderm, anhand der Messung spezifischer Marker keine Differenzierungsstörung nachgewiesen wurde. Eine direkte Auswirkung der fehlenden EpCAM Expression nach Knockout in ESC, die eine mesodermale Differenzierung durchlaufen, ist nicht wahrscheinlich, da in diesen Zellen ein kompletter Verlust von EpCAM unter Differenzierungsbedingungen beobachtet wurde (Sarrach et al. 2018). Außerdem konnten Vorarbeiten unseres Labors zeigen, dass bei einer Überexpression von EpCAM die Expression der mesodermalen Marker Col1a1 und Wt1 im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert war und EpCAM folglich eine inhibitorische Wirkung auf die Bildung von Mesoderm hat. Die reduzierte kardiomyozytäre Differenzierung in EpCAM-defizienten Zellen könnte deshalb aus der verminderten Präsenz endodermaler Zellen resultieren, welche für die induktiven Signalen an mesodermal differenzierende Zellen notwendig sind. Bereits Mummery et al. (2003) konnten zeigen, dass die Ko-Kultivierung von Stammzellen mit endodermalen Zellen die kardiomyozytäre Differenzierung unterstützt. Unter der Annahme, dass die wildtypischen Zellen zu endodermalen Zellen differenzieren, sollten diese dann in der Lage sein in den benachbarten EpCAM-KOs die kardiomyozytäre Differenzierung anzustoßen.

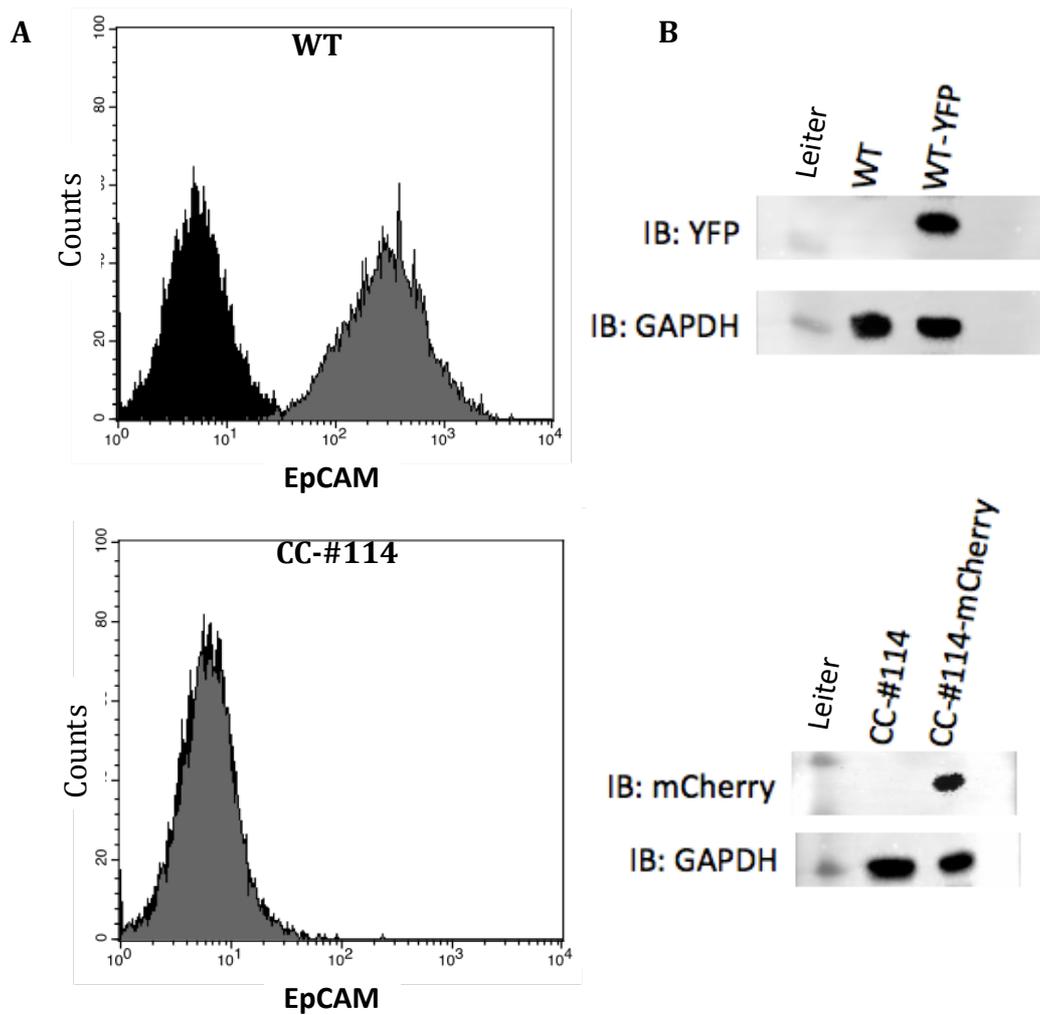


Abbildung 4. 7: Stabile YFP und mCherry Expression in ESC Klonen. (A) Histogramme der EpCAM Expression von WT und CC-#114 ESC Klonen nach Durchflusszytometrie. (B) Immunblotnachweis der mCherry und YFP Expression in WT und CC-#114 ESC Klonen. Gezeigt sind jeweils repräsentative Ergebnisse aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

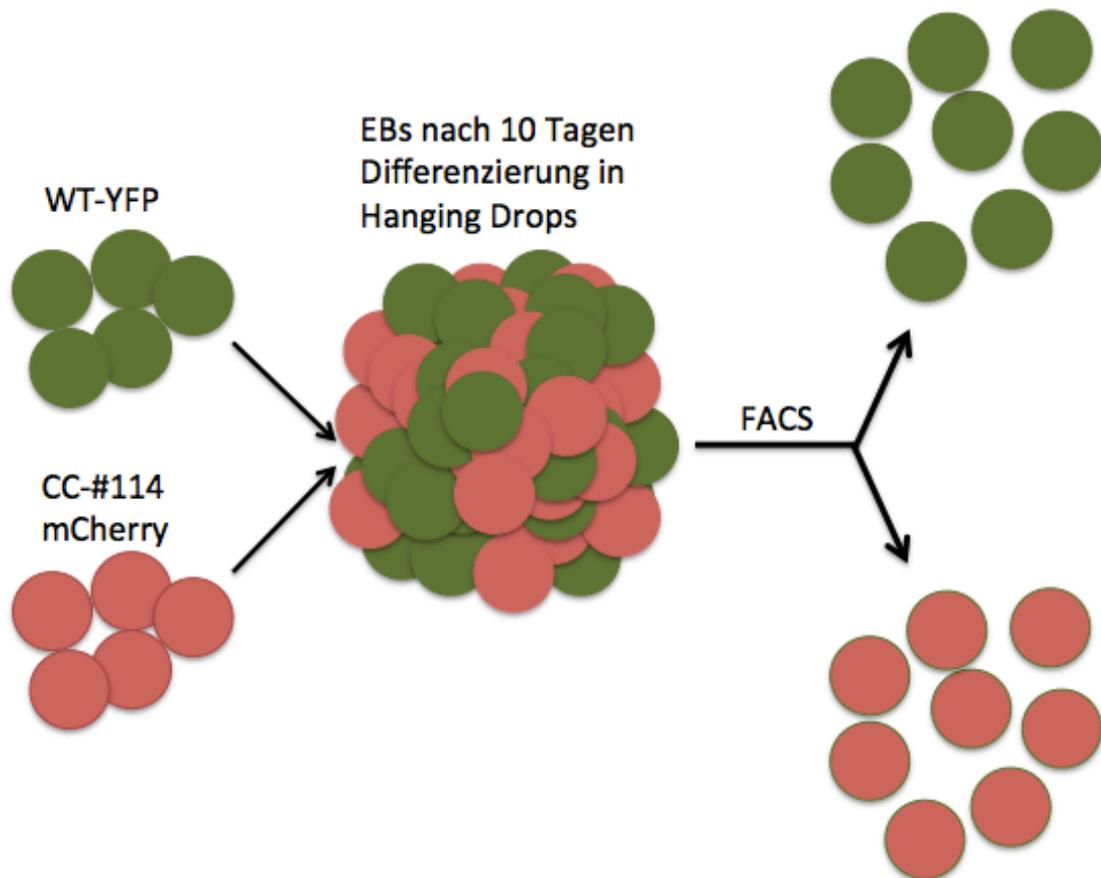


Abbildung 4. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Ko-Kultur wildtypischer und EpCAM-KO ESC Klonen: Ko-Kulturen wildtypischer und EpCAM-defizienter Zellen werden zur Bildung von EBs verwendet. Nach 10 Tagen spontaner Differenzierung werden wildtypische und EpCAM-defiziente Zellen anhand von Fluoreszenzproteinen mit FACS wieder aufgetrennt und deren Genexpression separat untersucht.

Für diese Experimentreihe wurden wildtypische embryonale E14TG2 α ESC und der EpCAM-defiziente Klon CC-#114. Die EpCAM-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie mit EpCAM-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 4.7). Wildtypische und EpCAM-KO E14TG2 α ESC Linien wurden mit pCAG Plasmiden transfiziert, die sowohl ein Fluoreszenzgen, als auch ein Resistenzgen für Puromycin enthielten. Nach Transfektion der Zellen durch Elektroporation wurden diese unter Zugabe von Puromycin-haltigem Medium kultiviert und stabile Zelllinien generiert. Die Expression des jeweiligen Fluoreszenzproteins YFP oder mCherry wurde in einem Immunoblot verifiziert (Abbildung 4.7).

Zu Beginn des Experiments wurden für die Herstellung jedes EBs 500 Zellen verwendet. Dabei bestand die eine Hälfte (250 Zellen) aus YFP-markierten wildtypischen ESCs. Die anderen 250 Zellen waren mCherry-markierte CC-#114

EpCAM-KO ESCs. Nach 10 Tagen der Differenzierung wurden die EBs mithilfe von Kollagenase Typ1 disaggregiert und die Zellen basierend auf der Expression des Fluoreszenzproteins YFP oder mCherry mittels FACS sortiert. Danach konnte aus wildtypischen Zellen und EpCAM-KOs separat RNA isoliert werden und die Genexpression analysiert werden (Abbildung 4.8).

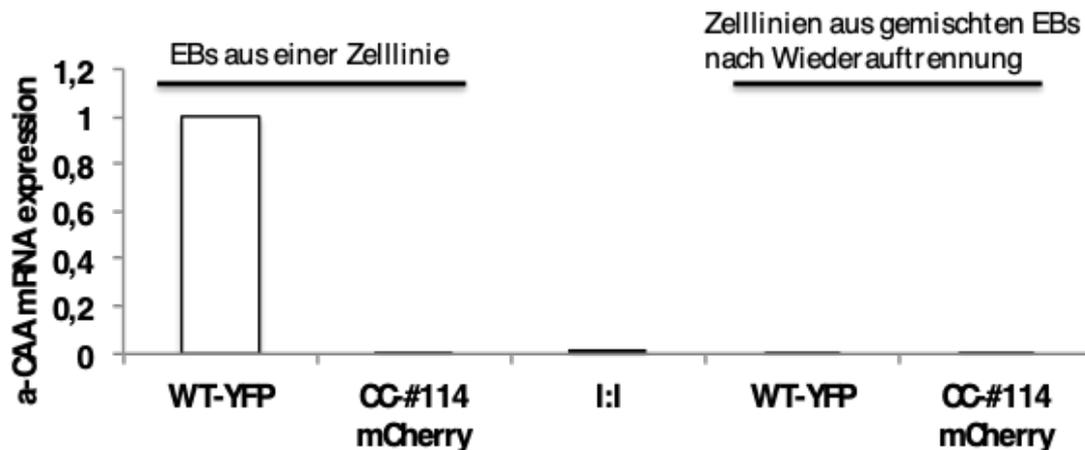


Abbildung 4. 9: Expression des kardiomyozytären Markers α -CAA in wildtypischen und EpCAM-KO ESCs nach Ko-Kultur in Embryoid Bodies. Wildtypische und EpCAM-KO ESC Klone wurden in Ko-Kulturen als EBs differenziert. Nach 10 Tagen spontaner Differenzierung wurden Wildtyp-Zellen und CRISPR-KOs aufgrund ihrer Fluoreszenzproteine YFP bzw. mCherry mittels FACS sortiert. Daraufhin wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qPCR konnte die Konzentration der α -CAA mRNA quantifiziert werden. Von links nach rechts handelt es sich um die α -CAA Expression von WT-YFP-Zellen aus rein wildtypischen EBs, von CC-#114 mCherry Zellen in rein EpCAM-defizienten EBs, in gemischten EBs und in WT-YFP und CC-#114mCherry Zellen aus gemischten EBs nach Wiederauftrennung der Zellen anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzproteine. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse eines Experiments.

Als Marker der kardiomyozytären Differenzierung wurde α -CAA verwendet, welches die Z-Scheiben zwischen den Sarkomeren der Myofibrillen bildet und ein früher Marker der murinen Kardiogenese ist (Sassoon et al., 1988). Aus Abbildung 4.9 geht hervor, dass alle Versuchsgruppen im Vergleich zu den rein wildtypischen EBs den kardiomyozytären Marker α -CAA deutlich weniger exprimieren: WT-YFP aus gemischten EBs exprimiert nur das 0,0012-fache, CC-#114-mCherry das 0,00038-fache von reinen WT-YFP EBs. Selbst die WT-Zellen aus den gemischten EBs exprimierten damit weniger α -CAA als erwartet. Wenn auch die Induktion der Differenzierung in den EpCAM-defizienten Zellen nicht möglich ist, wäre zumindest zu erwarten, dass ein Teil der WT-Zellen zu Kardiomyozyten differenzieren. Da in jedem

gemischten EB 250 WT Zellen sind, wäre dann die α -CAA Expression im Vergleich zu den reinen WT-EBs, die 500 WT-Zellen enthielten, um ca. 50% reduziert gewesen. Doch tatsächlich war sie auf das Niveau nichtkontrahierender Zellen gesunken. Zum Vergleich dient hier die Negativkontrolle der CC-#114-mCherry-EBs. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC in den gemischten EBs die Differenzierung der wildtypischen Zellen gestört haben, oder 250 wildtypische Zellen in einem gemischten EB nicht ausreichend sind.

Diese Vermutung wird auch durch einen weiteren Versuch erhärtet. Bei diesem wurden für jede Gruppe von EBs unterschiedliche Verhältnisse wildtypischer Zellen und EpCAM defizienter-Zellen verwendet und nach 10 Tagen die Zahl kontrahierender EBs gezählt. Als Positivkontrolle dienten rein wildtypische EBs mit einer initialen Zellzahl von 500 Zellen. Als Negativkontrolle dienten reine EpCAM-KO-EBs und WT-EBs mit einer initialen Zellzahl von nur 50 Zellen. Gemischt wurden WT und CC-#114 im Verhältnis 1:1, 1:9 und 1:49, wobei die initiale Gesamtzellzahl immer 500 betrug. Vorarbeiten aus unserem Labor hatten bereits gezeigt, dass WT-EBs mit solch niedriger initialer Zellzahl nicht in der Lage sind Kardiomyozyten zu bilden. In diesem Experiment kam es in EBs mit initialer Zellzahl von 50 wildtypischen Zellen nicht zur Differenzierung von ESC zu Kardiomyozyten. Es ist nicht möglich dieses durch EpCAM-KO Zellen zu kompensieren. Selbst bei initial 250 WT Zellen (1:1 Verhältnis) konnten keine kontrahierenden Areale im EB nachgewiesen werden. Bei den EBs mit einem Verhältnis von 1:9 bzw. 1:49 und mit einem initialen Anteil wildtypischer Zellen von 50 von 500 bzw. 10 von 500 konnten nur in 1,42 bzw. 1,43 % der EBs kontrahierende Areale gefunden werden. In rein wildtypischen EBs dagegen 70%.

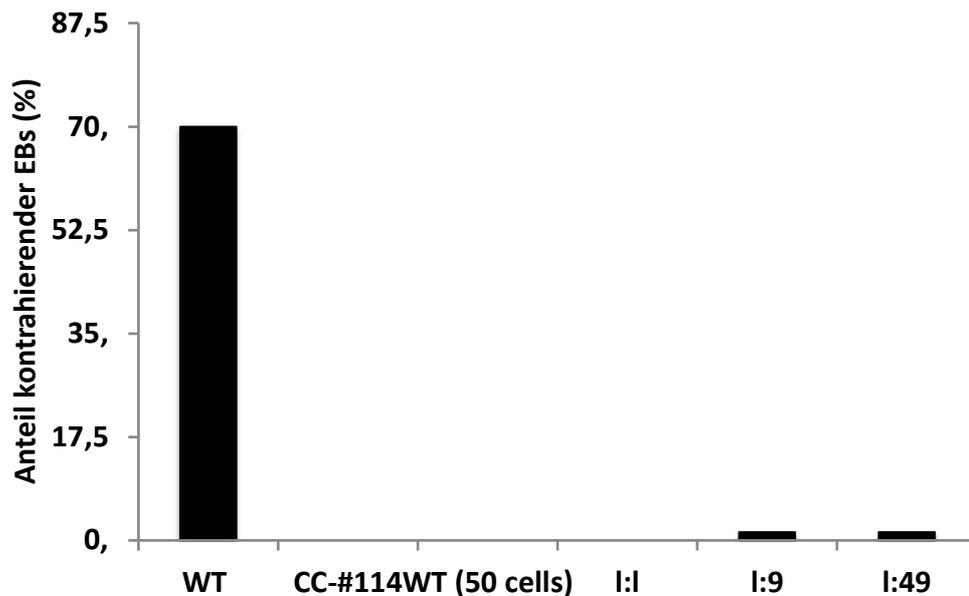


Abbildung 4. 10 Mischkulturen waren nicht in der Lage mehr Kardiomyozyten zu bilden als EpCAM-KOs. Alle hergestellten EBs, bis auf die Negativkontrolle „WT (50 Zellen)“ hatten eine initiale Zellzahl von 500 Zellen. Die Mischverhältnisse sind als WT- zu EpCAM-KO Zellen angegeben. Für jede Zelllinie wurde der Anteil kontrahierender EBs bestimmt an Tag 10 der spontanen Differenzierung. Das Diagramm ist das Ergebnis eines Experiments.

4.2. Effekte des EpCAM-Verlustes auf die mesodermale Differenzierung

4.2.1. Knockout von EpCAM inhibiert die mesodermale Differenzierung

Nachdem sich eine Störung der kardiomyozytären Differenzierung (Sarrach et al., 2018) und der endodermalen Differenzierung (Kapitel 4.1) in EpCAM KOs gezeigt hatte, sollte die Rolle EpCAMs bei der Differenzierung zu anderen Vorläuferzellen untersucht werden.

Als nächstes wurde die Fähigkeit der EpCAM-defizienten Stammzellen, mesodermal zu differenzieren, geprüft. Dazu wurde ein Protokoll verwendet, das die Bildung mesodermaler Zellen aus Stammzellen induziert (Kanke et al., 2014).

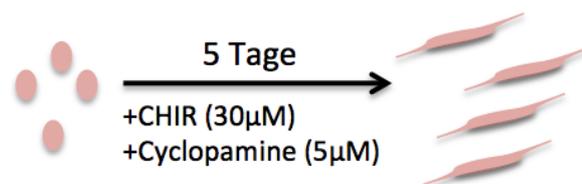


Abbildung 4. 11: Murine embryonale Stammzellen differenzieren unter dem Einfluss von CHIR und Cyclopamine zu mesodermalen Zellen. Modifiziert von Kanke et al. (2014)

Zur Induktion der mesodermalen Differenzierung wurden Zellen im Monolayer unter Zugabe zweier Inhibitoren kultiviert. Der Erste ist das CHIR 99021 ($C_{25}H_{18}Cl_2N_8$), ein Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3, kurz GSK3 (Bain et al., 2007). Dieses Enzym ist für den Abbau von β -catenin zuständig. Wenn dieser gehemmt wird, reichert sich β -catenin im Zytoplasma und Zellkern an und aktiviert die Transkription von Zielgenen.

Der andere Inhibitor ist das Cyclopamine, welches den Hedgehog (Hh)-Signalweg hemmt. Die Hh-Liganden sind sezernierte Glykoproteine, die an den Rezeptor Patched (Ptch) binden können, wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf Smoothened (Smo) aufgehoben wird und der Signalweg enthemmt wird (Hooper & Scott, 2005). Dadurch wird die neuroektodermale Entwicklung der Zellen blockiert.

Ein Tag vor Beginn der Behandlung mit CHIR 99021 und Cyclopamine wurden 200.000 Zellen unter +LIF Bedingungen ausplattiert. An Tag 0 des Experiments wurde das +LIF Medium entfernt und die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Monolayer mit -LIF Medium bedeckt, das außerdem die zwei Inhibitoren enthielt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen geerntet und aus diesen die RNA isoliert. Zunächst wurden nur wildtypische Zellen dieser Prozedur unterzogen und der Verlauf dreier Marker untersucht: Pax6 als Marker des Ektoderms, Brachyury als Marker des Mesoderms, EpCAM als Marker des Endoderms. Nach 5 Tagen zeigte sich eine Reduktion von Pax6 um 95,3%, eine Reduktion von EpCAM um 64% und ein gegenläufiger Anstieg von brachyury um das 132,6-fache.

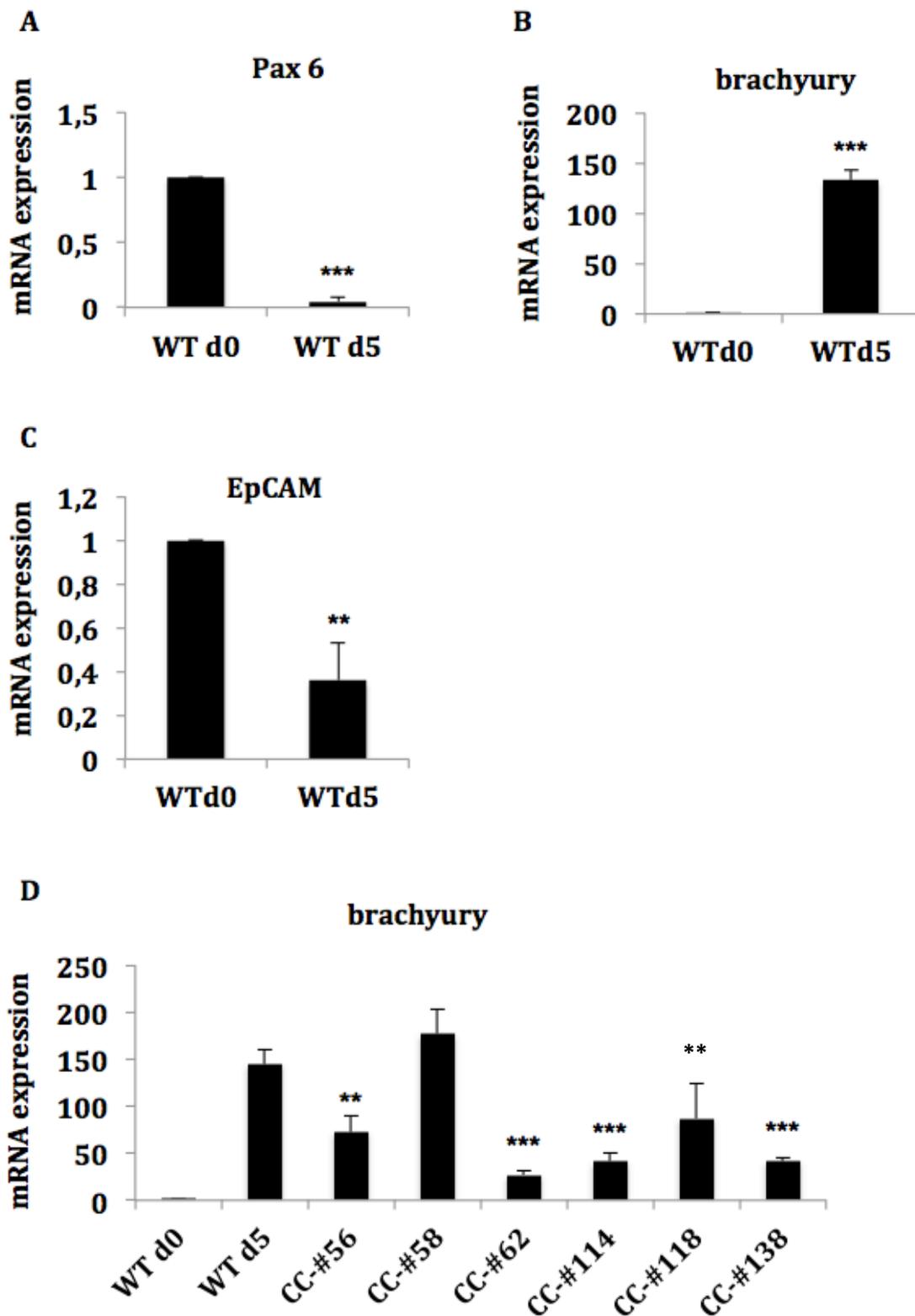


Abbildung 4. 12: EpCAM defiziente Zelllinien haben eine verminderte Kapazität mesodermal zu differenzieren. Wildtypische und EpCAM Knockout ESC wurden nach 5 Tagen forcierter mesodermaler Differenzierung geerntet, lysiert und die Expression der dargestellten Gene in der qPCR bestimmt. (A) Pax 6 Expression, (B) Brachyury Expression, (C) EpCAM Expression in WT Zellen an Tag 5 im Vergleich zu Tag 0 des Protokolls. (D) Brachyury Expression im WT und EpCAM KOs an Tag 5 des Protokolls im Vergleich zur Expression im WT an Tag 0. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz des Unterschiedes der brachyury-Expression in EpCAM-KO-Klonen an Tag 5 gegen die brachyury-Expression im WT an Tag 5

berechnet. In Abbildung (A), (B), (C) erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz mit dem zweiseitigen t-test, in Abbildung (D) erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Anschließend wurden die EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC mesodermal differenziert, um deren brachyury-Expression an Tag 5 mit der Expression im WT zu vergleichen. Hierbei zeigte sich nach CC-#58 die höchste Brachyury-Expression in CC-# 118, diese erreichte allerdings auch nur 60,1% der brachyury-Expression in wildtypischen Zellen an Tag 5. WT erreichte nach 5 Tagen das 144,6-fache der Expression von Tag 0. In CC-#56 war die brachyury-Expression an Tag 5 im Vergleich zur Expression im WT an Tag 0 72,5x höher, in CC-#58 176,7x höher, in CC-#62 um 27,1x höher, in CC-#114 um 41x höher, in CC-#118 um 87x höher, in CC-#138 um 41,6x höher.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen eine reduzierte Expression mesodermaler Gene in 5 von 6 EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zelllinien. In vier Zelllinien war diese Abnahme im Vergleich zur brachyury-Expression im WT an Tag 5 signifikant (Abbildung 4.12).

4.2.2. EpCAM-KO hat einen gemischten Einfluss auf die Vimentin-Expression von Zellen im pluripotenten Zustand.

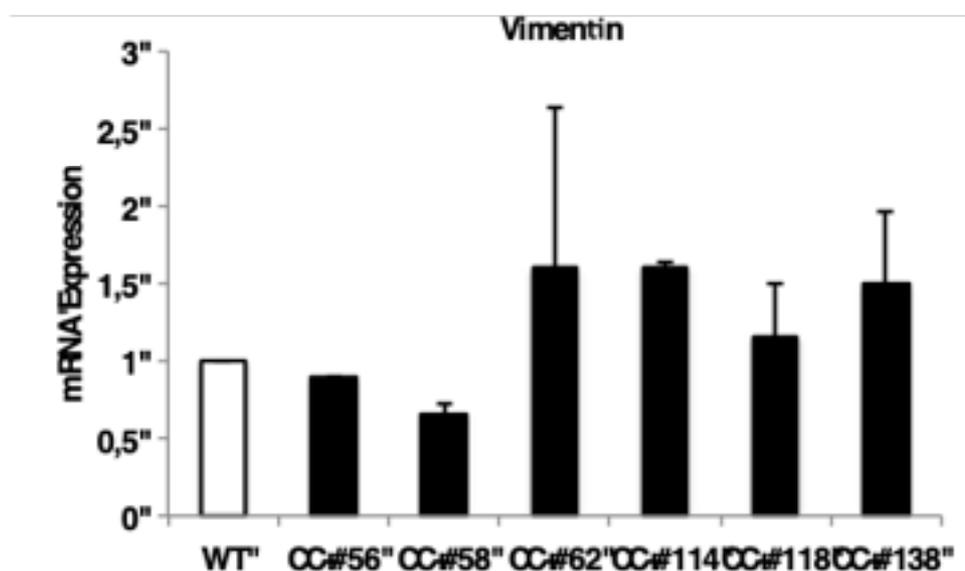


Abbildung 4. 13: Im Monolayer geht der EpCAM-Verlust mit einer gemischten Veränderung der Vimentin-Expression einher. Pluripotente Zellen wurden aus Zellkulturflaschen geerntet, die RNA isoliert und anschließend qRT-PCRs für Vimentin durchgeführt. Das Diagramm zeigt die Vimentin-Expression der jeweiligen Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz des Unterschiedes der Vimentin-Expression in EpCAM-Knockout Klonen gegen die Vimentin-Expression im WT berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Grundsätzlich hat das Zytoskelett drei Hauptbestandteile: Mikrotubuli, Mikrofilamente und die Intermediärfilamente. Letztere können in fünf Gruppen eingeteilt werden. Keratin (Epithel), Desmin (Muskel), GFAP, Neurofilament und Vimentin (Klymkowsky, 1982). In Tumoren ist Vimentin mit einer EMT assoziiert (Vuoriluoto et al., 2011). Um die Effekte des EpCAM-Verlustes auf die Expression mesenchymaler Marker zu überprüfen wurden pluripotente EpCAM-defiziente E14TG2 α ESC auf ihre Vimentin-Expression hin untersucht und mit der Vimentin-Expression in wildtypischen pluripotenten Stammzellen verglichen. Die Vimentin-Expression war in CC-#56 um 11% und in CC-#58 um 34% geringer als im WT. Dagegen war die Vimentin-Expression in CC-#62 um 60%, in CC-#114 um 61%, in CC-#118 um 16%, in CC-#138 um 49% höher als im WT. Die Ergebnisse waren nicht signifikant

4.2.3. EBs aus EpCAM defizienten Stammzellen unterscheiden sich nicht von Wildtypischen in der Vimentin Expression

Für den immunhistochemischen Nachweis von Vimentin wurden EBs nach 5 Tagen dreidimensionaler, spontaner Differenzierung isoliert, in flüssigem Stickstoff gefroren und dann in einem Mikrotom geschnitten. Vimentin ist ein Typ 3-Intermediärfilament und Zytoskelettbestandteil in Zellen mesenchymaler Herkunft (Franke, Schmid, Osborn, & Weber, 1978). Als solches verleiht es den Zellen mechanische Stabilität (Goldman, Khuon, Chou, Opal, & Steinert, 1996). Während der Differenzierung lassen sich Zellen des Mesoderms und Teile des parietalen Endoderms mit Vimentin anfärben (Lane, Hogan, Kurkinen, & Garrels, 1983). Außerdem wird es im Neuroektoderm in Vorläufern der Gliazellen exprimiert (Schnitzer, Franke, & Schachner, 1981).

In einem ersten Versuch mit 2 EBs pro Zelllinie waren nach Färbung der EBs mit Vimentin-spezifischen Antikörpern anhand des Quick Scores zwischen WT und EpCAM

KOs nur geringe Unterschiede zu sehen. Der Quick Score für WT betrug 170, für CC#56 153,3, für CC.#58 130, für CC-#62 140, für CC-#114 135, für CC-#118 130, für CC-#138 155.

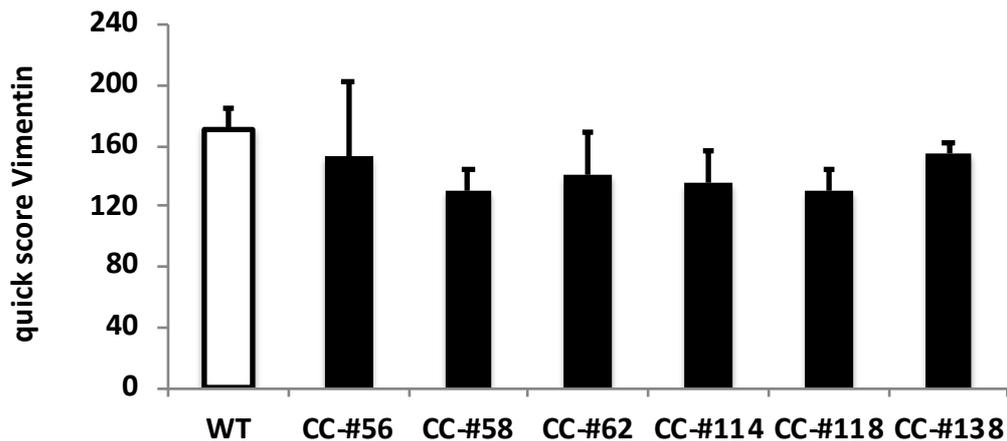
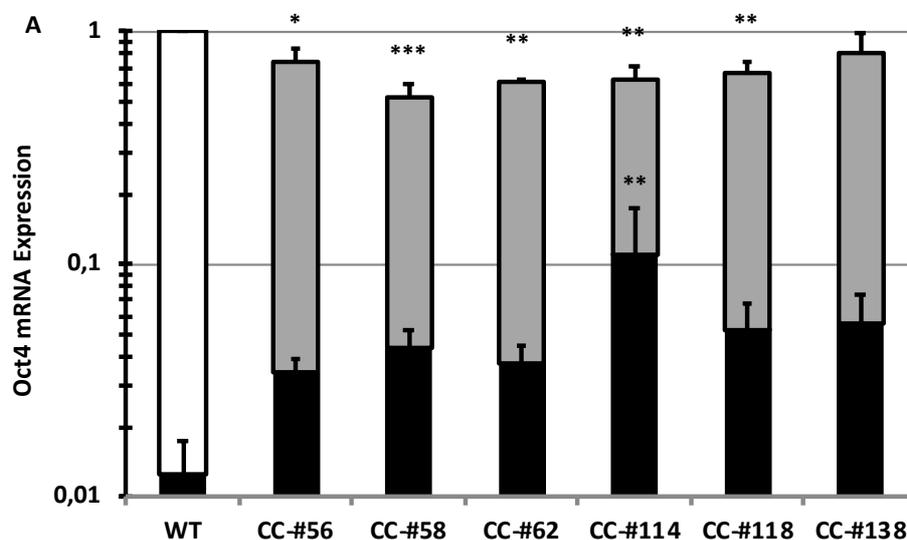


Abbildung 4. 14: Immunhistochemischer Nachweis der Vimentin-Expression in EpCAM-KOs im Vergleich zum WT : Nach 5 Tagen spontaner Differenzierung wurden EBs isoliert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Anfertigung von Serienschnitten wurden die Präparate mit Antikörpern gegen Vimentin gefärbt. Wie oben erfolgte die Auswertung mit dem Quick-Score. Es wurden pro Zelllinie 2 EBs aus einem Versuch analysiert (n=1). Die Standardabweichungen beziehen sich auf technische Replikate.

4.3. Expression der Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog in EpCAM-defizienten embryonale Stammzellen

Stammzellen können in einem pluripotenten Zustand verbleiben und dabei proliferieren. Das „Triumvirat“ (Chambers & Tomlinson, 2009) aus den Transkriptionsfaktoren Oct4 (Nichols et al., 1998; Niwa, 2000), Sox2 (Avilion et al., 2003) und Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) bewahrt die Zellen in pluripotentem Zustand. In Zellkultur wird der pluripotente Zustand der Zellen durch die Zugabe von LIF in das Kulturmedium sichergestellt (Tamm, Pijuan Galito, & Anneren, 2013). EpCAM ist in der Lage durch die Hemmung der p53 und p21 Expression und Aktivierung des Oct4-Promotors, die Expression von Pluripotenzfaktoren in Stammzellen aufrecht zu erhalten (Huang et al., 2011). Außerdem führt die siRNA-vermittelte Hemmung der EpCAM Expression zu einer Reduktion der Oct3/4, SSEA-1 und c-Myc Expression (Gonzalez, Denzel, Mack, Conrad, & Gires, 2009).

Um die Expression der Pluripotenzmarker Oct4, Sox2 und Nanog in den EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zelllinien zu untersuchen, wurden aus wildtypischen und 6 EpCAM-defizienten ESC Zelllinien EBs hergestellt und nach 5 Tagen Differenzierung geerntet. Nach RNA-Extraktion wurden qRT-PCRs mit Primern für Oct4, Sox2 und Nanog durchgeführt. Die Ergebnisse unter Kultivierung mit LIF und nach 5 Tagen Differenzierung sind in Abbildung 4.14 für jede Zelllinie und jedes Gen in einer Säule dargestellt. Während unter Kultivierung mit LIF-Zusatz die EpCAM-KO-Linien eine im Vergleich zu WT geringere Expression der Stammzell-Marker zeigen, ist die Herunterregulation derselben in den 5 Tagen Differenzierung schwächer.



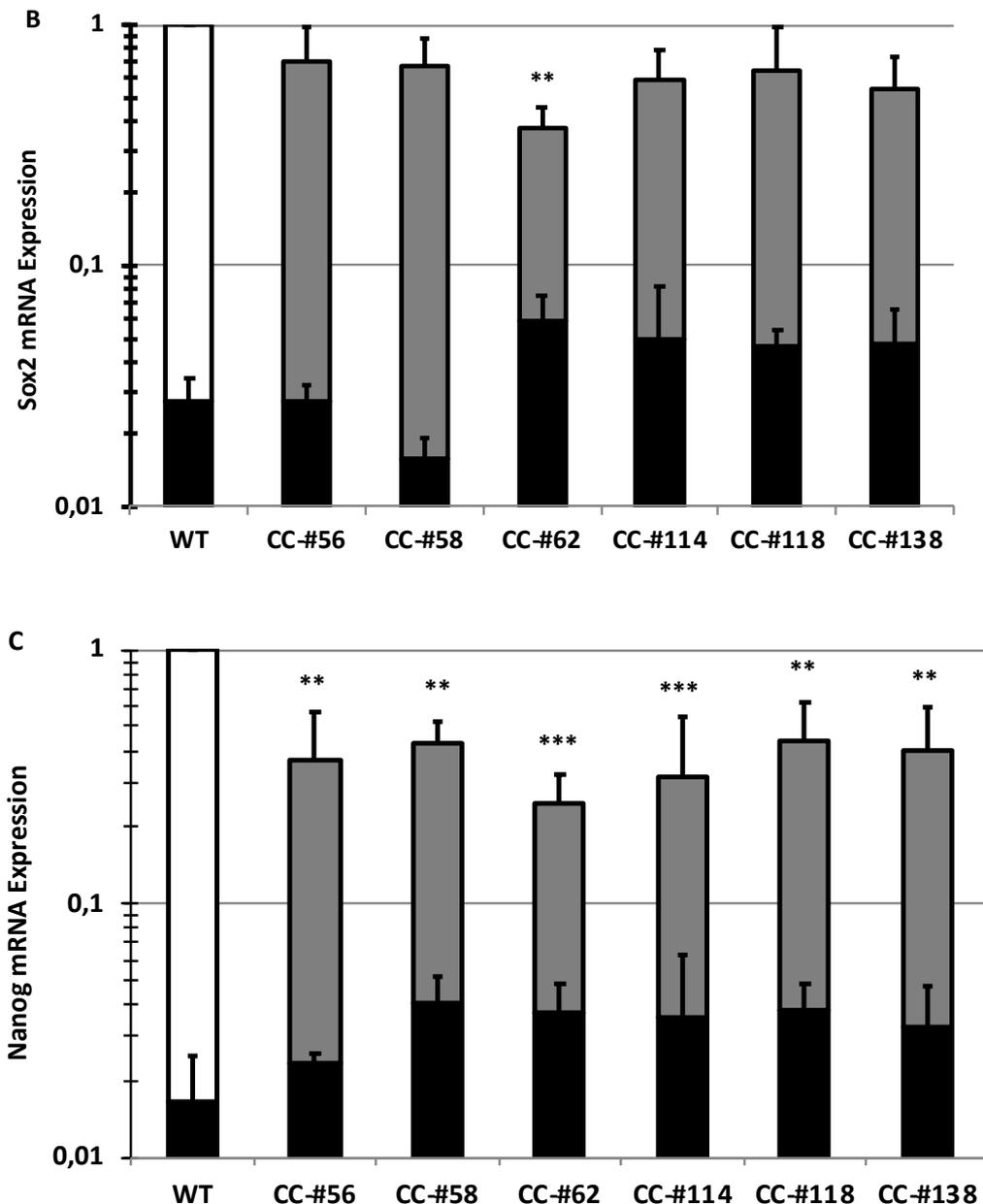


Abbildung 4. 15: EpCAM KOs zeigen im Vergleich zum WT eine verminderte Expression der Pluripotenzfaktoren Oct 4, Sox2, Nanog unter Pluripotenzbedingungen und eine erhöhte Expression bei Differenzierung .

Die Zellen wurden zunächst unter LIF-Zusatz und für 5 Tage unter LIF-Entzug im Monolayer kultiviert. Zu Beginn und zum Ende des Experiments wurden Zellen geerntet und die mRNA extrahiert. Mit qPCR wurde die Expression von (A) Oct4, (B) Sox2 und (C) Nanog analysiert. Die weiße Säule (WT) und die grauen Säulen (Kos) zeigen die Genexpression an Tag 0, die schwarzen Säulen die Expression an Tag 5 der jeweiligen Zelllinie. Es wurde die Signifikanz der Veränderung der Expression des Pluripotenzmarkers im EpCAM-KO gegen die Expression des Gens im WT am entsprechenden Tag berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

An Tag 0 war die Oct-4-Expression in CC-#56 um 26% geringer, in CC-#58 um 48% geringer, in CC-#62 um 39% geringer, in CC-#114 um 38% geringer, in CC-#118 um 33% geringer, in CC-#138 um 20% geringer als im WT. Die Nanog Expression war in CC-#56 um 63% niedriger, in CC-#58 um 57% niedriger, in CC-#62 um 71% niedriger, in CC-#114 um 68% niedriger, in CC-#118 um 57% niedriger, in CC-#138 um 60% niedriger als im WT. Die Sox2 Expression war in CC-#56 um 30% geringer, in CC-#58 um 33% geringer, in CC-#62 um 63% geringer, in CC-#114 um 41% geringer, in CC-#118 um 36% geringer, in CC-#138 um 46% geringer als im WT.

Nach 5 Tagen spontaner Differenzierung war die Oct-4-Expression im WT um 99% gesunken, in CC-#56 um 97% niedriger, in CC-#58 um 96% niedriger, in CC-#62 um 96% niedriger, in CC-#114 um 89% niedriger, in CC-#118 um 95% niedriger, in CC-#138 um 94% niedriger als im WT an Tag 0. Die Nanog-Expression zeigte sich im WT um 98% verringert, in CC-#56 um 98% niedriger, in CC-#58 um 96% niedriger, in CC-#62 um 96% niedriger, in CC-#114 um 96% niedriger, in CC-#118 um 96% niedriger, in CC-#138 um 97% niedriger als im WT an Tag 0. Die Sox2 Expression sank im WT um 97% niedriger als an Tag 0. In CC-#56 war die Expression um 97% niedriger, in CC-#58 um 98% niedriger, in CC-#62 um 94% niedriger, in CC-#114 um 95% niedriger, in CC-#118 um 95% niedriger, in CC-#138 um 95% niedriger als WT an Tag 0.

4.4. Generierung von EpCAM/ERas Doppelknockouts (DKOs)

Die exogene Überexpression von EpCAM hemmt die kardiomyozytäre Differenzierung und führt zu einer verminderten Anzahl kontrahierender EBs nach spontaner Differenzierung in 3D (Sarrach et al., 2018). Allerdings hat nur das EpCAM-Protein in voller Länge diesen Effekt. Die Überexpression der Spaltprodukte von EpCAM (*i.e.* EpCAM-CTF und EpICD) hat in dieser Hinsicht keine Wirkung. Daher wurde nach anderen möglichen intrazellulären Mediatoren von EpCAM gesucht. Die Kombination von SILAC-Markierung, EpCAM Immunpräzipitation und massenspektrometrischen Analysen ergab, dass ERas, ein kleines G-Protein, an EpCAM bindet. Wie in der Einleitung beschrieben kann ERAs den PI3K/Akt-Signalweg anstoßen. EpCAM könnte mit ERas zu Beginn dieses Signalweges interagieren (Abbildung 4.16) (Takahashi et al., 2005). Bei dem gemischten Erscheinungsbild der EpCAM KO Klone -4 von 6 zeigen eine eingeschränkte kardiomyozytäre Differenzierung, 2 Klone verhalten sich wie Wildtyp- stellte sich nun die Frage, ob es möglich ist, durch den Entzug eines potentiellen Interaktionspartners die Differenzierungsfähigkeit zu hemmen. Das galt vor allem in Klonen, die durch den alleinigen Verlust von EpCAM nicht eingeschränkt schienen. Eine Ursache dafür könnte die kompensatorische (Über)-Expression anderer Proteine sein, wie es als Folge von Gen-Knockouts bereits beschrieben wurde (Rossi et al., 2015). Deshalb wurden Doppelknockout ESC E14TG2 α ESC Zelllinien generiert, welche sowohl EpCAM als auch dessen Bindungspartner ERas nicht mehr exprimierten. Im folgenden Teil der Arbeit wird die Herstellung dieser EpCAM/ERas-DKO Klone mit der CRISPR Cas Technik beschrieben.

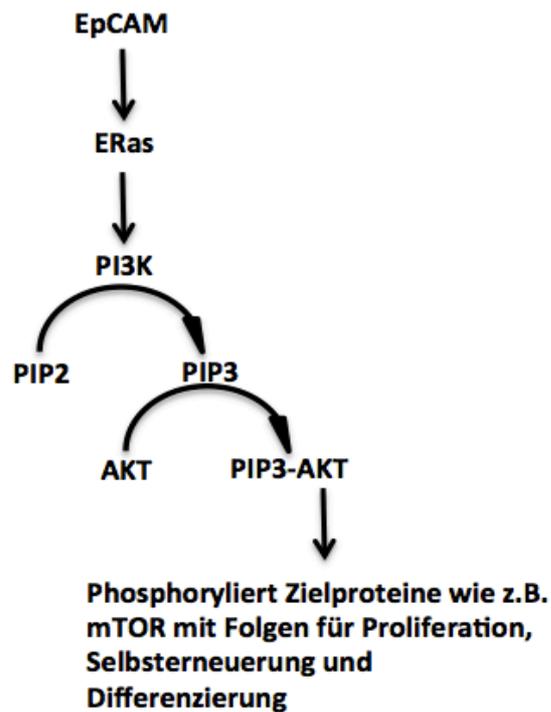


Abbildung 4. 16: Schema des hypothetischen EpCAM/ERas/Akt-Signalweges. Nach Aktivierung durch ERas phosphoryliert die PI3K Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphat(PIP2) Lipidreste zu Phosphatidylinositol (3,4,5,-)Triphosphat (PIP3). PIP3 kann Proteine wie Akt binden, die eine PH-Domäne tragen (pleckstrin homology domain). Nach Rekrutierung an die Zellmembran wird Akt phosphoryliert und aktiviert (Hemmings & Restuccia, 2015; Takahashi et al., 2005)

Grundsätzlich gibt es drei Arten von Genmutationen. Die Insertion, die Deletion und die Substitution. Letztere führt nicht zur Verschiebung des Leserasters (sog. Missense Mutation). Stattdessen kann eine andere Aminosäure oder ein Stop-Codon entstehen. Bei der Insertion oder Deletion der proteinkodierenden Region kommt es – sofern die Anzahl der deletierten Basen nicht durch 3 teilbar ist - zu einer Leserasterverschiebung. Entsteht dadurch oder durch eine einfache Substitution ein neues Stop-Codon, dann kann kein funktionelles Genprodukt gebildet werden (sog. Nonsense-Mutation) (Passarge, Taschenatlas der Genetik, 2004, Georg Thieme Verlag).

Die EpCAM-defizienten Zelllinien CC-#56, CC-#58 und CC-#118 wurden mit Plasmiden transient transfiziert, welche die Cas9 Endonuklease und ERas-spezifische guide RNAs enthielten. Die Target-Sequenzen befanden sich im Exon 2 des ERas Gens, welches für das ERas Protein kodiert. Zudem enthielt das Plasmid ein GFP, das von der Cas9 Nuklease durch ein 2A Peptid getrennt ist. Dieses Peptid ermöglicht die Herstellung zweier Proteine (Cas9 und GFP) aus einem Transkript, da es sich selbst während der Translation spaltet (Y. Wang, Wang, Wang, Zhao, & Xia, 2015).

Durch das GFP konnten transfizierte Zellen mittels FACS in Einzelzellablagen sortiert werden. Nachdem aus einzelnen Zellen Kolonien herangewachsen waren, wurde überprüft, welche Zellkolonien das ERas Protein nicht mehr bildeten und Mutationen der DNA im Bereich der guide-RNA Sequenzen bestimmt.

Zuerst wurden Western Blots zur Detektion von ERas in den potenziell mutierten E14TG2 α ESC Klonen durchgeführt (Abbildung 4.17). Dabei konnte in den meisten Zelllinien kein ERas Protein mehr nachgewiesen werden.

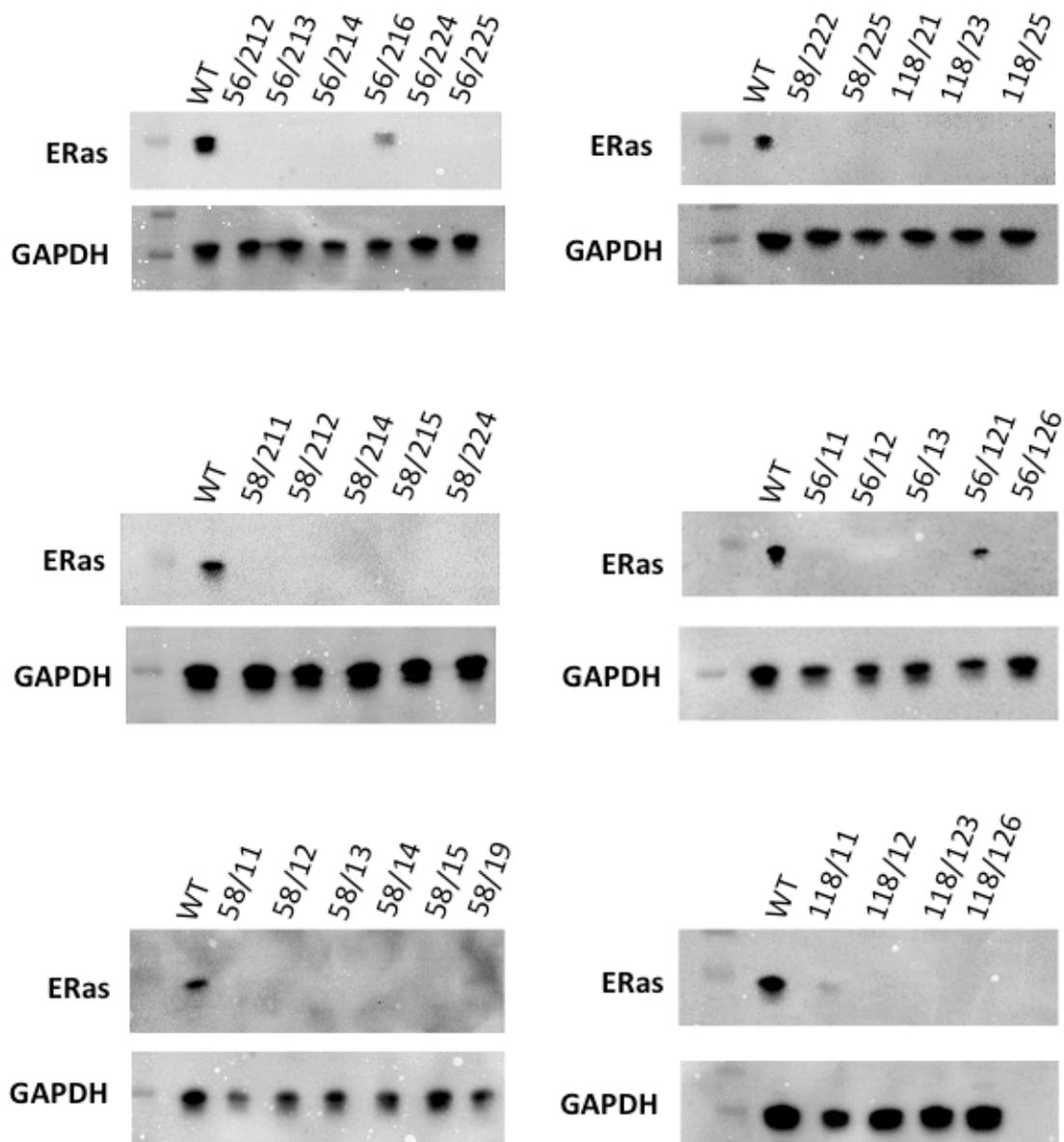


Abbildung 4. 17: CRISPR-Cas9-vermittelte Mutation und Knockout von ERas in ESC. Aus den EpCAM/ERas-DKO-Zelllinien wurden Proteinlysate hergestellt und anschließend Western Blots mit ERas-Primärantikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. ERas hat eine Größe von 24kDa und wird bei ca. 29kDa detektiert, während GAPDH eine Größe von 35,8kDa besitzt und bei 39kDa detektiert wird.

Nachdem auf Protein-Ebene festgestellt wurde, welche Klone kein ERas exprimieren, wurde mit einem Annealing-Experiment auf DNA-Ebene nachgeprüft, welche Klone eine Mutation im *ERAS* Gen tragen. Dazu wurde die genomische DNA isoliert und die ERas-Sequenz durch nested PCR amplifiziert. Dann wurde mit einer Elektrophorese in 1,5%igen Agarosegel überprüft, ob nur eine einzelne Bande sichtbar ist, was auf ein spezifisches PCR-Produkt hinweist. Anschließend wurden die PCR-Produkte denaturiert, um sie dann in einem Reagenzgefäß mit sich selbst und in einem zweiten Ansatz mit wildtypischer DNA zu renaturieren. Die renaturierten Nukleinsäuren wurden anschließend in einer 8% PAGE aufgetrennt.

Nicht durch fremde DNA kontaminierte Proben bildeten bei Annealing mit sich selbst eine einzige Bande (siehe Abbildung 4.18). Bei Annealing von ERas mutierter DNA und wildtypischer DNA entstanden aufgrund unterschiedlicher Basensequenzen, Doppelstränge mit unterschiedlicher Sekundärstruktur, die bei der Gelelektrophorese langsamer durch das Gel wandern. In diesem Falle waren im Gel mehrere Banden zu erkennen. Dabei entspricht eine Bande den gepaarten DKO-WT-Einzelsträngen und jeweils eine Bande den homolog gepaarten WT-WT und DKO-DKO-Einzelsträngen.

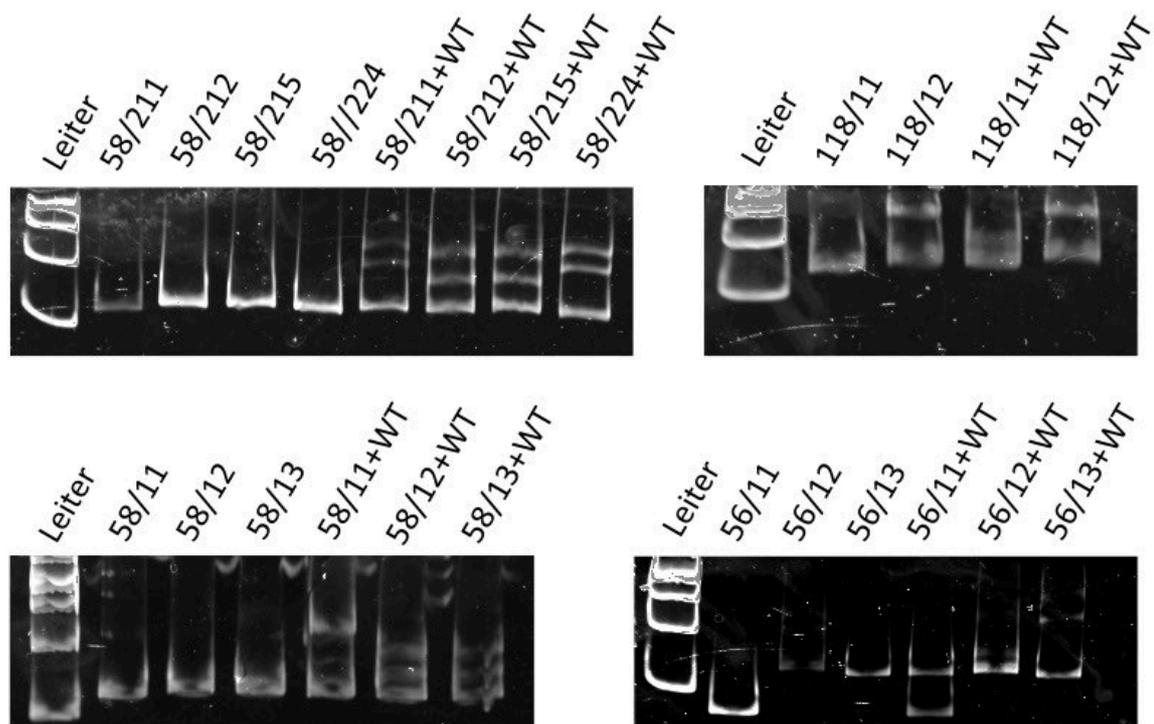


Abbildung 4. 18: Nachweis der mutierten ERas DNA durch Annealing mit wildtypischer DNA. Nach Denaturierung der mutierten ERas DNA wurde diese mit sich selbst und mit WT-

DNA renaturiert. Im linken Teil der Abbildungen sind die Ergebnisse der Elektrophorese nach Renaturierung der mutierten ERas-Einzelstränge mit sich selbst zu sehen. Im rechten Teil der Abbildungen ist die Elektrophorese nach Renaturierung der jeweiligen mutierten ERas-Einzelstränge mit wildtypischen ERas-Einzelsträngen zu sehen.

Zuletzt sollte durch Sequenzierung die genauen Mutationen im ERAS Gen ermittelt werden. Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von GATC-biotech durchgeführt. Wenn die Cas 9 Nuklease einen Doppelstrangbruch (DSB) induziert, hat die Zelle zwei Reparaturmöglichkeiten: die homologe Rekombinationsreparatur (HDR, homology-directed repair) und die nicht-homologe Verbindung von DNA-Enden (NHEJ, Non homologous end-joining). Eine Reparatur von DSB ist notwendig, da Zellen mit DSB den G1-Kontrollpunkt im Zellzyklus nicht passieren könnten. Der Zellzyklus kann in diesen Fällen auch verlangsamt werden, um der Zelle ausreichend Zeit zu geben ihren DNA-Schaden zu reparieren oder, sollte eine Reparatur nicht möglich sein, Apoptose zu induzieren. Für die homologe Rekombinationsreparatur wird die Schwesterchromatide als Matrize benötigt.



Abbildung 4. 19: Die homologe Rekombination (McGrew & Knight, 2003)

Da die verwendeten ESC aus einer männlichen Blastozyste stammen und das ERas-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, lag in den verwendeten Zellen nur ein ERas Allel vor, welches für einen homozygoten Knockout mutiert werden muss. Aufgrund des Fehlens eines zweiten Allels stand zudem nur eine nicht-homologe Verbindung der DNA Enden als Reparaturmechanismus für die Zellen nach Mutation des ERas-Allels zur Verfügung. Dabei werden die freien DNA-Enden von den heterodimeren Proteinkomplexen Ku70 und Ku80 erkannt. Diese Komplexe führen die DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PKs) an die Bruchstelle heran, wo sie einen weiteren Teil des Komplexes, die Endonuklease Artemis phosphorylieren. Diese spaltet die freien Enden versetzt, so dass die gegenüberliegenden Enden überhängend sind. DNA-Polymerasen und Ligasen können die Bruchstelle dann verschließen. Diese

Reparaturmethode wird ohne Matrize bewerkstelligt und ist deshalb im Vergleich zu den anderen Reparaturmethoden fehlerhaft.

Mit Hilfe der Sequenzierungsergebnisse konnte die Zahl deletierter Basen durch einen Vergleich mit der Wildtypsequenz ermittelt werden. Außerdem konnte durch *in silico* Translation der Sequenz die Länge der Aminosäure bis zum Stop-Codon berechnet werden. Die Tabelle 21 zeigt die Sequenzierungsergebnisse.

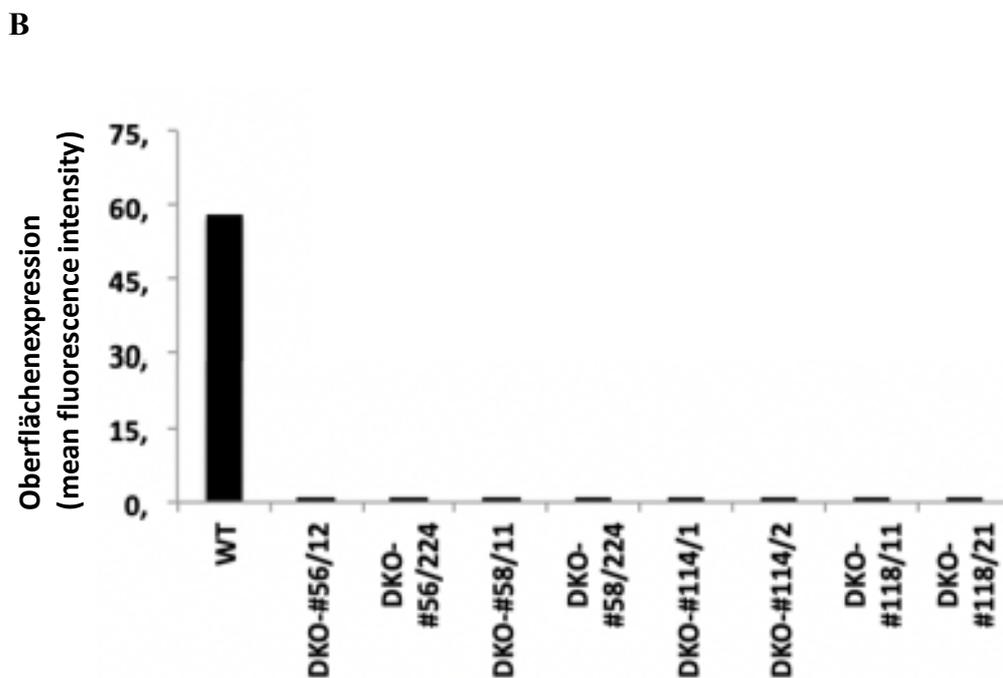
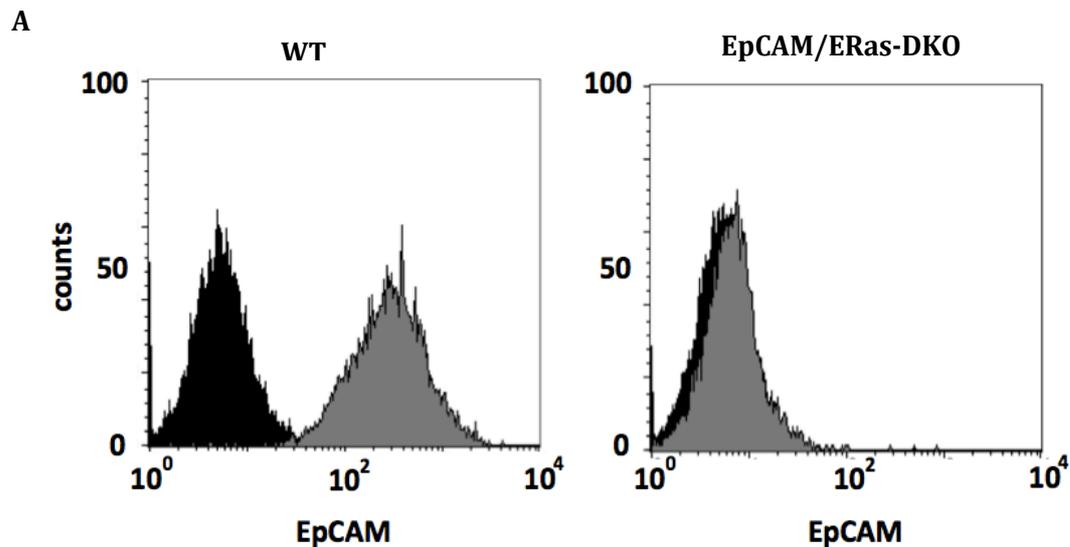
Die Translationsprodukte sind durch das verfrühte Stop Codon kürzer als das wildtypische ERas Protein.

Tabelle 21: Anzahl deletierter Basenpaare und resultierende ERas Proteine nach CRISPR-Cas9 Knockout. Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten EpCAM/ERas DKO, die Anzahl der durch die CRISPR-Cas-9-Mutation deletierten Basen und die Länge des entstehenden ERas-Genprodukts.

	Bp deleted	aa
WT	-	227
56/12	2	52
56/224	1	87
58/11	6	50
58/224	11	83
114/1 (D2)		
114/2 (D5)		
118/11	2	81
118/21	6	84

Das ERas-Protein in voller Länge besteht aus 227 Aminosäuren. In der Zelllinie 56/12 kam es durch die Deletion von zwei Basenpaaren zu einer Verkürzung des Proteins auf eine theoretische Größe von 52 Aminosäuren. Das ERas-Protein in der Zelllinie 56/224 hatte nach Deletion von einem Basenpaar eine Länge von 87 Aminosäuren, in der Zelllinie 58/11 nach Deletion von 6 Basenpaaren eine Länge von 50 Aminosäuren, in der Zelllinie 58/224 nach Deletion von 11 Basenpaaren 83 Aminosäuren, in der Zelllinie 118/11 nach Deletion von zwei Basenpaaren 81 Aminosäuren, in der Zelllinie 118/21 nach Deletion von 6 Basenpaaren 84 Aminosäuren. Die EpCAM/ERas DKO-Klone

114/1 und 114/2 wurden bereits in einer anderen Arbeit beschrieben (Sarrach et al. 2018). Zuletzt wurden die verwendeten EpCAM/ERas-DKO erneut auf ihre EpCAM und ERas-Expression überprüft. Da EpCAM ein Transmembranprotein wurde es mit Durchflusszytometrie nachgewiesen (Abbildung 4.20 A und B). ERas wurde als intrazelluläres Protein durch Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4.20 C). Auch auf Proteinebene konnte in den EpCAM/ERas-DKOs keine ERas-Expression mehr nach-



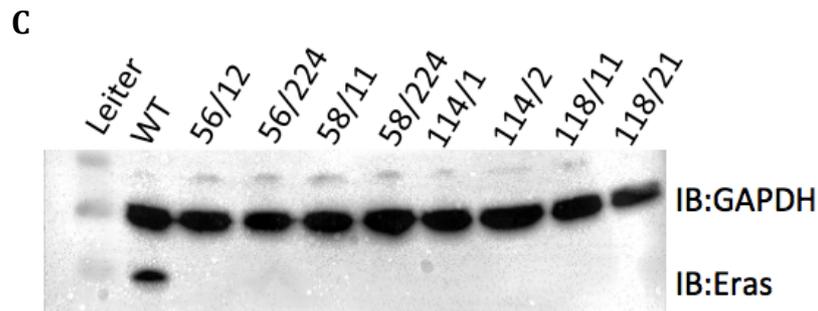


Abbildung 4. 20: Doppelknockout von EpCAM und ERas in ESC Linien. (A) Durchflusszytometrie von WT und dem DKO-#58/11 im Vergleich (B) Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Wildtyp und EpCAM/ERas-KOs nach EpCAM-Färbung. Für jede Zelllinie ergab ist der Quotient der EpCAM-Färbung und der Kontroll-Färbung dargestellt. (C) Western Blot der EpCAM /ERas-DKOs mit ERas-Primärantikörpern, als Ladungskontrolle diente GAPDH .

gewiesen werden. Um eine allgemeine Einschätzung der Differenzierungsfähigkeit der EpCAM/ERas-DKOs vornehmen zu können, wurden diese 10 Tage lang spontan in Hanging Drops differenziert und anschließend der Anteil kontrahierender EBs bestimmt (Abbildung 4.21).

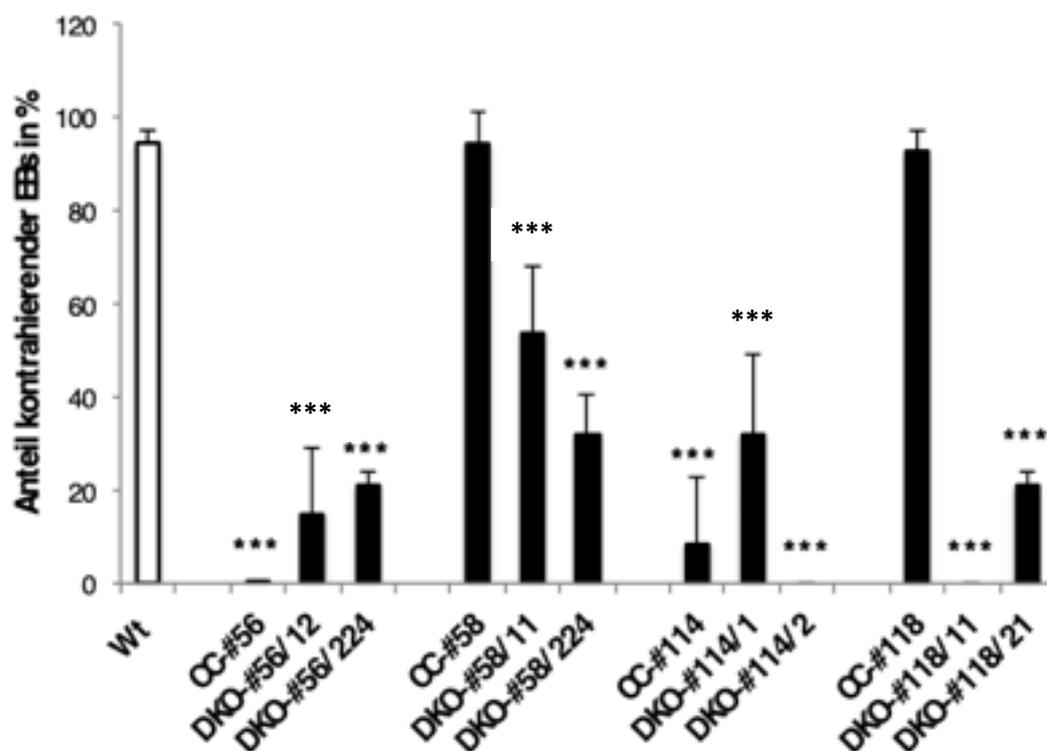


Abbildung 4. 21: Untersuchung der kardiomyozytären Differenzierung in EpCAM/ERas-DKOs. WT und EpCAM/ERas-DKOs wurden 10 Tage lang in EBs spontan differenziert. Das Diagramm zeigt für jede Zelllinie den Anteil der kontrahierenden EBs. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Veränderung des kontrahierenden Anteils der EBs in den einzelnen KO-

Zelllinien an Tag 10 im Vergleich zur Anzahl kontrahierender wildtypischer EBs berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Der Anteil kontrahierender EBs im WT betrug 94%, in CC-#56 0,17%, in DKO-#56/12 15%, in DKO-#56/224 21%, in CC-#58 94,37%, in DKO-#58/11 54%, in DKO-#58/224 32%, in CC-#114 8,36%, in DKO-#114/1 32% in DKO-#114/2 0%, in CC-#118 92,68%, in DKO-#118/11 0%, in DKO-#118/21 21%.

Eine Reduktion der Bildung kontrahierender Kardiomyozyten war in den EpCAM-Kos zu beobachten, in denen der alleinige EpCAM-Verlust keinen Einfluss auf die kardiomyozytäre Differenzierung hatte. In DKO-#58/11 und DKO-#58/224 fand sich im Vergleich zu CC-#58 eine Reduktion des Anteils kontrahierender EBs um 42,72 bzw. 66,06%. In DKO-#118/11 und DKO-#118/21 zeigte sich im Vergleich zu CC-#118 eine Reduktion des Anteils kontrahierender EBs um 92,68% bzw. 77,34%.

4.5. Auswirkung des EpCAM-Verlustes auf die Proliferation von ESC

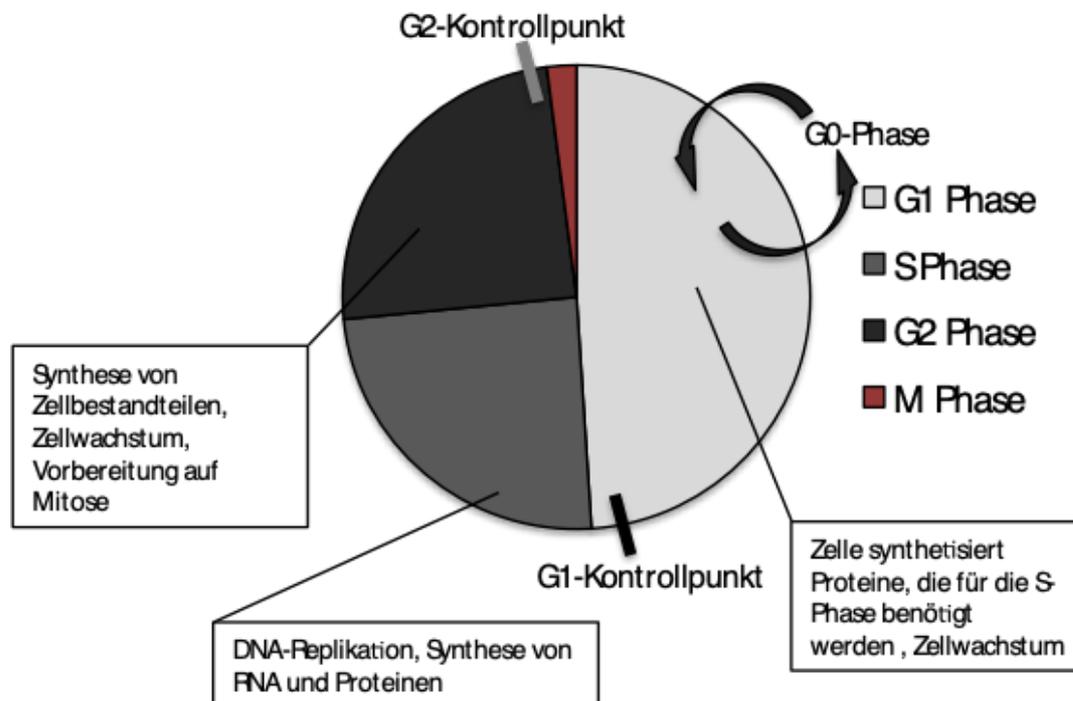


Abbildung 4. 22: Der Zellzyklus. Um ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen zu verhindern, sind Kontrollpunkte in den Zellzyklus eingebaut. Am G1 Kontrollpunkt wird die Größe der Zelle kontrolliert, die Integrität der DNA und die Verfügbarkeit von Substraten für die Replikation der DNA und die Synthese zellulärer Proteine. Am G2 Kontrollpunkt wird erneut die Größe der Zelle und die Fehlerfreiheit und Vollständigkeit der DNA-Replikation überprüft (Barnum & O'Connell, 2015).

Ob Stammzellen und Tumorzellen den Zellzyklus durchlaufen, wird durch ein Zusammenspiel von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen reguliert (Pardal, Molofsky, He, & Morrison, 2005). Während Protoonkogene die Zellen zur Proliferation veranlassen, wird diese, um eine neoplastische Proliferation zu verhindern, durch die Wirkung von Tumorsuppressorgenen gebremst. Im Verlauf der Entwicklung ändert sich das Gleichgewicht. Während adulte Stammzellen meistens quieszent sind (Cheng et al., 2000), vermehren sich embryonale Stammzellen schnell u.a. durch den funktionellen Einfluss von Protoonkogenen. Manche dieser Protoonkogene wie z.B. c-Myc können von EpCAM reguliert werden (Maaser & Borlak, 2008; Munz et al., 2009; Munz et al., 2004). Huang et al. (2011) zeigten außerdem, dass EpCAM über dessen intrazelluläre Domäne EpICD die Expression von p53 und dem nachgeschalteten p21 reduzieren kann.

Auch in murinen ES Zellen wird die Proliferation durch Knockdown von EpCAM reduziert (Gonzalez et al., 2009).

4.5.1. Untersuchung der Proliferation durch Zellzählung

Für den folgenden Teil der Arbeit wurde die Proliferation der oben beschriebenen EpCAM-KO-Zelllinien untersucht. Zur Bestimmung der Zellzahl im Hämocytometer wurden 10.000 Zellen/well in 6 well Platten ausgesät. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden die Zellen in Duplikaten ausgesät und das arithmetische Mittel beider Ergebnisse berechnet. Die gezeigten Grafen sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Die Experimente wurden unter Pluripotenzbedingungen (+Lif) und Differenzierungsbedingungen (-Lif) durchgeführt. Die Proliferation der Zellen wurde nicht nur von der EpCAM-Expression beeinflusst, sondern auch von der Anwesenheit von LIF, einem IL-6-Typ Zytokin. Ohne LIF-Zusatz proliferieren die Zellen langsamer (Abbildung 4.23) (Gonzalez et al., 2009).

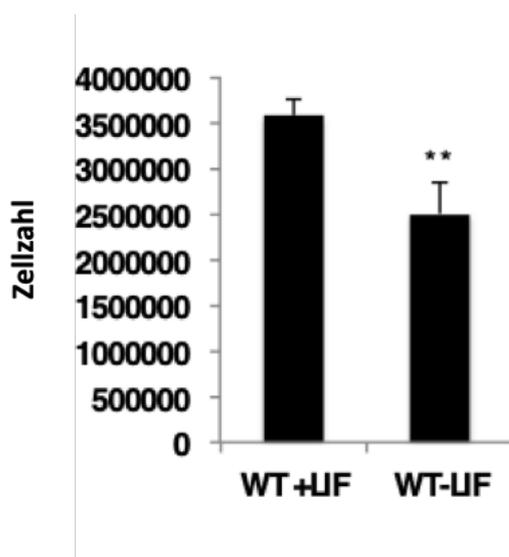


Abbildung 4. 23: Murine embryonale Stammzellen die unter LIF kultiviert wurden, proliferierten schneller als nach LIF-Entzug. An Tag 0 wurden jeweils 10.000 Zellen ausgesät. Eine Gruppe wurde unter LIF kultiviert, die andere unter LIF-Entzug. An Tag 5 wurde die absolute Zellzahl im Hämocytometer ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen t-test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Zunächst wurden nur die wildtypischen Zellen gezählt, die 5 Tage mit und ohne LIF kultiviert wurden. Die Zellen die mit LIF kultiviert wurden erreichten eine Zellzahl von $3,6 \times 10^6$, die Zellen, welche ohne LIF kultiviert wurden erreichten nur eine Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ (Abbildung 4.23).

Anschließend wurden zusätzlich die EpCAM KOs mit initialer Zellzahl von 10.000 Zellen/well ausplattiert und täglich die Zellzahl bestimmt (Abbildungen 4.24 und 4.25).

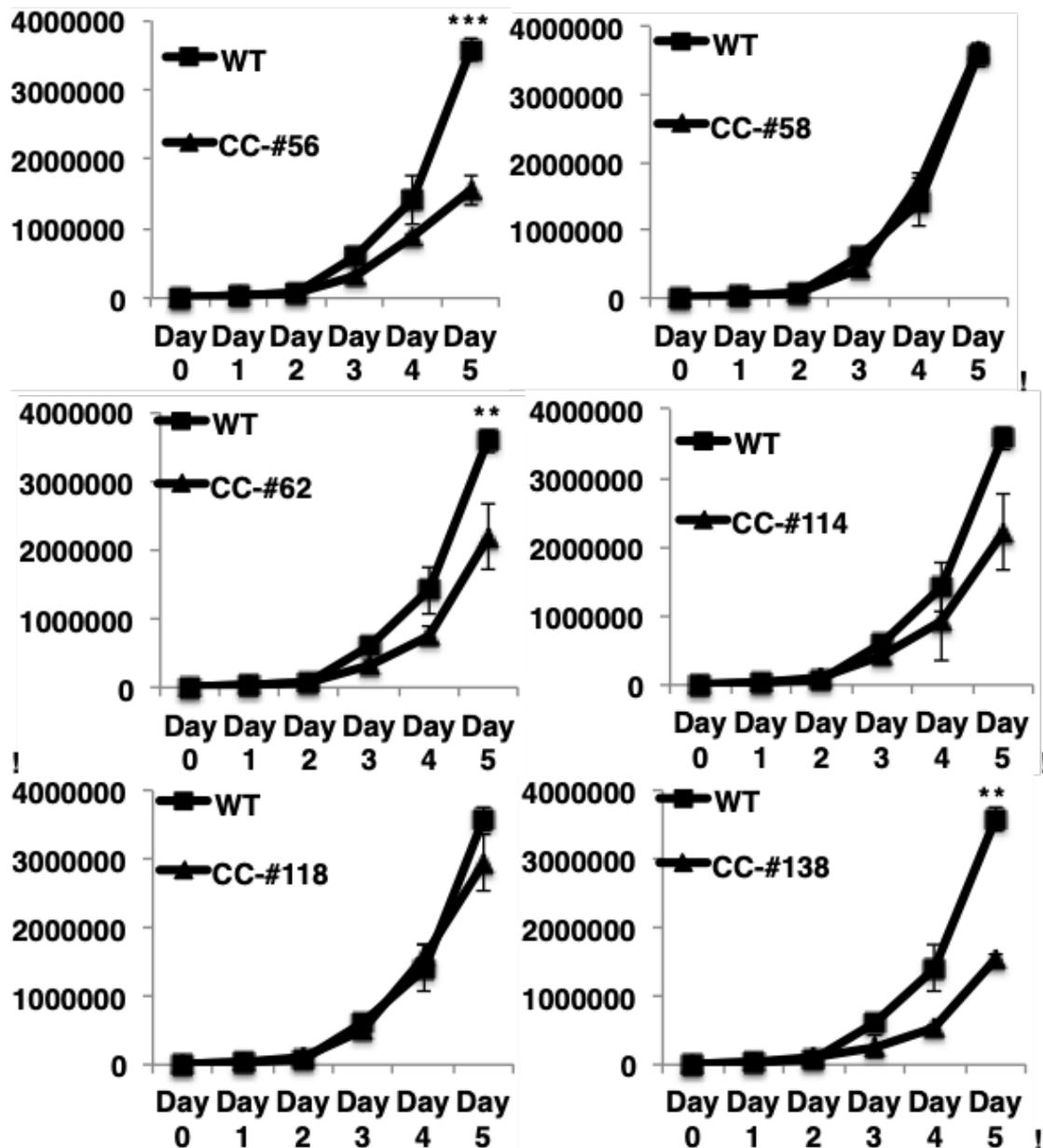


Abbildung 4. 24: Unter Pluripotenzbedingungen zeigt sich in vier von sechs Klonen eine signifikant ($p \leq 0,05$) verminderte Zellteilungsrate. . Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz des Unterschieds der absoluten Zellzahlen der EpCAM KOs gegen die Zellzahl des WT am selben Tag berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen t-test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Unter Pluripotenzbedingungen erreichten WT E14TG2 α ESC Zellen nach 5 Tagen eine Zellzahl von $3,6 \times 10^6$, CC-#56 erreichte eine Zellzahl von $1,6 \times 10^6$, CC-#58 erreichte eine Zellzahl von $3,6 \times 10^6$, CC-#62 erreichte eine Zellzahl von $2,2 \times 10^6$, CC-#114

erreichte eine Zellzahl von $2,2 \times 10^6$, CC-#118 erreichte eine Zellzahl von 3×10^6 , CC-#138 erreichte eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$

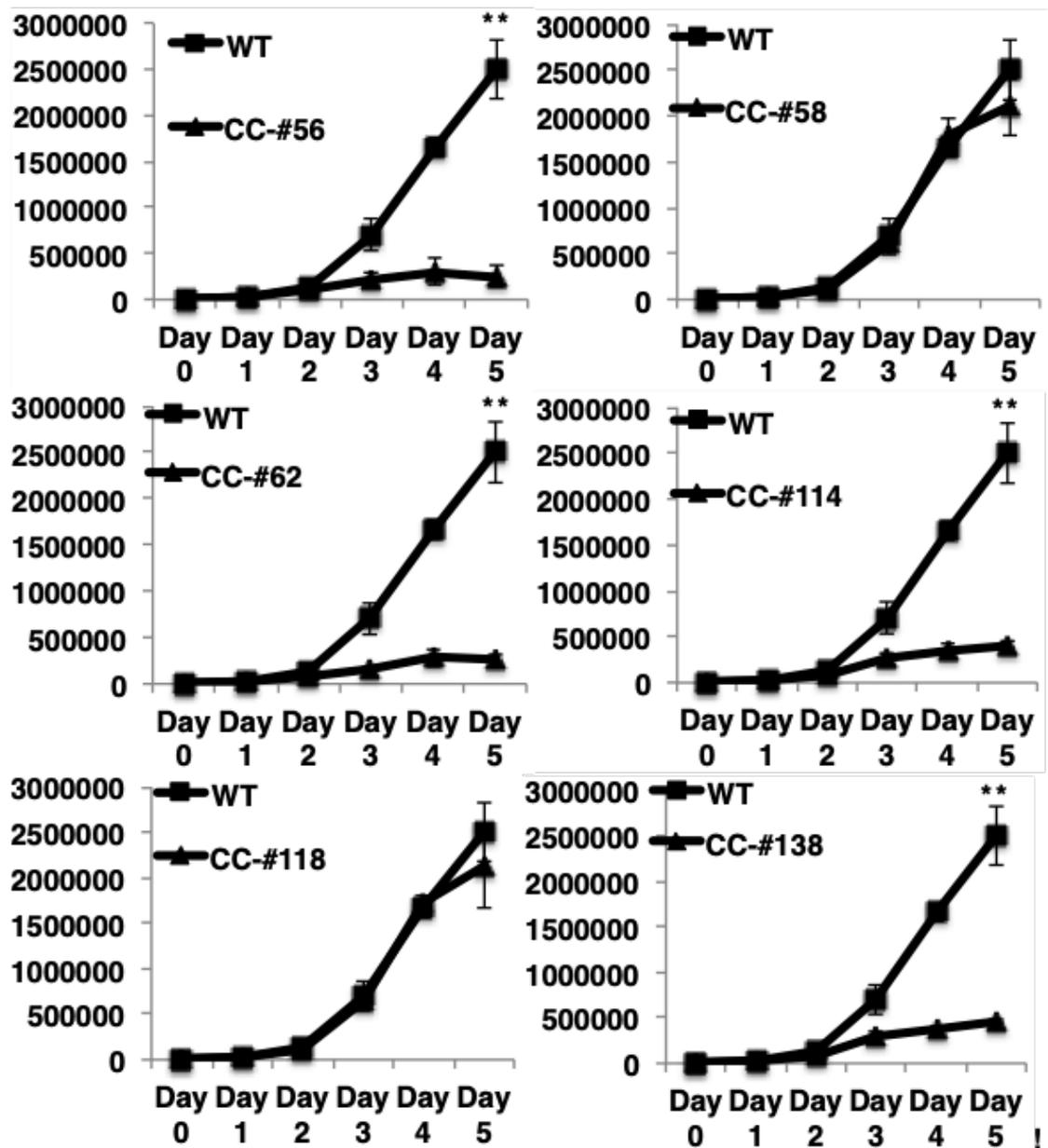


Abbildung 4. 25: Auch unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich eine verminderte Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Veränderung der Zellzahlen der EpCAM KOs gegen die Zellzahl des WT am selben Tag berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen t-test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

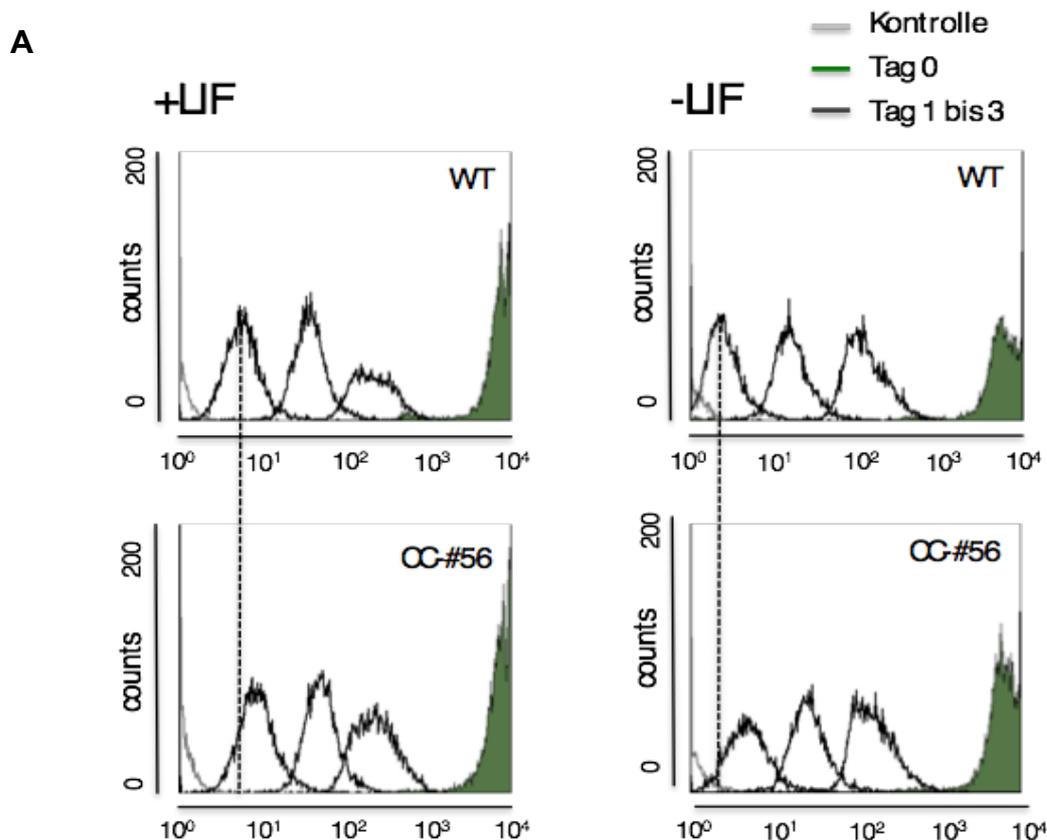
Nach LIF Entzug erreichten WT E14TG2 α ESC Zellen nach 5 Tagen Proliferation eine Zellzahl von $2,5 \times 10^6$, CC-#56 erreichte eine Zellzahl von $0,25 \times 10^6$, CC-#58 erreichte eine Zellzahl von $2,1 \times 10^6$, CC-#62 erreichte eine Zellzahl von $0,25 \times 10^6$, CC-#114

erreichte eine Zellzahl von $0,4 \times 10^6$, CC-#118 erreichte eine Zellzahl von $2,1 \times 10^6$, CC-#138 erreichte eine Zellzahl von $0,47 \times 10^6$.

Die verwendeten EpCAM KO E14TG2 α ESC Zelllinien zeigten also eine im Vergleich zu wildtypischen Zellen verminderte Zellteilungsrate. Dieser Unterschied war, mit Ausnahme der Klone #58 und #118, in allen analysierten EpCAM-defizienten ESC Linien signifikant. Die Wachstumskurven bestätigen außerdem, dass in den 5 Tagen die Zellen unter LIF stärker proliferieren als die Zellen ohne LIF (Abbildungen 4.24 und 4.25). Zudem ist an den Wachstumskurven der EpCAM-defizienten Zelllinien zu sehen, dass 4 von 6 Linien unter Differenzierungsbedingungen (-LIF) bereits nach 3-4 Tagen ein Plateau erreichen (Abbildung 4.25).

4.5.2. Untersuchung der Proliferation mittels CFSE Färbung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Zellzählung wurden die Zellen als Nächstes mit CFSE gefärbt. Wie in Kapitel 3 beschrieben, ist es möglich durch den fortschreitenden Fluoreszenzverlust von CFSE auf die Proliferation markierter Zellen zu schließen.



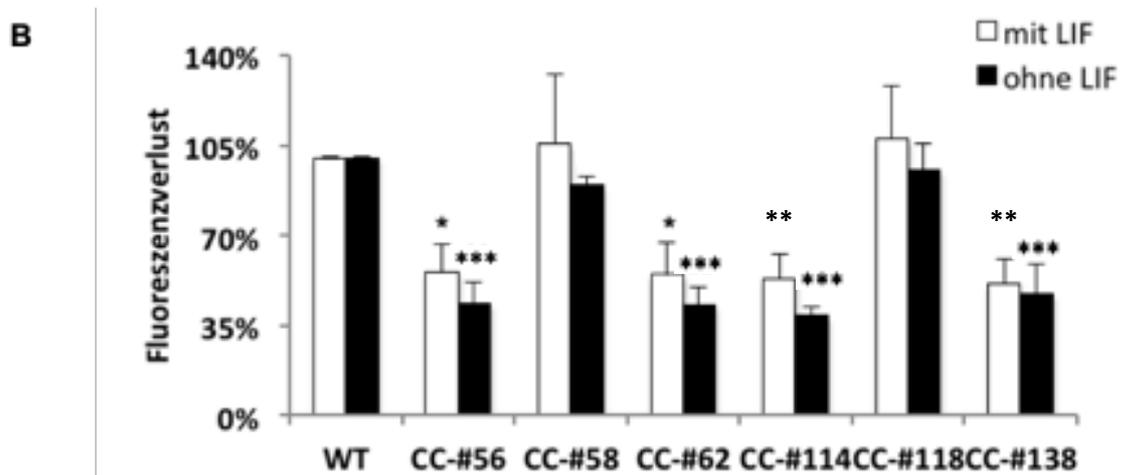


Abbildung 4. 26: Nachweis der Proliferation mittels CFSE-Färbung. (A) zeigt die proliferationsabhängige Fluoreszenzabnahme der Zellen anhand von zwei Beispielen: Wildtypische ESC und EpCAM Knockout Klon #56). Die linke Spalte zeigt den Verlauf der Fluoreszenzabnahme (von rechts nach links) von Wildtyp und des EpCAM-KO-Klons #56 unter +LIF Bedingungen. Die rechte Spalte das zeigt gleiche unter –LIF Bedingungen. Die Messung beginnt direkt nach dem Färbeprozess an Tag 0 (grün gefüllte Diagramme) und geht über Tag 1 bis 3 (schwarze Linie). Die Kontrollen sind hier ungefärbte Zellen. Die graue Linie zeigt die Eigenfluoreszenz der Zellen. (B) Die Balken des Säulendiagramm zeigen jeweils den Quotienten der (Fluoreszenz einer Zelllinie an Tag 0 / Tag3): (die Fluoreszenz der Wildtypzellen an Tag 0 / Tag 3. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Fluoreszenzabnahme in den EpCAM KOs an Tag3 im Vergleich zur Fluoreszenzabnahme im WT berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Im Vergleich zu wildtypischen Zellen E14TG2 α ESC Zellen zeigte sich nach 5 Tagen unter Pluripotenzbedingungen ein um 44,2% geringerer Fluoreszenzverlust in CC-#56, ein um 5,8% erhöhter Fluoreszenzverlust in CC-#58, ein um 45,2% geringerer Fluoreszenzverlust in CC-#62, ein um 46,8% geringerer Fluoreszenzverlust in CC-#114, ein um 7,5 % erhöhter Fluoreszenzverlust in CC-#118, ein um 49% verminderter Fluoreszenzverlust in CC-#138. Unter Differenzierungsbedingungen war der Fluoreszenzverlust in CC-#56 um 56,4%, in CC-#58 um 10,4%, in CC-#62 um 57,1%, in CC-#114 um 61,2%, in CC-#118 um 4,5%, in CC-#138 um 52,8% vermindert im Vergleich zum WT.

4.5.3. Quantifizierung der EB-Größe

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich die unterschiedliche Proliferationsfähigkeit auch in der Größe der EBs niederschlägt. Dazu wurden EBs nach 5 Tagen spontaner Differenzierung ausgemessen. Wildtypische EBs erreichten nach 5 Tagen spontaner Differenzierung eine durchschnittliche Größe von 466 μm (Abbildung

4.27). Im selben Zeitraum generierte der E14TG2 α ESC Klon CC-#56 EBs mit einer Größe von 321 μ m, CC-#58 EBs mit einer Größe von 448 μ m, CC-#62 EBs mit einer Größe von 294 μ m, CC-#114 EBs mit einer Größe von 324 μ m, CC-#118 EBs mit einer Größe von 467 μ m, CC-#138 EBs mit einer Größe von 321 μ m. Im Einklang mit den Ergebnissen der Zellzählung und CFSE-Färbung bildeten unter den EpCAM-KOs die langsamer proliferierenden Zelllinien kleinere EBs als schneller proliferierende Zelllinien (Abbildung 4.26).

Auf die Morphologie der EBs wird genauer in Kapitel 4.6 eingegangen.

Da die Zelllinien, die kleinere EBs bildeten auch seltener kontrahierende Kardiomyozyten enthielten, stellte sich die Frage, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Größe und der Differenzierung der EBs gibt. Hwang *et al.* (2009) ist es gelungen durch die Verwendung speziell angefertigter Microwells die EB-Größe mechanisch genau festzulegen. Dabei stellte sich heraus, dass mit der Größe des Microwells und damit des EBs die Differenzierung der Zellen in den EBs gesteuert werden konnte. Größere EBs (>450 μ m) bildeten verstärkt Kardiomyozyten. Kleinere EBs (<150 μ m) verstärkt Endothelzellen. Außerdem zeigte sich eine von der EB Größe abhängige Expression von Proteinen bestimmter nicht-kanonischer WNT-Signalwege. Dieselben Proteine der WNT Signalwege zeigen auch während des normalen Wachstums der EBs eine dynamische Expression. Anfangs wird WNT5a exprimiert, das im Verlauf der Größenzunahme herunterreguliert wird, während die WNT11 Expression zunimmt. Die Herunterregulation von WNT5a scheint dabei besonders wichtig zu sein, um es mesodermalen Zellen zu erlauben zu Kardiomyozyten zu differenzieren. Auch in unserem Labor wurde die WNT 11 Expression der EpCAM-defizienten Zellen untersucht. Nach 10 Tagen spontaner Differenzierung in EBs exprimierten die größeren, kontrahierenden EBs mehr WNT-11 als die kleineren, nicht kontrahierenden EBs (Promotionsarbeit Yuanchi Huang).

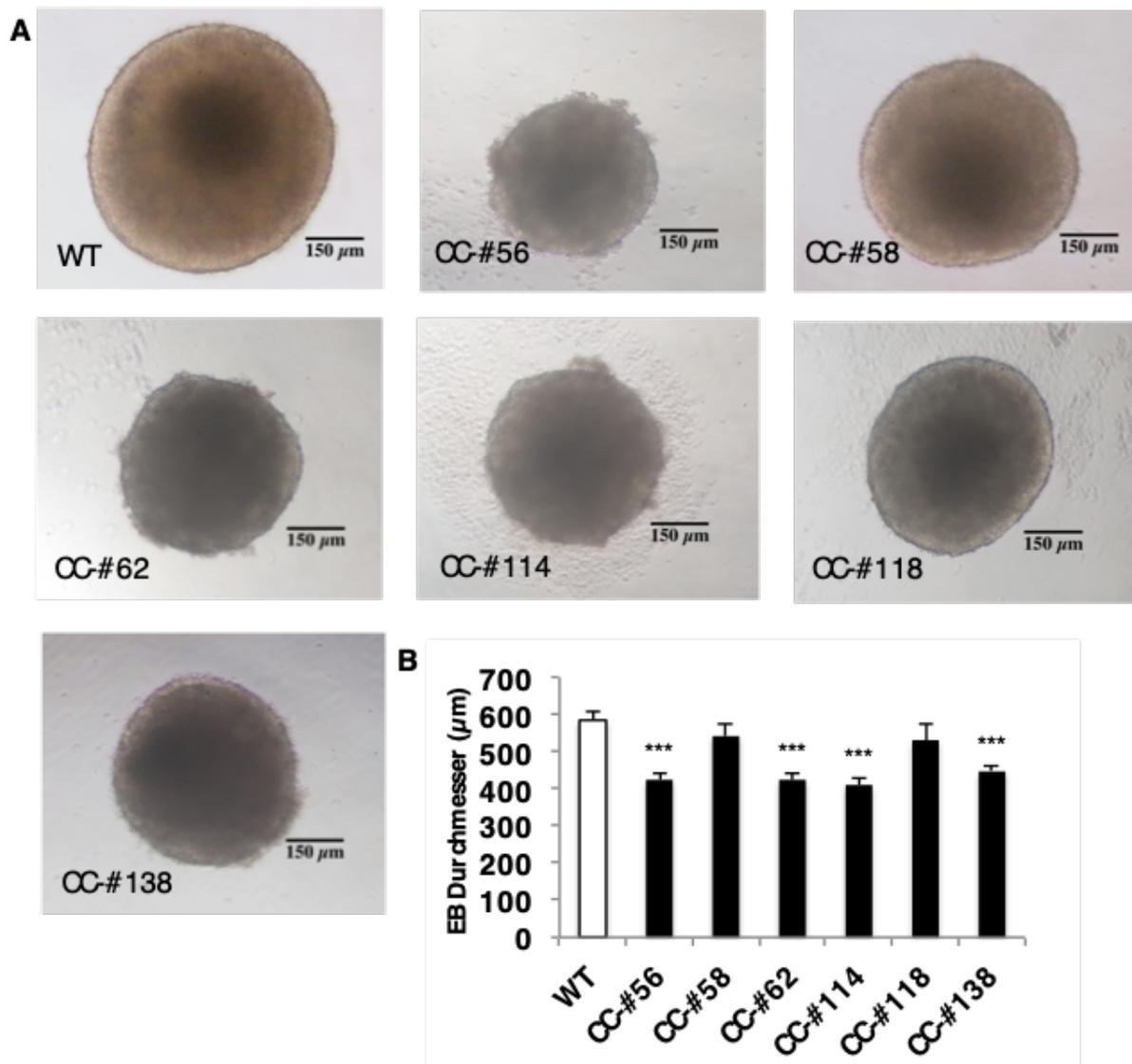


Abbildung 4. 27: Langsamer proliferierende Zelllinien bilden kleinere EBs.

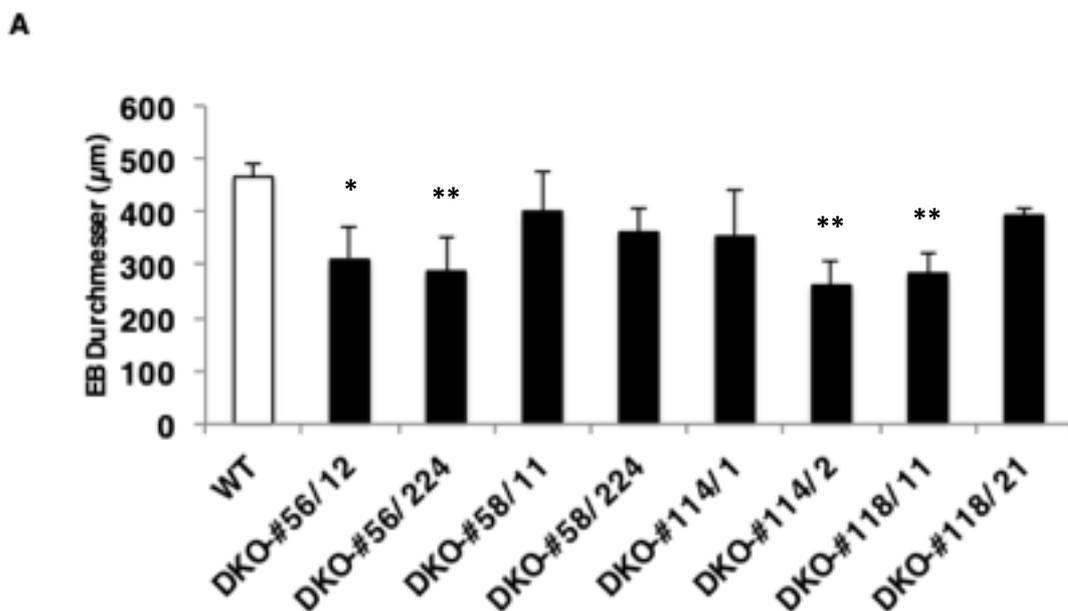
Zu Beginn des Experiments wurden 1000 Zellen für die Herstellung jedes EB verwendet. Nach fünf Tagen spontaner Differenzierung in Hanging Drops wurden EBs fotografiert und mit *Image J* ausgemessen. (A) zeigt jeweils einen repräsentativen EB jeder Zelllinie. (B) Säulendiagramm mit EB-Durchmessern in µm. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 EBs pro Ansatz und Linie. Es wurde die Signifikanz der EB-Größenveränderung bei EpCAM defizienten EBs im Vergleich zu WT EBs nach fünf Tagen spontaner Differenzierung berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett's test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Auch das kleine G-Protein ERas ist an der Proliferation muriner ES Zellen beteiligt. ERas-defiziente Zellen zeigen eine geringere Proliferation und bilden kleinere Teratome als Zellen, die ERas exprimieren (Takahashi et al., 2005). Da EpCAM und ERas beide an der Proliferation von Stammzellen beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob durch ein Doppelknockout, diejenigen Zelllinien, welche nach alleinigem EpCAM-Verlust

weiterhin normal proliferierten in ihrer Proliferationsfähigkeit gehemmt werden können. Deshalb wurden EpCAM-ERas-DKO für 10 Tage spontan differenziert und anschließend ihr Durchmesser ausgemessen. Wildtypische EBs zeigten nach 10 Tagen spontaner Differenzierung einen Durchmesser von 466 μm , EBs aus DKO-#56/12 einen Durchmesser von 310 μm , EBs aus DKO-#56/224 einen Durchmesser von 288 μm , EBs aus DKO-#58/11 einen Durchmesser von 401 μm , EBs aus DKO-#58/224 einen Durchmesser von 362 μm , EBs aus DKO-#114/1 einen Durchmesser von 354 μm , EBs aus DKO-#114/2 einen Durchmesser von 262 μm , EBs aus DKO-#118/11 einen Durchmesser von 284 μm , EBs aus DKO-#118/21 einen Durchmesser von 394 μm (Abbildung 4.28 A).

DKO-#58/11 und DKO-#58/224 bildeten im Vergleich zu CC-#58 jeweils um 10,44% und um 19,29% kleinere EBs. Die aus den Doppelknockouts DKO-#118/11 und DKO-#118/21 generierten EBs waren im Vergleich zur Ursprungslinie CC-#118 um jeweils 39,1% und 15,7% kleiner (Abbildung 4.28 B).



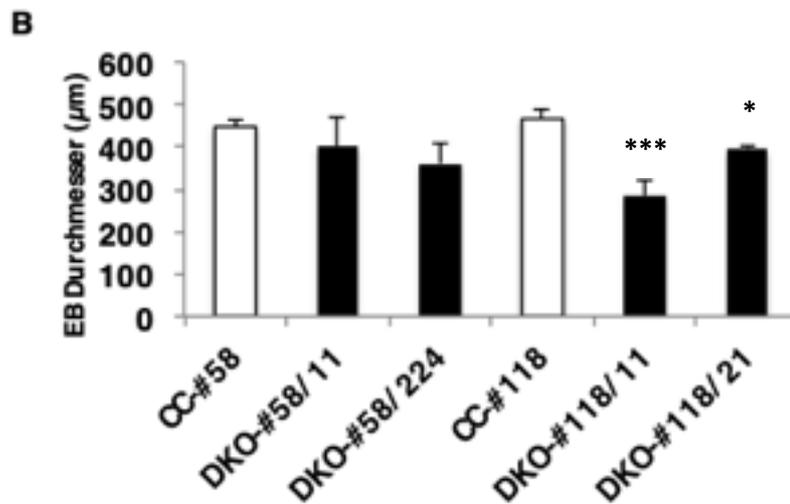


Abbildung 4. 28: Nach ERas-KO zeigen die Zelllinien, deren EpCAM-KO die EB-Größe nicht signifikant beeinflusst hatte eine Reduktion der EB-Größe. 500 Zellen wurden zur Herstellung von Hanging Drops zu Beginn des Experiments verwendet. Nach 5 Tagen spontaner Differenzierung in Hanging Drops wurden EBs aus EpCAM-ERas-DKOs fotografiert und abgemessen. In 3 unabhängigen Experimenten wurden jeweils 3 EBs ausgemessen. (A) Darstellung der EB-Durchmesser der EpCAM/ERas DKOs im Vergleich zu WT. (B) Vergleich von EpCAM/ERas-DKOs mit EpCAM-KOs. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 EBs pro Ansatz und Linie. Es wurde die Signifikanz des Größenunterschiedes EpCAM/ERas defizienter EBs gegen WT (A) und EpCAM/ERas defizienter EBs gegen EpCAM EBs (B) an Tag 5 spontaner Differenzierung berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

4.6. Effekte des EpCAM-Verlusts auf die EB-Struktur

4.6.1. EpCAM Expression bei spontaner Differenzierung in EBs

Embryonale Stammzellen aggregieren spontan zu Sphäroiden bzw. Embryoid Bodies (EBs), wenn sie auf nicht-adhärenter Oberfläche wachsen und unter Differenzierungsbedingungen kultiviert werden (Kurosawa, 2007).

Nach E-Cadherin vermittelter Aggregation differenzieren die außen liegenden Zellen des EBs zu primitivem Endoderm (Esner, Pachernik, Hampl, & Dvorak, 2002) und bilden eine Basalmembran (X. Li et al., 2001). Kontakt zur Basalmembran ermöglicht es der Zellschicht unter dem primitiven Endoderm zu überleben, während die Zellen im Inneren des EBs apoptotisch werden (Coucouvanis & Martin, 1995). Die überlebenden Zellen werden zu primitivem Ektoderm und durchlaufen die Gastrulation, ein Prozess aus dem Ektoderm, Mesoderm und Endoderm hervorgehen.

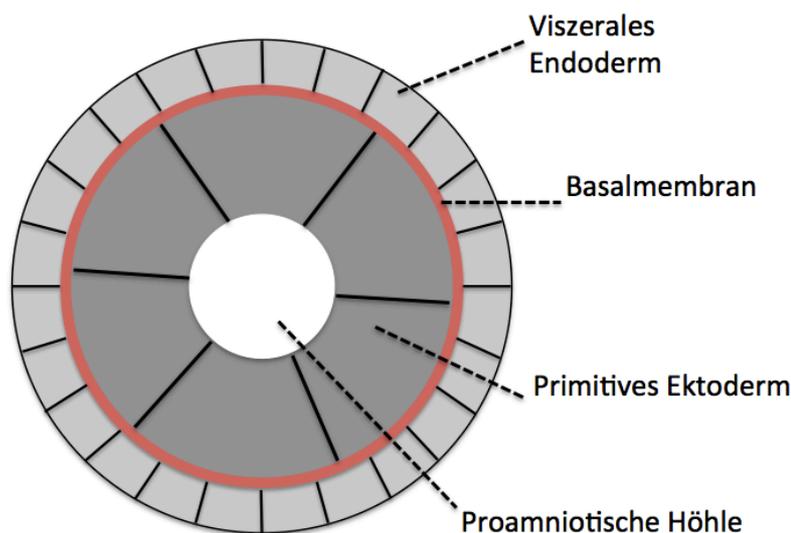


Abbildung 4. 29: Skizze eines EB an Tag 5 der Differenzierung nach Rodda et al. (2002)
(S. J. Rodda, Kavanagh, Rathjen, & Rathjen, 2002)

Auch in EBs entsteht unter dem Einfluss von WNT3A eine anterioposteriore Polarität und eine Primitivstreifen-ähnlichen Region (ten Berge et al., 2008). Bei größeren EBs können bis zu 2 dieser WNT3A-exprimierenden Regionen in EBs entstehen. Unter dem Einfluss von WNT3A durchlaufen Zellen in diesem Bereich eine EMT und bilden Mesendoderm, was durch den Nachweis der Expression von Brachyury (ein direktes Zielgen des WNT Signalweges (Yamaguchi, Takada, Yoshikawa, Wu, & McMahon, 1999) und Foxa2 gezeigt werden konnte (ten Berge et al., 2008). Im Gegensatz dazu

stehen die Arbeiten von Murry und Keller (2008), die eine ungeordnete Differenzierung im EBs postulieren.

In vivo entsteht der Primitivstreifen durch Interaktion zwischen Epiblast einerseits und embryonalem Ektoderm und viszeralem Endoderm andererseits über Faktoren wie Nodal, BMP4, WNT. ESC aus der inneren Zellmasse der Blastozyste sind nicht fähig extraembryonale Gewebe zu bilden, deshalb liegen externe Faktoren im fetalen Kälberserum (FCS) vor, die die Differenzierungsprozesse *in vitro* initiieren. Dieses stellt aber eine Unsicherheit bei der *in vitro* Differenzierung dar (ten Berge et al., 2008), da FCS verschiedene Wachstumsfaktoren in unbekannter Menge enthält. Die im Serum enthaltenen BMPs induzieren die WNT Expression im EB und dadurch die Entstehung des Primitivstreifens.

Weitere Faktoren beeinflussen die EB Differenzierung, dazu gehören die Größe der EBs, die Zelllinie, sowie die Tatsache dass manche ESC auch unter Differenzierungsbedingungen pluripotent bleiben und damit die Differenzierungsvorgänge in den EBs stören (Kawahara et al., 2009).

EBs spiegeln die frühe embryonale Entwicklung von Säugern sehr gut wieder. Indem die Expression bestimmter Marker *in vivo* in der Maus und in EBs verglichen wurden, konnten Meilensteine der murinen embryonalen Entwicklung mit der Differenzierung in EBs korreliert werden (Leahy, Xiong, Kuhnert, & Stuhlmann, 1999). Tag 0 bis 2 der 3D Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen entsprechend den Entwicklungsstadien zwischen Implantation und Gastrulation des Mäuseembryos an den Tagen 4.5.-6.5. *p.c.* Die Gastrulation folgt an den Tagen 3-5 im EB, im Mäuseembryo an Tag 6.5.-7.5. *p.c.* Bereits nach 6 Tagen beginnt in den EBs die Entstehung organtypischer Zellen, im Mäuseembryo erst an Tag 7.5. *p.c.*

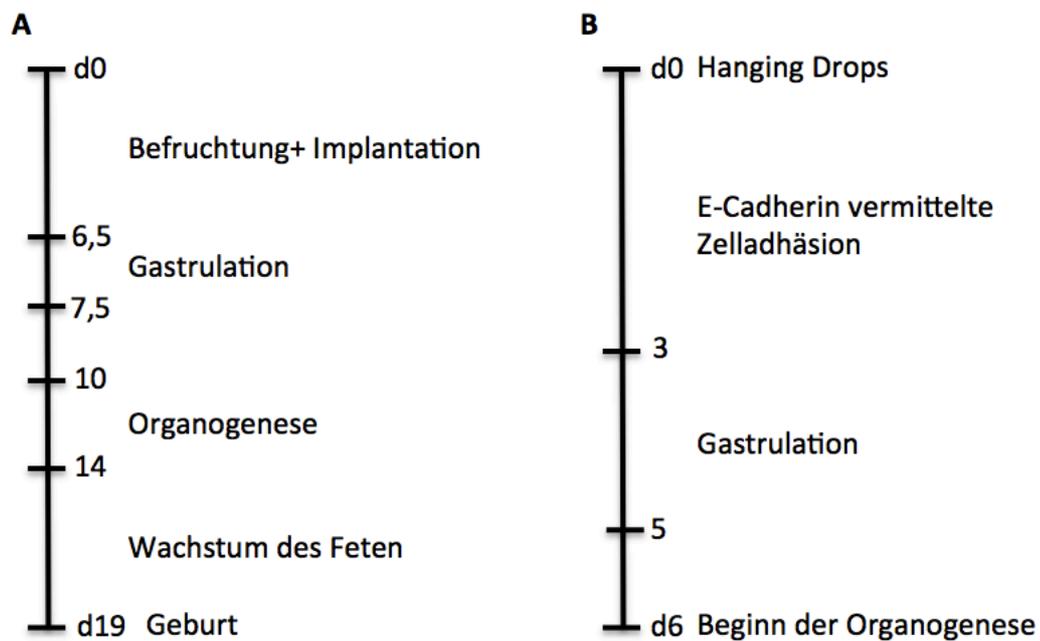


Abbildung 4. 30: (A) Embryologie der Maus im Vergleich zur (B) Entwicklung von Embryoid bodies (Leahy et al., 1999).

4.6.2. Veränderung der Oberflächenstruktur von EBs aus EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zelllinien

Die in Abbildung 4.31 gezeigten EBs wurden durch die Hanging Drop Methode gewonnen und unter dem Mikroskop fotografiert, solange sie sich noch in den *ultra low attachment plates* befanden, um mechanischen Stress zu verhindern. EBs bestehend aus wildtypischen ESC weisen eine glatte, stark strukturierte und kompakte Oberfläche auf (Abbildung 4.31 D,E,F.). EpCAM-defiziente EBs hingegen sind durch eine aufgeworfene Oberfläche mit Ausstülpungen charakterisiert (Abbildung 4.31 A,B,C). Bei einigen EBs haben sich die Zellen aus der äußeren Schicht herausgelöst.

Die Quantifizierung der Oberflächenveränderungen zeigt das Diagramm in Abbildung 4.32. Alle EpCAM KO-Klone bis auf CC-#58 zeigen eine Störung der Oberflächenstruktur. In den Klonen CC-#62, #114 und #138 war die Strukturveränderung signifikant, in den übrigen Klonen deutet sich die Veränderung nur an.

Auch in der Immunhistochemie sind Unterschiede des Oberflächenepithels zu erkennen (Abbildung 4.31 C,F). Allerdings sind in der Immunhistochemie diese Unterschiede in geringerem Ausmaß zu sehen, als auf den nativen Bildern, da die EBs hierfür in

mehreren Schritten präpariert werden müssen und dabei teils erheblicher mechanischer Belastung ausgesetzt werden. Es ist dennoch zu beobachten, dass EBs aus WT E14TG2 α ESC eine Schicht abgeflachter Zellen, ähnlich viszeralem Endoderm, als Abgrenzung aufweisen. EpCAM-defiziente E14TG2 α ESC wiederum wiesen eine Auflockerung dieser Zellschicht auf mit einem Verlust der abgeflachten Zellen (Abbildung 4.31F).

Die in EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zelllinien beobachteten Veränderungen der Oberflächenstruktur wurden bereits im Zusammenhang mit GATA 4-defizienten EBs beschrieben (Soudais et al., 1995). Das viszerale Endoderm entsteht wie das parietale Endoderm aus dem primitiven Endoderm, das sich an der Oberfläche der inneren Zellmasse der Blastozyste befindet (Gardner, 1983). In EBs erscheint das viszerale Endoderm als oberflächlich gelegenes einreihiges Epithel. Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop zeigten, dass GATA 4-defiziente EBs kein viszerales Endoderm bilden. Die verminderte Expression von Genen, die als Marker des viszeralen Endoderms gelten, bekräftigte den histologischen Befund (Soudais et al., 1995).

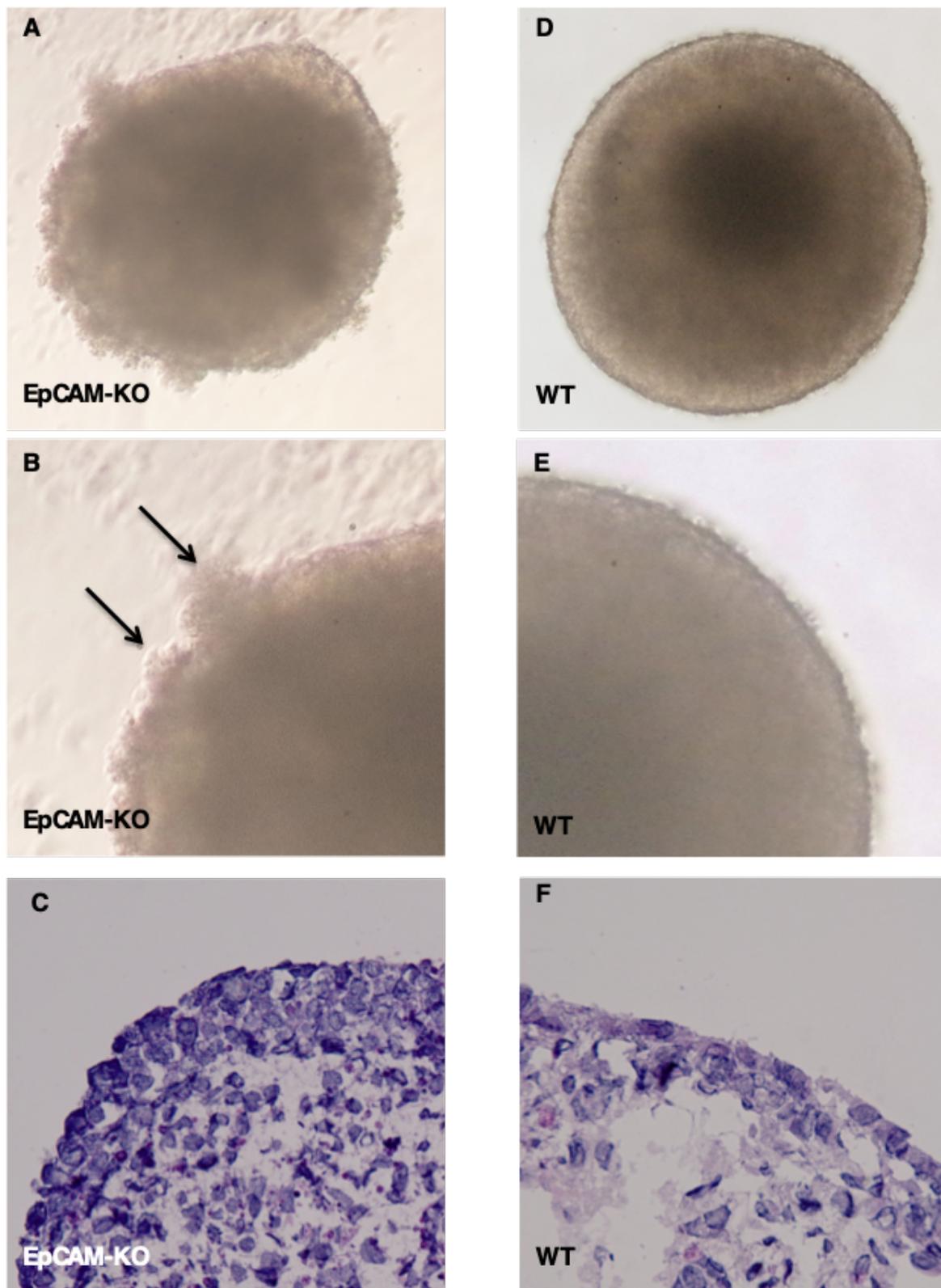


Abbildung 4. 31: Oberflächenstruktur von EBs aus wildtypischen ESC und EpCAM Knockout ESC. (A), (B), (C) zeigt beispielhaft EpCAM-KOs. In (D), (E) und (F) sind zum Vergleich WT abgebildet. (→C),(F) Nahaufnahmen des Oberflächenepithels von EpCAM KOs und WT in H.E.-Färbung. (A),(D) 40fach (B),(E) 100fach, Nativaufnahmen (C),(F) 200fache Vergrößerung, H.E.-Färbung, (→) unregelmäßige Oberfläche.

Die Oberfläche der EpCAM-defizienten EBs (Abbildung 4.31) zeigte eine Störung der Zelladhäsion, was an die Darm-pathologie der CTE erinnert. Ob tatsächlich die Zell-Zell-Verbindungen der EBs gestört sind oder andere Veränderungen vorliegen, sollte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen abgeklärt werden.

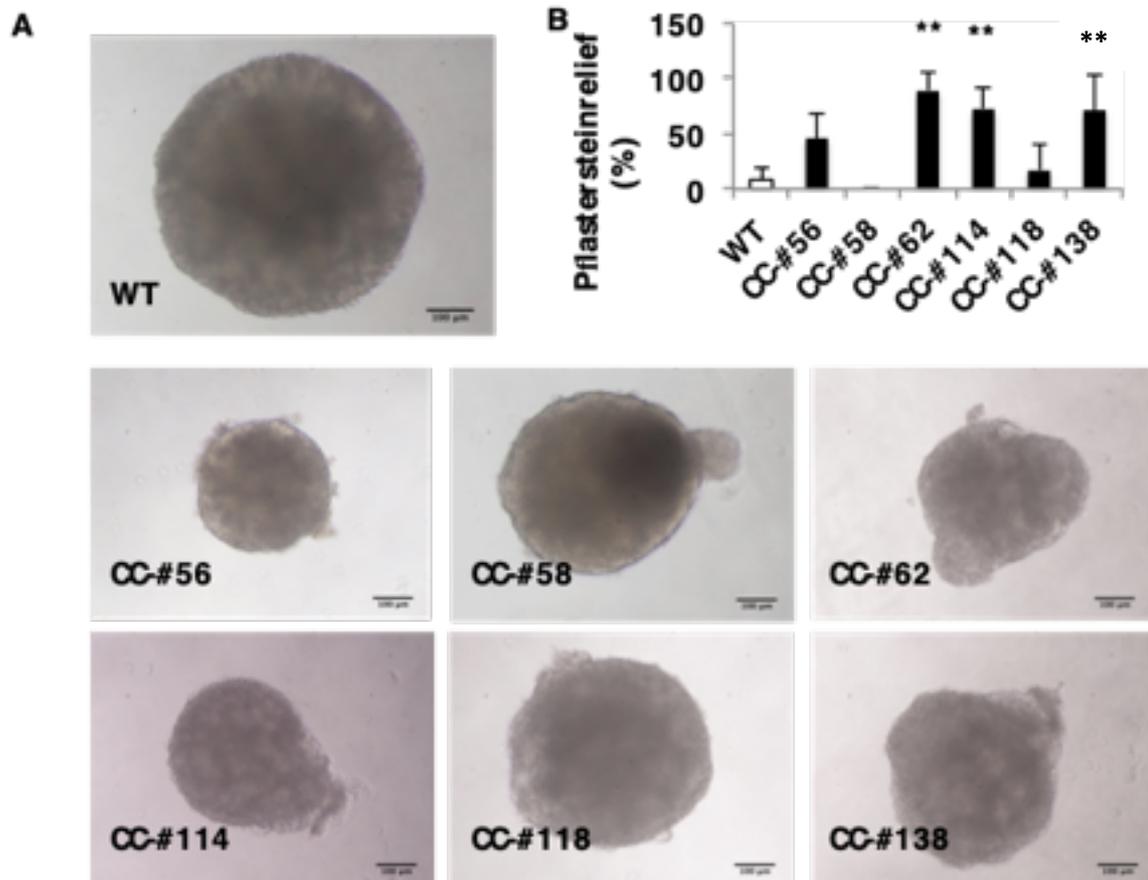


Abbildung 4. 32: Oberflächenstruktur wildtypischer EBs im Vergleich zu EBs aus EpCAM-KO ESC. (A) Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der EpCAM-defizienten EBs im Vergleich zu wildtypischen EBs. 40-fache Vergrößerung (B) Säulendiagramm zeigt den Anteil der EBs mit Membranveränderungen. Wenn mehr als die Hälfte des EB Randes eine unregelmäßige Oberfläche zeigte, wurde das als Membranveränderung gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde die Signifikanz der Oberflächenunregelmäßigkeit in EpCAM-KOs im Vergleich zum WT berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit „one way“ ANOVA und Dunnett`s test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

4.6.3. Vergleich der EpCAM-negativen 4T1-CTC und EpCAM-positiven 4T1 Tumorzelllinie

Neben einer Störung der Barrierefunktion von Epithelien ist die verminderte Adhäsion zwischen Zellen auch für die Entstehung von Metastasen von großer Bedeutung. Denn damit Metastasen entstehen können, müssen sich Zellen vom Primärtumor ablösen (Kalluri & Weinberg, 2009).

Wie ESC können auch Tumorzellen verwendet werden, um Sphäroide herzustellen (Halpern, Pejsachowicz, Febvre, & Barski, 1966). Dazu wurden, um einen ersten Eindruck von der Zelladhäsion zwischen Tumorzellen zu gewinnen, EpCAM-positiv 4T1 und EpCAM-negativ 4T1-CTC#1 verwendet (X. Liu et al., 2019). Als Indikator für die Adhäsionsfähigkeit der Zellen wurde die Oberfläche der Sphäroide beobachtet. 4T1 Zellen sind Zellen eines invasiv wachsenden Mammakarzinoms der Maus, die in Tierversuchen häufig spontan metastasieren. Die CTC#1 Linie (Circulating Tumor Cells) wurden 4 Wochen nach subkutaner Injektion von 4T1 Zellen in die Flanke von syngenen Balb/c Mäusen aus dem Blut der Mäuse isoliert und expandiert.

Zunächst wurden die Sphäroide aus 4T1 Zellen und CTCs auf 1% Agarosegel hergestellt (Abbildung 4.33).

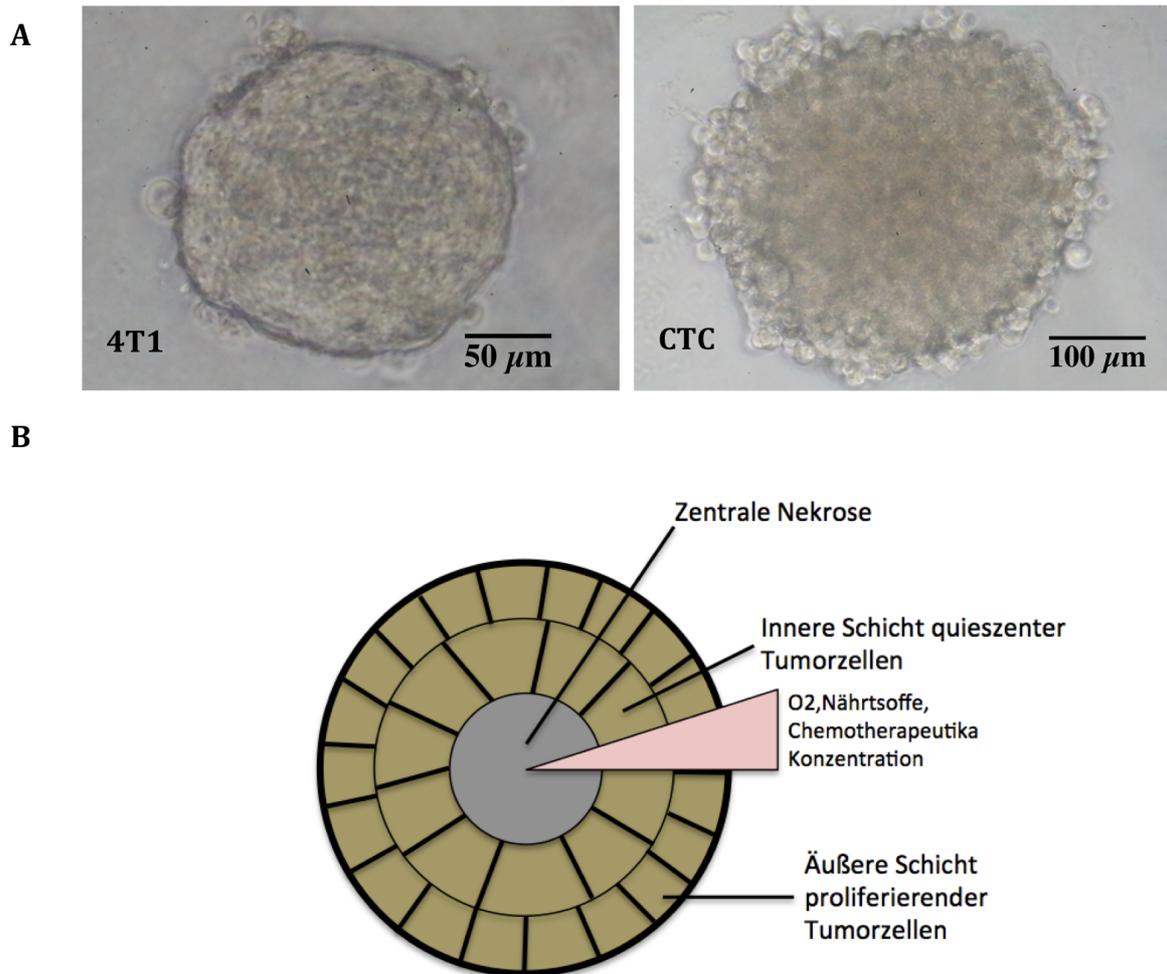


Abbildung 4. 33: Vergleich der Sphäroide aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Tumorzellen auf 1%igem Agarosegel (A) Repräsentative Sphäroide der EpCAM positiven 4T1 Linie und der EpCAM negativen 4T1-CTC Linie 3 Tage nachdem je 500 Zellen ausplattiert wurden. B) Aufbau eines Tumorsphäroids. Modifiziert nach Lin und Chang (2008). Um die zentrale Nekrose befindet sich ein Rand aus viablen Zellen. Die innere Schicht besteht aus quieszenten Zellen, die äußere Schicht aus proliferierenden Zellen (R. Z. Lin & Chang, 2008).

Sphäroide aus der parentalen EpCAM-positiven 4T1 Zelllinie sind durch eine glatte, klar definierte äußere Schicht charakterisiert. Sphäroide aus EpCAM-negativen 4T1-CTC#1 bildeten jedoch an der Oberfläche der Sphäroide keinen geschlossenen Epithelverband (Abbildung 4.33 A).

Als nächstes wurde die Hanging Drop Methode verwendet. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die resultierenden Sphäroide fotografiert (Abbildung 4.34A-D). Die Bestimmung der Sphäroidgröße zeigte einen 2,5-fach erhöhten Durchmesser von 4T1-CTC#1 Sphäroiden im Vergleich zu 4T1 Sphäroiden (Abbildung 4.34E).

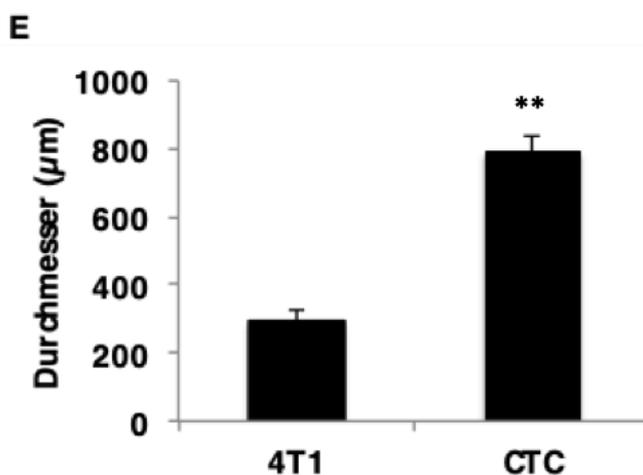
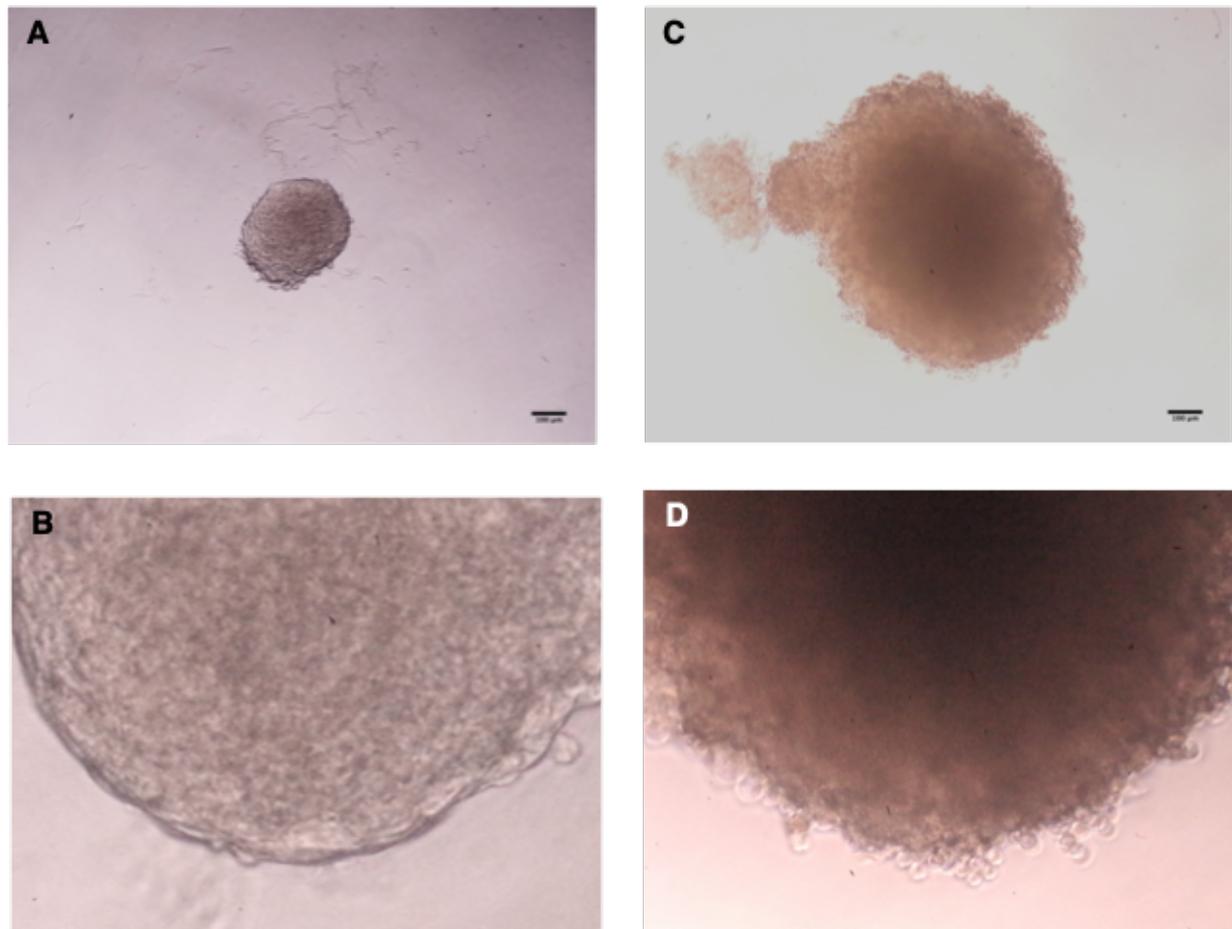


Abbildung 4. 34: Größenbestimmung der Sphäroide aus CTCs und 4T1-Zellen. Je 500 Zellen CTC oder 4T1 Zellen wurden zur Herstellung von Hanging Drops verwendet. Nach 3 Tagen wurden die Sphäroide in Ultra low attachment plates übertragen. (A) 4T1, 40-fach, (B) 4T1, 100-fach, (C) CTC, 40-fach, (D) CTC, 100-fach. Jeweils 6 Sphäroide wurden nach 5 Tagen fotografiert, um den Durchmesser zu bestimmen E) Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers von je 3 Tumorsphäroiden aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen t-test.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Neben dem Größenunterschied sticht ein deutlicher Unterschied in der Oberflächenbeschaffenheit hervor. Vergleichbar mit der Situation in EBs zeigen die EpCAM-positiven Tumorsphäroide eine glatte Oberfläche, während die EpCAM-negativen Tumorsphäroide durch eine deutlich unregelmäßigere Oberfläche charakterisiert sind.

Nach 5 Tagen in Kultur sind die EpCAM-negativen Sphäroide aus 4T1-CTC#1 fast dreimal so groß wie die EpCAM-positiven EBs aus 4T1. Das ist anders als in den Stammzellversuchen, allerdings handelt es sich bei 4T1 und CTCs um verschiedene Zelltypen. 4T1-Zellen sind in Hanging Drops benachteiligt und benötigen einen Kulturboden auf dem sie haften können, während CTCs ohne Kontakt zum Kulturboden wachsen (M. Yu et al., 2014).

5. Diskussion und Ausblick

5.1. EpCAM hat einen Einfluss auf die forcierte endodermale Differenzierung von ESC

Das 1979 von Herlyn et al. erstmals beschriebene Protein EpCAM ist auf Epithelien und in Karzinomen stark exprimiert (Gires, 2009; Herlyn et al., 1979; Munz et al., 2009). Während der normalen und malignen Differenzierung zeigt es eine dynamische Expression (Balzar et al., 1999). In den Zellen der Blastocyste ist EpCAM hoch exprimiert. Nach der Gastrulation ist EpCAM im viszeralen und parietalen Endoderm hoch exprimiert, während es im Mesoderm herunterreguliert wird (Sarrach et al., 2018). In Mäusen ist zu Beginn der Kardiogenese EpCAM-positives Endoderm dem EpCAM-negativen Mesoderm eng benachbart (Sarrach et al., 2018), was für die Induktion der Kardiomyozyten *via* GATA-4 im Mesoderm wichtig ist (Holtzinger, Rosenfeld, & Evans, 2010).

Das primitive oder viszerale Endoderm entsteht direkt aus der inneren Zellmasse der Blastocyste (Weber et al. 1999). Das VE bildet dann zunächst die epitheliale Auskleidung des Dottersacks (Kadokawa et al. 1987) und befindet sich damit am Boden des Epiblasten. Während der Gastrulation werden endodermale Zellen zunächst in das VE integriert. Im Verlauf werden mehr und mehr endodermale Zellen rekrutiert, die dann das VE nach vorne und zur Seite verdrängen. Das VE trägt dadurch mit kleinem Anteil zur Entstehung von Vorderdarm und Hinterdarm bei. Das DE entsteht aus Zellen des Epiblasten und bildet die Epithelien des Darmrohres und assoziierter Organe wie Leber und Pankreas. Die beiden Endodermtypen überschneiden sich bei der Expression mancher Gene wie Sox17 (Kanai-Azuma et al., 2002) und GATA4 (Kuo et al., 1997).

Nach dem Knockout des EpCAM-Gens in murinen embryonalen Stammzellen zeigte sich in 4 von 6 EpCAM-defizienten Zelllinien eine reduzierte Bildung von Kardiomyozyten, was anhand der Quantifizierung kontrahierender EBs und der Bestimmung der α -CAA- Expression nachgewiesen wurde (Sarrach et al., 2018). Die Überexpression von EpCAM führte einerseits zu einer gesteigerten Expression endodermaler Marker wie AFP und Fn1, andererseits ebenfalls zu einer Hemmung der Bildung von Kardiomyozyten (Sarrach et al., 2018).

Um den Einfluss von EpCAM auf die endodermale Differenzierung zu untersuchen, wurde der Effekt des EpCAM-Verlustes auf die endodermale Differenzierung überprüft. Durch die Zugabe von Retinsäure und b-FGF in das Kulturmedium wurde die endodermale Differenzierung der Zellen gesteuert. Die Bestimmung der endodermalen Marker FoxA2, AFP und Eomes bestätigte die endodermale Differenzierung der Zellen. Zudem zeigte sich eine morphologische Veränderung der Zellen, die unter dem Lichtmikroskop sichtbar wurde (Abbildung 4.2). Endodermale Zellen zeigten zahlreiche Ausstülpungen der Zellmembran. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei den Protrusionen vor allem um Filopodien handelt (Garcia, Arias, & Villar, 1995). *In vivo* dienen sie dazu über Zell-Zell-Kontakte das präkardiale Mesoderm zu steuern. Bereits England und Cowper (1975) haben beobachtet, dass endodermale Zellen des Hühnerembryos *in vivo* Filopodien bilden, um Zellen des Mesoderms zu kontaktieren.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben zeigte sich eine Abnahme der Expression endodermaler Marker in EpCAM-defizienten ESC Linien. Das lässt eine Rolle EpCAMs in der Differenzierung des definitiven Endoderms vermuten. Auch die Quantifizierung der FoxA2 gefärbten Areale in EBs mithilfe des Quick Scores zeigte eine tendenzielle Verminderung des Endoderms in EpCAM-defizienten EBs bei spontaner Differenzierung (Abbildung 4.5).

FoxA2 wird wie EpCAM sowohl im viszeralen als auch definitiven Endoderm exprimiert (Ang et al., 1993; Monaghan, Kaestner, Grau, & Schutz, 1993; Sarrach et al., 2018). Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der Forkhead-Box-Proteine. Bei der Entwicklung des definitiven Endoderms kann FoxA2 an einen intronischen Enhancer von GATA4 binden und dadurch dessen Transkription steigern (Schachterle, Rojas, Xu, & Black, 2012). GATA4 ist ein Mitglied der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, und neben dem definitiven und viszeralen Endoderm auch in weiten Teilen des Mesoderms exprimiert (Arceci, King, Simon, Orkin, & Wilson, 1993; Molkentin et al., 2000). Der Verlust eines GATA-Transkriptionsfaktors ist embryonal letal (Ang et al., 1993; Kuo et al., 1997; Lentjes et al., 2016). Sie sind sowohl an der Entwicklung des frühen Endoderms, als auch an der Entwicklung von Organen, die vom Endoderm abstammen beteiligt (Bossard & Zaret, 1998).

Auch EpCAM wird in endodermalen Zellen benötigt, um zu Leberzellen zu differenzieren, indem EpCAM Leber-induzierende WNT 2bb-Signale dereprimiert (H. Lu et al., 2013).

Aus der Kombination der Effekte von EpCAM-Überexpression (Sarrach et al. 2018) und den Folgen des EpCAM-Verlustes auf die endodermale Differenzierung lässt sich schlussfolgern, dass EpCAM auch für die Differenzierung von Endoderm notwendig ist. Diese Beobachtungen haben aber auch Einschränkungen. In diesen Experimenten wurde nur das definitive Endoderm betrachtet. Das viszerale Endoderm, das für die Entstehung von Herzmesoderm ebenso wichtig ist und sowohl EpCAM als auch ERas exprimiert, wurde in den Experimenten von Kapitel 4.1.1 durch forcierte Expression nicht untersucht. Ferner wird es nötig sein durch eine Reexpression von EpCAM zu zeigen, dass die beobachteten Effekte in EpCAM-Knockout Zelllinien nur auf den Verlust des EpCAM-Gens zurückzuführen sind.

Schließlich handelt es sich um Experimente, die im Monolayer durchgeführt wurden. Damit wurden die komplexen Zellinteraktionen einer dreidimensionalen Struktur vernachlässigt. Ein Vorteil der gerichteten Differenzierung im Monolayer ist jedoch eine homogenere Differenzierung in gewünschte Zelltypen im Vergleich zur spontanen Differenzierung in 3D. Das ist darin begründet, dass EBs nach spontaner 3D-Differenzierung unterschiedliche Zelltypen beinhalten und aufgrund der Diffusionsbarrieren im Sphäroid die Konzentration der Chemikalien nach innen abnimmt.

5.2. Mischkulturen von EpCAM-positiven und -negativen Stammzellen

Das Endoderm trägt in vivo zur Entstehung von Mesoderm bei (Nijmeijer, Leeuwis, DeLisio, Mummery, & Chuva de Sousa Lopes, 2009). In vitro ist es möglich durch die Ko-Kultivierung von endodermalen Zellen und Stammzellen die Entstehung von Kardiomyozyten zu steigern (Mummery et al., 2012).

Durch die Ko-Kultivierung von EpCAM-positiven wildtypischen E14TG2 α ESC und EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC Zellen sollte überprüft werden, ob wildtypische Stammzellen, aus denen endodermale Zellen entstehen können, dazu in der Lage sind in EpCAM-defizienten Stammzellen die Differenzierung zu Kardiomyozyten anzustoßen. Das in Kapitel 4.1.3 beschriebene Experiment zeigte aber, dass die Induktion der kardiomyozytären Differenzierung in den EPCAM-KOs durch eine Komplementation durch wildtypische E14TG2 α ESC nicht möglich ist. Theoretisch hätte man erwarten können, dass ein Teil der WT-Zellen zu Kardiomyozyten

differenzieren. Da in jedem gemischtem EB 250 wildtypische E14TG2 α ESC sind, wäre dann die α -CAA Expression im Vergleich zu den reinen WT-EBs, die 500 WT-Zellen enthielten, um ca. 50% reduziert gewesen. Doch tatsächlich war sie auf das Niveau nicht-kontrahierender Zellen reduziert. Zum Vergleich dient hier die Negativkontrolle der CC-#114-mCherry-EBs. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die EpCAM-defizienten Zellen in den gemischten EBs die Differenzierung der wildtypischen Zellen gestört haben, oder 250 wildtypische E14TG2 α ESC Zellen in einem EB nicht ausreichend sind.

Eine Ursache könnte eine Störung der mesodermalen Differenzierung in den EpCAM KOs sein. Eine andere Ursache könnte eine allgemeinere Störung der Differenzierung der EpCAM-KOs sein, die die gesamte Differenzierung im EB stört, das heißt auch die Differenzierung der wildtypischen Zellen im EB. Das erklärt die verminderte Expression von α -CAA in den wildtypischen Zellen aus gemischten EBs.

5.3. EpCAM hat einen Einfluss auf die forcierte mesodermale Differenzierung von Stammzellen

Nachdem sich in den oben beschriebenen Ko-Kultur-Experimenten von wildtypischen und EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC eine verminderte kardiomyozytäre Differenzierung zeigte wurden EpCAM-KOs auf ihre Fähigkeit mesodermal zu differenzieren überprüft.

Zum Zeitpunkt E7.0 der murinen Embryonalentwicklung ist EpCAM *in vivo* in mesodermalen Progenitoren herunterreguliert, während es im Endoderm hoch exprimiert ist (Sarrach et al., 2018). Die Überexpression von EpCAM in ESC führte zu einer Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung in EBs. In Kapitel 4.2 wurde die mesodermale Differenzierung der Stammzellen forciert. Durch die Zugabe von Cyclopamine in das Kulturmedium wird der hedgehog-Signalweg gehemmt, durch das CHIR wird der Abbau von β -catenin gehemmt (Kanke et al., 2014). Die Anreicherung von β -catenin führt zur Aktivierung kanonischer WNT-Signalwege (Bain et al., 2007).

Dadurch wird nicht nur die mesodermale Differenzierung beeinflusst, denn WNT hat auch auf die Selbsterneuerung und Proliferation von Zellen Einfluss (Grigoryan, Wend, Klaus, & Birchmeier, 2008; van Amerongen & Nusse, 2009). Wenn kanonisches WNT an den entsprechenden Rezeptorkomplex bindet, der aus Frizzled und Mitgliedern der LRP Rezeptor-Familie besteht, wird über die Aktivierung von Dishvelled ein β -catenin

Degradationskomplex gehemmt (MacDonald, Tamai, & He, 2009). Dieser Komplex enthält Axin, GSK3 und das APC (Kimelman & Xu, 2006). Letzteres rekrutiert das β -catenin zum GSK3-Axin-Komplex damit es von der GSK-3 phosphoryliert wird, um dann im Proteasom abgebaut zu werden.

Nach chemischer Induktion einer mesodermalen Differenzierung wiesen EpCAM-defiziente Zelllinien eine verminderte Expression des mesodermalen Markers brachyury im Vergleich zum WT.

Da EpCAM aber in mesodermalen Zellen herunterreguliert wird und auch kein Einfluss von EpCAM auf die mesodermale Differenzierung bislang beschrieben wurde, kommt der Verlust von EpCAM in den betroffenen Zelllinien wahrscheinlich zu einem frühen Zeitpunkt in der Differenzierung der Zellen zum Tragen (Kapitel 4.2). Alternativ ist es vorstellbar, dass ein Verlust von EpCAM die Differenzierung von endodermalen Zellen beeinträchtigt, welche die Reifung mesodermaler Zellen unterstützen. Der EpCAM-Verlust könnte somit nicht nur die endodermale Differenzierung, sondern auch die mesodermale Differenzierung und damit die aus dem Mesoderm entstehenden Kardiomyozyten beeinflussen.

Für eine Quantifizierung des Mesoderms in EBs wurden diese nach 10 Tagen spontaner Differenzierung mit Vimentin angefärbt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen wildtypischen EBs und solchen aus EpCAM-defizienten ESC. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis von Kapitel 4.2.1: Hier zeigte sich nach 5 Tagen spontaner Differenzierung von EpCAM-defizienten E14TG2 α ESC im Vergleich zu wildtypischen E14TG2 α ESC eine verminderte brachyury Expression. Das kann mehrere Gründe haben. Erstens ist Vimentin kein ausschließlich mesodermaler Marker (Franke et al., 1978; Schnitzer et al., 1981), so dass nicht nur mesodermale Zellen in die Quantifizierung eingeflossen sind. Zweitens sind die gefärbten EBs das Ergebnis spontaner Differenzierung. Das bringt eine erhöhte Variabilität der Ergebnisse mit sich, da die Differenzierung der EBs auch innerhalb einer Zelllinie variieren kann.

Erst durch weitere Experimente, u.a. die Re-Expression von EpCAM wird man eine sichere Aussage über den kausalen Zusammenhang von EpCAM-Verlust und mesodermale Differenzierung machen können.

5.4.EpCAM-Verlust vermindert die Expression von Pluripotenzmarkern in der qPCR

Nachdem sich eine Störung der endodermalen und mesodermalen Differenzierung in EpCAM-defizienten Stammzellen gezeigt hatte, sollte die Pluripotenz dieser Zellen anhand der Expression typischer Stammzellmarker überprüft werden.

EpCAM ist an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ESC beteiligt, u.a. durch die Hemmung der p53- und p21-Expression und Aktivierung des Oct4-Promotors (Huang et al., 2011). Der Vergleich der Expression von Pluripotenzfaktoren Sox2, Oct4, Nanog zeigte eine reduzierte Expression dieser Marker in EpCAM-defizienten Zellen unter pluripotenten Bedingungen. Nach 5 Tagen Differenzierung zeigte sich dagegen eine tendenziell erhöhte Expression der Pluripotenzfaktoren im Vergleich zu differenzierten WT E14TG2 α ESC. Das suggeriert eine verminderte Potenz der EpCAM-defizienten Zellen. Die erhöhte Expression der Pluripotenzmarker nach 5 Tagen spricht dagegen für eine fehlende Differenzierungsfähigkeit der Zellen. Damit scheint die strikte Regulation der Expression von EpCAM entscheidend für die normale Differenzierung von Zellen zu sein (Sarrach et al., 2018). Das würde erklären warum CC-#56, CC-#62, CC-#114 und CC-#138 in ihrer Fähigkeit zu differenzieren eingeschränkt sind. Allerdings zeigen auch die Zelllinien, die in den Differenzierungsversuchen in Kap 4.3. und 4.4. nicht eingeschränkt waren (CC-#58 und CC-#118) diesen Phänotyp.

Auch wenn CC-#58 in der Sox2 Expression keinen signifikanten Unterschied zu WT zeigt, sind in der Gesamtschau dieser qPCR Ergebnisse auch die Klone CC-#58 und-#118 in der Expression der Pluripotenzmarker verändert.

Folglich können diese Ergebnisse den Unterschied zwischen den EpCAM-KO-Linien bezüglich ihrer Differenzierungsfähigkeit nicht vollumfänglich erklären.

Das könnte daran liegen, dass es sich um RT-qPCR Ergebnisse handelt und eine Regulierung der Pluripotenzmarker auf posttranskriptioneller Ebene und Proteinebene mit diesem Verfahren nicht untersucht werden kann.

5.5.EpCAM/ERas DKO inhibiert die spontane kardiomyozytäre Differenzierung

Nun stellte sich die Frage durch welchen Signalweg EpCAM Einfluss auf die Differenzierung von Zellen nimmt. Da nur EpCAM in voller Länge Einfluss auf die kardiomyozytäre Differenzierung hat, wurde nach Interaktionspartnern von EpCAM

gesucht, die alternative Signalwege ermöglichen. Nach Immunpräzipitation und SILAC-Markierung stellte sich in der Massenspektrometrie ERas als Interaktionspartner von EpCAM heraus (Sarrach et al., 2018). Da 2 der 6 EPCAM-KOs keine Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung zeigten, wurde zusätzlich das ERas-Gen ausgeknockt, um eine mögliche kompensatorische Wirkung von ERas in diesen Klonen zu untersuchen. Tatsächlich gelang es dadurch in den beiden Klonen eine Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung zu induzieren. In den anderen EpCAM/ERas-DKO dagegen zeigte sich teilweise ein Anstieg des Anteils kontrahierender EBs im Vergleich zu den EpCAM-KOs aus denen sie hergestellt wurden (Kapitel 4.4).

Die Ergebnisse können mit einer kompensatorischen Wirkung von ERas in den Klonen CC-#58 und CC-#118 erklärt werden, was dazu führt, dass der Verlust von ERas in diesen Klonen einen stärkeren Effekt zeigt. Das geschieht aber vermutlich nicht über eine Störung der mesodermalen Differenzierung, denn nach zusätzlichem ERas-KO zeigte sich in den Klonen DKO-#58/11, DKO-#58/224, DKO-#118/11 und DKO-#118/21 keine verstärkte Inhibierung mesodermaler Differenzierung.

Zur Herstellung der DKOs wurde die CRISPR-Cas Technologie verwendet. Doch die Modifizierung des Genoms mit CRISPR/Cas9 hat auch Nachteile. Ohne Sequenzierung des gesamten Genoms ist es nicht möglich zu wissen, ob und wie viele off-target Mutationen möglicherweise entstanden sind. Dadurch bleibt eine gewisse Unsicherheit bestehen, ob beobachtete Effekte nach einem Genknockout ausschließlich auf das Zielgen zurückzuführen sind, oder ob auch off-target Effekte das Ergebnis beeinflussen. Am wichtigsten zur Vermeidung von off-target Effekten ist dabei die Spezifität der sgRNA (O'Geen et al., 2015).

Ferner kann CRISPR/Cas 9 zu Doppelstrangbrüchen führen, aus denen Deletionen resultieren, die sich über mehrere tausend Basenpaare erstrecken, was in sich teilenden Zellen schwere Auswirkungen haben kann (Kosicki, Tomberg, & Bradley, 2018).

Auch aufgrund dieser unvorhersehbaren Effekte von CRISPR/Cas9 sollten durch Rescue-Experimente, in denen EpCAM in EpCAM-defizienten Zellen reexprimiert wird, die Vermutungen konsolidiert werden.

5.6. EpCAM-Verlust verursacht eine Hemmung der Proliferation in 2D- und 3D-Kulturen

Schließlich wurde der Einfluss von EpCAM auf die Proliferation der Stammzellen untersucht.

Zur Regeneration von Organen durch Gewebstammzellen müssen sich die Stammzellen im Rahmen einer transienten Amplifikation teilen. Dazu durchlaufen sie den Zellzyklus (De Souza et al., 2007). Dieser besteht aus der Mitose (M-Phase) und der darauffolgenden Interphase, die sich in G1, S und G2 Phase unterteilen lässt. Differenzierte Zellen und ruhende, nicht terminal differenzierte Zellen befinden sich in der G0 Phase des Zellzyklus. Diesen Zustand können sie unter Umständen wieder verlassen. In den Zellzyklus sind Kontrollpunkte (checkpoints) eingebaut, die ein unkontrolliertes Wachstum verhindern sollen (Barnum & O'Connell, 2015). Dieser innere Regulationsmechanismus der Zelle, besteht aus Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK), sowie exogenen Faktoren (z.B. PDGF, FGF, EGF, TGF, IGF), die eine Zellproliferation durch intrazelluläre Signalkaskaden steuern. Extrazelluläre Signale, *i.e.* Liganden der oben genannten Rezeptoren, können einen Austritt aus der G0-Phase und einen Wiedereintritt in den Zellzyklus induzieren. Bei den exogenen Faktoren handelt es sich um Liganden, die an Membranrezeptoren der Zelle binden, meist Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch den nachfolgenden Signalweg üben sie eine regulatorische Funktion auf die Zyklin-abhängigen Kinasen aus. CDK werden in der Zelle ständig exprimiert, Zyklone dagegen werden phasenspezifisch gebildet und regulieren die Aktivität der Kinasen, indem sie an diese binden und sich daraufhin die Konformation des aktiven Zentrums der Kinasen verändert. Die Zyklin/CDK Komplexe werden auf verschiedene Art und Weise reguliert (Löffler, Springer Verlag, Biochemie, S.216 f.) (Prabhu et al., 1999). In vitro konnte gezeigt werden, dass die EpCAM Expression zu einer Steigerung der c-Myc Expression und das wiederum zu einer Hochregulierung der Zyklone A und E sowie FABP₅ führte (Munz et al., 2004). EpCAM hat ferner einen direkten Einfluss auf die Expression von Zyklin D1, indem EpICD Konsensussequenzen innerhalb des Zyklin D1-Promoters bindet und somit die Expression des CCND1 Gens steigert (Chaves-Pérez et al. 2012). Die durch Zellzählung und CFSE-Färbung innerhalb der vorgelegten Promotionsarbeit durchgeführten Experimente bestätigen die Rolle von EpCAM bei der Regulation der Proliferation von Stammzellen.

Außerdem konnte eine verminderte Proliferation bei LIF-Entzug bestätigt werden. LIF erhält in der Zellkultur die Pluripotenz der Zellen, indem es an den LIF-Rezeptor bindet (Gearing et al., 1991). Daraufhin wird die Rezeptoruntereinheit GP 130 (Glykoprotein 130) rekrutiert und bildet mit dem Rezeptor ein Heterodimer. Die Bindung des Liganden LIF führt zur Phosphorylierung konstitutiv assoziierter Januskinasen (JAK), die wiederum den Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) phosphorylieren und aktivieren. Am Ende dieser Signalkaskade steht die Dimerisierung von phosphoryliertem STAT3 und die Translokation in den Nucleus. Das aktivierte STAT3 reguliert in murinen ESC sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation (Boeuf, Hauss, Graeve, Baran, & Kedinger, 1997). Im Zellkern wird eine Vielzahl von Genen reguliert, auch solche, die über positiven oder negativen Feedback den JAK-STAT Signalweg beeinflussen. Die durch Zellzählung gemessenen Ergebnisse der Proliferation der EpCAM-defizienten Zelllinien wurden außerdem noch mit der Messung der EB-Durchmesser bestätigt.

Auch das kleine G-Protein ERas hat einen positiven Einfluss auf die Proliferation in ESC (Takahashi et al., 2005). Folglich wurde überprüft, ob der Knockout des ERas-Gens zusätzlich zum EpCAM-KO einen negativen Effekt auf die Proliferation der EpCAM-KOs hat. Es zeigte sich, dass der Knockout des ERas Gens sich eher in den EpCAM-defizienten Zelllinien auswirkt, in denen der EpCAM-KO nur geringen Einfluss auf die EB-Größe hatte, also CC-#58 und CC-#118. Das könnte damit zusammenhängen, dass die ERas-Expression in diesen Zelllinien den EpCAM-Verlust kompensiert, was die reduzierte EB-Größe nach ERas-KO erklären würde.

Trotzdem müssen weitere Experimente abklären, ob die Ergebnisse zufällig auf die Eigenschaften des einzelnen Klons zurückzuführen sind oder auf die mit CRISPR induzierten Mutationen von EpCAM und ERas.

5.7. Auswirkung der Proliferation auf die Differenzierung

In den EBs, die aus langsamer proliferierenden Zelllinien hergestellt wurden, konnte eine geringere WNT-11 Expression nachgewiesen werden (Sarrach et al., 2018). WNT-11 begünstigt die Kardiogenese und die Expression von WNT-11 korreliert mit der EB-Größe (Hwang et al. 2009). In den kleineren EBs wurde eine geringere kardiomyozytäre Differenzierung detektiert. Damit könnte der EpCAM-Verlust über WNT-11 die kardiomyozytäre Differenzierung beeinflussen.

Allerdings ist nicht klar, ob die verminderte WNT11 Expression in kleineren EBs eine direkte Folge des EpCAM-Verlustes ist. Die reduzierte WNT-11 Expression könnte auch

eine Folge verminderter Proliferation sein und damit nicht direkt mit dem EpCAM-Verlust zusammenhängen. Denn dann hätten auch andere Proteine, die die Proliferation in den EBs beeinflussen, denselben Effekt auf die WNT 11 Expression.

5.8. EpCAM- KO verursacht Oberflächenveränderungen an EBs, die an die CTE erinnern

Sowohl EpCAM als auch ERas sind in der äußeren Zellschicht der EBs exprimiert, wo das viszerale Endoderm lokalisiert ist (Leahy et al., 1999; Sarrach et al., 2018; Z. A. Zhao et al., 2015). In dieser Zellschicht zeigten die aus EpCAM-defizienten ESC hergestellten EBs morphologische Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen EBs, welche an eine EpCAM-assoziierte Darmpathologie erinnerten, die durch eine Störung des Oberflächenepithels gekennzeichnet ist, die congenital tufting enteropathy (CTE). 1978 wurden erstmals von Davidson et al. 5 Säuglinge beschrieben, die seit ihrer Geburt an starker wässriger Diarrhoe, Störung des Elektrolythaushaltes und Wachstumsstörungen litten, was eine parenterale Ernährung notwendig machte. Weitere Fallberichte folgten von Reifen et al. (1994), Goulet et al. (1998), Abely et al. (1998). Wie sich später herausstellte sind homozygote EpCAM-Mutationen eine Ursache der zugrundeliegenden Erkrankung (Sivagnanam et al. 2008). CTE (Congenital tufting enteropathy) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die sich im Neugeborenenalter manifestiert. In Westeuropa liegt die Inzidenz bei 1/50000 bis 1/100000 Lebendgeborenen (Schätzung von Goulet et al. 2007). Histologisch zeigt sich eine Atrophie der Dünndarmvilli, Hypertrophie der Krypten und Bildung von epithelialen „tufts“ (Ausstülpungen von Enterozyten-Klumpen) in Dünn- und Dickdarm, aber ohne oder mit nur gering ausgeprägter Entzündungsreaktion. Da diese Pathologie zu einer Resorptionsstörung führt, müssen die Patienten parenteral ernährt werden, was dauerhaft Komplikationen mit sich bringt (Eckart et al. 1989). 2008 wurde eine Mutation im *EPCAM* Gen als Ursache der CTE erkannt (Sivagnanam et al., 2008). Die Patienten trugen eine G>A Substitution an der Donor Splice Stelle des Exon 4, mit der Folge, dass Exon 4 nicht transkribiert wurde.

Für das Erscheinungsbild dieser Krankheit stehen verschiedene Erklärungsmodelle zur Verfügung. Kozan et al. machen eine zu hohe Permeabilität des Epithels im distalen *Ileum* und proximalen Kolon verantwortlich, welche aus einer Herunterregulation von Occludin und ZO-1 resultieren soll (Kozan et al., 2015). Andere erklären die

Barrierestörung mit einer Herunterregulation von Claudinen und damit durch eine gestörte Ausbildung von *Tight Junctions* (Lei et al., 2012).

Auch die Versuchstiere mancher Arbeitsgruppen unterscheiden sich in der Symptomatik der CTE. Guerra et al. (2012) berichten von Mäusen mit hämorrhagischen Durchfällen (und nicht wässrigen). In der Histologie zeigt sich eine Störung der Architektur des Dünndarmepithels. Als Ursache vermuten die Autoren eine reduzierte Lokalisation von E-Cadherin an der Membran des Dünndarmepithels (Guerra et al., 2012). Ähnliche Symptomatik schildern Lei et al. (2012). Mäuse die homozygot mutierte EpCAM Allele tragen, sterben postnatal an intestinalen Erosionen. Diese sind vorwiegend im Dünndarm und *Jejunum* lokalisiert. Folgende Erklärung wird für die Erosion geboten: EpCAM bildet physiologischerweise Komplexe mit Claudinen. Ohne EpCAM kommt es zu einer Störung der *Tight Junctions*, wahrscheinlich, weil eine Reihe von Claudinen posttranskriptional abgebaut werden. Davon betroffen sind vor allem Claudin 7, aber auch Claudin 2,3,15. Die Barrierestörung führt zum enteralen Salzverlust und sekundär von Wasser. Umgekehrt wird das Epithel auch angreifbar für Proteasen. Durch den Selbstverdau der Darmwand kommt es zu Schleimhautblutungen bis hin zu makroskopisch sichtbaren Perforationen der Darmwand (Lei et al., 2012).

Der Krankheitsprozess könnte auch durch eine Überaktivität der Matriptase in Gang gesetzt werden. Diese spaltet EpCAM und Claudin-7, welche dadurch endozytiert und abgebaut werden (C. J. Wu, Feng, Lu, Morimura, & Udey, 2017).

Schließlich gibt es auch EpCAM defiziente Mäuse, die bereits *in utero* sterben (Nagao et al., 2009).

Die Störung des Oberflächenepithels in EBs aus EpCAM-Knockout Zelllinien suggeriert eine Rolle EpCAMs bei der Entstehung des viszeralen Endoderms *in vitro*. Zur weiteren Untersuchung der Zelladhäsion in EBs sind für die Zukunft Western Blots zur Detektion von Claudinen geplant.

Um die Rolle EpCAMs in der Zelladhäsion von Sphäroiden aus Tumorzellen weiter zu untersuchen wurden auch Sphäroide aus EpCAM-exprimierenden 4T1-Zellen und den daraus entstandenen EpCAM-negativen 4T1-CTC hergestellt. Dabei zeigte sich auch hier bei den EpCAM-negativen Zellen eine Störung der oberflächlichen Zellschicht. Anders als bei den Versuchen mit ESC zeigten die EpCAM-negativen 4T1-CTC eine viel stärkere Proliferation in 3D-Kultur als die EpCAM-positiven 4T1-Zellen. Das liegt zum einen am Zelltyp und zum anderen an der dreidimensionalen Zellkultur. Durch die Bildung von Zellaggregaten haben CTCs in der Blutbahn einen Überlebensvorteil (Hong, Fang, & Zhang, 2016). 4T1 Zellen dagegen gehen wahrscheinlich in Anoikis,

eine Form der Apoptose, die Zellen bei Verlust der Zell-Matrix-Interaktion begehen (Frisch & Screaton, 2001). Das erklärt die unterschiedliche Sphäroid-Größe. Auch wenn die EpCAM-negativen Zellen eine stärkere Proliferation in Sphäroiden zeigten, waren sie in der Oberflächenbeschaffenheit mit den EpCAM-defizienten Stammzellen vergleichbar, während die glatte Oberfläche der 4T1-Zellen an die wildtypischen EpCAM-exprimierenden ESC erinnerte. Außerdem konnten andere Experimente unseres Labors zeigen, dass in zweidimensionaler Kultur die Proliferation von 4T1-Zellen stärker als die von 4T1-CTC ist. Somit konnten die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen auch in einer anderen Zelllinie nachgewiesen werden, in der EpCAM auf natürliche Weise herunterreguliert wurde. Das deutet darauf hin, dass die Oberflächenveränderungen in den EpCAM-KOs nicht oder zumindest nicht nur auf off-target-Effekte von CRISPR-Cas9 zurückzuführen sind.

Zur genaueren Untersuchung der Ultrastruktur der Zellen in den EBs wurde die Ultrastruktur der wildtypischen und EpCAM-defizienten EBs von der Kooperationsgruppe um Mamata Sivagnanam (San Diego, USA) untersucht. Dazu wurden nach o.g. Protokoll EBs hergestellt, an Tag 5 isoliert und in 2%er Formalinlösung fixiert. Einbettung der EBs, Schnittanfertigung und elektronenmikroskopische Untersuchung wurden von M. Sivagnanam und Mitarbeitern (s.u.) durchgeführt.

Unterschiede wurden festgestellt bezüglich Zelladhäsionsproteinen und Mitochondrien sowie MAMs (mitochondrienassoziierte Membranen).

In wildtypischen EBs war neben regelrechten Zelladhäsionen auch eine regelmäßige Binnenstruktur der Mitochondrien zu erkennen. Die EpCAM-KOs zeigten in Mitochondrien einen Verlust der *Cristae*, außerdem häufige ER Expansionen, teilweise mit Ribosomenverlust.

In EBs aus EpCAM-Klonen, die durch einen CMV-Promotor konstitutiv EpCAM exprimieren war dieser Effekt, in den Zelllinien CC-#62 und CC-#114 rückgängig zu machen. Um das zu erklären sind für die Zukunft weitere Experimente zur Untersuchung der Rolle EpCAMs bei der Regulierung der Morphologie von Mitochondrien angedacht. Besonders interessant scheint hier die Interaktion von EpCAM und OPA-1, einem Protein der inneren Mitochondrienmembran (Griparic, van der Wel, Orozco, Peters, & van der Blik, 2004; Misaka, Miyashita, & Kubo, 2002; Olichon et al., 2003).

6.Zusammenfassung:

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein Transmembranprotein, das auf Epithelien, einer Vielzahl von Tumoren und embryonalen Stammzellen exprimiert wird. Dabei erfüllt EpCAM physiologisch wichtige Funktionen bei der embryonalen Entwicklung und der Regeneration von Organen, wie z.B. der Leber. Während der embryonalen Entwicklung zeigt sich eine hohe EpCAM-Expression in den Zellen der *inner cell mass* der Blastozyste, im Epiblasten und nach der Gastrulation eine Restriktion auf das Endoderm. Während die Funktion EpCAMs in der Leberentwicklung bereits beschrieben wurde, bleibt die Rolle EpCAMs in der frühen embryonalen Entwicklung rätselhaft.

ERas ist ein kleines G-Protein, das während der embryonalen Entwicklung von Mäusen eine Überschneidung mit der Expression von EpCAM zeigt und nach Abschluss der Entwicklung ebenfalls in der Leber sowie verschiedenen Tumoren exprimiert wird. Beide Proteine sind ferner in grundlegende Funktionen embryonaler Stammzellen involviert, wie z.B. in die Proliferation. Embryonale Stammzellen stellen eine wichtige Ressource für die Medizin dar. Aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit lässt sich in der Theorie jedes Gewebe durch Stammzellen ersetzen. So konnten im Tierexperiment im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen untergegangene Neurone durch Stammzellen ersetzt werden. Ferner ermöglichen sie embryologische Forschung *in vitro*. Hervorzuheben ist hier die Hanging Drop-Methode, welche es erlaubt aus ESC dreidimensionale Zellaggregate, sog. embryoid bodies herzustellen und mit diesen die embryonale Entwicklung von Säugetieren zu imitieren. Eine Hürde beim medizinischem Einsatz von embryonalen Stammzellen bleibt die Steuerung der Differenzierung aller Stammzellen zu einem bestimmten Zelltyp. Das birgt eine Gefahr, denn ohne die genaue Kontrolle der Differenzierung können nach Implantation von Stammzellen in Lebewesen Teratome entstehen. Deshalb ist es von großer Bedeutung die Rolle dieser in Stammzellen exprimierten Gene weiter zu entschlüsseln. In dieser Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- nach EpCAM-Verlust zeigt sich bei forcierter endodermaler und mesodermaler Differenzierung von ESC eine verminderte Expression endodermaler bzw. mesodermaler Marker

- durch Ko-Kultivierung EpCAM-defizienter und wildtypischer Stammzellen gelang es nicht die kardiomyozytäre Differenzierung in EpCAM KOs anzustoßen
- der EpCAM-Verlust in ESC führt zu verminderter Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Sox2 und Nanog. Bei spontaner Differenzierung werden diese Marker in EpCAM-KOs weniger herunterreguliert als in wildtypischen Zellen, was auf einen Differenzierungsblock hinweist
- Herstellung von EpCAM/ERas-Doppelknockout Zelllinien durch CRSIPR-CAS 9 vermittelten Knockout von ERas
- 4 von 6 EpCAM-defiziente Zelllinien weisen eine reduzierte Proliferation im Vergleich zum Wildtyp auf. Die 2 weiterhin „normal“ proliferierenden Zelllinien zeigen nach ERas-Verlust eine Reduktion der Zellteilungsrate. Das weist auf eine kompensatorische Funktion von ERas in diesen beiden Zelllinien hin.
- Bei dreidimensionaler Differenzierung zeigten EpCAM-defiziente EBs neben verringerten Durchmessern auch eine lichtmikroskopisch sichtbare Störung der äußersten Zellschicht.
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten vorwiegend mitochondriale Defekte in EBs aus EpCAM-defizienten ESC.

Zusammenfassend konnte in 2D- und 3D- Experimenten gezeigt werden, dass EpCAM für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz, der Proliferationsfähigkeit sowie für die frühe Differenzierung der Zellen notwendig ist.

7.Summary

The epithelial cell adhesion molecule is a transmembrane protein, which is expressed on epithelial cells, various tumors and embryonic stem cells (ESC). EpCAM has important physiologic functions during organogenesis and regeneration of organs, for example of the liver. During embryonic development EpCAM is highly expressed in cells of the inner cell mass of the blastocyst, in the epiblast and after gastrulation the expression is restricted mainly to the endoderm. While the role of EpCAM during liver development is well understood, its role during the early embryonic development remains elusive.

ERas is a small G-Protein which during murine embryonic development shows an overlapping expression with EpCAM, and in adults is expressed in the liver and in various tumors. Both proteins are involved in basic functions of embryonic stem cells, for example proliferation. Embryonic stem cells are an important resource for medicine. Due to their potency, they are able to differentiate into any tissue. Indeed, they have already been used successfully to treat neurodegenerative disease. Furthermore embryonic stem cells allow the research of mammal development in vitro. But a main problem which is the difficulty of directing the differentiation of those cells into one specific cell type remains. This can be a risk, because if the differentiation of those cells can not be controlled this can lead to the formation of teratomas in mammals. This is why it is important to learn more about those genes, which are crucial for the differentiation of stem cells.

The following results have been achieved:

- following the knockout of EpCAM the forced endodermal and mesodermal differentiation showed a reduced expression of endodermal and mesodermal markers.
- the co-cultivation of EpCAM-deficient and wildtype ESC did not result in a more efficient differentiation of EpCAM-KOs into cardiomyocytes
- EpCAM-KO ESC show a reduced expression of Oct-4, Sox2 and Nanog under pluripotency conditions. During spontaneous differentiation these genes were less downregulated compared to the expression in wildtype cells, this suggests a reduced potency and at the same time inhibition of differentiation

- Generation of EpCAM/ERas DKO cells using CRISPR-Cas9 for the knockout of ERas
- 4 out of 6 EpCAM-deficient cell lines showed a reduced proliferation compared to WT. The other 2 EpCAM-KO cell lines, that were not affected after loss-of-EpCAM showed a reduced proliferation after ERas-KO. This suggests a compensation of EpCAM-KO through ERas
- After 3D-Differentiation EpCAM-deficient EBs showed a reduced size but also a morphologically different outer layer
- Electron microscope-analysis of those cells showed defects mainly of the mitochondria in EpCAM-deficient EBs

In summary the presented 2D- and 3D- experiments show, that EpCAM is necessary for the maintenance of pluripotency, of proliferation as well as for the early differentiation of cells.

8.Literaturverzeichnis

- Akita, H., Nagano, H., Takeda, Y., Eguchi, H., Wada, H., Kobayashi, S., . . . Doki, Y. (2011). Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene*, *30*(31), 3468-3476. doi:[onc201159 \[pii\]](https://doi.org/10.1038/onc.2011.59)
[10.1038/onc.2011.59](https://doi.org/10.1038/onc.2011.59)
- Al-Mayouf, S. M., Alswaid, N., Alkuraya, F. S., Almehaidib, A., & Faqih, M. (2009). Tufting enteropathy and chronic arthritis: a newly recognized association with a novel EpCAM gene mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *49*(5), 642-644.
doi:[10.1097/MPG.0b013e3181acaeae](https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181acaeae)
- Ang, S. L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K. A., Cascio, S., Rossant, J., & Zaret, K. S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development*, *119*(4), 1301-1315. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306889>
- Apostolakos, M. J., Schuermann, W. H., Frampton, M. W., Utell, M. J., & Willey, J. C. (1993). Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, *213*(2), 277-284. doi:[10.1006/abio.1993.1421](https://doi.org/10.1006/abio.1993.1421)
- Arai, A., Yamamoto, K., & Toyama, J. (1997). Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. *Dev Dyn*, *210*(3), 344-353. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199711\)210:3344::AID-AJA133.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3344::AID-AJA133.0.CO;2-A)
- Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H., & Wilson, D. B. (1993). Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*, *13*(4), 2235-2246. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8455608>
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, *17*(1), 126-140. doi:[10.1101/gad.224503](https://doi.org/10.1101/gad.224503)
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., . . . Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*, *408*(3), 297-315. doi:[10.1042/BJ20070797](https://doi.org/10.1042/BJ20070797)
- Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., & Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)*, *77*(10), 699-712. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606205>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2015). Molecular mechanisms involved in initiation of the DNA damage response. *Mol Cell Oncol*, *2*(1), e970065.
doi:[10.4161/23723548.2014.970065](https://doi.org/10.4161/23723548.2014.970065)
- Baumeister, P., Hollmann, A., Kitz, J., Afthonidou, A., Simon, F., Shakhtour, J., . . . Gires, O. (2018). High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci Rep*, *8*(1), 14582. doi:[10.1038/s41598-018-32178-8](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32178-8)
- Beddington, R. S., & Robertson, E. J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell*, *96*(2), 195-209. doi:[10.1016/s0092-8674\(00\)80560-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80560-7)
- Bergsagel, P. L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C. R., Trepel, J., & Kuehl, W. M. (1992). A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol*, *148*(2), 590-596. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1729376
- Bianchi, D. W., Wilkins-Haug, L. E., Enders, A. C., & Hay, E. D. (1993). Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet*, *46*(5), 542-550. doi:[10.1002/ajmg.1320460517](https://doi.org/10.1002/ajmg.1320460517)
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F. D., Baran, N., & Keding, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol*, *138*(6), 1207-1217. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298977>

- Böcker, Pathologie, 5.Auflage (2012), Urban und Fischer
- Bossard, P., & Zaret, K. S. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development*, 125(24), 4909-4917. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811575>
- Boulter, L., Govaere, O., Bird, T. G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., . . . Forbes, S. J. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med*, 18(4), 572-579. doi:10.1038/nm.2667
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., . . . Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947-956. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16153702
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100(4), 391-398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693756>
- Brown, S., Teo, A., Pauklin, S., Hannan, N., Cho, C. H., Lim, B., . . . Vallier, L. (2011). Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells*, 29(8), 1176-1185. doi:10.1002/stem.666
- Burtscher, I., & Lickert, H. (2009). Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development*, 136(6), 1029-1038. doi:10.1242/dev.028415
- Callihan, P., Mumaw, J., Machacek, D. W., Stice, S. L., & Hooks, S. B. (2011). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 129(3), 290-306. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.10.007
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., & Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132(5), 885-896. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15673569
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643-655. doi:S0092867403003921 [pii]
- Chambers, I., & Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 136(14), 2311-2322. doi:10.1242/dev.024398
- Chaves-Perez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harreus, U., & Gires, O. (2013). EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene*, 32(5), 641-650. doi:10.1038/onc.2012.75
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., & Scadden, D. T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*, 287(5459), 1804-1808. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710306>
- Coucovanis, E., & Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell*, 83(2), 279-287. doi:10.1016/0092-8674(95)90169-8
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., . . . Hayes, D. F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351(8), 781-791. doi:10.1056/NEJMoa040766
- Curto, G. G., Nieto-Estevez, V., Hurtado-Chong, A., Valero, J., Gomez, C., Alonso, J. R., . . . Vicario-Abejon, C. (2014). Pax6 is essential for the maintenance and multi-lineage differentiation of neural stem cells, and for neuronal incorporation into the adult olfactory bulb. *Stem Cells Dev*, 23(23), 2813-2830. doi:10.1089/scd.2014.0058
- Detre, S., Saclani Jotti, G., & Dowsett, M. (1995). A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast

- carcinomas. *J Clin Pathol*, 48(9), 876-878. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7490328
- Dolle, L., Theise, N. D., Schmelzer, E., Boulter, L., Gires, O., & van Grunsven, L. A. (2015). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 308(4), G233-250. doi:10.1152/ajpgi.00069.2014
- Ertongur, S., Lang, S., Mack, B., Wosikowski, K., Muehlenweg, B., & Gires, O. (2004). Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer*, 110(6), 815-824. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170662
- Esner, M., Pachernik, J., Hampl, A., & Dvorak, P. (2002). Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies. *Int J Dev Biol*, 46(6), 817-825. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382948>
- Evseenko, D., Zhu, Y., Schenke-Layland, K., Kuo, J., Latour, B., Ge, S., . . . Crooks, G. M. (2010). Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(31), 13742-13747. doi:10.1073/pnas.1002077107
- Faial, T., Bernardo, A. S., Mendjan, S., Diamanti, E., Ortmann, D., Gentsch, G. E., . . . Pedersen, R. A. (2015). Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. *Development*, 142(12), 2121-2135. doi:10.1242/dev.117838
- Fong, D., Moser, P., Kasal, A., Seeber, A., Gastl, G., Martowicz, A., . . . Spizzo, G. (2014). Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology*, 64(5), 683-692. doi:10.1111/his.12307
- Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M., & Weber, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10), 5034-5038. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/368806>
- Frisch, S. M., & Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13(5), 555-562. doi:10.1016/s0955-0674(00)00251-9
- Garcia, C., Arias, M., & Villar, J. M. (1995). A morphological study of cultured endodermal cells of chick embryo: characteristics of adhesion, spreading and locomotion. *Anat Histol Embryol*, 24(3), 145-147. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546319>
- Gardner, R. L. (1983). Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol*, 24, 63-133. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6302028>
- Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., . . . Beckmann, M. P. (1991). Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J*, 10(10), 2839-2848. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1915266>
- Gires, O. (2009). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expression in adamantinomatous craniopharyngioma. *Ann Diagn Pathol*, 13(6), 428-429. doi:S1092-9134(09)00085-9 [pii] 10.1016/j.anndiagpath.2009.07.001
- Gires, O. (2012). EpCAM in hepatocytes and their progenitors. *J Hepatol*, 56(2), 490-492. doi:10.1016/j.jhep.2011.05.036
- Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., & Steinert, P. M. (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol*, 134(4), 971-983. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769421>

- Gonzalez, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M., & Gires, O. (2009). EpCAM Is Involved in Maintenance of the Murine Embryonic Stem Cell Phenotype. *Stem Cells*, 27(8), 1782-1791. doi:10.1002/stem.97
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev*, 22(17), 2308-2341. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18765787
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J., & van der Blik, A. M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*, 279(18), 18792-18798. doi:10.1074/jbc.M400920200
- Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G. M., Piantelli, M., & Alberti, S. (2012). mTrop1/Epcam Knockout Mice Develop Congenital Tufting Enteropathy through Dysregulation of Intestinal E-cadherin/beta-catenin. *PLoS ONE*, 7(11), e49302. doi:10.1371/journal.pone.0049302
[PONE-D-12-27522 \[pii\]](#)
- Halpern, B., Pejsachowicz, B., Febvre, H. L., & Barski, G. (1966). Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells. *Nature*, 209(5019), 157-159. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5912424>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2015). The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(4). doi:10.1101/cshperspect.a026609
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., & Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(3), 1438-1442. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=286328
- Holtzinger, A., Rosenfeld, G. E., & Evans, T. (2010). Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells. *Dev Biol*, 337(1), 63-73. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.003
- Hong, Y., Fang, F., & Zhang, Q. (2016). Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*, 49(6), 2206-2216. doi:10.3892/ijo.2016.3747
- Hooper, J. E., & Scott, M. P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4), 306-317. doi:10.1038/nrm1622
- Huang, H. P., Chen, P. H., Yu, C. Y., Chuang, C. Y., Stone, L., Hsiao, W. C., . . . Kuo, H. C. (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem*, 286(38), 33520-33532. doi:10.1074/jbc.M111.256164
- Janni, W. J., Rack, B., Terstappen, L. W., Pierga, J. Y., Taran, F. A., Fehm, T., . . . Lucci, A. (2016). Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 22(10), 2583-2593. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1603
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., . . . Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997. doi:10.1126/science.1247997
- Jojovic, M., Adam, E., Zangemeister-Wittke, U., & Schumacher, U. H. (1998). Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, 30(10), 723-729. Retrieved from

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9873999
- Kaizaki, R., Yashiro, M., Shinto, O., Yasuda, K., Matsuzaki, T., Sawada, T., & Hirakawa, K. (2009). Expression of ERas oncogene in gastric carcinoma. *Anticancer Res*, 29(6), 2189-2193. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528480>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kameda, T., & Thomson, J. A. (2005). Human ERas gene has an upstream premature polyadenylation signal that results in a truncated, noncoding transcript. *Stem Cells*, 23(10), 1535-1540. doi:10.1634/stemcells.2005-0054
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., . . . Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*, 129(10), 2367-2379. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973269>
- Kanke, K., Masaki, H., Saito, T., Komiyama, Y., Hojo, H., Nakauchi, H., . . . Ohba, S. (2014). Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports*, 2(6), 751-760. doi:10.1016/j.stemcr.2014.04.016
- Karvelis, T., Gasiunas, G., Miksys, A., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2013). crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol*, 10(5), 841-851. doi:10.4161/rna.24203
- Kawahara, Y., Manabe, T., Matsumoto, M., Kajiume, T., Matsumoto, M., & Yuge, L. (2009). LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS One*, 4(7), e6343. doi:10.1371/journal.pone.0006343
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Okita, K., Nakagawa, M., Yamakado, H., . . . Takahashi, J. (2017). Idiopathic Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells function as midbrain dopaminergic neurons in rodent brains. *J Neurosci Res*, 95(9), 1829-1837. doi:10.1002/jnr.24014
- Kim, P. T., Hoffman, B. G., Plesner, A., Helgason, C. D., Verchere, C. B., Chung, S. W., . . . Ong, C. J. (2010). Differentiation of mouse embryonic stem cells into endoderm without embryoid body formation. *PLoS One*, 5(11), e14146. doi:10.1371/journal.pone.0014146
- Kimelman, D., & Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25(57), 7482-7491. doi:10.1038/sj.onc.1210055
- Kishimoto, Y., Lee, K. H., Zon, L., Hammerschmidt, M., & Schulte-Merker, S. (1997). The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development*, 124(22), 4457-4466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409664>
- Klymkowsky, M. W. (1982). Vimentin and keratin intermediate filament systems in cultured Ptk2 epithelial cells are interrelated. *EMBO J*, 1(2), 161-165. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201355>
- Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 36(8), 765-771. doi:10.1038/nbt.4192
- Kozan, P. A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Mueller, J. L., Barrett, K. E., Marchelletta, R. R., & Sivagnanam, M. (2015). Mutation of EpCAM leads to intestinal barrier and ion transport dysfunction. *J Mol Med (Berl)*, 93(5), 535-545. doi:10.1007/s00109-014-1239-x
- Kuan, II, Liang, K. H., Wang, Y. P., Kuo, T. W., Meir, Y. J., Wu, S. C., . . . Wu, H. C. (2017). EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2alpha. *Sci Rep*, 7, 41852. doi:10.1038/srep41852
- Kubota, E., Kataoka, H., Aoyama, M., Mizoshita, T., Mori, Y., Shimura, T., . . . Joh, T. (2010). Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer. *Am J Pathol*, 177(2), 955-963. doi:10.2353/ajpath.2010.091056

- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., & Moon, R. T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*, *275*(17), 12701-12711. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777564>
- Kuo, C. T., Morrissey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., . . . Leiden, J. M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, *11*(8), 1048-1060. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9136932>
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*, *103*(5), 389-398. doi:10.1263/jbb.103.389
- Kwon, G. S., Fraser, S. T., Eakin, G. S., Mangano, M., Isern, J., Sahr, K. E., . . . Baron, M. H. (2006). Tg(Afp-GFP) expression marks primitive and definitive endoderm lineages during mouse development. *Dev Dyn*, *235*(9), 2549-2558. doi:10.1002/dvdy.20843
- Lane, E. B., Hogan, B. L., Kurkinen, M., & Garrels, J. I. (1983). Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. *Nature*, *303*(5919), 701-704. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6190091>
- Lang, Gudrun, Histotechnik, Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, 2.Auflage (2013), Springer
- Leahy, A., Xiong, J. W., Kuhnert, F., & Stuhlmann, H. (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool*, *284*(1), 67-81. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368935>
- Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., . . . Christofori, G. (2008). NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J*, *27*(19), 2603-2615. doi:10.1038/emboj.2008.178
- Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., . . . Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol*, *371*(2), 136-145. doi:S0012-1606(12)00363-6 [pii]
[10.1016/j.ydbio.2012.07.005](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.005)
- Lentjes, M. H., Niessen, H. E., Akiyama, Y., de Bruine, A. P., Melotte, V., & van Engeland, M. (2016). The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Rev Mol Med*, *18*, e3. doi:10.1017/erm.2016.2
- Lewis, S. L., & Tam, P. P. (2006). Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn*, *235*(9), 2315-2329. doi:10.1002/dvdy.20846
- Li, X., Chen, Y., Scheele, S., Arman, E., Haffner-Krausz, R., Ekblom, P., & Lonai, P. (2001). Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *J Cell Biol*, *153*(4), 811-822. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352941>
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., & Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, *105*(2), 635-637. doi:10.1182/blood-2004-07-2681
- Lichtenthaler, S. F., Haass, C., & Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis-- lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*, *117*(5), 779-796. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07248.x
- Lien, C. L., Wu, C., Mercer, B., Webb, R., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (1999). Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development*, *126*(1), 75-84. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834187>
- Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, *3*(9-10), 1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228

- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E., & Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 7(2), 165-171. doi:ncb1211 [pii] 10.1038/ncb1211
- Linask, K. K., & Lash, J. W. (1993). Early heart development: dynamics of endocardial cell sorting suggests a common origin with cardiomyocytes. *Dev Dyn*, 196(1), 62-69. doi:10.1002/aja.1001960108
- Lindinger, A., Schwedler, G., & Hense, H. W. (2010). Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin Padiatr*, 222(5), 321-326. doi:10.1055/s-0030-1254155
- Litvinov, S. V., Bakker, H. A., Gourevitch, M. M., Velders, M. P., & Warnaar, S. O. (1994). Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun*, 2(5), 417-428.
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., . . . Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*, 139(5), 1337-1348.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 125(2), 437-446. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8163559>
- Liu, X., Li, J., Cadilha, B. L., Markota, A., Voigt, C., Huang, Z., . . . Wang, H. (2019). Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv*, 5(6), eaav4275. doi:10.1126/sciadv.aav4275
- Liu, Y., Wang, Z., Li, H., Wu, Z., Wei, F., & Wang, H. (2013). Role of the ERas gene in gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 30(1), 50-56. doi:10.3892/or.2013.2417
- Löffler, Springer Verlag, Biochemie, 2014, S.216 f.
- Lu, H., Ma, J., Yang, Y., Shi, W., & Luo, L. (2013). EpCAM is an endoderm-specific Wnt derepressor that licenses hepatic development. *Dev Cell*, 24(5), 543-553. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.021
- Lu, T. Y., Lu, R. M., Liao, M. Y., Yu, J., Chung, C. H., Kao, C. F., & Wu, H. C. (2010). Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 285(12), 8719-8732. doi:M109.077081 [pii] 10.1074/jbc.M109.077081
- Maaser, K., & Borlak, J. (2008). A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer*, 99(10), 1635-1643. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19002182
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1), 9-26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., . . . Gires, O. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, 11(2), 162-171. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19136966
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., . . . Wixler, V. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol*, 159(1), 113-122. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12370240
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-7638. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6950406

- McGrew, D. A., & Knight, K. L. (2003). Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38(5), 385-432. doi:10.1080/10409230390242489
- Misaka, T., Miyashita, T., & Kubo, Y. (2002). Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 277(18), 15834-15842. doi:10.1074/jbc.M109260200
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>
- Miyajima, A., Tanaka, M., & Itoh, T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(5), 561-574. doi:10.1016/j.stem.2014.04.010
- Molkentin, J. D., Antos, C., Mercer, B., Taigen, T., Miano, J. M., & Olson, E. N. (2000). Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. *Dev Biol*, 217(2), 301-309. doi:10.1006/dbio.1999.9544
- Molkentin, J. D., & Olson, E. N. (1997). GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation*, 96(11), 3833-3835. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403603>
- Monaghan, A. P., Kaestner, K. H., Grau, E., & Schutz, G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*, 119(3), 567-578. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187630>
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., & Kamp, T. J. (2012). Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*, 111(3), 344-358. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512
- Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res*, 69(14), 5627-5629. doi:0008-5472.CAN-09-0654 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-09-0654
- Munz, M., Fellingner, K., Hofmann, T., Schmitt, B., & Gires, O. (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci*, 13, 5195-5201. doi:10.2741/3075
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., & Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23(34), 5748-5758. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15195135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15195135)
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., . . . Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 24(15), 6710-6718. doi:10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M. B., Hanson, J. C., Morasso, M. I., Tessarollo, L., . . . Udey, M. C. (2009). Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLoS ONE*, 4(12), e8543. doi:10.1371/journal.pone.0008543
- Nakhaei-Rad, S., Nakhaeizadeh, H., Gotze, S., Kordes, C., Sawitza, I., Hoffmann, M. J., . . . Ahmadian, M. R. (2016). The Role of Embryonic Stem Cell-expressed RAS (ERAS) in the Maintenance of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem*, 291(16), 8399-8413. doi:10.1074/jbc.M115.700088
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, 1(7), 841-845. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6329708>

- Niakan, K. K., Ji, H., Maehr, R., Vokes, S. A., Rodolfa, K. T., Sherwood, R. I., . . . Eggan, K. (2010). Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev*, 24(3), 312-326. doi:10.1101/gad.1833510
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379-391. doi:S0092-8674(00)81769-9 [pii]
- Nicola, N. A., & Babon, J. J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 533-544. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.001
- Nijmeijer, R. M., Leeuwis, J. W., DeLisio, A., Mummery, C. L., & Chuva de Sousa Lopes, S. M. (2009). Visceral endoderm induces specification of cardiomyocytes in mice. *Stem Cell Res*, 3(2-3), 170-178. doi:10.1016/j.scr.2009.06.003
- Niwa, H. (2000). [Self-renewal and differentiation of ES cells]. *Hum Cell*, 13(4), 161-175. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432365>
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., & Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, 278(10), 7743-7746. doi:10.1074/jbc.C200677200
- Pardal, R., Molofsky, A. V., He, S., & Morrison, S. J. (2005). Stem cell self-renewal and cancer cell proliferation are regulated by common networks that balance the activation of proto-oncogenes and tumor suppressors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 177-185. doi:10.1101/sqb.2005.70.057
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., & Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66(6), 1039-1056. doi:10.1007/s00018-009-8740-3
- Parish, C. R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*, 77(6), 499-508. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., . . . Gires, O. (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, 193(1), 25-32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12691820
- Poh, Y. C., Chen, J., Hong, Y., Yi, H., Zhang, S., Chen, J., . . . Wang, N. (2014). Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nat Commun*, 5, 4000. doi:10.1038/ncomms5000
- Prabhu, N. S., Somasundaram, K., Tian, H., Enders, G. H., Satyamoorthy, K., Herlyn, M., & El-Deiry, W. S. (1999). The administration schedule of cyclin-dependent kinase inhibitor gene therapy and etoposide chemotherapy is a major determinant of cytotoxicity. *Int J Oncol*, 15(2), 209-216. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10402229>
- Qu, L., & Koromilas, A. E. (2004). Control of tumor suppressor p53 function by endoplasmic reticulum stress. *Cell Cycle*, 3(5), 567-570. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107622>
- Ralhan, R., Cao, J., Lim, T., Macmillan, C., Freeman, J. L., & Walfish, P. G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*, 10, 331. doi:10.1186/1471-2407-10-331
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., & Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep*, 12(7), 720-726. doi:10.1038/embor.2011.88
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying

- antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), 3116-3120. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91164>
- Rodaway, A., & Patient, R. (2001). Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell*, 105(2), 169-172. doi:10.1016/s0092-8674(01)00307-5
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280(26), 24731-24737. doi:10.1074/jbc.M502573200
- Rodda, S. J., Kavanagh, S. J., Rathjen, J., & Rathjen, P. D. (2002). Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development. *Int J Dev Biol*, 46(4), 449-458. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141431>
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Holper, S., Kruger, M., & Stainier, D. Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524(7564), 230-233. doi:10.1038/nature14580
- Sarrach, S., Huang, Y., Niedermeyer, S., Hachmeister, M., Fischer, L., Gille, S., . . . Gires, O. (2018). Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Sci Rep*, 8(1), 1801. doi:10.1038/s41598-018-20131-8
- Sassoon, D. A., Garner, I., & Buckingham, M. (1988). Transcripts of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development*, 104(1), 155-164. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3075543>
- Schachterle, W., Rojas, A., Xu, S. M., & Black, B. L. (2012). ETS-dependent regulation of a distal Gata4 cardiac enhancer. *Dev Biol*, 361(2), 439-449. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.023
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H. L., . . . Reid, L. M. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*, 204(8), 1973-1987. doi:10.1084/jem.20061603
- Schnell, U., Kuipers, J., & Giepmans, B. N. (2013). EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci Rep*, 33(2), e00030. doi:10.1042/BSR20120128
- Schnitzer, J., Franke, W. W., & Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*, 90(2), 435-447. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7026573>
- Schultz, R. M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*, 15(8), 531-538. doi:10.1002/bies.950150806
- Searcy, R. D., Vincent, E. B., Liberatore, C. M., & Yutzey, K. E. (1998). A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development*, 125(22), 4461-4470. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778505>
- Seligson, D. B., Pantuck, A. J., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, M. H., . . . 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(8), 2659-2669. doi:10.1158/1078-0432.ccr-1132-03
- Shi, Y., Katsev, S., Cai, C., & Evans, S. (2000). BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol*, 224(2), 226-237. doi:10.1006/dbio.2000.9802
- Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol*, 4, 134. doi:10.3389/fcell.2016.00134
- Sinowatz, F., Topfer-Petersen, E., Kolle, S., & Palma, G. (2001). Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol*, 30(5), 257-263. doi:10.1046/j.1439-0264.2001.00337.x
- Sissman, N. J. (1970). Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. *Am J Cardiol*, 25(2), 141-148. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413193>

- Sivagnanam, M., Mueller, J. L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S. F., Turner, D., . . . Hoffman, H. M. (2008). Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology*, *135*(2), 429-437. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.036
- Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C. A., Narita, N., Saffitz, J. E., . . . Wilson, D. B. (1995). Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development*, *121*(11), 3877-3888. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582296>
- Spizzo, G., Fong, D., Wurm, M., Ensinger, C., Obrist, P., Hofer, C., . . . Went, P. (2011). EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*, *64*(5), 415-420. doi:jcp.2011.090274 [pii] 10.1136/jcp.2011.090274
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P. A., . . . 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*, *103*(2), 483-488. doi:10.1016/j.ygyno.2006.03.035
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., . . . Gastl, G. (2004). High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *86*(3), 207-213. doi:10.1023/B:BREA.0000036787.59816.01
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62-67. doi:10.1038/nature13011
- Sweetman, D., Wagstaff, L., Cooper, O., Weijer, C., & Munsterberg, A. (2008). The migration of paraxial and lateral plate mesoderm cells emerging from the late primitive streak is controlled by different Wnt signals. *BMC Dev Biol*, *8*, 63. doi:10.1186/1471-213X-8-63
- Tada, S., Era, T., Furusawa, C., Sakurai, H., Nishikawa, S., Kinoshita, M., . . . Nishikawa, S. (2005). Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development*, *132*(19), 4363-4374. doi:10.1242/dev.02005
- Takahashi, K., Mitsui, K., & Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, *423*(6939), 541-545. doi:10.1038/nature01646
nature01646 [pii]
- Takahashi, K., Murakami, M., & Yamanaka, S. (2005). Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans*, *33*(Pt 6), 1522-1525. doi:10.1042/BST20051522
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16904174
- Takasato, M., & Little, M. H. (2015). The origin of the mammalian kidney: implications for recreating the kidney in vitro. *Development*, *142*(11), 1937-1947. doi:10.1242/dev.104802
- Tamm, C., Pijuan Galito, S., & Anneren, C. (2013). A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One*, *8*(12), e81156. doi:10.1371/journal.pone.0081156
- ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., & Nusse, R. (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*, *3*(5), 508-518. doi:10.1016/j.stem.2008.09.013
- Teo, A. K., Arnold, S. J., Trotter, M. W., Brown, S., Ang, L. T., Chng, Z., . . . Vallier, L. (2011). Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes Dev*, *25*(3), 238-250. doi:10.1101/gad.607311

- Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavsic, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., . . . Gires, O. (2016). Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). *J Biol Chem*, 291(1), 425. doi:10.1074/jbc.A115.662700
- van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205-3214. doi:10.1242/dev.033910
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, 9(5), e96801. doi:10.1371/journal.pone.0096801
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. doi:10.1126/science.1062023
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P., Nevo, J., Gjerdrum, C., . . . Ivaska, J. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 30(12), 1436-1448. doi:10.1038/onc.2010.509
- Wang, M. H., Sun, R., Zhou, X. M., Zhang, M. Y., Lu, J. B., Yang, Y., . . . Mai, S. J. (2018). Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Cell Death Dis*, 9(1), 2. doi:10.1038/s41419-017-0013-8
- Wang, X., & Yang, P. (2008). In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *J Vis Exp*(17). doi:10.3791/825
- Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P., & Xia, Q. (2015). 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep*, 5, 16273. doi:10.1038/srep16273
- Weismann A. (1883). Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydromedusen“ (Fischer)
- Wells, J. M., & Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 393-410. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.393
- Weston, S. A., & Parish, C. R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*, 133(1), 87-97. doi:10.1016/0022-1759(90)90322-m
- Wu, C. J., Feng, X., Lu, M., Morimura, S., & Udey, M. C. (2017). Matriptase-mediated cleavage of EpCAM destabilizes claudins and dysregulates intestinal epithelial homeostasis. *J Clin Invest*, 127(2), 623-634. doi:10.1172/JCI88428
- Wu, S. K., & Yap, A. S. (2013). Patterns in space: coordinating adhesion and actomyosin contractility at E-cadherin junctions. *Cell Commun Adhes*, 20(6), 201-212. doi:10.3109/15419061.2013.856889
- Yamaguchi, T. P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., & McMahon, A. P. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*, 13(24), 3185-3190. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617567>
- Yoon, S. M., Gerasimidou, D., Kuwahara, R., Hytioglou, P., Yoo, J. E., Park, Y. N., & Theise, N. D. (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology*, 53(3), 964-973. doi:10.1002/hep.24122
- Yu, G., Zhang, X., Wang, H., Rui, D., Yin, A., Qiu, G., & He, Y. (2008). CpG island methylation status in the EpCAM promoter region and gene expression. *Oncol Rep*, 20(5), 1061-1067. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949402>
- Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M. W., Donaldson, M. C., . . . Haber, D. A. (2014). Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*, 345(6193), 216-220. doi:10.1126/science.1253533
- Yu, T., Ma, Y., & Wang, H. (2017). EpCAM Intracellular Domain Promotes Porcine Cell Reprogramming by Upregulation of Pluripotent Gene Expression via Beta-catenin Signaling. *Sci Rep*, 7, 46315. doi:10.1038/srep46315

- Zhao, Z., Francis, C. E., Welch, G., Loscalzo, J., & Ravid, K. (1997). Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1359(2), 143-152. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409811>
- Zhao, Z. A., Yu, Y., Ma, H. X., Wang, X. X., Lu, X., Zhai, Y., . . . Li, L. (2015). The roles of ERAS during cell lineage specification of mouse early embryonic development. *Open Biol*, 5(8). doi:10.1098/rsob.150092
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12), e103. doi:10.1093/nar/gnh101

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1: Schema einer Blastocyste.	6
Abbildung 1. 2: Schema zur Differenzierung mesodermaler Zellen.....	7
Abbildung 1. 3: Beispielhaft ist die Entstehung einiger mesodermaler Organe gezeigt.	8
Abbildung 1. 4: Struktur des humanen EpCAM Proteins (nach Schnell et al. 2013)...	14
Abbildung 1. 5: ERas wird auf dem X-Chromosom kodiert.....	19
Abbildung 3. 1: Hanging drop (HD) Methode.....	32
Abbildung 3. 2: Das verwendete CRISPR-Cas9 Plasmid von SigmaAldrich GmbH...	35
Abbildung 3. 3: Schema der nested PCR.....	43
Abbildung 4. 1: Kultivierung unter FGF2 und Retinsäure steuert die endodermale Differenzierung von ES Zellen.....	48
Abbildung 4. 2: Morphologie von E14TG2a ESC nach endodermaler in vitro Differenzierung.	49
Abbildung 4. 3: EpCAM KO, die keine Kardiomyozyten bilden, weisen eine geringere endodermale Differenzierung auf	51
Abbildung 4. 4: EpCAM, FoxA 2 und GATA 4 weisen eine Kolokalisation in differenzierten EBs auf	53
Abbildung 4. 5: 5 von 6 EpCAM KOs zeigen eine geringere FoxA2 Expression als wildtypische EBs.....	54
Abbildung 4. 6: 4 von 6 EpCAM KOs zeigen eine tendenziell geringere GATA 4 Expression.....	55
Abbildung 4. 7: Stabile YFP und mCherry Expression in ESC Klonen.	57
Abbildung 4. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Ko-Kultur wildtypischer und EpCAM-KO ESC Klonen.....	58
Abbildung 4. 9: Expression des kardiomyozytären Markers α -CAA in wildtypischen und EpCAM-KO ESCs nach Ko-Kultur in Embryoid Bodies.	59
Abbildung 4. 10: Mischkulturen waren nicht in der Lage mehr Kardiomyozyten zu bilden als EpCAM-KOs.	61
Abbildung 4. 11: Murine embryonale Stammzellen differenzieren unter dem Einfluss von CHIR und Cyclopamine zu mesodermalen Zellen. Modifiziert von Kanke et al. (2014)	61

Abbildung 4. 12: EpCAM defiziente Zelllinien haben eine verminderte Kapazität mesodermal zu differenzieren.	63
Abbildung 4. 13: Im Monolayer geht der EpCAM-Verlust mit einer gemischten Veränderung der Vimentin-Expression einher	65
Abbildung 4. 14: Immunhistochemischer Nachweis der Vimentin-Expression in EpCAM-KOs im Vergleich zum WT.....	66
Abbildung 4. 15: EpCAM KOs zeigen im Vergleich zum WT eine verminderte Expression der Pluripotenzfaktoren Oct 4, Sox2, Nanog unter Pluripotenzbedingungen und eine erhöhte Expression bei Differenzierung	68
Abbildung 4. 16: Schema des hypothetischen EpCAM/ERas/Akt-Signalweges	71
Abbildung 4. 17: CRISPR-Cas9-vermittelte Mutation und Knockout von ERas in ESC	72
Abbildung 4.18: Nachweis der mutierten ERas DNA durch Annealing mit wildtypischer DNA.....	73
Abbildung 4. 19: Die homologe Rekombination (McGrew & Knight, 2003).....	74
Abbildung 4. 20: Doppelknockout von EpCAM und ERas in ESC Linien.....	77
Abbildung 4. 21: Untersuchung der kardiomyozytären Differenzierung in EpCAM/ERas-DKO.....	77
Abbildung 4. 22: Der Zellzyklus	79
Abbildung 4. 23: Murine embryonale Stammzellen die unter LIF kultiviert wurden, proliferierten schneller als nach LIF-Entzug.....	80
Abbildung 4. 24: Unter Pluripotenzbedingungen zeigt sich in vier von sechs Klonen eine signifikant ($p \leq 0,05$) verminderte Zellteilungsrate	81
Abbildung 4. 25: Auch unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich eine verminderte Proliferation	82
Abbildung 4. 26: Nachweis der Proliferation mittels CFSE-Färbung.....	84
Abbildung 4. 27: Langsamer proliferierende Zelllinien bilden kleinere EBs.	86
Abbildung 4. 28: Nach ERas-KO zeigen die Zelllinien, deren EpCAM-KO die EB-Größe nicht signifikant beeinflusst hatte eine Reduktion der EB-Größe	88
Abbildung 4. 29: Skizze eines EB an Tag 5 der Differenzierung nach Rodda et al. (2002)	89
Abbildung 4. 30: (A) Embryologie der Maus im Vergleich zur (B) Entwicklung von Embryoid bodies (Leahy et al., 1999).....	91
Abbildung 4. 31: Oberflächenstruktur von EBs aus wildtypischen ESC und EpCAM Knockout ESC.	93

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4. 32: Oberflächenstruktur wildtypischer EBs im Vergleich zu EBs aus EpCAM-KO ESC	94
Abbildung 4. 33: Vergleich der Sphäroide aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Tumorzellen auf 1%igem Agarosegel.....	96
Abbildung 4. 34: Größenbestimmung der Sphäroide aus CTCs und 4T1-Zellen.....	97

10.Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Chemikalien.....	23
Tabelle 2: verwendete Kits	24
Tabelle 3: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 4: verwendete Geräte	25
Tabelle 5: verwendete Primärantikörper	26
Tabelle 6: verwendete Sekundärantikörper	26
Tabelle 7: verwendete Primer.....	27
Tabelle 8: verwendete Plasmide.....	28
Tabelle 9: verwendete Zelllinien	28
Tabelle 10: verwendete Dienstleistungen.....	28
Tabelle 11: Stammlösungen für die Zellkultur.....	30
Tabelle 12: Puffer und Färbelösung	33
Tabelle 13: Reagenzien für Western Blot.....	37
Tabelle 14: Puffer und Zentrifugationsschritte zur DNA-Extraktion.....	40
Tabelle 15: Puffer und Zentrifugationsschritte zur RNA-Extraktion.....	41
Tabelle 16: Reagenzien für PCR.....	42
Tabelle 17: PCR-Protokoll	42
Tabelle 18: Nested PCR-Protokoll.....	42
Tabelle 19: Reagenzien für qPCR	44
Tabelle 20: qPCR-Protokoll	44
Tabelle 21: Anzahl deletierter Basenpaare und resultierende ERas Proteine nach CRISPR-Cas9 Knockout.....	75

11. Abkürzungsverzeichnis

ADAM	a disintegrin and metalloprotease		
Ak	Antikörper		
APP	amyloid precursor protein		
Aqua dest.	destilliertes Wasser		
BMP	Bone Morphogenic Protein		
bzw.	beziehungsweise		
°C	Grad Celsius		
CAA	<i>cardiac actin</i>		
ca.	circa		
cDNA	komplementäre DNA		
CTCs	circulating tumor cells		
CTE	congenital tufting enteropathy		
CTF	C-terminales Fragment		
d	Tag		
Da	Dalton		
d.h.	das heißt		
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure		
EMT	epithelial-mesenchymale Transition		
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül		
EpEx	extrazellulärer Domäne von EpCAM		
EpICD	intrazelluläre Domäne von EpCAM		
ERas	ES-cell expressed Ras		
FACS	Fluorescence activated cell sorter		
FKS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)		
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat		
<i>et al.</i>	<i>et alii (und andere)</i>		
g	Erdbeschleunigung		
g	Gramm		
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		
GFP	green fluorescent protein		
gRNA	guided RNA		
Gusb	Glucuronidase		
h	Stunde		
H ₂ O	Wasser		
HRP	<i>Horse</i>	<i>Radish</i>	<i>Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin		G
IgM	Immunglobulin M		
k	Kilo		
kb	Kilobasen		
l	Liter		
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>		
μ	Mikro		
min	Minute		

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TF	Tev-Flag
TIC	<i>Tumor initiating cell</i> (Tumor initiiierende Zelle)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot
Wnt	Wingless und Int-1
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

12.Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Prof. Olivier Gires für die Überlassung dieses interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während der gesamten Promotionsarbeit.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des HNO-Labors, die mich stetig unterstützt haben.

Schließlich danke ich auch meiner Familie für ihre Unterstützung und Ermutigung.

13.Publikation

Sarrach, S., Huang, Y., Niedermeyer, S., Hachmeister, M., Fischer, L., Gille, S., Pan, M., Mack, B., Kranz, G., Libl, D., Merl-Pham, J., Hauck, S. M., Paoluzzi Tomada, E., Kieslinger, M., Jeremias, I., Scialdone, A., & Gires, O. (2018). Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Sci Rep*, 8(1), 1801. doi: 10.1038/s41598-018-20131-8