

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Leiter der HNO-Forschung: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

**„Proteolytische Spaltung und Signaltransduktion des tumorassoziierten
Antigens EpCAM in murinen Teratom- und embryonalen Stammzellen“**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Matthias Hachmeister

aus Hannover

Februar 2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ludger Klein

Dekan: Prof. Dr.med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2014

Eidesstattliche Versicherung

Hachmeister, Matthias

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Proteolytische Spaltung und Signaltransduktion des tumorassoziierten Antigens EpCAM in murinen Teratom- und embryonalen Stammzellen“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftentum 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, den 20.10.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Krebs.....	8
1.1.1	Karzinogenese.....	8
1.1.2	Modelle der Krebsentstehung.....	10
1.2	Stammzellen.....	12
1.2.1	Signaltransduktionswege der Pluripotenz	13
1.2.2	Embryonale Karzinomzellen (Teratokarzinom Zellen)	14
1.2.3	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)	14
1.2.4	Stammzellen in der Regenerativen Medizin	15
1.2.5	Stammzellmarker.....	16
1.3	EpCAM	16
1.3.1	<i>Epcam</i> -Gen	17
1.3.2	Struktur des EpCAM-Proteins.....	18
1.3.3	EpCAM als Zelladhäsionsprotein	19
1.3.4	Spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen	20
1.3.5	EpCAM als Wnt-Derepressor bei der hepatozellulären Entwicklung im Zebrafisch.....	21
1.3.6	EpCAM-Expression und -Funktion in ES-Zellen sowie bei der induzierten Pluripotenz.....	22
1.3.7	Funktionelle Untersuchungen von EpCAM in Knockout-Modellen	24
2	Zielsetzung.....	26
3	Material.....	27
3.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
3.1.1	Chemikalien und Kits.....	27
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.3	Geräte	29
3.1.4	Dienstleistungen	29
3.2	Puffer und Stammlösungen	29
3.3	Antikörper	32

3.4	Oligonukleotide	32
3.4.1	Primer.....	32
3.4.2	siRNA.....	33
3.5	Plasmide.....	34
3.6	Bakterien- und Hefestämme.....	34
3.7	Zelllinien.....	35
4	Methoden.....	36
4.1	Molekularbiologische Methoden	36
4.1.1	Agarose Gelelektrophorese.....	36
4.1.2	DNA-Präparation.....	36
4.1.3	RNA-Präparation und cDNA-Synthese	36
4.1.4	Real Time quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction).....	36
4.1.5	Standard PCR (Polymerase Chain Reaction).....	37
4.1.6	Yeast-Two-Hybrid-System	37
4.2	Bakterienkultur.....	38
4.2.1	Vermehrung und Aufbewahrung.....	38
4.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	38
4.2.3	Transformation von <i>E.coli</i>	39
4.3	Hefekultur	39
4.3.1	Vermehrung und Aufbewahrung.....	39
4.3.2	Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen	39
4.3.3	Transformation von Hefezellen	39
4.4	Zellkultur	40
4.4.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Zelllinien	40
4.4.2	Transfektion und Selektion verschiedener Zelllinien.....	40
4.4.3	Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten.....	40
4.5	Proliferationsassays.....	41
4.5.1	Durchflusszytometrie-Kügelchen.....	41

4.5.2	Mischkulturen.....	41
4.6	Durchflusszytometrie	42
4.6.1	Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen	42
4.6.2	YFP-Expression.....	42
4.7	Western-Blot.....	42
4.8	Ko-Immunopräzipitation.....	43
4.9	Spaltungsassay in gereinigten Membranfraktionen (Membranassay).....	44
4.10	Genexpression mittels cRNA-Microarray.....	44
4.11	Life cell imaging.....	45
4.12	SILAC-basierte Interaktionsstudie von mEpCAM	45
4.13	Bestimmung der Schnittstellen von mEpCAM	45
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Spaltung von mEpCAM	48
5.2	Bestimmung der extrazellulären Spaltsequenzen von mEpCAM.....	51
5.2.1	Charakterisierung beteiligter Proteasen.....	53
5.2.2	Vergleich der extrazellulären Schnittstellen von murinem mit humanem EpCAM sowie von murinem EpCAM mit murinem Trop2.....	54
5.2.3	Konservierung der α - und β -Schnittstellen	56
5.3	Bestimmung der γ -und ϵ -Spaltstellen von mEpCAM	57
5.3.1	Proteasomaler Abbau von EpICD.....	60
5.3.2	Lokalisation des intrazellulären Spaltproduktes (EpICD)	66
5.4	Genregulation von mEpCAM in ES-Zellen (cRNA) Microarray	68
5.4.1	Bestimmung der Ausgangsparameter für den cRNA-Array	69
5.4.2	Bestimmung der Qualität der RNA und Messung des cRNA-Microarray.....	70
5.4.3	Vulkan-Blot der Mikroarray Daten (Einfluss des Knockdowns von mEpCAM)	71
5.5	Proteinregulation von mEpCAM in ES-Zellen (Massenspektrometrie)	73
5.5.1	Vulkan-Blot Proteomic (Einfluss des Knockdowns von mEpCAM)	74
5.6	Proteinregulation durch mEpCAM-CTF in murinen Teratokarzinomzellen	75
5.6.1	Bestimmung der Ausgangsparameter	75

5.6.2	Proteinregulationen bei mEpCAM-CTF Überexpression bzw. DAPT-Behandlung.....	76
5.7	Spaltungsabhängige Proliferation	77
5.8	Yeast-Two-Hybrid-Interaktion.....	78
5.9	SILAC-Interaktionsstudie.....	80
5.9.1	Interaktionspartner von mEpCAM und mEplCD in murinen Teratokarzinom-Zellen	82
5.9.2	Lysosomaler Abbau von mEpCAM.....	86
5.9.3	Akt-Phosphorylierung	88
6	Diskussion.....	93
6.1	Spaltung von mEpCAM	95
6.1.1	EplCD-vermittelte Signaltransduktion in murinen ES- und Teratokarzinom-Zellen	100
6.1.2	Physiologische Bedeutung der Spaltung von mEpCAM	101
6.2	Modell zur EpCAM-vermittelten Akt-Phosphorylierung.....	102
6.2.1	Bedeutung der PI3K-Akt Signalkaskade bei der Karzinogenese	106
6.3	Transport von EpCAM in Membranvesikeln	107
6.3.1	Endozytose von EpCAM	108
6.3.2	Intrazellulärer Transport von EpCAM innerhalb von Membranvesikeln	110
7	Ausblick	113
8	Zusammenfassung	115
9	Summary	116
10	Literaturverzeichnis.....	117
11	Abbildungsverzeichnis.....	135
12	Tabellenverzeichnis	137
13	Abkürzungsverzeichnis	138
14	Danksagung	139
15	Publikationen.....	140

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahre 2008 13% aller Todesursachen auf eine Krebserkrankung zurückzuführen (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

Wegen der vielfältigen Ursachen der Entstehung von Krebs gestaltet sich die Therapie als sehr schwierig. Für die Entwicklung neuer Ansätze in der Krebstherapie ist ein detailliertes Verständnis der molekularen Ursachen der Krebsentstehung essentiell. Insbesondere sind solche Therapieansätze, die auf den einzelnen Patienten zugeschnitten sind und die unter dem Begriff der personalisierten Medizin zusammengefasst werden, als besonders hoffnungsvoll einzustufen. Hierbei wird die Krebsbehandlung unter anderem basierend auf diagnostischen Markern individuell festgelegt. Aufgrund von methodischen Verbesserungen bei den Proteomics-Technologien und der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung ist mit einer Erweiterung solcher diagnostischer Marker, die zudem therapeutisch genutzt werden können, zu rechnen.

1.1.1 Karzinogenese

Die Karzinogenese bezeichnet die Prozesse der Krebsentstehung bei Zellen epithelialen Ursprungs, *i.e.* die Bildung von Karzinomen. Die molekularen Ursachen der Karzinogenese sind vielfältig. Hierbei ist eine Reihe von Veränderungen in der Zellphysiologie Voraussetzung (siehe Abbildung 1). Zu den ursächlichen Faktoren der Krebsentstehung werden eine nachhaltige Veränderung von proliferativen Signalwegen, der Sensitivitätsverlust gegenüber proliferationsinhibierenden Signalen, ein uneingeschränktes replikatives Wachstumspotenzial, die Metastasierung, eine verstärkte Angiogenese sowie die Resistenz gegenüber Apoptose gezählt (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Außerdem wurde vorgeschlagen physiologische Veränderungen, die zur Verhinderung einer Immunantwort gegen den Tumor führen, und Stoffwechselveränderungen, die zu einer verbesserten Adaption der Krebszellen an die Mikroumgebung führen, als wichtige Faktoren der Karzinogenese ebenfalls zu berücksichtigen (Hanahan and Weinberg, 2011). Des Weiteren tragen Entzündungsreaktionen sowie eine genomische Instabilität zur Krebsentstehung bei.

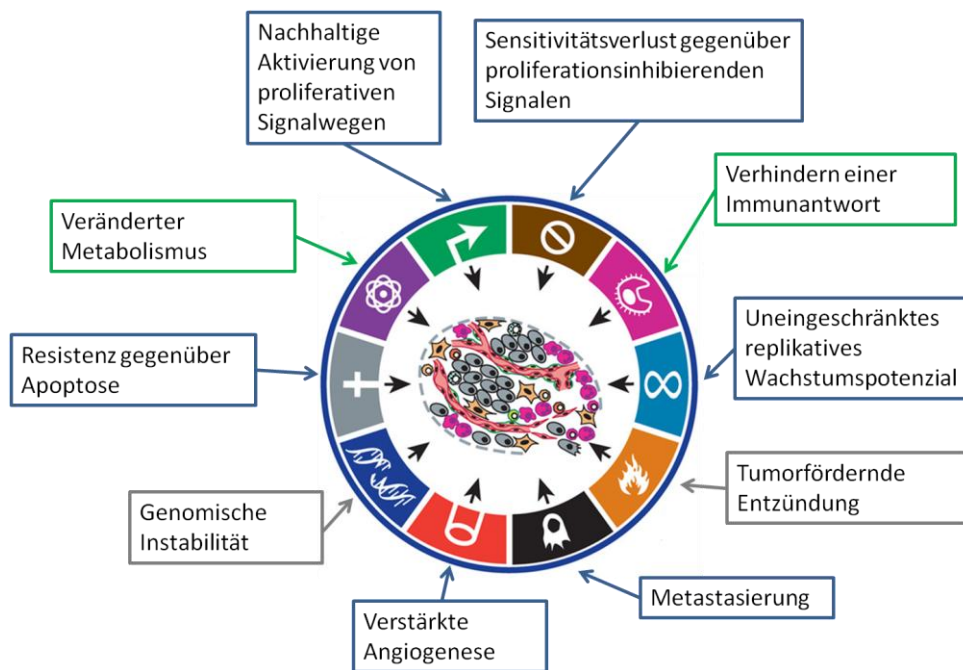


Abbildung 1: Veränderungen der Zellphysiologie bei der Karzinogenese.

Blau: Klassische Veränderungen in Zellen, die zur Karzinogenese führen. **Grün:** Erweiterte Faktoren, die zur Karzinogenese beitragen. **Grau:** Charakteristika, die eine Karzinogenese unterstützen. Die Abbildung wurde in adaptierter Form übernommen von (Hanahan and Weinberg, 2011).

Aufgrund von methodischen Verbesserungen bei der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung, konnte eine Reihe von onkogenen Mutationen in Genomen von Krebszellen identifiziert werden. Im Allgemeinen treten onkogene Mutationen entweder in Proto-Onkogenen oder in Tumorsuppressorgenen auf.

Proto-Onkogene kontrollieren die Zellproliferation. Bestimmte Mutationen führen zu deren permanenter Aktivierung und damit zur unkontrollierten Zellteilung. In diesem Fall wird das Proto-Onkogen durch Mutation in ein Onkogen umgewandelt. Insbesondere wurden Mutationen in Genen identifiziert, die bei der Signalweiterleitung durch Rezeptoren, die über Wachstumsfaktoren aktiviert werden, beteiligt sind. Zum Beispiel konnte in 40% aller Patienten mit Melanomen eine Mutation im B-Raf-Protein identifiziert werden, die zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges führt (Davies and Samuels, 2010). Weitere prominente Beispiele sind Mutationen in den Genen der Rezeptor-Tyrosinkinasen KIT und MET. Außerdem wurden Mutationen identifiziert, die zu einer permanenten Aktivierung der Enzyme PI3-Kinasen und Akt führen.

Tumorsuppressorgene hemmen oder verlangsamen eine unerwünschte Zellteilung, ermöglichen die Reparatur von Mutationen oder initiieren gegebenenfalls den programmierten Zelltod (Sherr, 2004). Inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressoren sind an der Karzinogenese beteiligt. Besonders häufig treten Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TP53 (p53), BRCA1, BRCA2,

APC und RB1 auf. Des Weiteren wurden in einer Vielzahl von Krebszellen inaktivierende Mutationen von PTEN dem Gegenspieler von PI3-Kinasen identifiziert (Jiang and Liu, 2008; Yuan and Cantley, 2008). Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, sind die molekularen Ursachen der Karzinogenese vielfältig und lassen sich nicht auf einen einzelnen deregulierten Signaltransduktionsweg reduzieren.

1.1.2 Modelle der Krebsentstehung

Die klonale Selektionstheorie wurde 1976 von Peter Nowell beschrieben (Nowell, 1976). In dem Modell der klonalen Selektionstheorie wird von der sukzessiven Ansammlung von Mutationen in Genen ausgegangen, die für die oben genannten Bereiche essentiell sind. Bestimmte Mutationen in einzelnen Zellen führen zu einem Selektionsvorteil, so dass sich diese Mutanten in der Gesamtzellpopulation durchsetzen können. Es findet also eine ständige Selektion nach Mutationen statt, die zu einer erhöhten Zellteilung und verbesserten Anpassung an die zelluläre Umgebung führen. Das Modell der klonalen Selektionstheorie zur Krebsentstehung lässt sich daher vereinfacht als Darwins Evolutionstheorie auf zellulärer Ebene verstehen. Auch nach der Entstehung eines Tumors findet eine fortdauernde Selektion statt. Einzelne Krebszellen weisen eine Verdopplungszeit von 1-2 Tagen auf, während Tumore sich erst nach einer Zeitspanne von 60-200 Tagen verdoppeln (Malaise et al., 1973). Somit stirbt ein großer Anteil der Krebszellen, bevor sie sich teilen können, sodass ein hoher Selektionsdruck im Tumor vorherrscht (Greaves and Maley, 2012). Gemäß der klonalen Selektionstheorie weisen alle Tumorzellen ein ähnliches tumorigenes Potential auf.

In den letzten Jahren gewann die Krebsstammzelltheorie an Bedeutung. Die Grundlage dieses Modells basiert auf den Erkenntnissen aus Xenotransplantationen von Tumorzellen. Hierbei wurde gezeigt, dass lediglich eine kleine Subpopulation an Zellen im Tumor das Potenzial hat, neue Tumore zu bilden. Diese Zellen werden als Tumor-induzierende Zellen (TICs) oder als Krebsstammzellen bezeichnet. Im Allgemeinen ist eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten zwischen TICs und Stammzellen beschrieben. Erstens haben adulte Stammzellen und TICs ein ähnliches Profil im Transkriptom (Hanahan and Weinberg, 2011). Zweitens haben beide Zelltypen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Drittens ist eine Stammzelltransplantation in Mausexperimenten häufig mit der Bildung von Teratomen verbunden (McKay, 2000). Die Eigenschaft von embryonalen Stammzellen, Teratome zu bilden zeigt deutlich, dass diese ein Tumor-induzierendes Potenzial haben und daher das entscheidende Charakteristikum von TICs aufweisen. Viertens zeigen Stamm- wie auch Krebszellen keine Kontaktinhibierung und proliferieren ohne Adhärenz (Takahashi et al., 2005). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde diskutiert, dass TICs aus gesunden Stammzellen hervorgehen (Visvader and Lindeman, 2008).

Wegen der Fähigkeit dieser Zellen Tumore zu bilden, wird im Folgenden die Bezeichnung „Tumor-induzierende Zellen (TIC)“ weiter verwendet. TICs weisen ein spezielles Expressionsprofil von bestimmten Membranproteinen auf. Anhand dieser Zelloberflächenmarker können TICs isoliert werden. Typische Marker für TICs sind neben EpCAM die Proteine CD20, CD24, CD34, CD44, CD45, CD133 und CD166 sowie Sca-1+.

CD20 ist an der T-Zell-unabhängigen Immunantwort beteiligt (Kuijpers et al., 2010). Bei CD24 handelt es sich um GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker-assoziiertes Membranprotein. CD24 verstärkt die Invasion von Tumorzellen durch Reprimierung von TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor-2) (Bretz et al., 2012). Der Zelloberflächenmarker CD31 wird auch als PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule -1) bezeichnet und ist bei der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel involviert (Piali et al., 1995). Außerdem wurde CD31 als Regulator von G-Proteingekoppelten Rezeptoren identifiziert (Yeh et al., 2008). CD34 wurde als Regulator der hämatopoetischen Zelladhäsion beschrieben (Healy et al., 1995). Der TIC-Marker CD44 moduliert Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen unter anderem durch Bindung an Hyaluronsäure (Goodison et al., 1999). CD44 ist an der Regulation von Genen beteiligt, die bei der Pluripotenz involviert sind (Zoller, 2011). Jedoch wird CD44 keine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps zugeschrieben. Außerdem ist CD44 bei der EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) sowie der Resistenzentwicklung von Apoptose involviert (Zoller, 2011). CD45 ist bei der Aktivierung von T-Zellen beteiligt (Altin and Sloan, 1997). Der Marker CD133 wird in der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne durch die Src-Kinase phosphoryliert (Boivin et al., 2009). Die Phosphorylierung von CD133 führt in neuronalen Stammzellen durch Bindung an die regulatorische Untereinheit von PI3K (p85) zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Wei et al., 2013). Außerdem wurde beschrieben, dass in CD133-positiven TICs vom Kolon der Akt- sowie der MAPK-Signalweg aktiviert sind (Wang et al., 2010).

Häufig kommen auch Kombinationen von Zelloberflächenmarkern für die Isolierung von Tumor-induzierenden Zellen (TICs) zum Einsatz. Zum Beispiel wird EpCAM in Kombination mit CD24 und CD44 beim Mamma- und Pankreaskarzinom sowie, in Kombination mit CD44 und CD166, beim kolorektalen Karzinom zur Isolierung von Tumor-induzierenden Zellen (TICs) eingesetzt. Weitere Kombinationen von Markern in Abhängigkeit vom Tumor-Typ sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Etablierte Marker für Tumor-induzierende Zellen (TICs).

Tumor Typ	Zelloberflächenmarker	Referenz
akute lymphatische Leukämie	CD34 ⁺ , CD38 ⁻	(Bonnet and Dick, 1997)
Mammakarzinom	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , EpCAM ⁺	(Al-Hajj et al., 2003)
Hirntumor	CD133 ⁺	(Singh et al., 2004)
Kolonkarzinom	CD133 ⁺	(Ricci-Vitiani et al., 2007)
kolorektales Karzinom	EpCAM ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺	(Dalerba et al., 2007)
Karzinom im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich	CD44 ⁺	(Prince et al., 2007)
hepatozelluläres Karzinom	CD133 ⁺	(Suetsugu et al., 2006)
Lungen Adenokarzinom	Sca-1 ⁺ , CD45 ⁻ , CD31 ⁺ , CD34 ⁺	(Kim et al., 2005)
metastasierendes Melanom	CD20 ⁺	(Fang et al., 2005)
Pankreaskarzinom	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , EpCAM ⁺	(Li et al., 2007)
Prostatakarzinom	CD133 ⁺	(Collins et al., 2005)

Die hier dargestellten Krebsstammzellmarker CD133 ((Jaksch et al., 2008)) und EpCAM (Gonzalez et al., 2009; Lu et al., 2010; Ng et al., 2010) werden auch von embryonalen Stammzellen exprimiert. Hingegen wird CD44 erst nach Differenzierung von murinen ES-Zellen gebildet (Haegel et al., 1994).

1.2 Stammzellen

Zellen, die in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können, werden als Stammzellen bezeichnet. Man unterscheidet embryonale und adulte Stammzellen. Während embryonale Stammzellen die Fähigkeit haben sich in jegliches Gewebe zu entwickeln, weisen adulte Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial auf. Bei embryonalen Stammzellen wird zudem zwischen Totipotenz und Pluripotenz unterschieden. Totipotente embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit sowohl in extraembryonale Gewebe wie z.B. in Zellen der Plazenta, wie auch in alle Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) zu differenzieren. Daher haben diese die Fähigkeit einen vollständigen Organismus zu bilden. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten Blastozysten isoliert werden, sind pluripotent, d.h. sie haben das Potenzial, sich in jede Körperzelle zu differenzieren. Jedoch haben diese nicht die Fähigkeit, extraembryonales Gewebe zu bilden (Evans and Kaufman, 1981). Stammzellen, die sich zu verschiedenen Zelltypen einer bestimmten Linie entwickeln können, werden aufgrund ihres eingeschränkten Entwicklungspotenzials als multipotent bezeichnet.

Bei der symmetrischen Zellteilung behalten die beiden resultierenden Zellen den Stammzellphänotyp bei. Hingegen entstehen bei der asymmetrischen Zellteilung eine differenzierte sowie eine pluripotente Stammzelle. Die Regulation dieser beiden Arten von

Zellteilungen ist entscheidend für alle Entwicklungsprozesse. Da murine ES-Zellen zum ersten Mal 1981 (Evans and Kaufman, 1981) und humane ES-Zellen erstmals 1998 (Thomson et al., 1998) beschrieben wurden, sind viele molekulare Mechanismen, die für die Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps wichtig sind, bis dato nur teilweise verstanden (Zech et al., 2011).

1.2.1 Signaltransduktionswege der Pluripotenz

Eine hohe Proliferationsrate sowie eine kurze Zeitspanne für den Zellzyklus (10-12 Stunden) sind charakteristisch für embryonale Stammzellen, die *in vitro* in Anwesenheit von LIF (Leukemia Inhibitory Factor) kultiviert werden. Murine ES-Zellen haben eine stark verkürzte G1- und G2-Phase und weisen eine erhöhte Aktivität von CdKs (Cyclin-dependet-Kinases) im Vergleich zu somatischen Zellen auf (Stead et al., 2002). Auch bei humanen ES-Zellen konnte eine verkürzte G1-Phase nachgewiesen werden (Calder et al., 2013). Die MAPK- und Akt-Signalwege wurden sowohl in murinen als auch in humanen ES-Zellen in Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Pluripotenz gebracht (Armstrong et al., 2006; Chimge et al., 2012; Heo et al., 2006).

Bei den Funktionen des wnt-Signalweges im Bezug auf die Aufrechterhaltung der Pluripotenz gibt es gegensätzliche Erkenntnisse. Der wnt-Signalweg wurde bei murinen und humanen embryonalen Stammzellen bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz beschrieben (Sato et al., 2004). Im Gegensatz hierzu wurde publiziert, dass der wnt-Signalweg die Differenzierung von humanen ES-Zellen verstärkt und dass im pluripotenten Zustand β -Catenin durch den Transkriptionsfaktor Oct4 reprimiert wird (Davidson et al., 2012).

Humane und murine ES-Zellen unterscheiden sich in vielen Aspekten. Zum Beispiel sind für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz bei murinen Stammzellen der Faktor LIF (Leukemia Inhibitory Factor) sowie BMP4 (Bone Morphogenic Protein-4) essentiell (Niwa et al., 1998; Ying et al., 2003). LIF gehört zur Familie der Interleukin-6-Zytokine. Die Bindung von LIF an den LIF-Rezeptor aktiviert eine Signalkaskade, die zur Phosphorylierung, Dimerisierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors Stat3 führt. Werden murine ES-Zellen im Medium ohne LIF-Zusatz kultiviert, kommt es zur Differenzierung und dem Verlust der Pluripotenz (Gonzalez et al., 2009). BMP4 gehört zur TGF β -Familie und wirkt über den Smad- und MAP-Kinase-Signalweg. Im Gegensatz zu murinen ES-Zellen ist bei humanen ES-Zellen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz eine Aktivierung des TGF β /Activin/Nodal-Signalweges sowie der Faktor FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2) essentiell (Greber et al., 2007; James et al., 2005). Die Signalwege zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz sind also zwischen humanen und murinen ES-Zellen unterschiedlich.

1.2.2 Embryonale Karzinomzellen (Teratokarzinom Zellen)

Tumore, die sich von pluripotenten Stammzellen ableiten, werden als Teratome oder Keimzelltumore bezeichnet. Keimzelltumore werden aufgrund ihres Differenzierungsgrades in gutartige (differenzierte) Teratome und bösartige (entdifferenzierte) Teratome unterteilt. Die wenig differenzierte Form wird auch als Teratokarzinom bezeichnet. Alle bösartigen Tumore epithelialen Ursprungs werden als Karzinome bezeichnet. Wie bereits erwähnt, leiten sich Teratokarzinome von pluripotenten Stammzellen ab und sind daher nicht epithelialen Ursprungs und somit auch keine klassischen Karzinome. Teratokarzinomzellen werden auch als embryonale Karzinomzellen bezeichnet. Sie sind pluripotent und häufig wie Krebszellen aneuploid (Brinster, 1974). Da Teratome in alle 3 Keimblätter (i.e. Ekto-, Meso-, und Endoderm) differenzieren können, sind bei differenzierten Formen häufig mehrere Gewebearten wie Haut, Haare und Zähne zu finden. Injektionen von humanen embryonalen Stammzellen in immunsupprimierte Mäuse führten zur Bildung von Teratomen (Blum and Benvenisty, 2008; Przyborski, 2005). Dieses Tumor-induzierende Potenzial wurde ebenfalls in murinen embryonalen Stammzellen nachgewiesen (Stevens and Hummel, 1957).

1.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

In den vorherigen Abschnitten wurden die Eigenschaften von Stammzellen und Signalwegen, die bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz involviert sind, vorgestellt. In den bisherigen Betrachtungen wurde von pluripotenten Stammzellen ausgegangen, die in alle Gewebearten differenzieren können. In zahlreichen Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Differenzierung reversibel ist und differenzierte Zellen sich zu Stammzellen reprogrammieren lassen.

Historisch waren es im Wesentlichen zwei Entdeckungen, die zur Hypothese führten, dass Pluripotenz induzierbar sein könnte. Erstens konnte gezeigt werden, dass aus dem Zellkerntransfer von differenzierten somatischen Zellen in entkernte Oozyten pluripotente Stammzellen resultieren (Wilmut et al., 1997). Zweitens geht aus der Hybridisierung von embryonalen Karzinomzellen mit somatischen Zellen ein überwiegend pluripotenter Phänotyp hervor (Miller and Ruddle, 1976). Embryonale Karzinome sind Keimzelltumore, die einen epithelialen Charakter aufweisen. Dies zeigt, dass bei der Hybridisierung ein pluripotenter Zustand induziert wird. Um Faktoren für eine induzierte Pluripotenz zu identifizieren, wurde das Neomycin-Resistenzgen in den *Fbxo15* Locus von murinen Fibroblastenzellen integriert. Das *Fbxo15* Gen wird ausschließlich von pluripotenten Zellen exprimiert. In diesem Ansatz wurden 24 verschiedene Gene auf ihre Fähigkeit getestet, die Neomycin-Resistenz bzw. die Pluripotenz zu

induzieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Überexpressionen von Oct-4, Sox2, Klf-4 und c-Myc ausreichend für die Induktion der Pluripotenz sind (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Genauso wie embryonale Stammzellen bilden diese iPSCs (induced pluripotent stem cells) bei Transplantation in immunsupprimierte Mäuse Teratome. Später konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von iPSCs in tetraploide Blastozysten Mäuse entstehen, die vollständig von diesen Zellen abstammten (Boland et al., 2009). Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass iPS-Zellen ähnliche Charakteristika und Fähigkeiten wie embryonale Stammzellen besitzen.

1.2.4 Stammzellen in der Regenerativen Medizin

Die Fähigkeit von embryonalen Stammzellen, in alle Gewebearten zu differenzieren, ermöglicht deren Einsatz im Rahmen der regenerativen Medizin. Hierbei können geschädigte Gewebszellen durch ausdifferenzierende Stammzellen ersetzt werden. Da iPSCs (induced pluripotent stem cells) pluripotent sind, stellen diese eine Alternative zu embryonalen Stammzellen dar (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die Verwendung von iPSCs hat den entscheidenden Vorteil, dass keine Embryonen zur Gewinnung dieser Zellen benötigt werden, da sie aus differenzierten somatischen Zellen generiert werden können. Es wäre durchaus denkbar, dem Patienten differenzierte Körperzellen zu entnehmen, um diese anschließend *in vitro* zu reprogrammieren und im Rahmen einer regenerativen Therapie dem Patienten zurückzuführen. In den letzten Jahren wurde der Einsatz von reprogrammierten Zellen beim Parkinson Syndrom intensiv erforscht. Das Ziel dieser Therapie besteht darin, dopaminerge Neuronen zu ersetzen. In Rhesusaffen konnte bereits gezeigt werden, dass reprogrammierte Fibroblasten im Gehirn in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren (Emborg et al., 2013). Allerdings stellt die derzeit noch geringe Effizienz der Reprogrammierung einen erheblichen Nachteil dar. Alternativ können von dem Patienten direkt adulte Stammzellen für die Therapie isoliert werden. Da es sich hierbei um körpereigene Zellen des Patienten handelt, ist auch hier mit keiner Abstoßung durch das Immunsystems zu rechnen. Im Vergleich zum Einsatz reprogrammierter Zellen des Patienten bietet der Einsatz von adulten Stammzellen in der Therapie zwei wesentliche Vorteile. Erstens entfällt die Problematik der geringen Effizienz der Reprogrammierung. Zweitens ist keine Manipulation der adulten Stammzellen notwendig. Bei der Verwendung von adulten Stammzellen in der Therapie haben sich mesenchymale Stammzellen als vielversprechend herauskristallisiert. Mesenchymale Stammzellen sind Vorläuferzellen des Bindegewebes und haben den wesentlichen Vorteil, keine Teratome zu bilden. Hierbei haben sich mesenchymale Stammzellen, die sich aus dem Fettgewebe des Patienten isolieren lassen, ASCs (adipose-derived stem cells) genannt, als vielversprechend erwiesen. Trotz des mesodermalen Ursprungs haben ASCs das Potenzial, in alle

drei Keimblätter Ectoderm, Endoderm und Mesoderm zu differenzieren (Zuk, 2010). Alternativ können mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert werden.

Potentielle Einsatzmöglichkeiten von mesenchymalen Stammzellen wären z.B. die Regenerierung von Gewebe bei Diabetes Mellitus, Myokardinfarkten, Leberzirrhosen, Autoimmunerkrankungen und pathologischen Veränderung der Niere und des Knochenmarks. Nachdem mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe bzw. dem Knochenmark entnommen, gegebenenfalls expandiert und angereichert wurden, erfolgt deren Einsatz in der Stammzelltherapie. In Abhängigkeit von der Erkrankung werden diese intravenös oder durch direkte Injektion in das betreffende Gewebe verabreicht (Price et al., 2006). Außerdem kommen angiographische Applikationen durch einen Katheter sowie intrathekale Verabreichung mittels Lumbalpunktion zum Einsatz (Tian et al., 2013).

1.2.5 Stammzellmarker

Stammzellen werden anhand von Markern definiert, isoliert und charakterisiert. Das Membranprotein EpCAM wird von murinen und humanen pluripotenten ES-Zellen exprimiert und wird bei der Differenzierung herunter reguliert (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2010). Daher wird EpCAM als Pluripotenzmarker eingesetzt. Außerdem exprimieren Vorläuferzellen von Hepatozyten EpCAM, während in reifen Hepatozyten kein EpCAM mehr nachgewiesen werden konnte (Schmelzer et al., 2007; Yoon et al., 2011). Außerdem wird EpCAM als gut etablierter Marker für Tumor-indizierende Zellen (TICs) eingesetzt (siehe Modelle der Krebsentstehung) (Gires et al., 2009). Die spezifische Expression in pluripotenten ES-Zellen, Vorläuferzellen und Tumor-induzierenden Zellen (TICs) suggeriert eine bedeutende Funktion von EpCAM in diesen Zelltypen.

1.3 EpCAM

EpCAM steht für **E**pithelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule. EpCAM wurde ursprünglich als Zelloberflächenprotein beschrieben, welches in epithelialen Tumoren und einigen Formen der akuten myeloische Leukämie sehr stark überexprimiert wird (Bergsagel et al., 1992; Chadeneau et al., 1991; Herlyn et al., 1979). Damit war EpCAM das erste Tumor-assoziierte Antigen, welches überhaupt beschrieben wurde. Als Tumor-assoziierte Antigene werden Proteine bezeichnet, die in Tumoren im Vergleich zum gesunden Gewebe stark überexprimiert werden. Im Gegensatz zu den Tumor-assoziierten Antigenen werden Tumor-spezifische Antigene ausschließlich von Krebszellen und von keiner gesunden Körperzelle exprimiert. EpCAM wird im normalen Epithel der Haut, des Thymus und des Darms in einem geringeren Maße im Vergleich zu Tumoren exprimiert (Nelson et

al., 1996; Trzpis et al., 2007). EpCAM zählt zu den am häufigsten und stärksten exprimierten Tumor-assoziierten Antigenen (Baeuerle and Gires, 2007). Aufgrund dessen wurde EpCAM als Zielmolekül für die Krebstherapie, die auf monoklonalen Antikörpern basierte, beim Menschen angewendet (Sears et al., 1984).

Eine hohe Expression von EpCAM in Tumoren korreliert häufig mit einer geringen Überlebensrate des Patienten. Dieser Zusammenhang ist jedoch vor allem von der Art des Tumors abhängig. So konnte eine erhöhte EpCAM-Expression mit einer reduzierten Überlebensrate bei Nodal-negativem Mammakarzinom (Spizzo et al., 2004), Ovarialkarzinom (Spizzo et al., 2006), Gallenblasenkarzinom (Varga et al., 2004), Pankreaskarzinom (Fong et al., 2008) und Plattenepithelkarzinom (Stoecklein et al., 2006) festgestellt werden. Hingegen wurde eine erhöhte Expression von EpCAM beim Schilddrüsenkarzinom (Ensinger et al., 2006; Ralhan et al., 2010) und beim klarzelligen Nierenzellkarzinom (Klatte et al., 2009; Seligson et al., 2004; Went et al., 2005) mit einer gesteigerten Lebenserwartung in Zusammenhang gebracht. Die Ursache für diesen Unterschied ist bis dato unverstanden. Eine Tumor-erzeugende Wirkung von EpCAM konnte in Xenograft-Transplantationen von immunsupprimierten Mäusen nachgewiesen werden. Die Überexpression von EpCAM in HEK293-Zellen führte zur Bildung von größeren Tumoren als in Kontroll-transfizierten Zellen (Maetzel et al., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EpCAM eine verstärkte Zellproliferation zur Folge hat und dass eine erhöhte EpCAM-Expression in Tumoren mit einer gesteigerten Proliferation korreliert (Driemel et al., 2013; Kroepil et al., 2013; Munz et al., 2004).

Da EpCAM in einer Vielzahl von Studien als Tumor-assoziiertes Antigen identifiziert wurde, hat eine hohe Anzahl an Synonymen von EpCAM Eingang in die Literatur gefunden. Unter anderem wird EpCAM auch als CD326, EGP-2, Egp314, GA733-2, gp40, Ly74, Panepithelial Glycoprotein 314, TROP1 und TACSTD1 (Tumor associated Calcium Transducer) bezeichnet. Um die Nomenklatur des Proteins in der Literatur zu vereinheitlichen, wurde auf einem Kongress 2006 die Bezeichnung EpCAM gewählt (Baeuerle and Gires, 2007). In den folgenden Abschnitten wird auf das *Epcam*-Gen, auf das EpCAM-Protein sowie auf Funktionen von EpCAM eingegangen.

1.3.1 *Epcam*-Gen

Das *Epcam*-Gen besteht aus 9 Exons. Murines und humanes *Epcam* weisen die gleiche Exonstruktur auf. Während humanes *Epcam* (*hEpcam*) auf Chromosom 2 (Chromosome 2: 47,572,297-47,614,740) lokalisiert, ist murines *Epcam* (*mEpcam*) auf Chromosom 17 kodiert. Das EpCAM-Protein besteht als Typ-I-Transmembranprotein aus einer extrazellulären Domäne (EpEX), einer Transmembran-Domäne (TMD) und einer intrazellulären Domäne (EpICD). Die extrazelluläre

Domäne (EpEX) enthält eine EGF-ähnliche Domäne (Epidermal Growth Factor) sowie eine Thyroglobulin-Domäne (TY). Auf die Struktur von EpCAM wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Das Signalpeptid von EpCAM wird in Exon 1 kodiert. Hingegen ist die EGF-ähnliche Domäne (Epidermal Growth Factor) in Exon 2 kodiert, während die Nucleotidsequenz der Thyroglobulin-Domäne (TY) in Exon 3 zu finden ist. Früher wurde die Thyroglobulin-Domäne (TY) fälschlicherweise als zweite EGF-ähnliche Domäne bezeichnet (Baeuerle and Gires, 2007). In Exon 7 wird die Transmembran-Domäne (TMD) kodiert. Die intrazelluläre Domäne (EpICD) wird in den Exons 8 und 9 kodiert. Die Genstruktur von *mEpcam* ist in der Abbildung 2 dargestellt.

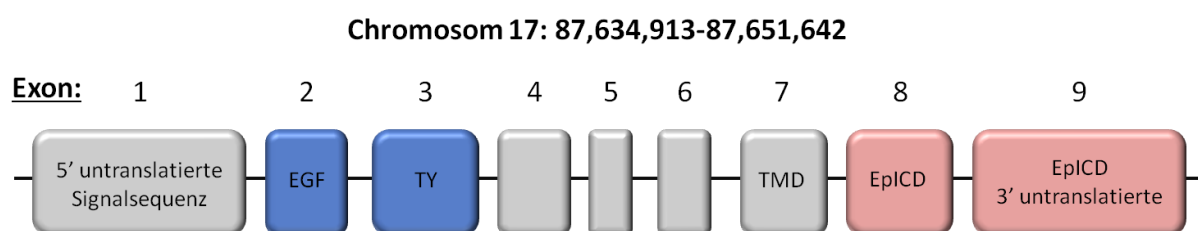


Abbildung 2: Genstruktur vom *EpCAM*-Gen.

Das *Epcam*-Gen besteht aus 9 Exons. Das erste Exon kodiert für das Signalpeptid, Exons 2-6 für die extrazelluläre Domäne (EpEX), Exon 7 für die Transmembran-Domäne (TMD) und Exons 8 und 9 für die intrazelluläre Domäne (EpICD). Die EGF (Epidermal Growth Factor)-ähnliche Domäne I wird in Exon 2 und die Thyroglobulin-Domäne (TY) wird in Exon 3 kodiert. Die Abbildung wurde adaptiert von Linnenbach (Linnenbach et al., 1993).

1.3.2 Struktur des EpCAM-Proteins

Die extrazelluläre Domäne von EpCAM (EpEX) besteht aus 265 Aminosäuren. Die Transmembran-Domäne (TMD) enthält 23 Aminosäuren, und die intrazelluläre Domäne (EpICD) wird von 26 Aminosäuren gebildet. Die ersten 23 N-Terminalen Aminosäuren bilden das Signalpeptid zum Transport in die Plasmamembran und werden beim Transport zur Zellmembran wahrscheinlich abgespalten (Szala et al., 1990). Im extrazellulären Teil sind eine EGF-ähnliche und eine Thyroglobulin-Domäne enthalten (Baeuerle and Gires, 2007) (siehe Abbildung 3). Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, sind mehrere Disulfidbrücken (dunkel-rot gestrichelte Linien) an der Bildung der dreidimensionalen Struktur der extrazellulären Domäne beteiligt. Ein Teil der extrazellulären Domäne wird proteolytisch abgespalten (Spaltung1) und bleibt aufgrund der Disulfidbindung mit dem übrigen EpCAM-Molekül assoziiert. Diese Spaltung findet nur teilweise statt, und deren Ausmaß ist abhängig von der jeweiligen Zelllinie (Schnell et al., 2013a). Aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsmuster hat EpCAM eine molekulare Masse zwischen 37-42 kDa (Chong and Speicher, 2001; Pauli et al., 2003). Die Glykosylierung wurde bislang nur für das hEpCAM beschrieben. Zwei von drei Glykosylierungsstellen sind im mEpCAM konserviert, wie in

Abbildung 3 dargestellt. Es konnten Unterschiede in der Glykosylierung von hEpCAM in normalem Epithel und in Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches festgestellt werden. Im normalen Epithel des Hals-Kopf-Bereiches war lediglich eine schwache Glykosylierung von hEpCAM nachweisbar. Hingegen liegt hEpCAM in entsprechenden Tumoren hyperglykosyliert vor (Pauli et al., 2003). In hEpCAM konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung von Asparagin an der Aminosäureposition 198 (N¹⁹⁸) einen stabilisierenden Einfluss auf das Molekül hat. Diese Glykosylierungsstelle ist auch in mEpCAM konserviert, wie in Abbildung 3 dargestellt.

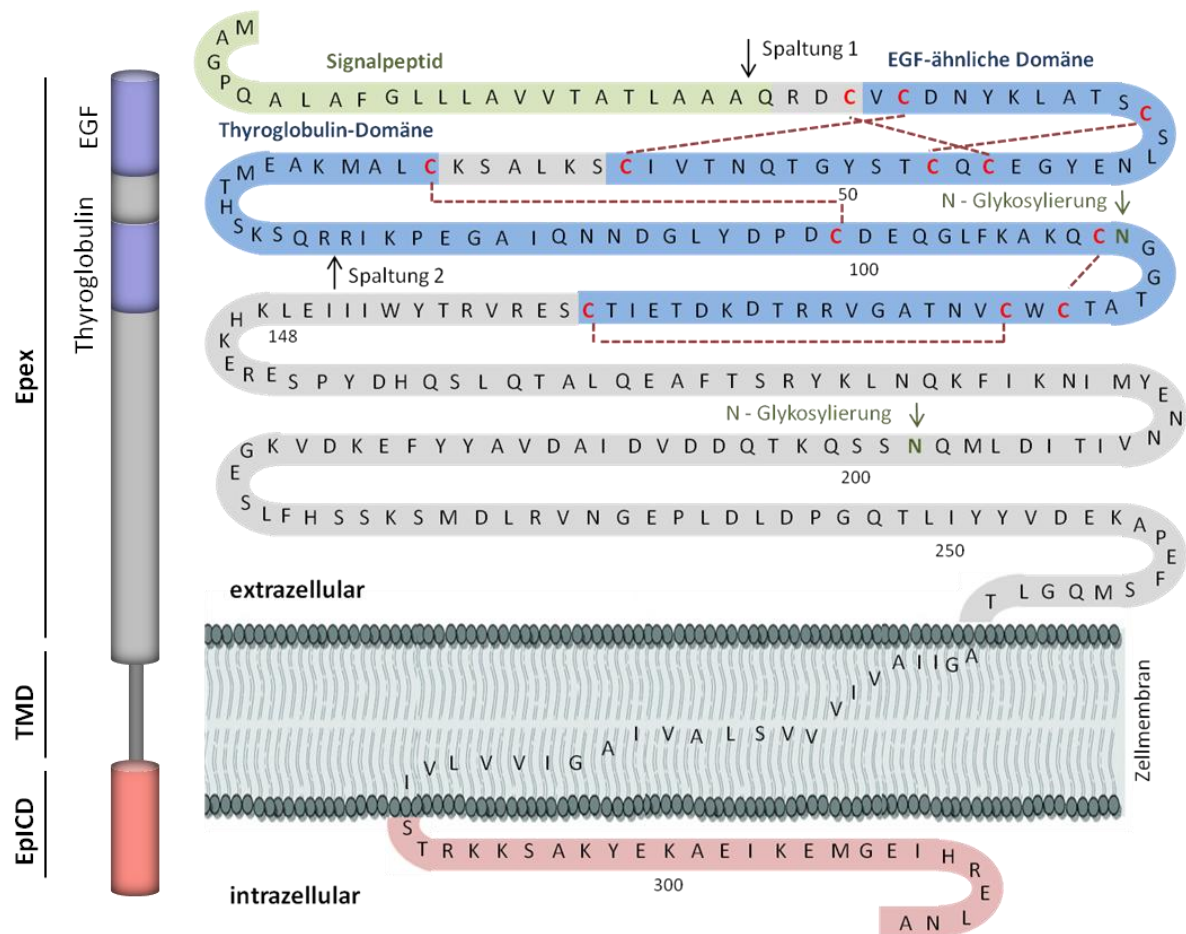


Abbildung 3: Struktur vom mEpCAM-Protein.

Der extrazelluläre Anteil von mEpCAM (EpEX) enthält eine EGF- und eine Thyroglobulin-ähnliche Domäne und besteht aus 265 Aminosäuren. Außerdem besteht mEpCAM aus der Transmembran-Domäne (23 Aminosäuren) und EpICD (26 Aminosäuren). Das Signalpeptid (hell-grün) wird beim Transport zur Zellmembran wahrscheinlich abgespalten (Spaltung 1). In der extrazellulären Domäne sind mehrere Disulfidbrücken vorhanden. Ein Teil der EGF-ähnlichen Domäne wird durch Spaltung 2 proteolytisch abgespalten und bleibt aufgrund der Disulfidbrücke mit den übrigen EpCAM-Molekül assoziiert. Das Ausmaß dieser Spaltung ist von der verwendeten Zelllinie abhängig (Schnell et al., 2013a).

1.3.3 EpCAM als Zelladhäsionsprotein

Die Namensgebung von EpCAM (**Ep**ithelial **Ce**ll **A**dhesion **M**olecule) basiert auf der Erkenntnis, dass durch EpCAM eine Ca²⁺-unabhängige homophile Zell-Zell-Adhäsion vermittelt wird (Balzar et al., 1999a; Balzar et al., 1999b; Litvinov et al., 1994). Hierbei wird angenommen, dass EpCAM-

Moleküle sich innerhalb der Plasmamembran zu einem Tetramer zusammenlagern und mit einem EpCAM-Tetramer der angrenzenden Zelle in Wechselwirkung treten (Baeuerle and Gires, 2007; Trebak et al., 2001).

Neben der EpCAM-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion wurde ein Zusammenhang mit der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Expression von EpCAM zu einer Reduktion der E-Cadherin-abhängigen Zelladhäsion führt. Hierbei führte die Expression von EpCAM zu einer verminderten Bindung zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett (Litvinov et al., 1997). Dieser Zusammenhang ist unter anderem in Abbildung 4 mit aufgeführt. Die Überexpression von EpCAM führt also zu einer abgeschwächten Zelladhäsion durch E-Cadherin und einer verstärkten homophilen Zelladhäsion durch EpCAM.

1.3.4 Spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen

Wie im obigen Abschnitt beschrieben wurde, konnte eine Korrelation zwischen der hEpCAM Expression und der Proliferation von Tumoren nachgewiesen werden (Maaser and Borlak, 2008; Munz et al., 2004; Schon et al., 1994). Zudem wurde gezeigt, dass die Überexpression von hEpCAM eine gesteigerte Proliferation und Tumorbildung in Xenografttransplantationen zur Folge hat. In Arbeiten von unserer Gruppe konnte erstmalig der Mechanismus des Signalweges von hEpCAM aufgeklärt werden.

Grundlage dieser Signaltransduktion stellt die proteolytische Prozessierung von hEpCAM dar. Hierbei wird hEpCAM sequentiell gespalten. Bei der ersten Spaltung ist die Protease TACE/Adam 17 involviert. Dabei wird ein Großteil der extrazellulären Domäne freigesetzt. Im zweiten Schritt wird das in der Membran verbleibende intermediäre Spaltprodukt CTF (C-Terminales-Fragment) von dem Proteinkomplex γ -Sekretase weiter prozessiert. hEpCAM wird also durch eine klassische Presenilin-abhängige **R**egulierte **I**ntramembran **P**roteolyse (RIP) weiter prozessiert. Dabei wird die intrazelluläre Domäne von hEpCAM (EpICD) von der Membran ins Zytoplasma freigesetzt und migriert in den Zellkern, wo sie im Komplex mit FHL2, β -Catenin und Lef1 an der Regulation von Genen wie c-Myc, Zyklin A und E mitwirkt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen EpICD und FHL2 direkt ist (Maetzel et al., 2009). Des Weiteren sind die Interaktionen zwischen β -Catenin und Lef-1 sowie zwischen β -Catenin und FHL2 in der Literatur beschrieben (Behrens et al., 1996; Renger et al., 2013).

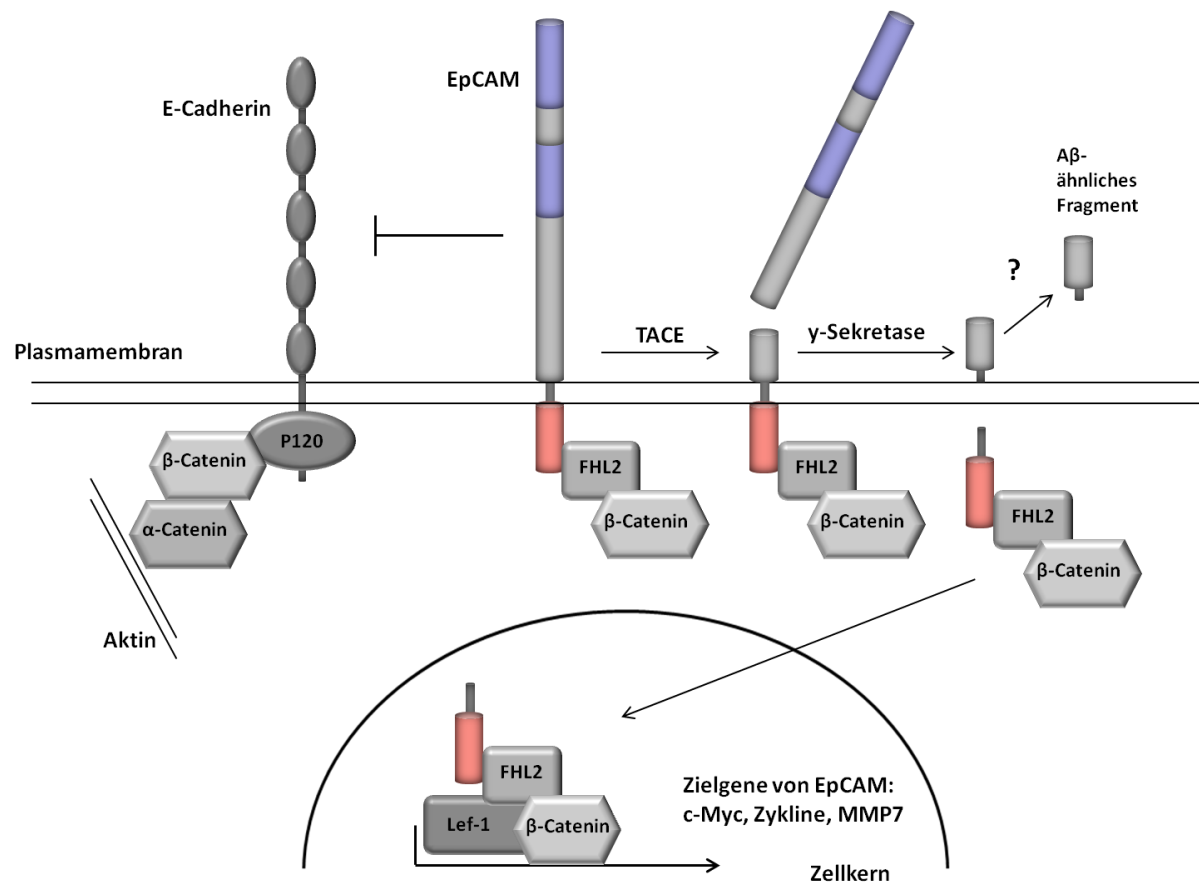


Abbildung 4: Signaltransduktion und Zelladhäsion von hEpCAM in Krebszellen.

EpCAM interferiert mit der E-Cadherin-abhängigen Zelladhäsion. hEpCAM wird in humanen Krebszellen sequentiell im ersten Schritt durch die Protease TACE (Adam 17) und im zweiten Schritt γ -Sekretase-abhängig gespalten. Die γ -Sekretase-abhängige Spaltung führt zur Freisetzung von EpICD, wodurch eine Translokation in den Zellkern möglich wird. Der nukleäre Proteinkomplex bestehend aus FHL2, β -Catenin und Lef-1 bindet an Lef1-Konsensussequenzen auf der DNA und führt zur Aktivierung von Genen wie c-Myc, Zyklinen und MMP7.

1.3.5 EpCAM als Wnt-Derepressor bei der hepatozellulären Entwicklung im Zebrafisch

Kürzlich wurde eine weitere Funktion von EpCAM in Zebrafischen beschrieben. Der wesentliche Unterschied zum vorherigen beschriebenen Signalweg ist, dass dieser unabhängig von der Spaltung von EpCAM verläuft. Hierbei wurde EpCAM als Wnt-Derepressor bei der hepatozellulären Entwicklung beschrieben. Der dem zugrunde liegende Mechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt. Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg wird durch Bindung des Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor sowie an den Ko-Rezeptor LRP5/6 initiiert. Die Bindung des Adapterproteins Dishevelled führt zur Rekrutierung des Axin-Komplexes, sodass β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und degradiert wird. Die Stabilisierung von β -Catenin ermöglicht dessen Kerntranslokation und Genaktivierung. Kremen1 bindet an Lrp6 und verhindert, dass sich ein funktioneller Komplex aus Ligand, Rezeptor und Ko-Rezeptor bildet. Durch Interaktion zwischen EpCAM und Kremen1 wird dessen Bindung an Lrp6 inhibiert (siehe Abbildung 5). Die

Expression von EpCAM ermöglicht daher die Aktivierung der Wnt2bb-abhängigen Signaltransduktion (Lu et al., 2013).

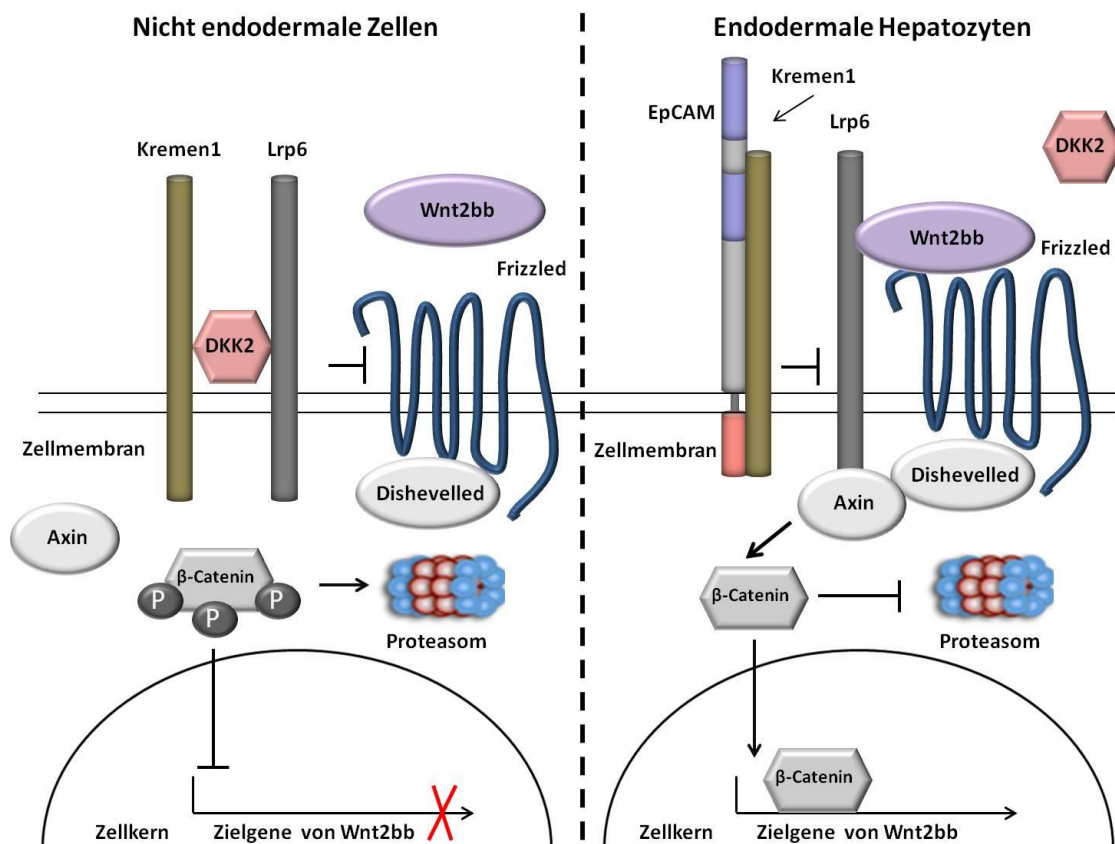


Abbildung 5: Mechanismus von EpCAM als Wnt-Derepressor.

In Abwesenheit von EpCAM bildet das Wnt-Repressor-Protein Kremen1 mit Dickkopf 2 (DKK2) und Lrp6 einen Komplex. In diesem Komplex ist Lrp6 inaktiviert. Die Expression von EpCAM führt zur Bindung an Kremen1, wodurch Lrp6 aus dem Komplex freigesetzt wird. Bei Ligandenbindung von Wnt2bb an den Frizzled-Rezeptor wird Lrp6 als Ko-Rezeptor rekrutiert. Durch die Bindung des Axin-Komplexes an das Dishevelled-Protein sowie an den Lrp6-Korezeptor wird die Phosphorylierung von β-Catenin und damit der Abbau über das Proteasom verhindert. β-Catenin migriert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und aktiviert Zielgene des Wnt2bb-Liganden.

1.3.6 EpCAM-Expression und -Funktion in ES-Zellen sowie bei der induzierten Pluripotenz

In murinen und humanen embryonalen Stammzellen konnte zum Einen gezeigt werden, dass EpCAM in pluripotenten embryonalen Stammzellen exprimiert wird und bei der Differenzierung herunterreguliert wird (Gonzalez et al., 2009; Lu et al., 2010). Hierbei wird das *hEpcam*-Gen in humanen ES-Zellen durch den Polycomb-Protein-Komplex reguliert. Der Polycomb-Protein-Komplex ist entscheidend an der Chromatinmodifikation bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen beteiligt (Schuettengruber et al., 2007). Bei differenzierten Zellen, die kein hEpCAM exprimieren, konnten die inaktivierenden H3K27me3 und H3K9me3 Chromatin-Modifikationen durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) im 5- und 3'-Bereich vom

Transkriptionsstart des *hEpcam*-Gens nachgewiesen werden. Zudem konnte eine SUZ12 und JMJD3 Chromatinlokalisierung im Promoterbereich von *Epcam* nachgewiesen werden. SUZ12 ist eine essentielle Komponente des Polycomb-Protein-Komplexes zur Einführung von H3K27me3 Methylierungen. JMJD3 katalysiert die Demethylierung von H3K27me3. Die Chromatinlokalisierung von SUZ12 und JMJD3 weist auf eine dynamische Regulation der *hEpcam* Promoteraktivität durch Chromatinmodifikation hin. Hingegen waren keine Unterschiede im Methylierungsmuster von CpG-Inseln des *hEpcam*-Promoters zwischen pluripotenten und differenzierten humanen ES-Zellen zu erkennen (Lu et al., 2010). Um die gewebespezifische mEpCAM-Expression bei der embryonalen Entwicklung zu untersuchen, wurde das β -Galactosidase (β -geo) Gen in den *Epcam*-Lokus integriert. Dies führt zum Einen zur Inaktivierung des *mEpcam*-Gens sowie zu EpCAM-spezifischer Expression des Reportergens β -Galactosidase (β -geo). β -Galactosidasen sind Enzyme, die endständige β -Galactose von Polysacchariden abspalten. Häufig wird die β -Galactosidase (β -geo) als Reportergen eingesetzt, da die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zur Freisetzung eines blauen Indigo-Farbstoffes führt. Auf diese Weise konnte die Expression von mEpCAM in epithelialen Strukturen von embryonalem Gewebe des Ohres, des Auges, der Branchialbögen, des Darms, der apikalen ektodermalen Leiste, der Lunge, der Pankreas und der Haarfollikeln nachgewiesen werden (Nagao et al., 2009).

Sowohl in humanen wie auch in murinen embryonalen Stammzellen wurde EpCAM in Verbindung mit der Aufrechterhaltung der Pluripotenz gebracht (Gonzalez et al., 2009; Lu et al., 2010; Ng et al., 2010). Der Knockdown von hEpCAM mit spezifischer siRNA (small interfering RNA) führte zur Induktion von endodermalen und mesodermalen Markern in humanen ES-Zellen. Unter gleichen Bedingungen waren jedoch nur marginale Effekte auf Pluripotenzmarker wie Oct-4 und TRA-1-60 zu verzeichnen. Außerdem waren humane ES-Zellen nach stabilem Knockdown von hEpCAM mit spezifischer shRNA (short hairpin RNA) in der Lage, Teratome bestehend aus Zellen aller drei Keimblätter zu bilden, und waren daher pluripotent (Ng et al., 2010). In murinen ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von mEpCAM mit siRNA (small interfering RNA) zu einer Reduktion von Pluripotenzmarkern wie Oct-4 und SSEA-1 führt sowie eine Reduktion der alkalischen Phosphatase bewirkt (Gonzalez et al., 2009). In Embryonen von Zebrafischen führte der Knockdown mit EpCAM-spezifischer Morpholino-basierten Oligonukleotiden (modifizierte und Nuklease-resistente DNA-Analoga) zu Defekten der epithelialen Morphogenese und Integrität des Otolith (Slanchev et al., 2009).

In weiteren Arbeiten wurde eine Funktion von mEpCAM und Claudin7 an der Reprogrammierung von murinen Fibroblastenzellen beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl mEpCAM und Claudin7 bei der Reprogrammierung induziert werden und dass deren Knockdown

zu einer reduzierten Effizienz der induzierten Pluripotenz führt. Hingegen hatte die Überexpression von mEpCAM, EpICD und Claudin7 eine erhöhte Reprogrammierungseffizienz zur Folge. Die Tatsache, dass für diesen Phänotyp eine Überexpression von EpICD ausreichend war, deutet auf einen spaltungsabhängigen Mechanismus der Signaltransduktion hin. Der Nachweis von EpICD an Promoterregionen von c-Myc, Oct-4, Nanog, Sox2 und Klf4 spricht für eine direkte Regulation dieser Gene durch eine spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM (Lu et al., 2010). Wie im Abschnitt (1.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)) bereits beschrieben wurde, sind diese Gene maßgeblich an der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu Stammzellen beteiligt.

1.3.7 Funktionelle Untersuchungen von EpCAM in Knockout-Modellen

Um weitere Einblicke in die Funktion von mEpCAM bei der Entwicklung und Differenzierung zu gewinnen, wurden EpCAM-Knockout-Mäuse generiert. Auf diese Weise kann der Beitrag von mEpCAM zur Embryonalentwicklung und zur Organo- und Morphogenese in vivo in der Maus studiert werden.

Im Jahre 2009 zeigten Arbeiten von Nagao et. al., dass der homozygote Knockdown von mEpCAM ab dem Tag E12,5 embryonal letal ist (Nagao, Zhu et al. 2009). Dieser Phänotyp wurde im Wesentlichen durch Defekte der Plazenta erklärt. Die Plazenten der homozygoten Knockout Embryonen von mEpCAM wiesen eine fehlende Vaskularität sowie eine reduzierte Anzahl an parientalen Trophoblast-Riesenzellen auf. Außerdem zeigten die mEpCAM-Knockout-Embryonen häufig eine verspätete Schließung des Neuralrohres.

In Arbeiten von Lei, Maeda et al. (2012) wurde ein abweichender Phänotyp des homozygoten mEpCAM-Knockouts beschrieben. Dabei waren homozygote Knockout-Mutanten von mEpCAM bis zu 10 Tage nach der Geburt überlebensfähig und starben dann aufgrund von Defekten des intestinalen Gewebes. Hierbei wurde gezeigt, dass mEpCAM für die Rekrutierung von Claudin7 sowie von Claudin 2,3,7 und 15 in Tight junctions (TJs) essentiell ist und der Knockout von mEpCAM zu intestinalen Erosionen führt (Lei et al., 2012). In Knockout-Mutanten von Claudin7 wurde ein ähnlicher Phänotyp beschrieben (Ding et al., 2012; Tatum et al., 2010). Dies unterstützt die physiologische Relevanz der mEpCAM-Claudin7-Interaktion in Bezug auf den hier dargestellten Phänotyp. Außerdem wurden in dieser Arbeit keine Effekte des mEpCAM-Knockouts auf die Membranlokalisierung von E-Cadherin festgestellt (Lei et al., 2012). Der Anteil an homozygoten EpCAM-Knockout-Mäusen lag bei 22,43% (EpCAM^{-/-}) bzw. 13,76% (EpCAM^{βgeo/βgeo}). Diese Werte legen einen marginalen bzw. keinen Einfluss von mEpCAM auf die embryonale Letalität nahe, da es sich nahezu um eine Mendelsche-Verteilung handelte.

In einer weiteren Publikation konnte die Bedeutung von mEpCAM bei der Bildung des intestinalen Gewebes bestätigt werden. Durch „*Gene Targeting*“ generierte mEpCAM-Knockout-Mäuse waren bis wenige Tage nach der Geburt überlebensfähig. Dabei zeigten die Mäuse Zeichen einer villösen Atrophie sowie Hyperplasien von Krypten im Kolon. Der Anteil an homozygoten mEpCAM-Knockout-Mäusen lag bei 26,5%, sodass wiederholt kein Einfluss von mEpCAM auf die embryonale Letalität festgestellt wurde. Als molekulare Ursache dieses Phänotyps wurde eine veränderte Lokalisation von E-Cadherin vorgeschlagen (Guerra et al., 2012). Im Wildtyp lokalisierte E-Cadherin 0 bis 4 Tage nach der Geburt in der basolateralen Membran von intestinalen Epithelzellen. Hingegen wurde in EpCAM-Knockout-Mäusen eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von E-Cadherin zu diesen Zeitpunkten beschrieben (Guerra et al., 2012).

Als Ursache für die CTE (Congenital Tufting Enteropathy) Erkrankung wurden Mutationen von hEpCAM genannt. Das Krankheitsbild entspricht den oben beschriebenen Defekten des Darmepithels der EpCAM-Knockout-Mäuse (Guerra et al., 2012). Congenital Tufting-Enteropathy (CTE) ist auch beim Menschen eine lebensbedrohliche Erbkrankheit. Neugeborene leiden bereits nach wenigen Tagen nach der Geburt an einem wässrigen Durchfall. Es wurden Mutation der Donor- oder Akzeptor Splice-Site von Exon 4, Mutationen und Insertionen in Exon 3,5 und 6 im Zusammenhang mit CTE beschrieben (Al-Mayouf et al., 2009; Ko et al., 2010; Salomon et al., 2011; Sivagnanam et al., 2008; Sivagnanam et al., 2010). CTE-assoziierte Mutationen von hEpCAM führen entweder zu einer reduzierten Expression, zu einer fehlenden Membranlokalisation oder zu einem völligen Verlust des Proteins (Guerra et al., 2012). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die Mutation von hEpCAM (Cys⁶⁶Tyr) mit der Membranlokalisation interferiert und bei der Entstehung von CTE involviert ist (Schnell et al., 2013b).

Alle in diesem Abschnitt diskutierten Publikationen sprechen für keine essentielle Funktion von EpCAM bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz. In diesem Fall wäre mit einer sehr frühen embryonalen Letalität in allen Knockout-Modellen sowie Mutationen von CTE, die zu einem vollständigen Verlust von EpCAM führen, zu rechnen. In allen hier vorgestellten Knockout-Modellen waren die Muttertiere lediglich heterozygote Knockout-Mutanten. Durch die Verpaarung der heterozygoten Elterntiere wurden homozygote Knockout-Mutanten generiert. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine maternale Versorgung mit mEpCAM eine frühe embryonale Letalität verhindert. Aufgrund der oben diskutierten Daten ist eine wichtige aber nicht essentielle Funktion von EpCAM bei Aufrechterhaltung der Pluripotenz wahrscheinlich.

2 Zielsetzung

Die Funktion von EpCAM und insbesondere die Funktion als signaltransduzierendes Protein wurden im Wesentlichen in humanen Zellen und mit dem hEpCAM-Molekül erforscht. Einblicke in die Funktion von mEpCAM in embryonalen Stammzellen und Teratokarzinomzellen beschränken sich bislang auf wenige Publikationen und sind auch in ihrem Umfang nicht ausführlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Untersuchung der Regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP) von mEpCAM unter Verwendung von massenspektrometrischen, zellbiologischen und biochemischen Methoden. Im Anschluss sollte die intrazelluläre Lokalisation des Spaltproduktes mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie bestimmt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der Spaltung von mEpCAM auf die Proliferation untersucht werden. Mit Hilfe eines genomweiten cRNA-Mikroarrays sollten neue Zielgene von mEpCAM in murinen embryonalen Stammzellen bestimmt und weiter untersucht werden. Zudem sollten Interaktionspartner von mEpCAM identifiziert und validiert werden. Hierzu sollten zunächst bekannte Interaktionspartner von hEpCAM im murinen System untersucht werden und anschließend ein Proteomansatz zur Identifizierung neuer Interaktionspartner durchgeführt werden. Im Anschluss sollten ausgewählte Interaktionspartner funktionell im Zusammenhang mit zellulären Effekten von mEpCAM charakterisiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Chemikalien und Kits

Artikel	Firma
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics Stuttgart
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Amaya Mouse ES Cell Nucleofector Kit	Lonza, Basel (Schweiz)
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma, Taufkirchen
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA aus Lachsspermien	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
Dodecylmaltosid (DDM)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Durchflusszytometrie	Becton Dickensen, Heidelberg
ECL Blotting Substrate	Pierce, Bonn
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACS absolute Counting Beads (CountBright)	Invitrogen, Karlsruhe
Flag-Agarose-Beads	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Gelatine (Zellkultur)	Sigma, Taufkirchen
Gene Ruler 1kb DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
GFP-Trap	Chromotek, München
Glycerin	Sigma, Taufkirchen
High Pure Plasmid Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Hoechst 33342 (H1399)	Molecular Probes, Karlsruhe
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore, Bedford (USA)
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	Millipore, Darmstadt
Lithiumacetat	Sigma, Taufkirchen
MG-132 (Proteasominhibitor)	Calbiochem, San Diego (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Organische Lösungsmittel	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
PEG-3350	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pfx-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Phusion High-Fidelity DNA PolymERase	New England Biolabs, Schwalbach
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteasominhibitor Lactacystin β -Lacton	Santa Cruz Biotechnology Dallas (Texas)
Proteasominhibitor MG132	Calbiochem, San Diego (USA)

Artikel	Firma
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteingrößenstandard "Benchmark"	Invitrogen, Karlsruhe
Proteingrößenstandard "Proteinmarker IV"	Peqlab, Erlangen
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
RNAse A	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SILAC Medien	Silantes, München
siRNAs	Eurogentec, Liège (Belgien)
Stempan Medium	Pan Biotech
Taq-Polymerase, PCR Reagenzien	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Tertamethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, Richmond (USA)
Transfektionsreagenz "MATRa-A"	IBA, Göttingen
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween	Serva, Heidelberg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Falkon /BD Le Pont de Claix (F)
Einmalpipette	Costar, New York (USA)
Immobilion-P Membran (0,45 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Immobilion-P ^{SQ} Membran (0,2 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Kanülen	BD, Heidelberg
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Menasha (USA)
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym, Wien (Österreich)
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falkon/BD, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße 1,5 ml (Nucleasefrei)	Costar, New York (USA)

3.1.3 Geräte

Artikel	Firma
Agarosegel- und Western Blotting Dokumentation „ChemiDoc“	Bio-Rad, Richmond (USA)
Blotting Kammer	Bio-Rad, Richmond (USA)
Durchflusszytometer „Durchflusszytometrie Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Richmond (USA)
ELISA-Reader ELx800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, München
Konfokales Laserscan-Mikroskop (KLSM)	Leika, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroliter-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	AEG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Halbergmoos
pH-Meter	WTW, Weilheim
Thermocycler „RoboCycler Gradient 96“	Stratagene, La Jolla (USA)
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse2	Heraeus, Hanau
Kühlsystem mit flüssigen Stickstoff	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Mikrophotometer	Pharmacia, Erlangen
Vortex Mixer	IKA Works, Inc., Wirmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Dienstleistungen

Dienstleistung	Dienstleister
DNA-Sequenzierung	GATC, Köln
Mikroarray Hybridisierung	IMG, Martinsried
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
siRNA Synthese	Eurogentec, Liège (Belgien)

3.2 Puffer und Stammlösungen

Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gel:	Agarose in 1xTBE
DNA-Laufpuffer:	45mM Tris-Borat, 1mM EDTA
6x Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin

Bakterienkultivierung

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

Bestimmung der Schnittstellen von mEpCAM

Elutionspuffer:	Glycin pH=4 (100mM)
Neutralisationspuffer:	Tris pH=8 (100mM)

Membrane Assay (Spaltungssassay in der aufgereinigten Membranfraktion)

Homogenisationspuffer:	Mops pH=7,0 (10mM); KCl (10mM); Protease Inhibitoren (Roche Complete)
Assaypuffer:	Natriumcitrat (150mM); ZnCl ₂ (10µM); Protease Inhibitoren (Roche Complete)

Durchflusszytometrie

Puffer:	PBS; 5% FKS; 1µg/ml Propidiumiodid
---------	------------------------------------

Herstellung kompetenter Bakterien

TFBI-Puffer	100mM KCl; 50mM MnCl ₂ ; 30mM KAc; 10mM CaCl ₂ ; 15% Glycerin; (pH = 5,8). Diese Lösung wurde immer frisch angesetzt.
TFBII-Puffer	10mM MOPS; 10mM KCl; 75mM CaCl ₂ ; 15% Glycerin; pH 7,0

Immunopräzipitation aus Zelllysaten

Lyse-Puffer:	PBS; 1% DDM; Proteinase Inhibitor Cocktail Complete
Wasch-Puffer:	50mM Tris (pH = 7,4); 150mM NaCl; Proteinase Inhibitor Cocktail Complete

Western-Blot

Lyse-Puffer:	PBS; 1% DDM; Proteinase Inhibitor Cocktail Complete
Sammelgel (4%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH = 6,8; 0,5M EDTA
Trenngel (10-17%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH = 8,9; 0,5M EDTA
Lauf-Puffer:	250mM Tris, 2M Glycin, 1% SDS
Lade-Puffer (Laemmli):	140mM Tris-HCl pH = 7,0; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% β -Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau
10x Blotting-Puffer:	250mM Tris; 1,26M Glycerin
Wasch-Puffer:	PBS; 0,2% Tween
Block-Puffer:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer
Lösung prim. Antikörper:	3% BSA in Waschpuffer
Lösung sek. Antikörper:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer

Yeast-Two-Hybrid

SC-Medium und -Platten:	0,67% Hefe-Stickstoffbasen (Difco); 0,2% Aminosäuremischung; 2% Glucose; 2% Agar. Das Medium wurde autoklaviert.
Aminosäuremischung:	20mg (Ade, Ura, Try, His); 30mg (Arg, Tyr, Leu, Lys); 50mg (Phe); 100mg (Glu, Asp); 150mg (Val); 200mg (Thr); 400mg (Ser).
Transfektions-Reagenz PEG:	100mM Lithiumacetat; 10mM Tris-HCl pH=8; 1mM EDTA pH = 8; 40% PEG-3350. Die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert.

Zellkultur

Einfriermedium:	10% (v/v) DMSO; 40% FKS; 50% DEMEM
E14 Medium:	Stempan Medium; 60000U/ml LIF
F9 Medium:	DEMEM Medium; 20% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin
HEK293 Medium:	DEMEM Medium; 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin

3.3 Antikörper

Primär Antikörper (Kat.Nr.)	Firma
α -Aktin, Ziege polyklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -EpCAM (BD 552370), Ratte polyklonal	BD Bioscience; Heidelberg
α -EplCD (1775-1, 1775-2), Meerschweinchen polyklonal	Peptide Specialty Laboratories; Heidelberg
α -ERas (sc-51072), Ziege polyklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -Flag (F1804), Maus Monoklonal	Sigma; Taufkirchen
α -GAPDH (A300-639A), Kaninchen polyklonal	Bethyl-Laboratories; Montgomery (USA)
α -GFP (sc-9996), Maus monoklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -Myc (9E10; sc-40), Maus monoklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -Prohibitin 1 (sc-28259), Kaninchen polyklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -Prohibitin 2 (sc-67045), Kaninchen polyklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -SSEA1 (sc-21702), Maus Monoklonal	Santa Cruz; Kalifornien (USA)
α -Tubulin (877-615-Cell), Kaninchen polyklonal	Cell Signaling; Boston (USA)

Sekundär Antikörper (Kat.Nr.)	Firma
Alexa 488 Ziege- α -Maus (sc2082)	Santa Cruz
FITC-Kaninchen- α -Ratte (FI-4001)	Vector Laboratories
HRP Kaninchen- α -Meerschwein (A5545)	Sigma
HRP Kaninchen- α -Ratte (P0450) polyklonal	Dako
HRP Kaninchen- α -Ziege (P0449)	Dako
HRP Ziege- α -Kaninchen (P0448)	Dako
HRP Ziege- α -Maus (P0447) polyklonal	Dako

3.4 Oligonukleotide

3.4.1 Primer

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
EpCAM-Tev-Flag	FW-EpCAM-Tev-Flag1	gaaaacctatactttcaaggagactacaagg atgacgacgataagctgtccattcttctaag	Bestimmung der extrazellulären Schnittstelle von mEpCAM (PCR1)
	BW-EpCAM-Tev-Flag1	tttgatattcctaggcattaagctctctgtg gatctcacccat	Bestimmung der extrazellulären Schnittstelle von mEpCAM (PCR1/3)
	FW-EpCAM-Tev-Flag2	tttgctagcgccgccaccatggcgggtcc ccaggccctcgcgt	Bestimmung der extrazellulären Schnittstelle von mEpCAM (PCR2)
	BW-EpCAM-Tev-Flag2	ttatcgtcgtatcctttagtctccttgaagt ataggtttcggactccccttcaatc	Bestimmung der extrazellulären Schnittstelle von mEpCAM (PCR2/3)
	Fw-EcoRI-EpCAM	aaagaattcggccaccatggcgggtc cccaggccctcgcg	Umklonierungen in pCAG (PCR4)
	BW-NheI-EpCAM	tttgctagcctaggcattaagctctctgtg	Umklonierungen in pCAG(PCR4)

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
Myc-CTF-Tev-Flag-YFP	FW-HindIII-Myc-CTF	ttaaagcttgagcaaaagctcatttctgaaga ggacttgtagcttgatgaaaaggcaccgagtc	Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstelle von mEpCAM (PCR1/2)
	BW-Flag-EpCAM	tttatcatcatcatctttgtaacggcattaagc tctctgtggatctcaccatctcctttat	Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstelle von mEpCAM (PCR1)
	BW-Agel-Tev-Flag-EpCAM	accggttctccaccttgaagtagaggttctct ttatcatcatcatctttgtaacggcatta	Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstelle von mEpCAM (PCR2)
	Fw-NheI-Kozak-Signalpeptid mEpCAM	aaactagcgcgccaccatggcggtcccca	Klonierung des Signalpeptides von mEpCAM (PCR3)
	Bw-HindIII-Signalpeptid mEpCAM	ttaaagcttagccgcccagcgtcgctg	Klonierung des Signalpeptides von mEpCAM (PCR3)
	FW-EcoRI-EpCAM	aaagaattcgcgccaccatggcggtcccc aggccctcgcg	Umklonierungen in pCAG (PCR4)
	BW-NheI-YFP	tttgtagcttactgtacagctcgccatgc	Umklonierungen in pCAG (PCR4)
Myc-CTF	Fw-EcoRI-EpCAM	aaagaattcgcgccaccatggcggtcccc cccaggccctcgcg	Klonierung des Flag bzw. ungetaggten Myc-mCTF
	BW-NheI-Stop-EpICD	tttgtagcttaggcattaagctctctgtggat ctcaccat	Klonierung des ungetaggten Myc- mCTF
	BW-NheI-Stop-Flag-EpICD	tttgtagctttatcatcatcatctttgtaacg gc	Klonierung des Flag getaggten Myc-mCTF
EpCAM (ICD)-YFP	FW-EcoRI-EpCAM	aaagaattcgcgccaccatggcggtcccc aggccctcgcg	Klonierung von mEpCAM-YFP
	FW-EcoRI-EpICD	aaagaattcgcgccaccatgtctacaagga agaatcagca	Klonierung von mEpICD-YFP
	FW-EcoRI-YFP	aaagaattcgcgccaccatggtgagcaagg gagaggagctgt	Klonierung von YFP
	BW-NheI-YFP	tttgtagcttactgtacagctcgccatgc	Klonierung von mEpCAM- und mEpICD-YFP sowie YFP
EpICDs	FW-MVI-EpICD	gaattcgcgccaccatggttatctacaag gaagaaat	Klonierung der kürzeren mEpICD- YFP Variante
	FW-MVLVI-EpICD	gaattcgcgccaccatggtctggttatct acaaggaagaaat	Klonierung der längeren mEpICD- YFP Variante
	BW-NheI-YFP	tttgtagcttactgtacagctcgccatgc	Klonierung der kürzeren / längeren mEpICD-YFP Variante

3.4.2 siRNA

Zielgen	Sequenz (5'-3')
mEpCAM	uugcucucugaugaauadtdt

3.5 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
141 pCAG-3SIP	CMV-SV40- β -Aktin-Promoter, Puromycinresistenz	Prof. T. Schröder
141 pCAG::EpCAM-YFP	Expression von mEpCAM-YFP	vorliegende Arbeit
141 pCAG::EpICD-YFP	Expression von mEpICD-YFP	
141 pCAG::YFP	Expression von für YFP	
141 pCAG::EpCAM-TF	Expression von mEpCAM-TF	
141 pCAG::Myc-CTF-FT-YFP	Expression von Myc-mCTF-FT-YFP	
141 pCAG::Myc-CTF-Flag	Expression von Myc-mCTF-Flag	
141 pCAG::Myc-CTF	Expression von Myc-mCTF	
141 pCAG::MVI-EpICD-YFP	Expression von MVI-EpICD-YFP	
141 pCAG::MVLVI-EpICD-YFP	Expression von MVLVI-EpICD-YFP	
pGAD-C2	ADH1-Promoter, Leucinresistenz	
pGAD-C2::EpICD	YTH-Interaktion mit mEpICD	Vorliegende Arbeit
pGAD-C2::FHL2	YTH-Interaktion mit FHL2	
pGAD-C2::Lef-1	YTH-Interaktion mit Lef-1	
pGAD-C2:: β -Catenin	YTH-Interaktion mit β -Catenin	
pGBD-C2	ADH1-Promoter, Tryptophanresistenz	Prof. Dr. S. Jentsch
pGBD-C2::EpICD	YTH-Interaktion mit mEpICD	Vorliegende Arbeit
pGBD-C2::FHL2	YTH-Interaktion mit FHL2	
pGBD-C2::Lef-1	YTH-Interaktion mit Lef-1	
pGBD-C2:: β -Catenin	YTH-Interaktion mit β -Catenin	
pDrive	Klonierungsvektor, Ampicillin-/Kanamycinresistenz	Qiagen (Hilden)

3.6 Bakterien- und Hefestämme

E.coli DH5 α (Klonierungen und Plasmidamplifikation)

F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, 1-, thi-1, gryA96, relA1. Dieser Bakterienstamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

E.coli DH10B (Klonierungen und Plasmidamplifikation)

F-, endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, Δ lacX74, Φ 80lacZ Δ M15, araD139, Δ (ara,leu) 7697, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), λ -. Dieser Bakterienstamm wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

PJ69-7A (Yeast-Two-Hybrid-System)

Trp901-, leu2-3, 112, ura3-53, his3-200, gal4, gal80, GAL1::HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ

3.7 Zelllinien

Name der Zelllinie	Referenz / Bemerkung
E14TG2 α (Murine ES-Zellen)	Dr. M. Conrad
E14TG2 α pCAG::mEpCAM-YFP	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-YFP
E14TG2 α pCAG::mEpicD-YFP	Transfektanten von pCAG::mEpicD-YFP
E14TG2 α pCAG::YFP	Transfektanten von pCAG::YFP
E14TG2 α pCAG::mEpCAM-TF	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-TF
E14TG2 α pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP
HEK-293 (Humane embryonale Nierenzellen)	(Graham et al., 1977)
HEK-293 pCAG::mEpCAM-YFP	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-YFP
HEK-293 pCAG::mEpCAM-TF	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-TF
HEK-293 pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP
HEK-293 pCAG::MVI-mEpicD-YFP	Transfektanten von pCAG::MVI-mEpicD-YFP
HEK-293 pCAG::MVLVI-mEpicD-YFP	Transfektanten von 293 pCAG::MVLVI-mEpicD-YFP
mF9 (Teratokarzinom Zelllinie aus murinem Testis)	Dr. M. Bouquet
mF9 pCAG::mEpCAM-YFP	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-YFP
mF9 pCAG::mEpicD-YFP	Transfektanten von pCAG::mEpicD-YFP
mF9 pCAG::YFP	Transfektanten von pCAG::YFP
mF9 pCAG::mEpCAM-TF	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-TF
mF9 pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP
mF9 pCAG::Myc-mCTF-Flag	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF-Flag
mF9 pCAG::Myc-mCTF	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF
NIH3T3 (Murine Fibroblastenzellen)	ATCC
NIH3T3 pCAG::mEpCAM-TF	Transfektanten von pCAG::mEpCAM-TF
NIH3T3 pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP	Transfektanten von pCAG::Myc-mCTF-FT-YFP

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration (0,7-2%) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) verwendet. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid (0,75 µg/ml), welches in die DNA interkaliert, wurde die aufgetrennte Nukleinsäure unter UV-Licht visualisiert.

4.1.2 DNA-Präparation

Transformierte Bakterien wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum expandiert. Für die Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 5-8ml Bakteriensuspension eingesetzt und mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für die Maxipräparation von Plasmid-DNA wurden 200ml Bakteriensuspension verwendet. Außerdem wurde der Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmidlösungen erfolgte photometrisch. Um die Reinheit dieser Lösungen abzuschätzen, wurde das Absorptionsverhältnis bei 260nm und 280nm bestimmt.

4.1.3 RNA-Präparation und cDNA-Synthese

Für die RNA-Präparation wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Der anschließende Verdau von genomischer DNA sowie die nachfolgende cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Vollständigkeit des DNA-Verdaus wurde durch den Einsatz der mit DNase behandelten RNA als Template in der qPCR verifiziert. Zur Synthese von cDNA wurden 1µg RNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

4.1.4 Real Time quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zur Quantifizierung der Transkription bestimmter Gene wurde ausschließlich die Real Time quantitative PCR mit Syber Green I als DNA Farbstoff verwendet. Die Spezifität der gemessenen Signale wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die Effizienz der Primer wurde

mittels Verdünnungsreihen der cDNA bestimmt. Es wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Alle Messungen wurden im Lightcycler 480 (Roche) durchgeführt.

Im Allgemeinen wurde die folgende Zusammensetzung des Reaktionsansatzes verwendet.

Reagenz	Volumen
Mastermix QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen)	5µl
Forward Primer (10µM)	1µl
Backward Primer (10µM)	1µl
cDNA (1:10 Verdünnung)	1µl
H ₂ O	2µl

4.1.5 Standard PCR (Polymerase Chain Reaction)

In Abhängigkeit von der zu amplifizierenden Nukleinsäuresequenz wurde die Taq-Polymerase (MBI Fermentas) bzw. die Phusion-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Es wurden die folgenden Reaktionsansätze und PCR Programme verwendet.

Taq-Polymerase		Phusion-Polymerase	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
10X Taq Puffer mit KCl	2µl	5X Phusion HF Puffer	4µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl	dNTP (25mM)	2µl
dNTP (25mM)	2µl	Forward Primer (10µM)	1µl
Forward Primer (10µM)	1µl	Backward Primer (10µM)	1µl
Backward Primer (10µM)	1µl	Phusion-Polymerase	0,2µl
Taq-Polymerase	1µl	Template	1µl
Template	1µl	DMSO	0,6µl
H ₂ O	10µl	H ₂ O	10,2µl

Taq-Polymerase				Phusion-Polymerase			
Temp.	Zeit	Zyklen	Reaktion	Temp.	Zeit	Zyklen	Reaktion
95°C	5min	1	Denaturierung	98°C	30s	1	Denaturierung
95°C	30s	25-40	Denaturierung	98°C	10s	25-40	Denaturierung
54°C-64°C	30s		Annealing	54°C-64°C	30s		Annealing
72°C	30s-90s		Elongation	72°C	15s-60s		Elongation
72°C	10min	1	Elongation	72°C	10min	1	Elongation
4°C	∞	1	Kühlung	4°C	∞	1	Kühlung

4.1.6 Yeast-Two-Hybrid-System

Mit Hilfe von Yeast-Two-Hybrid-Analysen können Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen werden. Diese Methode basiert auf der Transkriptionsinduktion durch den Gal4-Transkriptionsfaktor. Gal4 ist essentiell für die Transkription von Genen, die an der Adenin- und Histidin-Biosynthese beteiligt sind. Der Gal4-Transkriptionsfaktor besteht aus einer DNA-

Bindungsdomäne (BD) sowie einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Im Yeast-Two-Hybrid werden die zu untersuchenden Interaktionspartner als Fusionsproteine mit AD bzw. BD exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion, bildet sich ein funktionaler Gal4-Transkriptionsfaktor aus, der zur Induktion von Genen führt, welche essentiell für die Adenin- und Histidin-Biosynthese sind.

Die Gensequenzen von EpICD, FHL2, β -Catenin und Lef-1 wurden in die beiden Vektoren pGAD-C2 und pGBD-C2 kloniert. Die Expressionsvektoren pGAD-C2(Leu) und pGBD-C2 (Trp) wurden in den Hefestamm PJ69-7A ko-transfiziert, auf SC-Leu-Trp-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert (James et al., 1996). Für die Interaktionsanalyse mittels Yeast-Two-Hybrid wurden mehrere Kolonien in jeweils 500 μ l sterilem Wasser resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden in 96-well-Platten zu einer optischen Dichte von 1 und einem Volumen von 200 μ l verdünnt. Anschließend wurden diese Zellsuspensionen zum Ausplattieren auf Selektionsplatten (-Ade, -His und -Trp+Leu) verwendet. Proteininteraktionen können durch das Zellwachstum auf Selektionsplatten (-Ade, -His) nachgewiesen werden. Um falsch positive Interaktionen zu erkennen, wurden die Expressionsvektoren pGAD-C2 und pGBD-C2 ohne Insert als Kontrolle ko-transfiziert.

4.2 Bakterienkultur

4.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Zur Kultivierung von Bakterien in Suspension wurde Luria Broth Medium (LB) mit den jeweiligen Zusätzen an Antibiotikum eingesetzt. Im Allgemeinen wurden Bakterien bei 37°C kultiviert. Nach erfolgter Transformation bzw. zum Vereinzeln wurden Bakterien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Für die Aufbewahrung von Bakterien über einen längeren Zeitraum wurden die Flüssigkulturen mit 15% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme wurde 200ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur beimpft. Nachdem die Kultur eine optische Dichte (OD_{600nm}) zwischen 0,3-0,6 erreicht hatte, wurde die Zellsuspension auf Eis heruntergekühlt und durch aufeinander folgende Waschschriffe mit den Puffern TfBI und TfBII gewaschen (Hanahan, 1983). Die Bakterien wurden sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3 Transformation von *E.coli*

Aliquoten der chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden je 100µl Bakteriensuspension mit ca. 50ng Ligationsansatz bzw. mit ca. 1ng Plasmid verwendet. Nach der Inkubation für 30min auf Eis wurden die Bakterien für 45s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für 5min auf Eis inkubiert. Nachdem die Bakterien in 1ml LB-Medium aufgenommen worden waren, erfolgte eine Inkubation für 45min unter leichtem Schütteln bei 37°C. Im letzten Schritt wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.3 Hefekultur

4.3.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200rpm) kultiviert. Für eine längere Aufbewahrung wurden stationäre Flüssigkulturen (YPD-Medien) in 17% (v/v) Glycerin bei -80°C eingefroren.

4.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen

Für die Präparation von chemisch-kompetenten Hefezellen wurden 50ml YPD-Medium von einer Übernachtskultur zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,1 angeimpft und bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) zwischen 0,5-0,7 wurden die Hefezellen mittels Zentrifugation für 5min bei 500g und Raumtemperatur geerntet. Das Zellpellet wurde mit 25ml sterilem Wasser und anschließend mit 5ml SORB-Lösung gewaschen und dann in 360µl SORB-Lösung aufgenommen. Zuletzt wurden 40µl Lachsspermien-DNA (Invitrogen) zugesetzt. Kompetente Hefezellen wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.3.3 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen wurde entsprechend der LiOAc-Methode durchgeführt. Hierfür wurden 10µl kompetenter Hefezellen mit 1µl Plasmid-Lösung (Mini-Plasmid-Präparation) gemischt. Nach der Zugabe von 60µl PEG und gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubation für 30min bei Raumtemperatur. Die Hefezellen wurden bei 42°C für 15min einem Hitzeschock unterzogen und anschließend durch Zentrifugation für 3min bei 200rpm und Raumtemperatur abgetrennt. Das Hefepellet wurde in 200µl sterilem Wasser aufgenommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten wurden 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Zelllinien

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sicherheitswerkbank und unter Verwendung steriler Pipetten und Lösungen durchgeführt. Im Allgemeinen wurden Zellen bei 280g für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Alle Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C, mit 5% CO₂ Partialdruck und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Adhärenente Zellen wurden in Abhängigkeit von der Zelllinie alle 2-3 Tage gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) durch Inkubation bei 37°C in Suspension gebracht. Diese Zellsuspensionen wurden mit frischem Medium versetzt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Bei der E14TG2 α -Zelllinie wurden die trypsinierten Zellen zusätzlich mit Medium ohne LIF-Zusatz gewaschen. Außerdem wurden für E14TG2 α -Zelllinien ausschließlich mit Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen verwendet. Die Zelllinien-abhängigen Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in 3.2 aufgelistet. Zur Kultivierung stabiler Transfektanten wurde dem Medium Puromycin (1 μ g/ml) zugesetzt.

4.4.2 Transfektion und Selektion verschiedener Zelllinien

MATra-A

Die Zelllinien HEK293, NIH3T3 und mF9 wurden mit Hilfe des MATra-Reagenzes transfiziert. Für die Transfektion wurden Zellen bis zu einer Dichte von 60-80% kultiviert. Anschließend wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Transfektion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um stabile Transfektanten zu generieren, wurde mit der Selektion 24 Stunden nach der Transfektion begonnen.

Nukleofektion

Für die Transfektion der Zelllinie E14TG2 α wurde das Nukleofektionsystem (Amaya) verwendet. Hierfür wurden Zellen bis zu einer Dichte von 60-80% kultiviert, mit PBS gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Transfektion von E14TG2 α erfolgte mit Programm A-24.

4.4.3 Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten

TAPI-1-Inhibitor

TAPI-1 wurde zur Inhibierung von Metalloproteasen in einer Konzentration von 50 μ M über Nacht dem Zellkulturüberstand zugesetzt.

C3-Inhibitor

Der BACE1 Inhibitor C3 wurde in einer Konzentration von 1 μ M über Nacht dem Zellkulturüberstand zugesetzt.

PMA-Stimulation

Die PMA-Stimulation erfolgte 2 Stunden bevor der Zellkulturüberstand abgenommen wurde in einer Konzentration von 1 μ M.

DAPT-Inhibitor

Zur Inhibierung der γ -Sekretase wurde DAPT in einer Konzentration von 10 μ M in den Zellkulturüberstand bzw. in einer Konzentration von 50 μ M in die Membranfraktion (Membranassay) gegeben.

Lactacystin β -Lacton

Um den proteosomalen Abbau zu inhibieren, wurde Lactacystin β -Lacton in einer Konzentration von 50 μ M über Nacht auf die Zellen gegeben.

Mg132-Inhibitor

Der proteasomale Inhibitor Mg132 wurde in der Konzentration von 10 μ M für 4 Stunden auf die Zellen gegeben.

4.5 Proliferationsassays

4.5.1 Durchflusszytometrie-Kügelchen

Zur Bestimmung von Zellzahlen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Als Kalibrator wurden 20 μ l Durchflusszytometrie-Kügelchen (FACS absolute Counting Beads) einem Aliquot von 300 μ l der Zellsuspension zugesetzt. Durch Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes wurden die gemessenen Zellen und Kügelchen aufgetrennt und durch das Setzen entsprechender Gates quantifiziert. Die Berechnung der Zellzahlen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.5.2 Mischkulturen

Um die Proliferation von Zelllinien zu quantifizieren, wurden die zu untersuchenden Zellen mit YFP-exprimierenden Zellen des gleichen Ursprungs gemischt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an YFP-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Bei einer gesteigerten Proliferationsrate der YFP-negativen Zellen kommt es zu einer

relativen Abnahme der YFP-positiven Zellen. Außerdem wurden die Proliferationen der EpICD-YFP- und YFP-exprimierenden mF9-Zelllinie miteinander verglichen. Hierfür wurden diese Zelllinien mit mF9 Wildtypzellen gemischt.

4.6 Durchflusszytometrie

4.6.1 Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen

Die Oberflächenexpression von Membranproteinen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden Zellen trypsiniert, einmal mit PBS gewaschen und in Durchflusszytometrie-Puffer mit dem primären Antikörper (50µl Durchflusszytometrie-Puffer + 1µl primären Antikörper) aufgenommen. Nach einer Inkubation über 15min bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension bei 280g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Durchflusszytometrie-Puffer mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper resuspendiert (50µl Durchflusszytometrie-Puffer + 1µl SekundärAntikörper) und über 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 500µl Durchflusszytometrie-Puffer mit 2µl Propidiumiodid (0,5mg PI/ml PBS) aufgenommen und zur weiteren Durchflusszytometrie-Messung verwendet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Messungen herzustellen und unspezifische Bindungen des primären Antikörpers erkennen zu können, wurden Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, vermessen. Alle Messdaten wurden durch die Division der Negativkontrolle normalisiert. Bei exogener Expression wurde zur Kontrolle der Spezifität die stabile Transfektante des entsprechenden Leervektors als zusätzliche Negativkontrolle verwendet.

4.6.2 YFP-Expression

Die YFP-Expression wurde unter anderem mit Hilfe von Durchflusszytometrie-Messungen ermittelt. Als Kontrolle und Bezugsgröße wurden die YFP-negativen und stabilen Transfektanten des entsprechenden Leervektors verwendet.

4.7 Western-Blot

Um Proteine in Zelllysaten bzw. in Ko-Immunopräzipitations-Experimenten zu quantifizieren, wurde die Western-Blot-Methode verwendet.

Herstellung von Zelllysaten

Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und in Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation über 10min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 13000rpm bei 4°C für 10min. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit verwendet.

Western-Blot

In Abhängigkeit von der Proteinexpression sowie der Stärke des Antikörpers wurden zwischen 0,5µg - 50µg Gesamtproteinmenge mit Laemmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5min aufgeköcht (Laemmli, 1970). Anschließend wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel unter definierten Laufbedingungen (Fokussierung: 15min bei 15mA/Gel, 180V; Auftrennung: 30mA/Gel, 180V) aufgetrennt und auf eine durch Methanol aktivierte Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (100V, max. 500mA, 50min). Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu verhindern, erfolgte eine Inkubation für 30min im Blockpuffer. Der spezifische Proteinnachweis wurde durch die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde sowie mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 30min realisiert. Die jeweiligen Antikörperkonzentrationen (primären Antikörper: 1µg/ml – 50ng/ml; sekundärer Antikörper 100 ng/ml – 30ng/ml) wurden der jeweiligen Proteinexpression bzw. der Stärke des Antikörpers angepasst. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurde die Membran mindestens 3mal mit Waschpuffer für jeweils 5min gewaschen. Die Proteine wurden durch die Peroxidase-reaktion in einem ChemiDoc-Gerät mittels CCD-Kamera detektiert. Hierfür wurde das Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) verwendet. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Image Lab Software (Biorad).

4.8 Ko-Immunopräzipitation

Wechselwirkungen von mEpCAM mit identifizierten Interaktionspartnern wurden mittels Ko-Immunopräzipitation verifiziert. Hierfür wurden mEpCAM-YFP- bzw. YFP-exprimierende mF9-Zelllinien verwendet. Um unspezifische Interaktionen mit dem YFP-Tag ausschließen zu können, wurde die YFP-exprimierende Zelllinie als Negativkontrolle der Ko-Immunopräzipitation verwendet. Das deutlich höhere Expressionsniveau von YFP im Vergleich zu mEpCAM-YFP wurde durch das Verdünnen des YFP-Lysates mit Lysaten von stabilen Leervektortransfektanten ausgeglichen. Die für die Ko-Immunopräzipitation eingesetzte Menge an Gesamtprotein (200µg-4mg) wurde der Stärke der Interaktion, der Proteinexpression sowie der Stärke des Antikörper individuell angepasst. Die Agarosekügelchen (GFP-Trap) wurden 3mal mit PBS gewaschen und für

2-3 Stunden mit den Zelllysaten unter leichter Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarosekügelchen 2-5mal mit 700µl eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Die Waschbedingungen wurden in Abhängigkeit von der Interaktion individuell angepasst. Die Elution der Proteine erfolgte durch das Aufkochen der Agarosekügelchen für 5min mit 20µl Laemmli-Puffer. Die interagierenden Proteine wurden im Western-Blot detektiert und quantifiziert.

4.9 Spaltungsassay in gereinigten Membranfraktionen (Membranassay)

Für den Spaltungsassay wurden die Zellen in Petrischalen (10cm Durchmesser) bis zur nahezu vollständigen Konfluenz kultiviert. Für die Isolierung der Membranfraktion wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und ausschließlich in Eis gekühlten Lösungen verwendet. Das Zellkulturmedium wurde verworfen, die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 1ml PBS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden 3mal in 5ml PBS gewaschen (jeweils 280g, 5min, 4°C) und in 0,5ml Homogenisierungspuffer pro 10cm Petrischale resuspendiert. Zur Zellyse wurde die Zellsuspension 10mal durch eine 23-Gauge Nadel gepresst. Die Abtrennung der Zellkerne erfolgte durch Zentrifugation (1000xg; 4°C, 15min). Die Membranfraktion wurde durch Zentrifugation des postnukleären Überstandes isoliert (16000xg; 4°C; 20min). In dem hierbei anfallenden Pellet ist die Membranfraktion enthalten. Nach dem Waschen mit 500µl Homogenisierungspuffer (16000xg; 4°C; 3min) wurde das Membranpellet in 50µl Assaypuffer (pro 10cm Petrischale) aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde durch das Kühlen der Proben auf Eis zu beliebigen Zeitpunkten gestoppt. In einigen Experimenten wurden lösliche und Membran-assoziierte Spaltprodukte durch eine Ultrazentrifugation voneinander getrennt (100000xg; 4°C; 60min). Die unlöslichen Proteine der Membranfraktion wurden durch Zugabe von 20µl (PBS + 2% TritonX) in Lösung gebracht und durch Zentrifugation von der restlichen Membranfraktion abgetrennt (16000xg; 4°C; 10min). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurden die Proben mit der Western-Blot-Methode weiter untersucht.

4.10 Genexpression mittels cRNA-Microarray

Der cRNA-Microarray wurde in Auftrag gegeben und von der Firma IMG M Laboratories GmbH durchgeführt. Zuerst wurde die Qualität der eingeschickten RNA durch Ermittlung des RIN-Wertes mittels RNA 6000 Nano LabChip Kits (Agilent) überprüft. Nachdem die cRNA aus der eingeschickten RNA hergestellt wurde, erfolgte deren Hybridisierung mit den Sonden auf den Agilent Whole Mouse Genome 4x44K v2 Microarray. Für die Auswertung der Daten wurden die Softwares Perseus, Panther und IPA Analysis verwendet.

4.11 Life cell imaging

Die Lebendzellmikroskopie wurde am Leica TCS SP5 durchgeführt.

4.12 SILAC-basierte Interaktionsstudie von mEpCAM

Um Interaktionspartner von mEpCAM zu identifizieren, wurden Proteine die mit mEpCAM koimmunopräzipitierten mit Hilfe der Massenspektrometrie quantifiziert. Hierbei wurde die SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) Technologie verwendet. Zuerst wurden stabile mF9-Transfektanten von mEpCAM-YFP, mEpICD-YFP und YFP für 14 Tage im entsprechenden SILAC-Medium (Silantes) passagiert. Hierbei wurde die mEpCAM-YFP-exprimierende Zelllinie schwer (Lys6, Arg8), die mEpICD-YFP-exprimierende Zelllinie mittelschwer (Lys4, Arg6) und die YFP-exprimierende Zelllinie leicht (Lys, Arg) markiert. Der Anteil an markierten Proteinen wurde mittels Massenspektrometrie (LC-MS / MS (LTQ Orbitrap XL, Q-TRAP 4000) ermittelt. Die markierten Zelllinien wurden expandiert und lysiert. Um annähernd ähnliche Konzentrationen zwischen mEpCAM-YFP und YFP herzustellen, wurde das Zelllysat der YFP-exprimierenden Zelllinie mit dem Zelllysat der Leervektortransfektanten im Verhältnis 1:7 gemischt. Für die Immunopräzipitation wurden 6mg Gesamtprotein und 30µl Agarosekügelchen (GFP-Trap) pro Ansatz verwendet. Nach einer Immunopräzipitation über 3 Stunden bei 4°C unter leichter Rotation wurden die Agarosekügelchen dreimal mit 700µl Waschpuffer gewaschen. Die Agarosekügelchen der mEpCAM-YFP- und mEpICD-YFP Immunopräzipitation wurden jeweils mit den Agarosekügelchen der Negativkontrollen vereinigt und bei 95°C für 5min im Laemmli-Puffer eluiert. Alle weiteren Schritte wurden von der Core Facility Proteomics (Helmholtz Zentrum, München) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Vorfraktionierung im SDS-Polyacrylamid-Gel in 5 Fraktionen. Die Proteine wurden durch Dithiothreitol reduziert, durch Iodacetamid alkyliert und anschließend tryptisch verdaut. Zur Quantifizierung der Peptide wurde die LC-MS/MS (LTQ Orbitrap XL, Q-TRAP 4000) eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Softwares MaxQuant (Version 1.4.1.2) und Perseus (Version 1.3.0.4).

4.13 Bestimmung der Schnittstellen von mEpCAM

Bestimmung der extrazellulären Schnittstelle von mEpCAM

Für die Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen von mEpCAM wurde ein Tev-Motiv gefolgt von einem Flag-Tag 42 Aminosäuren N-terminal von der Transmembrandomäne entfernt in mEpCAM kloniert. Dieses mEpCAM-Konstrukt wird im Folgenden als mEpCAM-TF bezeichnet. Das Tev-Motiv ist eine Erkennungssequenz für die Tobacco Etch Virus (Tev) Protease. Nach der Spaltung wird mEpEX in den Zellkulturüberstand freigegeben und kann mit Sepharose Kügelchen,

an welche ein Flag-spezifischer Antikörper gekoppelt wurde, immunopräzipitiert werden. Der größte Teil des mEpEX Proteins kann mit Hilfe der Tev-Protease abgespalten werden. Die Schnittstelle der Tev-Protease liegt zwischen Glycin (G) und Asparaginsäure (D) innerhalb der Tev-Erkennungssequenz (ENLYFQG/D). Auf diese Weise werden Peptide generiert, die sich problemlos mittels Massenspektrometrie analysieren lassen. Das Prinzip der Bestimmung der extrazellulären Spaltstelle von mEpCAM ist im Ergebnisteil in Abbildung 9 veranschaulicht. Mit dem mEpCAM-TF-Konstrukt wurden stabile Transfektanten in den Zelllinien HEK293, NIH3T3 und mF9 generiert.

Nachdem die stabilen Transfektanten des mEpCAM-TF-Konstruktes eine vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium erneuert und nach 24 Stunden für die Flag-Immunopräzipitation abgenommen. Für die NIH3T3- und HEK293-Zelllinien wurden 15ml und für die mF9-Zelllinie wurde 50ml Zellkulturüberstand für die Flag-Immunopräzipitation eingesetzt. Zunächst wurden Zellen durch Zentrifugation abgetrennt. Die Flag-Immunopräzipitation wurde mit 30µl Flag-Kügelchen über Nacht bei 4°C und Rotation durchgeführt. Die Flag-Kügelchen wurden 3mal mit PBS sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen in 40µl Glycinpuffer (100mM; pH 2,5) resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert, um Proteine von den Kügelchen zu eluieren. Nach Zentrifugation (280rcf, 2min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, um eluierte Peptide von den Flag-Kügelchen abzutrennen. Der Überstand wurde durch Zugabe von 200µl Tris (100mM; pH8) neutralisiert, und entsprechende Peptide wurden nach Angaben des Herstellers durch die Protease Tev verdaut. Peptide mit einem Flag-Tag wurden mit Hilfe von 10µl Flag-Kügelchen bei 4°C über 4 Stunden unter Rotation immunopräzipitiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer und zweimaligen Waschen mit Wasser wurden die Peptide in 10µl mit 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure-gesättigter Lösung aus Acetonitril und Wasser (1:1) eluiert und zur weiteren Analyse im MALDI-TOF (Voyager-DE STR, Applied Biosystems) vermessen.

Bestimmung der γ -Schnittstellen von mEpCAM

Für die Bestimmung der γ -Sekretase-Schnittstellen in mEpCAM wurde das Myc-mCTF-FT-YFP-Konstrukt generiert. Hierfür wurde das Signalpeptid für die Translokation in die Plasmamembran von mEpCAM verwendet. Auf das Signalpeptid folgen ein Myc-Tag und die mEpCAM-Sequenz ab 15 Aminosäuren N-terminal von der Transmembrandomäne bis zum C-terminalen Ende. Auf die Sequenz von mEpCAM folgt ein Flag-Tag, ein Tev-Motiv sowie die Sequenz für das YFP-Protein. Mit dem Myc-CTF-FT-YFP-Konstrukt wurden stabile Transfektanten in den Zelllinien HEK293, NIH3T3 und mF9 generiert. Mit Hilfe von Sepharose-Kügelchen, an welche ein Myc-spezifischer Antikörper gekoppelt wurde, wurden Peptide aus den Zellkulturüberständen von stabilen Transfektanten des Myc-CTF-FT-YFP-Konstruktes immunopräzipitiert und massenspektrometrisch

analysiert. Das Prinzip der Schnittstellenbestimmung von der γ -Sekretase in mEpCAM ist im Ergebnisteil in Abbildung 13 dargestellt.

Nachdem die stabilen Transfektanten des Myc-CTF-FT-YFP-Konstruktes eine vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium erneuert und nach 24 Stunden für die Myc-Immunopräzipitation eingesetzt. Hierfür wurden 50ml Zellkulturüberstand und 15 μ l Myc-Kügelchen gemischt über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Waschschriffe sowie die Elution der Peptide wurden wie im oberen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

Bestimmung ϵ -Schnittstellen von mEpCAM

Zur Bestimmung der ϵ -Schnittstellen von mEpCAM wurden die stabilen Transfektanten des Myc-mCTF-FT-YFP-Konstruktes verwendet. Um die ϵ -Schnittstellen von mEpCAM zu bestimmen, wurden die intrazellulären Spaltprodukte des Myc-mCTF-FT-YFP-Konstruktes mit YFP-Kügelchen immunopräzipitiert. Anschließend folgte ein Tev-Verdau und eine erneute Immunopräzipitation mit Hilfe von Flag-Kügelchen. Die dabei isolierten Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Das Prinzip der ϵ -Schnittstellenbestimmung von mEpCAM ist im Ergebnisteil in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

Für die Immunopräzipitation des intrazellulären Spaltproduktes wurden 4mg Gesamtprotein aus Zelllysaten zusammen mit 30 μ l GFP-Trap über 4 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie im oberen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der intrazellulären Spaltprodukte aus Membranfraktionen (Membranassay) wurden die Zellen für 24 Stunden vor der Membranisolierung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt, um die Spaltung des Myc-CTF-FT-YFP-Konstruktes zu verhindern.

5 Ergebnisse

5.1 Spaltung von mEpCAM

Wie bereits in der Zielsetzung erwähnt, wurde die proteolytische Spaltung von hEpCAM bislang ausschließlich in humanen Krebszellen untersucht. Daher sollte überprüft werden, ob auch mEpCAM in diesen Zellen gespalten wird.

Hierfür wurde murines EpCAM als C-terminale Fusion mit YFP stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Aufgrund der geringen molekularen Größe ist das intrazelluläre Spaltprodukt (mEpICD) nur sehr schwer nachweisbar. Die Fusion mit dem YFP-Tag führt zu einer Vergrößerung des intrazellulären Spaltprodukts um 26 kDa und gewährleistet daher eine vereinfachte Detektion von mEpICD. Die antizipierte sequentielle Spaltung von mEpCAM-YFP verläuft über mCTF-YFP und mEpICD-YFP (siehe Abbildung 6).

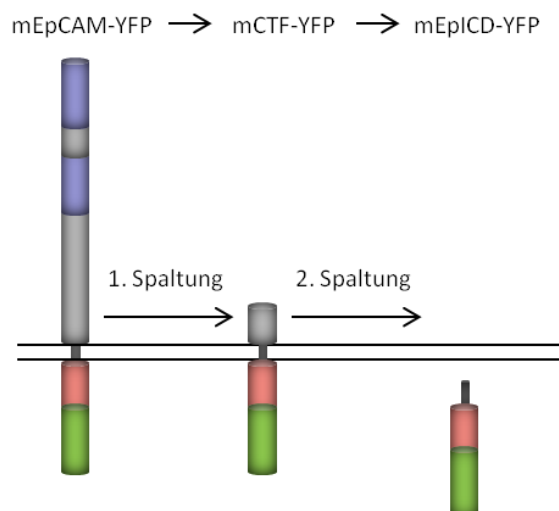


Abbildung 6: Schema der sequentiellen Spaltung des mEpCAM-YFP Fusionsproteins.

Die sequentielle Spaltung vollzieht sich in zwei Schritten. Die erste Spaltung führt zur Freisetzung der Ektodomäne und zur Bildung des C-terminalen Fragments (CTF-YFP). Im zweiten Schritt wird das CTF-YFP weiter zu EpICD-YFP gespalten.

Zunächst wurde eine stabile Zelllinie in HEK293 generiert, die das mEpCAM-YFP-Fusionsprotein stabil exprimiert. Aus dieser Zelllinie wurde die Membranfraktion isoliert (Membranassay) und für die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C und pH7 inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und die Suspension in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden sowohl der Überstand als auch das Pellet für eine Western-Blot-Analyse mit YFP-spezifischen Antikörpern verwendet. Im ersten Versuchsteil (A) konnte die Spaltung des mEpCAM-YFP-Fusionsproteins in HEK293 nachgewiesen werden. Proteine mit intakter Transmembrandomäne (TMD) wie mEpCAM-YFP oder mCTF-YFP waren in der Pelletfraktion im Vergleich zum Überstand deutlich

angereichert. Ein gegensätzlicher Trend war bei dem löslichen Spaltprodukt EpICD-YFP zu erkennen, welches vermehrt im Überstand nachweisbar war (Abbildung 7). Diese Beobachtung lässt sich durch die erhöhte Hydrophilie des Proteins beim Verlust der Transmembrandomäne erklären. Im zweiten Versuchsteil (B) konnte die Spaltung des mEpCAM-YFP-Fusionsproteins in murinen ES-Zellen (E14TG2 α) sowie in Teratokarzinom-Zellen (mF9) bestätigt werden. Hierfür wurden die aufgereinigten Membranfraktionen von stabilen mEpCAM-YFP-Transfektanten beider Zelllinien verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und pH7 wurden die Reaktionen auf Eis gestoppt. Die Beteiligung der γ -Sekretase an der sequentiellen Spaltung von mEpCAM konnte durch die Akkumulation des C-terminalen Fragments (CTF-YFP) nach Inhibierung der γ -Sekretase (DAPT), im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit dem Lösungsmittel DMSO, nachgewiesen werden.

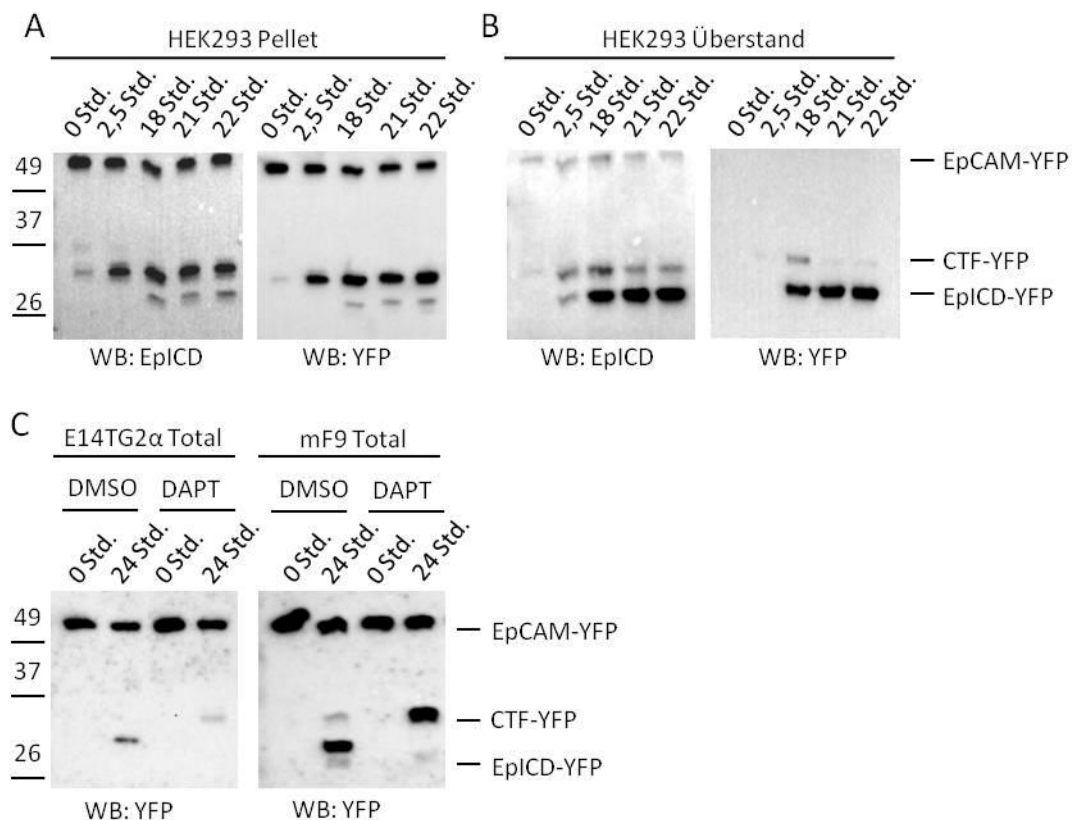


Abbildung 7: Nachweis der proteolytischen Spaltung von mEpCAM.

Hierfür wurde eine aufgereinigte Membranfraktion (Membransassay) von stabilen Zelllinien, die das mEpCAM-YFP-Fusionsprotein exprimieren, über die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C inkubiert. Für den Nullwert bzw. für das Stoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis inkubiert. Für alle hier dargestellten Experimente wurde ein Reaktionspuffer mit einem pH-Wert von 7 verwendet. **(A)** Membransassay von HEK293-Zellen, die das mEpCAM-YFP exprimieren. Nach der Inkubation über die angegebenen Zeitintervalle wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert und die Überstände für eine Western-Blot-Analyse verwendet. **(B)** Membransassay von HEK293-Zellen, die mEpCAM-YFP exprimieren. Nach der Inkubation für die angegebenen Zeitintervalle wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert und die Pellets für eine Western-Blot-Analyse verwendet. **(C)** Membransassay von E14TG2 α und mF9, die das mEpCAM-YFP stabil exprimieren. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von DMSO oder DAPT. Nach der angegebenen Inkubation wurden die Proben ohne Zentrifugation für eine Western-Blot-Analyse verwendet.

Um einen Einfluss der Überexpression sowie des YFP-Tags auf die Spaltung ausschließen zu können, wurde die Spaltung von endogenem mEpCAM in aufgereinigten Membranfraktionen von murinen Teratokarzinomzellen (mF9) und murinen embryonalen Stammzellen (E14TG2 α) mit EpICD-spezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Daten der Arbeitsgruppe Lichtenthaler (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, München) legen nahe, dass EpCAM durch die Protease BACE1 gespalten wird. Hierbei konnte gezeigt werden, dass EpCAM in BACE1-Deletionsmutanten von Zebrafischembryonen angereichert war (unpublizierte Daten). Während BACE1 in Endosomen bei pH4 aktiv ist, sind die Metalloproteasen Adam10 und Adam17 in der Zellmembran bei pH7 aktiv. Aus diesem Grund wurde der Spaltungsassay bei pH4 und pH7 durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation bei pH7 wurde in Anwesenheit von DAPT eine Akkumulation von mEpCAM-CTF in Membranfraktionen von mF9 und E14TG2 α beobachtet. Auf diese Weise wurde die Spaltung von endogenem mEpCAM bei pH7 nachgewiesen. Das intrazelluläre Spaltprodukt EpICD konnte im Western-Blot nicht detektiert werden. Möglicherweise ist die molekulare Masse von EpICD zu gering, um im Western-Blot detektiert zu werden. Bei pH4 war hingegen nach DAPT- und DMSO-Behandlung eine deutliche Akkumulation von mEpCAM-CTF nach 24-stündiger Inkubation zu verzeichnen. Der γ -Sekretase-Komplex ist bei diesem pH-Wert inaktiv, sodass keine weitere Spaltung von mEpCAM-CTF zu mEpICD stattfinden kann. Bei pH7 war nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C lediglich ein kleiner Anteil von mEpCAM gespalten, während bei pH4 und sonst gleichen Bedingungen mEpCAM vollständig zu mEpCAM-CTF gespalten wurde. Diese Daten zeigen, dass auch endogenes mEpCAM bei den pH-Werten 7 und 4 in den Zelllinien mF9 und E14TG2 α gespalten wird. Die Hypothese der mEpCAM-Spaltung durch BACE1 in murinen mF9- und E14TG2 α -Zellen wird durch die Beobachtung gestützt, dass mEpCAM auch bei einem pH-Wert von 4 gespalten wird.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Proteolyse von mEpCAM im Überexpressionssystem mit mEpCAM in Fusion mit YFP in verschiedenen Zelllinien (HEK293, mF9 und E14TG2 α) nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte die Spaltung von endogenem mEpCAM in mF9 und E14TG2 α bei pH4 und pH7 gezeigt werden.

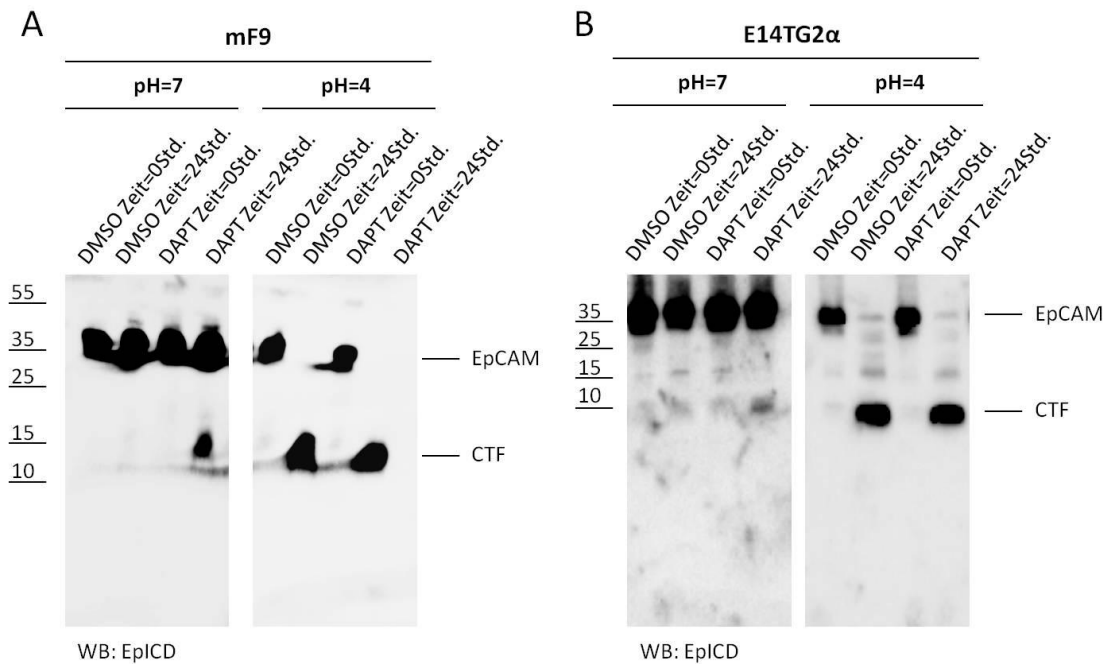


Abbildung 8: Nachweis der proteolytischen Spaltung von endogenem mEpCAM.

Hierfür wurde eine aufgereinigte Membranfraktion (Membransassay) von Wildtyp-Zellen über die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C inkubiert. Für den Nullwert und für das Stoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von DMSO oder DAPT bei pH-Werten von 7 und 4. **(A)** Nachweis der Spaltung vom endogenen mEpCAM bei pH7 und 4 in mF9. **(B)** Nachweis der Spaltung vom endogenen mEpCAM bei pH7 und pH4 in E14TG2α.

5.2 Bestimmung der extrazellulären Spaltsequenzen von mEpCAM

Im Folgenden sollten von Proteasen, die für die Spaltung von mEpCAM verantwortlich sind, die jeweiligen Schnittstellen bestimmt werden. Hierzu wurde die *Tobacco Etch Virus* (Tev)-Erkennungssequenz - gefolgt vom Flag-Tag - in die Nukleotidsequenz von mEpCAM kloniert. Der Flag-Tag ermöglicht eine Immunopräzipitation des extrazellulären Spaltproduktes von mEpCAM aus Zellkulturüberständen. Die Tev-Erkennungssequenz kann genutzt werden, um einen Großteil des extrazellulären Spaltproduktes mittels Tev-Protease proteolytisch abzutrennen. Auf diese Weise werden Peptide generiert, die klein genug sind, um im *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometer detektiert zu werden. Typische Schnittstellen für Proteasen, die in der extrazellulären Domäne von Membranproteinen schneiden, liegen bis zu 30 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt. Um diesen Bereich vollständig abzudecken, wurde der Tev-Flag-Tag in dem verwendeten Expressionsplasmid so eingefügt, dass er sich 42 Aminosäuren N-terminal von der Transmembrandomäne in mEpCAM befindet. Da die Schnittstelle der Tev-Protease genau definiert ist, können die extrazellulären Schnittstellen von mEpCAM durch eine genaue Massenbestimmung der entstehenden Peptidfragmente berechnet werden (siehe Abbildung 9A). Für die Schnittstellenbestimmung des extrazellulären Schnittes wurden stabile Transfektanten des mEpCAM-TF Konstruktes in den

Zelllinien HEK293, NIH3T3 und mF9 generiert. In Abbildung 9B sind repräsentative Spektren der verschiedenen Zelllinien dargestellt. Die Spezifität der gemessenen Signale wurde durch stabile Transfektanten der HEK293-Zellen, die ausschließlich einen Leervektor beinhalten, kontrolliert. Im Wesentlichen konnten 4 extrazelluläre Spaltstellen von mEpCAM identifiziert werden. Wie in Abbildung 9B zu erkennen ist, wurden in den verschiedenen Zelllinien identische Massen der extrazellulären Spaltprodukte mit verschiedenen Intensitäten identifiziert. Zum Beispiel zeigten Peak (#1) und Peak (#4) in HEK293-Zellen vergleichbare Intensitäten, während in mF9-Zellen der Peak (#4) im Vergleich zum Peak (#1) eine ca. 10-fach höhere Intensität aufwies. Die entsprechenden Massen dieser Peaks - und damit die Spaltstellen - waren jedoch in jeder Zelllinie die gleichen. Die Intensitäten der jeweiligen Spaltprodukte sind zwischen den Zelllinien deutlich verschieden. Die unterschiedlichen Intensitäten der Spaltprodukte in Abhängigkeit von der Zelllinie, können durch unterschiedliche Expressionsstärken beteiligter Proteasen erklärt werden. In Abbildung 9C sind alle gemessenen Massen der jeweiligen Aminosäuresequenz zugeordnet. Außerdem sind die Abweichung zur theoretisch berechneten Masse sowie die Ladung der Moleküle dargestellt. Im Allgemeinen liegen diese Abweichungen im Bereich der Messgenauigkeit der verwendeten Methode und bestätigen die Spezifität der gemessenen Signale.

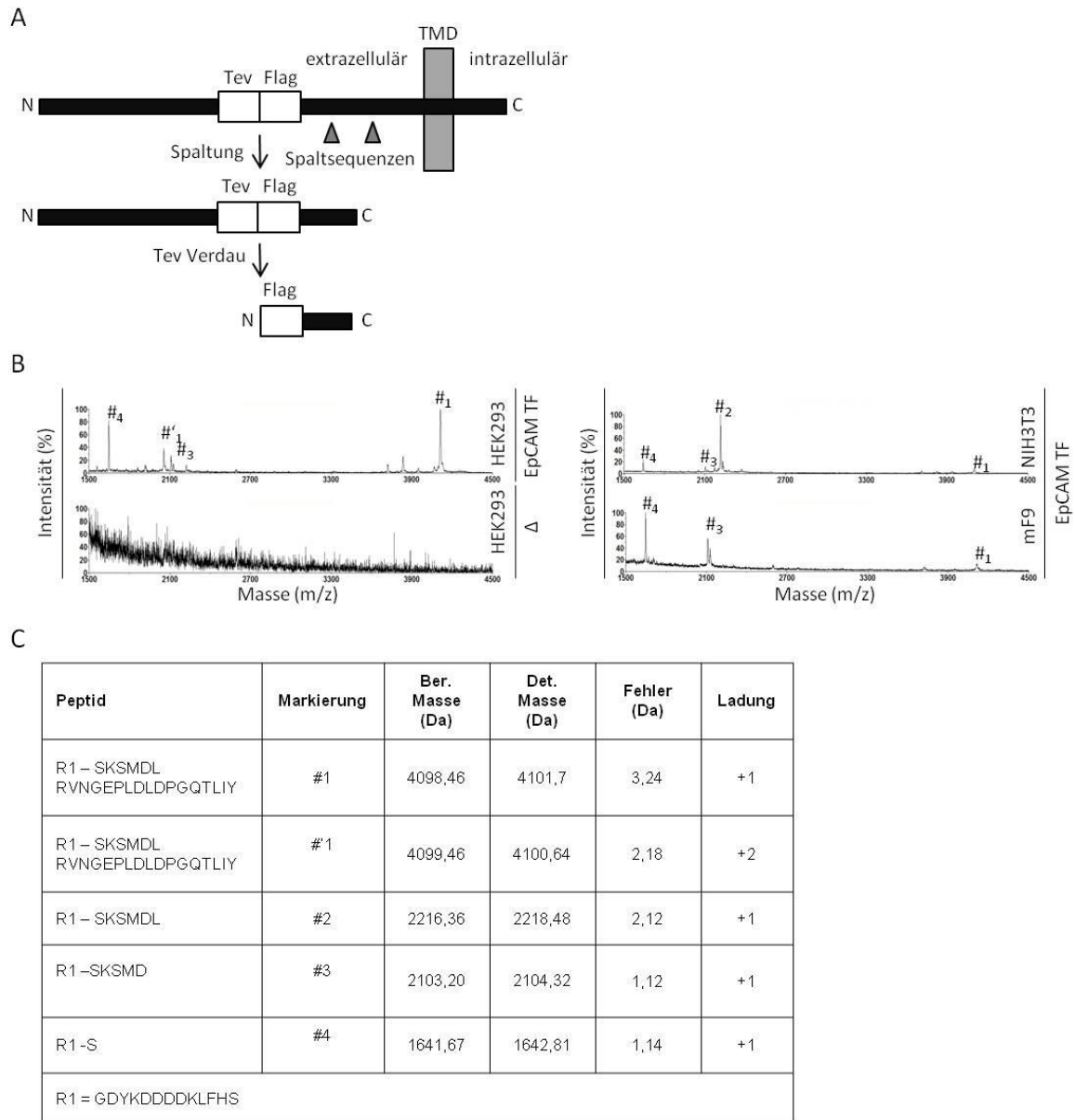


Abbildung 9: Schnittstellenbestimmung in der extrazellulären Domäne von mEpCAM.

(A) Schema der Schnittstellenbestimmung in der extrazellulären Domäne. **(B)** Repräsentative MALDI-TOF-Spektren von HEK293, NIH3T3 und mF9. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die das mEpCAM-TF-Konstrukt stabil exprimierten. Als Negativkontrolle wurde eine mit dem Leervektor stabil transfizierte HEK293-Zelllinie verwendet. **(C)** In dieser Tabelle sind die berechnete und detektierte Masse sowie der Fehler und die Ladung aller detektierten Ionen dargestellt.

5.2.1 Charakterisierung beteiligter Proteasen

Als nächstes sollten den Schnittstellen von mEpCAM Proteasen zugeordnet werden. Während für mF9-Zellen erst größere Volumina von 50ml an Zellkulturüberstand deutlich zu erkennende Signalintensitäten wie in Abbildung 9B lieferten, waren für HEK293-Zellen bereits Zellkulturüberstände mit einem Volumen von 10ml ausreichend. Aus diesem Grund wurden HEK293-Zellen als Modellzelllinie zur Charakterisierung von Proteasen verwendet. In humanen Krebszellen wurde gezeigt, dass Metalloproteasen an der Spaltung von hEpCAM beteiligt sind (Maetzel et al., 2009). Um den Einfluss von Metalloproteasen auf die Spaltung von mEpCAM zu

überprüfen, wurde der Einfluss von TAPI1 (Inhibitor von Metalloproteasen) sowie von *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) (Aktivator von Metalloproteasen) auf die gemessenen Spektren bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von Metalloproteasen durch TAPI1 zu einer deutlichen Reduktion der Intensität von Peak #₄ führte (Abbildung 9A). Hingegen hatte die PMA-Behandlung einen deutlichen Anstieg der Intensität von Peak #₄ im Vergleich zur Intensität von Peak #₁ zur Folge (Abbildung 10A). Diese Daten zeigen, dass Peak #₄ durch die Spaltung von mEpCAM durch eine Metalloprotease hervorgerufen wird. Anschließend wurde die Hypothese überprüft, dass mEpCAM durch die Protease BACE1 gespalten wird. Hierzu wurde der Einfluss eines BACE1-spezifischen Inhibitors (C3) sowie der Einfluss der BACE1-Überexpression auf die generierten Proteinfragmente von mEpCAM bestimmt. Als Kontrollbehandlung wurde hierfür das Lösungsmittel des C3-Inhibitors DMSO verwendet. Die Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor C3 führte zu einem nahezu vollständigen Verschwinden von Peak #₁. Umgekehrt führte die BACE1-Überexpression zu einem deutlichen Intensitätszuwachs von Peak #₁ in Relation zu Peak #₄ (Abbildung 10B). Diese Daten zeigen, dass Proteinfragmente von mEpCAM, welche in Peak #₁ detektiert werden, durch die enzymatische Aktivität von BACE1 entstehen. Aufgrund dieser Daten konnte die Spaltung von mEpCAM durch BACE1 bestätigt werden und die Spaltstelle in der Aminosäuresequenz von mEpCAM bestimmt werden.

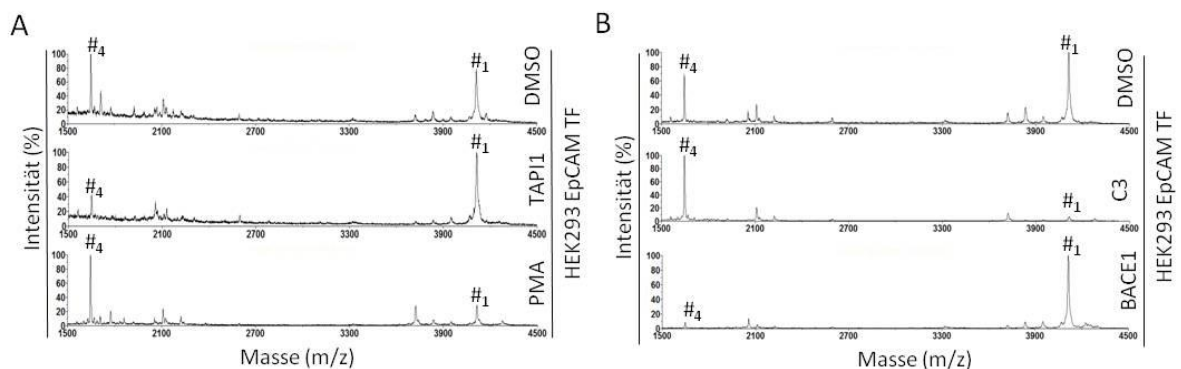


Abbildung 10: Charakterisierung an der Spaltung von mEpCAM beteiligter Proteasen.

(A) Identifikation der Metalloprotease-Schnittstelle. Repräsentatives Schnittmuster von mEpCAM-TF in HEK293-Zellen nach DMSO-, TAPI1- und PMA-Behandlung. (B) Identifikation der BACE1-Schnittstelle. Repräsentatives Schnittmuster von mEpCAM-TF in HEK293-Zellen nach DMSO- und C3-Behandlung sowie nach BACE1-Überexpression.

5.2.2 Vergleich der extrazellulären Schnittstellen von murinem mit humanem EpCAM sowie von murinem EpCAM mit murinem Trop2

Um festzustellen, ob die identifizierten Spaltstellen von mEpCAM auch in hEpCAM konserviert sind, wurden die jeweiligen Aminosäuresequenzen miteinander verglichen. Trop2 ist ein Retroposon von EpCAM und weist eine Homologie von ca. 50% auf (Okabe et al., 2009). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass Trop2 ähnlich wie hEpCAM durch Adam17 und den γ -Sekretase

5.2.3 Konservierung der α - und β -Schnittstellen

Um ein umfassenderes Bild der Konservierung der Metalloprotease (α)- sowie der BACE1 (β)-Schnittstellen zu erhalten, wurden Orthologe von EpCAM in verschiedenen Spezies in silico ermittelt. Als Kriterium wurde hier eine gleiche Exonstruktur wie bei mEpCAM vorausgesetzt. Orthologe von mEpCAM wurden in Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln, Kloakentieren, Beuteltieren, Ungulaten, Primaten und Nagetieren identifiziert. Es konnten keine EpCAM-ähnlichen Gensequenzen in Pflanzen, Bakterien, Viren und Pilzen nachgewiesen werden. Für die weitere Analyse wurden ausschließlich EpCAM-Sequenzen verwendet, bei denen eine vollständige Sequenz und Exon-Struktur identifiziert werden konnte. Anhand dieser Kriterien wurden 52 Orthologe von EpCAM identifiziert. Diese Aminosäuresequenzen wurden für die weitere Analyse verwendet. Mit Hilfe eines Alignment wurden Werte für die Konservierung jeder einzelnen Aminosäure ermittelt. Der hierfür verwendete ClustalW Algorithmus lieferte Werte zwischen 11 (bei vollständiger Konservierung) und 0 (bei gar keiner bzw. bei sehr geringer Konservierung). Die resultierenden Werte der jeweiligen Schnittstellen wurden mit dem Wert der durchschnittlichen Konservierung des gesamten EpCAM-Moleküls verglichen. Auch in dieser Analyse konnte bestätigt werden, dass die BACE1-Schnittstelle (β) in der Evolution nahezu unverändert geblieben ist. Die N- und C-terminalen Aminosäuren der BACE1-Schnittstelle waren in allen Orthologen von EpCAM vollständig konserviert. Dies spiegelt sich auch im Höchstwert der Konservierung von 11 wieder (siehe Abbildung 12). Mit Ausnahme der dritten N-terminalen Aminosäure der BACE1-Schnittstelle, sind alle übrigen Aminosäuren überdurchschnittlich konserviert (siehe Abbildung 12). Hingegen liegt die Schnittstelle der Metalloprotease in einem gering konservierten Bereich. Die hier ermittelte Konservierung hatte Werte zwischen 0 und 4 und ist daher im Vergleich zum gesamten EpCAM-Molekül unterdurchschnittlich (siehe Abbildung 12). Diese Daten legen nahe, dass BACE1 in allen für die Analyse verwendeten Organismen an der Proteolyse von EpCAM beteiligt sein könnte. Die geringe Konservierung der Metalloprotease Schnittstelle von EpCAM lieferte erste Hinweise darauf, dass EpCAM möglicherweise nur in einigen Organismen, wie im Menschen und der Maus, durch Metalloproteasen gespalten wird.

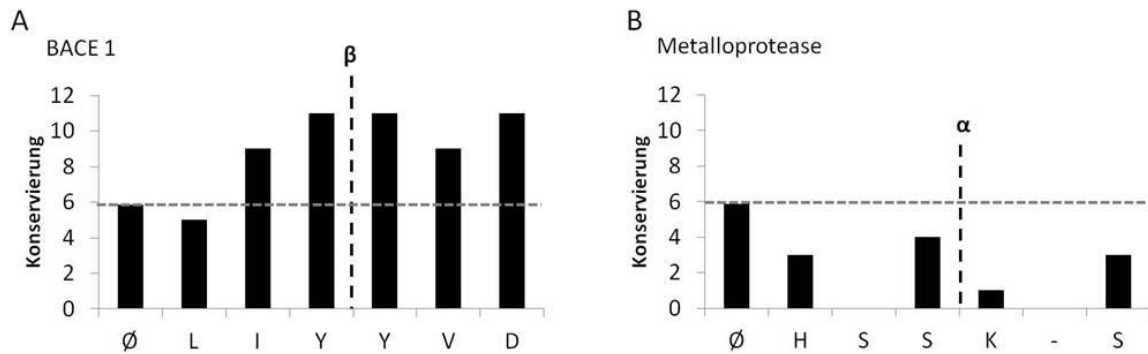


Abbildung 12: Konservierung der β - und α -Schnittstellen von mEpCAM.

Der Wert für die Konservierung in Abhängigkeit von der Position der Aminosäure wurde mittels ClustalW Algorithmus berechnet. Der Maximalwert liegt bei 11 und entspricht einer vollständigen Konservierung. Für den Vergleich wurden 52 Aminosäuresequenzen von EpCAM aus verschiedenen Organismen verwendet. Zum Vergleich wurde die durchschnittliche Konservierung (Mittelwert) der vollständigen mEpCAM Aminosäuresequenzen berechnet. **(A)** Konservierung der BACE1-Schnittstelle im Vergleich zur durchschnittlichen Konservierung von EpCAM. **(B)** Konservierung der Metalloprotease-Schnittstelle im Vergleich zur durchschnittlichen Konservierung von EpCAM.

5.3 Bestimmung der γ - und ϵ -Spaltstellen von mEpCAM

Im Folgenden wurden Schnittstellen der γ -Sekretase in mEpCAM bestimmt. Nach der initialen Spaltung von mEpCAM, die zur Freisetzung der Ektodomäne führt, wird das gebildete mEpCAM-CTF durch die γ -Sekretase prozessiert. Aufgrund bekannter Spaltungsmuster der γ -Sekretase sind zum einen mehrere N-terminale Spaltprodukte (γ -Schnitt) sowie mehrere C-terminale Spaltprodukte (ϵ -Schnitt) zu erwarten. Als prominente Beispiele für bekannte Spaltmuster der γ -Sekretase sind hier App und Notch zu nennen (Tagami et al., 2008; Wang et al., 1996).

Um beide Schnittstellen mittels Massenspektrometrie identifizieren zu können, wurde ein N- und C-terminales Fusionsprotein von mEpCAM-CTF kloniert. Der N-terminale Myc-Tag ermöglicht die Immunopräzipitation des resultierenden Peptids aus Zellkulturüberständen. Die hierbei freigesetzten Peptide sollten aufgrund der zu erwartenden Masse von ca. 4KDa problemlos mittels MALDI-TOF detektiert werden können. Vorherige Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass die C-terminale YFP-Fusion einen stabilisierenden Einfluss auf das intrazelluläre Spaltprodukt EpICD hat. Außerdem ermöglicht YFP die intrazelluläre Lokalisation von EpICD nach einer Spaltung mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie. Um dennoch Peptide zu generieren, die im MALDI-TOF problemlos detektiert werden können, wurde eine Tev-Erkennungssequenz zum Abtrennen von YFP zwischen EpICD und YFP kloniert. Außerdem ermöglicht der zwischen EpICD und der Tev-Erkennungssequenz eingefügte Flag-Tag eine Immunopräzipitation des intrazellulären Spaltproduktes EpICD. Dieses mEpCAM-CTF-Konstrukt wird im Folgenden mit Myc-mCTF-FT-YFP abgekürzt. Die Vorgehensweise zur Bestimmung der γ - und ϵ -Spaltstellen von mEpCAM sind in Abbildung 13A schematisch gezeigt.

In Abbildung 13B sind repräsentative Spektren der γ -Spaltung von Myc-mCTF-FT-YFP in den Zelllinien NIH3T3, mF9 und HEK293 dargestellt. Als Kontrolle für die Spezifität der gemessenen Signale wurden Kontrolltransfektanten der HEK293-Zelllinie, welche den Leervektor stabil beinhalten, verwendet. Hierbei konnten zwei Spaltprodukte (γ_1 und γ_2) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen dieser Peptide sind in Abbildung 13D zusammengefasst.

In Abbildung 13C sind die Spektren der ϵ -Spaltung von Myc-mCTF-FT-YFP der Zelllinien NIH3T3, mF9 und HEK293 dargestellt. Als Kontrolle für die Spezifität der gemessenen Signale wurden Kontrolltransfektanten der HEK293-Zelllinie, welche den Leervektor stabil beinhalten, eingesetzt. Hierbei konnten vier intrazelluläre Spaltprodukte (ϵ_1 , ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen dieser Peptide sind in Abbildung 13D zusammengefasst.

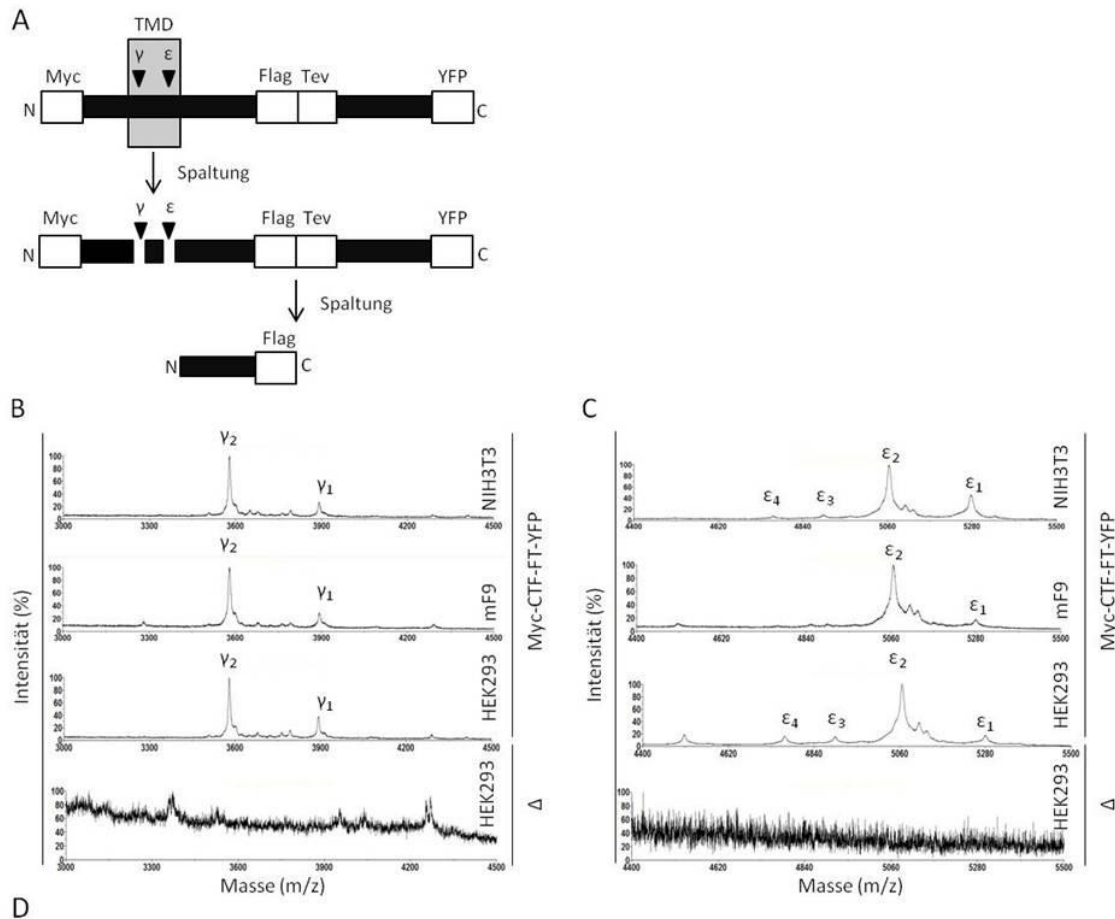


Abbildung 13: Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstellen von mEpCAM (γ - und ϵ -Schnittstellen).

(A) Schema der γ -Sekretase abhängige Schnittstellenbestimmung von mEpCAM. **(B)** Repräsentative MALDI-TOF Spektren von Myc-IPs (γ -Spaltstellenbestimmung von mEpCAM) in HEK293, NIH3T3 und mF9. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die das Myc-mCTF-FT-YFP-Konstrukt stabil exprimierten. Als Negativkontrolle wurde eine mit dem Leervektor stabil transfizierte HEK293-Zelllinie verwendet. **(C)** Repräsentative MALDI-TOF-Spektren von Flag-IPs (ϵ -Spaltstellenbestimmung von mEpCAM) in HEK293, NIH3T3 und mF9. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die das Myc-mCTF-FT-YFP-Konstrukt stabil exprimierten. Als Negativkontrolle wurde eine mit dem Leervektor stabil transfizierte HEK293-Zelllinie eingesetzt. **(D)** In dieser Tabelle sind die berechnete und detektierte Masse sowie der Fehler und die Ladung aller detektierten Ionen dargestellt.

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der gemessenen Signale von der γ -Sekretase überprüft. Hierfür wurden Zellen mit DAPT (Inhibitor für die γ -Sekretase) oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, wiesen alle γ - und ϵ -Schnittfragmente eine deutliche Reduktion der Intensität nach DAPT-Behandlung auf. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass alle hier betrachteten Signale γ -Sekretase-abhängig gebildet werden.

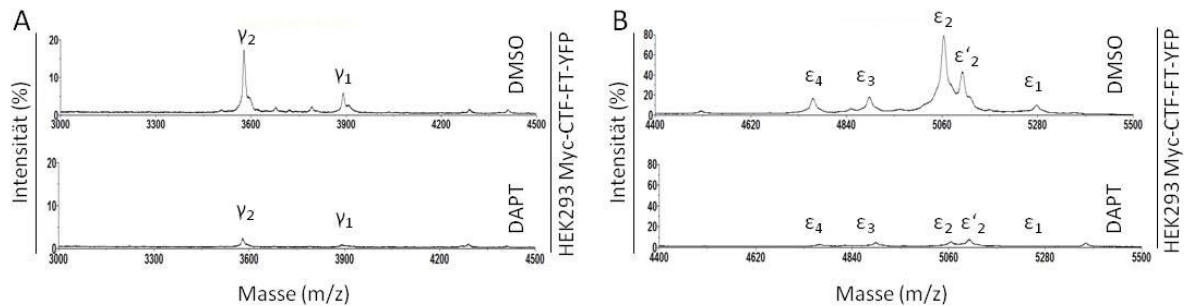


Abbildung 14: γ -Sekretase Abhängigkeit des γ - und ϵ -Schnittes von mEpCAM.

Stabile HEK293-Transfektanten des Myc-mCTF-FT-YFP-Konstruktes wurden über Nacht im Zellkulturmedium mit DAPT bzw. DMSO kultiviert. Für beide Ansätze wurden stets gleiche Zelldichten, Volumen an Zellkulturmedium und Inkubationszeiten verwendet, um eine Vergleichbarkeit zwischen diesen Ansätzen zu gewährleisten. **(A)** Für die Bestimmung der γ -Schnittstellen wurden Immunopräzipitationen mittels Myc-Tag aus Zellkulturüberständen durchgeführt. **(B)** Hingegen wurden für Bestimmung des ϵ -Schnittes Immunopräzipitationen mittels Flag-Tag aus Zelllysaten verwendet. Um die Abhängigkeit dieser Signale von der γ -Sekretase zu überprüfen, wurden diese Versuche mit DAPT bzw. DMSO als Kontrollbehandlung durchgeführt. Eine Reduktion der Signalintensitäten nach DAPT-Behandlung, zeigt die γ -Sekretase-Abhängigkeit dieser Signale. Für die Darstellung der Inhibierung der Spaltung sind alle Spektren im relativen Basis-Peak Modus wiedergegeben. In diesem Modus werden alle Signalintensitäten relativ zum Rauschen des Basis-Peaks dargestellt.

5.3.1 Proteasomaler Abbau von EpICD

Bereits 2009 wurde von unserer Arbeitsgruppe berichtet, dass humanes EpICD sehr instabil ist, und es wurde angenommen, dass hEpICD durch das Proteasom degradiert wird (Maetzel et al., 2009). Im folgenden Versuchsteil wurde die Stabilität des murinen intrazellulären Spaltprodukts untersucht. Hierfür wurden stabile HEK293- und mF9-Zelllinien verwendet, die das für die Bestimmung der Spaltsequenzen konstruierte mEpCAM-CTF exprimierten. Das mEpCAM-CTF ist C-terminal mit einem Flag-Tev-YFP-Tag (CTF-YFP) fusioniert. Die Zelllinien wurden mit DMSO (Kontrolle), DAPT (Inhibierung der γ -Sekretase), Lactacystin β -Lacton (Inhibierung des proteasomalen Abbaues) und DAPT zusammen mit Lactacystin β -Lacton behandelt. Die Zellen wurden für eine Western-Blot-Analyse mit YFP-spezifischen Antikörpern verwendet.

Nach Behandlung der Zellen mit DMSO waren lediglich sehr schwache Banden von CTF-YFP und von EpICD-YFP zu erkennen. Die Akkumulation von CTF-YFP nach DAPT-Behandlung bestätigte, dass CTF-YFP durch die γ -Sekretase gespalten wird. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte die Doppelbehandlung mit DAPT und Lactacystin β -Lacton. Die Behandlung mit dem Proteasom

Inhibitor Lactacystin β -Lacton führte zu einer deutlichen Stabilisierung von EpICD-YFP. Die Spezifität der Banden wurde durch eine mit dem Leervektor stabil transfizierte Zelllinie kontrolliert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH zur Bestimmung der gleichmäßigen Proteinmenge verwendet (siehe Abbildung 15A).

Außerdem wurde die Zunahme der YFP-Expression nach Behandlung mit DMSO, DAPT, Lactacystin β -Lacton sowie nach der Doppelbehandlung mit DAPT und Lactacystin β -Lacton mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Als Bezugsgrößen für die Normalisierung wurden hierfür die Fluoreszenzwerte nach DMSO-Behandlung verwendet (siehe Abbildung 15B).

Im Western-Blot und in Durchflusszytometrie-Messungen konnte bestätigt werden, dass mEpCAM-CTF durch die γ -Sekretase gespalten wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass EpICD-YFP sehr instabil ist und in Abhängigkeit des Proteasoms degradiert wird.

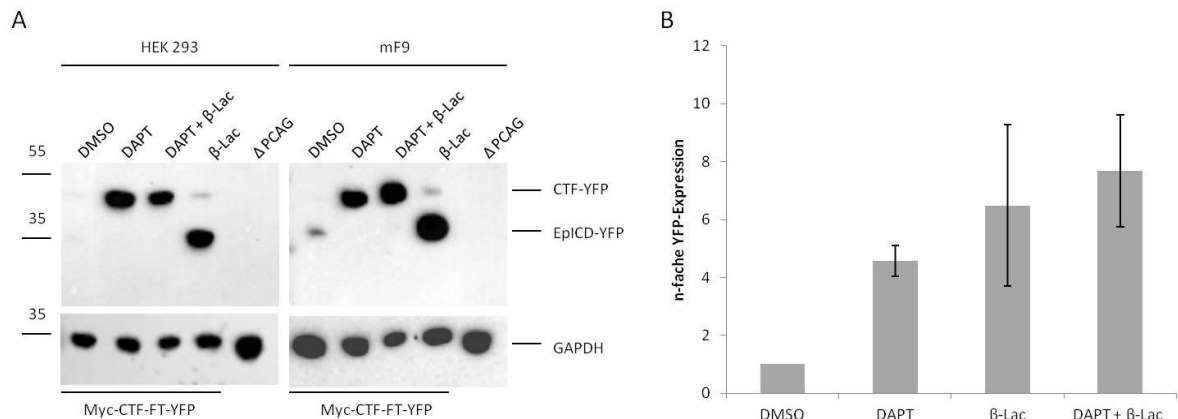


Abbildung 15: Proteasomaler Abbau von EpICD.

Stabile Zelllinien (HEK293 und mF9) wurden mit DMSO (Kontrollbehandlung), DAPT (Hemmung der γ -Secretase), Lactacystin β -Lacton (Proteasomaler Inhibitor) und mit DAPT zusammen mit Lactacystin β -Lacton für 12 Stunden behandelt. **(A)** Gleiche Mengen an Proteinlysaten wurden für die Western-Blotting-Analyse mit YFP-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Die Spezifität wurde mit Zelllinien kontrolliert, in denen das pCAG-Leerplasmid stabil transfiziert wurde. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. **(B)** Mittels Durchflusszytometrieanalyse wurde die YFP-Fluoreszenz nach der jeweiligen Behandlung bestimmt. In der Abbildung sind die auf die DMSO-Behandlung normalisierten Werte dargestellt.

Als Nächstes wurden die Stabilitäten der verschiedenen EpICDs untersucht, die aus der Spaltung von mEpCAM-CTF mit Hilfe der γ -Sekretase resultieren. Hierfür wurden stabile mF9- und HEK293-Transfektanten, welche mEpCAM-CTF exprimieren, mit DMSO oder mit Lactacystin β -Lacton behandelt und die Bildung von ϵ -Fragmenten von mEpCAM massenspektrometrisch bestimmt. In mF9-Zellen wurde zudem das Schnittmuster aus der aufgereinigten Membranfraktion (Membranassay) bestimmt.

Beim Vergleich der Spektren nach DMSO- oder Lactacystin β -Lacton-Behandlung waren zwei wesentliche Unterschiede zu erkennen. Zum einen wies das Spaltprodukt ϵ_1 nach Behandlung mit

dem proteasomalen Inhibitor Lactacystin β -Lacton eine höhere Intensität im Vergleich zu allen weiteren Spaltprodukten auf. Diese Tendenz konnte in Spektren von aufgereinigten Membranen (Membranassay) verifiziert werden (siehe Abbildung 16). Diese Beobachtungen weisen auf eine geringere Stabilität des Spaltproduktes ϵ_1 im Vergleich zum Spaltprodukt ϵ_2 hin. Die Stabilisierung des Spaltproduktes ϵ_1 durch den proteasomalen Inhibitor Lactacystin β -Lacton zeigt zudem, dass dieses Peptid Proteasom abhängig degradiert wird. Diese Schlussfolgerung wird durch die erhöhte Stabilität des Spaltproduktes ϵ_1 in der aufgereinigten Membranfraktion (Membranassay) gestützt, da in dieser Fraktion das Proteasom deutlich abgereichert ist.

Außerdem zeigten die Spektren nach Lactacystin β -Lacton- im Vergleich zur DMSO-Behandlung eine Stabilisierung der Spaltprodukte ϵ_3 und ϵ_5 . Spektren mit vergleichbaren Intensitäten der intrazellulären Spaltprodukte wurden aus aufgereinigten Membranfraktionen gemessen. Das Spaltprodukt ϵ_5 konnte in Lysaten von DMSO-behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16) und war erst nach der Behandlung apparent. Diese Daten deuten auf eine hohe Sensitivität der Spaltprodukte ϵ_1 , ϵ_3 und ϵ_5 und auf eine niedrige Sensitivität des Spaltproduktes ϵ_2 gegenüber dem Proteasom hin. Der stabilisierende Einfluss von Lactacystin β -Lacton auf das Spaltprodukt ϵ_1 war jedoch wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Spaltprodukten ϵ_3 und ϵ_5 .

Das Spaltprodukt ϵ_4 trat mit einer höheren Intensität nach Lactacystin β -Lacton-Behandlung auf. Da es mit einer geringeren Intensität im Spaltungsassay von aufgereinigten Membranen nachgewiesen wurde, besteht die Möglichkeit, dass dieses Peptid durch weitere Proteasen gebildet wurde. Außerdem liegt die ϵ_4 -Schnittstelle in einem für die γ -Sekretase untypischen Bereich. Gewöhnlich sind Schnittstellen der γ -Sekretase in der Transmembrandomäne zu erwarten (Tagami et al., 2008; Wang et al., 1996).

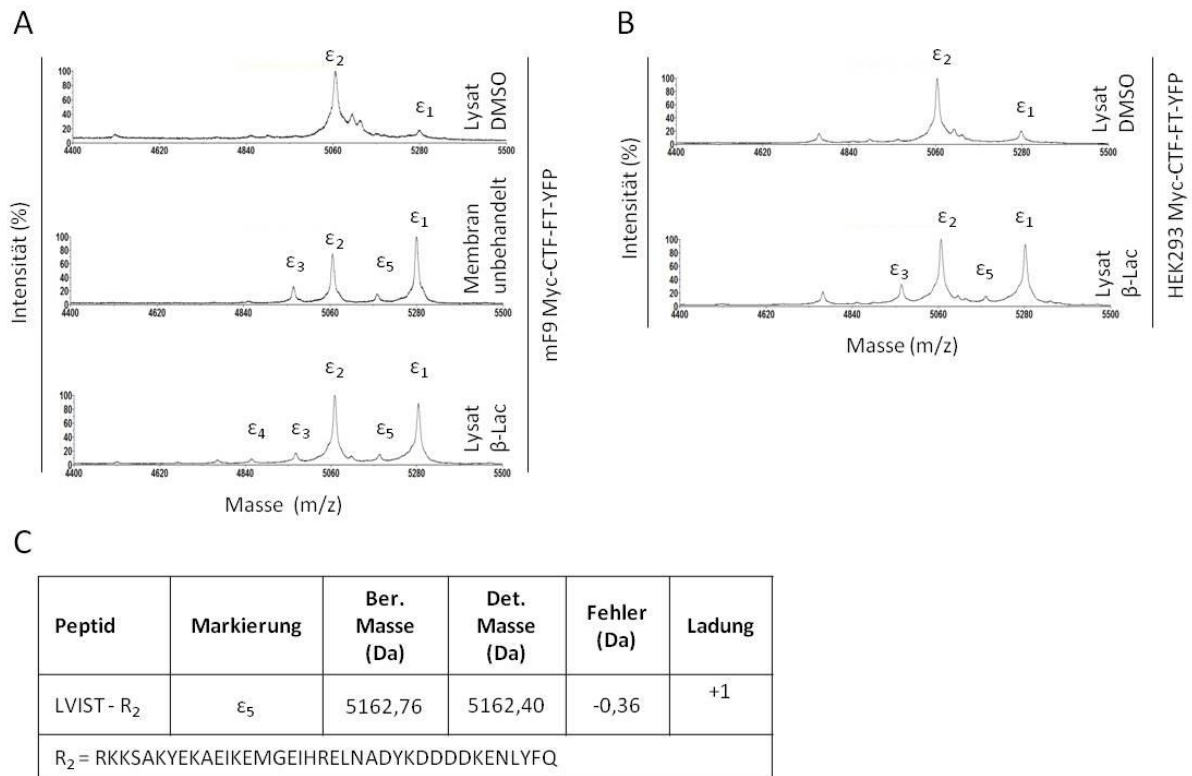


Abbildung 16: Stabilitäten der intrazellulären Spaltprodukte (EpicDs).

(A) MALDI-TOF-Spektren: Intensitätsunterschiede der gebildeten intrazellulären Spaltprodukte nach DMSO- und Lactacystin β -Lacton-Behandlung sowie in der aufgereinigten Membranfraktion von mF9 Zellen. (B) MALDI-TOF-Spektren: Intensitätsunterschiede der gebildeten intrazellulären Spaltprodukte nach DMSO- und Lactacystin β -Lacton-Behandlung in HEK293-Zellen.

Um erste Hinweise auf die Konservierung der γ - und ε -Spaltstellen zu erhalten, wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen von murinem und humanem EpCAM im Alignment miteinander verglichen (siehe Abbildung 17). ε -Schnittstellen, deren Spaltprodukte in Zelllysaten auftraten, sind hierbei schwarz gekennzeichnet. Graumarkierte ε -Schnittstellen konnten ausschließlich in Lactacystin β -Lacton oder in aufgereinigten Membranfraktionen (Membranassay) nachgewiesen werden. Da es sich bei dem Spaltprodukt ε_4 aus den oben genannten Gründen auch um ein weiter prozessiertes Peptid gehandelt haben könnte, ist dieses mit einem weißen Dreieck gekennzeichnet.

konnten die unterschiedlichen Stabilitäten der beiden EpICD-Varianten bestätigt werden. Die Stabilität der kürzeren EpICD-Variante MVI-EpICD-YFP war - basierend auf den Daten der Durchflusszytometrie - um den Faktor 5 höher als die um zwei Aminosäuren längere EpICD-Variante MVLVI-EpICD-YFP.

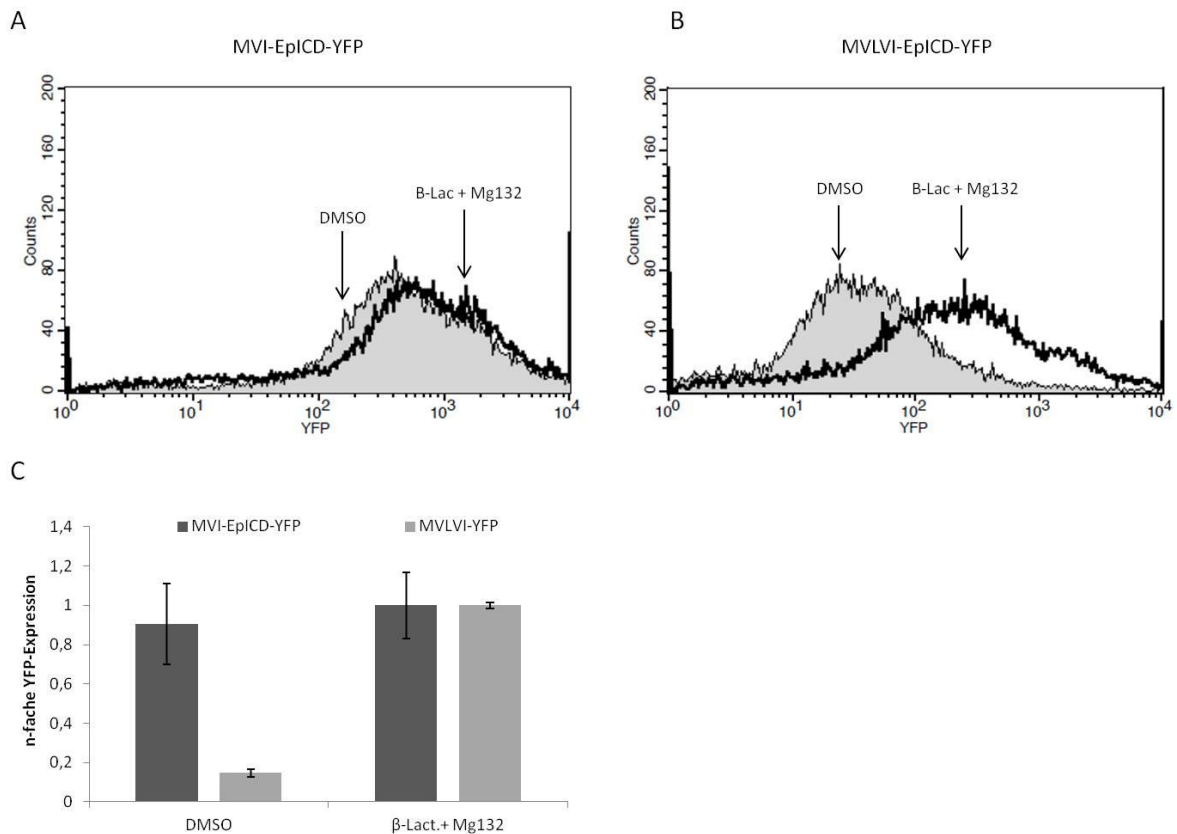


Abbildung 18: Stabilitäten der verschiedenen intrazellulären Spaltprodukte.

(A) Das Spaltprodukt mit dem N-terminalen Ende Valin-Isoleucin wurde stabil in HEK293 exprimiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Stabilität dieses YFP-Fusionsproteins nach DMSO- bzw. nach Behandlung mit Lactacystin β -Lacton und Mg132 bestimmt. (B) Das Spaltprodukt mit dem N-terminalen Ende Valin-Leucin-Valin-Isoleucin wurde stabil in HEK293 exprimiert. Mit der Durchflusszytometrie wurde die Stabilität dieses YFP-Fusionsproteins nach DMSO- bzw. nach Behandlung mit Lactacystin β -Lacton und Mg132 bestimmt. (C) Die Spaltprodukte mit dem N-terminalen Enden VI und VLVI wurde stabil in HEK293 exprimiert. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Stabilitäten dieser YFP-Fusionsproteine nach DMSO- bzw. nach Behandlung mit Lactacystin β -Lacton und Mg132 bestimmt. Die Daten wurden auf das Spaltprodukt mit den N-terminalen Aminosäuren Valin-Isoleucin nach DMSO-Behandlung normalisiert.

Wie im Abschnitt 5.2.3 beschrieben, wurde die Konservierung der γ - und ϵ -Schnittstellen untersucht. Grundlage dieser Analyse waren EpCAM-Sequenzen aus 52 verschiedenen Organismen. Durch ein Alignment (ClustalW) dieser Sequenzen wurde die Konservierung der jeweiligen Spaltstellen bestimmt. Als Bezugsgröße wurde die durchschnittliche Konservierung des gesamten EpCAM-Moleküls gewählt.

Während die γ -Schnittstellen mit Werten für die Konservierung zwischen 9 und 11 deutlich über der durchschnittlichen Konservierung von EpCAM von 6 liegen, weisen die ϵ -Schnittstellen

lediglich eine leicht überdurchschnittliche Konservierung mit Werten zwischen 7 und 9 auf (siehe Abbildung 19).

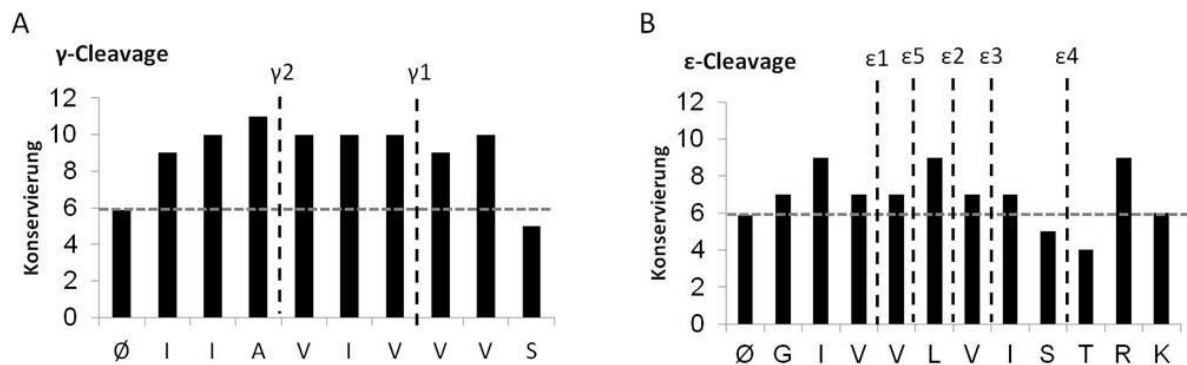


Abbildung 19: Konservierung der γ - und ϵ -Schnittstelle von EpCAM.

Hierfür wurde in 52 verschiedenen Spezies EpCAM in silico identifiziert und für ein Alignment verwendet. Mittels ClustalW Algorithmus wurde die Konservierung an jeder Aminosäureposition bestimmt. Hierbei entspricht ein Wert von 11 einer vollständigen Konservierung, während ein Wert von 0 gar keine bzw. eine sehr schwache Konservierung bedeutet. Als Vergleichsgröße wurde die durchschnittliche Konservierung des gesamten EpCAM-Moleküls berechnet. **(A)** Zeigt die Konservierung der γ -Schnittstellen von EpCAM in 52 verschiedenen Spezies. **(B)** Zeigt die Konservierung der ϵ -Schnittstellen von EpCAM in 52 verschiedenen Spezies.

5.3.2 Lokalisation des intrazellulären Spaltproduktes (EpICD)

In humanen Krebszellen konnte EpICD mittels konfokaler Mikroskopie im Zellkern nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.3.4 Spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen). Um erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von murinem EpICD in der Teratokarzinomzelllinie mF9 zu erhalten, wurde die intrazelluläre Lokalisation von EpICD untersucht. Hierfür wurden mF9-Zellen verwendet, die das Fusionsprotein von mEpCAM-CTF mit N-terminalem Myc-Tag und einem C-terminalem YFP (Myc-CTF-YFP) stabil exprimierten. Nach der Behandlung der Zellen jeweils mit DMSO (Kontrolle), DAPT (Inhibierung der γ -Sekretase) und Lactacystin β -Lacton (Inhibierung des proteasomalen Abbaus) wurde die intrazelluläre Lokalisation von EpICD durch konfokale Lebendzellmikroskopie bestimmt. Als Kontrollen wurden stabile Transfektanten von YFP in mF9-Zellen verwendet.

In diesem Versuch wurden die Laser-Intensitäten der jeweiligen YFP-Signalstärke angepasst. Aus diesem Grund können lediglich die unterschiedlichen Lokalisationen von YFP miteinander verglichen werden. Die Signalstärken spiegeln nicht die eigentlichen Expressionsstärken wieder.

Nach einer Behandlung der Zellen mit DMSO war ein diffuses YFP-Signal mit leichter perinukleärer Lokalisation zu beobachten (siehe Abbildung 20). Hierbei könnte es sich um neu synthetisiertes Myc-CTF-YFP im Endoplasmatischen Retikulum (ER) handeln (Ancot et al., 2012). Alternativ könnte es auch eine perinukleäre Lokalisation von EpICD-YFP sein. Eine zunehmende perinukleäre

Lokalisation von EpICD wurde in humanen Kolonkarzinom-Zellen mit zunehmender Konfluenz beschrieben (Denzel et al., 2009). In diesem Versuch wurde die nukleäre Lokalisation von murinen EpICD-YFP in Teratokarzinomzellen nicht festgestellt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fusion mit YFP mit der Kernlokalisation interferiert. Nach DAPT-Behandlung lokalisiert das Fusionsprotein Myc-CTF-YFP fast ausschließlich in der Plasmamembran (siehe Abbildung 20). Auf diese Weise wurde erneut bestätigt, dass Myc-CTF-YFP durch die γ -Sekretase gespalten wird. Aufgrund der deutlich höheren Fluoreszenzintensität nach DAPT-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung wurde eine deutlich geringere Laserintensität verwendet. Dies würde erklären, warum kein perinukleäres YFP-Signal durch neu synthetisiertes Myc-CTF-YFP nach DAPT-Behandlung zu erkennen ist.

Nach der Behandlung mit Lactacystin β -Lacton trat ein gleichmäßiges YFP-Signal auf. Hierbei konnte kein Unterschied zur YFP-exprimierenden Zelllinie festgestellt werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass in diesem Experiment keine präferentielle subzelluläre Lokalisation von YFP-getaggten EpICD nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der YFP-Tag mit der intrazellulären Lokalisation interferiert oder dass die Sensitivität der verwendeten Methode nicht ausreichend ist, um kleine Mengen von EpICD-YFP eindeutig zu visualisieren.

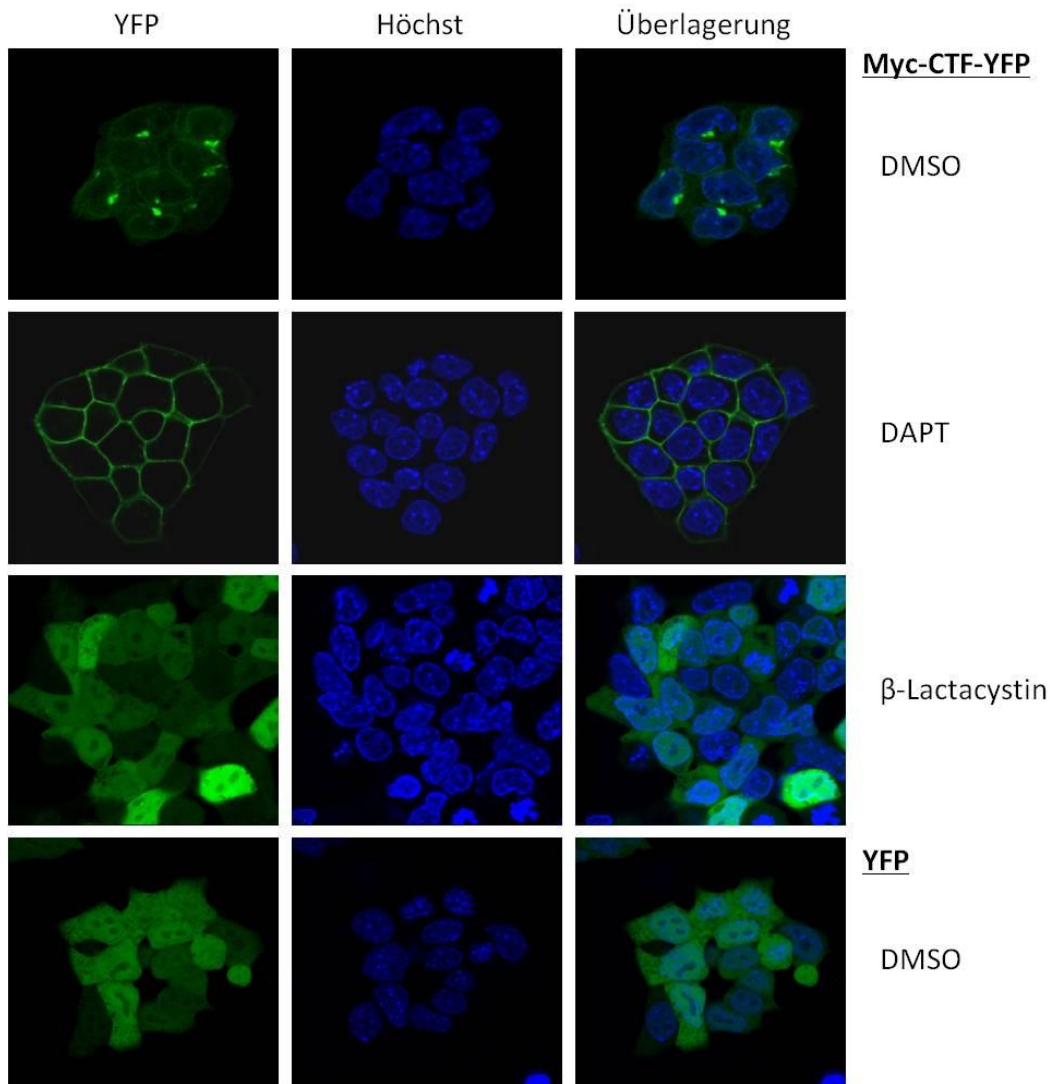


Abbildung 20: Konfokale Lebendzellmikroskopie (intrazelluläre Lokalisation von mEpICD).

Das vorgespaltene mEpCAM-Konstrukt Myc-mCTF-YFP bzw. YFP wurden stabil in mF9-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit DMSO (Kontrollbehandlung), DAPT (Inhibierung der γ -Sekretase) und β -Lactacystin (Inhibierung des proteasomalen Abbaus) behandelt und zur konfokalen Lebendzellmikroskopie verwendet. Die Zellkerne wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff Höchst dargestellt.

5.4 Genregulation von mEpCAM in ES-Zellen (cRNA) Microarray

Wie in der Einleitung bereits beschreiben wurde, konnte in humanen Stammzellen gezeigt werden, dass EpCAM an der Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands beteiligt ist. Der Knock-Down von hEpCAM in humanen embryonalen Stammzellen (HES-3 Zellen) führte zu einer marginalen Reduktion der Oct4-Expression sowie zu einer Induktion von Markern aller drei Keimblätter (Ng et al., 2010). Im Folgenden sollten Zielgene von mEpCAM in murinen embryonalen Stammzellen identifiziert werden. In Anlehnung an die oben zitierte Publikation wurde hierbei ein transienter Knock-Down mit mEpCAM-spezifischer siRNA verwendet. Zum Vergleich wurden mit Kontroll-siRNA transient transfizierte Zellen eingesetzt. Um eine hohe Knock-Down-Effizienz nach 72 Stunden sicherzustellen, wurden die Zellen nach 24 Stunden erneut

mit der jeweiligen siRNA transfiziert. Nach der Kontrolle der Knock-Down-Effizienz wurde die RNA isoliert und für eine genomweite Transkriptomanalyse eingesetzt. Zum Vergleich sollten alle Genregulationen bei der Differenzierung bestimmt werden. Hierfür wurden Zellen 6 Tage lang ohne LIF kultiviert. Als Vergleich dienten Zellen, die unter pluripotenten Bedingungen (in Gegenwart von LIF) kultiviert worden waren.

Für die genomweite Transkriptomanalyse wurde ein cRNA-Mirkoarray verwendet. Bei dieser Technologie wird die RNA isoliert und in Fluoreszenz-markierte cRNA Proben umgeschrieben. Im nächsten Schritt werden diese cRNAs auf einem Chip hybridisiert. Auf diesem Chip sind komplementäre Nukleotidsequenzen von jedem Gen aufgebracht. Die Fluoreszenz-markierten cRNA-Proben binden an die komplementären Sonden auf dem Chip. Eine Quantifizierung ist über die Fluoreszenzintensität möglich, während die Zuordnung dieser Intensität über die Position auf dem Chip erfolgt.

5.4.1 Bestimmung der Ausgangsparameter für den cRNA-Array

Die Güte des mEpCAM-Knock-Downs wurde mittels Durchflusszytometrie-Analyse unter Verwendung mEpCAM-spezifischer Antikörper bestimmt. Wie an der Verschiebung der gesamten Population im Durchflusszytometrie-Profil zu erkennen ist, war der mEpCAM-Knockdown im überwiegenden Anteil der Zellpopulation erfolgreich (siehe Abbildung 21). Die Quantifizierung dieser Spektren ergab eine Reduktion von mEpCAM von über 90%. Die erfolgte Differenzierung nach LIF-Entzug wurde durch die verminderte Expression der Pluripotenzmarker SSEA1 und mEpCAM kontrolliert (siehe Abbildung 21).

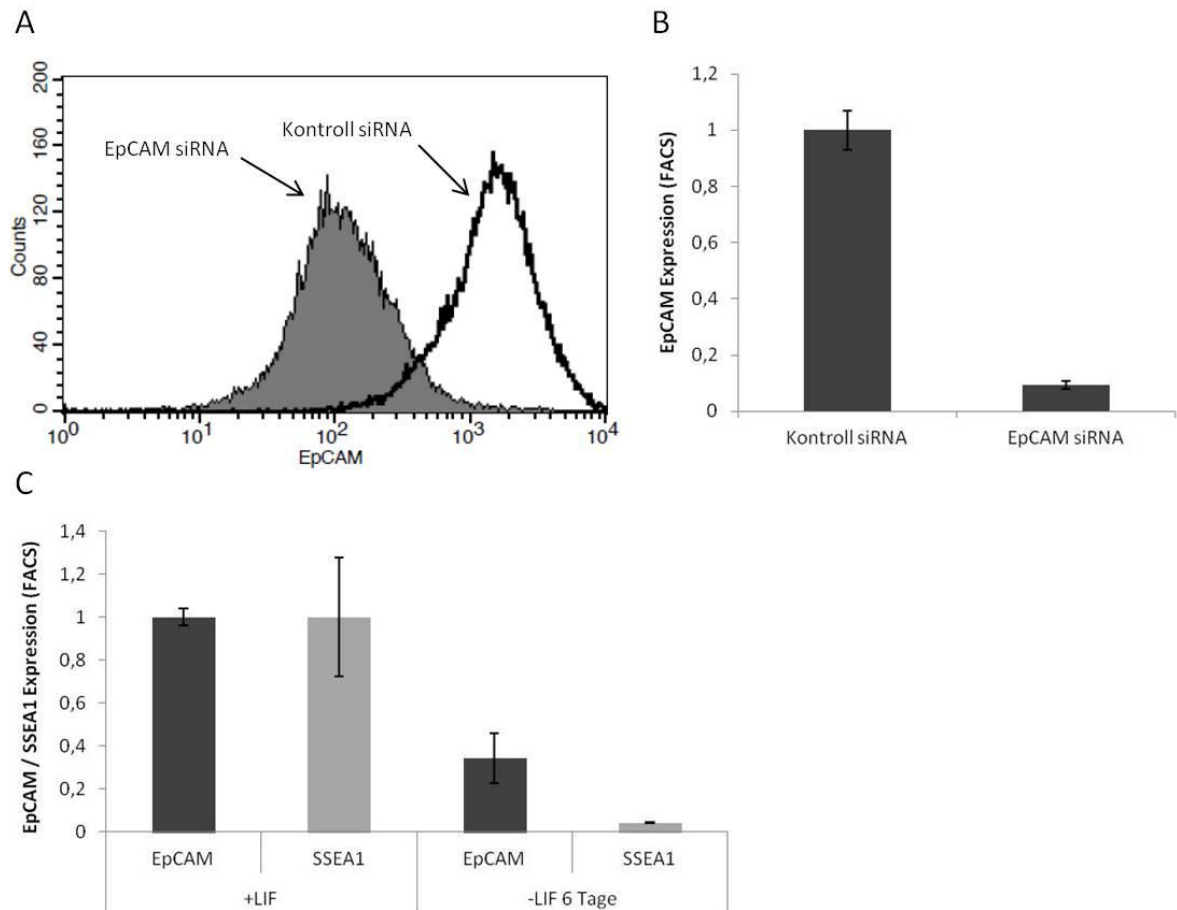


Abbildung 21: Probenkontrolle cRNA-Mikroarray.

(A) Durchflusszytometrie-Profil des mEpCAM-Knock-Down in E14TG2 α -Zellen. Als Referenz wurden mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen verwendet. (B) Quantifizierung des mEpCAM-Knock-Downs mittels Durchflusszytometrie aus allen 3 Proben, die für den Microarray verwendet wurden. (C) Quantifizierung der Zelloberflächen-Expression von mEpCAM und SSEA1 nach Kultivierung der E14TG2 α Zellen in Anwesenheit von LIF (+LIF) sowie nach Abwesenheit von LIF (-LIF) für 6 Tage. Bei dieser Berechnung wurden alle für den Microarray verwendeten Proben mit einbezogen.

5.4.2 Bestimmung der Qualität der RNA und Messung des cRNA-Microarrays

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitsschritte wurden im Auftrag von dem Unternehmen IMG M Laboratories GmbH in Martinsried durchgeführt.

Die Qualität der RNA wurde mit einem Elektropherogramm überprüft. Basierend auf den Profilen der Elektropherogramme werden RIN (RNA integrity number) -Werte zwischen 1 und 10 ermittelt. Für die Bestimmung der RIN-Werte wird ein Algorithmus verwendet, welcher neben dem Verhältnis der ribosomalen RNA 28S/18S-rRNA weitere Daten aus dem gesamten Elektropherogramm mit berücksichtigt. Ein RIN-Wert von 10 bedeutet exzellente RNA-Qualität, während ein RIN-Wert von 1 für massive RNA-Degradation spricht.

In allen für den cRNA-Microarray eingesetzten Proben wurde eine exzellente RNA-Qualität mit einem RIN-Wert von 10 ermittelt.

Nach dem Auslesen der Chips und entsprechender Normalisierung erfolgte eine Qualitätskontrolle der Daten. Hierfür wurde die Korrelation zwischen biologischen Replikaten herangezogen. Die Korrelation war sehr hoch und lag bei $r \geq 0,994$. Dies bedeutet, dass die Unterschiede in der Genexpression zwischen den biologischen Replikaten gering waren und größere Effekte durch experimentelle Einflüsse ausgeschlossen werden können. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurde die QC-Metrics angewendet.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sowohl die Qualität der RNA als auch die Qualität der Microarray-Daten als sehr gut von der IMGGM Laboratories GmbH eingestuft wurden.

5.4.3 Vulkan-Blot der Mikroarray-Daten (Einfluss des Knockdowns von mEpCAM)

Die genomweiten Microarray-Datensätze des mEpCAM-Knock-Downs sowie der Differenzierung in E14TG2 α -Zellen wurden mit der Software Perseus ausgewertet. Die vollständigen Messdaten wurden in Form eines Vulkan-Blots dargestellt. Auf der Y-Achse ist der negative Logarithmus zur Basis 2 vom p-Wert dargestellt. Auf der X-Achse ist der Logarithmus zur Basis 2 vom Verhältnis Kontrolle vs. mEpCAM-Knock-Down bzw. Pluripotenter Zustand (+LIF) vs. Differenzierter Zustand (-LIF) dargestellt. Linien in den Blots trennen Bereiche von statistisch signifikant regulierten Genen von solchen, die keine statistische Signifikanz erreicht haben. Für die Berechnung des FDR-Werts (False Discovery Rate) wurde ein auf Permutation basierender Algorithmus verwendet. Der FDR-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wurde. Übertragen auf dieses Experiment gibt der FDR-Wert also die Wahrscheinlichkeit einer irrtümlich angenommenen Genregulation an. Eine detektierte Genregulation ist dann als besonders vertrauenswürdig einzustufen, wenn ihr ein kleiner FDR-Wert zugeordnet wurde. Da im Vulkan-Blot der negative Logarithmus zur Basis 2 des FDR-Werts (p-Wert) auf der y-Achse dargestellt ist, sind Genregulationen als besonders vertrauenswürdig einzustufen, die oberhalb der eingezeichneten FDR-Grenzen liegen. Diese Gene haben einen FDR-Wert von kleiner als 0,05 und sind damit statistisch signifikant. Trotz hoher Knock-Down-Effizienz von mEpCAM mit über 90%iger Reduktion wurden nur marginale Genregulationen gemessen. Erwartungsgemäß spiegelte sich der mEpCAM-Knock-Down durch eine 12-fache Reduktion der mEpCAM-mRNA-Expression in den Microarray-Daten wieder. Außer mEpCAM war nur das Gen Fxyd2 statistisch signifikant reguliert (siehe Abbildung 22). Der Knock-Down von mEpCAM führte zu einer 6,6-fachen Erhöhung der Fxyd2 Genexpression (siehe Abbildung 22). Bei Fxyd2 handelt es sich um einen Natrium- / Kalium-Ionen-Transporter. Im Allgemeinen konnte keine Genregulation mit weiteren biologisch unabhängigen Proben bestätigt werden. Auch die Regulation von Fxyd2 konnte nur mit den für den Microarray verwendeten RNA-Proben bestätigt werden. Messungen mit biologisch unabhängigen Proben zeigten keine Regulation von Fxyd2.

Im Gegensatz zum mEpCAM-Knock-Down-Datensatz waren deutliche globale Effekte auf das Transkriptom nach dem Entzug von LIF zu beobachten. Hierbei waren mehrere Tausend Gene statistisch relevant reguliert. Die gemessene Reduktion des mEpCAM-Proteins bei der Differenzierung spiegelte sich nicht in den Microarray-Daten wieder (siehe Abbildung 22) und spricht daher für eine post-transkriptionelle Regulation. Anhaltspunkte für eine post-transkriptionelle Regulation von hEpCAM bei der Differenzierung wurden bereits in humanen Stammzellen beschrieben (Ng et al., 2010).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass der mEpCAM-Knockdown in E14TG2 α -Zellen zu keiner nachweisbaren Genregulation im pluripotenten Zustand führte. Bei Differenzierungsprozessen waren große globale Veränderungen im Transkriptom zu erkennen (siehe Abbildung 22).

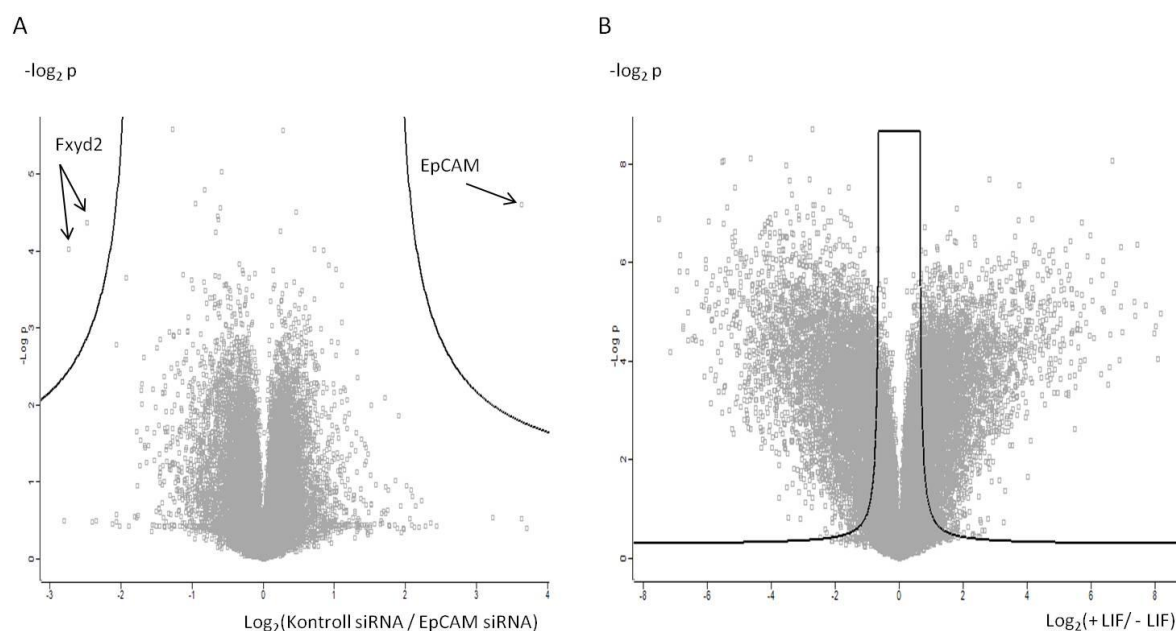


Abbildung 22: Vulkan-Blots Transkriptom (EpCAM Knockdown + LIF Entzug).

(A) Auf der y-Achse ist der negative logarithmische p-Wert zur Basis 2 ($-\log_2 p$) dargestellt. Auf der x-Achse ist das logarithmische Verhältnis der Genexpression von Kontroll-si-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mEpCAM-Knockdown-Zellen dargestellt. (B) Auf der y-Achse ist der negative logarithmische p-Wert zur Basis 2 ($-\log_2 p$) dargestellt. Auf der x-Achse ist das logarithmische Verhältnis der Genexpression von Zellen dargestellt, die in Anwesenheit von LIF kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen, die für 6 Tage in Abwesenheit von LIF kultiviert wurden.

Tabelle 2: Statistisch relevante Genregulationen (mEpCAM-Knockdown; Differenzierung)

Gen	Regulation (mRNA) si mEpCAM / ci RNA	p-Wert	Regulation (mRNA) +LIF / -LIF	p-Wert
mEpCAM	-12,3	1,02E-03	+1,3	8,26E-02
Fxyd2	+6,7	1,1E-04	+11,9	1,37E-04

5.5 Proteinregulation von mEpCAM in ES-Zellen (Massenspektrometrie)

Um den Einfluss von mEpCAM in ES-Zellen auf der Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Proteine in Zelllysaten nach der Transfektion mit mEpCAM-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA quantifiziert. Dieser Versuch ist als eine Erweiterung der genomweiten Transkriptomanalyse zu verstehen. Veränderungen im Proteom können einerseits durch Veränderungen im Transkriptom und andererseits durch veränderte Proteinstabilitäten oder weitere posttranskriptionelle Einflüsse hervorgerufen werden. Mit dieser Methode können zudem Proteininteraktionen identifiziert werden, insofern die Interaktion mit mEpCAM wichtig für die Stabilität des Interaktionspartners ist. Zum Beispiel führt der Knockout von mEpCAM in murinem Darmepithel zu einer drastischen Reduktion der Claudin-7-Expression (Lei et al., 2012). Claudin-7 interagiert mit mEpCAM im Epithel des Intestinaltrakts und wird in dessen Abwesenheit destabilisiert und abgebaut (Lei et al., 2012).

Außerdem können mit diesem Versuchsansatz zusätzlich posttranskriptionelle Regulationen detektiert werden. Für die Quantifizierung von Proteinen in Zelllysaten wurde die Massenspektrometrie eingesetzt.

Hierfür wurden Proteine mit Dithiothreitol reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und anschließend tryptisch verdaut. Durch diese Behandlung werden Peptide generiert, die durch Elektrospray-Ionisation (ESI) in die gasförmige Phase überführt werden. Im ersten Massenspektrometer (MS) werden Peptide mit einem bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnis gefiltert, durch Kollisionen fragmentiert und anschließend in einem zweiten Massenspektrometer erneut detektiert. Da die Peptide präferentiell in der Peptidbindung fragmentieren, enthalten die im zweiten Massenspektrometer gemessenen Massedifferenzen die Information zur Aminosäuresequenz des im ersten Massenspektrometer gefilterten Peptides. Über einen Abgleich mit Datenbanken werden die gemessenen Peptide Proteinen zugeordnet. Über die Anzahl gemessener Peptide eines Proteins können Proteine in komplexen Proteinmischungen, wie Zelllysaten, quantifiziert werden.

Die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von F. Coscia in der Abteilung für Singaltransduktion und Proteomic am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

5.5.1 Vulkan-Blot Proteomic (Einfluss des Knockdowns von mEpCAM)

Auch in diesen Experimenten wurde eine gute Knock-Down-Effizienz von ca. 90% Reduktion erreicht (Daten nicht gezeigt). Damit war die Effizienz des mEpCAM-Knockdowns vergleichbar zu den Proben, die für den cRNA-Microarray verwendet wurden.

In diesem Versuch wurden ca. 3500 Proteingruppen quantifiziert. In einer Proteingruppe sind alle Isoformen und postranskriptionellen Modifikationen eines Proteins zusammengefasst. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, konnten nur wenige Proteinregulationen detektiert werden. Im Wesentlichen wurden die marginalen Veränderungen im Transkriptom auf Proteinebene verifiziert. Des Weiteren konnten keine ähnlichen Gen- bzw. Proteinregulationen zwischen beiden Datensätzen identifiziert werden.

Das Hnnpd-Protein wurde beim Knockdown von mEpCAM statistisch signifikant -11,8-fach herunterreguliert. Hingegen wurde keine Regulation des Hnnpd-Gens auf transkriptioneller Ebene im Microarray-Datensatz gemessen (siehe Abbildung 23).

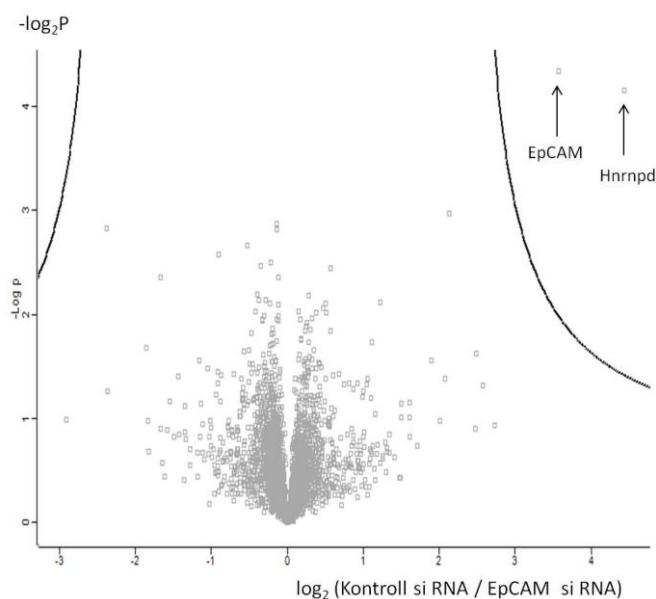


Abbildung 23: Vulkan-Blots Proteom (mEpCAM-Knockdown).

Auf der y-Achse ist der negative logarithmische p-Wert zur Basis 2 ($-\log_2 p$) dargestellt. Auf der x-Achse ist das logarithmische Verhältnis der Proteinintensitäten von Kontroll-si-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mEpCAM-Knockdown-Zellen dargestellt.

Tabelle 3: Statistisch Relevante Proteinregulationen (mEpCAM Knockdown)

Gen / Protein	Regulation (mRNA) si mEpCAM / ci RNA	p-Wert	Regulation (Protein) si mEpCAM / ci RNA	p-Wert
mEpCAM	-12,3	0,0011	-21,4	4,65E-05
Hnnpd	+1,1	0,3788	-11,8	7,20E-05

5.6 Proteinregulation durch mEpCAM-CTF in murinen Teratokarzinomzellen

Um die Möglichkeit des geringen Einflusses von mEpCAM auf die Transkription durch eine geringe Spaltungsfrequenz experimentell zu untersuchen, wurden Transfektanten in mF9-Zellen generiert, die das mEpCAM-CTF stabil exprimierten. Mittels Massenspektrometrie sollten regulierte Proteine in Abhängigkeit von der mEpCAM-CTF-Überexpression identifiziert werden. Hierfür wurde, wie in Abschnitt 5.5 beschrieben, die Elektrospray-Ionisation mit zwei Massenspektrometern verwendet (ESI-MS-MS). In diesem Versuch wurde der Einfluss der mEpCAM-CTF-Überexpression zur Kontrolltransfektionen mit dem Leervektor miteinander verglichen. Um eine Abhängigkeit der Spaltung dieses Konstrukts auf regulierte Proteine nachzuweisen, wurden zudem DMSO- oder DAPT-behandelte Zellen miteinander verglichen.

5.6.1 Bestimmung der Ausgangsparameter

Zunächst wurde die Expression des mEpCAM-CTF sowie die γ -Sekretase-abhängige Spaltung des Konstrukts überprüft. Das hierfür verwendete mEpCAM-CTF war extrazellulär mit einem Myc-Tag versehen. Der C-Terminus hatte keinen Tag und entsprach endogenem EpCAM. Mittels Myc-spezifischen Antikörpern wurde die Expression des EpCAM-mCTF nach Behandlung mit DAPT sowie DMSO mittels Durchflusszytometrie überprüft. Als Kontrolle für die Spezifität des Myc-Antikörpers wurden stabile Transfektanten des Leervektors verwendet.

Die DAPT-Behandlung führte im Vergleich zur DMSO-Behandlung zu einer deutlichen Verschiebung der Durchschnittsfluoreszenz (siehe Abbildung 24). Auf diese Weise konnte die Expression sowie die γ -Sekretase-abhängige Spaltung des Konstrukts verifiziert werden. Nach DMSO-Behandlung der mEpCAM-CTF-Überexpressionszelllinie, im Vergleich zu der Zelllinie mit dem Leervektor, war lediglich ein marginaler Shift im Spektrum des Durchflusszytometers zu erkennen (siehe Abbildung 24). Diese Daten zeigen, dass das mEpCAM-CTF relativ schnell γ -Sekretase-abhängig gespalten wird.

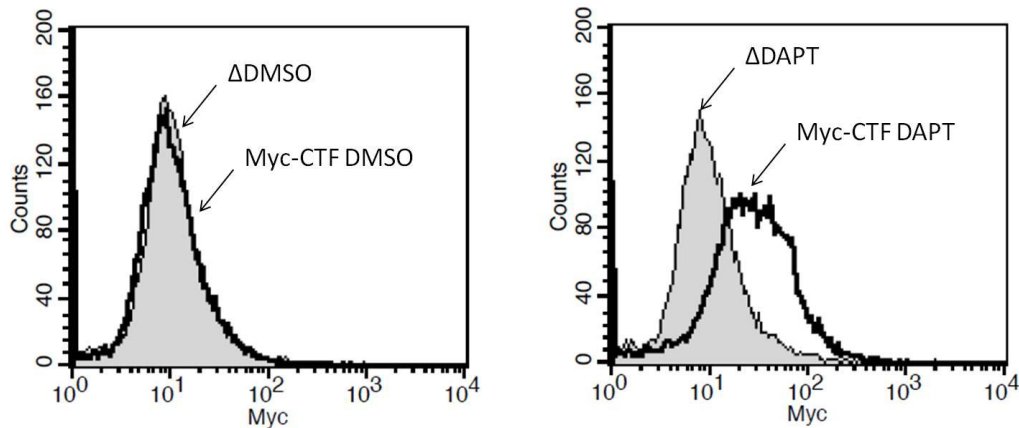


Abbildung 24: Probenkontrolle Proteom (mEpCAM-CTF Überexpression und DAPT Behandlung).

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression des Myc-mEpCAM-CTF-Proteins unter Verwendung Myc-spezifischer Antikörper nach DMSO- (Kontrollbehandlung) bzw. DAPT-Behandlung (Inhibierung der γ -Sekretase). Zur Kontrolle der Spezifität wurde eine mit dem Leervektor transfizierte Zelllinie verwendet.

5.6.2 Proteinregulationen bei mEpCAM-CTF Überexpression bzw. DAPT-Behandlung

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, führte die Überexpression von mEpCAM-CTF im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen zu keinen deutlichen Unterschieden im Proteom. Auch die Behandlung der mEpCAM-CTF-Überexpressionszelllinie mit DAPT im Vergleich zu DMSO führte lediglich zu marginalen und statistisch nicht signifikanten Proteinregulationen (siehe Abbildung 25). Aufgrund der schnellen Spaltung von mEpCAM-CTF durch den γ -Sekretase-Komplex sind die hier festgestellten marginalen Effekte nicht auf eine geringe Spaltungsfrequenz von mEpCAM-CTF und EpICD-Freisetzung zurückzuführen. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass die geringen Effekte des mEpCAM-Knockdowns auf die globale Genexpression (Microarray) durch eine geringe Spaltungsfrequenz von mEpCAM zu erklären sind.

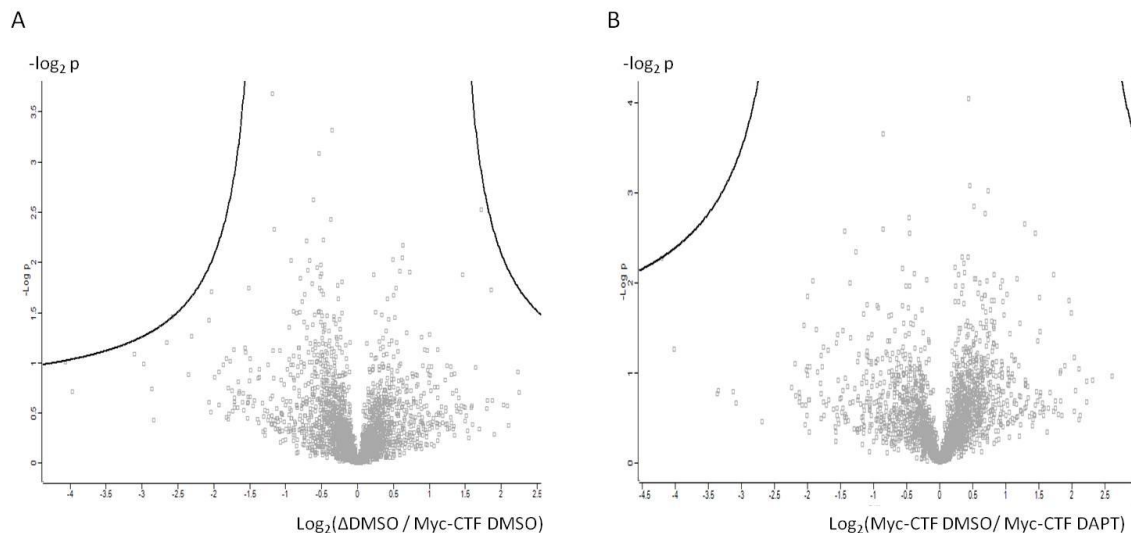


Abbildung 25: Proteom (mEpCAM-CTF-Überexpression und DAPT-Behandlung).

Proteinregulationen (Vulkan-Blot) in Abhängigkeit der mEpCAM-CTF-Überexpression im Vergleich zu stabilen Transfektanten des Leervektors. Außerdem sind hier die Proteinregulationen der DAPT-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung von der Myc-mEpCAM-CTF-Zelllinie im Vulkan-Blot veranschaulicht. **(A)** Auf der y-Achse ist der negative logarithmische p-Wert zur Basis 2 ($-\log_2 p$) dargestellt. Auf der x-Achse ist das logarithmische Verhältnis der Proteinintensitäten von Leervektor-transfiziertem Zellen im Vergleich zu mEpCAM-CTF stabil transfizierten Zellen gezeigt. **(B)** Auf der y-Achse ist der negative logarithmische p-Wert zur Basis 2 ($-\log_2 p$) dargestellt. Auf der x-Achse ist das logarithmische Verhältnis der Proteinintensitäten von mEpCAM-CTF stabil transfizierten Zellen nach DMSO-Behandlung im Vergleich zur DAPT-Behandlung gezeigt.

5.7 Spaltungsabhängige Proliferation

Über humane Krebszellen ist bereits beschrieben, dass hEpCAM an der Proliferation durch die Regulation von Genen wie c-Myc oder Zyklin D1 beteiligt ist (Chaves-Perez et al., 2013; Maetzel et al., 2009). Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass die Überexpression von EpICD ausreichend ist, um entsprechende Effekte auf die Genregulation und Proliferation hervorzurufen. Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss der mEpCAM-CTF- bzw. der mEpICD-Überexpression auf die Proliferation untersucht.

Zum einen wurde die Proliferation der mEpCAM-CTF-Überexpressionszelllinie im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten nach DMSO- bzw. DAPT-Behandlung bestimmt. Zum anderen wurde die Proliferationen der mEpICD-YFP- bzw. YFP-Überexpressionszelllinien in mF9 miteinander verglichen. Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden spezielle Kügelchen als Kalibrator für eine Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie eingesetzt. Um die Proliferation über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurde die mEpCAM-CTF-Überexpressionszelllinie bzw. der Wildtyp mit YFP-positiven Zellen vermischt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil YFP-positiver Zellen nach DAPT- bzw. DMSO-Behandlung in einem Zeitraum von 12 Tagen

bestimmt. Bei einer verstärkten Proliferation durch die mEpCAM-CTF-Überexpression wäre demnach mit einem Rückgang der YFP-positiven Population zu rechnen.

Jedoch führten weder die mEpCAM-CTF- noch die EpICD-YFP-Überexpression zu einer gesteigerten Proliferation (siehe Abbildung 26). Beide Versuchsansätze zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Auch nach einer Verringerung des FCS-Anteils im Medium konnten keine Unterschiede in der Proliferation gemessen werden.

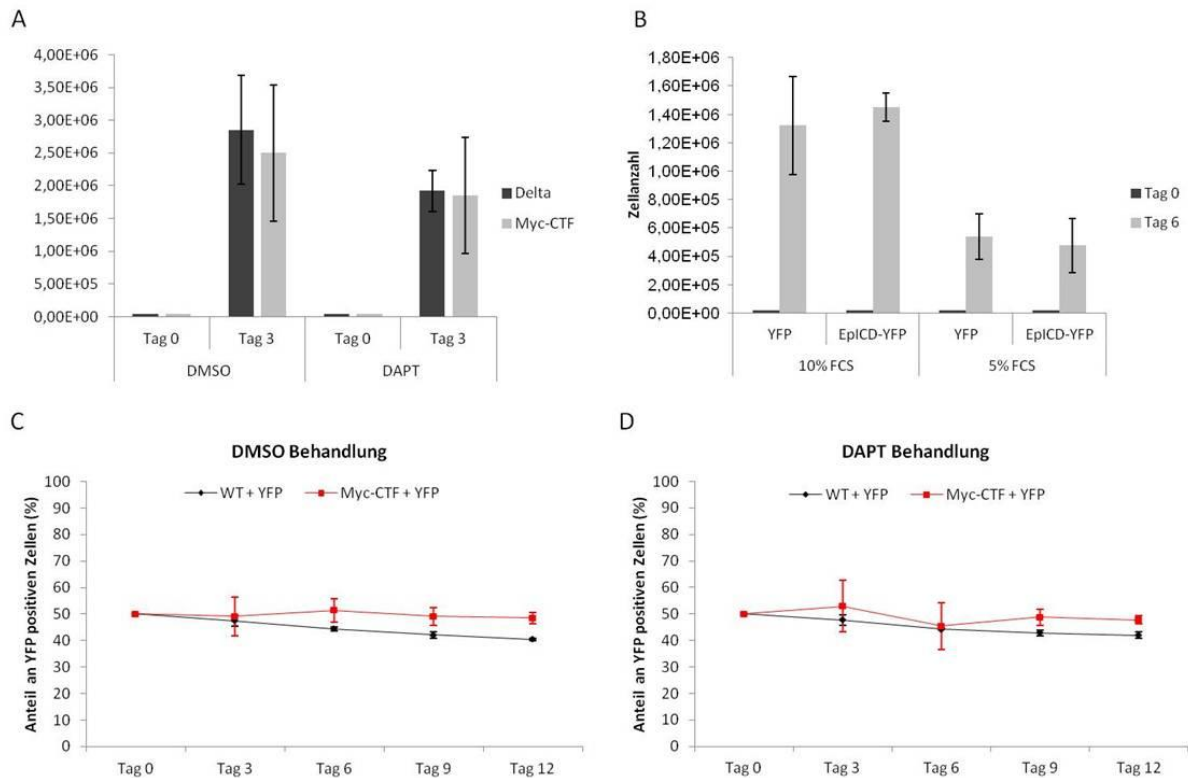


Abbildung 26: mEpCAM spaltungsabhängige Proliferation.

(A) Proliferationstest von Myc-CTF stabil transfizierten mF9-Zellen im Vergleich zu Leervektor stabil transfizierten mF9-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen von 4 Versuchen mit jeweils 3 unabhängigen Zelllinien. Der Versuch wurde in Anwesenheit von DAPT (Inhibierung der γ -Sekretase) sowie in Anwesenheit von DMSO (Kontrollbehandlung) durchgeführt. Die Zellzahlen wurden mittels Durchflusszytometrie sowie speziellen Durchflusszytometrie-Kügelchen als Kalibrator ermittelt. **(B)** Proliferationstest von EpICD-YFP stabil transfizierten mF9-Zellen im Vergleich zu YFP stabil transfizierten mF9-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen von 4 Versuchen mit jeweils 3 unabhängigen Zelllinien. Der Versuch wurde in Anwesenheit von 5% und 10% FCS durchgeführt. Die Zellzahlen wurden mittels Durchflusszytometrie sowie speziellen Durchflusszytometrie-Kügelchen als Kalibrator ermittelt. **(C/D)** Proliferationstest von Myc-CTF stabil transfizierten mF9-Zellen im Vergleich zu mF9 WT-Zellen. Beide Zelllinien wurden als Mischkultur mit YFP-exprimierenden mF9-Zellen über den Zeitraum von 12 Tagen zusammen kultiviert. Dargestellt ist der Anteil an YFP-positiven Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Der Versuch wurde in Anwesenheit von DMSO (C) und DAPT (D) durchgeführt.

5.8 Yeast-Two-Hybrid-Interaktion

In humanen Krebszellen wurde nachgewiesen, dass EpICD im Komplex mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 an TCF-DNA-Sequenzen bindet und zur Genaktivierung von Genen wie Zyklin D1, c-Myc und

MMP7 führt (Chaves-Perez et al., 2013; Denzel et al., 2012; Maetzel et al., 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es sich bei der Interaktion zwischen hEpCAM und FHL2 um eine direkte Bindung handelt (Maetzel et al., 2009). Diese mEpCAM-abhängigen Genregulationen konnten in murinen embryonalen Stammzellen nicht bestätigt werden (Daten werden hier nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Unterschiede wurde die Interaktion von murinem EpICD mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 im Yeast-Two-Hybrid-Assay untersucht. Hierfür wurden die Nukleotidsequenzen von EpICD, FHL2, β -Catenin und Lef-1 in speziell für Yeast-Two-Hybrid-konstruierte Vektoren kloniert (James et al., 1996). Kommt es zu einer Interaktion zwischen der Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindungsdomäne (BD), wird hierdurch ein Transkriptionsfaktor für Gal4-DNA-Sequenzen rekonstituiert. Als Folge wird das Gen für die Histidine-Biosynthese (HIS3) aktiviert, sodass der Yeast-Two-Hybrid-Hefestamm auf Nährmedium ohne Histidin (-His) wachsen kann. Hefestämme, die den pGAD-C2- bzw. pGBD-C2-Vektor enthalten, können auf Nährmedium ohne Leucin bzw. Tryptophan (-Leu + Tryp) wachsen. Mit Nährmedium ohne Tryptophan und Leucin kann somit sichergestellt werden, dass die Hefestämme beide Vektoren tragen.

Die Interaktionen zwischen β -Catenin in Fusion mit der Bindungsdomäne (BD) mit allen übrigen Komponenten können nicht gewertet werden, da bereits der leere pGAD-C2-Vektor ausreichend für ein Zellwachstum auf dem Selektionsmedium ohne Histidin (-His) ist (siehe Abbildung 27). Ansonsten wurden keine Autoaktivierungen festgestellt. In diesem Versuch konnte die Interaktion zwischen β -Catenin und Lef1 bzw. zwischen β -Catenin und FHL2 bestätigt werden. Die Interaktion zwischen β -Catenin und Lef-1 wurde bereits im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg beschrieben (Behrens et al., 1996). Gleiches gilt für die Interaktion zwischen β -Catenin und FHL2 (Renger et al., 2013). Jedoch konnte keine Interaktion zwischen EpICD und einer der übrigen Komponenten ermittelt werden. Die Expression des EpICD-Konstruktes wurde mittels EpICD-spezifischen Antikörpern in der Western-Blot-Analyse überprüft (Daten werden hier nicht gezeigt).

Im Yeast-Two-Hybrid-System konnten keine Interaktionen zwischen mEpICD und Komponenten des in humanen Krebszellen beschriebenen Signalweges von hEpCAM bestätigt werden. Im humanen Krebszellen stellt die Interaktion zwischen EpICD und FHL2 eine wichtige Voraussetzung für die spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM dar. Diese Daten weisen auf eine unterschiedliche Funktion von mEpCAM hin.

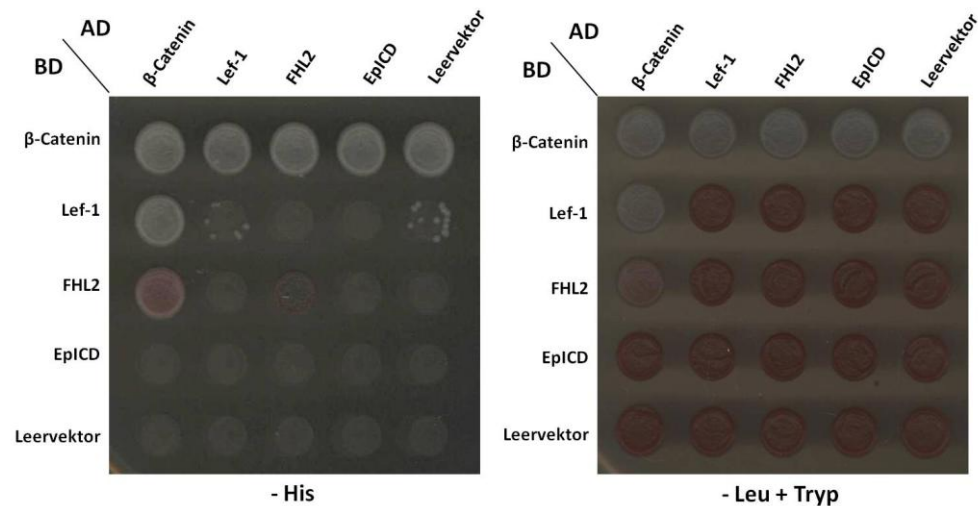


Abbildung 27: Yeast-Two-Hybrid-Interaktionen.

β-Catenin, Lef-1, FHL2 und EpICD wurden in Vektoren für Yeast-Two-Hybrid-Interaktionen kloniert. Jedes dieser Gene wurde in Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindungsdomäne (BD) kloniert, sodass die Interaktionen in jeder der zwei Kombinationsmöglichkeiten getestet werden konnte. Nachdem die verschiedenen Vektorkombinationen in Hefe transfiziert wurden, erfolgte eine Selektion nach Hefezellen, die mit beiden Vektoren (pGBD-C2 und pGAD-C2) transfiziert wurden. Hefesuspensionen dieser Doppeltransfektanten wurden auf verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen der Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindungsdomäne (BD), wird ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet, welcher Gene aktiviert, sodass die Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Histidin wachsen können. Durch das Wachstum auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan (-Leu + Tryp) wurde zudem die Anwesenheit beider Vektoren (pGBD-C2 und pGAD-C2) in jeder Hefesuspension nachgewiesen.

5.9 SILAC-Interaktionsstudie

Da im Yeast-Two-Hybrid-Assay keine Interaktion zwischen EpICD und β-Catenin, FHL2 bzw. Lef-1 zu detektieren war, sollten neue Interaktionspartner von mEpCAM und mEpICD identifiziert werden. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die mEpCAM-YFP, mEpICD-YFP und YFP stabil exprimierten. Durch YFP-spezifische Immunopräzipitationen von mEpCAM-YFP und mEpICD-YFP sollten Interaktionspartner unter Verwendung der Massenspektrometrie identifiziert werden. Damit unspezifische Interaktionen mit YFP ausgeschlossen werden konnten, wurde die Immunopräzipitation von YFP als Kontrolle verwendet. Interaktionspartner von mEpCAM-YFP bzw. mEpICD-YFP sollten nach erfolgter Immunopräzipitation und entsprechenden Waschschritten dieser Proben im Vergleich zur YFP-Kontrolle angereichert sein. Um eine bessere Quantifizierung der Proteine zu erreichen, wurde die SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) Technologie verwendet. Für diese Methode werden Zellen im Medium mit Isotopen-markiertem Lysin und Arginin kultiviert. Die SILAC-Methode bietet den Vorteil, dass Proben mit unterschiedlichen Isotopenmarkierungen vereinigt werden können und dennoch aufgrund des veränderten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses im Spektrogramm unterscheidbar sind. Da mehrere Proben vereinigt, zusammen weiter verarbeitet und gemessen werden, können auf

diese Weise experimentelle und messtechnische Abweichungen umgangen werden. Das Prinzip der SILAC-basierten Interaktionsstudie von mEpCAM und mEpICD ist schematisch in Abbildung 28 dargestellt.

Da die murine embryonale Stammzelllinie E14TG2 α nicht mit dem speziellen SILAC-Medium kultiviert werden konnte, wurde hierfür die murine Teratokarzinom-Zelllinie (mF9) verwendet. Dieser Interaktionsscreen basierte auf einer Immunopräzipitation der Proteinvarianten mittels YFP-Tag. Um eine Unterscheidbarkeit im Massenspektrum zwischen den vereinigten Immunopräzipitationen gewährleisten zu können, wurden die Zellen mit Isotopen-markierten Lysin und Arginin markiert (Harsha et al., 2008). Die mEpCAM-YFP-Zelllinie wurde mit schwerem SILAC-Medium (Lys6 + Arg8) und die EpICD-YFP-Zelllinie mit mittelschwerem SILAC-Medium (Lys4 + Arg6) markiert. Die YFP-Kontrollzelllinie wurde im SILAC-Medium mit unmarkierten Aminosäuren (Lys0 + Arg0) kultiviert. Interaktionspartner von mEpCAM weisen daher ein erhöhtes Verhältnis zwischen schwer- und leicht-markierten Peptiden im Massenspektrum auf. Hingegen sollten Interaktionspartner von EpICD in der mEpCAM-YFP- und mEpICD-YFP-Immunopräzipitation im Vergleich zur YFP-Kontrolle angereichert sein (siehe Abbildung 28). Nach den Waschschritten der Immunopräzipitation wurden die Agarose-Kügelchen mit YFP spezifischen Antikörpern aus allen 3 Ansätzen (mEpCAM-YFP, mEpICD-YFP und YFP) vereinigt und in Laemmli-Puffer eluiert. Die Proben wurden im SDS-Gel in 5 Banden vorfraktioniert, um mehrere Proteine quantifizieren zu können.

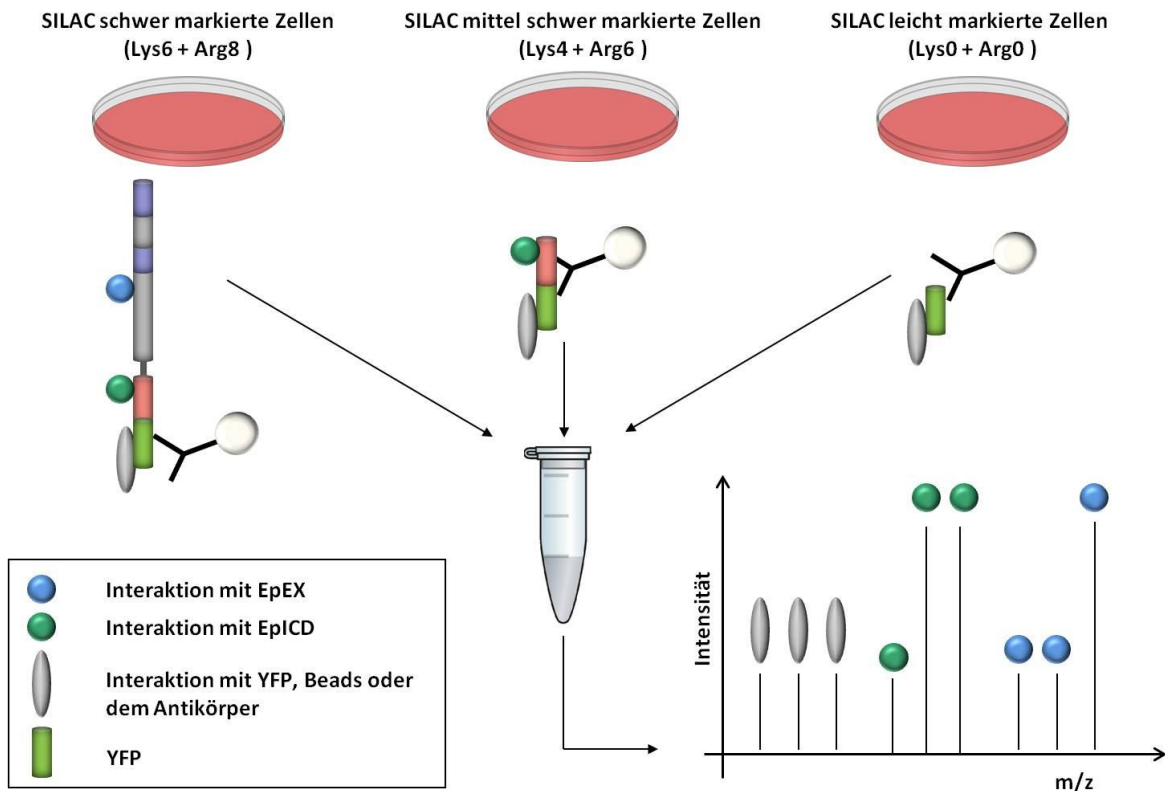


Abbildung 28: Schema des SILAC basierten mEpCAM- und mEpICD-Interaktionsscreens.

Für diesen Interaktionsscreen wurden ausschließlich mF9-Zelllinien verwendet, die das mEpCAM-YFP-Fusionsprotein, das EpICD-YFP-Fusionsprotein bzw. das YFP-Protein als Kontrolle stabil exprimierten. Die mEpCAM-YFP-Zelllinie wurde mit schwerem SILAC-Medium (Lysin6 + Arginin8) und die EpICD-YFP-Zelllinie mit mittel-schwerem SILAC-Medium (Lysin4 + Arginin 6) markiert. Die zur Kontrollzwecken verwendete YFP-Zelllinie wurde im gleichen SILAC-Medium, jedoch ohne Isotopenmarkierung, kultiviert. Die Güte der Markierung wurde mittels ESI-MS-MS überprüft. Für die Immunpräzipitation wurden YFP-spezifische Antikörper sowie 10mg Zelllysate pro Ansatz verwendet. Nach dem Waschen der Agarose-Kügelchen wurden alle 3 Ansätze (mEpCAM-YFP, mEpICD-YFP und YFP) vereinigt und mit Laemmli-Puffer von den Kügelchen eluiert und im SDS-Gel in 5 Banden vorfraktioniert. Die Isotopenmarkierung gewährleistet eine eindeutige Zuordnung der Peptide zum jeweiligen Ansatz (mEpCAM-YFP, mEpICD-YFP und YFP). Bei Interaktionspartnern von mEpICD ist theoretisch eine Anreicherungen in beiden Ansätzen (schwere und mittel-schwere Markierung) zu erwarten, während Interaktionspartner von mEpCAM-Volllänge nur in der mEpCAM-YFP-Immunpräzipitation (schwere Markierung) angereichert sein sollten.

5.9.1 Interaktionspartner von mEpCAM und mEpICD in murinen Teratokarzinom-Zellen

Im Datensatz der mEpCAM-Präzipitation konnte eine Vielzahl von potenziellen Interaktionspartnern ermittelt werden. Für die weitere Analyse wurden lediglich solche Proteine weiter berücksichtigt, die eine Anreicherung von über 4 von schwer zu leicht markierten Peptiden zeigten. Als Schwellenwert des p-Wertes wurde hier $p \leq 0,05$ verwendet. Außerdem wurden nur die Proteine weiter betrachtet, die in allen Versuchen durch mindestens 2 Peptide quantifiziert wurden. Nach diesen Filterkriterien wurden 76 potenzielle Interaktionspartner von mEpCAM ermittelt.

Im Datensatz der EpICD-Interaktion konnte unter den oben genannten Filter-Bedingungen nur ein Interaktionspartner identifiziert werden. Das Protein Pik3c3 war mit einem Verhältnis von 434,4 (mittel-schweren im Vergleich zu leichten Peptiden) und einem p-Wert von 0,01 im Datensatz als potenzieller Interaktionspartner von EpICD angereichert. Bei Pik3c3 handelt es sich um eine Phosphoinositide-3-Kinase der Klasse 3, die in Zusammenhang mit intrazellulärem Vesikeltransport und der Endozytose gebracht wird (Bechtel et al., 2013). Im Datensatz der mEpCAM-Immunopräzipitation konnte jedoch keine statistisch relevante Anreicherung von Pik3c3 festgestellt werden. Die sehr geringe Anzahl an reproduzierbaren Interaktionspartnern von murinem EpICD weist darauf hin, dass die physiologische Funktion eher beim ungespaltenen mEpCAM zu suchen ist. Jedoch kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass mEpICD transiente Interaktionen eingeht, die mit dieser Methode nicht detektiert werden können.

Außerdem konnte mit dieser Methode keine Interaktion von mEpCAM oder mEpICD zu β -Catenin, FHL2, und Lef-1 nachgewiesen werden. Die Daten des Yeast-Two-Hybrid-Interaktions-Assays konnten hier erneut bestätigt werden.

Aufgrund der geringen Anzahl an reproduzierbaren Interaktionen von mEpICD, wurden in der folgenden Auswertung ausschließlich Bindungspartner von mEpCAM weiter verwendet. Um erste Anhaltspunkte über die physiologische Funktion von ungespaltenem mEpCAM in murinen Teratokarzinom-Zellen (mF9) zu gewinnen, wurde der Datensatz auf überrepräsentierte Proteinklassen hin analysiert. Zum Vergleich wurden die Proteine herangezogen, die unter Verwendung der Massenspektrometrie in Zelllysaten von mF9 identifiziert wurden (siehe Abschnitt 5.6 „Proteinregulation durch mEpCAM-CTF in murinen Teratokarzinom-zellen“). In beiden Datensätzen wurde die Anzahl von Proteinen in den jeweiligen Proteinklassen ermittelt. Hierfür wurde die Panther Software verwendet. In Abbildung 29 sind überrepräsentierte Proteinklassen vom mEpCAM-Interaktom im Vergleich zu den Gesamtproteinen im Zelllysate dargestellt.

Bei dieser Analyse war die Proteinklasse „Membrantransport“ am deutlichsten überrepräsentiert. Außerdem waren die Klassen „Zelladhäsion“, „Transport“ und „Enzym-Modulatoren“ im mEpCAM-Interaktom deutlich angereichert (siehe Abbildung 29).

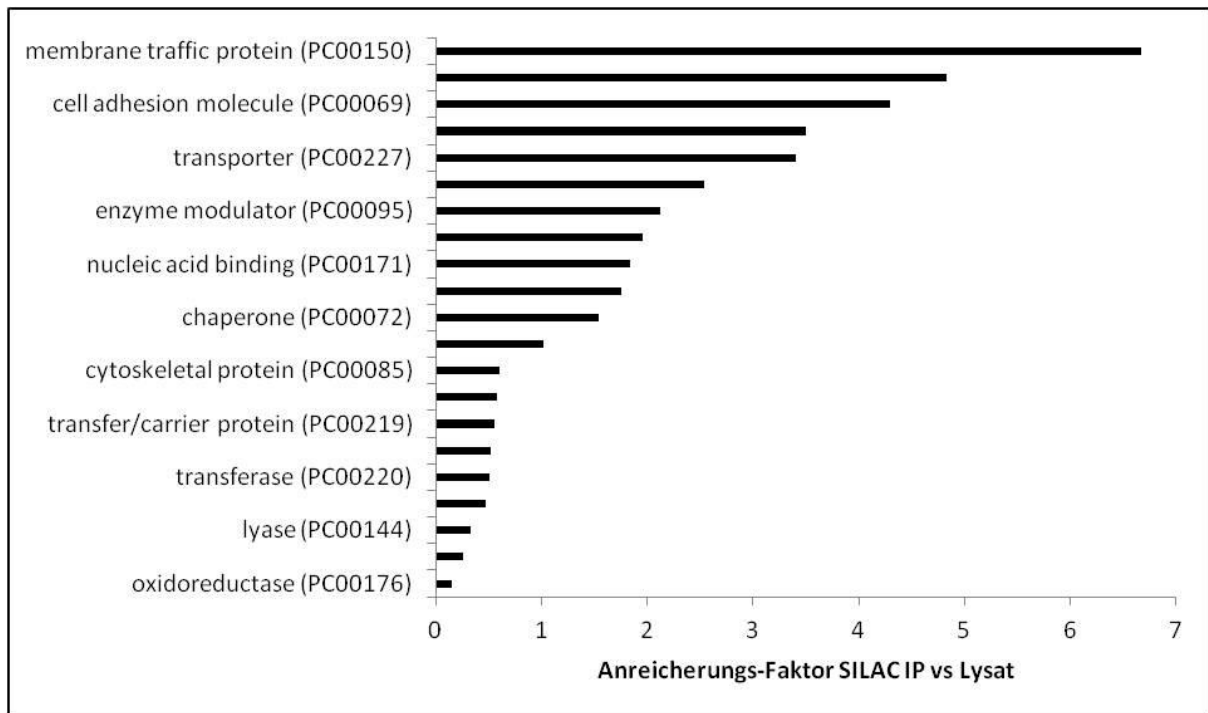


Abbildung 29: Protein Class Enrichment von Interaktionspartnern von mEpCAM.

Interaktionspartner von mEpCAM (Anreicherung ≥ 3 ; p-Wert $\leq 0,05$) wurden mittels Panther-Analyse in Proteinklassen aufgeteilt. Als Bezugsgröße diente die Verteilung der Proteinklassen von Proteinen, die in Lysaten identifiziert wurden. Für den Interaktionsscreen sowie für die Identifizierung der Proteine in Zelllysaten wurden mF9-Zellen verwendet. Aus diesen beiden Verteilungen wurden Proteinklassen ermittelt, die im Interaktom von mEpCAM-Volllänge deutlich überrepräsentiert waren.

In der Proteinklasse „Membrantransport“ konnten einige Proteine identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Endozytose stehen. Hierbei konnten mögliche Protein-Interaktionen zu Clathrin-abhängiger sowie zu Clathrin-unabhängiger Endozytose identifiziert werden. Allerdings wurden viele dieser Proteine lediglich in einem von drei Experimenten identifiziert. Die hier dargestellte Liste ist daher als erster Anhaltspunkt für mögliche Interaktionen von mEpCAM anzusehen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Potentielle Interaktionspartner von mEpCAM (Endozytose)

Endozytose				
Protein	Anreicherung mEpCAM-YFP / YFP	p-Wert	Eindeutige Peptide	Funktion
AP2A1	3,6	-	12	Clathrin abhängige Endozytose
AP2B1	11,9	-	5	Clathrin abhängige Endozytose
CLTA	21,2	-	7	Clathrin abhängige Endozytose
CLTC	7,1	0,402	59	Clathrin abhängige Endozytose
Dab2	12,1	-	6	Clathrin abhängige Endozytose
Lrp2	15,4	0,016	6	Clathrin abhängige Endozytose
Flot1	13,6	0,009	6	Clathrin unabhängige Endozytose
Flot2	16,1	0,029	6	Clathrin unabhängige Endozytose

Außerdem konnten weitere Proteine als potenzielle Interaktionspartner von mEpCAM identifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport von Membranvesikeln stehen (siehe Tabelle 5). Hierbei war insbesondere die große Anzahl an Rab-Proteinen auffällig.

Tabelle 5: Potentielle Interaktionspartner von mEpCAM (intrazellulärer Transport)

Intrazellulärer Membranvesikel-Transport				
Protein	Anreicherung mEpCAM-YFP vs. YFP	p-Wert	Eindeutige Peptide	Funktion
Copg	3,6	0,194	8	Retrograder Transport
Dync1h1	2,0	0,039	36	Retrograder Transport
Hspa5	2,1	0,006	24	Involviert bei der Ausbildung eines Protein-Komplexes im ER
Lman2	5,8	-	8	Involviert beim Transport und Sortieren von Glykoproteinen
Mon2	14,6	0,039	5	Transport zwischen spätem Golgi Apparat und frühen Endosomen
Rab10	4,6	0,003	2	Exozytose, Transport zwischen TGN und Plasmamembran
Rab11b	4,6	0,018	11	Transport zwischen TGN und Plasmamembran
Rab14	5,6	0,020	8	Transport zwischen TGN und Plasmamembran
Rab18	4,7	0,047	6	Transport zwischen der Plasmamembran und frühen Endosomen
Rab1b	5,7	0,011	5	Transport zwischen der ER und Golgi-Apparat bzw. innerhalb des Golgi-Apparats
Rab2a	4,3	0,083	10	Transport zwischen ER und Golgi-Apparat
Rab5a	4,1	0,037	3	Endozytose und Membranfusionen mit frühen Endosomen
Rab5c	4,9	0,029	3	Endozytose und Membranfusionen mit frühen Endosomen
Rab6	5,7	0,028	5	Transport zwischen Golgi-Apparat und ER,

Intrazellulärer Membranvesikel-Transport				
Protein	Anreicherung mEpCAM-YFP vs. YFP	p-Wert	Eindeutige Peptide	Funktion
				zwischen Endosomen und Golgi bzw. innerhalb des Golgi-Apparates
Rab7	5,0	0,037	14	Transport zwischen späten Endosomen und Lysosomen
Rab8a	4,1	0,004	4	Exocytose, Transport zwischen TGN und Plasmamembran
Rab9	5,3	0,150	8	Transport zwischen Endosomen und TGN
Rala	4,1	0,013	3	Involviert bei Exozytose
SAR1	26,9	0,103	11	Transport zwischen ER und Golgi-Apparat
Scfd1	10,2	0,030	4	Retrograder Transport
Sec22b	7,4	0,068	10	SNARE: Involviert bei der Vesikelfusion beim Transport zwischen Golgi-Apparat und ER
Stx12	13,3	-	4	Transport zwischen Golgi-Apparat und späten Endosomen
Vamp3	7,3	0,011	5	SNARE: Involviert bei der Vesikelfusion beim Transport zwischen Golgi-Apparat und späten Endosomen
Vapa	8,8	0,029	9	Vesikeltransport

5.9.2 Lysosomaler Abbau von mEpCAM

Da kein Zusammenhang zwischen der Spaltung von murinem EpCAM in embryonalen Stamm- und Teratokarzinom-Zellen und der Proliferation bzw. Gen- und Proteinregulation beschrieben werden konnte, ist ein proteolytischer Abbau als physiologische Funktion in Betracht zu ziehen. Im Folgenden wurde überprüft, ob mEpCAM in Lysosomen abgebaut wird. Einen ersten Anhaltspunkt hierfür liefern potenzielle Interaktionspartner, die Funktionen bei der Endozytose (siehe Tabelle 4) und die Funktionen bei dem intrazellulären Membranvesikel-Transport (siehe Tabelle 5) haben. Um den lysosomalen Abbau von EpCAM zu untersuchen, wurden Zelllinien in mF9, die entweder das mEpCAM-YFP- oder das CTF-YFP-Fusionsprotein stabil exprimierte, mit DMSO (Kontrollbehandlung), DAPT (Inhibierung der γ -Sekretase), Bafilomycin (Inhibierung des lysosomalen Abbaus) oder mit DAPT zusammen mit Bafilomycin behandelt. Um unter diesen Bedingungen die Lokalisation des YFP-Tags zu ermitteln, wurde die konfokale Lebendzellmikroskopie eingesetzt.

Nach Bafilomycin-Behandlung der mEpCAM-YFP-Zelllinie wurde mEpCAM-YFP in intrazellulären Kompartimenten detektiert. Gleiches gilt für eine Bafilomycin- und DAPT-Doppelbehandlung. Zwischen der DAPT- und DMSO-Behandlung konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Diese Daten zeigen, dass mEpCAM in Lysosomen in murinen Teratokarzinom-Zellen abgebaut wird. Außerdem unterstützen diese Daten die Hypothese, dass mEpCAM auch in murinen

Teratokarzinom-Zellen endozytiert wird. Erste Hinweise auf den Mechanismus der Regulation der Endozytose liefern hier potenzielle Interaktionspartner aus Tabelle 4.

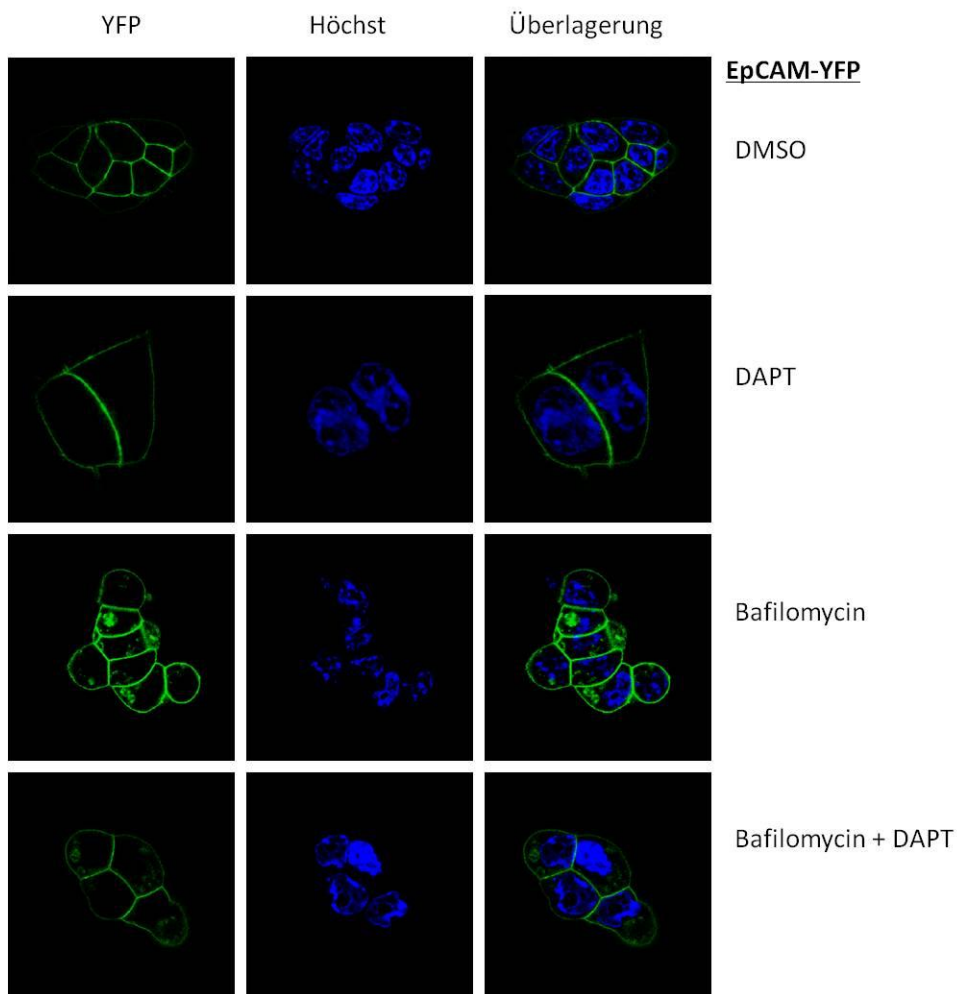


Abbildung 30: Konfokale Lebendzellmikroskopie (Lysosomler Abbau von EpCAM-YFP).

Es wurde die Lokalisation von mEpCAM-YFP in mF9-Zellen bei Inhibierung der lysosomalen Ansäuerung (Bafilomycin-Behandlung) und bei Inhibierung der γ -Sekretase (DAPT-Behandlung) sowie bei gleichzeitiger Inhibierung der lysosomalen Ansäuerung und der γ -Sekretase (Bafilomycin- + DAPT-Behandlung) untersucht. Hierfür wurden ausschließlich stabile mEpCAM-YFP-Transfektanten in mF9-Zellen verwendet. Da beide Inhibitoren (Bafilomycin und DAPT) in DMSO gelöst sind, diente eine DMSO-Behandlung als Kontrolle. Die Zellkerne wurden mit Höchst visualisiert.

Im Folgenden wurde untersucht, ob mEpCAM-CTF als Alternative zur γ -Sekretase abhängigen-Spaltung auch lysosomal abgebaut werden kann. Ähnliches wurde bereits beim Met-Rezeptor beschrieben (Ancot et al., 2012). Hierfür wurden Zellen, die das CTF-YFP-Fusionsprotein stabil exprimierten, mit DMSO, DAPT, Bafilomycin oder mit DAPT und Bafilomycin zusammen inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisation von YFP wurde wieder mittels Lebendzellmikroskopie bestimmt. Nach DMSO-Behandlung war ein diffuses YFP-Signal mit schwacher perinukleärer Lokalisation zu erkennen. Wie bereits erwähnt, könnte es sich hier um neu gebildetes CTF-YFP im Endoplasmatischen Retikulum handeln (Ancot et al., 2012). Nach DAPT-Behandlung war das YFP-Signal an der Plasmamembran lokalisiert, sodass die γ -Sekretase abhängige Spaltung von CTF-YFP

erneut bestätigt werden konnte. Zwischen der Bafilomycin- und DMSO-Behandlung war kein Unterschied zu erkennen. Dies weist daraufhin, dass mEpCAM-CTF in murinen Teratokarzinom-Zellen (mF9) überwiegend γ -Sekretase-abhängig und nur zu einem geringen Anteil oder gar nicht lysosomal-abhängig degradiert wird. Nach der Doppelbehandlung mit DAPT und Bafilomycin konnten YFP-Signale in intrazellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass bei Inaktivierung der γ -Sekretase das CTF-YFP lysosomal degradiert wird.

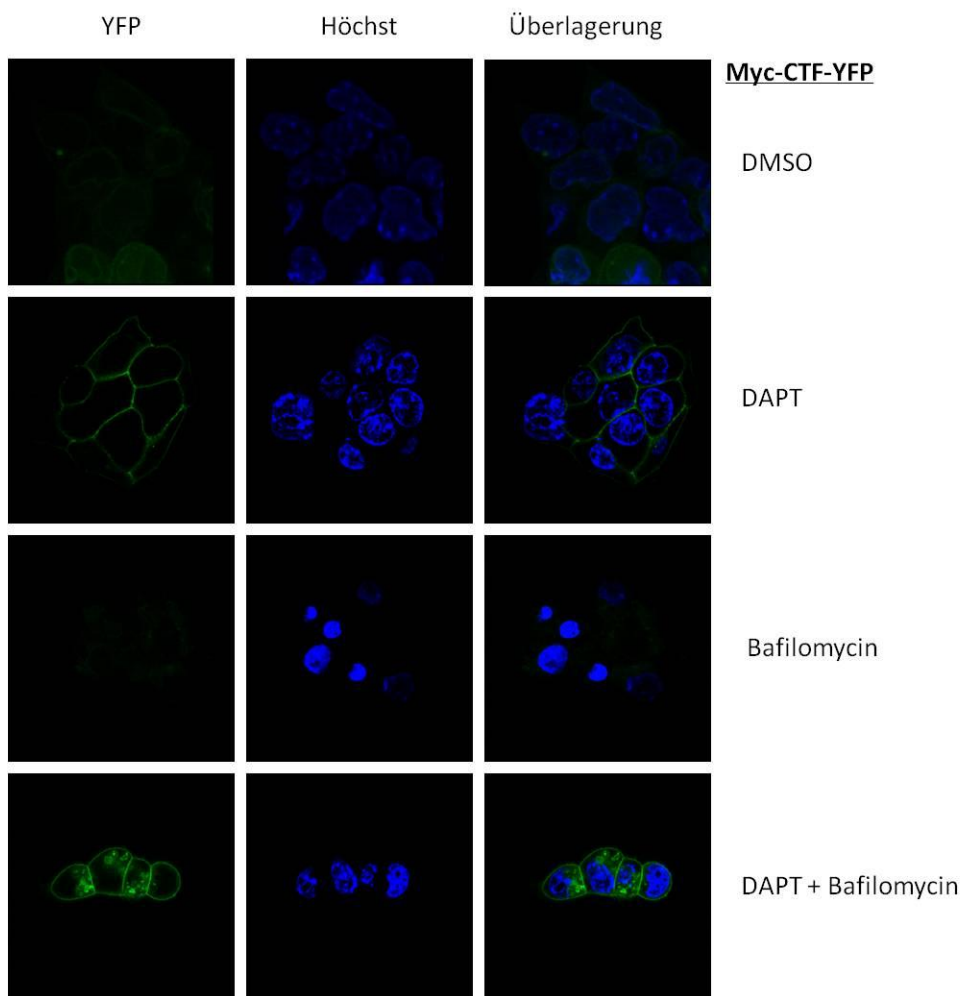


Abbildung 31: Konfokale Lebendzellmikroskopie (Lysosomler Abbau von Myc-CTF-YFP).

Es wurde die Myc-CTF-YFP-Lokalisation in mF9-Zellen bei Inhibierung des lysosomalen Abbaues (Bafilomycin-Behandlung) und bei Inhibierung der γ -Sekretase (DAPT-Behandlung) sowie bei gleichzeitiger Inhibierung des lysosomalen Abbaues und der γ -Sekretase (Bafilomycin- + DAPT-Behandlung) untersucht. Hierfür wurden ausschließlich stabile Myc-CTF-YFP-Transfektanten in mF9-Zellen verwendet. Da beide Inhibitoren (Bafilomycin und DAPT) in DMSO gelöst sind, diente DMSO als Kontrollbehandlung. Die Zellkerne wurden mit Höchst visualisiert.

5.9.3 Akt-Phosphorylierung

Im SILAC-basierten Interaktions-Screen von mEpCAM wurden Proteine identifiziert, die im Zusammenhang mit dem Akt-Signalweg stehen. Zum einen wurde ERas als Interaktionspartner von mEpCAM identifiziert. ERas ist ein Homolog des Ras-Proteins, und es wird spezifisch in ES-

Zellen und Teratokarzinom-Zellen exprimiert. Außerdem interagiert ERas mit der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase und führt bei Überexpression zur Induktion der Akt-Phosphorylierung (Takahashi et al., 2003). Ein weiterer potentieller Interaktionspartner von mEpCAM ist Prohibitin1 (Phb). Prohibitin1 (Phb) interagiert mit Ras und ist essentiell für die Ras-Raf Interaktion bei der MAPK-Kaskade (Chiu et al., 2013). ERas weist eine Identität in der Aminosäuresequenz zu HRas, KRas und NRas von 43%, 46% bzw. 47% auf (Takahashi et al., 2003). Daher wäre eine Interaktion zwischen Prohibitin1 und ERas möglich. Prohibitin1 (Phb) und Prohibitin2 (Phb2) interagieren miteinander (Coates et al., 2001). Eine Interaktion zwischen Prohibitin-2 und Akt wurde im Rahmen der Skelettmuskel-Differenzierung beschrieben (Heron-Milhavet et al., 2008). Das Protein Prohibitin2 war am stärksten von allen Proteinen im SILAC-Interaktions-Screen angereichert. Alle in Abbildung 32 dargestellten Interaktionen wurden in allen 3 Versuchen quantifiziert und zeigten reproduzierbare Anreicherungen in den mEpCAM-YFP im Vergleich zu den YFP-Immunopräzipitationen (siehe p-Werte in Tabelle 6).

Der Akt-Signalweg ist an der Regulation der Zellproliferation, der Überlebensrate von Zellen, der Zellgröße, der Versorgung mit Nahrungsmitteln sowie der Angiogenese beteiligt. In humanen Krebszellen ist dieser Signalweg häufig dereguliert (Altomare and Testa, 2005). Eine mögliche Verbindung zwischen mEpCAM und der Akt-Signaltransduktion erscheint als sehr interessant, da beide zur Krebsentstehung beitragen.

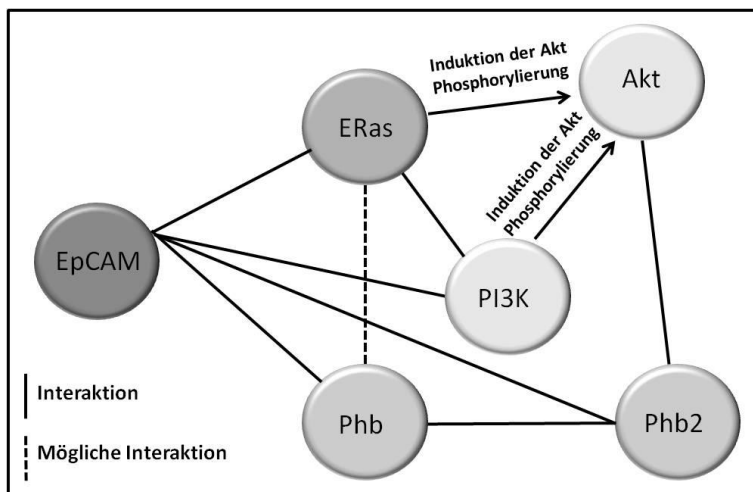


Abbildung 32: Interaktionen von EpCAM bei der Signaltransduktion von Akt.

Interaktionspartner von mEpCAM (Winter et al., 2007) mit deren Interaktionen untereinander sowie deren Verbindungen zur Akt-vermittelten Signaltransduktion.

Tabelle 6: Interaktionspartner von mEpCAM (Akt-Phosphorylierung)

Protein-Interaktionen bzw. Induktion der Akt-Phosphorylierung	Anreicherung mEpCAM-YFP vs. YFP	p-Wert	Quelle
EpCAM-Phb2 (Interaktion)	30,80	0,010	vorliegende Arbeit
mEpCAM-Phb (Interaktion)	27,45	0,005	vorliegende Arbeit
mEpCAM-ERas (Interaktion)	4,12	0,028	vorliegende Arbeit
mEpCAM-PI3K (Interaktion)	-	-	(Winter et al., 2007)
Phb-Phb2 (Interaktion)	-	-	(Coates et al., 2001)
ERas-PI3K (Interaktion)	-	-	(Takahashi et al., 2003)
ERas-induzierte Akt-Phosphorylierung	-	-	(Takahashi et al., 2003)
PI3K-induzierte Akt-Phosphorylierung	-	-	(Fayard et al., 2005)

5.9.3.1 Interaktionsnetzwerk von mEpCAM, ERas, Phb und Phb2

Im Folgenden wurden die Interaktionen von mEpCAM mit ERas sowie mit Prohibitin1 (Phb) und mit Prohibitin2 (Phb2) unter Zuhilfenahme von Ko-Immunopräzipitationen verifiziert. Hierbei wurden mEpCAM-YFP- und YFP-Transfektanten der mF9-Zelllinie verwendet. Für die Immunopräzipitationen wurden Agarose-Kügelchen, die mit YFP-spezifischen Antikörpern gekoppelt waren, verwendet.

Nach der Immunopräzipitation waren in allen Versuchen vergleichbare Mengen an mEpCAM-YFP und YFP im Western-Blot detektierbar. Vor der YFP-spezifischen Immunopräzipitation wurden vergleichbare Mengen an ERas, Prohibitin1 (Phb) und Prohibitin2 (Phb2) in den Ansätzen nachgewiesen (Input). Nach erfolgter Immunopräzipitation und weiteren Aufreinigungen wurde eine deutliche Anreicherung von ERas, Prohibitin1 (Phb) und Prohibitin2 (Phb2) in dem Ansatz mit mEpCAM-YFP im Vergleich zum Ansatz mit YFP im Western-Blot detektiert (siehe Abbildung 33). Die Interaktionen von mEpCAM mit ERas, mit Prohibitin1 (Phb) sowie mit Prohibitin2 (Phb2) konnten in diesem Versuch bestätigt werden (siehe Abbildung 33).

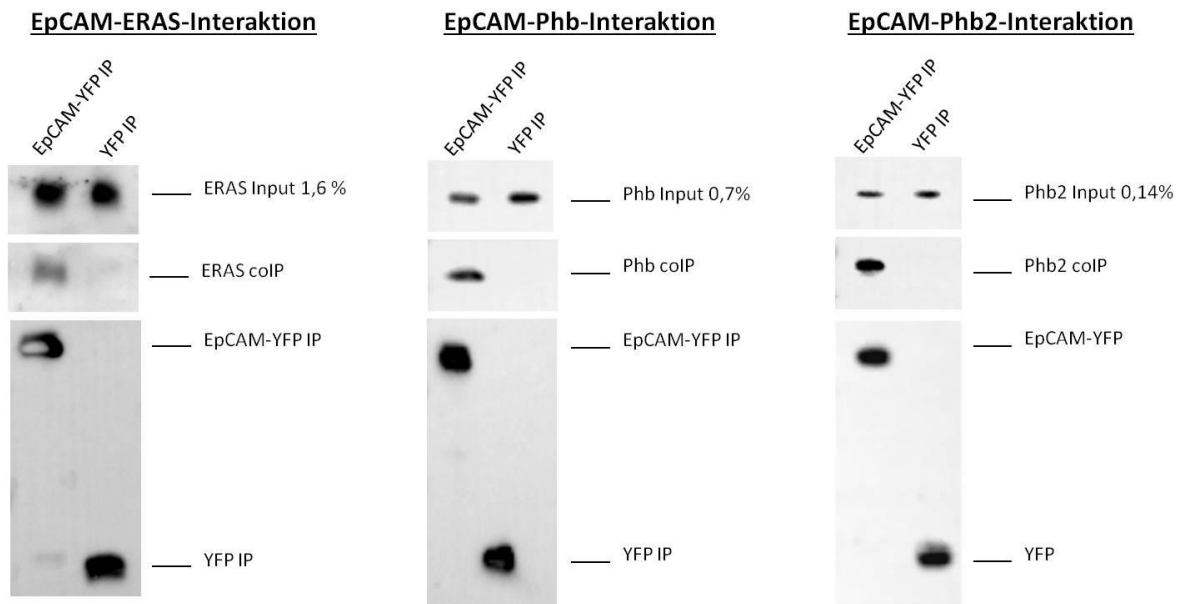


Abbildung 33: Interaktionen von mEpCAM mit ERAs, mit Prohibitin sowie mit Prohibitin2.

Für den Nachweis dieser Protein-Protein-Interaktionen wurden YFP-spezifische Immunopräzipitationen aus Zelllysaten von mEpCAM-YFP und YFP-Transfektanten der Zelllinie mF9 verwendet. Im Western-Blot wurde die Menge an präzipitierten mEpCAM-YFP und YFP sowie die Menge an ERAs, Prohibitin1 (Phb) und Prohibitin2 (Phb2) vor der Immunopräzipitation (Input) kontrolliert. Nach erfolgter Immunopräzipitation von mEpCAM-YFP war im Vergleich zur YFP-Kontrolle eine deutliche Anreicherung von ERAs, Phb und Phb2 zu erkennen.

5.9.3.2 mEpCAM-induzierte Akt-Phosphorylierung

Als nächstes wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen mEpCAM und der Phosphorylierung von Akt untersucht. Hierfür wurde die Phosphorylierung von Akt in murinen embryonalen Stammzellen, in denen mEpCAM-YFP bzw. YFP stabil exprimiert wurden, miteinander verglichen. Als Positivkontrolle für die Akt-Phosphorylierung wurden beide Zelllinien mit IGF (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor) behandelt.

Die Behandlung von E14TG2 α ES-Zellen mit IGF induzierte die verstärkte Phosphorylierung von Akt (Abbildung 34, linke Seite). Die Expression von mEpCAM-YFP führte ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Expression von YFP. Die Behandlung von E14TG2 α ES-Zellen mit IGF und die Expression von mEpCAM-YFP wiesen additive Effekte auf und resultierten in der stärksten Phosphorylierung von Akt (Abbildung 34, linke Seite). Das Ausmaß der Induktion der Phosphorylierung von Akt wurde in vier unabhängigen Experimenten durch eine Software-basierte Quantifizierung der Immunoblots bestimmt. Hierfür wurde die Intensität der Akt-Phosphorylierung der YFP-exprimierenden Zelllinie als Bezugsgröße festgelegt. Die Überexpression von EpCAM-YFP in murinen ES-Zellen (E14TG2 α) führte zu einer 2,2-fach erhöhten Phosphorylierung von Akt (Abbildung 34, rechte Seite). Die statistische Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten ergab einen p-Wert von 0,024.

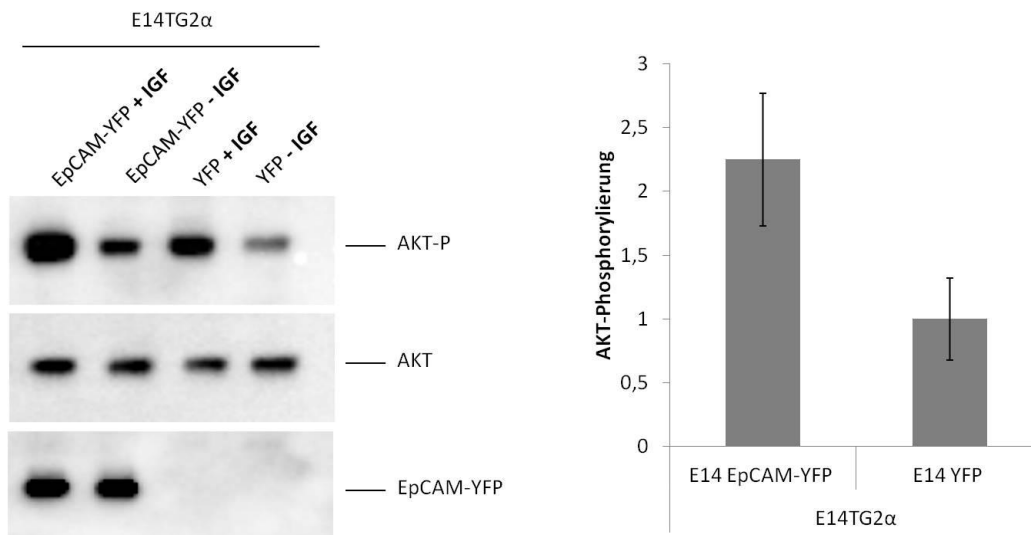


Abbildung 34: Induktion der Akt-Phosphorylierung durch mEpCAM-YFP-Überexpression.

Linke Seite: Als Kontrolle für die Spezifität der Akt-Phosphorylierung wurden die EpCAM-YFP- bzw. YFP-Überexpressionszelllinien mit IGF stimuliert. **Rechte Seite:** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Akt-Phosphorylierung aus 4 unabhängigen Experimenten. Für diesen Versuch wurde die embryonale Stammzelllinie E14TG2 α verwendet.

6 Diskussion

hEpCAM wurde bereits 1979 als erstes Tumor-assoziiertes Antigen beschrieben (Bergsagel et al., 1992; Chadeneau et al., 1991; Herlyn et al., 1979). Aufgrund der Tumor-spezifischen Überexpression an der Zelloberfläche wurde hEpCAM sehr früh als Zielmolekül für Antikörper-basierte Therapieansätze in der Onkologie verwendet (Armstrong and Eck, 2003; Baeuerle and Gires, 2007; Braun et al., 1999; Di Paolo et al., 2003; Imrich et al., 2012; Riesenberg et al., 2001). Außerdem wurde hEpCAM als Marker für Tumor-Induzierende Zellen (TICs) beschrieben. Zum Beispiel wird hEpCAM in Kombination mit CD24 und CD44 zur Isolierung von Tumor-induzierenden Zellen (TICs) bei Mammakarzinomen eingesetzt (Al-Hajj et al., 2003). Häufig verwendete Ansätze in der Krebstherapie, wie Chemotherapien, haben den entscheidenden Nachteil, dass Tumor-Induzierende Zellen (TICs) weniger effektiv adressiert werden. Da hEpCAM sowohl im primären Tumor wie auch in Tumor-Induzierenden Zellen (TICs) exprimiert wird, sind Therapieansätze mit hEpCAM als Zielmolekül als vielversprechend anzusehen (Imrich et al., 2012). Zudem wird hEpCAM in einem geringeren Maße im normalen Epithel der Haut, des Thymus und des Darms im Vergleich zu Tumoren exprimiert (Nelson et al., 1996; Trzpis et al., 2007).

In ersten funktionellen Untersuchungen wurde hEpCAM als Zelladhäsionsmolekül beschrieben. Hierbei wurde verdeutlicht, dass EpCAM eine homophile Adhäsion zwischen Epithelzellen vermittelt und die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion wiederum unterdrückt (Litvinov et al., 1994; Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Knockout von mEpCAM mit der Rekrutierung von Claudinen in Tight Junctions im Darmepithel interferiert und hierdurch die Zelladhäsion beeinflusst (Lei et al., 2012). In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von hEpCAM durch die Geninduktion von c-myc, Zyklin A und E zu einer erhöhten Proliferation führt (Munz et al., 2004). Der Einfluss von hEpCAM auf die Regulation von Genen war nicht allein durch die Funktion als Zelladhäsionsmolekül zu erklären. Schließlich gelang es durch Arbeiten unserer Gruppe die Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen aufzuklären. Hierbei wird hEpCAM im Rahmen einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) gespalten und damit aktiviert. Die intrazelluläre Domäne EpICD migriert in den Zellkern und bildet zusammen mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 einen Proteinkomplex, der die transkriptionelle Aktivierung von Genen, wie c-myc, Zyklin A und E, zur Folge hat (Chaves-Perez et al., 2013; Maetzel et al., 2009).

Neben der Expression von EpCAM in einer Vielzahl von Karzinomen, Tumor-induzierenden Zellen (TICs) und in gesundem Epithel wird EpCAM in humanen und murinen embryonalen Stammzellen sowie Teratokarzinomzellen exprimiert (Gonzalez et al., 2009; Lu et al., 2010; Ng et al., 2010).

Bereits im Zweizellstadium der Morulation konnte die Expression von EpCAM in Ratten nachgewiesen werden (Tarmann et al., 1990). Die Expression von humanem und murinem EpCAM wurde mit der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Zusammenhang gebracht (Gonzalez et al., 2009; Lu et al., 2010; Ng et al., 2010). In humanen embryonalen Stammzellen wurde das intrazelluläre Spaltprodukt hEpICD an Promotoren von Genen identifiziert, die bei der induzierten Pluripotenz eine bedeutende Funktion haben (Lu et al., 2010). Dies legt nahe, dass hEpCAM in humanen embryonalen Stammzellen wahrscheinlich im Rahmen der Regulierten Intermembran Proteolyse (RIP) gespalten wird. Ein direkter Nachweis der Proteolyse von hEpCAM in humanen ES-Zellen wurde allerdings bis dato nicht publiziert. Weiterhin ist unklar, mit welchen Interaktionspartnern EpICD in diesem Zellsystem interagiert, da die Signaltransduktion von EpCAM lediglich in humanen Krebszellen beschrieben wurde. In den letzten Jahren wurde die Funktion von mEpCAM in Knockout-Modellen in der Maus weiter untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Phänotypen des Knockouts von mEpCAM beschrieben. In der ersten Publikation führte die Deletion des mEpCAM-Gens aufgrund von Defekten in der Plazenta zu einer embryonalen Letalität (Nagao et al., 2009). In weiteren Untersuchungen von mEpCAM-Knockout-Mäusen wurde der Phänotyp der embryonalen Letalität jedoch nicht bestätigt. Homozygote Knockout-Mutanten von mEpCAM starben aufgrund von Defekten im intestinalen Epithel wenige Tage nach der Geburt (Lei et al., 2012). Eine detaillierte Beschreibung der Phänotypen von den mEpCAM-Knockout-Mutanten ist in der Einleitung im Abschnitt 1.3.7: „Funktionelle Untersuchungen von EpCAM in Knockout-Modellen“ zu finden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die spaltungsabhängige Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen bereits beschrieben. In vorherigen Untersuchungen unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass hEpCAM initial durch die Metalloprotease TACE (Tumor Necrose Factor converting enzyme) sowie im zweiten Schritt durch den γ -Sekretase-Komplex gespalten wird (Maetzel et al., 2009). Das extrazelluläre (EpEX) und das intrazelluläre Spaltprodukt (EpICD) von hEpCAM wurden in humanen Krebszellen bereits nachgewiesen. Allerdings waren diese zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht Aminosäure-genau definiert. Da die Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen durch die Spaltung und Freisetzung von EpICD aktiviert wird, ist ein detailliertes biochemisches Verständnis von diesem Prozess wichtig. Außerdem war unklar, ob an der extrazellulären Spaltung von EpCAM weitere Proteasen als TACE (Tumor Necrose Factor Converting Enzyme) beteiligt sind. Zudem war zu diesem Zeitpunkt noch unklar, ob mEpCAM in embryonalen Stamm- und Teratokarzinomzellen ebenfalls proteolytisch gespalten wird. Außerdem war nicht bekannt, welche Interaktionen und Funktionen mEpCAM in diesen Zellen hat.

6.1 Spaltung von mEpCAM

In humanen Krebszellen wurde nachgewiesen, dass hEpCAM im Rahmen einer spaltungsabhängigen Signaltransduktion an der Entstehung von Krebs beteiligt ist. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass hierbei das intrazelluläre Spaltprodukt eine entscheidende Bedeutung hat und als Transkriptionsfaktor im Komplex mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 Gene induziert, die mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht werden (Maetzel et al., 2009). Außerdem wurde Adam17/TACE als die Metalloprotease identifiziert, die hEpCAM initial spaltet. Die weitere Spaltung des resultierenden hEpCAM-CTF wird durch den γ -Sekretase-Komplex katalysiert (Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009). In humanen embryonalen Stammzellen wurde das intrazelluläre Spaltprodukt EpICD an Promotoren von Genen nachgewiesen, die bei der induzierten Pluripotenz eine bedeutende Funktion haben (Lu et al., 2010). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass hEpCAM in humanen embryonalen Stammzellen gespalten wird und das intrazelluläre Spaltprodukt als Teil eines Proteinkomplexes an der Regulation von Genen beteiligt ist, die bei der induzierten Pluripotenz eine übergeordnete Rolle spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mEpCAM in murinen embryonalen Stamm- und Teratokarzinom-Zellen ebenfalls proteolytisch gespalten wird. Die hier beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass Metalloproteasen an der extrazellulären Spaltung beteiligt sind. Das durch die Metalloprotease gebildete Spaltprodukt konnte durch die Induzierung von PMA und Hemmung durch TAPI1 eindeutig massenspektrometrisch definiert werden. Eine potentielle Metalloprotease - neben der für hEpCAM bereits beschriebenen TACE/Adam17 - stellt die Protease Adam10 dar, welche mit hEpCAM in Tetraspanin-reichen Mikrodomänen kolokalisiert ist (Le Naour et al., 2006a; Le Naour et al., 2006b). Weiterführende Arbeiten haben zum Ziel, den Einfluss von TACE/Adam17 und Adam10 in Bezug auf die Spaltung von mEpCAM aufzuklären. Im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lichtenthaler, (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, München), konnte BACE1 als weitere Protease identifiziert werden, die bei der initialen Spaltung von mEpCAM mitwirkt. BACE1 (β -site of APP cleaving enzyme) ist eine Aspartatprotease, die durch die Spaltung von APP (amyloid precursor protein) an der Generierung der A β -Fragmente und damit an der Entstehung der Alzheimer Erkrankung essentiell beteiligt ist (Stockley and O'Neill, 2008; Vassar et al., 2009; Willem et al., 2009). Im Allgemeinen war der Anteil der jeweiligen Proteasen an der extrazellulären Spaltung von der verwendeten Zelllinie abhängig. Der BACE1-abhängige Schnitt war in allen getesteten Zelllinien im Vergleich zu den übrigen Spaltprodukten mit unterschiedlichen Intensitäten detektierbar. In HEK293-Zellen war der Anteil des BACE1-

abhängigen Spaltproduktes im Vergleich zu allen weiteren extrazellulären Spaltprodukten dominant. Hingegen hatte in der Teratokarzinom-Zelllinie mF9 eine Metalloprotease den größten Beitrag bei der extrazellulären Spaltung. In der NIH3T3-Zelllinie hatte eine bislang nicht weiter charakterisierte Protease die höchste relative Signalintensität von 100% im Spektrum der massenspektrometrischen Analyse. Zum Vergleich hatte das Spaltprodukt der Metalloprotease in der Zelllinie NIH3T3 nur eine relative Signalintensität von ca. 20% (siehe Abbildung 9). Das Spaltprodukt von BACE1 war mit einer relativen Signalintensität von unter 10% in der Zelllinie NIH3T3 gerade noch als Signal erkennbar (siehe Abbildung 9). Da die Peptide bei der massenspektrometrischen Untersuchung unterschiedlich gut ionisiert und detektiert werden, können aufgrund dieser Daten keine Aussagen über die tatsächlichen Mengenverhältnisse der extrazellulären Spaltprodukte getroffen werden. Ein Vergleich zwischen den Zelllinien bezüglich eines Spaltproduktes ist jedoch möglich.

Die Protease BACE1 hat ein pH-Optimum von 4,5 und ist primär in Endosomen aktiv (Grbovic et al., 2003; Shimizu et al., 2008). Hingegen haben Metalloproteasen ein pH-Optimum bei 7 (Webb et al., 1999). Die Spaltung von endogenem mEpCAM konnte in der aufgereinigten Membranfraktion (Membranassay) bei pH-Werten von 7 und 4,5 bestätigt werden (vorliegende Arbeit). In diesem Experiment wurde nachgewiesen, dass endogenes mEpCAM sowohl im neutralen pH-Bereich des extrazellulären Milieus und bei sauren pH-Werten von 4,5, die in angesäuerten Endosomen vorherrschen, proteolytisch gespalten wird. Interessanterweise war die Abspaltung der extrazellulären Domäne nach 24-stündiger Inkubation bei einem pH-Wert von 4,5 nahezu vollständig, während bei einem pH-Wert von 7 nur ca. 20% von mEpCAM zu mEpCAM-CTF gespalten wurden. Diese Daten weisen auf eine relativ schnelle proteolytische Spaltung von mEpCAM in Endosomen im Vergleich zur Spaltung an der Zytoplasmamembran hin. Wie bereits beschrieben, ist BACE1 bei sauren pH-Werten in Endosomen aktiv. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Spaltung von mEpCAM durch BACE1 in angesäuerten Endosomen stattfindet. Der Transport von mEpCAM in angesäuerten Endosomen stellt daher eine Voraussetzung für die Proteolyse durch BACE1 dar. Hierfür sind mehrere Alternativen denkbar. Zum einen könnte mEpCAM durch Endozytose in Endosomen aufgenommen werden. Außerdem wäre es denkbar, dass mEpCAM nach erfolgter Synthese am trans-Golgi-Netzwerk auf dem Weg zur Plasmamembran durch BACE1 gespalten wird. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde eine Mutation von hEpCAM (Cys⁶⁶Tyr) identifiziert, die mit der Zellmembranlokalisation interferiert und zur Congenital Tufting Enteropathy (CTE) Erkrankung führt. Trotz fehlender Integration in die Plasmamembran wird diese hEpCAM-Mutante gespalten (Schnell et al., 2013a). Möglicherweise wird die hEpCAM (Cys⁶⁶Tyr)-Mutante in Endosomen von BACE1 gespalten. Aufgrund der Bedeutung des intrazellulären Spaltproduktes hEpICD in humanen Krebszellen ist

anzunehmen, dass hEpICD im gesunden Gewebe eine wichtige physiologische Funktion hat. Unter dieser Annahme wäre es denkbar, dass die Spaltung durch BACE1 in Endosomen die fehlende hEpICD-Freisetzung der hEpCAM (Cys⁶⁶Tyr)-Mutante von der Zellmembran kompensiert. Außerdem könnte die Spaltung durch BACE1 eine Akkumulation der hEpCAM (Cys⁶⁶Tyr)-Mutante in den Endosomen verhindern.

Die Existenz sowie die Freisetzung des A β -ähnlichen EpCAM-Fragments (mEp- β) von der Zellmembran wurde in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen und unter Verwendung der Massenspektrometrie Aminosäuren-genau bestimmt. Eine physiologische Funktion dieses Fragments ist bislang nicht bekannt. hTrop2 ist ein Retroposon von hEpCAM und weist gegenüber diesem eine Homologie von 49% in der Aminosäuresequenz auf (Szala et al., 1990). Mutationen von hTrop2 werden mit der familiären subepithelialen Amyloidose der Kornea in Zusammenhang gebracht (TsujiKawa et al., 1999). Bei dieser Erkrankung kommt es zu Amyloidablagerungen in der Hornhaut des Auges. Da Trop2 wie EpCAM durch die Protease TACE/Adam17 sowie den γ -Sekretase-Komplex gespalten wird (Stoyanova et al., 2012), ist auch bei Trop2 mit der Generierung und Freisetzung eines A β -ähnlichen Trop2-Fragments (Trop2- β) zu rechnen. Bis jetzt wurde das Trop2- β jedoch nicht nachgewiesen. Außerdem sind die Schnittstellen von BACE1 sowie der γ -Sekretase zwischen mEpCAM und mTrop2 gut konserviert, sodass ein mEp- β -ähnliches Fragment von mTrop2 theoretisch zu erwarten wäre (siehe Abbildung 17). Eine mögliche Akkumulation von Trop2- β , in Analogie zur Akkumulation von A β bei der Alzheimer-Erkrankung, könnte die Ursache für das Entstehen von Amyloidablagerungen in der Hornhaut des Auges sein. Massenspektrometrisch wurden im Wesentlichen zwei Schnittstellen in der Ektodomäne sowie zwei N-terminale Schnittstellen der γ -Sekretase in der Transmembrandomäne identifiziert (vorliegende Arbeit). Daraus resultierten 4 verschiedene mEp- β -ähnliche Fragmente. Bei APP werden ausschließlich solche Peptide als A β -Peptide bezeichnet, die durch das Zusammenspiel der Proteasen BACE1 mit dem γ -Sekretase-Komplex gebildet werden. Hingegen werden Peptide von APP, die durch die α -Sekretase und den γ -Sekretase-Komplex gebildet werden, als p3-Peptide (Hass et al., 2009) bezeichnet. Im Gegensatz zu A β sind diese nicht an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt (Postina, 2008). Bei mEpCAM wurden Peptide, die von einer Metalloprotease zusammen mit dem γ -Sekretase-Komplex bzw. von BACE1 zusammen mit dem γ -Sekretase-Komplex gebildet werden, als mEp- β definiert (Hachmeister et al., 2013). Der wesentliche Unterschied zwischen der Spaltung von mEpCAM und APP ist, dass die Spaltung mit Hilfe von BACE1 und dem γ -Sekretase-Komplex bei APP ein längeres Peptid generiert, als bei der Spaltung durch eine α -Sekretase und den γ -Sekretase-Komplex. Nur das längere Peptid von APP (A β) ist an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt. Da bei mEpCAM die Schnittstelle der Metalloprotease weiter N-terminal von der Transmembrandomäne entfernt ist als die BACE1-

Schnittstelle, sind die durch die Metalloprotease gebildeten mEp- β Spaltprodukte entsprechend größer als die durch BACE1 gebildeten Fragmente.

Das bei der sequentiellen Spaltung von mEpCAM entstehende mEpCAM-CTF wird durch die γ -Sekretase weiter prozessiert. Um die Spaltung von mEpCAM-CTF durch die γ -Sekretase biochemisch und funktionell weiter untersuchen zu können, wurden stabile Transfektanten des N-terminal Myc-getaggten mEpCAM-CTF in der Teratokarzinomzelllinie mF9 generiert. Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe des extrazellulären Myc-Tags im Durchflusszytometer analysiert. Das Myc-getaggte EpCAM-CTF war im Durchflusszytometer ausschließlich nach Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT nachweisbar, was eine nahezu vollständige Prozessierung durch den γ -Sekretase-Komplex nahelegt. Hingegen wurde mEpCAM in der aufgereinigten Membranfraktion bei einem pH Wert von 7 und einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bei 37° nur zu ca. 20% in mEpCAM-CTF gespalten. Außerdem spricht die Tatsache, dass endogenes mEpCAM im Durchflusszytometer leicht detektiert werden kann, für die Spaltung der Ektodomäne als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der sequentiellen Spaltung von mEpCAM. Damit folgt die Proteolyse von mEpCAM der klassischen Regulierten Intramembran Proteolyse (RIP) (Hass et al., 2009; Rawson, 2002). Hauptsächlich werden Transmembranproteine vom Typ-1 sequentiell durch die γ -Sekretase gespalten (Haapasalo and Kovacs, 2011). Bei Typ-1-Transmembranproteinen befindet sich das N-terminale Ende extrazellulär und das C-terminale Ende intrazellulär. Außerdem zeichnen sich diese Proteine durch eine einzelne Transmembrandomäne aus. Bereits im Jahr 2011 waren 91 Typ-1-Transmembranproteine als Substrate des γ -Sekretase-Komplexes bekannt (Haapasalo and Kovacs, 2011). Als prominente Beispiele sind APP, Notch und ErbB4 zu nennen (Hass et al., 2009). Jedoch sind bis heute sind nur zwei Substrate der γ -Sekretase beschrieben, die keine Typ-1-Transmembranproteine sind. Zum einen wurde die β 1,6-Acetylglucosaminyltransferase als ein atypisches Substrat für die γ -Sekretase dargestellt, da es sich hierbei um ein Typ-2-Transmembranprotein handelt (Nakahara et al., 2006). Typ-2-Transmembranproteine haben eine einzelne Transmembrandomäne. Bei Typ-2-Transmembranproteinen ist das N-terminale Ende intrazellulär und das C-terminale Ende extrazellulär lokalisiert. Außerdem spaltet die γ -Sekretase die Glutamat-Rezeptor-Untereinheit 3 in ein multipass α -helikales Transmembranprotein (Meyer et al., 2003).

Bereits in Abschnitt 5.3.1 wurde die geringe Stabilität von humanem EpICD beschrieben und sein Abbau durch das Proteasom diskutiert (Maetzel et al., 2009). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch murine EpICD-Varianten Proteasom-abhängig degradiert werden. Insgesamt konnten 5 verschiedene Varianten des murinen EpICDs detektiert werden. Insbesondere erwies sich, dass sich diese Varianten beim proteasomalen Abbau unterschiedlich stabil verhalten. Der

deutlichste Stabilitätsunterschied war zwischen der labileren EpICD-Variante ϵ_1 (mit den N-terminalen Aminosäuren VLVISTRK...) und der stabileren EpICD-Variante- ϵ_2 (mit den N-terminalen Aminosäuren VISTRK...) zu erkennen. Da beide EpICD-Varianten mit Valin die gleiche N-terminale Aminosäure haben, lässt sich dieser Stabilitätsunterschied nicht mit der N-End-Rule erklären. Die Stabilität von Proteinen wird unter anderem durch deren N-terminale Aminosäure bestimmt. Diese Stabilitätsabhängigkeit wird als N-End-Rule bezeichnet (Gonda et al., 1989). Proteine bzw. Peptide mit Valin als N-terminale Aminosäure gelten nach den Regeln der N-End-Rule als stabil (Gonda et al., 1989). Die übrigen EpICD-Varianten ϵ_5 (mit den N-terminalen Aminosäuren LVISTRK...) und ϵ_3 (mit den N-terminalen Aminosäuren ISTRK...) wiesen im Vergleich zu ϵ_2 (mit den N-terminalen Aminosäuren VISTRK...) eine deutlich geringere Stabilität und eine höhere Signalsteigerung nach einer Hemmung des Proteasoms durch Lactacystin β -Lacton auf. Die geringe Stabilität dieser EpICD-Varianten ließe sich aufgrund ihrer destabilisierenden N-terminalen Aminosäuren mit Hilfe die N-End-Rule erklären. Jedoch zeigten Substitutionsmutationen dieser N-terminalen Aminosäuren zu Methionin, keine Effekte auf die Stabilität (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen ist ein alternativer Abbaumechanismus über das Proteasom anzunehmen. Zum Beispiel wäre eine Erkennungssequenz für den Abbau im Proteasom innerhalb von EpICD denkbar.

Im Allgemeinen sind Parallelen zwischen der spaltungsabhängigen Signaltransduktion von hEpCAM in humanen Krebszellen und dem Notch-Signalweg vorhanden. In beiden Fällen ist an der Spaltung in der Ektodomäne die Protease TACE/ Adam17 sowie in an der zweiten Spaltung die γ -Sektretase beteiligt. Außerdem werden bei der Signaltransduktion von Notch verschiedene Notch-ICD-Varianten mit unterschiedlichen Stabilitäten gebildet. Dabei wurde in Endosomen präferentiell eine kürzere Notch-ICD-Variante gebildet (Tagami et al., 2008). Gleiches wurde bei APP beschrieben (Fukumori et al., 2006). Aufgrund dieser Publikationen ist anzunehmen, dass die kürzere und damit stabilere EpICD-Variante in Endosomen gebildet wird.

Um die Konservierung der in mEpCAM ermittelten Spaltsequenzen zu bestimmen, wurden zunächst Orthologe von EpCAM in silico identifiziert (vorliegende Arbeit). In Kooperation mit W. Zimmer, Ludwig Maximilians Universität München, wurden 52 verschiedene Orthologe von EpCAM identifiziert und im Alignment miteinander verglichen. Die BACE1-Schnittstelle war im Vergleich zur Metalloprotease-Schnittstelle auffällig konserviert. Dies spricht für eine bedeutende physiologische Funktion der BACE1-Spaltung. Da EpCAM in verschiedenen Organismen, wie Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel, Kloakentiere, Beuteltiere, Ungulaten, Primaten und Nagetiere, identifiziert werden konnte, scheint EpCAM eine wichtige physiologische Funktion zu haben.

6.1.1 EpICD-vermittelte Signaltransduktion in murinen ES- und Teratokarzinom-Zellen

Das intrazelluläre Spaltprodukt von hEpCAM (hEpICD) bildet zusammen mit FHL2, β -Catenin und Lef-1 einen Proteinkomplex und ist an der Regulation von Genen wie Zyklin D1, c-Myc und MMP7 beteiligt (Chaves-Perez et al., 2013; Denzel et al., 2009; Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2004). Des Weiteren ist hEpICD von endogenem hEpCAM in der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FADU, sowie in der Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie HCT8 im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert (Denzel et al., 2009; Maetzel et al., 2009). Die nukleäre Lokalisation von mEpICD konnte in der Teratokarzinom-Zelllinie mF9 mit dem C-terminal-YFP-getaggten EpCAM-CTF nicht bestätigt werden. Hingegen war eine leichte perinukleäre Lokalisation zu erkennen, die einerseits durch neu synthetisiertes mEpCAM-CTF-YFP am endoplasmatischen Retikulum (ER) zu erklären wäre (Ancot et al., 2012), andererseits das Ergebnis einer perinukleären Lokalisation des Spaltproduktes mEpICD sein kann. In humanen Kolonkarzinomzellen HCT8 wurde eine perinukleäre Lokalisation von EpICD bei höheren Zelldichten bereits beschrieben (Denzel et al., 2009). Trotz Behandlung mit Lactacystin β -Lacton war keine unterschiedliche Lokalisation im Vergleich zur YFP-Kontrolle zu erkennen. Dies deutet nicht auf einen aktiven Kerntransport von EpICD wie z.B. über Importine hin. Bei einer aktiven Kerntranslokation wäre eine präferentielle nukleäre Akkumulation des YFP-Signals zu erwarten. Zum Vergleich dazu zeigte Notch-ICD in Fusion mit EGFP eine klare nukleäre Lokalisation im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (Zecchini et al., 2005). Ein Einfluss des YFP-Tags auf die Funktionalität und Lokalisation von EpICD kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. In humanen Krebszellen wurde jedoch keine funktionelle Beeinträchtigung von EpICD durch Fusion mit dem YFP-Protein festgestellt (Chaves-Perez et al., 2013; Maetzel et al., 2009).

Die geringen Effekte des mEpCAM-Knockdown auf das Transkriptom und Proteom sprechen nicht für eine ausgeprägte Funktion von mEpICD als Transkriptionsfaktor. Bei einer Signaltransduktion wie beim hEpCAM in Krebszellen wären hier deutlich stärkere Effekte zu erwarten. Als Ursache hierfür kann eine geringe Spaltungseffizienz von mEpCAM ausgeschlossen werden, da die Überexpression von mEpCAM-CTF, welches nahezu vollständig durch γ -Sekretase gespalten wird, im Vergleich zur Leervektortransfektion nur marginale Effekte im Proteom zeigte (vorliegende Arbeit). Außerdem konnte keine veränderte Proliferation durch Überexpression von mEpCAM-CTF im Vergleich zur Leervektortransfektion bzw. durch Überexpression von EpICD-YFP im Vergleich zu YFP festgestellt werden.

Um Zielgene von mEpCAM in murinen ES-Zellen zu identifizieren, wurde ein Knockdown mit mEpCAM-spezifischer siRNA mit anschließender Microarray-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Zellen verwendet, die eine ca. 90%ige Reduktion von mEpCAM auf der Zelloberfläche zeigten. Möglicherweise sind die restlichen 10% von mEpCAM an der Zelloberfläche für die

Aufrechterhaltung der Genregulation ausreichend. Für die weitere Untersuchung wäre eine erneute Transkriptomanalyse in Zellen mit einem vollständigen Knockout von mEpCAM denkbar. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Trop2 die Funktionen von mEpCAM komplementiert. mTrop2 und mEpCAM weisen eine Homologie von 50% in der Aminosäuresequenz auf. Daher wäre es möglich, dass mTrop2 die Funktion von mEpCAM bei dessen Knockdown übernimmt. Außerdem könnte mEpCAM in murinen ES-Zellen und Teratokarzinom-Zellen eine physiologische Funktion haben, die unabhängig von der Genregulation bzw. Proliferation ist.

Des Weiteren konnten keine Interaktionen zwischen murinem EpICD und murinem FHL2, β -Catenin sowie Lef-1 im Yeast-Two-Hybrid-System detektiert werden (siehe Abschnitt 5.8). Dies legt nahe, dass der für humane Karzinomzellen beschriebene Signalweg von hEpCAM in murinen ES-Zellen nicht oder nicht messbar stattfindet. Ebenfalls ist unklar, ob EpICD als Transkriptionsfaktor in humanen ES-Zellen fungiert. Die beschriebene Chromatinlokalisation von humanem EpICD an Promotoren von Genen wie Myc, Oct-4, Nanog, Sox2 und Klf4 impliziert eine regulierte intramembrane Proteolyse von hEpCAM in humanen ES-Zellen (Lu et al., 2010). Der formale Nachweis dafür fehlt bislang jedoch.

6.1.2 Physiologische Bedeutung der Spaltung von mEpCAM

Die unterschiedlichen Effekte von murinem und humanem EpCAM auf die Proliferation, Genregulation und Protein-Protein-Interaktion lassen auf unterschiedliche Mechanismen der Signaltransduktion schließen. Wie bereits in der Einleitung diskutiert, sind die Signalwege, die bei der Pluripotenz eine entscheidende Rolle spielen, zwischen humanen und murinen ES-Zellen unterschiedlich. Zum Beispiel wäre es möglich, dass nur murines EpICD an zytoplasmatischen Signalwegen beteiligt ist. Außerdem wäre eine Funktion der extrazellulären Spaltprodukte wie EpEX und mEp- β als potentielle Liganden denkbar. Außer einer Funktion bei der Signaltransduktion wurde die Regulierte Intramembran Proteolyse (RIP) als Abbaumechanismus von Membranproteinen diskutiert (Nath et al., 2001). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird das EpCAM-Gen in humanen ES-Zellen vom Polycomb-Protein-Komplex durch Chromatinmodifikationen bei der Differenzierung inaktiviert (Lu et al., 2010). In differenzierten humanen ES-Zellen konnten die inaktivierenden H3K27me3- und H3K9me3-Chromatin-Modifikationen durch Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) an den 5- und 3'-Positionen vom Transkriptionsstart des *EPCAM* Gens nachgewiesen werden (Lu et al., 2010). Bei der Differenzierung von humanen ES-Zellen wurde eine stärkere Reduktion des EpCAM-Proteins im Vergleich zu dessen mRNA festgestellt (Ng et al., 2010). Diese Beobachtung wurde durch eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von EpCAM in humanen ES-Zellen erklärt (Ng et al., 2010). Zudem zeigen nicht publizierte Arbeiten von unserem Labor eine transkriptionelle sowie

posttranskriptionelle Regulation von murinem EpCAM bei der Differenzierung. Der Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation ist bis heute unverstanden. Denkbar ist, dass die Menge an EpCAM bei der Differenzierung im Rahmen der Regulierten Intramembran Proteolyse (RIP) reguliert wird. Dies wäre physiologisch vor allem bei Differenzierungsvorgängen von Bedeutung, bei denen EpCAM relativ schnell herunter reguliert werden muss, um eine korrekte Differenzierung zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass murines EpCAM zusätzlich zur Spaltung auch lysosomal abgebaut wird. Nach der Behandlung der EpCAM-YFP-Transfektanten (mF9) mit dem Inhibitor für den lysosomalen Abbau Bafilomycin konnte eine EpCAM-YFP-Akkumulation in intrazellulären Kompartimenten und eine allgemeine Zunahme der EpCAM-YFP-Expression beobachtet werden. Gleiches konnte mit dem YFP-getaggten EpCAM-CTF bei gleichzeitiger Inaktivierung des γ -Sekretase-Komplexes belegt werden. Hingegen waren bei der Behandlung mit Bafilomycin ohne DAPT keine Effekte zu erkennen. Dies zeigt, dass EpCAM-CTF lysosomal- bzw. γ -Sekretase- und Proteasom-abhängig degradiert werden kann. Außerdem legen diese Daten nahe, dass EpCAM-CTF durch Endozytose aufgenommen wird. Da EpCAM-CTF in murinen Teratokarzinomzellen (mF9) schnell durch den γ -Sekretase-Komplex gespalten wird, ist der lysosomale Abbau von EpCAM-CTF zu vernachlässigen. In anderen Zelllinien könnte dieser jedoch zu einem größeren Anteil am Abbau von EpCAM-CTF beteiligt sein. Das Ausmaß des Abbaus von EpCAM durch Spaltung oder durch Endozytose und Hydrolyse in Lysosomen ist jedoch unklar.

6.2 Modell zur EpCAM-vermittelten Akt-Phosphorylierung

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression von mEpCAM in murinen embryonalen Stammzellen die Akt-Phosphorylierung induziert. Außerdem wurden ERas, Prohibitin1 und Prohibitin2 als Interaktionspartner von mEpCAM identifiziert, die Funktionen bei Signaltransduktionen an der Plasmamembran haben und bei der Phosphorylierung von Akt durch EpCAM beteiligt sein könnten.

ERas ist eine konstitutiv aktive RAS-ähnliche GTPase, die in ES-Zellen und Teratokarzinom-Zellen exprimiert wird und den PI3K/Akt-Signalweg induziert. Die Proteininteraktion zwischen ERas und PI3K führt zu dessen Aktivierung und Induktion der Akt-Phosphorylierung. In murinen ES-Zellen wurden ERas-Knockout-Mutanten erzeugt und anschließend in immunsupprimierte Mäuse transplantiert. Die hierbei entstandenen Teratome waren kleiner als die vom Wildtyp gleichen Ursprungs. Auf diese Weise wurde belegt, dass ERas die Proliferation von Teratomen verstärkt (Takahashi et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass die ERas-vermittelte Phosphorylierung

von Akt zu einer gesteigerten Reprogrammierungseffizienz in murinen Fibroblastenzellen und in humanen mesenchymalen Stammzellen führt. Hierbei nimmt die Phosphorylierung von Foxo1 durch Akt eine zentrale Rolle ein (Yu et al., 2013). Einen weiteren Hinweis auf die physiologische Funktion der ERas-Akt-Signalkaskade bei der Reprogrammierung bzw. bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz lieferte die Erkenntnis, dass Akt Oct4 phosphoryliert und dadurch stabilisiert, eine Kerntranslokation ermöglicht sowie eine verstärkte Interaktion zu Sox2 und Klf4 bewirkt (Lin et al., 2012). Einen direkten Hinweis auf eine Korrelation der Oct4-Phosphorylierung mit dem ERas-Akt-Signalweg gibt es bislang nicht. Dies ist Gegenstand der aktuellen Arbeiten in unserem Labor.

In der vorgelegten Arbeit konnte zudem aufgezeigt werden, dass die Überexpression von EpCAM in murinen ES-Zellen zu einer Induktion der Akt-Phosphorylierung führt. Allerdings ist unklar, ob die EpCAM-ERas-Interaktion hierfür essentiell ist. Außerdem kann ausgeschlossen werden, dass die Interaktion zwischen EpCAM und ERas bei der ERas-Akt-Signaltransduktion zwingend erforderlich ist, da eine Überexpression von ERas in Zellen, die kein endogenes EpCAM exprimieren, ausreicht, um eine Phosphorylierung von Akt zu induzieren (Takahashi et al., 2003). Die EpCAM-ERas-Interaktion könnte jedoch die Funktion haben, die ERas-Akt-Signaltransduktion zu modulieren. Durch die Myristylierung lokalisiert ERas in der Plasmamembran (Yu et al., 2013). Da auch EpCAM in der Plasmamembran zu finden ist, wäre eine Kollokalisierung von ERas und EpCAM zu erwarten. Bis dato gibt es hierüber keine Publikation. Hingegen wird in einer Reihe von Arbeiten über die funktionelle Charakterisierung der Überexpression, des Knockdown sowie des Knockout von ERas und EpCAM berichtet. Im Allgemeinen sprechen vergleichbare Phänotypen in Überexpressions- bzw. Knockdown-Experimenten von EpCAM und ERas für eine bedeutende physiologische Funktion dieser Protein-Interaktion. So führt die Überexpression von ERas und EpCAM neben der Phosphorylierung von Akt und der verstärkten Tumorbildung zu einer gesteigerten Effizienz der Reprogrammierung (Huang et al., 2011; Maetzel et al., 2009; Takahashi et al., 2003; Yu et al., 2013). Der Knockout von ERas und EpCAM war in Embryonen nicht letal, sodass beide Proteine keine essentielle Funktion der Aufrechterhaltung der Pluripotenz haben können. ERas-Knockout-Mäuse entwickelten sich normal und waren fortpflanzungsfähig, während EpCAM-Knockout-Mäuse postnatal aufgrund von Defekten des intestinalen Gewebes starben (Lei et al., 2012; Takahashi et al., 2003).

Klassisch werden Ras-Proteine durch den Austausch zwischen GDP und GTP im Rahmen der EGF-Rezeptor-Signaltransduktion aktiviert. Die Bindung von EGF an dessen Rezeptor führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Domäne und Rekrutierung von Grb2 und SOS. Das Protein SOS katalysiert den Austausch zwischen GDP und GTP in Ras-Proteinen und aktiviert diese. In der Regel aktivieren Ras-Proteine in der GTP-gebundenen Form Raf und führen auf die Weise zu einer

Signalweiterleitung des MAPK-ERK-Signalweges. In dieser klassischen Signaltransduktion von Ras-Proteinen kommt es also zu keinen direkten Interaktionen von Ras mit Membranproteinen. Vor diesem Hintergrund ist eine direkte Interaktion zwischen ERas und EpCAM unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu Ras-Proteinen ist ERas jedoch nicht an der Aktivierung des MAPK-ERK-Signalweges beteiligt (Takahashi et al., 2003). Außerdem weist ERas eine eingeschränkte GTPase-Aktivität auf und liegt deshalb überwiegend in der aktiven GTP-gebundenen Form vor (Takahashi et al., 2003). Im Allgemeinen sind bei einer Vielzahl von Signalwegen an der Plasmamembran mehrere Proteine in der Signalweiterleitung involviert. Deshalb ist davon auszugehen, dass bei der Induktion der Phosphorylierung von Akt durch EpCAM auch mehrere Proteine beteiligt sind. Im SILAC-basierten Interaktionsscreen von EpCAM wurden in der vorliegenden Arbeit neben ERas auch Prohibitin1 und Prohibitin2 als Interaktionspartner identifiziert.

Prohibitin1 und Prohibitin2 wurden im Zusammenhang mit der Signaltransduktion an der Plasmamembran beschrieben. Beide Proteine wurden als Interaktionspartner des IgM-Rezeptors in B-Lymphozyten identifiziert sowie in Zusammenhang mit der Proliferation und der Zelladhäsion von Krebszellen gebracht (Sievers et al., 2010; Terashima et al., 1994). Neben physiologischen Funktionen an der Zellmembran wurden nukleäre sowie mitochondriale Funktionen von Prohibitin1 und Prohibitin2 genannt. Prohibitin2 wurde als Korepressor des Estrogenrezeptors durch Rekrutierung von Histondeacetylasen identifiziert (Kurtev et al., 2004). Außerdem bindet Prohibitin2 als Korepressor an MyoD und MEF2 (Heron-Milhavet et al., 2008). Diese sind Transkriptionsfaktoren, die bei der Muskeldifferenzierung eine übergeordnete Rolle spielen. Durch Bindung von Akt an Prohibitin2 wird dieser reprimierende Effekt auf die Muskeldifferenzierung abgeschwächt (Heron-Milhavet et al., 2008). Die Interaktion zwischen Akt und Prohibitin2 liefert einen ersten Hinweis, dass auch Prohibitin2 an der Induktion der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM beteiligt sein könnte. Prohibitin1 interagiert mit aktiviertem Ras und ist essentiell für die C-Raf-Aktivierung sowie die Induktion des Raf–MEK–ERK-Signalwegs (Rajalingam et al., 2005). Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben (Abschnitt 5.9.3), wäre aufgrund der bekannten Interaktion zwischen Prohibitin1 und Ras auch eine Interaktion zwischen Prohibitin1 und ERas möglich. ERas weist eine Identität in der Aminosäuresequenz mit HRas, KRas und NRas von 43%, 46% und 47% auf (Takahashi et al., 2003). Möglicherweise ist der Proteinkomplex bestehend aus EpCAM, ERas, Prohibitin1 und Prohibitin2 an der Induktion der Akt-Phosphorylierung beteiligt. Ein mögliches Modell zur Induktion der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM wird im folgenden Abschnitt diskutiert. Das dort vorgestellte Modell stützt sich lediglich auf Anhaltspunkte und ist daher als eine Möglichkeit zu betrachten, wie EpCAM die Akt-Phosphorylierung induziert.

Die Interaktion von EpCAM, Prohibitin1 und Prohibitin2 mit ERAs könnte zu einer Konformationsänderung von ERAs führen, wodurch die Bindungsaffinität von der Phosphoinositid-3-Kinase erhöht wird und diese deshalb effektiver zur Plasmamembran rekrutiert wird. Die Phosphoinositid-3-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP₃). PIP₃ dient als Bindungsstelle für Phosphoinositide dependent kinase-1 (PDK1) sowie Akt und ermöglicht die Phosphorylierung von Akt durch die Kinase mTOR und PDK1 (siehe Abbildung 35). Akt bindet über die Pleckstrin Homology Domain (PH) an PIP₃. Die Phosphorylierung durch PDK1 erfolgt an Threonin308 und die Phosphorylierung von mTOR an Serin473. Akt wird hierdurch aktiviert und katalysiert die Phosphorylierung von Proteinen, wie z.B. von Oct4 und Foxo1. Oct4 wird durch die Phosphorylierung stabilisiert, während Foxo1 durch die Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markiert wird (siehe Abbildung 35).

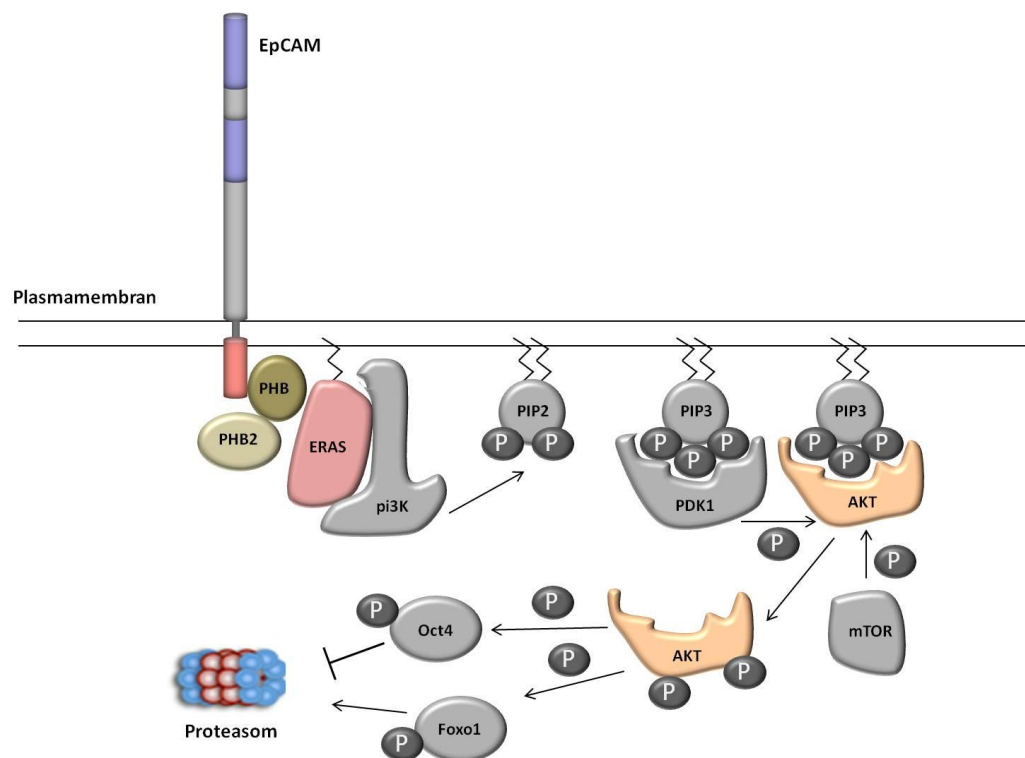


Abbildung 35: Modell zur Aktivierung der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM.

EpCAM interagiert mit Prohibitin1, Prohibitin2 und ERAs. ERAs rekrutiert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), wodurch Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert wird. Die Bindung von Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) und Akt an PIP₃, führt zur Phosphorylierung von Akt durch mTOR und PDK1. Die Phosphorylierung von Akt führt zur Aktivierung der Akt-Kinaseaktivität. Akt phosphoryliert unter anderem Oct4 und Foxo1. Die Phosphorylierung von Oct4 hat dessen Stabilisierung und nukleäre Lokalisation zur Folge und verstärkt die Interaktion mit Klf4 und Sox2. Hingegen führt die Phosphorylierung von Foxo1 zu dessen zytoplasmatischer Lokalisation sowie dessen Abbau und trägt dadurch zur erhöhten iPS-Effizienz bei.

Das vorgeschlagene Modell zur Aktivierung der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM konnte in der vorliegenden Arbeit durch erste experimentelle Daten untermauert werden. Hierbei wurde

deutlich, dass EpCAM mit ERas, Prohibitin1 und Prohibitin2 interagiert und die Überexpression von EpCAM zur verstärkten Phosphorylierung von Akt führt. In künftigen weiteren Arbeiten soll untersucht werden, ob diese Interaktionen für die Induktion der Akt-Phosphorylierung wichtig sind. Außerdem ist zur Zeit noch unklar, ob die EpCAM induzierte Phosphorylierung von Akt über die PI3K vermittelt wird und daher Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3)-abhängig ist. Im Allgemeinen kann Akt durch eine Vielzahl von alternativen Kinasen auch unabhängig von Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3) phosphoryliert und aktiviert werden. In einem siRNA-basierten Screen für die Serin(473)-Phosphorylierung von Akt konnten in der Brustkrebszelllinie MDA-MB468 über 90 Kinasen identifiziert werden (Chua, Gallego-Ortega et al. 2009). Die PI3K-Abhängigkeit der EpCAM-induzierten Akt-Phosphorylierung wird in aktuellen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Ein detailliertes Verständnis vom Mechanismus der Induktion der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM ist aufgrund der übergeordneten Stellung des Akt-Signalweges bei der Karzinogenese von großem Interesse.

Alternativ könnte die Interaktion zwischen EpCAM und Prohibitin1 eine Funktion bei der Zelladhäsion haben. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, führt die Überexpression von EpCAM zu einer reduzierten E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion (Litvinov, Balzar et al. 1997). Der Knockdown von Prohibitin1 mittels siRNA führt zu einer verstärkten Zelladhäsion von E-Cadherin (Rajalingam, Wunder et al. 2005). Deshalb wäre es denkbar, dass der Interaktion von EpCAM und Prohibitin1 bei der modulierenden Wirkung von EpCAM auf die Zelladhäsion eine bedeutende Rolle zukommt.

6.2.1 Bedeutung der PI3K-Akt Signalkaskade bei der Karzinogenese

Aberrante Akt-Aktivierung führt zur Verstärkung von Signalwegen, die beim Zellüberleben, bei der Proliferation, der Angiogenese und der Metastasierung von Tumorzellen involviert sind. Außerdem werden Resistenzen gegenüber Krebstherapien häufig mit einer abnormalen Aktivierung des Akt-Signalweges in Zusammenhang gebracht (Calvo, Bolos et al. 2009). Deregulationen der PI3K-Akt-Signalkaskade werden mit einer schlechten Prognose bei einer Vielzahl von Tumor-Typen, wie Pankreas-, Magen-, Brust-, Zungen-, Gliom- und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo-, Radio- und Antikörper-basierten Therapien in Verbindung gebracht. Aktivierende Mutationen der PI3K führen zu einer aberranten Verstärkung dieser Signalkaskade und sind daher bei der Entstehung von Krebs involviert (Samuels, Diaz et al. 2005). PTEN und SHIP sind Phosphatasen, die eine Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 katalysieren und daher reprimierend auf die PI3K-Akt-Signaltransduktion wirken. PTEN ist eines der am häufigsten mutierten oder deletierten Gene in humanen Krebsarten (Engelman, Luo et al. 2006). Ein weiterer Repressor dieses Signalweges ist

CTMP. Dieses bindet an Akt, erschwert dadurch die Phosphorylierung an Serin473 und Threonin308 und verhindert somit die Aktivierung von Akt. Die Hypermethylierung des Promoters von CTMP wurde in Glioblastomen identifiziert und führt zum vollständigen Verlust der Transkription dieses Gens (Knobbe, Reifenberger et al. 2004). Dem PI3K-Akt-Signalweg wird somit eine bedeutende Funktion bei der Karzinogenese zugeordnet.

In der bisherigen Diskussion wurden beispielhaft die Proteine Foxo1 und Oct4 als mögliche Downstream Targets der Akt-Signaltransduktion diskutiert. In der Literatur sind eine Vielzahl von Akt-Substraten beschrieben, die Funktionen bei dem Zellüberleben, dem Zellzyklus, der Angiogenese und der Metastasierung aufweisen. Welche Downstream-Effekte der durch EpCAM induzierten Akt-Phosphorylierung in embryonalen Stammzellen auftreten, ist Gegenstand weiterer aktueller Arbeiten in unserer Gruppe.

6.3 Transport von EpCAM in Membranvesikeln

Im SILAC-basierten Interaktionsscreen für EpCAM waren solche Proteine, die beim Membrantransport eine Rolle spielen, deutlich überrepräsentiert (siehe Abbildung 29). Hierbei wurden Interaktionspartner von EpCAM identifiziert, die bei der Endozytose und dem intrazellulären Membranvesikeltransport involviert sind.

Ein detailliertes Verständnis von der Endozytose sowie von dem intrazellulären Membranvesikeltransport von EpCAM ist aus zwei Gründen von Belang.

Erstens wurde in humanen embryonalen Stammzellen im Laufe der Differenzierung eine stärkere Reduktion des EpCAM-Proteins im Vergleich zu dessen Transkript festgestellt. Deshalb wurde neben der Inaktivierung des EpCAM-Gens zusätzlich ein posttranskriptioneller Mechanismus für das Herunterregulieren des EpCAM-Proteins bei der Differenzierung vermutet (Ng, Ang et al. 2010). Die Endozytose, gefolgt vom Abbau in Lysosomen, stellt eine solche Möglichkeit dar. Aktuelle Arbeiten in unserem Labor zeigen, dass eine verminderte Expression von EpCAM für Differenzierungsvorgänge wichtig ist.

Zweitens werden Signaltransduktionswege von Rezeptoren häufig durch Endozytose reguliert. Früher wurden die Endozytose von Rezeptoren sowie deren Signaltransduktion als getrennte Prozesse betrachtet. Ein verbessertes Verständnis dieser Prozesse zeigte jedoch, dass die Signaltransduktion von Rezeptoren sowohl positiv wie auch negativ durch Endozytose beeinflusst werden (Sorkin and von Zastrow 2009). Häufig werden aktivierte Rezeptoren durch Endozytose, gefolgt von lysosomalem Abbau, degradiert und damit inaktiviert. Durch Endozytose wird die Anzahl an Rezeptoren in der Plasmamembran reguliert (Sorkin and von Zastrow 2009). Die

Endozytose von EpCAM könnte bei der Termination der Signaltransduktion involviert sein. Z.B. wäre es denkbar, dass die EpCAM-induzierte Akt-Phosphorylierung durch Endozytose, gefolgt vom Abbau von EpCAM in Lysosomen, beendet wird. Ein vergleichbarer Vorgang wurde für die Signaltermination der Liganden-aktivierten EGF- und ErbB-1-Rezeptoren durch Endozytose und den lysosomalen Abbau beschrieben (Levkowitz, Waterman et al. 1998). Hingegen stellt die Endozytose von manchen Rezeptoren eine Voraussetzung für die Aktivierung mancher Signaltransduktionswege dar (Sorkin and von Zastrow 2009). Durch die Endozytose werden Signalkomponenten voneinander getrennt, um unerwünschte Interaktionen bei Signalwegen zu verhindern (Taelman, Dobrowolski et al. 2010). Außerdem werden manche Komponenten der Signaltransduktion in Endosomen durch Endosomen-assoziierte Adaptoren und Scaffold-Proteine zusammengeführt (Shilo and Schejter 2011). Ein Beispiel hierfür stellt das Endosomen-spezifische Scaffold-Protein SARA dar. SARA bringt den TGF-Rezeptor mit dessen Zielmolekülen SMAD2 und SMAD3 sterisch in Kontakt (Panopoulou, Gillooly et al. 2002). Die Endozytose von EpCAM könnte neben der Inaktivierung eine Signaltransduktion erst ermöglichen bzw. verstärken. Prinzipiell wäre es vorstellbar, dass die EpCAM-induzierte Phosphorylierung von Akt durch Endozytose positiv reguliert wird. Im Allgemeinen sind detaillierte Kenntnisse über die Endozytose von EpCAM und vom intrazellulären Transport innerhalb von Membranvesikeln für ein fundiertes Verständnis von der Signaltransduktion von EpCAM wichtig.

6.3.1 Endozytose von EpCAM

In dieser Arbeit wurden potenzielle Interaktionspartner von EpCAM identifiziert, die bei der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt sind. Unter anderem konnten AP2A1 und AP2B1 als potenzielle Interaktionspartner von EpCAM identifiziert werden. AP2A1 und AP2B1 sind Komponenten des Adapterprotein-Komplexes AP-2 (Traub 2005). Der Adapter-Proteinkomplex stellt eine Interaktion zwischen Clathrinen und dem Zielmolekül der Endozytose her und ist daher bei der Selektivität der Endozytose maßgeblich involviert. Clathrine tragen durch ihre käfigförmige Struktur um den durch Endozytose aufzunehmenden Membranbereich zur Krümmung der Membran bei. Clathrin ist ein Hexamer, das aus 3 leichten und 3 schweren Ketten besteht. Im Interaktionsscreen wurden die Clathrine CLTA und CLTC als mögliche Interaktionspartner von EpCAM identifiziert. Weitere Anhaltspunkte für eine Clathrin-abhängige Endozytose lieferten die Interaktionen mit Dab2 und Lrp2. Dab2 interagiert zum einen mit dem Zielmolekül und zum anderen mit Phosphatidylinositol und weiteren Komponenten der Clathrin-abhängigen Endozytose (Mishra, Keyel et al. 2002). Daher trägt Dab2 als Adapter zur Selektivität der Endozytose bei. Außerdem binden Dab2 und Lrp2 an AP-2 und interagieren miteinander (Morris and Cooper 2001). Gewöhnlich werden Rezeptoren und Membranproteine über ein FXN-PXY-

Motiv durch Dab2 für die Endozytose markiert (Mishra, Keyel et al. 2002). In der cytoplasmatischen Domäne von murinem und humanem EpCAM fehlt dieses Motiv, obwohl seine Existenz postuliert wurde (Balzar, Winter et al. 1999). Aus diesem Grund erscheint eine klassische Dab2-abhängige Endozytose von EpCAM unwahrscheinlich.

Außerdem konnten Flotillin1 und Flotillin2 als potenzielle Interaktionspartner von EpCAM identifiziert werden. Zuerst wurden Flotilline in Zusammenhang mit der Endozytose von CD59, einem GPI-Anker assoziierten Membranprotein, sowie von CTxB, dem Rezeptor von Cholera-Toxin, beschrieben (Glebov, Bright et al. 2006). Der Mechanismus der Flotillin-abhängigen Endozytose ist unabhängig von Clathrin und Caveolin (Glebov, Bright et al. 2006). Außerdem wurde über eine Abhängigkeit von Flotillin bei der Endozytose von APP berichtet (Schneider, Rajendran et al. 2008). Zwischen EpCAM und APP bestehen Gemeinsamkeiten. Vor allem werden beide Membranproteine im Rahmen der Regulierten Transmembran Proteolyse (RIP) durch BACE1, Metalloproteasen und dem γ -Sekretase-Komplex gespalten. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten ist es daher möglich, dass beide Membranproteine ähnliche oder sogar gleiche Mechanismen der Endozytose haben. Die Flotillin-abhängige Endozytose wird durch die FYN-Kinase reguliert (Riento, Frick et al. 2009). Bis dato sind der EGF-Rezeptor (Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor) und CD59 als Substrate für die FYN-Kinase-abhängige Endozytose durch Flotillin charakterisiert (Riento, Frick et al. 2009). Da Mutationen der Phosphorylierungsstellen von Flotillin mit der Lokalisation innerhalb von Endosomen interferieren, könnte die Flotillin-abhängige Endozytose auch bei weiteren Membranproteinen durch die FYN-Kinase reguliert werden (Riento, Frick et al. 2009). Daher ist eine über die FYN-Kinase regulierte Endozytose von EpCAM denkbar.

Die verschiedenen Mechanismen der Endozytose werden mit unterschiedlichen Funktionen in Verbindung gebracht. Zum Beispiel führt die Clathrin-abhängige Endozytose des TGF-Rezeptors zu einer aktiven Signaltransduktion, während die Clathrin-unabhängige Endozytose über Lipid Rafts und Caveolin dessen Inaktivierung bewirkt (Di Guglielmo, Le Roy et al. 2003). Im SILAC-basierten Interaktionsscreen wurden potentielle Interaktionspartner von EpCAM identifiziert, die auf eine Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Endozytose von EpCAM hindeuten. Daher ist es möglich, dass verschiedenen Mechanismen der Endozytose von EpCAM aktivierend bzw. deaktivierend auf die Signaltransduktion von EpCAM wirken. Inwiefern internalisiertes EpCAM von Endosomen an der Signaltransduktion beteiligt ist bzw. in Lysosomen abgebaut wird, könnte zudem über den intrazellulären Transport von EpCAM reguliert werden.

6.3.2 Intrazellulärer Transport von EpCAM innerhalb von Membranvesikeln

Durch Endozytose aufgenommene Membranvesikel werden als frühe Endosomen bezeichnet. Die frühen Endosomen reifen zu späten Endosomen und verschmelzen mit Lysosomen. Beim Übergang von frühen zu späten Endosomen findet eine zunehmende Ansäuerung durch membranständige Protonenpumpen (V-ATPasen) statt. Außerdem fusionieren mehrere frühe Endosomen zu größeren Membranvesikeln. Durch Membranabschnürungen von kleineren Vesikeln in das Endosomeninnere entstehen Membrankompartimente, die mehrere kleinere Vesikel einschließen. Diese Membrankompartimente werden als späte Endosomen oder alternativ als Multivesicular Bodies (MVBs) bezeichnet. Die späten Endosomen verschmelzen mit Lysosomen, in denen die Hydrolyse von Membranproteinen stattfindet. Alternativ zu diesem Abbaumechanismus in Lysosomen können frühe Endosomen wieder mit der Plasmamembran fusionieren. Diese Vorgänge bei Membranvesikeln werden als Recycling Endosomen bezeichnet.

Wie in Abschnitt 6.3 „Transport von EpCAM in Membranvesikeln“ beschrieben, stehen die Regulationen von Signaltransduktionswegen von Rezeptoren häufig mit deren intrazellulärem Transport in enger Verbindung. Die Kenntnis von intrazellulären Transportvorgängen von EpCAM ist damit Voraussetzung für ein umfassendes Verständnis der Signalwege von EpCAM.

Bei der Regulation von intrazellulären Transportvorgängen haben Rab-Proteine eine bedeutende Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden im SILAC-basierten Interaktionsscreen von EpCAM folgende Interaktionspartner von EpCAM identifiziert: Rab1b, Rab2a, Rab5a, Rab5c, Rab6, Rab7, Rab8a, Rab9, Rab10, Rab11b, Rab14 und Rab18.

Rab-Proteine fungieren als molekulare Schalter bei der Regulation von intrazellulären Transportvorgängen und sind an der Regulation der Bildung, des Transports sowie der Fusion von Membranvesikeln beteiligt. Alle Rab-Proteine sind GTPasen. Die Cystinseitenketten der CAAX-Motive sind in der Regel mit Geranylgeranyl-Resten als Membrananker kovalent gebunden (Alexandrov, Horiuchi et al. 1994). Das CAAX-Motiv besteht aus Cystein (C) gefolgt von zwei aliphatischen Aminosäuren (A) und einer variablen Aminosäure (X). Rab-Proteine werden durch GEFs (guanine nucleotide exchange factor), die den Austausch von GDP und GTP katalysieren, aktiviert. Nur die GTP-gebundenen Rab-Proteine sind aktiv und interagieren mit Effektoren, wodurch Prozesse des intrazellulären Transports initiiert werden. Aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität von Rab-Proteinen sind diese nur für eine relativ kurze Zeit aktiv.

Alle potentiellen Interaktionspartner von EpCAM, die Funktionen im intrazellulären Membrantransport aufweisen, sind in Tabelle 4 dargestellt. In der vorliegenden Arbeit konnten im SILAC-basierten Interaktionsscreen Proteine identifiziert werden, die bei der Endozytose, dem

Übergang von frühen zu späten Endosomen, von frühen Endosomen zu Recycling-Endosomen bzw. von späten Endosomen zu Lysosomen beteiligt sind. Außerdem wurden Proteine identifiziert, die beim Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum bzw. zwischen dem Golgi-Apparat und der Zellmembran involviert sind (siehe Abbildung 36).

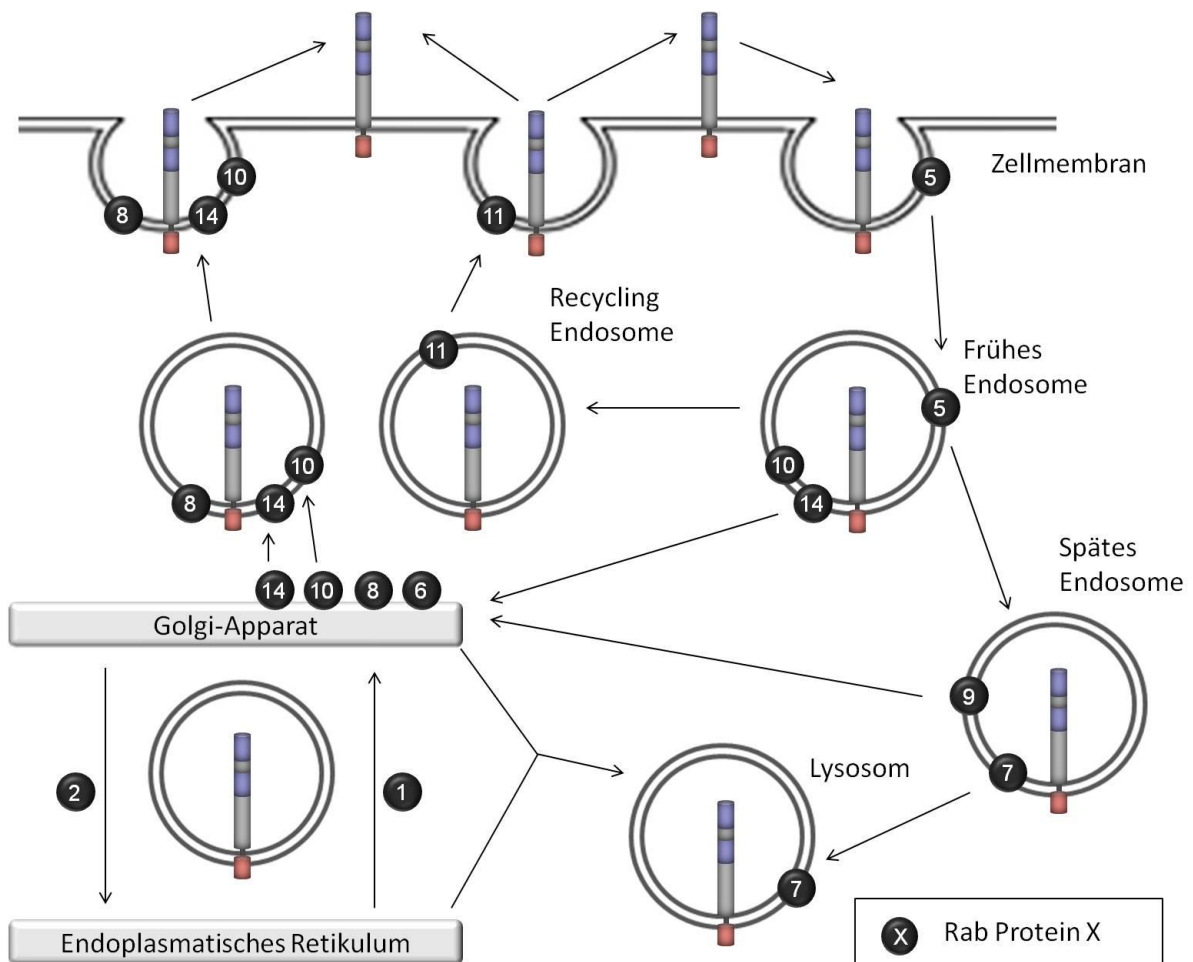


Abbildung 36: Intrazelluläre Lokalisation der Rab-Proteine die mit EpCAM interagieren.

Im SILAC-Interaktionsscreen wurden Proteine identifiziert, die Funktionen bei der Endozytose, dem Übergang zwischen von frühen zu späten Endosomen, von frühen Endosomen zu Recycling-Endosomen bzw. von späten Endosomen zu Lysosomen haben. Außerdem wurden Proteine identifiziert, die beim Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum bzw. zwischen dem Golgi-Apparat und der Zellmembran involviert sind.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lichtenthaler, (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, München) konnte gezeigt werden, dass murines EpCAM durch die Protease BACE1 proteolytisch gespalten wird. BACE1 hat ein pH-Optimum bei 4,5 (Grbovic, Mathews et al. 2003; Shimizu, Tosaki et al. 2008) und ist in Endosomen aktiv. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit das Spaltprodukt von EpCAM durch BACE1 im Zellüberstand massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Dies bedeutet auch, dass Endosomen, in denen die BACE1-Spaltung stattgefunden hat, wieder mit der Plasmamembran verschmelzen. Hierbei

könnte es sich um Recycling-Endosomen bzw. um Endosomen vom Trans-Golgi-Network (TGN) handeln. Zudem konnte mit der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass EpCAM in Lysosomen abgebaut wird. Die Rab-Proteine als potentielle Interaktionspartner von EpCAM geben einen ersten Hinweis auf den intrazellulären Transport von EpCAM in Membranvesikeln.

7 Ausblick

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellt die zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Regulierten Intermembran Proteolyse (RIP) von EpCAM in murinen Teratokarzinomzellen und embryonalen Stammzellen dar. In dieser Arbeit wurden die exakten Spaltstellen von murinem EpCAM massenspektrometrisch bestimmt und den beteiligten Proteasen zugeordnet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das intrazelluläre Spaltprodukt sehr instabil ist und durch das Proteasom abgebaut wird. Die Spaltung von EpCAM führt zu dessen Abbau und somit zur Regulation des Proteins. Andere Funktionen sind bislang unbekannt. Aufgrund der Hinweise in der Literatur und der Erkenntnisse aus der spaltungsabhängigen Signaltransduktion von EpCAM in humanen Krebszellen (siehe Einleitung), fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf das intrazelluläre Spaltprodukt EpICD als Transkriptionsfaktor. Für weitere zukünftige Arbeiten wäre es von Interesse, cytoplasmatische Funktionen von EpICD zu untersuchen. Zum Beispiel wurde die Induktion der Akt-Phosphorylierung bis jetzt nur in Abhängigkeit von der Überexpression von EpCAM betrachtet. Es wäre jedoch auch aufschlussreich zu überprüfen, ob die Überexpression von EpICD bereits ausreichend ist, um die Phosphorylierung von Akt zu induzieren. Die Funktionen weiterer Spaltprodukte von EpCAM, wie z.B. das extrazelluläre Spaltprodukt EpEX oder das A β -ähnlichen Spaltprodukt mEp- β , wurden bislang noch nicht ausführlich untersucht. Prinzipiell wäre es denkbar, dass das extrazelluläre Spaltprodukt EpEX als Ligand Signaltransduktionswege initiiert. Experimentell ließe sich diese Hypothese durch Zugabe von rekombinantem EpEX in Zellkulturüberstände überprüfen. Hierbei wäre es zum Beispiel interessant, die Proliferation mit und ohne EpEX-Behandlung zu betrachten. Vergleichbare Experimente wären zudem mit dem A β -ähnlichen Spaltprodukt von EpCAM (mEp- \hat{a}) denkbar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EpCAM die Akt-Phosphorylierung induziert. Der zugrunde liegende Mechanismus des EpCAM-Akt-Signalweges ist bislang unklar. Basierend auf der Interaktion von EpCAM mit Prohibitin-1, Prohibitin-2 und ERas wurde eine erste Modellvorstellung entwickelt. Es ist jedoch unbekannt, ob diese Interaktionspartner in die durch EpCAM induzierte Akt-Phosphorylierung involviert sind. Deshalb wäre es wichtig zu wissen, ob die EpCAM-abhängige Induktion der Akt-Phosphorylierung durch den Knockdown von ERas, Prohibitin-1 und Prohibitin-2 gehemmt wird. Außerdem wäre es reizvoll zu überprüfen, ob die EpCAM-Akt-Signaltransduktion abhängig von der Phosphoinositid-3-Kinase ist. Ein möglicher Versuchsansatz wäre hier, den Einfluss von Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitoren auf die EpCAM-vermittelte Akt-Phosphorylierung zu verifizieren. Zudem wäre es sinnvoll, die Downstream-Moleküle/Effekte des EpCAM-Akt-Signalweges in ES-Zellen zu

untersuchen. Aufgrund der übergeordneten Funktion von Oct-4 im pluripotenten Zustand ist dessen Phosphorylierung durch Akt Gegenstand der aktuellen Forschungsarbeiten in unserem Labor.

In dieser Arbeit konnte eine Reihe von Hinweisen für eine Clathrin-abhängige sowie Clathrin-unabhängige Endozytose gesammelt werden. Bei weiterführenden Untersuchungen wäre es von Belang zunächst zu überprüfen, ob EpCAM endozytiert wird. Daran anschließend könnte man untersuchen, ob die Endozytose Clathrin-abhängig oder Clathrin-unabhängig verläuft. Des Weiteren könnte die physiologische Relevanz dieser beiden Möglichkeiten untersucht werden. Hierbei wäre es möglich, den Effekt der Endozytose-Hemmungen auf die EpCAM-vermittelte Phosphorylierung von Akt zu untersuchen. Da eine Flotillin-abhängige Endozytose durch die Fyn-Kinase reguliert wird, wäre es zudem denkbar, deren Einfluss auf die Endozytose von EpCAM zu analysieren.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass murines EpCAM in ES-Zellen und Teratokarzinom-Zellen durch regulierte intramembrane Proteolyse gespalten wird. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lichtenthaler (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, München), konnte - neben einer Metalloprotease - die Protease BACE1, die EpCAM in der extrazellulären Domäne spaltet, identifiziert werden. Zudem ist es gelungen, die Abhängigkeit der intramembranen Spaltungen von murinem EpCAM von der γ -Sekretase nachzuweisen. Die Spaltstellen der identifizierten Proteasen von EpCAM wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals massenspektrometrisch auf eine Aminosäure genau bestimmt. Außerdem konnte die Freisetzung des A β -ähnlichen Fragments von EpCAM (mEp- β) von der Membran gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden insgesamt 2 extrazelluläre Spaltprodukte (EpEX), 4 A β -ähnliche Fragmente (mEp- β) und 5 verschiedene intrazelluläre Spaltprodukte von EpCAM (EpICDs) nachgewiesen. Es konnte zudem belegt werden, dass diese 5 intrazellulären Spaltprodukte Proteasom-abhängig abgebaut werden und in Abhängigkeit von der Spaltstelle unterschiedliche Stabilitäten aufweisen.

Der siRNA-induzierte Knockdown von mEpCAM mit spezifischer siRNA führte zu marginalen Effekten im Transkriptom und Proteom von ES-Zellen. Auch die Überexpression von EpCAM-CTF, welches nahezu vollständig gespalten wird, führte nur zu marginalen Effekten im Proteom und zu keinen Effekten in der Proliferation von murinen Teratokarzinomzellen. Diese Daten deuten nicht auf eine Funktion von EpICD als Transkriptionsfaktor in murinen ES-Zellen und Teratokarzinomzellen hin. Außerdem konnte in dieser Arbeit keine nukleäre Lokalisation von EpICD nachgewiesen werden. Da sowohl im Yeast-Two-Hybrid-System als auch im SILAC-basierten Interaktionsscreen keine Interaktion von murinem EpICD mit FHL2 bzw. β -Catenin oder Lef-1 auftrat, ist von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen von EpCAM in murinen ES-Zellen und Teratokarzinomzellen im Vergleich zu humanen Krebszellen auszugehen.

Im SILAC-basierten Screen wurden Interaktionspartner von EpCAM identifiziert, die mit der Signaltransduktion von Akt, der Endozytose sowie dem intrazellulären Transport innerhalb von Membranvesikeln in Zusammenhang gebracht werden. Die Interaktion von EpCAM mit Prohibitin-1, Prohibitin2 und ERas konnte in Ko-Immunopräzipitationen verifiziert werden. In murinen ES-Zellen wurde zudem erstmalig gezeigt, dass die Überexpression von EpCAM die Akt-Phosphorylierung induziert. Diese Ergebnisse weisen erstmals auf eine Verbindung von EpCAM und dem Akt-Signalweg hin. Infolge der übergeordneten Stellung des PI3K-Akt-Signalweges bei der Karzinogenese stellt die induzierte Phosphorylierung von Akt durch EpCAM eine aufschlussreiche Erkenntnis auch für zukünftige Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe dar.

9 Summary

In this work it was demonstrated for the first time that murine EpCAM in murine embryonic stem cells and teratocarcinoma cells is cleaved by Regulated Intermembrane Proteolysis (RIP). A metalloprotease, which is involved in the shedding of the ectodomain of mEpCAM was identified. Furthermore, in cooperation with the group of Prof. Lichtenthaler (German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich), BACE1 was shown to cleave EpCAM in the extracellular domain. The resulting C-terminal fragments (CTF) become further processed by the γ -secretase complex. For the first time, the exact cleavage sites of all these fragments were mapped at the amino acid level by using mass spectrometry. In addition, the existence of soluble A β -like fragments mEp- β was detected by mass spectrometry for the first time. In total, 2 extracellular cleavage products (mEpEX), 4 A β -like fragments of EpCAM (mEp- β) and 5 different intracellular cleavage products of EpCAM (EpICDs) were identified for the case of murine EpCAM in this work. Furthermore, the 5 intracellular cleavage products of murine EpCAM (EpICD variants) showed different stabilities towards proteasomal degradation.

The siRNA-mediated knockdown of murine EpCAM displayed only marginal effects on the transcriptom and proteome of murine embryonic stem cells. Moreover, the overexpression of EpCAM-CTF, which is almost completely cleaved, had just marginal effects on the proteome and no effects on proliferation in the murine teratocarcinoma cell line mF9. These data indicate that cleaved EpICD has no measurable activity as a transcription factor in murine embryonic stem cells and teratocarcinoma cells. Furthermore, no nuclear localization of murine EpICD could be detected in this cell lines. In addition, no interaction between murine EpICD with FHL2, β -Catenin or Lef1 could be detected in the yeast two hybrid system and the SILAC-based interaction screen. Taken together, these data indicate that the signal transduction pathway of EpCAM as described in human cancer cells does not occur in murine stem cells and teratocarcinoma cells to a substantial and measurable level.

In a SILAC-based interaction screen of murine EpCAM in teratocarcinoma cells several potential interaction partners were identified, that are associated with Akt signalling, endocytosis and intracellular transport. The interaction between murine EpCAM and Prohibitin-1, Prohibitin-2 and ERas were verified with co-Immunoprecipitation experiments. Furthermore, it was shown for the first time that the overexpression of EpCAM induces the phosphorylation of Akt. These data suggest a connection between EpCAM and the signal transduction of Akt. In cancerogenesis the PI3K-Akt signal transduction pathway is often deregulated. Thus, a connection between EpCAM and Akt signalling represents a novel and highly interesting topic for future work in our research group.

10 Literaturverzeichnis

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.

Al-Mayouf, S.M., Alswaied, N., Alkuraya, F.S., Almehaidib, A., and Faqih, M. (2009). Tufting enteropathy and chronic arthritis: a newly recognized association with a novel EpCAM gene mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* *49*, 642-644.

Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C., and Zerial, M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J* *13*, 5262-5273.

Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* *75*, 430-445.

Altomare, D.A., and Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* *24*, 7455-7464.

Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lefebvre, J., Vicogne, J., Lemiere, A., Kherrouche, Z., Foveau, B., Pourtier, A., Melnyk, O., *et al.* (2012). Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway. *Traffic* *13*, 1261-1272.

Armstrong, A., and Eck, S.L. (2003). EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* *2*, 320-326.

Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., *et al.* (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet* *15*, 1894-1913.

Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* *96*, 417-423.

Balzar, M., Prins, F.A., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., and Litvinov, S.V. (1999a). The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* *246*, 108-121.

Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., and Litvinov, S.V. (1999b). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* *77*, 699-712.

- Bechtel, W., Helmstadter, M., Balica, J., Hartleben, B., Schell, C., and Huber, T.B. (2013). The class III phosphatidylinositol 3-kinase PIK3C3/VPS34 regulates endocytosis and autophagosome-autolysosome formation in podocytes. *Autophagy* 9.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Bergsagel, P.L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C.R., Trepel, J., and Kuehl, W.M. (1992). A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol* 148, 590-596.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* 100, 133-158.
- Boivin, D., Labbe, D., Fontaine, N., Lamy, S., Beaulieu, E., Gingras, D., and Beliveau, R. (2009). The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases. *Biochemistry* 48, 3998-4007.
- Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K.K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461, 91-94.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Braun, S., Hepp, F., Kentenich, C.R., Janni, W., Pantel, K., Riethmuller, G., Willgeroth, F., and Sommer, H.L. (1999). Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 5, 3999-4004.
- Bretz, N., Noske, A., Keller, S., Erbe-Hofmann, N., Schlange, T., Salnikov, A.V., Moldenhauer, G., Kristiansen, G., and Altevogt, P. (2012). CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis* 29, 27-38.
- Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med* 140, 1049-1056.

- Calder, A., Roth-Albin, I., Bhatia, S., Pilquill, C., Lee, J.H., Bhatia, M., Levadoux-Martin, M., McNicol, J., Russell, J., Collins, T., *et al.* (2013). Lengthened G1 phase indicates differentiation status in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 279-295.
- Calvo, E., Bolos, V., and Grande, E. (2009). Multiple roles and therapeutic implications of Akt signaling in cancer. *Onco Targets Ther* 2, 135-150.
- Chadeneau, C., Denis, M.G., Blottiere, H.M., Gregoire, M., Douillard, J.Y., and Meflah, K. (1991). Characterization, isolation and amino terminal sequencing of a rat colon carcinoma-associated antigen. *Int J Cancer* 47, 903-908.
- Chaves-Perez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harreus, U., and Gires, O. (2013). EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 32, 641-650.
- Chimge, N.O., Makeyev, A.V., Waigel, S.J., Enkhmandakh, B., and Bayarsaihan, D. (2012). PI3K/Akt-dependent functions of TFII-I transcription factors in mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 113, 1122-1131.
- Chiu, C.F., Ho, M.Y., Peng, J.M., Hung, S.W., Lee, W.H., Liang, C.M., and Liang, S.M. (2013). Raf activation by Ras and promotion of cellular metastasis require phosphorylation of prohibitin in the raft domain of the plasma membrane. *Oncogene* 32, 777-787.
- Chong, J.M., and Speicher, D.W. (2001). Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem* 276, 5804-5813.
- Chua, B.T., Gallego-Ortega, D., Ramirez de Molina, A., Ullrich, A., Lacal, J.C., and Downward, J. (2009). Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer* 8, 131.
- Coates, P.J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S.M., Crouch, D.H., Hall, P.A., and Wright, E.G. (2001). Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp Cell Res* 265, 262-273.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10158-10163.

- Davidson, K.C., Adams, A.M., Goodson, J.M., McDonald, C.E., Potter, J.C., Berndt, J.D., Biechele, T.L., Taylor, R.J., and Moon, R.T. (2012). Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4485-4490.
- Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545-5555.
- Denzel, S., Mack, B., Eggert, C., Massoner, P., Stocklein, N., Kemming, D., Harreus, U., and Gires, O. (2012). MMP7 is a target of the tumour-associated antigen EpCAM. *Int J Exp Pathol* 93, 341-353.
- Denzel, S., Maetzel, D., Mack, B., Eggert, C., Barr, G., and Gires, O. (2009). Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 9, 1471-2407.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5, 410-421.
- Di Paolo, C., Willuda, J., Kubetzko, S., Lauffer, I., Tschudi, D., Waibel, R., Pluckthun, A., Stahel, R.A., and Zangemeister-Wittke, U. (2003). A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. *Clin Cancer Res* 9, 2837-2848.
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., and Chen, Y.H. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology* 142, 305-315.
- Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., Mack, B., Baldus, S.A., Hoya, V., Pietsch, J.M., *et al.* (2013). Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*.
- Emborg, M.E., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., Joers, V., Swanson, C., Holden, J.E., and Zhang, S.C. (2013). Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Rep* 3, 646-650.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.

- Ensinger, C., Kremser, R., Prommegger, R., Spizzo, G., and Schmid, K.W. (2006). EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *J Immunother* 29, 569-573.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 65, 9328-9337.
- Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A., and Hemmings, B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 118, 5675-5678.
- Fong, D., Steurer, M., Obrist, P., Barbieri, V., Margreiter, R., Amberger, A., Laimer, K., Gastl, G., Tzankov, A., and Spizzo, G. (2008). Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* 61, 31-35.
- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R.C., Giglione, C., and Meinel, T. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* 5, 2336-2349.
- Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S., Jiang, J., Itoh, N., Nakayama, T., Yanagida, K., Ishizuka-Katsura, Y., Morihara, T., Kamino, K., *et al.* (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct. *Biochemistry* 45, 4907-4914.
- Gires, O., Klein, C.A., and Baeuerle, P.A. (2009). On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer* 9, 143; author reply 143.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8, 46-54.
- Gonda, D.K., Bachmair, A., Wunning, I., Tobias, J.W., Lane, W.S., and Varshavsky, A. (1989). Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem* 264, 16700-16712.
- Gonzalez, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M., and Gires, O. (2009). EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells* 27, 1782-1791.
- Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52, 189-196.

- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 278, 31261-31268.
- Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25, 455-464.
- Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G.M., Piantelli, M., and Alberti, S. (2012). mTrop1/Epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal E-cadherin/beta-catenin. *PLoS One* 7, 28.
- Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25, 3-28.
- Hachmeister, M., Bobowski, K.D., Hogg, S., Dislich, B., Fukumori, A., Eggert, C., Mack, B., Kremling, H., Sarrach, S., Coscia, F., *et al.* (2013). Regulated Intramembrane Proteolysis and Degradation of Murine Epithelial Cell Adhesion Molecule mEpCAM. *PLoS One* 8, e71836.
- Haegel, H., Dierich, A., and Ceredig, R. (1994). CD44 in differentiated embryonic stem cells: surface expression and transcripts encoding multiple variants. *Dev Immunol* 3, 239-246.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harsha, H.C., Molina, H., and Pandey, A. (2008). Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Nat Protoc* 3, 505-516.
- Hass, M.R., Sato, C., Kopan, R., and Zhao, G. (2009). Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol* 20, 201-210.

- Healy, L., May, G., Gale, K., Grosveld, F., Greaves, M., and Enver, T. (1995). The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12240-12244.
- Heo, J.S., Lee, Y.J., and Han, H.J. (2006). EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺ influx and p44/42 MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C123-133.
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 1438-1442.
- Heron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *J Cell Physiol* *214*, 158-165.
- Huang, H.P., Chen, P.H., Yu, C.Y., Chuang, C.Y., Stone, L., Hsiao, W.C., Li, C.L., Tsai, S.C., Chen, K.Y., Chen, H.F., *et al.* (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem* *286*, 33520-33532.
- Imrich, S., Hachmeister, M., and Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* *6*, 30-38.
- Jaksch, M., Munera, J., Bajpai, R., Terskikh, A., and Oshima, R.G. (2008). Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Res* *68*, 7882-7886.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* *132*, 1273-1282.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* *144*, 1425-1436.
- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2008). PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* *1784*, 150-158.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* *121*, 823-835.

- Klatte, T., Pantuck, A.J., Said, J.W., Seligson, D.B., Rao, N.P., LaRochelle, J.C., Shuch, B., Zisman, A., Kabbinavar, F.F., and Beldegrun, A.S. (2009). Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 1162-1169.
- Knobbe, C.B., Reifenberger, J., Blaschke, B., and Reifenberger, G. (2004). Hypermethylation and transcriptional downregulation of the carboxyl-terminal modulator protein gene in glioblastomas. *J Natl Cancer Inst* 96, 483-486.
- Ko, J.S., Seo, J.K., Shim, J.O., Hwang, S.H., Park, H.S., and Kang, G.H. (2010). Tufting Enteropathy with EpCAM Mutations in Two Siblings. *Gut Liver* 4, 407-410.
- Kroepil, F., Dulian, A., Vallbohmer, D., Geddert, H., Krieg, A., Vay, C., Topp, S.A., am Esch, J.S., Baldus, S.E., Gires, O., *et al.* (2013). High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer. *BMC Res Notes* 6, 253.
- Kuijpers, T.W., Bende, R.J., Baars, P.A., Grummels, A., Derks, I.A., Dolman, K.M., Beaumont, T., Tedder, T.F., van Noesel, C.J., Eldering, E., *et al.* (2010). CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 120, 214-222.
- Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V., and Seiser, C. (2004). Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* 279, 24834-24843.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006a). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6, 6447-6454.
- Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.F., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006b). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5, 845-857.
- Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., Yashiro, K., Tsukita, S., and Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol* 371, 136-145.

- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12, 3663-3674.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030-1037.
- Lin, Y., Yang, Y., Li, W., Chen, Q., Li, J., Pan, X., Zhou, L., Liu, C., Chen, C., He, J., *et al.* (2012). Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell* 48, 627-640.
- Linnenbach, A.J., Seng, B.A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyrc, J.J., Druck, T., and Huebner, K. (1993). Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 13, 1507-1515.
- Litvinov, S.V., Bakker, H.A., Gourevitch, M.M., Velders, M.P., and Warnaar, S.O. (1994). Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2, 417-428.
- Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139, 1337-1348.
- Lu, H., Ma, J., Yang, Y., Shi, W., and Luo, L. (2013). EpCAM is an endoderm-specific Wnt derepressor that licenses hepatic development. *Dev Cell* 24, 543-553.
- Lu, T.Y., Lu, R.M., Liao, M.Y., Yu, J., Chung, C.H., Kao, C.F., and 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, 8719-8732.
- Maaser, K., and Borlak, J. (2008). A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer* 99, 1635-1643.
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., *et al.* (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11, 162-171.
- Malaise, E.P., Chavaudra, N., and Tubiana, M. (1973). The relationship between growth rate, labelling index and histological type of human solid tumours. *Eur J Cancer* 9, 305-312.
- McKay, R. (2000). Stem cells--hype and hope. *Nature* 406, 361-364.

- Meyer, E.L., Strutz, N., Gahring, L.C., and Rogers, S.W. (2003). Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by gamma-secretase. *J Biol Chem* 278, 23786-23796.
- Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 9, 45-55.
- Mishra, S.K., Keyel, P.A., Hawryluk, M.J., Agostinelli, N.R., Watkins, S.C., and Traub, L.M. (2002). Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *EMBO J* 21, 4915-4926.
- Morris, S.M., and Cooper, J.A. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* 2, 111-123.
- Munz, M., Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69, 5627-5629.
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., and Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23, 5748-5758.
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M.B., Hanson, J.C., Morasso, M.I., Tessarollo, L., Mackem, S., and Udey, M.C. (2009). Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLoS One* 4, 0008543.
- Nakahara, S., Saito, T., Kondo, N., Moriwaki, K., Noda, K., Ihara, S., Takahashi, M., Ide, Y., Gu, J., Inohara, H., *et al.* (2006). A secreted type of beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), a novel angiogenesis inducer, is regulated by gamma-secretase. *FASEB J* 20, 2451-2459.
- Nath, D., Williamson, N.J., Jarvis, R., and Murphy, G. (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 114, 1213-1220.
- Nelson, A.J., Dunn, R.J., Peach, R., Aruffo, A., and Farr, A.G. (1996). The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 26, 401-408.
- Ng, V.Y., Ang, S.N., Chan, J.X., and Choo, A.B. (2010). Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28, 29-35.

- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-2060.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136, 1951-1960.
- Panopoulou, E., Gillooly, D.J., Wrana, J.L., Zerial, M., Stenmark, H., Murphy, C., and Fotsis, T. (2002). Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 18046-18052.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R., and Gires, O. (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* 193, 25-32.
- Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D., and Imhof, B.A. (1995). CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 130, 451-460.
- Postina, R. (2008). A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res* 5, 179-186.
- Price, M.J., Chou, C.C., Frantzen, M., Miyamoto, T., Kar, S., Lee, S., Shah, P.K., Martin, B.J., Lill, M., Forrester, J.S., *et al.* (2006). Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol* 111, 231-239.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 973-978.
- Przyborski, S.A. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 23, 1242-1250.
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R., and Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol* 7, 837-843.

- Ralhan, R., Cao, J., Lim, T., Macmillan, C., Freeman, J.L., and Walfish, P.G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer* 10, 331.
- Rawson, R.B. (2002). Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Essays Biochem* 38, 155-168.
- Renger, A., Zafiriou, M.P., Noack, C., Pavlova, E., Becker, A., Sharkova, K., Bergmann, M.W., El-Armouche, A., Zimmermann, W.H., and Zelarayan, L.C. (2013). The four and a half LIM-domain 2 controls early cardiac cell commitment and expansion via regulating beta-catenin-dependent transcription. *Stem Cells* 31, 928-940.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115.
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., and Nichols, B.J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J Cell Sci* 122, 912-918.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H., and Lindhofer, H. (2001). Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem* 49, 911-917.
- Salomon, J., Espinosa-Parrilla, Y., Goulet, O., Al-Qabandi, W., Guigue, P., Canioni, D., Bruneau, J., Alzahrani, F., Almuhsen, S., Cerf-Bensussan, N., *et al.* (2011). A founder effect at the EPCAM locus in Congenital Tufting Enteropathy in the Arabic Gulf. *Eur J Med Genet* 54, 319-322.
- Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., *et al.* (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., *et al.* (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987.

- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S.W., and Simons, M. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci* 28, 2874-2882.
- Schnell, U., Kuipers, J., and Giepmans, B.N. (2013a). EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci Rep*.
- Schnell, U., Kuipers, J., Mueller, J.L., Veenstra-Algra, A., Sivagnanam, M., and Giepmans, B.N. (2013b). Absence of cell-surface EpCAM in congenital tufting enteropathy. *Hum Mol Genet* 22, 2566-2571.
- Schon, M.P., Schon, M., Klein, C.E., Blume, U., Bisson, S., and Orfanos, C.E. (1994). Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol* 102, 987-991.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128, 735-745.
- Sears, H.F., Herlyn, D., Steplewski, Z., and Koprowski, H. (1984). Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. *J Biol Response Mod* 3, 138-150.
- Seligson, D.B., Pantuck, A.J., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, M.H., Han, K.R., Correa, A.J., Eeva, M., Tze, S., *et al.* (2004). Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 2659-2669.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Shilo, B.Z., and Schejter, E.D. (2011). Regulation of developmental intercellular signalling by intracellular trafficking. *EMBO J* 30, 3516-3526.
- Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., and Nukina, N. (2008). Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Mol Cell Biol* 28, 3663-3671.
- Sievers, C., Billig, G., Gottschalk, K., and Rudel, T. (2010). Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion. *PLoS One* 5, e12735.

- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396-401.
- Sivagnanam, M., Mueller, J.L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S.F., Turner, D., Zlotkin, S.H., Pencharz, P.B., Ngan, B.Y., Libiger, O., *et al.* (2008). Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology* *135*, 429-437.
- Sivagnanam, M., Schaible, T., Szigeti, R., Byrd, R.H., Finegold, M.J., Ranganathan, S., Gopalakrishna, G.S., Tatevian, N., and Kellermayer, R. (2010). Further evidence for EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Am J Med Genet A* *152A*, 222-224.
- Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., and Hammerschmidt, M. (2009). The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genet* *5*, e1000563.
- Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 609-622.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G., and Zeimet, A.G. (2006). Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* *103*, 483-488.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., von Castelberg, B., Bart, R., *et al.* (2004). High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *86*, 207-213.
- Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., and Dalton, S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* *21*, 8320-8333.
- Stevens, L.C., and Hummel, K.P. (1957). A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* *18*, 719-747.
- Stockley, J.H., and O'Neill, C. (2008). Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* *65*, 3265-3289.

- Stoecklein, N.H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A.M., Erbersdobler, A., Verde, P.E., Eisenberger, C.F., Peiper, M., Rehders, A., Esch, J.S., *et al.* (2006). Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer* 6, 165.
- Stoyanova, T., Goldstein, A.S., Cai, H., Drake, J.M., Huang, J., and Witte, O.N. (2012). Regulated proteolysis of Trop2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via beta-catenin signaling. *Genes Dev* 26, 2271-2285.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., and Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 820-824.
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., and Linnenbach, A.J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3542-3546.
- Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136-1148.
- Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., Ishizuka-Katsura, Y., Nakayama, T., Itoh, N., Jiang, J., *et al.* (2008). Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Mol Cell Biol* 28, 165-176.
- Takahashi, K., Mitsui, K., and Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 423, 541-545.
- Takahashi, K., Murakami, M., and Yamanaka, S. (2005). Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans* 33, 1522-1525.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tarmann, T., Dohr, G., Schiechl, H., Barth, S., and Hartmann, M. (1990). Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel)* 137, 141-145.

- Tatum, R., Zhang, Y., Salleng, K., Lu, Z., Lin, J.J., Lu, Q., Jeansonne, B.G., Ding, L., and Chen, Y.H. (2010). Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F24-34.
- Terashima, M., Kim, K.M., Adachi, T., Nielsen, P.J., Reth, M., Kohler, G., and Lamers, M.C. (1994). The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *EMBO J* 13, 3782-3792.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tian, C., Wang, X., Wang, L., Wu, S., and Wan, Z. (2013). Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture. *Exp Clin Transplant* 11, 176-181.
- Traub, L.M. (2005). Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1744, 415-437.
- Trebak, M., Begg, G.E., Chong, J.M., Kanazireva, E.V., Herlyn, D., and Speicher, D.W. (2001). Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 276, 2299-2309.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., de Leij, L.M., and Harmsen, M.C. (2007). Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171, 386-395.
- Tsujikawa, M., Kurahashi, H., Tanaka, T., Nishida, K., Shimomura, Y., Tano, Y., and Nakamura, Y. (1999). Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21, 420-423.
- Varga, M., Obrist, P., Schneeberger, S., Muhlmann, G., Felgel-Farnholz, C., Fong, D., Zitt, M., Brunhuber, T., Schafer, G., Gastl, G., *et al.* (2004). Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 10, 3131-3136.
- Vassar, R., Kovacs, D.M., Yan, R., and Wong, P.C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29, 12787-12794.

- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E., and Sisodia, S.S. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 271, 31894-31902.
- Wang, Y.K., Zhu, Y.L., Qiu, F.M., Zhang, T., Chen, Z.G., Zheng, S., and Huang, J. (2010). Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133+ primary colon cancer cells. *Carcinogenesis* 31, 1376-1380.
- Webb, S.D., Sherratt, J.A., and Fish, R.G. (1999). Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: a theoretical model. *Clin Exp Metastasis* 17, 397-407.
- Wei, Y., Jiang, Y., Zou, F., Liu, Y., Wang, S., Xu, N., Xu, W., Cui, C., Xing, Y., Cao, B., *et al.* (2013). Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6829-6834.
- Went, P., Dirnhofer, S., Salvisberg, T., Amin, M.B., Lim, S.D., Diener, P.A., and Moch, H. (2005). Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 29, 83-88.
- Willem, M., Lammich, S., and Haass, C. (2009). Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE1). *Semin Cell Dev Biol* 20, 175-182.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Winter, M.J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2007). Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem* 302, 19-26.
- Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E., Rees-Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., and Litvinov, S.V. (2003). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285, 50-58.
- Yeh, J.C., Otte, L.A., and Frangos, J.A. (2008). Regulation of G protein-coupled receptor activities by the platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1. *Biochemistry* 47, 9029-9039.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.

Yoon, S.M., Gerasimidou, D., Kuwahara, R., Hytioglou, P., Yoo, J.E., Park, Y.N., and Theise, N.D. (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 53, 964-973.

Yu, Y., Liang, D., Tian, Q., Chen, X., Jiang, B., Chou, B.K., Hu, P., Cheng, L., Gao, P., Li, J., *et al.* (2013). Stimulation of Somatic Cell Reprogramming by Eras-Akt-Foxo1 Signaling Axis. *Stem Cells*.

Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.

Zecchini, V., Domaschenz, R., Winton, D., and Jones, P. (2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev* 19, 1686-1691.

Zech, N.H., Preisegger, K.H., and Hollands, P. (2011). Stem cell therapeutics--reality versus hype and hope. *J Assist Reprod Genet* 28, 287-290.

Zoller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11, 254-267.

Zuk, P.A. (2010). The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21, 1783-1787.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veränderungen der Zellphysiologie bei der Karzinogenese.	9
Abbildung 2: Genstruktur vom <i>EpCAM</i> -Gen.	18
Abbildung 3: Struktur vom mEpCAM-Protein.	19
Abbildung 4: Signaltransduktion und Zelladhäsion von hEpCAM in Krebszellen.	21
Abbildung 5: Mechanismus von EpCAM als Wnt-Derepressor.	22
Abbildung 6: Schema der sequentiellen Spaltung des mEpCAM-YFP Fusionsproteins.	48
Abbildung 7: Nachweis der proteolytischen Spaltung von mEpCAM.	49
Abbildung 8: Nachweis der proteolytische Spaltung von endogenem mEpCAM.	51
Abbildung 9: Schnittstellenbestimmung in der extrazellulären Domäne von mEpCAM.	53
Abbildung 10: Charakterisierung an der Spaltung von mEpCAM beteiligter Proteasen.	54
Abbildung 11: Alignment der extrazellulären Spaltsequenzen von mEpCAM.	55
Abbildung 12: Konservierung der β - und α -Schnittstellen von mEpCAM.	57
Abbildung 13: Bestimmung der γ -Sekretase Schnittstellen von mEpCAM (γ - und ϵ -Schnittstellen).	59
Abbildung 14: γ -Sekretase Abhängigkeit des γ - und ϵ -Schnittes von mEpCAM.	60
Abbildung 15: Proteasomaler Abbau von EpICD.	61
Abbildung 16: Stabilitäten der intrazellulären Spaltprodukte (EpICDs).	63
Abbildung 17: Konservierung der γ - und ϵ -Spaltstellen.	64
Abbildung 18: Stabilitäten der verschiedenen intrazellulären Spaltprodukte.	65
Abbildung 19: Konservierung der γ - und ϵ -Schnittstelle von EpCAM.	66
Abbildung 20: Konfokale Lebendzellmikroskopie (intrazelluläre Lokalisation von mEpICD).	68
Abbildung 21: Probenkontrolle cRNA-Mikroarray.	70
Abbildung 22: Vulkan-Blots Transkriptom (EpCAM Knockdown + LIF Entzug).	72
Abbildung 23: Vulkan-Blots Proteom (mEpCAM-Knockdown).	74
Abbildung 24: Probenkontrolle Proteom (mEpCAM-CTF Überexpression und DAPT Behandlung).	76
Abbildung 25: Proteom (mEpCAM-CTF-Überexpression und DAPT-Behandlung).	77
Abbildung 26: mEpCAM spaltungsabhängige Proliferation.	78
Abbildung 27: Yeast-Two-Hybrid-Interaktionen.	80
Abbildung 28: Schema des SILAC basierten mEpCAM- und mEpICD-Interaktionsscreens.	82
Abbildung 29: Protein Class Enrichment von Interaktionspartnern von mEpCAM.	84
Abbildung 30: Konfokale Lebendzellmikroskopie (Lysosomler Abbau von EpCAM-YFP).	87
Abbildung 31: Konfokale Lebendzellmikroskopie (Lysosomler Abbau von Myc-CTF-YFP).	88
Abbildung 32: Interaktionen von EpCAM bei der Signaltransduktion von Akt.	89
Abbildung 33: Interaktionen von mEpCAM mit ERas, mit Prohibitin sowie mit Prohibitin2.	91
Abbildung 34: Induktion der Akt-Phosphorylierung durch mEpCAM-YFP-Überexpression.	92

Abbildung 35: Modell zur Aktivierung der Akt-Phosphorylierung durch EpCAM.....105
Abbildung 36: Intrazelluläre Lokalisation der Rab-Proteine die mit EpCAM interagieren.....111

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Etablierte Marker für Tumor-induzierende Zellen (TICs).....	12
Tabelle 2: Statistisch relevante Genregulationen (mEpCAM-Knockdown; Differenzierung).....	72
Tabelle 3: Statistisch Relevante Proteinregulationen (mEpCAM Knockdown)	74
Tabelle 4: Potentielle Interaktionspartner von mEpCAM (Endozytose).....	85
Tabelle 5: Potentielle Interaktionspartner von mEpCAM (intrazellulärer Transport).....	85
Tabelle 6: Interaktionspartner von mEpCAM (Akt-Phosphorylierung)	90

13 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
b	Basen
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
CTF	C-terminales Fragment
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DAPT	N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
EpEX	extrazelluläre Domäne von EpCAM
EpICD	intrazelluläre Domäne von EpCAM
ESI	Elektronsprayionisation
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii (und andere)
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H3K27me ₃	Histon 3 methyliert an Lysin 27
H3K4me ₃	Histon 3 methyliert an Lysin 4
hEpCAM	humanes EpCAM
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iPS	induced pluripotent stem cells
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight
mEpCAM	murines EpCAM
min	Minute

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Olivier Gires für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Forschungsgruppe mit einem für mich vielseitigen und spannenden Thema durchzuführen. Vielen Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, Diskussionen und die ausführlichen Feedback-Gespräche vor und nach meinen Fachpräsentationen. Insbesondere bedanke ich mich für die Unterstützung und Chance meine eigenen Ideen und Vorstellungen bei der Planung der weiteren Vorgehensweise mit einfließen zu lassen.

Vielen, vielen Dank an Sannia Sarrach, Carola Eggert, Brigitte Mack, Heidi Kremling, Karolina Bobowski, Gisela Kranz, Dr. Rahul Date und dem Rest der HNO-Forschung für eure Hilfsbereitschaft, euren wissenschaftlichen Rat und das gute Arbeitsklima. Im Speziellen möchte ich mich bei Sannia Sarrach für die schöne Zeit im Labor und die gute Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank an Carola Eggert für die ganze Unterstützung bei den Experimenten und die gute Teamarbeit. Bei Dr. Rahul Date bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung. Außerdem möchte ich mich bei Brigitte Mack für die ganzen Färbungen und lebendzellmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Ein großes Dankeschön an Fabian Coscia für die gute Kooperation, die hilfreichen Diskussionen und deine ausführlichen Erklärungen und Vorschläge bei der Auswertung der Massenspektrometrie-Daten. Vielen Dank an unsere Kooperationspartner Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler, Dr. Sebastian Hogl, Dr. Bastian Dislich, Prof. Dr. Harald Steiner und Dr. Akio Fukumori für die MALDI-TOF-Messungen zur Bestimmung der Spaltstellen von EpCAM. Außerdem möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Dr. Stefanie Hauk und Dr. Juliane Merl für Messung des SILAC-basierten Interaktionsscreen von EpCAM bedanken.

Bei Dr. Doan Duy Hai Tran und Dr. Ivan Psakhye bedanke ich mich für euren wissenschaftlichen Rat und Interesse an meinem Promotionsthema.

Ich möchte meinen Eltern und meiner Schwester für eure Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Britta Wessel für deinen ganzen Beistand und dein Verständnis in den letzten Jahren.

15 Publikationen

Während meiner Promotionszeit habe ich zu den folgenden Publikationen beigetragen:

Hachmeister M., Eggert C., Mack B., Coscia F., Hogl S., Dieslich B., Fukumori A., Bobowski K., Zimmermann W., Steiner H., Lichtenthaler S., and Gires O.

Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM

PLoS ONE 8(8): e71836. doi:10.1371/journal.pone.0071836; August 29, 2013

Imrich S., **Hachmeister M.** and Gires O.

EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells

Cell Adhesion & Migration 6: 1, 30-38; January/February 2012