

**Charakterisierung und Bedeutung des Tumor-
assoziierten Antigens EpCAM in murinen embryonalen
Stammzellen und Etablierung eines transgenen
Mausmodells zur *in vivo* Studie**

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

vorgelegt von

Bárbara González Carvajal

aus Madrid

angefertigt in der
Klinischen Kooperationsgruppe „Molekulare Onkologie“ der Ludwig-
Maximilians-Universität München und des Helmholtz Zentrums München

eingereicht über die
Ludwig-Maximilians-Universität München



Dissertation eingereicht am: 15. Oktober 2009
Betreuer: PD Dr. Gires
1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ackmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Bettina Kempkes
Mündliche Prüfung am : 26. März 2010

A mi madre que me ha enseñado tantas cosas

Für meine Mutter, die mich so viel lehrte

EHERENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Bárbara González Carvajal, geboren am 11. Mai 1978 in Madrid, erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit nur unter Zuhilfenahme der hier angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 15. März 2007 von Herrn PD Dr. Olivier Gires betreut und durch Herrn Prof. Dr. Michael Ackmann von der Fakultät für Biologie vertreten.

München, den 15. Oktober 2009

Bárbara González Carvajal

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Biologie der embryonalen Stammzellen	1
1.1.1	Definition und Eigenschaften von undifferenzierten embryonalen Stammzellen	1
1.1.2	Adulte Stammzellen	5
1.1.3	Krebsstammzellen	7
1.2	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)	8
1.2.1	Gen- und Protein-Struktur von EpCAM	9
1.2.1.1	Die GA-733-Genfamilie und das <i>epcam</i> Gen	9
1.2.1.2	Das EpCAM Protein	11
1.2.1.3	N-Glykosylierung von hEpCAM	13
1.2.2	Funktion von EpCAM und EpCAM-Signalkomplexes	14
1.2.3.	Expressionsmuster von EpCAM	17
1.2.3.1	EpCAM in gesunden Geweben	17
1.2.3.2	EpCAM bei Tumorprogression und Metastasierung	18
1.3	Tiermodelle	19
1.3.1	Transgene Mäuse	19
1.3.2	Konventionelles <i>gene targeting</i>	21
1.3.3	Konditionales <i>gene targeting</i> mit Hilfe des Cre/loxP Systems	22
1.4	Zielstellung der Dissertation	24
2.	MATERIALIEN	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Radioaktive Isotope	29
2.4	Verwendete Antikörper	29
2.5	Oligonukleotide und Plasmide	31
2.5.1	Primer	31
2.5.2	Plasmide	32
2.5.3	siRNA	33
2.6	DNA-Sonden für Southern Blot Analyse	33
2.7	Kits, Standards und Enzyme	34
2.8	Bakterien	35
2.9	Zelllinien	35
2.10	Blastozysten	36

3.	METHODEN	37
3.1	Bakterien assoziierte-Techniken	37
3.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung	37
3.1.2	Herstellung chemokompetenter Bakterien	37
3.1.3	Transformation von Bakterien	37
3.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	38
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von ES Zellen	38
3.2.3	Kultivierung muriner ES Zellen: Passagieren und Expandieren	38
3.2.4	Morphologie, Proliferation und Zellzahlbestimmung von ES Zellen	39
3.2.5	Generierung von Zelllysaten	39
3.2.6	Transfektion der Stammzellen: Elektroporation, MATra und Nukleofektion	40
3.2.7	Selektion homolog rekombinierter ES Klonen	40
3.2.8	Einfrieren von ES Zellklonen im 96-Loch Format	41
3.2.9	Blastozysteninjektion und Embryotransfer	41
3.3	Durchflusszytometrische Analyse	42
3.3.1	Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen	42
3.3.2	Propidiumiodid-(PI)-Analyse	43
3.4	Molekularbiologische Methoden	43
3.4.1	Isolation von RNA und cDNA Synthese	43
3.4.2	Standard PCR (" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")	43
3.4.3	Restriktionsverdau	44
3.4.4	Agarosegelelektrophorese	44
3.4.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	44
3.4.6	Klassische Klonierung von DNA Fragmenten und PCR-Produkten	44
3.4.7	Präparation von Plasmid-DNA	45
3.4.8	DNA-Isolation und Detektion rekombinierter ES Zellklonen	45
3.4.9	Southern Blot	45
3.4.10	Generierung und radioaktive Markierung von DNA-Sonden	46
3.4.11	Hybridisierung von DNA-Filtern und Auswertung	47
3.4.12	Sonstige DNA/RNA Arbeitstechniken	47
3.5	Proteinbiochemische Analyseverfahren	47
3.5.1	Proteinbestimmung	47
3.5.2	Western Blot	47

3.6	Immunhistochemische Methoden	49
3.6.1	Immunzytochemie von mEpCAM in ES Zellen	49
3.6.2	Eosin-Färbung	50
3.6.3	Alkalische Phosphatase Nachweismethode: BCIP/NBT	50
3.7	Zucht der Mauslinien	50
3.7.1	Tierhaltung und Tierhygiene	50
3.7.2	Etablierung von konditionalen transgenen Knock-in-Mausstämme	51
4.	ERGEBNISSE	52
4.1	Bedeutung des Tumor-assoziierten Antigens EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen	52
4.1.1	Phänotypische Analyse von mEpCAM in ES Zellen	52
4.1.1.1	mEpCAM Expression in murinen und humanen Zelllinien	52
4.1.1.2	Immunzytochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von mEpCAM an der Zelloberfläche	54
4.1.2	Der Leukämie Inhibitionsfaktor LIF (<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>) ist essentiell für die Erhaltung des Stammzellphänotyps von E14TG2 α Zellen	55
4.1.2.1	Morphologische Veränderungen von E14TG2 α Stammzellen in Abwesenheit von LIF	55
4.1.2.2	LIF beeinflusst die Proliferationskapazität von E14TG2 α Zellen	56
4.1.2.3	E14TG2 α Zellen differenzieren nach LIF-Entzug: negative Modulation von stammzellspezifischen Markern	57
4.1.2.4	Der Phänotypwechsel von E14TG2 α ES Zellen korreliert mit einer negativen Regulation des mEpCAM Proteins	62
4.1.2.5	Phänotypwechsel von E14TG2 α ES Zellkulturen nach Wiedergabe von LIF	64
4.1.3	Modulation der mEpCAM Expression in E14TG2 α ES Zellen	66
4.1.3.1	Optimierung der Transfektion und Transfektionseffizienz	66
4.1.3.2	Inhibierung der mEpCAM Expression mittels RNAi	68
4.1.3.3	Die Inhibition von mEpCAM hat einen Einfluss auf die Zellzahl	69
4.1.3.4	Die Repression von mEpCAM induziert keine Apoptose	70
4.1.3.5	Die Repression von mEpCAM in ES Zellen verursacht eine Reduktion von spezifischen Stammzellmarkern	71
4.1.4	Analyse der Auswirkung einer konstitutiven Expression von mEpCAM in Stammzellen	74

4.1.4.1	Etablierung zelluläre Systemen zur funktionellen Analyse von EpCAM	74
4.1.4.2	Konstitutiv exprimiertes mEpCAM verlangsamt den Verlust des ES Zellphänotyps nach LIF Entzug	75
4.2	Generierung eines konditionalen transgenen Mausmodells für humanes EpCAM	78
4.2.1	Konditionale hEpCAM Expression unter Verwendung des Cre/LoxP Rekombinationssystems und „Gene Targeting“	79
4.2.2	Klonierung von hEpCAM in die Targetierungsvektoren Rosa26 und Hprt	82
4.2.3	Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen	85
4.2.4	Identifikation der gewonnenen Klone durch Southern Blot	85
4.2.5	Untersuchung der Cre/LoxP Rekombination in ES Zellklonen	88
4.2.6	Chimärenherstellung und Rückkreuzung der Chimären	89
5.	DISKUSSION UND AUSBLICK	91
5.1	mEpCAM in embryonalen Stammzellen	95
5.2	mEpCAM ist beteiligt an der Regulation des Stammzellphänotyps	99
5.3	Konditionales Mausmodell zur Untersuchung der Funktion von hEpCAM <i>in vivo</i>	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG	108
7.	REFERENZEN	109
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	124
9.	DANKSAGUNG	127
10.	LEBENS LAUF	128

1. EINLEITUNG

Pluripotente embryonale Stammzellen (ES Zellen) gewinnen immer mehr an Bedeutung in der modernen Grundlagenforschung und in der regenerativen Medizin. Der entscheidende Grund dafür ist ihre Kapazität sich in alle Gewebe, die von den drei Keimblättern (Ekto-, Meso- und Endoderm) abgeleitet sind, zu differenzieren (Abb. 1.1). Die einzigartige Eigenschaft in jeden Zelltyp des Körpers differenzieren zu können, wird als Pluripotenz definiert und unterscheidet Stammzellen von allen anderen bislang identifizierten organspezifischen Stammzellen (Enver *et al.* 2009). Dieses Phänomen ermöglicht eine Regeneration spezialisierter Gewebe in physiologischen und pathophysiologischen Situationen (Muller und Lengerke 2009). Dadurch werden embryonale Stammzellen zu potentiellen Therapeutika für Krankheitszustände bei denen Gewebszellen zu Grunde gehen wie z.B. Myokardinfarkte, *Diabetes mellitus* Typ I, Parkinson, Leberzirrhose oder periphere Durchblutungsstörungen (Weissman 2000).

Embryonale Stammzellen können zudem als reine Population undifferenzierter Zellen über lange Zeiträume in Kultur gehalten und expandiert werden. Im Gegensatz zu Tumorzelllinien behalten sie in hohen Passagenzahlen einen normalen Karyotyp (Pease *et al.* 1990). Murine embryonale Stammzellen sind deswegen ideale *in vitro* Modellsysteme für zellbiologische Vorgänge, die *in vivo* nur sehr schwer zu erfassen sind. Sie ermöglichen die Erforschung von frühen entwicklungsbiologischen Vorgängen und regulatorischen Mechanismen der Zelldifferenzierung in den frühesten Entwicklungsstadien. Des Weiteren sind murine ES Zellen leicht modifizierbar und ermöglichen, z.B. über die Generierung transgener Mäuse, die Untersuchung einzelner Gene *in vivo*.

1.1 Biologie der embryonalen Stammzellen

1.1.1 Definition und Eigenschaften von undifferenzierten embryonalen Stammzellen

Pluripotente embryonale Stammzellen können bei der Zellteilung zwei Tochterzellen produzieren, von denen beide Zellen den Stammzellphänotyp behalten, auch als symmetrische Teilung bezeichnet. Alternativ kann eine

Tochterzelle den Stammzellphänotyp behalten und die andere in einen vorprogrammierten Zelltyp differenzieren. Durch diese asymmetrische Zellteilung haben Stammzellen die einzigartige Eigenschaft, sich zu differenzieren und gleichzeitig selbst zu erneuern (Becker *et al.* 1963; Molofsky *et al.* 2004, Raff 2003). Die Regulationsprozesse dieser Mechanismen, Differenzierung und Selbsterneuerung, erfolgen durch Proteine der Mutterzellen und durch den Einfluss der zellulären Umgebung. Obschon diese Vorgänge Gegenstand intensiver Forschung sind, sind sie bis heute nicht vollständig bekannt (Spradling *et al.* 2001, Watt und Hogan 2000).

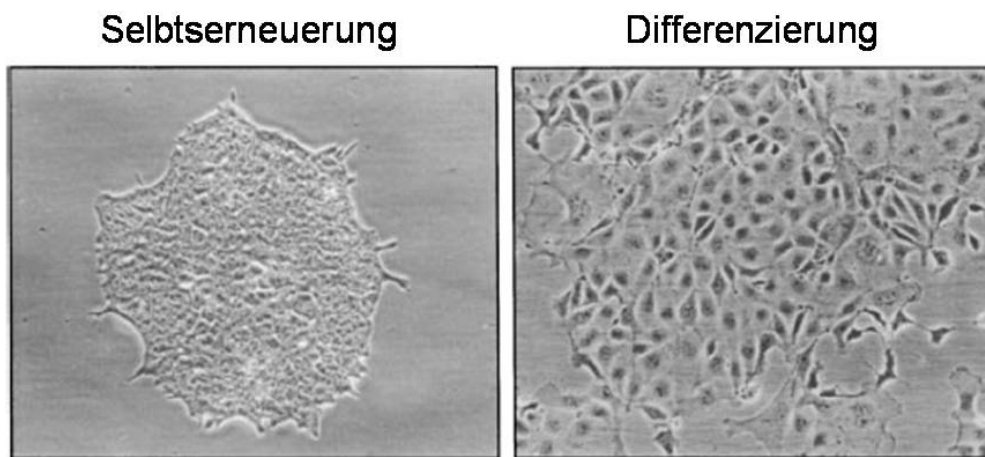


Abb. 1.1: Pluripotente embryonale Stammzellen. Embryonale Stammzellen zeichnen sich durch ihre unbegrenzte Selbsterneuerung *in vitro* in ES Zellkolonien (linkes Foto) und durch ihre Differenzierungskapazität (rechtes Foto) aus (Smith 2001).

In Deutschland und in den meisten europäischen Ländern ist die Humanstammzellforschung durch das Stammzellgesetz und das Embryonenschutzgesetz reguliert und die Gewinnung von humanen Stammzellen aus Embryonen nach dem 14. Tag der Embryonalentwicklung untersagt. Die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen ist daher erschwert (Lo und Parham 2009).

Auch murine embryonale Stammzellen zeichnen sich durch ihre nahezu unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit sowie durch ihre Pluripotenz aus (Suda *et al.* 1987). Diese ES Zellen werden aus der inneren Zellmasse (ICM: *inner cell mass*) von 3.5 Tage alten Blastozysten isoliert (Abb. 1.2) (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981) und können nach der Reimplantation in Mausblastozysten zur Generierung von transgenen Mäusen führen (Gossler *et al.* 1986, Mansour *et al.* 1988). *In vitro* ist es möglich das murine Genom durch verschiedene

molekularbiologische Techniken wie die homologe Rekombination (Siehe 1.3) zu manipulieren (Smithies *et al.* 1985, Thomas und Capecchi 1987). Diese transgenen ES Zellen werden anschließend zur Generierung von Knock-in bzw. Knockout Mauslinien eingesetzt.

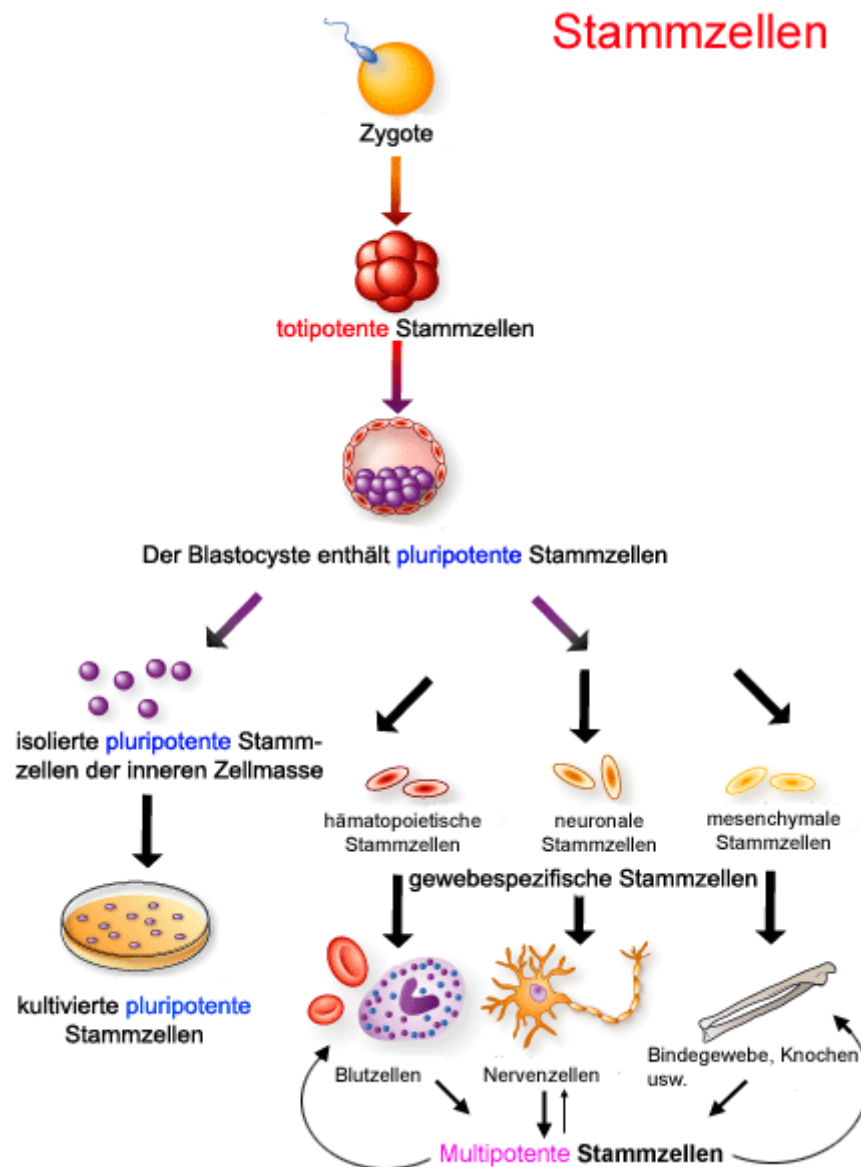


Abb. 1.2: Differenzierungspotenzial von embryonalen Stammzellen. ES Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert und anschließend *ex vivo* expandiert. Diese Zellen haben das Potenzial in alle Gewebetypen zu differenzieren (Abbildung aus www.egbeck.de).

ES Zellen behalten ihre Pluripotenz, wenn sie auf „feeder“ Zellen oder unter Zugabe von LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), ein Mitglied der Interleukin 6 Familie, das die Differenzierung von ES Zellen inhibiert, kultiviert werden. „Feeder“ Zellen, also Begleitzellen zur Ko-Kultur von ES Zellen, sind in der Lage LIF zu produzieren und in das umgebende Medium zu sezernieren

(Matsuda *et al.* 1999, Niwa *et al.* 2009, Smith und Hooper 1987, Williams *et al.* 1988).

Die Regulation und Charakterisierung undifferenzierter ES Zellen erfolgt über membrangebundene Rezeptoren (gp130/LIF-R) (Burdon *et al.* 1999, Matsuda *et al.* 1999, Niwa *et al.* 2009). Enzymaktivitäten wie die der alkalischen Phosphatase (AP) (Wobus *et al.* 1984) und der Telomerase (Thomson *et al.* 1998), Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4 (*Octamer Binding Transcription Factor-4*) (Okamoto *et al.* 1990), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) (Yoshida *et al.* 1994), c-Myc und der Homeobox-Transkriptionsfaktor Nanog (Chambers *et al.* 2003), sowie spezifische Zelloberflächenantigene (*Stage specific embryonic antigen* SSEA-1) (Solter und Knowles 1978) sind ebenfalls essentiell beteiligt.

Das bereits erwähnte Zytokin LIF ist Mitglied der Interleukin (IL)-6 Familie und bindet direkt an den LIF-Rezeptor (LIF-R), welcher nach Aktivierung mit seiner zytoplasmatischen Domäne den Transmembranrezeptor gp130 rekrutiert, um einen trimeren Komplex zu bilden. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung, Dimerisierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors Stat3. Es wurde in experimentellen Modellen gezeigt, dass allein die Aktivierung von Stat3 ausreichend ist, um die Selbsterneuerung von ES Zellen aufrecht zu erhalten (Matsuda *et al.* 1999). Die differenzierungshemmende Wirkung von LIF *in vitro* ist dabei konzentrationsabhängig und reversibel (Viswanathan *et al.* 2002, Zandstra *et al.* 2000). Der Transkriptionsfaktor Oct3/4 gehört zu einer Familie DNA-bindender Proteine, welche an die Oktamer Sequenz ATGCAAAT binden. Oct3/4 ist essentiell für den Erhalt der Pluripotenz in murinen ES Zellen. Entzieht man Wildtyp ES Zellen LIF, so wird Oct3/4 innerhalb weniger Tage herunter reguliert und die Zellen differenzieren. Signalwege, die an der Regulation und der Aufrechterhaltung des undifferenzierten pluripotenten Potentials von ES Zellen beteiligt sind, wurden in Abbildung 1.3 zusammengefasst (Varga und Wrana 2005). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie die Transkriptionsfaktoren Oct3/4 und Stat3 und das Antigen SSEA-1, werden als Stammzellmarker zur Beurteilung des Differenzierungsstatus von Stammzellen herangezogen, da differenzierte Zellen diese Marker nicht oder nur beschränkt exprimieren.

Weiterhin können ES Zellen *in vitro* gezielt zu verschiedensten Zelltypen, wie z.B. Nervenzellen, ausdifferenziert werden. Die Differenzierung in spezialisierte Zellen macht ES Zellen für mögliche Zellersatztherapien oder potentielle Therapeutika für Krankheitszustände, die mit einem Verlust von Gewebezellen assoziiert sind, verfügbar. Experimente mit Mäusen zeigten jedoch, dass embryonale Stammzellen auch bösartige Teratome in Empfängertieren induzieren, was eine Verwendung am Menschen weiter in Frage stellt (McKay 2000).

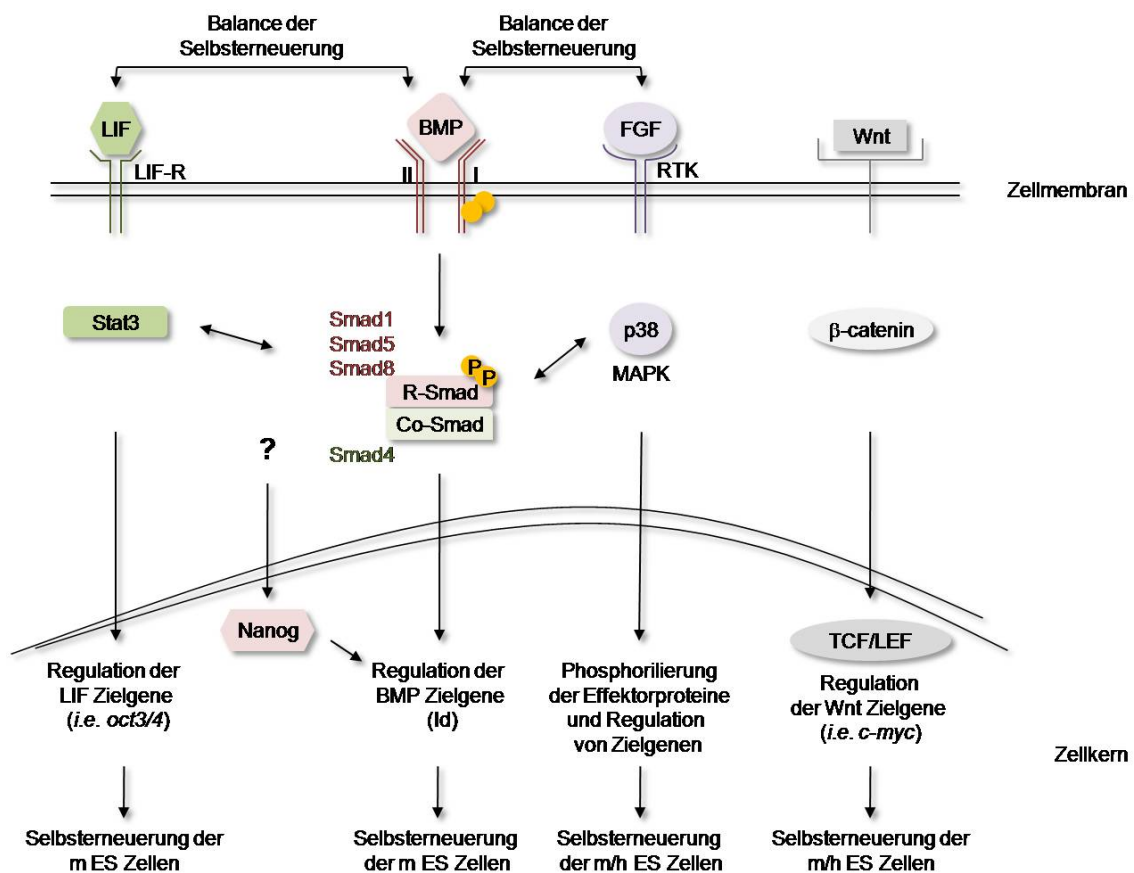


Abb. 1.3: Übersicht der Signalwege, die in die Regulation der Pluripotenz muriner ES Zellen involviert sind. Die Pluripotenz wird durch Oberflächenrezeptoren, die Schlüsseltranskriptionsfaktoren, wie Oct3/4, STAT3, Tcf-Lef und Nanog, im Zellkern regulieren, vermittelt. LIF und BMP4 (*bone morphogenic proteins*) wirken über die Bindung an den jeweiligen Rezeptor. Die Transkriptionsfaktoren Stat3, Oct3/4 und Nanog induzieren durch die Bindung an DNA Veränderungen in der Genexpression, die zu phänotypischen Auswirkungen führen. Abbildung adaptiert von Varga und Wrana (Varga und Wrana, 2005).

1.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen, auch somatische Stammzellen genannt, befinden sich in verschiedenen Geweben des adulten Organismus. Bei Bedarf proliferieren adulte Stammzellen (Selbsterneuerung) oder differenzieren in Gewebezellen

zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Reparatur von Schäden in ihrem jeweiligen Organsystem (Abb. 1.2). Die Fähigkeit in vorgegebene Gewebszellen ausdifferenzieren zu können, jedoch nicht in Zellen aller drei Keimblätter, bezeichnet man als Multipotenz (Raff 2003).

In den vergangenen Jahren wurden adulten Stammzellen in nahezu allen Geweben des Körpers nachgewiesen. Außerdem können sich adulte Stammzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über ihre determinierten somatischen Gewebegrenzen hinaus in verschiedene Gewebe differenzieren oder reprogrammiert werden (Hochedlinger und Jaenisch 2003, Hochedlinger und Jaenisch 2006, Hochedlinger und Jaenisch 2007, Jaenisch und Young 2008).

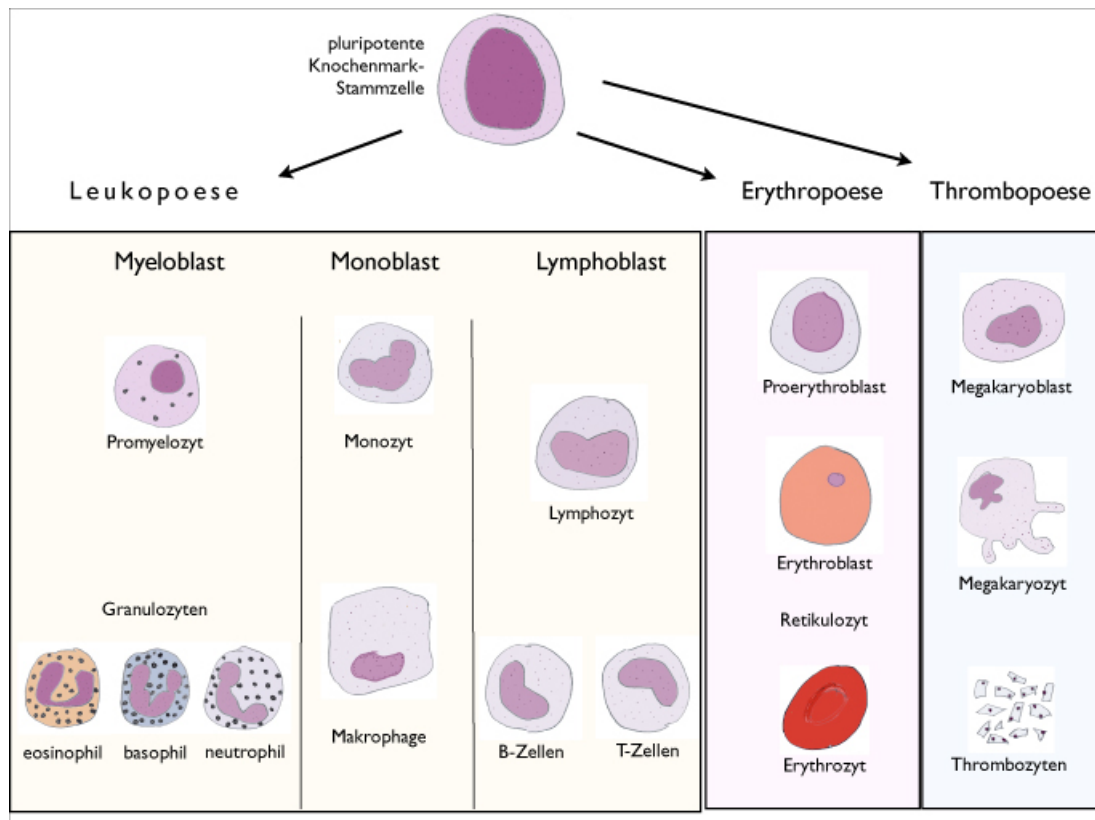


Abb. 1.4: Hämatopoetischen Stammzellen. Die hämatopoetischen Stammzellen sind im Knochenmark von Stromazellen, von denen sie wichtige regulatorische Signale erhalten, umgeben. Wenn Blutkörperchen benötigt werden, teilt sich eine Stammzelle zunächst asymmetrisch in zwei Tochterzellen: Eine verbleibt in ihrer Nische und behält ihre Identität als Stammzelle. Die andere differenziert in verschiedene Blut- und Immunzellen.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind aufgrund ihrer langjährigen Verwendung bei Knochenmarkstransplantationen, im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen, die am besten untersuchten adulten Stammzellen (Abb. 1.4). Sie können durch den Oberflächenmarker CD34

charakterisiert und selektioniert werden und werden seit Jahrzehnten z.B. bei Leukämien, aplastischen Anämien oder Thalassämien als Transplantate verwendet, um das maligne oder dysfunktionale Knochenmark zu ersetzen (Gratwohl *et al.* 2002, Verfaillie 2002).

Adulte Stammzellen haben als potenzielle Modellsysteme und Therapeutika gegenüber ES Zellen einen Vorteil: sie sind leicht zugänglich wie z.B. Knochenmarkstammzellen und das ethische Dilemma der Verwendung von Zellen aus menschlichen Embryonen ergibt sich nicht. Sie haben jedoch auch einen Nachteil: sie sind nicht pluripotent.

1.1.3 Krebsstammzellen

Krebsstammzellen, auch Tumorstammzellen oder Tumor-initiiierende Zellen genannt, werden als Ursprung von Malignomen betrachtet und weisen ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen auf: Selbsterneuerung und Differenzierungspotenzial (Visvader und Lindeman 2008). Es bestehen zusätzliche Gemeinsamkeiten zwischen embryonalen Stammzellen und Tumorstammzellen. Beide Zelltypen tragen auf der Zelloberfläche identische Marker, wie z.B. CD34, CD44, EpCAM oder CD133 (Atlasi *et al.* 2007, Dalerba *et al.* 2007, Gires *et al.* 2009, Prince *et al.* 2007, Visvader und Lindeman 2008, Yin *et al.* 2007). Sie bilden Stammzell- oder Tumorspezifische Antigene (Costa *et al.* 2007) und weisen eine sehr aktive Telomerase auf, was die Selbsterneuerung der Zellen erleichtert, in dem es die Replikation der Chromosomenenden ohne DNA Verlust unterstützt. Des Weiteren ist es auffällig, dass beide Zelltypen sich ähnlicher Signalwege bedienen (Reya und Clevers 2005, Reya *et al.* 2001). Diese Parallelen werden von mehreren Forschern dahingehend interpretiert, dass Krebsstammzellen unter bestimmten Bedingungen aus einer gesunden Stammzelle hervorgehen könnten (Visvader und Lindeman 2008).

Zwei Theorien versuchen die Entstehung von Tumoren zu erklären: die klonale Selektionstheorie und die Krebsstammzelltheorie. Bei der klonalen Selektionstheorie wird von sukzessiven Mutationen von somatischen Zellen ausgegangen. Die so entstandenen Tumorzellen sind in ihrem tumorigenen Potenzial ähnlich. Im Gegensatz hierzu wird bei der Krebsstammzelltheorie von einem hierarchischen Aufbau von Tumoren ausgegangen. Krebsstammzellen

haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und in alle Tumorzellen innerhalb von Malignomen aberrierend zu differenzieren. Diese Aussage wird auf Experimente verschiedener Forschungsgruppen gestützt, in denen aus nur wenigen Krebszellen in Mäusen wieder ein Originaltumor wuchs (Li *et al.* 2007, Ricci-Vitiani *et al.* 2007, Rosen und Jordan 2009, Visvader und Lindeman 2008). Krebsstammzellen ließen sich *ex vivo* anhand von Oberflächenmarkern von nicht-tumorigenen Krebszellen unterscheiden (Visvader und Lindeman 2008) und wiesen zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber Standardtherapien auf (Dylla *et al.* 2008). Krebsstammzellen sind resistent gegenüber Strahlen- und Chemotherapie und könnten aufgrund dessen für das Auftreten von Metastasen verantwortlich sein (Abb. 1.5). Trotz aller Untersuchungen konnte bis dato nicht geklärt werden, ob Krebsstammzellen den Ursprung bösartiger Proliferation darstellen (Mimeault *et al.*, 2007).

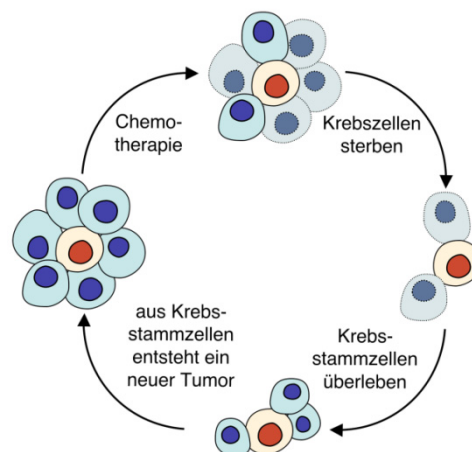


Abb. 1.5: Krebsstammzellen sind chemoresistent. Seit einigen Jahren wird angenommen, dass Krebsstammzellen resistent gegen Strahlen- und Chemotherapie sind und dass sie verantwortlich für das Auftreten von Metastasen sein könnten.

1.2 Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)

Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM; CD326) ist ein Ca^{2+} -unabhängiges, homotypisches Transmembranprotein, das aufgrund differentieller Glykosylierungen ein apparentes Molekulargewicht von 37 bis 42 kDa im Immunoblot aufweist (Chong und Speicher 2001, Pauli *et al.* 2003). EpCAM vermittelte Zell-Zell Adhäsion ist schwach im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. Cadherine (Litvinov *et al.* 1994a, Litvinov *et al.* 1997). Neben seiner Funktion als Adhäsionsmolekül wurde gezeigt, dass EpCAM mit verschiedenen Proteinen an der Membran wechselwirkt (Kuhn *et al.*

2007, Le Naour *et al.* 2006), Zellproliferation induziert und die Expression verschiedener Karzinom-assoziiierter Proteine verstärkt (Maetzel *et al.* 2009, Munz *et al.* 2009, Munz *et al.* 2004b).

EpCAM wird während der frühen Phase der Embryogenese und auch in nahezu allen adulten Epithelgeweben exprimiert (Cirulli *et al.* 1998, Cirulli *et al.* 1995, Litvinov *et al.* 1994a, Litvinov *et al.* 1994b, Moldenhauer *et al.* 1987, Trzpis *et al.* 2008a). EpCAM wurde 1979 als Kolorektalkarzinom-spezifisches Antigen erstmals beschrieben (Herlyn *et al.* 1979a) und wird in den meisten Karzinomen *de novo* bzw. überexprimiert (Went *et al.* 2004).

Seine Überexpression an der Zelloberfläche von Tumorzellen qualifiziert es zudem als Zielmolekül für Antikörper und rekombinanten Derivaten von Antikörpern bei der Entwicklung von Immuntherapien und innovativen Behandlungsverfahren von Krebspatienten (Armstrong und Eck 2003, Baeuerle und Gires 2007, Braun *et al.* 1999).

1.2.1 Gen- und Proteinstruktur von EpCAM

1.2.1.1 Die GA-733-Genfamilie und das *epcam* Gen

Das *epcam* Gen (*TACSTD1*, auch unter CO17-14, GA733-2, EGP-2, EGP40, KSA in der Literatur zu finden), gehört zur Genfamilie GA-733, die zwei Typ-I-Transmembranproteine umfasst: EpCAM (CD326) und Trop-2 (Epitheliales Glykoprotein 1, *tacstd2*) (Alberti *et al.* 1994, Gires 2008, Szala *et al.* 1990). Die Aminosäuren Sequenzhomologie von EpCAM und Trop2 beträgt 49% (Szala *et al.* 1990).

Der *epcam* Genlokus lokalisiert auf Chromosom 2p21 (Alberti *et al.* 1994; Calabrese *et al.* 2001, Szala *et al.* 1990) und hat eine Größe von 17,7 Kb. Im Promotorbereich des *epcam* Gens konnten Konsensus Bindungssequenzen für Inr (Initiator), SP-1, Ap-1, Ap-2, Ets, ESE-1 und E-pal-like (HLH) Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (McLaughlin *et al.* 2004). Es wurde weder eine TATA- noch eine CAAT-Box in diesem Bereich nachgewiesen (Linnenbach *et al.* 1993). Die starke Epithel-spezifische Expression des Gens wird von dem Promotorbereich 687 bp 5' vor dem Startkodon vermittelt. Die höchste Promotoraktivität besitzt dagegen den Bereich 177 bp vor der 5'-flankierenden Sequenz (Gires *et al.* 2003, McLaughlin *et al.* 2004). Faktoren wie NF κ B, TNF α und INF γ wurden als negative Regulatoren des EpCAM Promotors

identifiziert (Gires *et al.* 2003, Gires *et al.* 2001). Dagegen vermittelt TCF-4 (*T cell factor*), ein Transkriptionsfaktor, der zur TCF/LEF Familie gehört, eine positive Regulation (Yamashita *et al.* 2007).

Wie in der Abbildung 1.6 dargestellt, besteht das *epcam*-Gen aus neun Exons. Das erste Exon (AS: 1-26) kodiert für ein Signalpeptid, das für das Einschleusen des Moleküls in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und für den Golgi-vermittelten Transport an die Plasmamembran verantwortlich ist. Exons 2 bis 6 kodieren die extrazelluläre Domäne des Proteins. Diese Exons enthalten eine EGF-I- und EGF-II- (*epidermal growth factor*; AS: 27-135) ähnliche Domäne und eine Cystein-arme Region (CAR, AS: 136-266) Die Transmembrandomäne wird von Exon 7 (AS: 267-289) und die kurze intrazelluläre Domäne, das Stopp-Kodon und die 3'-untranslatierte Region werden von Exon 8 und 9 (AS: 290-315) kodiert.

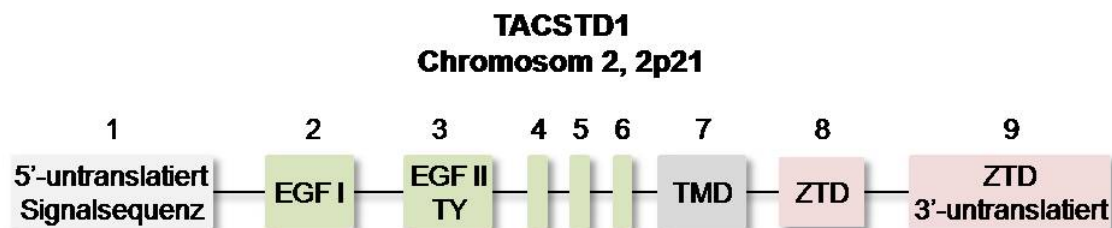


Abb. 1.6: Das *epcam* Gen. EpCAM besteht aus 9 Exons. Das erste Exon kodiert für eine Signalpeptidsequenz, Exon 2 bis 6 für die extrazelluläre Domäne von EpCAM (EpEX), Exon 8 kodiert für die Transmembrandomäne und Exon 9 kodiert die Intrazelluläre Domäne (EpICD). (EGF: EGF(*epidermal growth factor*)-ähnliche Domäne; TY: Tyroglobulinähnliche Domäne; TMD: Transmembrandomäne; ZTD: Zytoplasmatische Domäne). Abbildung adaptiert von Linnenbach (Linnenbach *et al.* 1993).

Die kodierende Sequenz der EpCAM mRNA umfasst 945 bp offenen Leserahmen, und hat eine Größe von ca. 1,5 Kb. Die 3'-untranslatierte Region enthält zwei besondere Motive (Perez und Walker 1989). Das erste Sequenzmotiv (ATTTA) wird als Signal für die spezifische Degradation von mRNAs von Zytokinen, Lymphokinen und einigen Proto-Onkogenen verantwortlich gemacht (Shaw und Kamen 1986). Das zweite Motiv (TTATTTAT) wurde als Konsensussequenz in der 3'-Region von Entzündungsmediatoren identifiziert (Caput *et al.* 1986). Da beide Sequenzen eine Rolle bei der posttranskriptionalen und translationalen Regulation der Genexpression von Entzündungsmediatoren spielen, könnte dies ein Anhaltspunkt dafür sein, das EpCAM ebenfalls auf dieser Ebene reguliert wird.

Es ist bisher eine pathogene Mutation des *epcam* Gens beschrieben. In Patienten mit *Congenital tufting enteropathy* (CTE) wurde eine homozygote G→A Substitution an der *Donor-Splice-Site* von Exon 4 nachgewiesen, die für eine unterschiedliche Isoform von EpCAM kodiert. Diese Mutation führt zur Deletion von Exon 4 und verursacht die Pathologie (Sivagnanam *et al.* 2008). Zuletzt zeichnet sich die Aminosäuresequenz von *epcam* durch eine hohe evolutionäre Konservierung aus und weist eine Homologie von 82% zwischen der humanen und der murinen Sequenz auf (Bergsagel *et al.* 1992). Hohe Sequenzhomologien zwischen humanem EpCAM und verwandten Sequenzen in Genomen mehrerer Säugetiere, Fische und Vögel wurden beschrieben (Linnenbach *et al.* 1993). Eine solche starke Konservierung weist stark auf eine essentielle Funktion dieses Moleküls hin.

1.2.1.2 Das EpCAM Protein

Das *epcam* Gen kodiert für ein 314 Aminosäuren umfassendes Polypeptid, das aus einer 23 Aminosäuren Leadersequenz, einer 242 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne mit zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen in dem Cystein-reichen N-Terminus, einer aus 23 Aminosäuren bestehenden Transmembran Domäne und einer 26 Aminosäuren relativ kurzen zytoplasmatischen Domäne besteht (Abb. 1.7) (Balzar *et al.* 1999b, Gires 2008).

Die 265 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne von EpCAM beginnt am N-Terminus mit einer Signalsequenz bestehend aus 11 hydrophoben Aminosäuren, die zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 durch Peptidasen gespalten wird (Szala *et al.* 1990). Sequenzanalysen der extrazellulären Domäne EpCAMs zeigten, dass der Cystein-reiche N-Terminus zwei EGF-ähnliche Wiederholungen mit den Motiven CX₁CX₈CX₇CX₁CX₁₀C (Position 27-59) und CX₃₂CX₁₀CX₅CX₁CX₁₆C (Position 66-135), gefolgt von einer Cystein-armen Region beinhaltet.

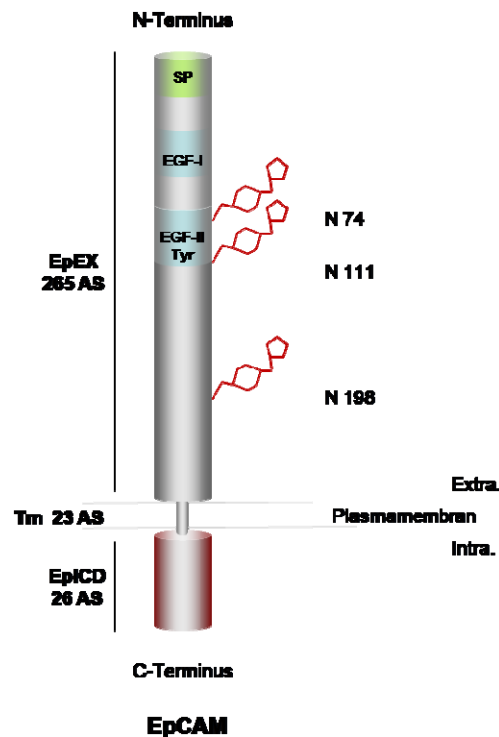


Abb. 1.7: Struktur des EpCAM Proteins. EpCAM besteht aus 314 Aminosäuren. Die Zahlen geben die Positionen der N-Glykosylierungen an Asparaginresten an. (SP: Signalpeptid, EGF: *epidermal growth factor-like repeat*, TM: Transmembrandomäne, ICD: zyttoplasmatische Domäne)

Es konnte gezeigt werden, dass diese zwei EGF-ähnlichen Domänen eine homophile Zelladhäsion ermöglichen, und dass diese Adhäsion Ca^{2+} -unabhängig verläuft (Abb. 1.8). Balzar und Kollegen postulieren, dass ein Tetramer aus EpCAM Molekülen mit einem EpCAM Tetramer auf einer angrenzenden Epithelzelle eine Verbindung eingeht (Abb. 1.8a). Die Bildung des Tetramers sowie die interzelluläre Assoziation von EpCAM Proteinen wird über die beiden EGF-Domänen vermittelt. Dabei ist die EGF-II Domäne für die laterale Interaktion von vier EpCAM Molekülen auf einer Zelloberfläche verantwortlich und die EGF-I Domäne reguliert die interzelluläre Bindung zwischen Tetrameren zweier benachbarter Zellen (Balzar et al, 2001). Bei der zweiten EGF-ähnlichen Domäne handelt es sich jedoch um eine Thyroglobulin (TY) Wiederholungsdomäne (Baeuerle und Gires 2007, Chong und Speicher 2001, Linnenbach *et al.* 1989). Es ist bekannt, dass Thyroglobulin Domänen häufig als EGF-ähnliche Domänen fehlgedeutet werden (Novinec *et al.* 2006). Je nachdem, welche Annahme für den Bereich der extrazellulären Domäne zutreffend ist, ergeben sich zwei unterschiedliche Proteinstrukturen (Abb. 1.8b).

Die Transmembran Domäne von EpCAM enthält 23 hydrophobe Aminosäuren. Im Anschluss befindet sich die auffällig kurze intrazelluläre Domäne von EpCAM, die nur aus 26 Aminosäuren besteht. Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne konnten ein Internalisierungsmotiv (NPXY) und zwei Konsensussequenzen (RKKRMAK) für die Bindung des Zytoskelett-interagierenden Proteins α -Aktinin identifiziert werden (Position 289-296 und 304-314) (Balzar *et al.* 1998).

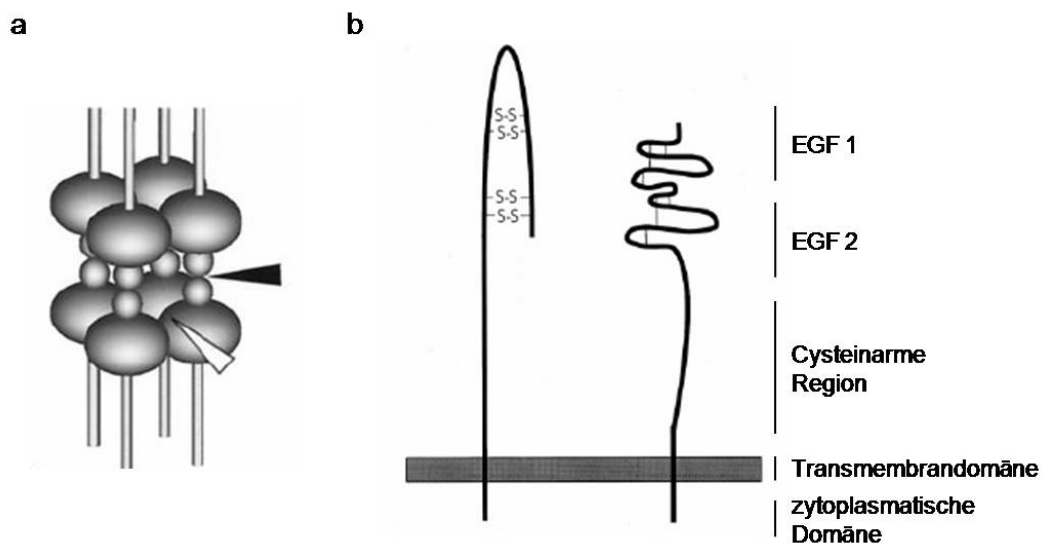


Abb. 1.8: EpCAM Struktur und homotypische Bindungsstellen. (a) Abgebildet sind zwei interagierende EpCAM Tetramere auf gegenüberliegenden Zellmembranen. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die interzelluläre Assoziation vermittelt über die EGF-1 Domäne. Für die laterale Interaktion zur Formierung von Tetrameren auf einer Zelloberfläche ist die EGF-2 Domäne (weißer Pfeil) verantwortlich (Balzar *et al.* 2001). (b) Schematische Darstellung zweier EpCAM Modelle. Das erste Modell zeigt eine schleifenförmige Struktur des Transmembranproteins (Schon *et al.*, 1994), das zweite zeigt ein Modell, das den extrazellulären Aminosäureabschnitt in zwei EGF-ähnliche Domänen und eine Cystein-arme Region unterteilt (verändert nach Balzar (Balzar *et al.* 1999a). Es folgen die Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre Domäne.

1.2.1.3 N-Glykosylierung von hEpCAM

EpCAM kommt in unterschiedlichen post-translational modifizierten Formen vor (Abb. 1.9). Die Aminosäuresequenz, inklusive der notwendigen Asparagine zu Anheftung von Zuckerresten, deutet auf drei potentielle Glykosylierungsstellen (AS: 74, 111, 198). Alle drei Positionen werden mit Mannose-Oligosachariden modifiziert (Durbin *et al.* 1990, Pauli *et al.* 2003, Schon *et al.* 1994, Thampoe *et al.* 1988).

In Karzinomen können EpCAM Moleküle mit unterschiedlichen Größen (34, 40 und 42 kDa) detektiert werden, welche auf eine differentielle Glykosylierung zurückgehen (Pauli *et al.* 2003). EpCAM ist in gesundem Epithel häufig schwach glykosyliert, dagegen liegt EpCAM im Tumorgewebe hyperglykosyliert vor. Ob es Unterschiede in der Funktion der unterschiedlichen Glykosylierungsformen gibt, ist bis *dato* unerforscht. *In vitro* wurde der Einfluss der N-Glykosylierung auf die Proteinstabilität an der Plasmamembran untersucht. Die Punktmutation von Asp¹⁹⁸ zu Alanin verursachte eine dreifache Reduktion der Verweilzeit von EpCAM Molekülen an der Plasmamembran von Tumorzellen (Munz *et al.* 2008).

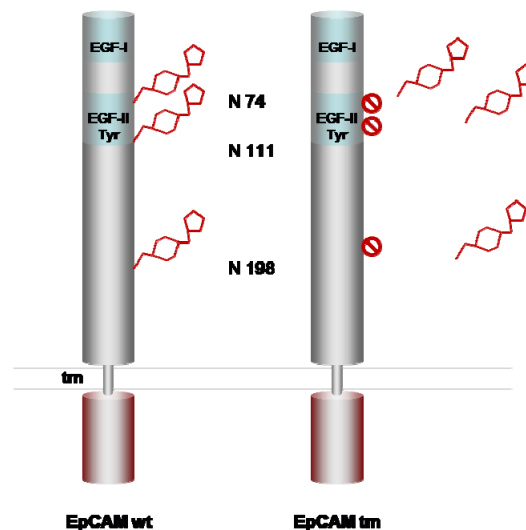


Abb. 1.9: Struktur von Wildtyp und mutantern hEpCAM: Das humane EpCAM Protein (links) kann an den Asparaginresten 74, 111 und 198 glykosyliert werden. Diese 3 Aminosäuren wurden genetisch modifiziert, so dass das resultierende Protein (rechts) nicht mehr glykosylierbar ist.

1.2.2 Funktion von EpCAM und des EpCAM Signalkomplexes

Wie bereits erwähnt ist EpCAM in der homophilen Zelladhäsion involviert. EpCAM wurde an der Oberfläche von interagierenden Zellen nachgewiesen und nimmt in gesunden Epithelien eine basolaterale Lokalisation ein (Litvinov *et al.* 1994a, Litvinov *et al.* 1994b). Des Weiteren interagiert EpCAM über die zytoplasmatische Domäne mit α -Aktinin und dem Aktin Zytoskelett. Die Behandlung von EpCAM positiven Zellen mit dem Aktin-Depolymerisationsagenz Zytochalasin D zerstörte die EpCAM-vermittelten Adhäsion (Balzar *et al.* 1998).

Eine Überexpression von EpCAM in Zellen, die über Cadherine eine interzelluläre Wechselwirkung eingehen, führt zu einer Reduktion der Cadherin-vermittelten Adhäsion und eine Erhöhung der EpCAM-vermittelte Adhäsion (Litvinov *et al.* 1997). Die Anzahl der Cadherin Moleküle wird dabei in der Zelle nicht beeinflusst, vielmehr wird die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett gestört. Parallel wird die α -Catenin Proteinmenge reduziert, die Menge an β -Catenin hingegen bleibt konstant. Die Lokalisation von β -Catenin wechselt jedoch bei einer Überexpression von EpCAM von der unlöslichen in die lösliche Fraktion von Zelllysaten. Zytoplasmatische Deletionsmutanten von EpCAM demonstrierten diesen Effekt auf die Cadherin vermittelte Adhäsion nicht. Daher wurde angenommen, dass der zytoplasmatische Teil von EpCAM über die Bindung von α -Aktinin in der Regulation der Cadherin-vermittelten Adhäsion involviert ist (Balzar *et al.* 1998). Die Regulation von Cadherin erfolgt vermutlich über einen Signalweg, der die Phosphoinositol-3-Phosphat Kinase (PI3K) involviert, wie unter Verwendung von Inhibitoren von PI3K nachgewiesen wurde (Winter *et al.* 2007).

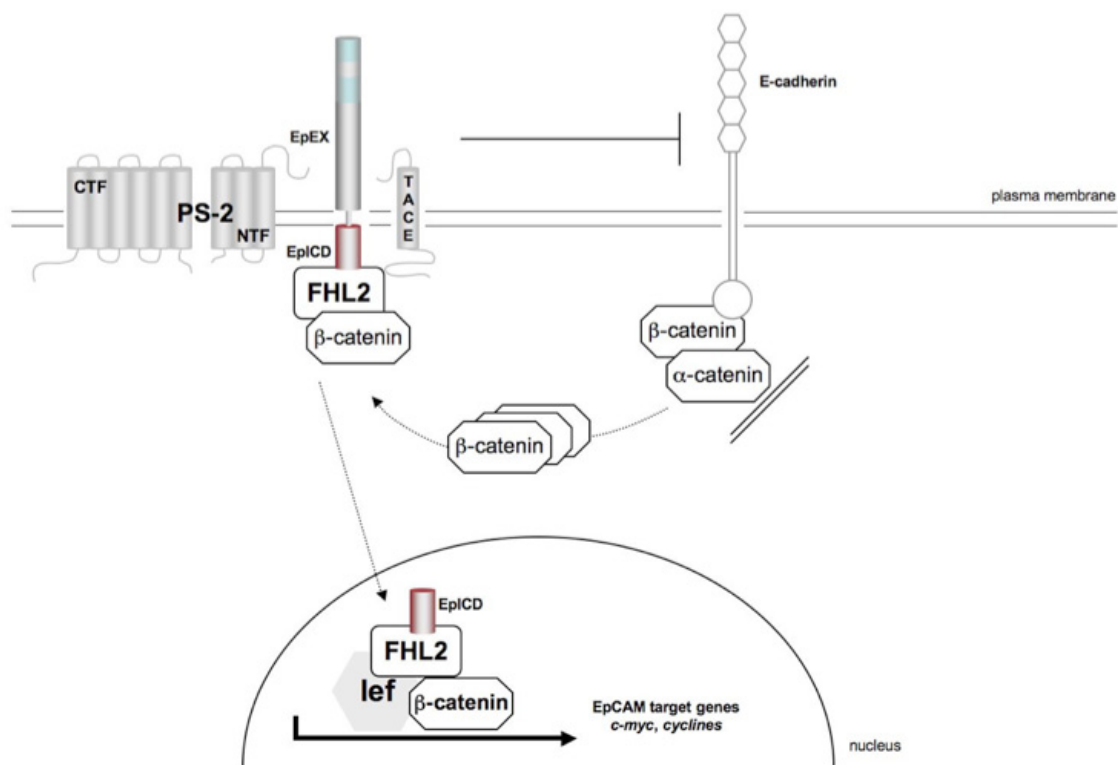


Abb. 1.10: EpCAM Signalling. Die vermittelte Signaltransduktion von EpCAM basiert auf die regulierte Intramembranproteolyse (RIP). Die proteolytische Spaltung erfolgt durch TACE und PS2. (EpEX: extrazelluläre Domäne von EpCAM, EpiCD: intrazelluläre Domäne von EpCAM, PS2: Presenilin 2, TACE: *tumor necrosis factor- α converting enzyme*)

Es ist zusätzlich bekannt, dass die EpCAM Expression die Proliferation induziert und dass die ektopische Expression des Moleküls eine erhöhte Expression von c-Myc und Zyklin A und E zur Folge hat (Munz *et al.* 2004b). Diese Ergebnisse wiesen erstmals auf die Fähigkeit EpCAMs hin, Signale in den Kern zu vermitteln und somit die Expression von Zielgenen, die an der Regulation der Zellproliferation und des Metabolismus beteiligt sind, zu induzieren.

Die Signaltransduktion von EpCAM basiert zunächst auf einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) des Proteins, ein bekannter Mechanismus der Rezeptoraktivierung, welcher bei mehreren membranständigen Rezeptoren bereits beschrieben wurde (Mumm und Kopan 2000).

Die proteolytische Spaltung EpCAMs in der extrazellulären Domäne erfolgt durch das Enzym TACE (Tumornekrosefaktor α konvertierendes Enzym) und ist Voraussetzung für das zweite Prozessieren des Moleküls durch den Presenilin-Typ γ -Sekretase (PS) Komplex. Durch RIP kommt es zur Freisetzung von EpEX (extrazelluläre Domäne), welche *in vitro* als löslicher Ligand intakter EpCAM Moleküle dient. Gleichzeitig wird die intrazelluläre, signaltransduzierende Domäne EpICD freigesetzt. Spezifische Inhibitoren von PS und TACE verhindern die Spaltung von EpCAM und haben einen EpCAM-spezifischen negativen Einfluss auf das Zellwachstum (Maetzel *et al.* 2009).

Das FHL2 (*four and a half LIM domain*) Protein wurde als direkter Interaktionspartner von EpCAM bestätigt. Die vierte LIM-Domäne von FHL2 ist essentiell für die Bindung an EpICD, während die zweite und dritte LIM-Domäne β -Catenin und Lef-1 binden (Labalette *et al.* 2004, Martin *et al.* 2002). Der gesamte EpICD/FHL2/ β -Catenin/Lef-1 Kernkomplex transloziert in den Zellkern und steuert die Transkription des *c-myc* Gens (Abb. 1.10) (Maetzel *et al.* 2009, Munz *et al.* 2009).

Als Ligand für EpCAM wurde die Ektodomäne EpEX (extrazelluläre Domäne von EpCAM) identifiziert, welche nach der Spaltung von EpCAM durch das Enzym TACE als löslicher Ligand vorliegt. Als initiales Signal wird eine Aggregation von EpCAM Molekülen an der Membran und auf gegenüber liegenden Zellen postuliert, da EpCAM Moleküle auf Einzelzellen, die ohne Zell-Zell Kontakte vorliegen, meist als intakte Proteine vorkommen. Die Existenz

eines weiteren spezifischen Ligands von EpCAM ist bis *dato* noch nicht bekannt.

1.2.3 Expressionsmuster von EpCAM

1.2.3.1 EpCAM in gesunden Geweben

Die Expression von EpCAM ist bei Prozessen der Entwicklung und Morphogenese essentiell (Trzpis *et al.* 2008a, Trzpis *et al.* 2007a). EpCAM ist in befruchteten Oozyten nachweisbar und in Zygoten bereits in dem Zweizellstadium der Morulation exprimiert (Tarmann *et al.* 1990). Im Verlauf der Embryogenese wird EpCAM in fötalen Lungen-, Nieren-, Leber-, Pankreas- und Hautzellen exprimiert (Anderson *et al.* 1999, Cirulli *et al.* 1998, Cirulli *et al.* 1995, Kasper *et al.* 1995, Tarmann *et al.* 1990). Epithelzellen der Lunge exprimieren auch beim Erwachsenen EpCAM, während Hepatozyten ihre EpCAM Expression in der Erwachsenenleber verlieren (de Boer *et al.* 1999, Kasper *et al.* 1995). Interessanterweise repopulieren nach einem Leberschaden EpCAM⁺ Zellen das Organ, welche nach terminaler Differenzierung in Hepatozyten erneut EpCAM-negativ sind (de Boer *et al.* 1999). Ein ähnliches Expressionsmuster von EpCAM wurde nach einer Ischämie bei einer Regeneration der Niere in Ratten beschrieben (Trzpis *et al.* 2008b, Trzpis *et al.* 2007b).

Die EpCAM Expression ändert sich in adulten Organismen. EpCAM wird an der basolateralen Membran von allen einfachen, Pseudo- Platten- und Übergangsepithelgeweben, und im Drüsengewebe exprimiert. Im Gegensatz dazu sind gesunde Plattenepithel-, Mesenchymale-, Muskel- und Neuroendokringewebe im adulten Menschen EpCAM negativ (Bumol *et al.* 1988, Momburg *et al.* 1987). Im Gegensatz zu murinen Lymphozyten, konnte in humanen B- und T-Zellen keine Expression von EpCAM nachgewiesen werden (Borkowski *et al.* 1996, Nelson *et al.* 1996).

Die Expressionsstärke von EpCAM variiert zwischen einzelnen Geweben sehr stark. Kolongewebe weist eine sehr hohe Expression auf, das Dünndarmepithel exprimiert EpCAM intermediär und das Magenepithel sehr schwach (Momburg *et al.* 1987). In der Haut kommt es zu einer Expression von EpCAM in den Schweißdrüsen und in der proliferativen Zone der Haar-Follikel. Dagegen weisen Keratinozyten und Melanozyten keine EpCAM-Expression auf

(Momburg *et al.* 1987, Tsubura *et al.* 1992). Die meisten Zellen der Niere exprimieren EpCAM. Auch das ductale Gewebe und Inselzellen des Pankreas sind EpCAM positiv (Cirulli *et al.* 1998, Momburg *et al.* 1987). Die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Hypophyse, adrenale Drüsen) sowie die Trachea, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen im unteren Respirationstrakt weisen ebenfalls eine EpCAM Expression auf. Des Weiteren exprimieren Gewebe des weiblichen und männlichen Genitaltraktes (Ovarien, Zervix, Uterus, Testis und Prostata) EpCAM ebenfalls in unterschiedlichen Stärken (Litvinov *et al.* 1996, Tsubura *et al.* 1992).

1.2.3.2 *EpCAM bei Tumorprogression und Metastasierung*

In einer Vielzahl von epithelialen Gewebe korreliert die benigne oder maligne Proliferation mit einer verstärkten oder *de novo* Expression von EpCAM (Litvinov *et al.* 1996, Zorzos *et al.* 1995). Dieses Phänomen ist besonders auffällig in Geweben, die normalerweise keine oder nur geringe Mengen von EpCAM exprimieren.

Im frühen Stadien von Neoplasien der Zervix kommt es beispielsweise zu einer *de novo* Expression in atypisch dedifferenzierten Bereichen des Plattenepithels. Der Grad der EpCAM Expression nimmt deutlich mit dem Grad der Neoplasie zu (Litvinov *et al.* 1996). Eine starke EpCAM Expression wurde zudem bei Dünndarm-, Kolon-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebs nachgewiesen (Spizzo *et al.* 2006, Spizzo *et al.* 2004, Went *et al.* 2005, Went *et al.* 2006, Went *et al.* 2004). Neuronale Tumoren, Melanome, Sarkome und Lymphome weisen keine EpCAM Expression auf. Dies erlaubt EpCAM als einen streng epithelialen prognostischen und therapeutischen Marker zu verwenden (Armstrong und Eck 2003, Baeuerle und Gires 2007, Went *et al.* 2006, Went *et al.* 2004). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine starke Expression von EpCAM in der Mehrheit von Karzinomentitäten mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Diese Beobachtung hat bei Brust-, Prostata-, Kolon-, Pankreas- und Ösophaguskarzinomen, so wie Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches Gültigkeit (Fong *et al.* 2006, Stoecklein *et al.* 2006, Varga *et al.* 2004, Went *et al.* 2006). Dagegen sind nur wenige Krebserkrankungen bekannt, bei denen die Expression von EpCAM mit einer guten Überlebensprognose korreliert, wie bei Subtypen von Lungenkarzinomen, beschrieben (Went *et al.* 2006).

Im Hinblick auf die metastasierungsfördernden Eigenschaften von EpCAM sind die Beobachtungen nicht so eindeutig. Einige Untersuchungen weisen eine verstärkte Präsentation des Adhäsionsmoleküls auf der Oberfläche disseminierter Karzinomzellen auf (Chaubal *et al.* 1999, Momburg *et al.* 1987). Dagegen wurde eine reduzierte Expression von EpCAM in Metastasen beobachtet (Takes *et al.* 2001, Winter *et al.* 2003a, Winter *et al.* 2003b).

1.3 Tiermodelle

Eine der gängigsten molekularbiologische Methode zur Untersuchung von Genfunktionen ist die Methode der Überexpression (*gain of function*) eines Gens *in vivo* mit Hilfe eines Tiermodells. Die Hausmaus (*Mus musculus*) ist aufgrund ihrer anatomischen, physiologischen und genetischen Ähnlichkeit zum Menschen ein besonders geeignetes Modellsystem zum Studium von zell- und entwicklungsbiologischen Vorgängen (van der Weyden *et al.* 2002). Die Gestationszeit beträgt je nach Mausstamm etwa 19-21 Tage und die physiologischen Daten zur Reproduktionsbiologie und Embryonalentwicklung sind sehr detailliert beschrieben. Aufgrund dieser kurzen Gestationszeit sind Mausstämme hervorragende Modelltiere, die eine Untersuchung von zell- und molekularbiologischen Vorgängen innerhalb einer durchführbaren Zeit *in vivo* erlauben.

1.3.1 Transgene Mäuse

Transgene Mäuse sind Tiere, deren Genom eine oder mehrere gezielte Mutation/en tragen und diese Mutation stabil an ihre Nachkommen weitergeben. Die ersten genetisch modifizierten Mäuse wurden erzeugt, indem ein linearisiertes DNA Fragment (Transgen) in den männlichen Vorkern von befruchteten Oozyten, die aus Spenderweibchen stammten, injiziert wurde (Abb. 1.11a). Anschließend wurden die mittels Mikroinjektion veränderten Oozyten in scheinträchtige Empfängertiere implantiert, die Nachkommen hervorbrachten, welche die transgene DNA ins Genom integriert hatten (Brinster *et al.* 1981, Palmiter und Brinster 1986).

Ein transgenes Konstrukt besteht aus einem ausgewählten *enhancer* und/oder Promotor, der cDNA des zu untersuchenden Gens, das gewebespezifisch oder zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt exprimiert werden soll, sowie

einem Polyadenylierungssignal (polyA). Da die Insertion des Transgens zufällig erfolgte, können unerwünschte Nebenwirkungen auftreten und Analysen erschweren (Boehm *et al.* 1997).

Eine Alternative zur Herstellung transgener Tiere liegt in der Mikroinjektion von genetisch modifizierten murinen embryonalen Stammzellen in Mausblastozysten. Die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von murinen ES Zellen (Evans und Kaufman 1981), deren Eigenschaft selbst nach *in vitro* Kultivierung in Zellkultur die Keimbahn der Maus besiedeln (Bradley *et al.* 1992) und, dass sie zur genetischen Manipulation und anschließender Mikroinjektion in Blastozysten genutzt werden können (Kuehn *et al.* 1987), waren ausschlaggebend für die Entwicklung der *gene targeting* Technologie (Abb. 1.11b).

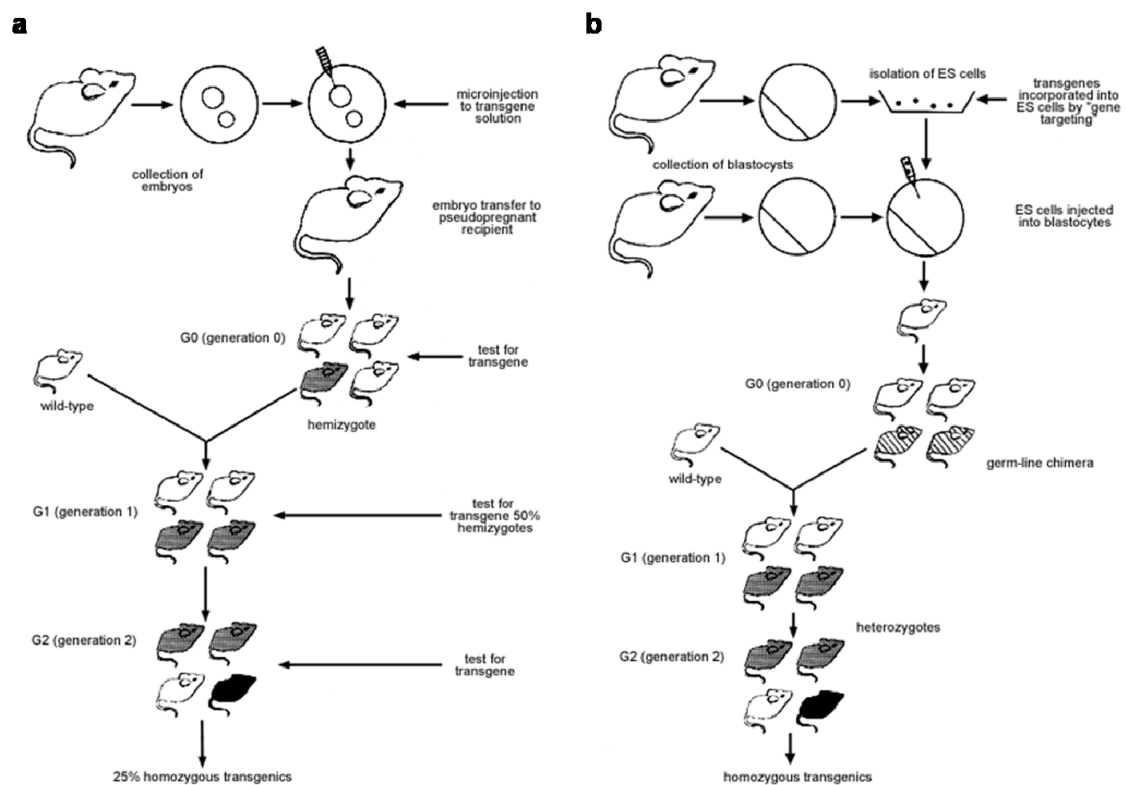


Abb. 1.11: Generierung genetisch modifizierter Mäuse. (a) Die ersten genetisch modifizierten Mäuse wurden durch die Injektion eines linearisierten DNA Fragments (Transgen) in den männlichen Vorkern von befruchteten Oozyten, die aus Spenderweibchen stammten. Die veränderten Oozyten wurden mittels Mikroinjektion in scheinträchtige Empfängertiere implantiert. (b) Herstellung transgener Tiere mittels Mikroinjektion von gezielt genetisch modifizierten murinen embryonalen Stammzellen (*gene targeting*) in Mausblastozysten (Mephram *et al.* 1998).

1.3.2 Konventionelles *gene targeting*

Der Austausch von DNA Sequenzen zwischen zwei Chromosomen wird als Rekombination bezeichnet. Homologe Rekombination ist ein natürlicher Prozess, der in allen Organismen vorkommt und der zur Entstehung von genetischer Diversität und der Reparatur geschädigter DNA dient.

Als *gene targeting* wird die gezielte Mutagenese von Genen mittels provozierter homologer Rekombination bezeichnet. Dafür wird ein Konstrukt, das Sequenzhomologien zum Zielgen und einen positiven Selektionsmarker (normalerweise Geneticin G418) enthält, in ES Zellen eingeführt (Abb. 1.12). Die positiven Selektionsmarker erlauben ES Zellen, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert haben, unter Selektionsbedingungen zu überleben. Nach einer Überprüfung der homologen Rekombination werden die selektierten ES Zellen in Blastozysten injiziert und in den Uterus von scheinträchtigen Mäusen transferiert. Wie schon erwähnt sind genetisch modifizierte ES Zellen in der Lage den Mausembryo zu besiedeln. Die geborenen Chimären werden mit Wildtyp Mäusen verpaart. So wird festgestellt, ob während der Embryoentwicklung aus genetisch veränderten ES Zellen Keimbahnzellen hervorgegangen sind. Heterozygote Tiere können miteinander verpaart werden, mit dem Ziel homozygote Mäuse zu generieren. Diese Technologie ermöglicht die gezielte Inaktivierung von endogenen Genen (*knockout*), die Insertion neuer ausgewählter Gene oder DNA Fragmente in einen bestimmten *Locus* unter die Kontrolle eines endogenen Promoters (*knock-in*), sowie Veränderungen wie Punktmutationen und chromosomale Neuordnungen (Bockamp *et al.* 2002).

Ein mit diesem System verbundenes Problem ist, dass einige Gene während der Embryogenese essentiell sind (*knockout*) oder die Insertion eines neuen Genes (*knock-in*) letale Konsequenzen hervorbringen kann. Etwa 14 % der murinen Gene sind für die Entwicklung essentiell und führen zu embryonal letalen Phänotypen, so dass eine postnatale Analyse der Genfunktion ausgeschlossen ist (Wilson *et al.* 2005). Um diese Nachteile zu umgehen, wurde das konditionale *gene targeting* entwickelt. Diese Technik ermöglicht die Entfernung der Selektionskassetten sowie die Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression *in vitro* oder *in vivo* in einzelnen Zellen und/oder einzelnen Geweben. Zusätzlich ermöglicht das konditionale *gene targeting* die An- oder Ausschaltung der Genexpression zum gewünschten Entwicklungszeitpunkt.

Dieser Prozess verhindert die embryonale Letalität, die durch die Veränderung des Genoms hervorgerufen werden könnte.

1.3.3 Konditionales *gene targeting* mit Hilfe des Cre/loxP Systems

Das Cre/loxP-System stammt aus dem Bakteriophagen P1. Das 38kDa Cre Enzym (Cre=*causes recombination*) katalysiert die ortsspezifische Rekombination zwischen DNA-Zielsequenzen von jeweils 34 bp, den loxP Elementen (*locus of crossing over*). Jedes loxP Element besteht aus 2 umgekehrten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) von 13 bp, die ein asymmetrisches Zwischenelement (*spacer*) flankieren. Eine Cre-vermittelte Rekombination zwischen 2 loxP-Elementen geschieht mit Basenpaargenauigkeit (Austin *et al.* 1981, Sauer und Henderson 1988). Die DNA wird geschnitten und im asymmetrischen Zwischenstück religiert. Liegen beide loxP Elemente in gleicher Orientierung auf dem gleichen DNA-Strang (*in cis*), so führt dies zum Ausschneiden der dazwischen liegenden Sequenz (Abb. 1.11). Inversionen und Translokationen sind ebenfalls möglich.

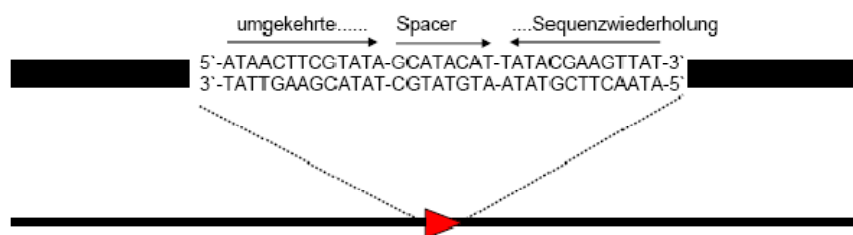


Abb. 1.12: Struktur eines loxP Elementes (*locus of crossing over*). Das Enzym Cre erkennt spezifische 34 bp loxP Zielsequenzen und induziert an loxP-flankierten DNA Molekülen ein Rekombinationsereignis.

Um ein Zielgen mit Hilfe des Cre/loxP-Systems konditional an- oder auszuschalten, müssen zunächst durch *gene targeting* in ES Zellen zwei loxP Elemente in das Zielgen eingebracht werden. Um einen Knockout zu erreichen, wird üblicherweise ein essentielles Exon von loxP Elementen (*gefloxte Maus*) flankiert. Um einen Knock-in zu erzielen, wird der kodierenden Sequenz des zu untersuchenden Gens eine loxP flankierte Stopp Kassetten vorangeschaltet. In Abwesenheit von Cre bleibt bei der Knockout Maus das gefloxt Element intakt und das Gen wird exprimiert. Bei der Knock-in Maus wird das Gen nicht exprimiert, da die Transkription durch die Anwesenheit der Stopp Kassetten verhindert wird (Abb.1.13). Die Cre Rekombinase wird transgen in einer zweiten

Maus exprimiert. Durch die gezielte Wahl der regulatorischen Elemente, unter deren Kontrolle Cre gebracht wird, kann die Expression und somit auch die Expression des Knock-ins oder der Knockout des Zielgens von Cre gezielt kontrolliert werden (Koresawa *et al.* 2000).

Die Induktion von Cre kann bei Verwendung von einem ubiquitären Promoter in allen Zellen erfolgen. Andererseits kann die Induktion von Cre bei Verwendung von Zelltyp-spezifischen Promotoren, nur in bestimmten Zellen, oder bei Verwendung von induzierbaren Promotoren nur zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgen. Zur konditionalen An- oder Ausschaltung des Zielgenes kommt es, wenn die transgene *Knock-in* oder *Knockout* Maus und die Cre-Maus miteinander gekreuzt werden. Die Kreuzung beider Mausstämme induziert die gewebe- oder entwicklungsspezifische Aktivierung der Cre Rekombinase und die Rekombination zwischen den 2 loxP Elementen im Genom findet statt (Schnutgen 2006, Schnutgen *et al.* 2006).

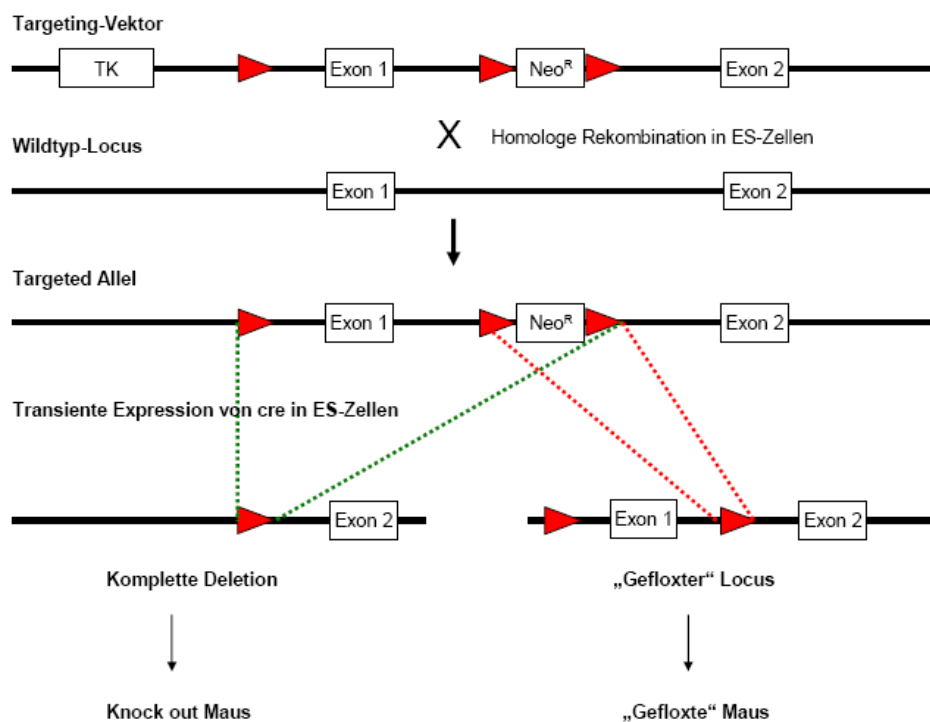


Abb. 1.13: Beispiel der Strategie zur Generierung konditionaler Allele in der Maus. Im *targeting* Vektor wird das Neomycinresistenzgen mit loxP Sequenzen flankiert. Der *targeting* Vektor enthält eine positive Selektionskassette (*neo*), die von FRT Zielsequenzen flankiert wird. Nach der Elektroporation des Vektors in ES Zellen und der Selektion für Rekombinanten wird das *neo* Gen entweder in ES Zellen, in der Maus oder in Oozyten mittels FLP vermittelter Rekombination ausgeschnitten. Homozygote Mäuse für das konditionale Allel werden dann mit Mäusen verpaart, die Cre ubiquitär, gewebe- oder zeitspezifisch exprimiert, wodurch das loxP flankierte Exon 1 aus dem Zielgen deletiert und ein *Knockout* Allel erzeugt wird (Schnutgen 2006, Schnutgen *et al.* 2006).

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein integrales Transmembranprotein, welches in einer Vielzahl von Karzinomen im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert vorliegt. EpCAM dient daher als prognostischer und diagnostischer Marker und als Zielmolekül im Rahmen von Krebsbehandlungen mit therapeutischen Antikörpern. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wiesen erstmals auf eine Funktion EpCAMs als Signaltransduzierender Rezeptor, der die Proliferation und den Metabolismus von Karzinomzellen beschleunigt bzw. erhöht hin. In Tumor-initiiierenden Zellen (Krebsstammzellen) wird EpCAM gemeinsam mit Markern wie CD133 und CD44 stark überexprimiert und ist somit Teil der Signatur, welche Krebsstammzellen *ex vivo* definiert. In gesunden adulten Vorläuferzellen der Leber und der Niere wurde ebenfalls eine *de novo* Expression von EpCAM bei einer Geweberegeneration beschrieben. Eine mögliche Beteiligung EpCAMs am Phänotyp gesunder embryonaler Stammzellen ist bis *dato* unerforscht. Des Weiteren existiert bislang kein *in vivo* Modell zur Analyse der Funktion des humanen EpCAM Proteins in einer gewebsspezifischen und zeitlich definierten Weise.

Die **Ziele** der vorliegenden Arbeit waren folglich:

1. Die molekulare Charakterisierung der Funktion von murinem EpCAM in gesunden embryonalen Stammzellen unter Verwendung von ektopischen Expressionssystemen und siRNA-vermittelter Hemmung der endogenen Expression von mEpCAM.
2. Die Entwicklung zellulärer Systeme zur konditionalen Expression von humanem EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen, welche der Generierung eines transgenen Mausmodells dienen sollen.

2. MATERIALIEN

2.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien

Artikel	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
4-Hydroxytamoxifen (Tam)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agarose	SERVA GmbH, Heidelberg
Agarose, low melting point	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ampizillin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Anorganische Säuren, Salze, Basen	Merck KGaA, Darmstadt
Amonium Persulfat	BioRad, Kalifornien (USA)
Ak Serum	Biotest AG, Dreieich
Bromphenolblau	SERVA GmbH, Heidelberg
Butanol	Merck KGaA, Darmstadt
CD CHO Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DMEM	Biochrom AG, Berlin
dNTPs	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ECL Blotting Substrat	PIERCE, Rockford (USA)
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
ESGRO [®] LIF	Millipore, Schwalbach
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Fast Blue BB salt	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418 Sulfat (Zellkultur getestet)	Merck KGaA, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glyzerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hematoxylin	Merck KGaA, Darmstadt

HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
IPTG	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Luria Broth (Miller's modification)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Carl Roth GmbH <i>und</i> Co. KG,
Milchpulver	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Neomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligonukleotide	Metabion International AD, Planegg
Paraffin	Vogel GmbH
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptavidin	Biochrom AG, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	
Complete	Roche Diagnostics, Mannheim
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Sarcosyl	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Sephadex G25 Medium	GE Healthcare, Freiburg
StemPAN Gmem ohne LIF	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Spermidin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Superblock [®] Blocking Buffer	PIERCE, Rockford (USA)
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	IBA GmbH, Göttingen
TEMED	BioRad, Kalifornien (USA)
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypton	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween	SERVA GmbH, Heidelberg
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese	
Dokumentation	CyberTech, Berlin
Agarosegel-Elektrophoresekammern	GE Healthcare, Freiburg
Bench-top radioisotope Counter	Bioscan, Washington DC (USA)
Blotting-Kammer	BioRad, München
Durchflusszytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
Elektrophorese-Netzgeräte	BioRad, California (USA)
ELISA-Reader „EIX800“	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Einkanalpipette „Transferpette“	Brand GmbH, Wertheim
Feinwaage „CP 4202 S“	Sartorius, München
Filmentwicklungsmaschine „Curix 60“	Agfa Healthcare GmbH, Berlin
Filmentwicklungskassette	GE Healthcare, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 mit hochauflösender Digital-Videokamera	Carl Zeiss AG, Jena
„Gene Pulser II“ System	BioRad, California (USA)
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Glaswaren	Schott AG, Jena
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus Holding GmbH, Hanau Leica Microsystems GmbH,
Konfokales Laserscan-Mikroskop (KLSM)	Wetzlar
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer, Heizblock „IKamag REO“	Janke & Kunkel, Staufen

Mikroliterpipetten „Labmate“	Abimed GmbH, Langenfeld
Mikrowelle	AEG, Berlin
Netzteil Elektrophorese „PowerPac 200“	BioRad, Kalifornien (USA)
Phasenkontrastmikroskop „Standard 25“	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter 197	WTW, Weilheim
Sicherheitswerkbank HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Stickstoff-Kühlagereinrichtungen	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektionssystem „Nucleofector“	AMAXA, Köln
Vortex Mixer Reax1	IKA Works Inc., Wirmington (USA)
Wasserbad 13a	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 46 R	Sorvall, Bad Homberg

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
3MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Chamber Slides (Glas, Permanox) „Chambered Coverglass, 1.5“	Thermo Fischer GmbH, Schwerte
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
Elektroporationsküvetten (4mm)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
„Hyperfilm“ ECL	GE Healthcare, Freiburg
„Immobilon-P“ Membran	Millipore, Schwalbach
„Immobilon-Ny+transfer“ Membran	Millipore, Schwalbach
Objektträger „SUPERFROST“ PLUS	Thermo Fischer GmbH, Schwerte
Parafilm [®] M	Pechiney Plastic Packaging Company
Pipettenspitzen	Biozym Diagnostic GmbH, Wien (Österreich)
Plastikware	Nunc [™] , Wiesbaden
Reagenzreservoir	Costar [®] , New York (USA)

Sephadex G-50 Säulen	GE Healthcare, Freiburg
Skalpelle	Feather/PMF, Köln
Spritzen (5, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkultur-Multiloch-Platten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen- und schalen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.3 Radioaktive Isotope

Tab. 2.4: In dieser Arbeit verwendete Isotope

Isotop	Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	GE Healthcare, Freiburg

2.4 Verwendete Antikörper

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller
α -Aktin	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg
α -c-myc	Maus IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg
α -HA-HBF10	Ratte IgG ₁	Roche Diagnostics, Mannheim
α -hEpCAM (A-20)	Ziege IgG	Santa Cruz Boitechnology, Heidelberg
α -hEpCAM (Ho-3)	Maus IgG _{2a}	Trion Pharma München, München
α -mEpCAM	Ratte IgG _{2a} , K	BD Biosciences, Heidelberg
α -mEpCAM	Meerschweinchen	PSL GmbH, Heidelberg
α -Oct 3/4	Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge (USA)
α -SSEA1	Maus IgGM	Santa Cruz Boitechnology, Heidelberg
α -SSEA-4	Ziege IgG ₃	Santa Cruz Boitechnology, Heidelberg
α -Sox	Ziege IgG	Santa Cruz Boitechnology, Heidelberg

Tab. 2.6: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Sekundäre Ak, Detektionssystem	Hersteller
Alexa 488 Ziege- α -Maus	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa 488 Ziege- α -Ratte IgG (H+L)	Molecular Probes, Karlsruhe
APAAP Maus monoclonal	Dako, Glostrup (Dänemark)
Avidin-Biotin-PO-Complex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -Maus IgG, FITC-konjugiert	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)
Biotinylated α -Ratte IgG (H+L), Maus adsorbed	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Ziege- α -Meerschweinchen IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Kaninchen- α -Ziege IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Ziege- α -Maus IgM (M chain)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Brückenantikörper Kaninchen- α -Maus Ig	Dako, Glostrup (Dänemark)
FITC Ziege- α -Kaninchen	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
FITC Ziege- α -Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fluorescein α -Ratte IgG (H+L), Maus adsorbed	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
HPR Kaninchen- α -Meerschweinchen	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
HRP Kaninchen- α -Ratte	Dako, Glostrup (Dänemark)
HRP Kaninchen- α -Ziege	Dako, Glostrup (Dänemark)
HPR Ziege- α -Maus	Dako, Glostrup (Dänemark)
Streptavidin Alexa-488 Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin Alexa-594 Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin Alexa-647 Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe

2.5 Oligonukleotide und Plasmide

2.5.1 Primer

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Primer (m: murin; h: human)

Primer	Sequenz (5'→3')
RT-PCR	
GAPDH FW	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA
GAPDH BW	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG
Fw-Gen PURO	ATGGCCACAACCATGACCGAGTACAAGCCC
Bw-GEN PURO	TCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCATGCACCAGC
mEpCAM FW	CAGTGTACTTCCTATGGTACACAGAATACT
mEpCAM BW	CTAGGCATTAAGCTCTCTGTGGATCTCACC
FW-mOct 3/4	ATCGGACCAGGCTCAGAGGTATTG
BW-mOct 3/4	GTTCTCATTGTTGTGCGGCTTCC
FW-msSEA-1	CGTGGACGATTTCCCTAATGC
BW-msSEA-1	CAGTCTGCCAAGTTGTGGATGC
FW-mgp130	AAGCTATCATGGGTCAGTTCAGGGC
BW-mgp130	ATTGGTGAGATTCACGGTCAGCTCT
FW-mLIFR	TCAGGAAAATCGGCAGTAT
BW-mLIFR	GTCTACAGCAACATGGTAAG
FW-mNanog	CTGGGAACGCCTCATCAATG
BW-mNanog	GGTTTTTCTGCCACCGCTTG
FW-mSox2	GGAGTGGAAACTTTTGTCCGAGAC
BW-mSox2	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTAACC
FW-mc-myc	TCTGTGGAGAAGAGGCAAACCC
BW-mc-myc	TGTGCTCGTCTGCTTGAATGG
FW-mSTAT3	AGTTCCTGGCACCTTGGATTG
BW-mSTAT3	TCTGCTGCTTCTCTGTCACTACGG
Sequenzierung	
BGC-TvRosa-6831F	GATCCAAAATTTATCACGAG
BGC-TvRosa-6947R	GAATGAAACAAGGATTCACC
BGo-hprt-FW5205	CCAGCTTTTAGACCCTGC
BGo-hprt-FW4375	GCAACAAGATAAAATGACTTC
BGo-pCAGrev	GAATTGCCTTCACAAAGA
Bgo-pCAGintrev	TTCTCATACAAAATACTCGTC

Bgo-pCAGintfor	AAAGTTTGCGGACTGCAC
Klonierung	
hEpCAM FW Pmel	TCGGGGGTTTAAACCCACCATGGCGCCCCCGC AGGTCC
hEPCAM BW Xbal	TCGGGGTCTAGACTATCTAATTATGCATTGAGTT CCCTATGCATC
FW-hEpCAM-NheI	GTTGCTAGCGCCGCCACCATGGCGCCCCCGCA GGTCCTC
BW-hEpCAM-HA-NheI	GCTAGCCTACTAGCTAGCCTAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTATGCATTGAGTTCCTATG
FW-mEpCAM-NheI	GTTGCTAGCGCCGCCACCATGGCGGGTCCCCA GGCCCTC
BW-mEpCAM-NheI	GGTCTCGCTAGCTTACTACTAGGCATTAAGCTC TCTGTG
BW-mEpCAM-NheI- HA	GCTAGCCTACTAGCTAGCCTAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTAGGCATTAAGCTCTCT

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion International AD (Planegg) synthetisiert.

2.5.2 Plasmide (Expressionsvektoren)

Tab. 2.8: Freundlicherweise von Prof. Bornkamm (Helmholz Zentrum München) zur Verfügung gestellte Plasmide

Plasmide	Kurzbeschreibung
141pCAG-ø	SV40, PuroR, CMV, IRES
141pCAG-3SIP-stop	SV40, hCMVieE, 3x STOP, IRES, PuroR, AmpR
pBluescript+	AmpR, polyA,
pEYFP-N1	CMV, SV40, EYFP, KanR, NeoR, HSV TK
2949pHprt Maus locus	hCMVieE, hprt, loxP
pRosa26	SA, RFP, FRT, polyA, loxP, SV40, SD

Tab. 2.9: In dieser Arbeit klonierte Plasmide. (Siehe Abb. 4.19 und 4.20)

Plasmide	Kurzbeschreibung
5.2 pRosa26-hEpCAM-wt	hEpCAM in pRosa26
6.6 pRosa26-hEpCAM-tm	hEpCAM triple Mutante pRosa26
7.1 141pCAG-hEpCAM-wt	hEpCAM in pCAG-3SIP-stop

8.5 141pCAG-hEpCAM-tm	hEpCAM triple Mutante in pCAG-3SIP-stop
9.5 pHprt-hEpCAM-wt	hEpCAM in 2949pHprt Maus locus
pCAG-hEpCAM	hEpCAM in 141pCAG-∅
pCAG-mEpCAM-HA	mEplCD, HA-tagged, in 141pCAG-∅
pCAG-GFP	GFP in 141pCAG-∅
pCAG-mercremer	MerCreMer Fusionsprotein in 141pCAG-∅
pEYFP-hEpCAM	N-Terminal hEpCAM in pEYFP-N1

Alle in dieser Arbeit klonierten Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.5.3 siRNA

Tab. 2.10: In dieser Arbeit verwendete siRNAs

siRNA	Sequenz (5'→3')
mEpCAM 1	UUGCUCUCUGAAUGAAUAdTdT
mEpCAM 2	CUGUCAUUUGCUCCAAACUdTdT
mEpCAM 3	CCUACUGGAUCAUCAUUGAdTdT
siRNA Kontrolle	siRNA negative control duplex

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

2.6 DNA-Sonden für Southern Blot Analyse

Rosa26-Sonde

Die 550 bp Sonde wurde aus dem Plasmid pTVRosa26 mit den Enzymen EcoRI und PaeI isoliert (siehe Abb. 4.21).

Neo-Sonde

Die 466 bp Sonde wurde mit RsrII und PstI aus dem pBluescript-Neo-Plasmid isoliert (siehe Abb. 4.21).

Diese Proben wurden freundlicherweise von Dr. Marcus Conrad (Helmholz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

2.7 Kits, Standards und Enzyme

Tab. 2.11: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
BCA Protein Assay	PIERCE, Rockford, USA
DNA „QIAshredder“	QIAGEN GmbH, Hilden
„JETstar Plasmid Purification“ system	Genomed GmbH, Löhne
„Maus ES Cell Nucleofector“ Kit	AMAXA, Köln
„NucleoSpin Extract II“ Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
„NucleoSpin“ Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Düren
„Nucleotrap“	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Düren
„PCR Cloning“ Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
“Random Primed DNA Labelling” Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
„Reverse Transcription“ System	Promega GmbH, Mannheim
„RNeasy Micro“ Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Tab. 2.12: Verwendete Standards

Standards	Hersteller
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.13: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Cre Rekombinase	Freundlicherweise von Dr. Mancao zur Verfügung gestellt (Helmholz Zentrum München)
DNase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

„Platinum Pfx“ DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.8 Bakterien

DH10B: Escherichia coli-Stamm

Genotyp: F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻. Der Ausgangsbakterienstamm wurde von der Firma Invitrogen („MAX Efficiency DH10B“) bezogen.

XL-1blue: Escherichia coli -Stamm

Genotyp: F⁺:Tu10 proA+B+ lacIq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nal^r) thi hsd R17 (rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Ausgangsbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen.

DH5α: Escherichia coli -Stamm

Genotyp: F⁻, F80dlacZDM15, D (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk-, mk+), supE 44, l-, thi-1, gyrA96, relA1. Der Ausgangsbakterienstamm wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.9 Zelllinien

Tab. 2.14: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie*	Herkunft	Referenz/Bemerkung
	Human	
FADU	Hypopharynx-Karzinom	ATCC [®] , Middlesex (UK)
HEK293	Embryonale Nierenlinie	(Graham <i>et al.</i> 1977)
HEK293-Ø	Embryonale	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-Ø

Nierenzelllinie		
HEK293-hEpCAM	Embryonale Nierenzelllinie	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-hEpCAM
HEK293-hEpCAM- GFP	Embryonale Nierenzelllinie	Transfiziert mit Vektor pEYFP-N1-hEpCAM
Maus		
E14TG2 α ***	ES aus Mausblastozysten	Freundlicherweise von Dr. Conrad zur Verfügung gestellt.
E14TG2 α - \emptyset **	ES Zellen aus Mausblastozysten	Transfiziert mit Vektor 141pCAG- \emptyset
E14TG2 α -hEpCAM- HA**	ES Zellen aus Mausblastozysten	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-hEpCAM
E14TG2 α -mEpCAM- HA**	ES Zellen aus Mausblastozysten	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-mEpCAM-HA
E14TG2 α - TVRosa26- hEpCAMwt**	ES Zellen aus Mausblastozysten	Transfiziert mit Vektor 5.2 pTVRosa26-hEpCAM-wt
E14TG2 α - TVRosa26- hEpCAMtm**	ES Zellen aus Mausblastozysten	Transfiziert mit Vektor 6.6 pTVRosa26-hEpCAM-tm
F9	Teratokarzinomzelllinie murinem Testis	Freundlicherweise von Dr. Bouquet zur Verfügung gestellt
Pfes	Embryonalen Stammzellen aus der Maus	Freundlicherweise von Dr. Conrad zur Verfügung gestellt

*: Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Linien handelt es sich um adhärenente Zellen.

** : In dieser Arbeit etablierte Zelllinien.

***: Diese Zellen wurden bereits mehrfach erfolgreich für die Etablierung von transgenen Mäusen verwendet. Deshalb wurden sie für den in dieser Arbeit beschriebenen hEpCAM Knock-in verwendet.

2.10 Blastozysten

Die Blastozysten für die Injektion von ES Zellen zur Herstellung von chimären Mäusen wurden durch Uterusspülung aus C57BL/6-Mäusen (Charles Rivers, Sulzfeld) gewonnen. Dazu wurden C57BL/6-Weibchen drei Tage *post coitum* euthanasiert und die Uteri entnommen.

3. METHODEN

3.1 Bakterien assoziierte-Techniken

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung

Die Kultivierung von dem Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte auf LB-Agar-Platten oder in flüssigem LB Medium bei 37°C und über Nacht (ÜN). Im Fall von transformierten Bakterien wurde zusätzlich das entsprechende Antibiotikum (Ampizillin 100 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml) dem Medium zugefügt. Um die Bakterien permanent zu lagern wurde eine ÜN gewachsene flüssige Bakterienkultur mit 20% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl; pH 7,2
LB-Agar-Platten: 15g/l Agar in LB Medium

3.1.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* wurde auf einer LB-Agar-Platte ÜN bei 37°C kultiviert. Eine einzige Kolonie reichte für die Inokulation der Vorkultur, die auch ÜN bei 37°C kultiviert wurde. Anschließend wurde die Hauptkultur angeimpft und bei einer OD von 0,4-0,6 geerntet. Nach der Inkubation des *E. coli*-Stammes in TFBI- und TBFII-Puffer auf Eis (Hanahan 1983), wurden Aliquots der Bakterien in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFBI-Puffer: 100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH5.8 (steril filtriert 0,45 µm)
TBFII-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH7.0 (steril filtriert 0,45 µm)

3.1.3 Transformation von Bakterien

Aliquots chemokompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 5-10 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid DNA dazu pipettiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 50 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, 10 min auf Eis inkubiert und mit 900 µl LB-Medium versetzt. Anschließend wurden die transformierten Bakterien 45 min bei 37°C geschüttelt, auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien zur Weiterverarbeitung gepickt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank und unter Verwendung steriler Pipetten sowie Lösungen durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1200 rpm (ca. 300 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS verwendet. Die verwendeten Zellinkubatoren wurden konstant bei einer Temperatur von 37°C, mit 5% CO₂ Partialdruck und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden in auf diese Zellen angepassten Medien kultiviert.

E14 Medium:	Stempan Medium (L-Glutamine, 3,7 g/NaHCO), Esgro [®] (LIF) 60000 U/ml
PFes Medium:	DMEM, 15% FCS, 1% Glutamine, Esgro [®] (LIF) 50000 U/ml
FADU, HEK293 Medium:	DMEM, 10% FCS, 1% Streptomycin/Penicillin
F9 Medium:	DMEM, 20% FCS
PBS:	80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g Kh ₂ PO ₄ in 1 l H ₂ O; pH7.4

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen unter Verwendung von Trypsin zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einem Kryogefäß zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Röhrchen in Propanolbehälter eingefroren.

Beim Auftauen wurden Zellen durch Zugabe von Kulturmedium zügig auf 37°C erwärmt und im 10-fachen Volumen Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Nach 24 h wurde das Medium erneuert.

Einfriermedium:	50% FCS, 40% Medium, 10% DMSO
------------------------	-------------------------------

3.2.3 Kultivierung muriner ES Zellen: Passagieren und Expandieren

Um bei adhärenen ES Zellen eine gute Adhäsion zu gewährleisten, wurden die verwendeten 10 cm Zellkulturplatten mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Platten 15 min mit einer 1%igen Gelatinelösung (in PBS) inkubiert. Da die ES Zellen für die Generierung transgener Mäuse genutzt wurden, musste bei der Kultivierung in besonderem Maße darauf geachtet werden, dass sie nicht

differenzieren. Der Zusatz von LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) zum Zellmedium sollte die Differenzierung der ES Zellen vermindern (Smith *et al.* 1988).

Adhärenente Zellen wurden zum Passagieren, Ernten oder Transfizieren durch kurzzeitige Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin in Suspension gebracht. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmem Trypsin 4-8 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde danach mit Zellkulturmedium gestoppt, anschließend die Zellen zentrifugiert, und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen. Sobald die ES Zellen im subkonfluenten Stadium vorlagen (nach 48 h), wurden sie passagiert, um eine mögliche Differenzierung zu vermeiden. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 10 cm Kulturschale von der Oberfläche abgelöst. Nach ca. 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von frischem ES-Medium beendet. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt, mit Medium gewaschen, zentrifugiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue beschichtete Kulturschalen ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich.

3.2.4 Morphologie, Proliferation und Zellzahlbestimmung von ES Zellen

Um die Morphologie der embryonalen Stammzellen zu untersuchen, wurden diese beim Wechseln des Kulturmediums lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Inversionsmikroskops untersucht. Die Zellen wurden fotografiert und die Proliferationskapazität wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer über einen Zeitraum von bis zu 12 Tagen analysiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 0,1%igen Trypanblaulösung (in PBS) gemischt. Das Trypanblau diente der Identifizierung von toten Zellen, die den Farbstoff im Gegensatz zu lebenden aufnehmen. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl berechnet.

3.2.5 Generierung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen mit PBS gespült, durch Inkubation in Trypsin von der Kulturschale abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets mit Lysepuffer resuspendiert und für 10 min bei RT auf einem Drehrad rotiert. Mittels Zentrifugation (10 min, 10000 g, 4°C) konnte das Gesamtzelllysate als Überstand abgenommen werden.

Lysepuffer: PBS, 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail Complete (1 Tablette/25 ml)

3.2.6 Transfektion der Stammzellen: Elektroporation, MATra und Nukleofektion

Elektroporation

50-70% konfluente ES Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Elektroporation wurden 7×10^6 Zellen in PBS und 20 μg linearisierten DNA Vektor (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Enzym, 37°C, 4 h) DNA-Vektor in einem Volumen von 900 μl vermischt und in gekühlten Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation wurde mit einem *Gene Pulser* (BioRad) durchgeführt und erfolgte bei 240 V und 500 μF . Die Küvetten wurden anschließend für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die ES Zellen wieder in vorgewärmtes ES Zellmedium überführt und auf 10 cm mit Gelatine beschichteten Schalen ausplattiert.

MATra

Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte mit dem MATra-A Reagenz (IBA). Dazu wurden die Zellen ÜN auf einer 6-Loch-Platte bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Das MATra-A Reagenz wurde mit dem Plasmid im Serumfreies Kulturmedium 20 min bei RT inkubiert, die Mischung auf die Zellen dazu pipetiert und 15 min auf Magnetplatten inkubiert. Um stabile transfizierte Zelllinien zu erhalten, wurde anschließend eine Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum durchgeführt.

Nukleofektion

Um die Zellen mit dem Nukleofektionssystem von AMAXA zu transfizieren wurden 70-80% konfluente ES Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Nukleofektion wurden 7×10^6 Zellen in PBS und 5 μg DNA Plasmid in einem Volumen von 100 μl Nukleofektionlösung vermischt und in Nukleofektionsküvetten überführt. Die Transfektion erfolgte in Program A-24 und nach Angaben des Herstellers.

3.2.7 Selektion homolog rekombinierter ES Klonen

Zur Selektion von stabilen Zellklonen wurden transfizierte Zellen nach 48 h unter Zugabe von 180 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ G-418-Sulfat ins Zellkulturmedium kultiviert. Neun

bis elf Tage nach der Transfektion waren auf den G418-behandelten Platten Einzelkolonien sichtbar. Mit Hilfe einer Pipette (p-200) wurden unter einem Mikroskop in einer Sicherheitswerkbank einzelne Kolonien in 25 µl PBS aufgenommen. Bei der Auswahl der Kolonien wurde darauf geachtet, dass nur Kolonien mit klar abgegrenzter Oberfläche, ein Indiz für undifferenzierten Zustand, gepickt wurden. Außerdem wurden hauptsächlich kleine bis mittelgroße Kolonien ausgewählt, da sehr schnell wachsende, große ES Zellkolonien erfahrungsgemäß häufig Aneuploidien aufweisen. Die Kolonien wurden jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte transferiert und 25 µl Trypsin hinzugegeben. Nach einer kurzen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und die Trypsinreaktion mit 100 µl Medium gestoppt. Nach weiteren zwei bis drei Tagen Inkubation wurden drei Replikas von jedem einzelnen Zellklon hergestellt. Ein Teil der Replika diente dazu, die Zellklone auf homologe Rekombination per Southern Blot zu verifizieren. Die restlichen ES Zellklone wurden für eine spätere Expansion zunächst in DMSO-haltigem Einfriermedium bei -80°C kryokonserviert.

3.2.8 Einfrieren von ES Zellklonen im 96-Loch Format

Zum Einfrieren der Zellen in 96-Loch-Platten wurden diese mit 50 µl Trypsin vom Plattenboden abgelöst, durch mehrfaches Pipettieren in Einzelzellsuspensionen überführt und die Reaktion durch 2-fach konzentriertes Einfriermedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellklone in Standard ES Zell Medium gut resuspendiert und mit 100 µl Einfriermedium versetzt. Zuletzt wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet, mit Zellstoff umgewickelt und bei -80°C eingefroren. Die Klone wurden spätestens nach 6 Wochen erneut kultiviert.

3.2.9 Blastozysteninjektion und Embryotransfer

Die Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozysten erfolgte freundlicherweise im Labor von Prof. Wurst, Institut für Entwicklungsgenetik (Helmholz Zentrum München) in Neuherberg. Zwei bis drei Tage vor einer ES Zelleninjektion in Blastozysten wurden die Zellen aufgetaut und auf einer 6 cm Schale kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen durch 10-minütige Trypsinierung vereinzelt, in 0,5 ml Medium aufgenommen und auf 4°C belassen. Pro Blastozyste wurden zwischen 10 und 20 ES Zellen mikroinjiziert.

8 bis 10 mit homolog rekombinierten ES Zellen beladene Blastozysten wurden am selben Tag einer Empfängermaus implantiert. Die Empfängermäuse waren zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart und einer Plugkontrolle unterzogen worden, um eine Scheinträchtigkeit zu induzieren. Die empirisch höchste Trächtigkeitsrate beim Blastozystentransfer erreicht man, wenn die Empfängerweibchen, denen die Blastozysten implantiert werden, sich am Tag 2.5 der Scheinträchtigkeit befinden.

3.3 Durchflusszytometrische Analyse

3.3.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen

Die Oberflächenexpression von Membranproteinen wurden nach Anfärbung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper mit einem FACSCalibur™ (BD-Biosciences) untersucht. Es wurden die Zelloberflächenmoleküle hEpCAM, mEpCAM, SSEA-1 SSEA-4 und Oct3/4 nachgewiesen.

Zur Analyse dieser Zelloberflächenantigene wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugierte Sekundärantikörper verwendet (Excitationsmaximum/Emissionsmaximum 494 nm/519 nm). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wurden.

Für die Durchflusszytometrie wurden pro Ansatz 5×10^5 Zellen aus dem Kulturgefäß entnommen und 2x mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS aufgenommen und mit der vom Hersteller empfohlenen Primärantikörperkonzentration (in der Regel 1 µg/µl für 5×10^5 Zellen) 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1 µg/µl). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer für die Messung aufgenommen. Um anschließend die Proben untereinander zu vergleichen, wurden die Resultate mit der CELLQuest™ Software hinsichtlich der Parameter Fluoreszenzeigenschaften, Zellgröße (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) analysiert. Der im Ergebnisteil dargestellte Prozentsatz von positiven Zellen entspricht der Differenz der Prozentsätze von spezifischer und Kontrollfärbung.

FACS-Puffer: PBS, 3% FCS

3.3.2 Propidiumiodid-(PI)-Analyse

Um die genomische DNA-Fragmentierung und somit die Apoptose zu messen, wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und 2 Stunden in 70%iger Ethanollösung (in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen 1 Stunde im Dunkeln gefärbt.

PI-Färbelösung: 10µg/ml RNase A, 1µg/ml PI

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation von RNA und cDNA Synthese

Um die RNA von ES Zellen zu isolieren wurden 1×10^6 Zellen mit Hilfe der Qia-Shredder Säulen lysiert und die gesamtzelluläre RNA mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben extrahiert.

Die cDNA Synthese erfolgte nach einem zwei-Stufen-Protokoll; die reverse Transkription und darauffolgende PCR finden in getrennten Reaktionen statt. Die isolierte RNA wurde zunächst mit DNase behandelt und mittels PCR auf das Vorhandensein genomischer DNA geprüft. 1 µg der RNA wurde dann mit Hilfe des „Reverse Transcription System“ (Promega) in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primerpaaren durchgeführt, die zur Evaluierung des Expressionslevels der Ziel-RNA diente.

3.4.2 Standard PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”)

Die Anwendung der PCR (Saiki *et al.* 1985) diente in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung von PCR Fragmenten für Klonierungsschritte und zur Evaluierung des Expressionslevels von bestimmten Zielgenen in ES Zellen.

Die PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 50 µl und enthielt: 5 µl 10 x PCR-Puffer, je 1 pmol des 5'- und 3'-Primers, 1,75 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 U Taq Polymerase, 200 ng DNA/cDNA und *add* H₂O. Die Amplifizierung erfolgte in 25-35 Zyklen mit einer 45 sec Denaturierungsphase bei 92°C, 30 sec Annealingphase bei 52-62°C (je nach Schmelzeigenschaften der verwendeten Primer) und einer Elongationsphase bei 72°C für 120 sec. Die quantitative Analyse des PCR Amplifikates erfolgte durch eine Agarose Gelelektrophorese.

3.4.3 Restriktionsverdau

Zur Spaltung von Plasmiden und genomischer DNA für Klonierungen sowie zur Linearisierung von Plasmiden für stabile Transfektionen wurden Restriktionsendonukleasen und Enzym-spezifische Puffer nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas bzw. New England Biolabs) eingesetzt. Die nachfolgende Weiterverarbeitung der gespaltenen DNA erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente wurden, je nach Größe, in Agarosegelen geeigneter Konzentration in 1/6 Volumen Ladepuffer aufgetrennt (0,7%-2%). Aufgrund der negativen Gesamtladung der DNA wandert diese in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und wird dabei entsprechend der Größe der einzelnen DNA Fragmente aufgetrennt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) versetzt. Ein Längenstandard mit genau definierten Fragmentgrößen wurde zusätzlich aufgetragen.

Agarosegel:	Agarose (je nach Konzentration) in 1 x TBE oder TAE
Laufpuffer:	<u>1 x TBE:</u> 45 mM TRIS-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0 <u>1 x TAE:</u> 40 mM TRIS-acetat; 1 mM EDTA/NaOH pH 8.0
6 x Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin in H ₂ O

3.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Restriktionsverdauansätzen oder von PCR Produkten erfolgte mit dem Nucleo Spin Extract Kit (Macherey-Nagel). Die DNA wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert und nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4.6 Klassische Klonierung von DNA Fragmenten und PCR-Produkten

Unter dem Begriff Klonierung versteht man das künstliche Zusammenfügen von DNA Molekülen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Bei der klassischen Methode wurde die DNA mit einem Restriktionsenzym gespalten und ein DNA Fragment mit passenden kohäsiven Enden mittels einer T4 DNA-Ligase eingefügt (Sambrook *et al.* 1989). Die Ligationsreaktion wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Endgültige Targetierungsvektoren sind in den Abbildungen 4.19 und 4.20 dargestellt.

Die Subklonierung von PCR Produkten, die mittels Taq-Polymerase erzeugt wurden, erfolgte durch TA Klonierung mit dem System pDrive PCR Cloning (Qiagen). Die resultierenden Produkte wurden anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert und auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert.

3.4.7 Präparation von Plasmid-DNA

Transformierte Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium angereichert und die DNA mittels Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed) präpariert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Verunreinigungen der Proben wurden durch die Verhältnisbildung (Ratio) verschiedener Absorptionswerte erkannt. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, kann man die Reinheit einer Nukleinsäurelösung anhand der Ratio E_{260}/E_{280} abschätzen. Der Quotient sollte unter neutralen bis leicht alkalischen pH-Bedingungen bei reiner DNA 1,8 bis 2,0 betragen. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4.8 DNA-Isolation und Detektion rekombinierter ES Zellklone

ES-Zell Klone wurden für die Präparation von DNA in 96-Loch Platten zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 50 µl Lyse-Puffer zugegeben. Die Platten wurden dann in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 55°C ÜN inkubiert und am nächsten Tag bei Raumtemperatur für 30 min abgekühlt. Anschließend wurden 100 µl eiskalten 100%-Ethanol/150 mM NaCl je Loch zugesetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach 30 min Schütteln bei RT wurde die DNA sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde zweimal mit 100 µl 70%-Ethanol gewaschen, getrocknet und direkt in 30 µl/Loch Restriktionslösung resuspendiert. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre ÜN bei 37°C inkubiert.

Lysepuffer:	10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaCl, 0,5% Sarcosyl, 1 mg/ml Proteinase K
Restriktionslösung:	4 mM Spermidin, 1x Restriktionspuffer, RNase 100 µg/ml, Enzym 10U/Loch

3.4.9 Southern Blot

Die von Southern entwickelte Methode ermöglicht den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine Membran. Durch das

anschließende Hybridisieren der immobilisierten DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente auf der Membran zu detektieren. Dabei ist die Spezifität des Nachweises von der Spezifität der Sonde abhängig, die ein Teil der nachzuweisenden Region komplementär ist. Die mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Ladepuffer auf ein 0,8%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Nach der Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese (40 V, mindestens 6 Stunden), wurde diese unter UV-Licht visualisiert. Das Gel wurde für 20 Minuten in 0,25 N HCl auf einem Schüttler geschwenkt. Danach wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen und 1 h in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot, wie in Abbildung 3.1 zu sehen, zum Transfer der DNA auf eine Immobilon™ Ny+ Membran (ÜN) aufgebaut. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Position der Geltaschen markiert und die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Danach konnte der Blot für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde vorbereitet werden.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl 0.5N NaOH
20xSSC: 3 M NaCl, 300mM Trinatriumazetat, NaOH pH 7.0

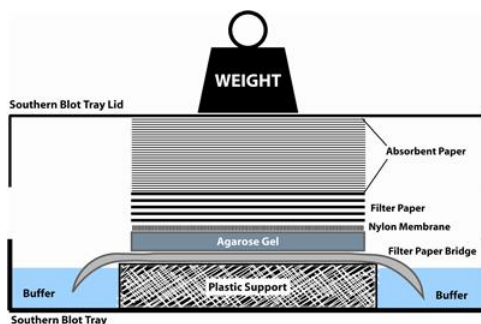


Abb. 3.1: Aufbau Southern-Blot Für den DNA-Transfer auf eine Nylonmembran wurde das Gel auf eine Plastikunterlage gelegt und die Nylonmembran unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Darüber wurden zwei in Denaturierungspuffer getränkte 3MM Papiere, eine mindestens 5 cm hohe Lage von Zellstoff und zuoberst eine Glasplatte zum Beschweren aufgelegt. (Grafik stammt von www.gbiosciences.com).

3.4.10 Generierung und radioaktive Markierung von DNA Sonden

Es wurden jeweils 20-50 ng DNA Sonde mit 50 μ Ci [α^{32}]-dCTP (3000Ci/mmol, 10 mCi/ml, GE Healthcare) mit Hilfe des „Random Prime Labelling Kit“ (Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer G50 Sephadex Säule (Amersham Bioscience Freiburg) gereinigt. Die Probe wurde durch 10-minütige Inkubation bei 95°C denaturiert und der Hybridisierungslösung beigemischt.

3.4.11 Hybridisierung von DNA-Filtern und Auswertung

Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Membranen in Hybridisierungspuffer ohne Sonde geschwenkt. Die Membran wurde dazu in 2XSSC angefeuchtet und in einem Glaszylinder in vorgewärmten Hybridisierungspuffer für mindestens 3 h bei 64°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Dann wurde frischer Hybridisierungspuffer mit denaturierter, radioaktiv markierter DNA-Sonde vermischt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 64°C im Rotationsofen. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15 min bei 64°C mit Waschpuffer gewaschen und in Frischhaltefolie verpackt. Die auf der Membran hybridisierte Sonde ließ sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film nachweisen.

Churchpuffer: 200 nM NaH₂PO₄, 400 nM Na₂HPO₄, 400 nM Na₂HPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA, pH 7.1 (Hybridisierungspuffer)

Waschpuffer: 0,5% SDS, 0,2x SSC

3.4.12 Sonstige DNA/RNA Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein verbreiteter Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt werden, beispielsweise die Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren und deren Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, die enzymatische Restriktionshydrolyse, die Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase, das Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden, die Ligation freier DNA Enden, etc., erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.* 1989).

3.5 Proteinbiochemische Analyseverfahren

3.5.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Gesamtzelllysat wurde mittels eines BCA Protein Assay Reagent Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5.2 Western Blot

Unter einem Immunoblot, auch Western Blot genannt, versteht man die Übertragung von Proteinen von einer Trägermatrix (SDS-PAGE) auf eine Trägermembran (z.B. Immobilon-P Transfermembran).

Zur Vorbereitung der Zelllysate wurde jede Probe mit 1/10 Volumen 10x Lämmli Puffer versetzt, diese nochmals 5 min bei 95°C aufgeköcht, und somit die

Proteine denaturiert. Die vorbereiteten Proben wurden aufgetragen und nach ihrer Größe und Ladung in 12–15%igen SDS-Polyacrylamidgelen durch Elektrophorese im Laufpuffer aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V, 30 mA/Gel). Das verwendete Trenngel ermöglichte eine Proteinauftrennung im Bereich zwischen 20 und 80 kDa. In einer Spur des Gels wurde zusätzlich ein Proteinstandard mit Proteinen genau definierter Größen mitgeführt.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (Western Blot: 100 V, max. 500 mA, 40-45 min) wandern Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung aus dem Gel auf eine Immobilon-P Transfermembran über. Zur Fixierung der Proteine auf der Membran wurde diese kurz in Methanol getaucht und anschließend getrocknet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen zunächst in Blockpuffer für 1 h bei RT auf dem Schütter inkubiert.

Die Anfärbung der Proteine erfolgte 1 h bei RT, mit spezifischen Primärantikörpern (1:250-1:10000 in Primärantikörperpuffer). Nach mehrmaligem Waschen der Membran in Waschpuffer, wurde der Primärantikörper mit entsprechenden spezifischen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:1000 in Blockpuffer) detektiert (1 h, RT). Nachdem die Membran mehrmals gewaschen wurde, erfolgte die Visualisierung der Peroxidase-Reaktion mit Hilfe des ECL Blotting Substrats (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Die auf der Membran gefärbte Proteine ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film nachweisen. Zum Entfernen von Antikörpern wurden PVDF-Membranen 30 min bei RT auf einem Schüttler in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 20 min mit Waschpuffer gewaschen.

SDS-Polyacrylamidgel:	<u>Sammelgel</u> (4%): 30% Acrylamid; 2 M Tris pH6.8; 0,5 M EDTA <u>Trenngel</u> (12-15%): 30% Acrylamid; 2 M Tris pH8.9, 0,5 M EDTA
10 x Laufpuffer:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
Lämmli Puffer:	140 mM TRIS-HCl pH7.0, 30% Glycerin, 4% SDS, 16% Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau
10 x Blottingpuffer:	250 mM Tris, 1,26 M Glycin
Waschpuffer:	PBS mit 0,2% Tween
Blockpuffer:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer
Primärantikörperpuffer:	3% BSA in Waschpuffer
Stripping-Puffer:	0,2M Tris, 1% SDS, pH2.5

3.6 Immunhistochemische Methoden

3.6.1 Immunzytochemie von mEpCAM in ES Zellen

Immunzytochemische Färbungen wurden an adhärenenten, stabil transfizierten Zellen durchgeführt. 5×10^5 Zellen wurden auf Superfrost Plus Objektträger ausplattiert und in Quadriperm Kulturschalen für 48 h mit entsprechendem Medium weiter kultiviert. Die Fixierung der Präparate erfolgte in leicht modifizierter Weise nach Brock (Brock *et al.* 1999). Dafür wurden die Objektträger zweimal für 5 min in eiskaltem HBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 min bei 4°C und nachfolgend für 10 min RT mit Paraformaldehyd behandelt. Nach 3x 5-minütigem Waschen mit HBS-Puffer bei RT wurden die Proben für 20 Sekunden mit -20°C kaltem Methanol behandelt und danach erneut 5 min mit HBS-Puffer gewaschen. Nach der Fixierung wurde direkt mit der immunzytochemischen Färbung der Präparate fortgefahren.

Endogene Peroxidase wurde mittels 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) inaktiviert. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Proben mit Normalserum für 25 min überschichtet. Als Normalserum diente Serum des Tieres, in dem der Zweitantikörper produziert wurde. Bei einer Färbung mit dem Avidin-Biotin-System wurden die Zellen mit 100 µl Avidin-D-Lösung pro 1 ml Normalserum behandelt.

Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert (α -mEpCAM 1:200; α -Oct3/4; 1:100). Als Negativkontrolle wurden die Präparate in eine PBS-Lösung an Stelle der Primärantikörperlösung inkubiert. Die Objektträger wurden dann zweimal mit PBS/Triton gewaschen und mit dem entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (1 bis 2 h) oder mit biotinyliertem Brückenantikörper (1 h) und Avidin-Biotin- bzw. Fluorochrom-Streptavidin-Sekundärantikörper bei RT inkubiert.

Bei der Immunhistologie diente Aminoethylkarbazol als Chromogen. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Mayers Hämatoxilin bevor die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt wurden. In der Fluoreszenzfärbung wurden die Zellkerne mittels DAPI (Hoechst 33342) angefärbt, in Moviol fixiert und mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame) eingedeckelt.

Bei Doppelfärbungen können Antikörper verschiedener Spezies simultan inkubiert werden. Eines der beiden verwendeten Detektionssysteme muss direkt konjugiert sein. Bei dem ersten Detektionsschritt ist der

Sekundärantikörper Flurochrom-konjugiert und über den Sekundärantikörper (z.B. Alexa 488) detektiert. Das zweite Detektionssystem wird über einen biotinylierten Brückenantikörper verstärkt (1 h RT) und anschließend über einen geeigneten Fluorochrom-konjugierten Streptavidin-Antikörper (z.B. Alexa 647) detektiert. Die Zellkerne wurden abschließend mittels DAPI (Hoechst 33342) angefärbt.

HBS-Puffer: 78,8 g NaCl, 7,4 g KCl, 0,81 g MgCl₂, 1,1 g CaCl₂, 23,6 g Hepes auf 1 l H₂O, pH7.4

3.6.2 Eosin-Färbung

Eosin-Färbungen wurden an adhärenenten, stabil transfizierten Zellen durchgeführt. 5×10^5 Zellen wurden auf Superfrost Objektträger ausplattiert und in Quadriperm Kulturschalen für 48 h mit entsprechendem Medium kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit einer wässrigen Eosin-Lösung für 2 min gefärbt und anschließend durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt, in Xylol fixiert und mit Eukitt eingedeckelt.

Eosin-Lösung: 2% Eosin in H₂O

3.6.3 Alkalische Phosphatase Nachweismethode: BCIP/NBT

Um Alkalische Phosphatase Aktivität nachzuweisen wurden 5×10^5 Zellen auf Superfrost Objektträger ausplattiert und in Quadriperm Kulturschalen für 48 h mit entsprechendem Medium kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen 5 bis 10 min mit 200 µl NBT/BCIP Färbelösung auf dem Objektträger inkubiert.

NBT/BCIP Färbelösung: 100mM Tris-Base pH9.5, 100mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 5 µl/ml NBT, 3,8 µl/ml BCIP

3.7 Zucht der Mauslinien

3.7.1 Tierhaltung und Tierhygiene

Die Tierräume befinden sich im Biologikum des Helmholtz Zentrums, Neuherberg. Sie sind mit Gestellen und Typ II Polycarbonat Käfigen ausgestattet. Pro Käfig werden maximal 5 Mäuse gehalten. Die Tiere sitzen auf hochwertiger Labortiereinstreu (Altromin, Typ $\frac{3}{4}$), die einmal wöchentlich gewechselt wird. Die Haltung der Tiere erfolgt unter standardisierten klimatischen Bedingungen. In den Tierräumen herrschen 21 °C (+/-1) bei einer

relativen Luftfeuchte von 55% (+/-5). Die Räume werden mit einer Luftwechselrate von 15-20 pro Stunde belüftet, die Zuluft wird HEPA-gefiltert. Der Lichtzyklus beträgt 12 Stunden (6:30-18:30 h, keine Sommerzeit). Die Tiere werden mit einer Standarddiät (Altromin 1314) *ad libitum* gefüttert. Sie erhalten durch 0,2 µm filtriertes teilentmineralisiertes Wasser *ad libitum*. Die Tiere werden unter SPF-Status gehalten und ihr Hygienestatus nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) regelmäßig untersucht. Die hygienische Einheit, in der die Mäuse gehalten wurden, war im Zeitraum über den in dieser Arbeit berichtet wird frei von allen in der zitierten FELASA-Richtlinie gelisteten Mauspathogenen.

3.7.2 Etablierung von konditionalen transgenen Knock-in-Mausstämme

Blastozysten, die mit fremden embryonalen Stammzellen injiziert werden, können sich nach Implantation in scheinchwangere Weibchen zu genetischen Mosaiktieren, den sogenannten „Chimären“ entwickeln. Wie zuvor bereits erwähnt, stammten die verwendeten Blastozysten dem C57BL/6-Inzuchtmausstamm ab, der die schwarze Fellfarbe rezessiv vererbt. Die in Zellkultur veränderten und später in diese Blastozysten injizierten E14 ES Zellen wurden hingegen von 129/ola Mäusen gewonnen. Dieser Mausstamm besitzt die dominant vererbare, bräunliche Fellfarbe Chinchilla (A). Dadurch war es möglich, Chimären nach der Geburt an ihrem gescheckten Haarkleid zu erkennen. Die Chimären wurden mit C57BL/6-Tieren verpaart, um die genetische Veränderung durch Vererbung an die nächste Generation als allelische Variante im Gesamtorganismus zu haben („Keimbahntransmission“). Nur aus der Verpaarung von Chimären (AA) mit C57BL/6-Mäusen (aa) stammende Nachkommen mit brauner Fellfarbe (Aa) können auch die genetische Veränderung tragen. Die Nachkommen mit brauner Fellfarbe wurden auf das konditionale Allel analysiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Bedeutung des Tumor-assoziierten Antigens EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM gewinnt mehr und mehr an Bedeutung in verschiedenen Forschungsgebieten, wie zum Beispiel in der Krebsforschung und der regenerativen Medizin. EpCAM wird in murinen Stammzellen, während der humanen und murinen Embryogenese (Anderson *et al.* 1999) und in einer Vielzahl epithelialer Gewebe exprimiert (Baeuerle und Gires 2007, Balzar *et al.* 1999b, Trzpis *et al.* 2007a). EpCAM ist zusätzlich in adulten Vorläuferzellen der Lunge-, Leber- und Keimzellen exprimiert (de Boer *et al.* 1999, Schmelzer und Reid 2008, Schmelzer *et al.* 2007). Adulte differenzierte Zellen dieser Gewebe exprimieren EpCAM jedoch nicht mehr (Kasper *et al.* 1998, Schmelzer *et al.* 2006).

Trotz intensiver Untersuchungen zur Expression und Funktion von EpCAM in unterschiedlichen adulten Zellen wurden das Expressionsmuster und eine potentielle Funktion von EpCAM in gesunden embryonalen Stammzellen bislang noch nicht charakterisiert. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression und die molekulare Rolle von murinem EpCAM in embryonalen Stammzellen erforscht werden.

4.1.1 Phänotypische Analyse von mEpCAM in ES Zellen

4.1.1.1 mEpCAM Expression in murinen und humanen Zelllinien

Die Expression von mEpCAM in ES Zellen ist bis *dato* unzureichend erforscht. Infolgedessen wurden die embryonalen adhärennten Stammzelllinien E14TG2 α und mPfes und eine transformierte Teratokarzinomzelllinie F9 der Maus (Kellermann und Kelly 1986) mit mEpCAM-spezifischen Antikörpern und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Als Referenz diente die Hypopharynx Karzinomzelllinie FaDu, welche eine starke Überexpression von humanem EpCAM an der Zelloberfläche aufweist. Alle gefärbten Zelllinien wurden anschließend in einem Durchflusszytometer auf die Oberflächenexpression von EpCAM analysiert.

Abbildung 4.1 zeigt, dass EpCAM in den murinen embryonalen Stammzelllinien E14TG2 α und mPfes, sowie in den malignen F9 Stammzellen der Maus, auf der Zelloberfläche exprimiert wird (graue Diagramme). In murinen Fibroblasten

(PS2 Fibros, Abb. 4.1) konnte EpCAM wiederum nicht nachgewiesen werden. Kontrollfärbungen in Abwesenheit des Primärantikörpers sind in denselben Diagrammen als offene Kurven dargestellt. Die Expression von EpCAM in normalen murinen ES Zellen und in transformierten Teratokarzinomen war vergleichbar mit der starken Expression von EpCAM auf humanen HNO-Karzinomzellen. Auf gastrischen Adenokarzinomzellen war EpCAM heterogen exprimiert, wobei ein Anteil von 35% der Zellen kein EpCAM exprimierte und 65% eine mäßige bis starke Expression aufwiesen (MAKS, Abb. 4.1).

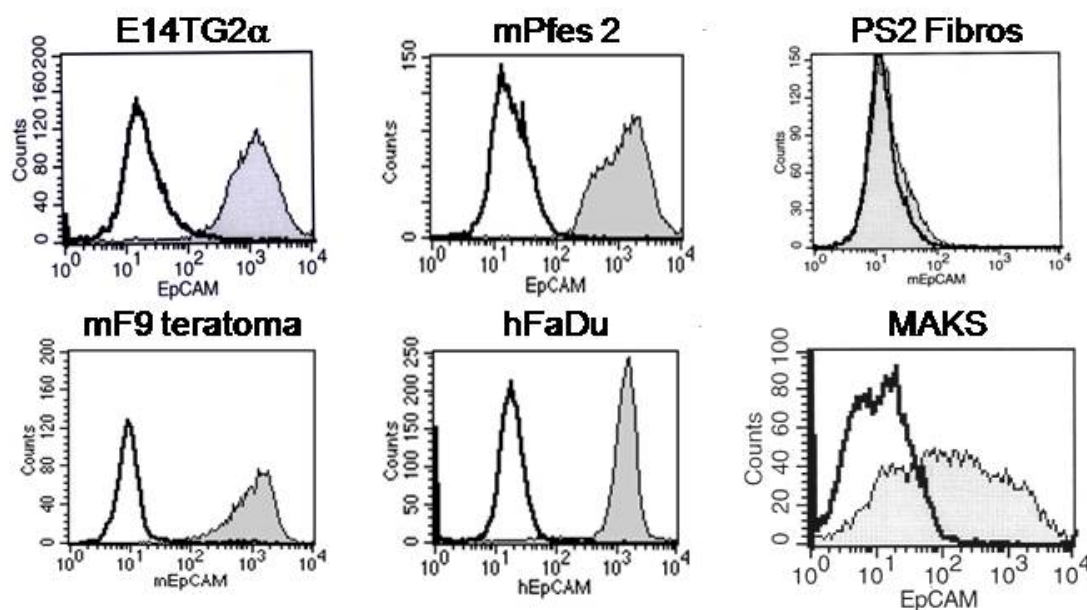


Abb. 4.1: EpCAM Expression an der Oberfläche von mE14TG2 α , mPfes, PS2 Fibros, F9, hFadu und MAKS Zellen. Die Oberflächenexpression von mEpCAM und hEpCAM wurde mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern für murines oder humanes EpCAM nachgewiesen (graue Histogramme). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper in Abwesenheit des Primärantikörpers behandelt (offene Histogramme). Dargestellt sind jeweils die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Das murine Homolog von hEpCAM ist somit auf nicht-transformierten embryonalen Stammzellen und auf transformierten Teratomzellen sehr stark exprimiert.

Für die vorliegende Arbeit wurde die ES Zelllinie E14TG2 α verwendet, welche standardweise von unseren Kooperationspartnern im Projekt am Institut für Säugetiergenetik zur Generierung von transgenen Mäusen herangezogen wird.

4.1.1.2 Immunzytochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von mEpCAM an der Zelloberfläche

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel 4.1.1.1, zeigen eine Expression von EpCAM auf der Oberfläche von embryonalen Stammzellen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die E14TG2 α ES Zellen immunzytochemisch angefärbt. Die Zellen wurden hierfür mit spezifischen Antikörpern gegen mEpCAM und mit Avididin-Biotin- und Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin markiert (siehe Methoden).

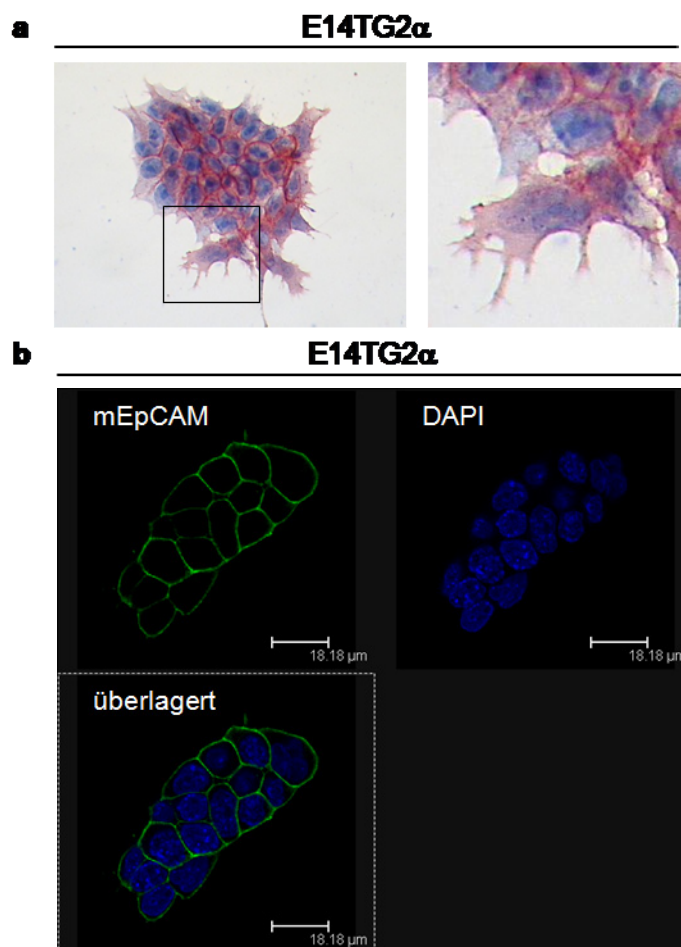


Abb. 4.2: Immunhistochemischer und Immunfluoreszenz-vermittelter Nachweis von mEpCAM in undifferenzierten ES Zellen. (a) Immunhistochemische Färbung des mEpCAM Moleküls in E14TG2 α embryonalen Stammzellen. Die Färbung von mEpCAM ist im Inneren der Stammzellkolonie stärker als am Rand (Links: Vergrößerung 200x; rechts: zusätzliche 10-fache Vergrößerung). (b) Immunfluoreszenzfärbung der E14TG2 α embryonalen Stammzellen mit einem mEpCAM spezifischen Antikörper in Kombination mit Fluoreszenz markierten Sekundäntikörpern. Die Lokalisation von mEpCAM (grün) wurde durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen. Die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. mEpCAM lokalisierte stets an der Membran der ES Zellen. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In mikroskopischen Aufnahmen zeigte sich, dass mEpCAM sehr hoch, jedoch nicht homogen in der gesamten Stammzellkolonie exprimiert wurde (Abb. 4.2a). Zellen, die sich im Inneren der Kolonie befanden, waren durch eine stärkere Expression von EpCAM charakterisiert. Zellen am Rand der Kolonie, die Fortsätze aufwiesen und einen differenzierten Phänotyp aufwiesen, zeigten eine schwächere Färbung von EpCAM auf (Abb. 4.2a, Vergrößerung rechts). Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation von mEpCAM an der Membran wurden Immunfluoreszenzfärbungen an embryonalen Stammzellen durchgeführt. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops, das eine präzise Visualisierung in gewünschten Ebenen der Zellen erlaubt. Die mikroskopischen Aufnahmen bewiesen eine exklusive Lokalisation von mEpCAM (grün) an der Zellmembran (Abb. 4.2b).

4.1.2 Der Leukämie Inhibitionsfaktor LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) ist essentiell für die Erhaltung des Stammzellphänotyps von murinen E14TG2 α Zellen

Die Gabe von LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) in das Kulturmedium zur Unterbindung der Differenzierung ist für E14TG2 α embryonale Stammzellen essentiell (Smith *et al.* 1988, Williams *et al.* 1988). Der Entzug von LIF verursacht eine spontane Differenzierung von murinen Stammzellen und somit die Veränderung des Phänotyps. Um dieses Phänomen nachzuprüfen und die Effekte der Differenzierung zu analysieren, wurde LIF aus dem Stammzellkulturmedium entzogen und die Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen analysiert.

4.1.2.1 Morphologische Veränderungen von E14TG2 α Stammzellen in Abwesenheit von LIF

Bei der Kultivierung von E14TG2 α Stammzellen in Abwesenheit von LIF über einen Zeitraum von 6 Tagen konnten deutliche morphologische Veränderungen beobachtet werden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen demonstrieren in einem repräsentativen Experiment die morphologischen Unterschiede zwischen pluripotenten Zellen (Abb. 4.3, links) und Zellen, die sich in einem Differenzierungsprozess befinden (Abb. 4.3, rechts). Diese differenzierenden Zellen wuchsen nicht mehr in charakteristischen runden Kolonien, sondern

neigten zum vereinzelt Zellwachstum mit einer auffälligen Bildung von spindelförmigen Fortsätzen, welche fibroblastoid erschienen.

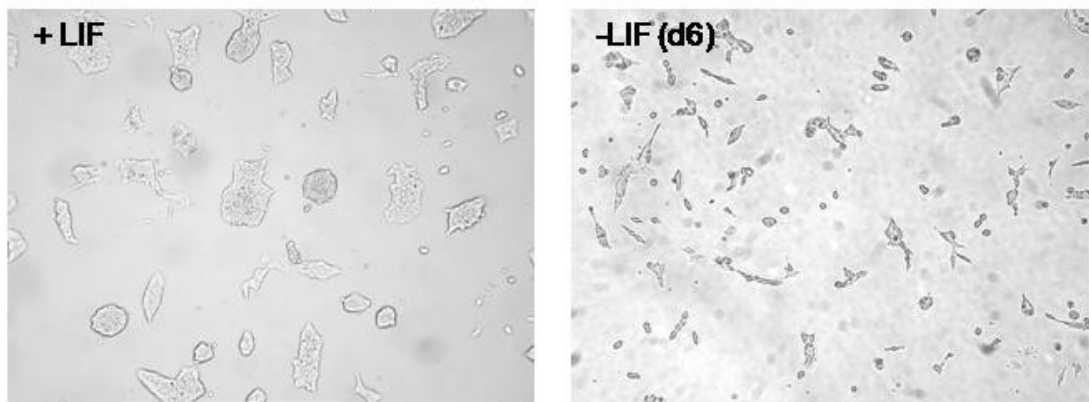


Abb. 4.3: Morphologie von E14TG2 α embryonalen Stammzellen nach Kultivierung in An- und Abwesenheit von LIF: E14TG2 α Zellen wurden 6 Tage lang mit oder ohne LIF im Medium kultiviert. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen zeigten Veränderungen in der Morphologie von E14TG2 α ES Zellen, welche ohne LIF wuchsen, bildeten keine typischen Stammzellkolonien sondern wuchsen als fibroblastoide, spindelförmige Zellen (Originalvergrößerung 200x). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte von ES Zellkulturen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.2.2 LIF beeinflusst die Proliferationskapazität von E14TG2 α Zellen

Ein Hauptmerkmal von ES Zellen in Zellkultur ist die hohe Proliferationsrate mit einer durchschnittlichen Verdoppelungszeit von 8-10 Stunden. Die Proliferationskapazität von E14TG2 α Zellen sollte daher nach Entzug von LIF analysiert werden um den Verlust des ES Zellphänotyps nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden E14TG2 α Zellen zu gleichen Zellzahlen (3×10^5 Zellen/Platte) in An- oder Abwesenheit von LIF im Stammzellkulturmedium kultiviert und nach 2, 4 und 6 Tagen die Gesamtzellzahl in einer Fuchs-Rosenthal Kammer bestimmt.

Wie in der Abbildung 4.4 zu sehen ist, proliferierten E14TG2 α embryonale Stammzellen exponentiell in Anwesenheit von LIF (weiße Balken). Im Gegensatz führte die Kultivierung der Stammzellen in Abwesenheit von LIF zu einer 90%igen Reduktion der Proliferation. Dies bestätigte, dass der Entzug von LIF aus dem Kulturmedium von ES Zellen eine Verminderung der Proliferationsrate und einen Verlust des ES Zellphänotyps induzierte.

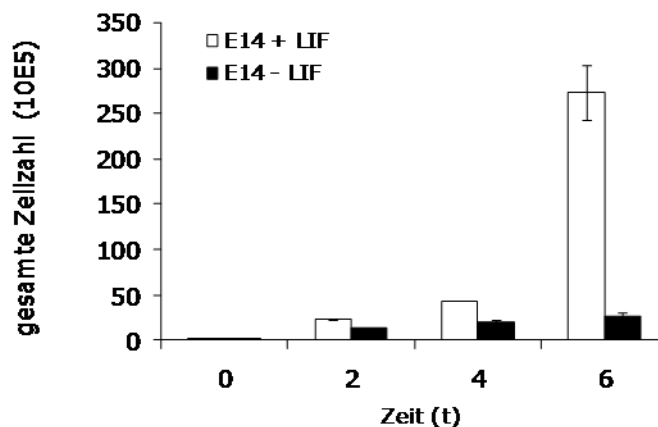


Abb. 4.4: Unterschiedliche Proliferation der E14TG2 α Zellen in An- und Abwesenheit von LIF: Die Gesamtzellzahl wurde am Tag 2, 4 und 6 mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. E14TG2 α embryonale Stammzellen proliferierten exponentiell in Anwesenheit von LIF. Trypanblau diente dabei als Farbstoff, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.2.3 E14TG2 α Zellen differenzieren nach LIF-Entzug: negative Regulation von stammzellspezifischen Markern

Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen in Abwesenheit von LIF verursachte, wie oben beschrieben, die Inhibition der Proliferation und die Änderung der Morphologie dieser Zellen. Diese Beobachtung weist auf einen Differenzierungsprozess der Zellen hin. Infolgedessen wurde die Expression und Aktivität von etablierten Stammzellmarkern unter Stammzell Kulturbedingungen (+LIF) und in Abwesenheit von LIF untersucht, um einen potentiellen Pluripotenzverlust von ES Zellen auf molekularer Ebene zu messen. Die gewählten Marker für embryonale Stammzellen sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

E14TG2 α Zellen wurden wie bereits erwähnt in An- oder Abwesenheit von LIF in Kulturmedium kultiviert und die Stammzellmarker alkalische Phosphatase, Oct3/4, Stat3, Sox2, c-Myc, SSEA-1 und LIF-Rezeptor analysiert.

Zunächst wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) analysiert. 6 Tage nach der Kultivierung von E14TG2 α Stammzellen in An- und Abwesenheit von LIF wurde die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase unter Verwendung von NBT/BCIP als Substrat bestimmt (blaue Anfärbung der Zellen; Abb. 4.5a). Auf diese Weise wurde eine 60%ige Verminderung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase nach Entzug von LIF gemessen (Abb. 4.5b). Parallel wurde die EpCAM Expression analysiert.

Tab.4.1: Stammzellmarker für undifferenzierte embryonalen Stammzellen

Stammzellmarker	Referenz
Alkalische Phosphatase	(Pease <i>et al.</i> 1990)
Transkriptionsfaktor Oct3/4	(Nichols <i>et al.</i> 1998, Okamoto <i>et al.</i> 1990)
Transkriptionsfaktor Stat3	(Kidder <i>et al.</i> 2008)
Transkriptionsfaktor Sox2	(Avilion <i>et al.</i> 2003)
c-myc	(Kidder <i>et al.</i> 2008)
SSEA-1	(Solter und Knowles 1978, Williams <i>et al.</i> 1988)
LIF-R	(Niwa <i>et al.</i> 2009)

Wie in dem Histogramm in Abbildung 4.5b zu sehen ist, war die mEpCAM Expression nach Entzug von LIF ebenfalls um durchschnittlich 55% reduziert. Diese Beobachtung wird näher im Kapitel 4.1.2.5 beschrieben. Als Positivkontrolle und um Zellen, welche keine AP Färbung aufwiesen, visualisieren zu können, wurde parallel eine Eosin-Färbung durchgeführt (Abb. 4.5a).

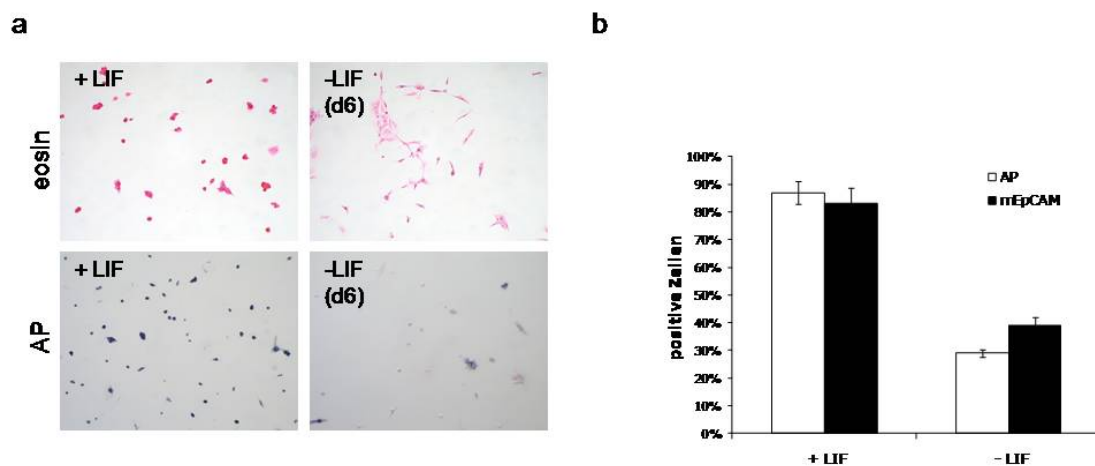


Abb. 4.5: Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase in E14TG2 α Stammzellen: E14TG2 α Zellen wurden 6 Tage in An- und Abwesenheit von LIF im Medium kultiviert. (a) Gezeigt sind die Eosin-Färbung (oben) und die NBT/BCIP-Färbung (unten) zum Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase. 6 Tage nach dem Entzug von LIF sinkt die Aktivität des Enzyms um durchschnittlich 70% (b) Gezeigt ist die statistische Darstellung der Expression von EpCAM und der Aktivität der alkalischen Phosphatase in E14TG2 α Zellen in An- und Abwesenheit von LIF. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuchsreihen (A) und die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei Experimenten (B).

Weitere etablierte Stammzellmarker wie das Proto-Onkogen *c-myc*, ein beschriebenes Zielgen von humanem EpCAM (Munz *et al.*, 2004b), die Transkriptionsfaktoren Oct3/4 (*octamer 4*), *sox-2* (*SRY, sex determining region*

Y box 2 protein) und Stat3 (*signal transducer and activator of transcription*) und der Membranrezeptor LIF-R (*leukemia inhibitory factor receptor*), wurden 6 Tage nach Kultivierung von E14TG2 α Zellen in An- und Abwesenheit von LIF bestimmt. Die gesamt-RNA wurde aus den beiden Zellpopulationen isoliert und die jeweiligen Mengen an mRNA der unterschiedlichen Stammzellmarker mittels RT-PCR mit spezifischen Primerpaaren analysiert. In Abbildung 4.6a sind die Veränderungen der mRNA-Expression von c-Myc, Sox2, LIF-R, Oct3/4, und Stat3 in An- und Abwesenheit von LIF im Kulturmedium dargestellt. Die mRNA Mengen aller gewählten Marker waren 6 Tage nach Entzug von LIF aus dem Kulturmedium reduziert. Als Kontrolle der gleichmäßigen reversen Transkription von Gesamt-RNA beider Zelltypen diente die mRNA-Expression von GAPDH (Abb. 4.6a).

Zusätzlich wurde die Proteinexpression des etablierten Stammzellmarkers Oct3/4 mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern untersucht. E14TG2 α ES Zellen wurden nach einer 6-tägigen Kultur in An- und Abwesenheit von LIF in Lysepuffer aufgenommen und gleiche Proteinmengen in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF Membran wurden Oct3/4 und GAPDH mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern visualisiert. Auch in diesem Fall wurde in Anwesenheit von LIF eine hohe Expression von Oct3/4, die nach 6 Tage LIF-Entzug stark reduziert wurde (Abb. 4.6b). Die unveränderte GAPDH-Expression bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen beider Zellpopulationen.

In den gleichen experimentellen Ansätzen wurde die Expression von dem Zelloberflächenantigen SSEA-1 (*stage-specific embryonic antigen*) durchflusszytometrisch mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörpern bestimmt. In Abbildung 4.6c sind die durchschnittlichen Fluoreszenzmittelwerte von mEpCAM (schwarze Balken) und von SSEA-1 (weiße Balken) in E14TG2 α Zellen, die in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert wurden, dargestellt. Die SSEA1-Oberflächenexpression wurde nach dem Entzug von LIF durchschnittlich um 40% vermindert. Die EpCAM Expression wurde in denselben Proben durchschnittlich um 50% reduziert.

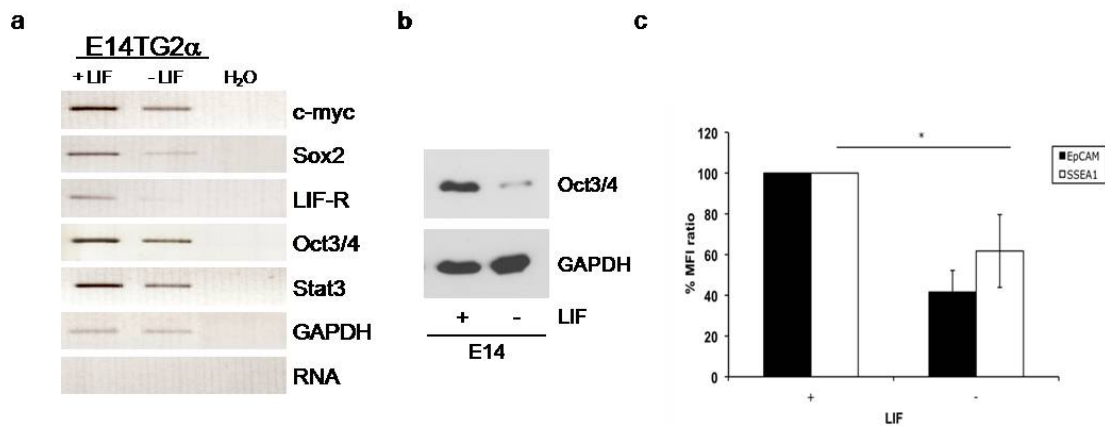


Abb. 4.6: Stammellspezifische Marker werden nach Entzug von LIF negativ reguliert: E14TG2 α Zellen wurden 6 Tage in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert, geerntet und die gesamt-RNA bzw. Proteine isoliert. **(a)** Die isolierte RNA wurde mittels RT-PCR analysiert. Die mRNA-Expression der Stammzellmarker c-Myc, Sox2, LIF-R, Oct3/4, Stat3 wurde nach Entzug von LIF negativ moduliert. Durch die Amplifikation des Haushaltgens GAPDH konnte die gleichmäßige reverse Transkription der gesamt-RNA beider Zellpopulationen nachgewiesen werden. **(b)** Die Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4 wurde in einem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die GAPDH Kontrolle bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen beider Zellpopulationen. **(c)** Die Expression von mEpCAM und SSEA-1 wurde mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern in Zellpopulationen, welche in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert wurden, bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (a, b) und die Fluoreszenzmittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (c). Statistische Signifikanz wird mit einem Sternchen * gekennzeichnet (* $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$).

Um diese Ergebnisse zu untermauern wurde die Lokalisation und Ko-Expression von mEpCAM und Oct3/4 in E14TG2 α embryonalen Stammzellen in An- und Abwesenheit von LIF untersucht. Zu diesem Zweck wurden Doppelfärbungen mit mEpCAM- und Oct3/4-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Avidin-Biotin- bzw. immunfluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die Visualisierung der Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Abb. 4.7a) bzw. mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (Abb. 4.7b). Erwartungsgemäß lokalisierte mEpCAM (rot in der Immunzytochemie; grün in der Fluoreszenzmikroskopie) an der Zellmembran und Oct3/4 (blau in der Immunzytochemie; rot in der Fluoreszenzmikroskopie) im Zellkern (blau in der Fluoreszenzmikroskopie). Beide Moleküle wurden in E14TG2 α Zellen in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium (+LIF) stark exprimiert (Abb. 4.7 linke und rechte Bilder). Nach Entzug von LIF waren beide Moleküle in E14TG2 α embryonalen Stammzellen unter der Nachweisgrenze (Abb. 4.7, mittlere Bilder).

Abb. 4.7: EpCAM- und Oct3/4-Expression in E14TG2 α Zellen nach Entzug von LIF: E14TG2 α embryonale Stammzellen wurden in Anwesenheit (links und rechts) und Abwesenheit (Mitte) von LIF über einen Zeitraum von 6 Tagen kultiviert. **(a)** Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern für mEpCAM (rotbraun) und Oct3/4 (blau). Zellen, welche in Abwesenheit von LIF kultiviert wurden, waren durch den Verlust von mEpCAM und Oct3/4 charakterisiert (Originalvergrößerung 400x) **(b)** Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern für mEpCAM (grün) und Oct3/4 (rot) Die Lokalisation von mEpCAM an der Membran und Oct3/4 im Zellkern wurde durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Nach Entzug von LIF waren mEpCAM und Oct3/4 unter der Detektionsgrenze. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Versuchsreihen.

Auffällig war, dass trotz Stammzellkulturbedingungen, einige Stammzellen in der Gesamtpopulation spontan differenzierten, wie im rechten Bild der Abbildung 4.7 zu sehen ist. Die Expression von mEpCAM und Oct3/4 war in diesen spontan differenzierten E14TG2 α Zellen ebenfalls unter der Detektionsgrenze, während undifferenzierte Zellen in derselben Kultur beide Marker stark exprimierten (Abb. 4.7b, rechte Spalte). Dieser differenzielle Phänotyp war auch bei E14TG2 α Zellen, die in direktem Zell-Zell Kontakt standen, nachweisbar (Abb. 4.7a).

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigte, dass der Leukämie Inhibitionsfaktor LIF essentiell für die Erhaltung des murinen embryonalen Stammzellphänotyps ist. Erstmals wurde deutlich, dass die Differenzierung von E14TG2 α Zellen ebenfalls negative Auswirkungen auf die EpCAM Expression hat. Eine detaillierte Untersuchung dieses Phänotyps wird in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.1.2.4 Der Phänotypwechsel von E14TG2 α ES Zellen korreliert mit einer negativen Regulation des mEpCAM Proteins

Die mEpCAM Expression wurde in E14TG2 α embryonalen Stammzellen nach Kultivierung ohne den essentiellen Faktor LIF stark reduziert (siehe Abb. 4.5b und 4.6b). Diese Beobachtungen wurden mit Hilfe weiterer Experimente untermauert.

Im Folgenden wurden E14TG2 α Zellen in An- oder Abwesenheit von LIF 6 Tage kultiviert und die Oberflächenexpression von EpCAM im Verlauf der Differenzierung untersucht. E14TG2 α Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen mEpCAM gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (FITC) in Abwesenheit von EpCAM-spezifischen Antikörpern angefärbt (offene Diagramme). Die Abbildung 4.8a stellt den Verlust der Expression von EpCAM während des Differenzierungsprozesses dar. 6 Tage nach Entzug von LIF konnte eine 70%ige Reduktion der Oberflächenexpression von mEpCAM (gefüllte Diagramme) beobachtet werden. E14TG2 α Zellen, welche in Anwesenheit von LIF kultiviert wurden, zeigten eine homogene Färbung von mEpCAM auf (Abb. 4.8a, links). Nach Entzug von LIF kam es zu einer heterogenen Expression von mEpCAM mit einer Subpopulation, die durch eine 10-fach verminderte Expression charakterisiert war (Abb. 4.8a, links). Anschließend wurde dieses Phänomen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen visualisiert (Abb. 4.8c). E14TG2 α Zellen wurden in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert und mit spezifischen Antikörpern gegen mEpCAM und Avididin-Biotin gefärbt. In lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich, dass mEpCAM in undifferenzierten Stammzellen (+LIF) stark exprimiert wurde (Abb. 4.8c, links). Unter Kulturbedingungen, die eine Differenzierung der Zellen induzierte (-LIF), wurde mEpCAM nur noch sehr schwach detektiert (Abb. 4.8c, rechts). Gleichermäßen war eine deutlich

Vergrößerung der Zellen und die Ausbildung weiterer Zellfortsätze zu beobachten.

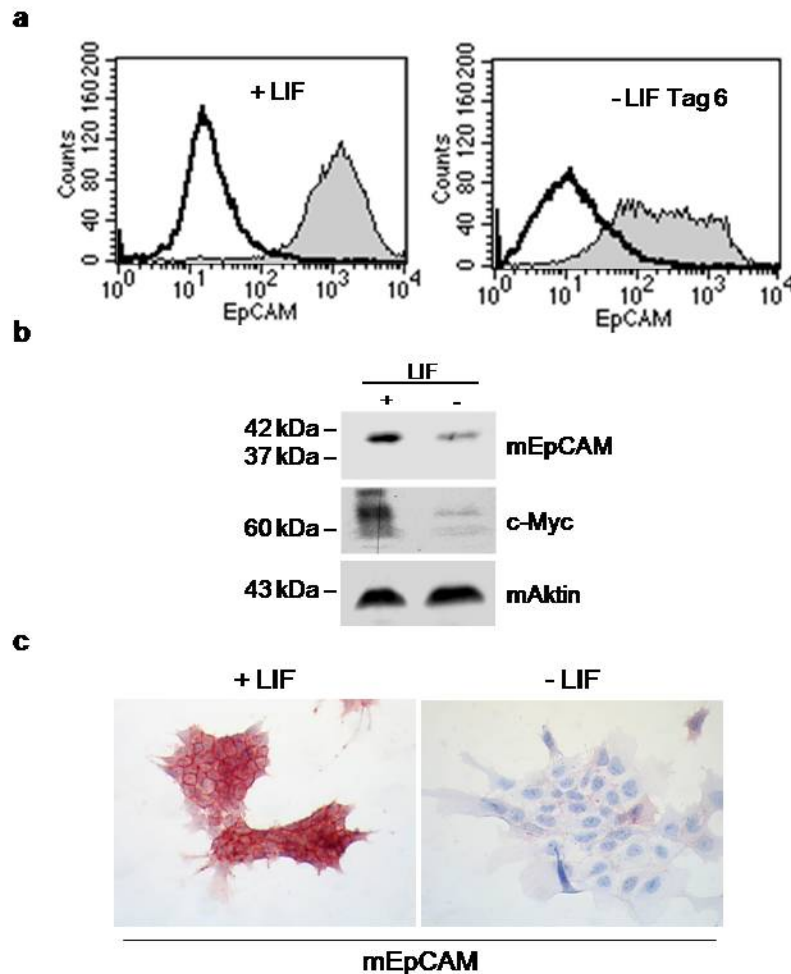


Abb. 4.8: Negative Modulation von mEpCAM nach Entzug von LIF: 6 Tage nach Kultivierung von E14TG2 α Stammzellen in Abwesenheit von LIF konnte eine Reduktion von mEpCAM in differenzierten murinen Stammzellen nachgewiesen werden **(a)** Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von mEpCAM (graue, gefüllte Histogramme) mit FITC-Kontrollen (offene Histogramme). Die mEpCAM Expression wurde in Abwesenheit von LIF um bis zu 70% reduziert. **(b)** Nachweis der Reduktion des mEpCAM-Proteins und seines Zielgenes *c-myc* im Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Expression der mEpCAM- und c-Myc Proteine wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper in Kombination mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Aktin bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen **(c)** Immunhistochemische Färbung von E14TG2 α Zellen kultiviert mit LIF (links) und ohne (rechts) (Originalvergrößerung 400x). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

In den gleichen experimentellen Ansätzen wurde die Expression von mEpCAM und seines Zielgenes *c-myc* auf Proteinebene mit Hilfe von spezifischen Antikörper im Immunoblot untersucht (Abb. 4.8b). E14TG2 α Zellen wurden 6 Tage nach Kultur unter Stammzell- und Differenzierungsbedingungen in Lysepuffer aufgenommen und gleiche Proteinmengen in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF Membran wurden mEpCAM, c-Myc und Aktin mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit

HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern visualisiert. Auch in diesem Fall wurde eine starke Reduktion der Expression von EpCAM in Abwesenheit von LIF beobachtet. Gleichzeitig konnte eine deutliche Verminderung der Expression von c-Myc unter Differenzierungsbedingungen (-LIF) nachgewiesen werden. Die unveränderte Expressionshöhe von Aktin bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen.

4.1.2.5 Phänotypwechsel von E14TG2 α ES Zellkulturen nach Wiedergabe von LIF

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob eine Wiedergabe von LIF in das ES Zellmedium 6 Tage nach Entzug von LIF einen Effekt auf die Morphologie und Proliferation verursacht, und ob dieses Phänomen auch eine Wirkung auf die Expression von EpCAM hat.

Bei der Kultivierung von E14TG2 α Stammzellen in Abwesenheit von LIF zeigten sich nach 6 Tagen deutliche morphologische Veränderungen der embryonalen Stammzellen (siehe Kapitel 4.1.2.1). Lichtmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4.9a) zeigten morphologische Unterschiede zwischen pluripotenten Zellen (Abb. 4.9a links oben) und Zellen, die sich in einem Differenzierungsprozess nach Entzug von LIF befanden (rechts oben). E14TG2 α Zellen wurden weitere 6 Tage in Differenzierungsbedingungen ohne LIF oder alternativ unter Wiedergabe von LIF in das Stammzellmedium kultiviert. Die Kultivierung von E14TG2 α 12 Tage in Abwesenheit von LIF hatte eine weitere Veränderung der Morphologie zur Folge. Nach 12 Tagen unter Entzug von LIF waren E14TG2 α Zellen in der Mehrzahl Spindelförmig mit starken und langen Fortsätzen (Abb. 4.9a, unten rechts). Die Wiedergabe von LIF in das Kulturmedium nach 6 Tagen Entzug verursachte eine Umkehr des differenzierten Phänotyps. E14TG2 α waren vermehrt rundlich und durch das Fehlen von Fortsätzen charakterisiert (Abb. 4.9a, unten rechts). Parallel konnte eine partielle Reversion des Proliferationskapazitäts von E14TG2 α embryonalen Stammzellen und erneutes Wachstum in Kolonien beobachtet werden (Abb. 4.9b). E14TG2 α Zellen wurden zu gleichen Zellzahlen (3×10^5 Zellen/Platte) in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert. Am Tag 6 des LIF Entzuges wurde LIF wiedergegeben und weitere 6 Tage kultiviert. Die gesamte Zellzahl wurde jeden zweiten Tag mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Kammer bestimmt.

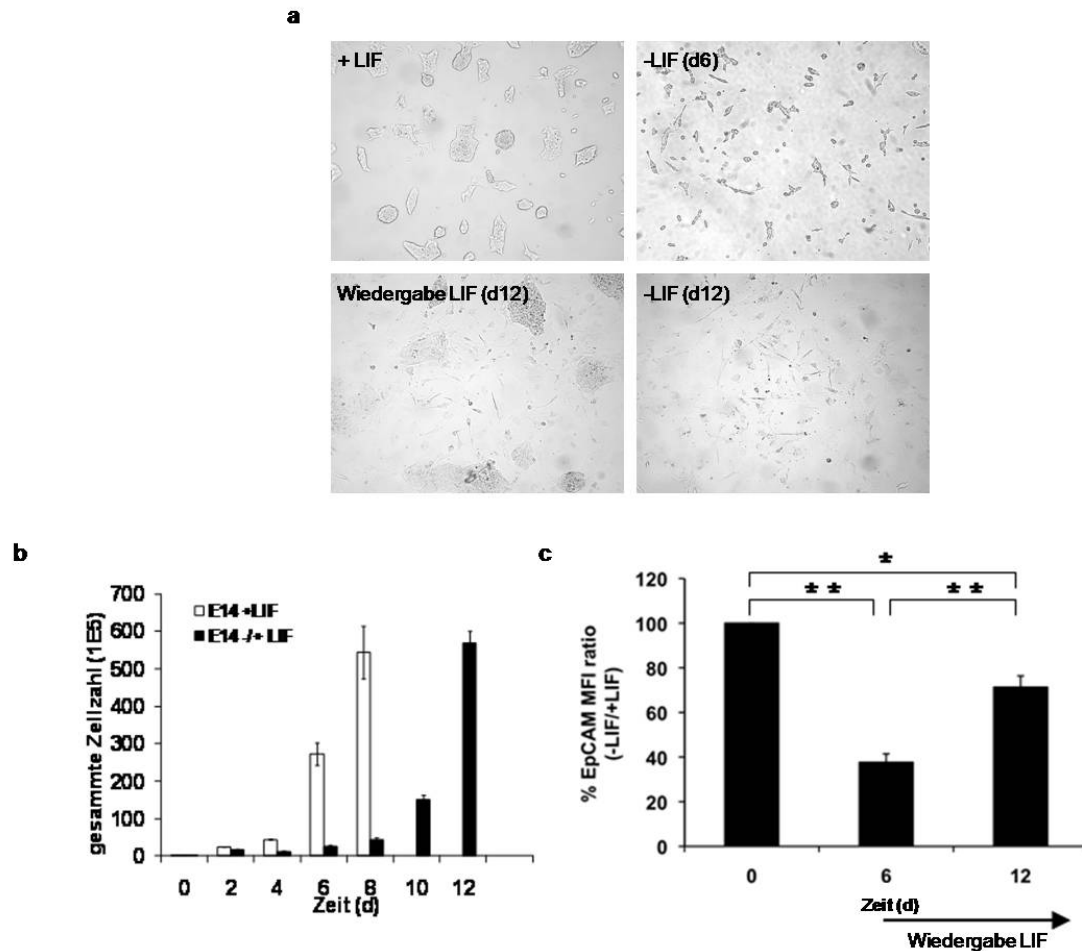


Abb. 4.9: Morphologie-, Expressions- und Proliferationsveränderungen von E14TG2 α Zellen nach Entzug und Wiedergabe des Leukämie Inhibitionsfaktors LIF. E14TG2 α Zellen wurden 6 Tage in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert. An Tag 6 wurden gehungerte Kulturen (-LIF) wieder mit LIF supplementiert. **(a)** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen zeigten Veränderungen in der Morphologie von E14TG2 α Zellen nach Wiedergabe von LIF (Originalvergrößerung 200x). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. **(b)** Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die embryonalen Stammzellen proliferierten exponentiell in Anwesenheit und nach erneuter Zugabe von LIF. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. **(c)** FACS-Analyse der Oberflächenexpression von mEpcAM. Als Positivkontrolle und zum Vergleich dienten Zellen die unter Stammzellbedingungen wuchsen (+LIF). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wird mit einem Sternchen * gekennzeichnet (* \leq 0,05; ** \leq 0,01).

Wie in Abbildung 4.9b zu sehen ist und im Kapitel 4.1.2.2 beschrieben, proliferierten E14TG2 α embryonale Stammzellen exponentiell in Anwesenheit von LIF (weiße Balken). Im Gegensatz hierzu führte die Kultivierung der Stammzellen in Abwesenheit von LIF zu einer 90%igen Reduktion der Proliferation (schwarze Balken). Durch die Wiedergabe von LIF nach 6 Tagen Entzug wurde die Proliferationskapazität der embryonalen Stammzellen wiederhergestellt. Sechs Tage nach Wiedergabe von LIF konnten Zellzahlen bestimmt werden, die einer Proliferation der Zellen nach acht Tagen in

Anwesenheit von LIF entsprachen. Eine Wiedergabe von LIF verursacht demnach eine Reversion des differenzierten Phänotyps und induziert Proliferation.

Zur Überprüfung der EpCAM-Oberflächenexpression nach Wiedergabe von LIF wurden die Zellen anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gefärbt und im FACS-Calibur analysiert. Abbildung 4.9c stellt den Verlust der Expression von EpCAM während des Differenzierungsprozesses dar. Durch die Wiedergabe von LIF nach Entzug konnte eine 50%ige Erhöhung der mEpCAM-Oberflächenexpression im Vergleich zu E14TG2 α Zellen, die weiterhin in Abwesenheit von LIF wuchsen, erreicht werden (Abb. 4.9c).

Diese ersten Ergebnisse zur Differenzierung embryonaler Stammzellen zeigten erstmals eine Korrelation der Expression von mEpCAM mit dem Differenzierungszustand von ES Zellen und wiesen auf eine bedeutende Relevanz von EpCAM in diesem Prozess hin. In Folgeexperimenten werden die Auswirkungen einer Inhibition oder konstitutiven Expression von EpCAM in den Stammzellen näher erforscht.

4.1.3 Modulation der mEpCAM Expression in E14TG2 α ES Zellen

Ausgehend von der Beobachtung, dass das mEpCAM Protein in embryonalen Stammzellen mit dem Differenzierungsgrad invers korreliert und zur Untersuchung einer möglichen Rolle bei der Aufrechterhaltung des ES Zellphänotyps, wurde die Expression von mEpCAM moduliert. Zunächst wurde der Einfluss einer Inhibition der mEpCAM Expression auf den Phänotyp und die Proliferation von ES Zellen untersucht.

4.1.3.1 Optimierung der Transfektion und Transfektionseffizienz

In Folgeexperimenten sollten siRNA Oligonukleotide zur Hemmung der mEpCAM Expression verwendet werden. Zu diesem Zweck musste die Transfektionseffizienz für embryonale Stammzellen, die erfahrungsgemäß sehr schwer transfizierbar sind, optimiert werden. Eine höchstmögliche Effizienz war essentiell um ein hohes Maß an Repression zu erreichen und somit höchstmögliche Effekte in E14TG2 α Stammzellen beobachten zu können.

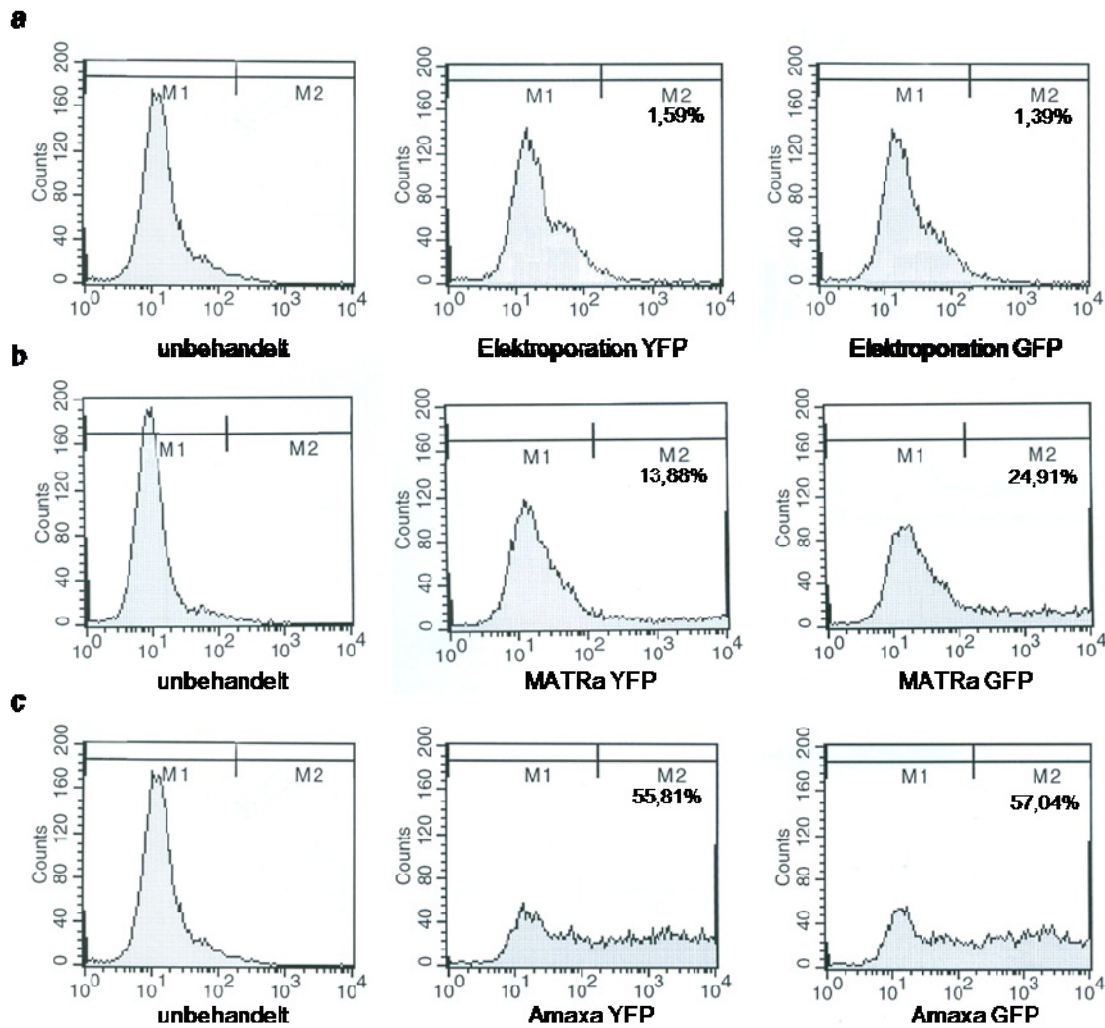


Abb. 4.10: Optimierung der Transfektionseffizienz in E14TG2 α Zellen: E14TG2 α embryonale Stammzellen wurden mittels **(a)** Elektroporation, **(b)** MATRa-A Transfektion und **(c)** Nukleofektion mit einem YFP- oder GFP-Plasmid transfiziert. Die Fluoreszenz wurde nach 48h in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Mit der Nukleofektion wurden jeweils >50% der analysierten Zellen transfiziert.

Zwei unterschiedliche Expressionsplasmide für YFP und GFP, die für das gelbe bzw. das grüne Fluoreszenzgen kodieren, wurden als Reporterplasmide zur Optimierung der Transfektion verwendet. Die Plasmide wurden mit drei verschiedenen Methoden transfiziert: Elektroporation, Magnetische Transfektion (MATRa) und Nukleofektion. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als negative Kontrolle dienten unbehandelte ES Zellen zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz.

Die Abbildung 4.10 demonstriert, dass die Methode der Nukleofektion nach Anweisung der Firma AMAXA die effizienteste Methode war. 55% der ES Zellen exprimierten YFP, 57% exprimierten GFP nach Nukleofektion im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.10c). Dagegen war die Elektroporation die

uneffektivste Methode. Nur 1,6% der ES Zellen haben das YFP Protein und 1,4% das GFP Protein exprimiert (Abb. 4.10a). Die Transfektionsmethode MATRa, welche auf DNA-beladene paramagnetische Kügelchen und einem magnetischen Feld basiert, erreichte eine Effizienz von 13,9% bzw. 24,9% (Abb.4.10b). Infolgedessen wurde die Nukleofektion als Transfektionsmethode für die folgenden Experimente ausgewählt.

4.1.3.2 Inhibierung der mEpCAM Expression mittels RNAi

In den folgenden Experimenten sollte der Effekt einer Repression der mEpCAM Expression unter ES-Zellbedingungen, *i.e.* in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium, untersucht werden. Hierzu wurde die Translation des murinen EpCAM Proteins durch Transfektion spezifischer siRNA (*small interfering RNAs*), welche die mRNA des *epcam* Gens gezielt binden und zu dessen Degradation führen, *in vitro* transient reprimiert. Zunächst wurde die Effizienz von drei verschiedenen siRNAs, die unterschiedlichen Regionen der mRNA von EpCAM entsprechen (Daten nicht gezeigt), untersucht. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde jeweils die effektivste siRNA verwendet. Die getesteten siRNAs wiesen laut BLAST-Sequenz Analyse keine vollständige Homologie zu anderen Regionen im murinen Genom auf. E14TG2 α Zellen wurden zu gleichen Zellzahlen ausplattiert und mit 100nMol EpCAM spezifischer, doppelsträngiger Oligonukleotide oder 100nMol einer Kontrolle (csi) transfiziert. Diese Experimente wurden in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium durchgeführt, so dass Veränderungen der EpCAM Expression in den E14TG2 α Zellen unter Stammzellbedingungen untersucht werden konnten. Die Kontroll siRNA ist käuflich erhältlich und wurde so gewählt, dass sie keine Zielgene innerhalb des Mausgenoms aufweist (Eurogentec Seraing, Belgien). Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Wirkung der Transfektion von 21-mer Oligonukleotiden gering gehalten. 48 h nach Transfektion von siRNAs wurden diese Zellen auf die Expression von mEpCAM analysiert.

Die Ergebnisse der Modulation von mEpCAM mittels siRNA wurden im FACS analysiert und sind in der Abbildung 4.11 dargestellt. Die Oberflächenexpression von EpCAM wurde trotz der Anwesenheit von LIF durch spezifische siRNAs partiell inhibiert. Eine Inhibition um 50% (offenes Histogramm) verglichen zur Kontrolle siRNA (csi, graues Histogramm) wurde

gemessen. In dem mittleren und dem rechten Diagramm ist jeweils die Expression von mEpCAM gegen die Zellgröße aufgetragen (Forward Scatter, FSC). Aus diesen Dot Blots geht hervor, dass die gesamte Zellpopulation mit einer Reduktion der Expression von mEpCAM nach einer Transfektion mit spezifischer siRNA reagierte. Unter diesen Bedingungen konnte des Weiteren eine Veränderung in der Zellgröße zwischen den Kontrollzellen und den spezifischen Transfektanten beobachtet werden (mittleres und rechtes Diagramm). Zellen, welche mit einer EpCAM-spezifischen siRNA transfiziert wurden, zeigten eine leichte aber konsistente Verschiebung nach rechts im Dot Blot, ein Maß für die Vergrößerung der Zellen (Abb. 4.11, Vergleich mittleres und rechtes Histogramm).

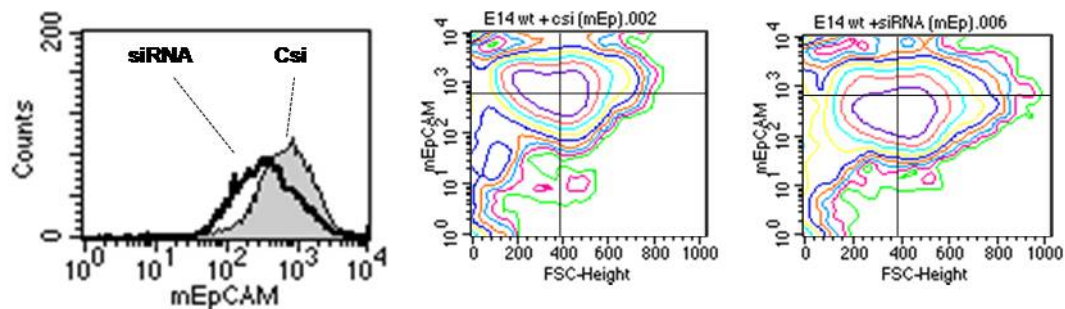


Abb. 4.11: Reduktion der Oberflächenexpression von mEpCAM in E14TG2 α ES Zellen nach Transfektion mit siRNA: E14TG2 α embryonale Stammzellen wurden mit einer spezifischen mEpCAM siRNA (siRNA) oder einer negativen Kontrolle (csi) transient transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mittels FACS auf die Anwesenheit von mEpCAM an der Zelloberfläche analysiert. Die Expression von mEpCAM war nach spezifischer RNA Interferenz im Vergleich zu den csi-behandelten Zellen (graues gefülltes Histogramm) um 40% reduziert (offenes Histogramm). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3.3 Die Inhibition von mEpCAM hat einen Einfluss auf die Zellzahl

Der Entzug von LIF im Kulturmedium von ES Zellen induzierte eine Reduktion der mEpCAM Expression und eine Verminderung der erreichten Zellzahlen in Kultur *in vitro*. In den hier dargestellten Experimenten sollte der Einfluss einer alleinigen Hemmung der mEpCAM Expression in Anwesenheit von LIF auf den ES Zellphänotyp bestimmt werden. Daher wurde parallel zur Expressionsanalyse der Einfluss der spezifischen Repression von mEpCAM auf die Zellproliferation analysiert. Die Reduktion der mEpCAM Expression mittels siRNA induzierte eine 40%ige Hemmung der Proliferation von E14TG2 α Stammzellen (Abb. 4.12) im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen und in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium.

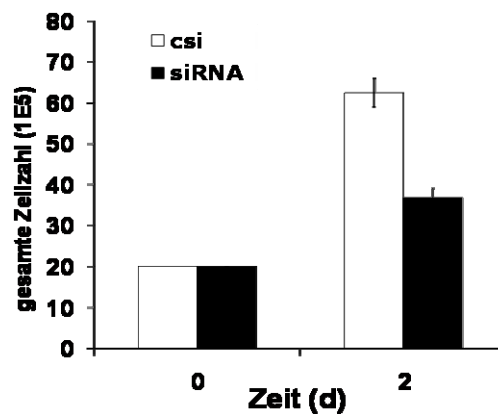


Abb. 4.12: Reduktion der Zellproliferation nach einer RNAi-vermittelten Inhibition der mEpCAM Expression: Zwei Tage nach transienter Transfektion von E14TG2 α ES Zellen mit csi und siRNA gegen mEpCAM, wurden die Zellen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Die Behandlung mit EpCAM-spezifischer siRNA führte zur 40%igen Reduktion der Proliferation der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3.4 Die Repression von mEpCAM induziert keine Apoptose

Die beobachtete Verminderung der Zellzahl nach einer Hemmung der mEpCAM Expression kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen können Zellen stärker in Apoptose gehen und/oder den Zellzyklus langsamer durchschreiten.

Die Apoptoserate wurde im Folgenden in E14TG2 α Stammzellen in Anhängigkeit der mEpCAM Expression analysiert. Hierzu wurden siRNA behandelte E14TG2 α Stammzellen mit Propidiumiodid gefärbt, um die genomische DNA-Fragmentierung und somit die Apoptose zu messen. Eine Anfärbung mit Propidiumiodid erlaubt die Unterscheidung zwischen Zellen in der G1-Phase (DNA Gehalt $n=2$), in der G2-Phase (DNA Gehalt $n=4$) und Zellen mit fragmentierter DNA (subG1; DNA Gehalt $<n=2$). Abbildung 4.13 stellt die Ergebnisse dieser Experimente dar. Nach Transfektion der Stammzellen mit spezifischer EpCAM-siRNA wurde die Oberflächenexpression von EpCAM inhibiert (Abb. 4.13a). Die Transfektion einer Kontroll-siRNA hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Expression von EpCAM im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Das Histogramm in der Abbildung 4.13b stellt die Induktion der Apoptose nach einer Inhibierung von mEpCAM dar. Sowohl nach Behandlung der Zellen mit Kontroll- als auch mit EpCAM-siRNA kam es zu einer gleichbleibenden durchschnittlichen Apoptoserate von 2.5% (Abb. 4.13b, c). Diese Ergebnisse zeigen, dass keine signifikante Induktion der Apoptose als Konsequenz der Inhibition von mEpCAM erfolgt.

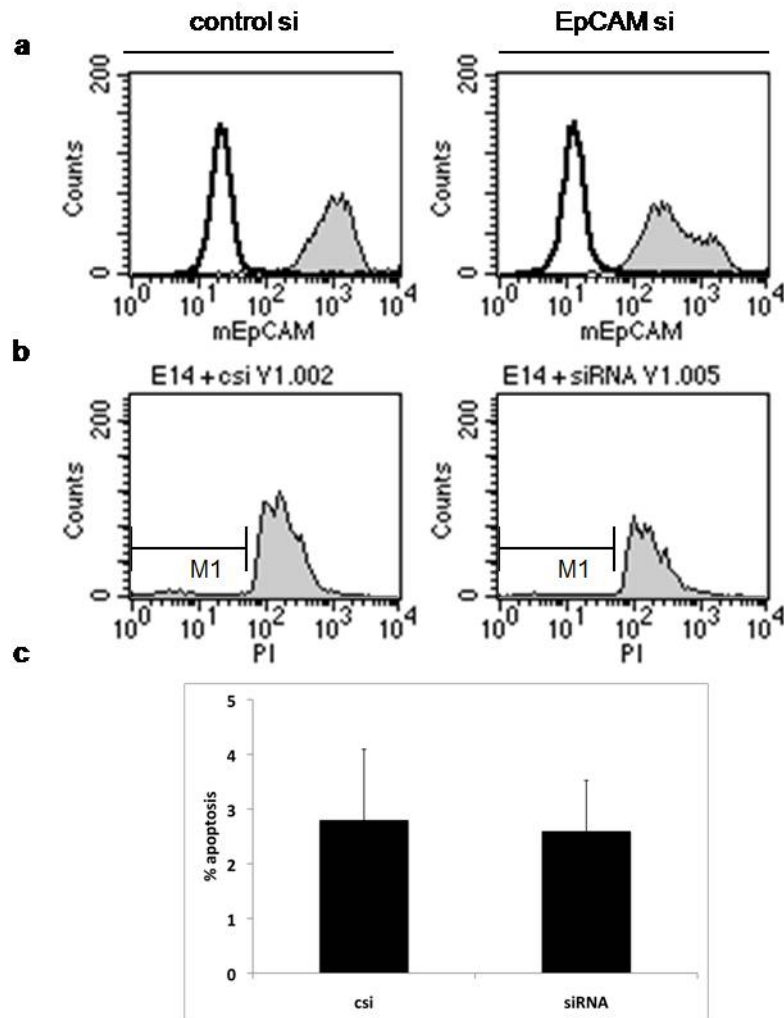


Abb. 4.13: Die mEpCAM-Inhibition induziert keine Apoptose in E14TG2 α embryonalen Stammzellen: (a) E14TG2 α ES Zellen wurden mit einer EpCAM-spezifischen siRNA und einer Kontroll-siRNA transient transfiziert und nach 48 h analysiert. (a) Durchflusszytometrische Analysen zeigen die mEpCAM Expression nach Behandlung mit Kontroll- oder spezifischer siRNA in Anwesenheit von LIF (b, c) Nach transienter Transfektion von E14TG2 α ES Zellen wurden die Zellen mit PI gefärbt um die Fragmentierung der DNA nachzuweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3.5 Die Repression von mEpCAM in ES Zellen verursacht eine Reduktion von spezifischen Stammzellmarkern

Um weitere Effekte der Repression von mEpCAM in ES Zellen zu studieren, wurden die Expression und Aktivität von etablierten Stammzellmarkern unter normalen Kulturbedingungen in Anwesenheit von LIF untersucht. Auf diese Weise sollte der Einfluss der mEpCAM Expression auf den Phänotyp von ES Zellen auf molekularer Ebene bestimmt werden.

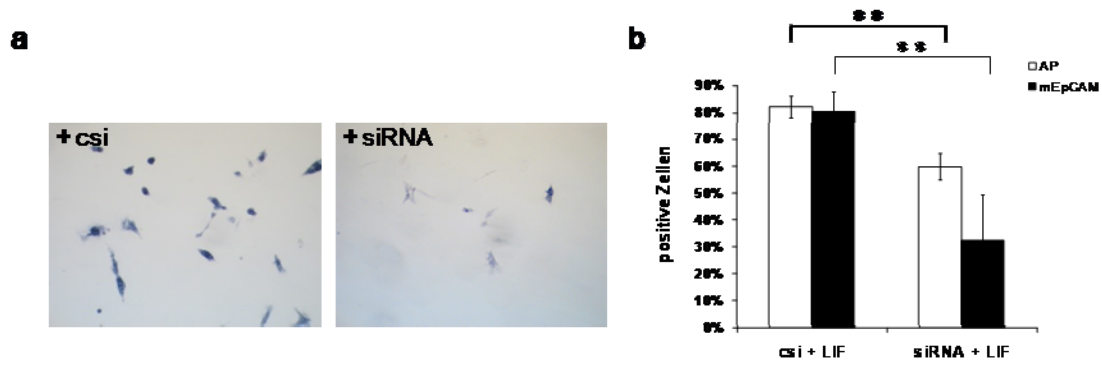


Abb. 4.14: Die Inhibition von mEpCAM mittels siRNA führt zu einer Reduktion der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP): Zwei Tage nach transienter Transfektion von E14TG2 α ES Zellen mit csi und siRNA gegen mEpCAM, wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase analysiert. (a) Die NBT/BCIP-Färbung stellt die Enzymaktivität in blau dar, welche nach einer Hemmung der mEpCAM Expression stark reduziert war (Original Vergrößerung 100x). (b) Grafische Darstellung der Expression von EpCAM und der Aktivität der AP. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuchsreihen. Statistische Signifikanz wird mit einem Sternchen * gekennzeichnet (* $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$).

Zu diesem Zweck wurden E14TG2 α ES Zellen zu gleichen Zellzahlen ausplattiert und mit EpCAM-spezifischer oder einer Kontroll-siRNA transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase unter Verwendung von NBT/BCIP als Substrat bestimmt (blaue Anfärbung der Zellen; Abb. 4.14a). Die Reduktion der mEpCAM Expression (weiße Balken) um durchschnittlich 60% resultierte in einer 30%igen, signifikanten Verminderung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase (schwarze Balken; Abb. 4.14b).

Weitere charakteristische Stammzellmarker wie *c-myc*, Sox 2, LIF-R Stat3 und Oct3/4, wurden nach der Inhibierung von mEpCAM unter Stammzell Kulturbedingungen untersucht. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben mit siRNA Oligonukleotiden behandelt und nach 48h die gesamte RNA aus den Zellen isoliert. Die jeweiligen Mengen an mRNA der unterschiedlichen Stammzellmarker wurden mittels RT-PCR mit spezifischen Primerpaaren analysiert. In Abbildung 4.15a ist die Veränderungen der mRNA-Expression der unterschiedlichen Marker in Abhängigkeit von der Inhibierung von mEpCAM dargestellt. Das Proto-Onkogen *c-myc*, ein beschriebenes Zielgen von humanem EpCAM (Munz et al, 2004b), die Transkriptionsfaktoren *sox-2* und Stat3 und der Membranrezeptor LIF-R wurden nach einer EpCAM Inhibition trotz Anwesenheit von LIF im Kulturmedium reduziert. Als Kontrolle diente die gleichmäßige mRNA-Expression des Haushaltgens GAPDH.

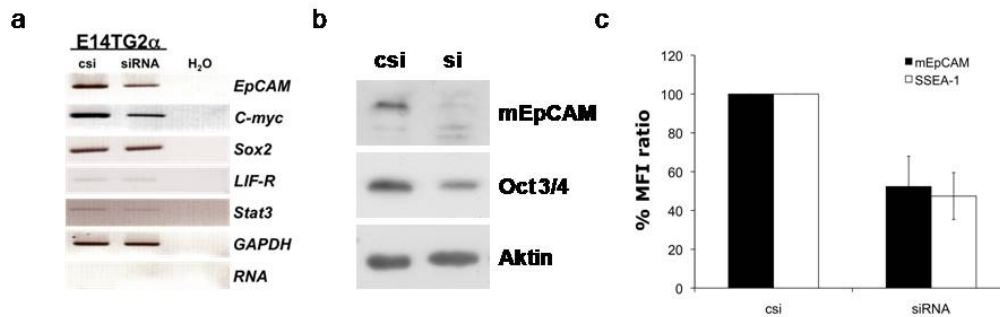


Abb. 4.15: Die Inhibition von mEpCAM mittels siRNA führt zu einer reduzierten Expression wichtiger Stammzellmarker: E14TG2 α ES Zellen wurden mit einer EpCAM-spezifischen siRNA transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. **(a)** Die gesamt-RNA wurde nach 48 h isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Die mRNA-Expression der Stammzellmarker c-Myc, Sox2, LIF-R, Oct3/4, Stat3 wurde nach einer Repression der mEpCAM Expression negativ reguliert. Die gleichmäßige Expression der mRNA des Haushaltgens GAPDH bestätigte gleiche Ausgangsmengen der jeweils verwendeten mRNAs. **(b)** Die Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4 und des EpCAM Proteins wurden zusätzlich in einem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Aktin Kontrolle bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen. **(c)** Die SSEA-1-Expression wurde durchflusszytometrisch mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Inhibition von mEpCAM führte zu einer erniedrigten SSEA-1-Expression. Dargestellt sind die durchschnittlichen Fluoreszenzmittelwerte. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (a, b) und die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Experimenten (c).

Zusätzlich wurde die Proteinexpression von mEpCAM und des Stammzellmarkers Oct3/4 mittels Immunoblot untersucht (Abb. 4.15b). E14TG2 α ES Zellen wurden nach Behandlung mit siRNAs in Lysepuffer aufgenommen und gleiche Proteinmengen in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF Membran wurden mEpCAM, Oct3/4 und Aktin mit spezifischen Antikörpern in Kombination mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern visualisiert. Auch in diesem Fall wurde in Anwesenheit von LIF 48 h nach einer spezifischen Inhibition der EpCAM Expression in ES Zellen eine Reduktion von Oct3/4 nachgewiesen (Abb. 4.15b). In den gleichen experimentellen Ansätzen wurde die Expression von SSEA-1 durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 4.15c sind die durchschnittlichen Fluoreszenzmittelwerte von mEpCAM (schwarze Balken) und von SSEA-1 (weiße Balken) mit Kontroll-siRNA oder mEpCAM-spezifischer siRNA in E14TG2 α Zellen dargestellt. Die SSEA1-Oberflächenexpression wurde nach einer Inhibition von EpCAM (50%) durchschnittlich um 55% vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine spezifische Reduktion von mEpCAM in murinen Stammzellen unter ES Kulturbedingungen zur negativen Regulation von etablierten Stammzellmarkern führt.

4.1.4 Analyse der Auswirkung einer konstitutiven Expression von mEpCAM in Stammzellen

Die Repression der Expression von mEpCAM induzierte einen Phänotyp von differenzierenden ES Zellen, einhergehend mit einem Verlust der Proliferation, und weist somit auf eine essentielle Rolle dieses Proteins bei der Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps. Daher stellte sich die Frage, ob eine konstitutive Expression von mEpCAM in der Lage ist, den Phänotyp von differenzierenden ES Zellen nach LIF Entzug zu kompensieren.

4.1.4.1 Etablierung zellulärer Systeme zur funktionellen Analyse von EpCAM

Um die Effekte einer konstitutiven Expression von mEpCAM in ES Zellen zu untersuchen, wurde die E14TG2 α Zelllinie mit einem Expressionsplasmid, welches für die gesamte cDNA von murinem EpCAM kodiert (pCAGmEp-HA), stabil transfiziert. Die verwendete cDNA wurde direkt aus den E14TG2 α ES Zellen amplifiziert und mit einem kurzen Epitop des Hämagglutinin (HA) Proteins des Influenza Virus fusioniert. HA-spezifische Antikörper ermöglichen anschließend eine Differenzierung zwischen endogenem und ektoischem mEpCAM in stabilen Transfektanten. Parallel wurde der entsprechende pCAG Leervektor in E14TG2 α ES Zellen stabil transfiziert, welcher als negative Kontrolle diente (E14-pCAG \emptyset). Jeweils drei stabile Transfektanten als Gesamtzellkulturen und drei stabile Klone von Einzelzellen wurden durch Transfektion von mit pCAGmEp-HA und mit pCAG \emptyset und Selektion mit Puromycin etabliert. Im Folgenden werden die Daten eines Paares von Transfektanten (Gesamtzellkulturen) gezeigt, da sie repräsentativ für alle generierten Klone sind. Die Expression von mEpCAM wurde nach der Selektion zu stabilen Linien in beiden E14TG2 α Transfektanten analysiert. Die dargestellten Daten wurden mit Gesamtzellkulturen gewonnen.

Lysate der beiden stabilen Transfektanten (E14-pCAG \emptyset und E14-pCAGmEp-HA) wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mit mEpCAM- und HA-spezifischen Antikörpern in einem Immunoblot untersucht (Abb. 4.16). Auf diese Weise wurde die Expression von endogenem mEpCAM und von ektoisch exprimiertem mEpCAM-HA visualisiert. Beide Zelllinien produzieren das murine EpCAM-Protein (Abb. 4.16, obere Spalte), in E14-pCAGmEp war zudem das HA-Epitop und somit eine ektoische Expression von mEpCAM nachweisbar

(Abb. 4.16, mittlere Spalte). In beiden Zellklonen kam mEpCAM als glykosyliertes und damit stabileres Protein vor (Munz *et al.* 2008).

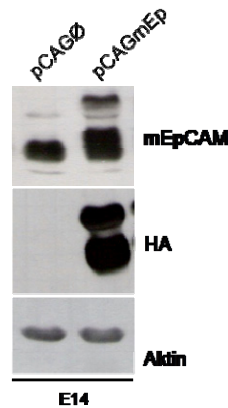


Abb. 4.16: Stabile Transfektion von E14TG2 α Zellen mit mEpCAM: E14TG2 α Stammzellen wurden stabil mit dem Kontrollvektor pCAGØ und dem Expressionsvektor pCAGmEp-HA transfiziert. Stabile Transfektanten wurden unter Zugabe von Puromycin selektiert und anschließend lysiert zur Analyse der Proteinexpression. Die Expression von mEpCAM und mEpCAM-HA wurde in einem Western Blot mit mEpCAM- und HA-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Peroxidasen-gekoppelten Sekundärantikörpern bestimmt. Die Aktin Kontrolle bestätigte die Auftragung gleicher Proteinmengen. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

4.1.4.2 Konstitutiv exprimiertes mEpCAM verlangsamt den Verlust des ES Zellphänotyps nach LIF Entzug

Mit der Etablierung von konstitutiven mEpCAM-exprimierenden E14TG2 α Transfektanten konnten die Effekte einer künstlichen und permanenten Expression von mEpCAM auf den Phänotyp embryonaler Stammzellen in Abwesenheit von LIF analysiert werden. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob mEpCAM den ES Zellphänotyp partiell erhalten kann. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Proliferation von E14TG2 α ES Zellen und die Expression verschiedener Stammzellmarker in den resultierenden ES Zellklonen erforscht.

Um die Proliferation zu untersuchen wurden E14-pCAGØ und E14-pCAGmEp-HA Zellen zu gleichen Zellzahlen in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert. Nach 6 Tagen wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Kammer bestimmt. Wie in der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben (4.1.2.2) und in Abbildung 4.17 zu sehen, wurde ein Proliferationsunterschied zwischen Zellen, die in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert wurden, beobachtet (erster und dritter Balken; Abb. 4.17). Unter ES Zell Kulturbedingungen, *i.e.* in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium, unterschieden sich beide E14TG2 α Transfektanten nicht signifikant. Unter Differenzierungsbedingungen in Abwesenheit von LIF

wurde die Proliferation von E14TG2 α Zellen inhibiert, jedoch konnten signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltransfektanten (E14-pCAG \emptyset) und E14TG2 α Zellen, welche eine konstitutive mEpCAM-HA Expression aufweisen (E14-pCAGmEp-HA), gemessen werden. Die konstitutive Expression des HA-markierten mEpCAM Moleküls resultierte in einer signifikant erhöhten Zellzahl nach LIF Entzug im Vergleich zu Kontrolltransfektanten (Abb. 4.17, zweiter und vierter Balken). mEpCAM-HA Transfektanten wiesen eine 1.8-fache erhöhte Zellzahl verglichen mit Kontrollzelllinien auf. Somit führte die konstitutive Expression von mEpCAM-HA zu einer partiellen Stabilisierung des ES Zellphänotyps unter Kulturbedingungen, welche normalerweise eine Differenzierung der Zellen verursachen.

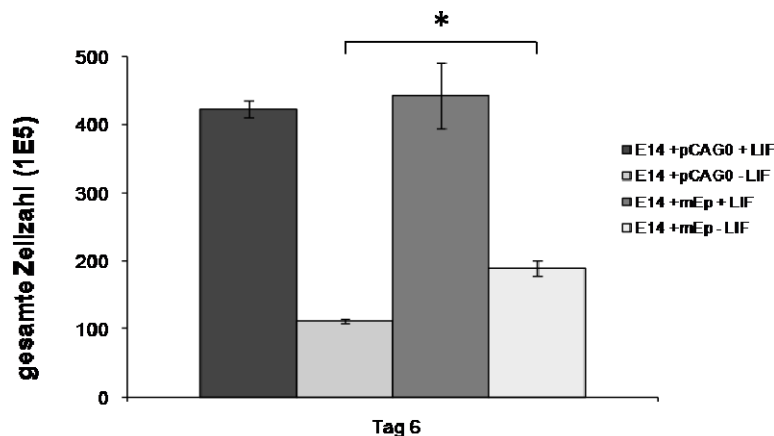


Abb. 4.17: mEpCAM-HA Transfektanten der E14TG2 α Zellen haben einen Proliferationsvorteil in Abwesenheit von LIF: E14TG2 α Zellen wurden stabil mit dem Kontrollvektor pCAG \emptyset und dem Expressionsvektor pCAGmEpCAM-HA transfiziert. Die resultierenden Transfektanten wurden in An- und Abwesenheit von LIF für 6 Tage kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuchsreihen. Statistische Signifikanz wird mit einem Sternchen * gekennzeichnet (* \leq 0,05; ** \leq 0,01).

Veränderungen der Differenzierung von E14TG2 α ES Zellen wurden unter Verwendung von akzeptierten molekularen Markern bestimmt. Zunächst wurden die Aktivität des Stammzellmarkers alkalische Phosphatase mittels einer NBT/BCIP-Färbung und die Expression von mEpCAM unter Verwendung spezifischer Antikörper parallel untersucht. Stabil transfizierte E14TG2 α Zellen (E14-pCAG \emptyset und E14-pCAGmEp-HA) wurden 6 Tage in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert. Erwartungsgemäß induzierte der Entzug von LIF eine Senkung der Expression von EpCAM (Abb. 4.18a, schwarze Balken) und der

Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 4.18a, weiße Balken) in E14TG2 α Kontrollzellen. Die relative Menge der Zellen mit einer messbaren Aktivität der alkalischen Phosphatase und einer Expression von mEpCAM sank auf 10% bzw. 12%, wobei >80% der Zellen beide Marker in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium exprimierten. Die konstitutive Expression von mEpCAM in E14TG2 α war in 70% der Zellen nachweisbar und induzierte eine signifikante Stabilisierung der AP Aktivität in Abwesenheit von LIF, die zu einer 3-fach erhöhten relativen Menge positiver Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen führte (30% versus 10%).

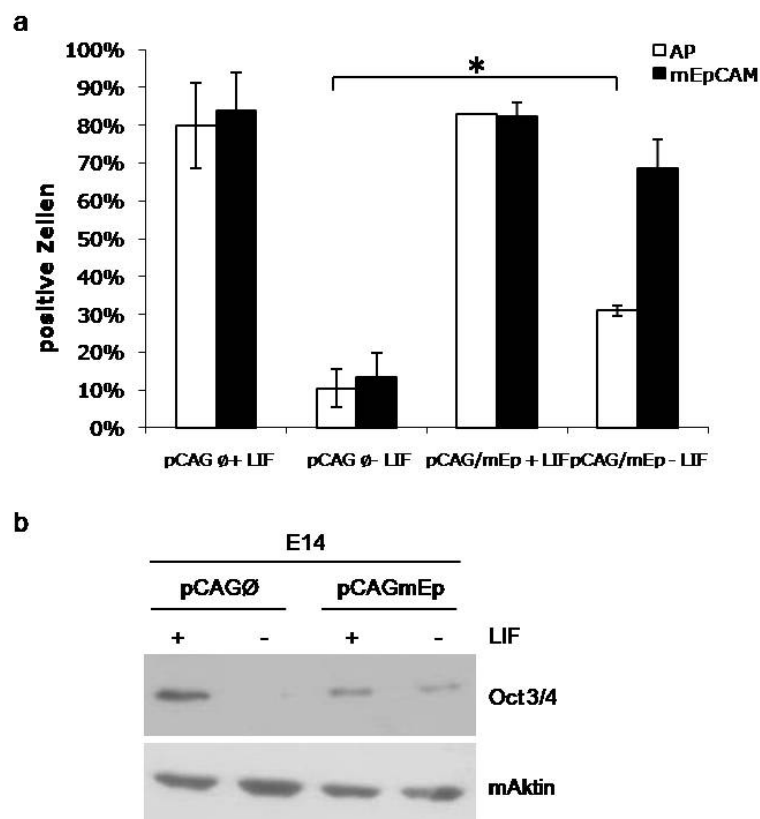


Abb. 4.18: Die konstitutive Expression von mEpCAM-HA in E14TG2 α Zellen wirkt dem Verlust des ES Zellphänotyps entgegen: E14TG2 α Stammzellen wurden stabil mit dem pCAGØ (Leervektor) und dem pCAGmEpCAM-HA Plasmid (Expressionsvektor) transfiziert und in An- oder Abwesenheit von LIF 6 Tage lang kultiviert. **(a)** Statistische Darstellung EpCAM Expression und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, nach stabiler Transfektion mit pCAGmEpCAM-HA und pCAGØ in E14TG2 α Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten in denen mEpCAM mittels Durchflusszytometrie und AP Aktivität unter Verwendung von NBT/BCIP als Substrat bestimmt wurden. **(b)** Die Expression von Oct3/4 wurde mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot analysiert. Gleichmäßige Mengen des Aktin Proteins bestätigten die Auftragung gleicher Proteinmengen. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuchsreihen. Statistische Signifikanz wird mit einem Sternchen * gekennzeichnet (* \leq 0,05; ** \leq 0,01).

Anschließend wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4 mit Hilfe von Immunoblot Experimenten untersucht. Die mit pCAGØ (Leervektor) und

E14-pCAGmEp-HA stabil transfizierten E14TG2 α Zellen wurden wie bereits beschrieben in An- und Abwesenheit von LIF kultiviert. Erwartungsgemäß führte der Entzug von LIF zu einer vollständigen Repression der Oct3/4 Expression in Kontrollzellen (Abb. 4.18b). Im Gegensatz hierzu induzierte die konstitutive Expression von mEpCAM-HA in E14TG2 α Zellen eine stabile Expression von Oct3/4, welche unabhängig von der Zugabe von LIF war (Abb. 4.18b).

Die dargestellten Ergebnisse weisen erstmals eine essentielle Funktion von mEpCAM in der Regulation des ES Zellphänotyps auf. Die Expression von mEpCAM geht mit einem undifferenzierten Phänotyp von ES Zellen einher. Zudem ist mEpCAM in der Lage die Proliferation und die Expression von zentralen Regulatoren von ES Zellen zu kontrollieren.

4.2 Generierung eines konditionalen transgenen Mausmodells für humanes EpCAM

Humanes EpCAM (hEpCAM) wird bei der Karzinogenese in transformierten Epithelzellen und besonders auf Tumorstammzellen, sowie auf embryonalen Stammzellen stark überexprimiert (Gires *et al.* 2009, Visvader und Lindeman 2008, Went *et al.* 2006). Durch intensive Untersuchungen zur Funktion von EpCAM konnten in den letzten Jahren die Mechanismen des EpCAM-Signalweges und sein onkogenes potential nachgewiesen werden. Die Identifikation einer regulierten intramembranen Proteolyse (RIP) als Mechanismus der Aktivierung der EpCAM-Signaltransduktion führte zur Entwicklung eines innovativen Therapieansatzes (Maetzel *et al.* 2009). Diese Therapie besteht aus einer Kombination aus spezifischen Inhibitoren zur Hemmung der Proteasen welche an der RIP von EpCAM beteiligt sind und aus therapeutisch wirksamen EpCAM-spezifischen Antikörpern.

Bisherige Arbeiten zur Funktion von EpCAM wurden vorwiegend *in vitro* und in Tumorzelllinien durchgeführt. Es ist daher gänzlich unbekannt, ob eine konstitutive Expression von hEpCAM und eine damit verbundene Signaltransduktion *in vivo* einen ähnlichen transformierenden Phänotyp hat. Des Weiteren ist die Möglichkeit einer therapeutischen Hemmung dieser Signale von großer klinischer Bedeutung. Ferner gibt es bis *dato* kein Tiermodell, das humanem EpCAM für *in vivo* Untersuchungen konstitutiv überexprimiert. Infolgedessen wurden in der vorliegenden Arbeit Strategien entwickelt, die zur Entwicklung von zwei verschiedenen transgenen

Mausmodellen dienen. Im Folgenden werden die ersten Schritte zur Generierung eines hEpCAM transgenen Mausmodells detailliert beschrieben.

4.2.1 Konditionale hEpCAM Expression unter Verwendung des Cre/LoxP Rekombinationssystems und „Gene Targeting“

Die von dem Bakteriophagen P1 gebildete Cre-Rekombinase (Nagy, 2000) ist in Säugetierzellen funktionell und kann somit in diesen Zellen verwendet werden (Sauer und Henderson 1988). Dieses Enzym erkennt im Genom spezifische 34 bp Nukleotidsequenzen, die sogenannte loxP-Stellen (Abremski und Gottesman 1981), und schneidet loxP-flankierte DNA-Abschnitte aus. Die in dieser Arbeit verwendete Targetierungsstrategie zur konditionalen Expression von hEpCAM *in vivo* basiert auf dem Cre/loxP System.

Um sicherzustellen, dass potentielle Phänotypen einer hEpCAM Expression *in vivo* keine Artefakte der Integration fremder DNA im Mausgenom sind, muss das hEpCAM-Gen in einen bekannten Locus integriert werden, der keine phänotypischen Auswirkungen nach einer heterozygoten Inaktivierung in der Maus aufweist.

Die *rosa26* und *hprt* Gene können ohne phänotypische Auswirkungen heterozygot in der Maus inaktiviert werden. Infolgedessen wurde die cDNA des humanen *epcam* Gens (hEpCAMwt, wildtyp) und eine unglykosylierbare, dreifach mutierte Version von *epcam* (hEpCAMtm) in die XbaI-Schnittstelle im ersten Intron des *rosa26*-Gens integriert. Dadurch wird das Transgen, nach homologer Rekombination in das murine Genom (Abb. 4.19) unter die Kontrolle des *rosa26* Promotors gesetzt (Soriano, 1999). Des Weiteren wurde die hEpCAM cDNA in den mit MluI und BstBI linearisierten Hprt Vektor über die gleichen Schnittstellen integriert (Thompson *et al.* 1989, Tsuda *et al.* 1997). Das Transgen wird somit *in vivo* unter der Steuerung des *hprt* Promotors exprimiert (Abb. 4.20). Zudem verfügt der Targetierungsvektor über „homologe Arme“ für die homologe, Sequenz-spezifische Rekombination in embryonalen Stammzellen („*site specific recombination*“).

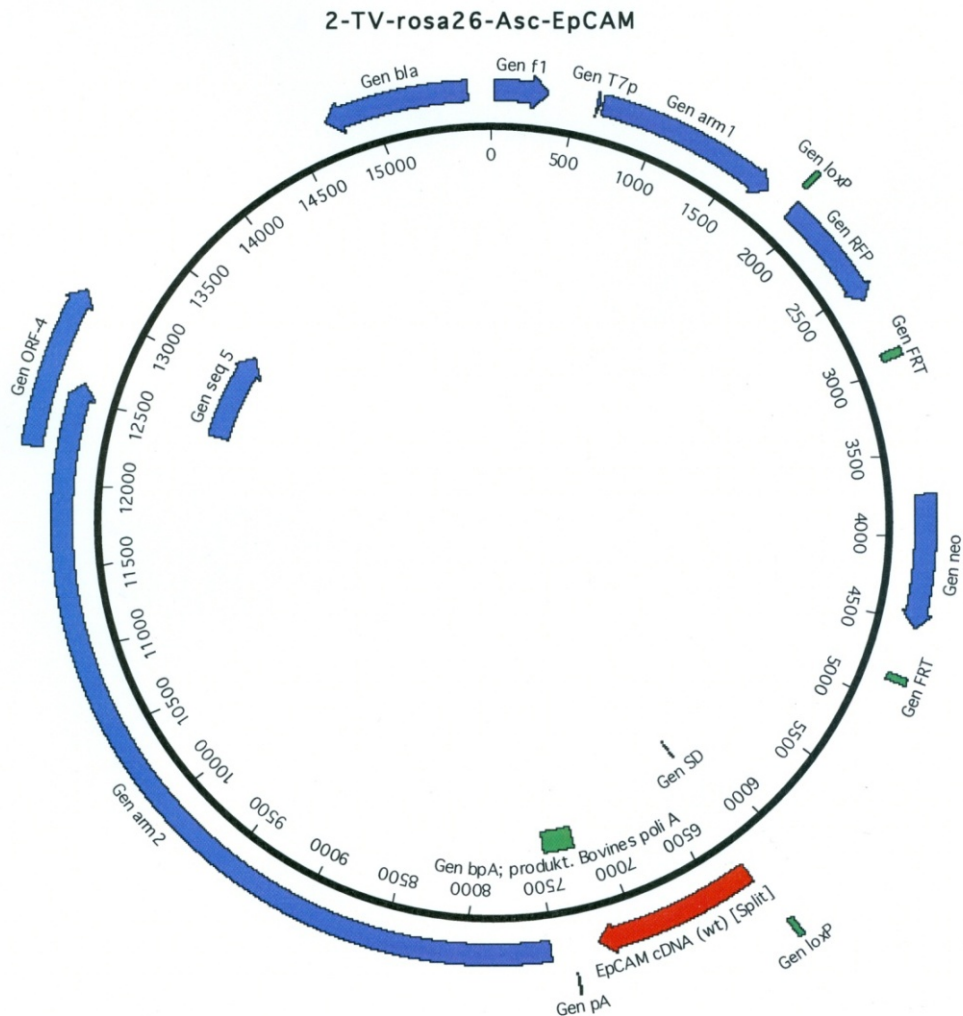


Abb. 4.19: Rosa26-hEpCAMwt Vektor zur konditionalen Gentergetierung in das murine Genom. Schematische Darstellung der Genkarte des Vektors Rosa26 nach Insertion von hEpCAM. Der Vektor wird über einen 4Kb und eine 1 Kb langen, dem *rosa26*-Lokus homologen Bereich in den *rosa26*-Lokus im murinen Genom integriert. Vor dem Transgen ist eine mit loxP Sequenzen flankierte Stopp-Kassette integriert, welche für die FRT-Sequenz flankierte Sequenz des „rot fluoreszierenden Proteins“ (RFP), das Neomycinresistenzgen und eine Stopp-Sequenz kodiert. (FRT: Bindungsstellen der FLP-Rekombinase; lox: LoxP-Bindungsstelle der Cre-Rekombinase; SD: Splice donor; pA: bidirektionelles Polyadenylierungsstelle).

Die Isolierung homolog rekombinierter ES Zellklone wurde *in vitro* mit einem positiven Selektionsmarker (Neomycinresistenzgen) erreicht. Zellen, die eine homologe Rekombination und damit eine Integration des Vektors im Genom durchgeführt haben, sind dadurch resistent gegenüber Neomycin im ES-Zellmedium und können spezifisch selektiert werden.

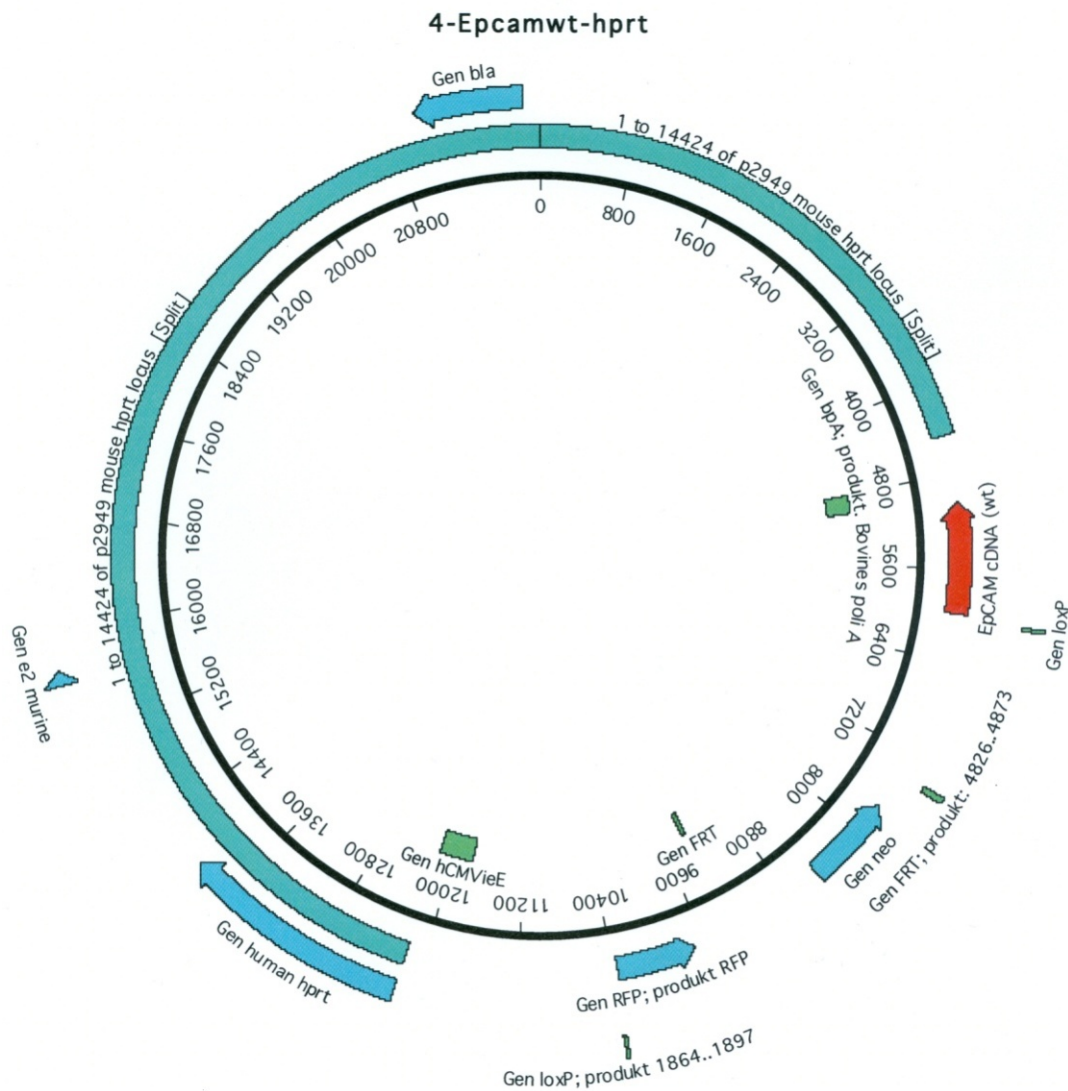


Abb. 4.20: Hprt-hEpCAMwt Vektor zur konditionalen Gentargetierung in das murine Genom. Schematische Darstellung der Genkarte des Vektors Hprt nach Insertion von hEpCAM. Der Vektor wird über einen 4Kb und eine 8 Kb langen dem *hprt*-Lokus homologen Bereich in den *hprt*-Lokus im murinen Genom integriert. Vor dem Transgen ist eine mit loxP Sequenzen flankierte Stopp-Kassette integriert, welche für die FRT-Sequenz flankierte cDNA des „rot fluoreszierenden Proteins“ (RFP), ein Neomycinresistenzgen und eine Stopp-Sequenz kodiert. (FRT: Bindungsstellen der FLP-Rekombinase; lox: LoxP-Bindungsstelle der Cre- Rekombinase; SD: Splice donor; pA: bidirektionelle Polyadenylierungsstelle).

Um eine zellspezifische Expression von *hEpCAM* zu erreichen, wurde zusammen mit dem Transgen eine von loxP Stellen flankierte Stopp-Kassette integriert, welche die Expression des hEpCAM Proteins zunächst verhindert. Kreuzt man die resultierenden Mäuse mit transgenen Tieren, welche die Cre Rekombinase unter gewebespezifischen und/oder induzierbaren Promotoren exprimieren, wird die Stopp-Kassette deletiert und das Gen ausschließlich in dem Zielgewebe exprimiert (Abb. 4.21).

Für die homologe Integration der insgesamt 4 hergestellten Targetierungsvektoren (*rosa26*-hEpCAMwt, *rosa26*-hEpCAMtm, *hprt*-hEpCAMwt und *hprt*-hEpCAMtm) wurden embryonale Stammzellen der Linie E14TG2 α verwendet. Gezeigt sind die Ergebnisse zur Klonierung und Generierung der transgenen Maus mit dem Targetierungsvektor *rosa26*-hEpCAMwt, als relevantes Beispiel.

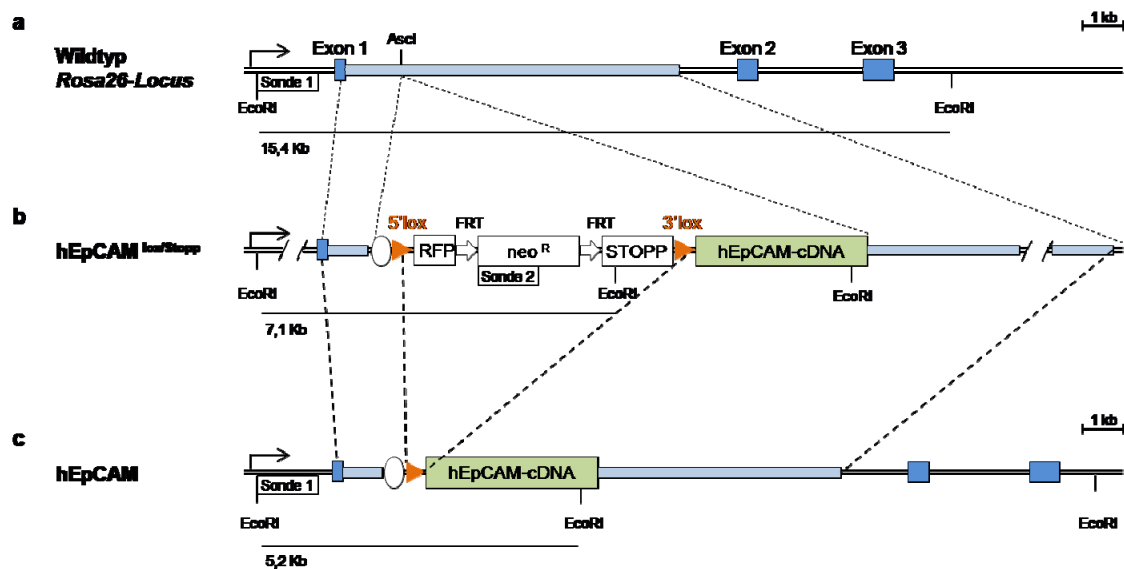


Abb. 4.21: Gtargetierungsstrategie zur Generierung einer konditionalen transgenen Maus für humanes EpCAM. Strategie für die Insertion der hEpCAM cDNA in das erste Intron des *rosa26* Locus. Das Schema zeigt die unterschiedlichen Schnittstellen, welche für die Klonierungen bzw. Detektionen der DNA Fragmente nach homologer Rekombination, und für die Deletion der Stopp-Kassette notwendig sind. Die erwarteten genomischen DNA-Fragmente, welche nach Verdau mit *EcoRI* mit unterschiedlichen Sonden nachweisbar sind, wurden im Schema mit dünnen Linien gekennzeichnet (siehe Abb. 4.25). Durch eine Expression der Cre Rekombinase können die Stopp- und die Selektionskassette entfernt und somit die Expression des Transgens gesteuert werden. Die drei im Schema dargestellten DNA Fragmente zeigen den *rosa26*-Locus: (a) Wildtyp, (b) nach homologer Integration von hEpCAM cDNA und (c) nach der Cre-vermittelten Deletion der Stopp-Kassette. (RFP: Rotes fluoreszierendes Protein; *Neo^R*: Neomycinresistenzgen; FRT: Bindungsstellen der FLP Rekombinase; lox: LoxP Bindungsstelle der Cre Rekombinase).

4.2.2 Klonierung von hEpCAM in die Targetierungsvektoren Rosa26 und Hprt

Zur Klonierung von hEpCAM in die *Rosa26* und *Hprt* Targetierungsvektoren waren mehrere Klonierungsschritte notwendig. Die Benutzung von Subklonierungsvektoren ermöglichte die sukzessive Inkorporation der Elemente, die für das funktionale Rekombinationssystem benötigt wurden. Die Klonierungsstrategie ist in der Abbildung 4.22 schematisch dargestellt und die Elemente, die in jedem Schritt eingefügt wurden, aufgelistet.

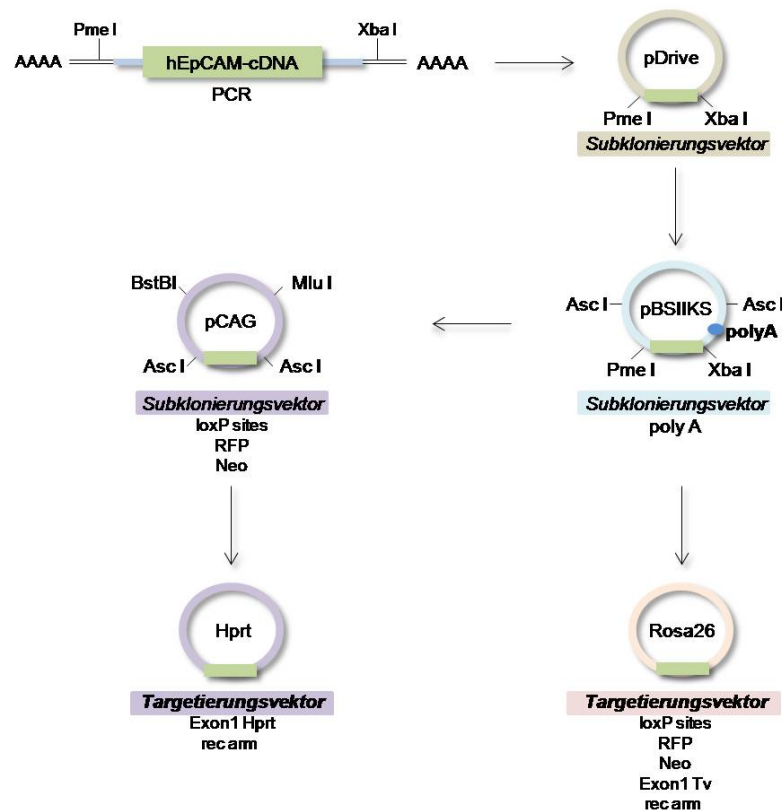


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung der Targetierungsvektoren Rosa26-hEpCAM und hprt-hEpCAM: Nach einer PCR-vermittelten Amplifikation der hEpCAM cDNA wurde das DNA Fragment in unterschiedliche Vektoren kloniert, um die benötigten Elemente in das funktionale Endkonstrukt einzufügen. Angezeigt sind die Restriktionsenzyme und die Elemente, die in jedem Schritt verwendet und eingefügt wurden. (polyA: Polyadenylierungsstelle, Neo^R: Neomycinresistenzgen; RFP: Rotes fluoreszierendes Protein; rec arm: Rekombinationsarm; loxP: LoxP-Bindungstelle der Cre-Rekombinase).

Die hEpCAM cDNA wurde mittels PCR mit einem spezifischen Primerpaar und dem Expressionsvektor pMEP-EpCAM als Vorlage amplifiziert (Abb. 4.23a). Die in der Amplifikation verwendete *Pfx*-Polymerase besitzt eine sehr hohe „*proofreading*“ Aktivität und minimiert somit den Einbau nicht komplementärer Basen. Bei der Synthetisierung der Primer wurden an die Sequenz zusätzliche Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme eingefügt (Pme I und Xba I). Dies ermöglichte die spätere Exzision aus dem pDrive Vektor und die Integration in den pBSIIKS-Vektor.

Das Amplikon wurde direkt nach der PCR in den Klonierungsvektor pDrive integriert. Dieser Vektor enthält überlappende Thyminenden („*T-overhang*“), welche mit den angefügten Adeninenden („*A-overhang*“) des Amplikons Basenpaarungen eingehen. Der pDrive Vektor ermöglicht eine vereinfachte weitere Klonierung und Vervielfältigung des PCR Produkts. pDrive Vektoren

wurden nach der Transformation der Konstrukte in *E. coli* mittels PCR überprüft (Abb. 23b) und durch einen Restriktionsverdau verifiziert (Abb. 23c, e-f).

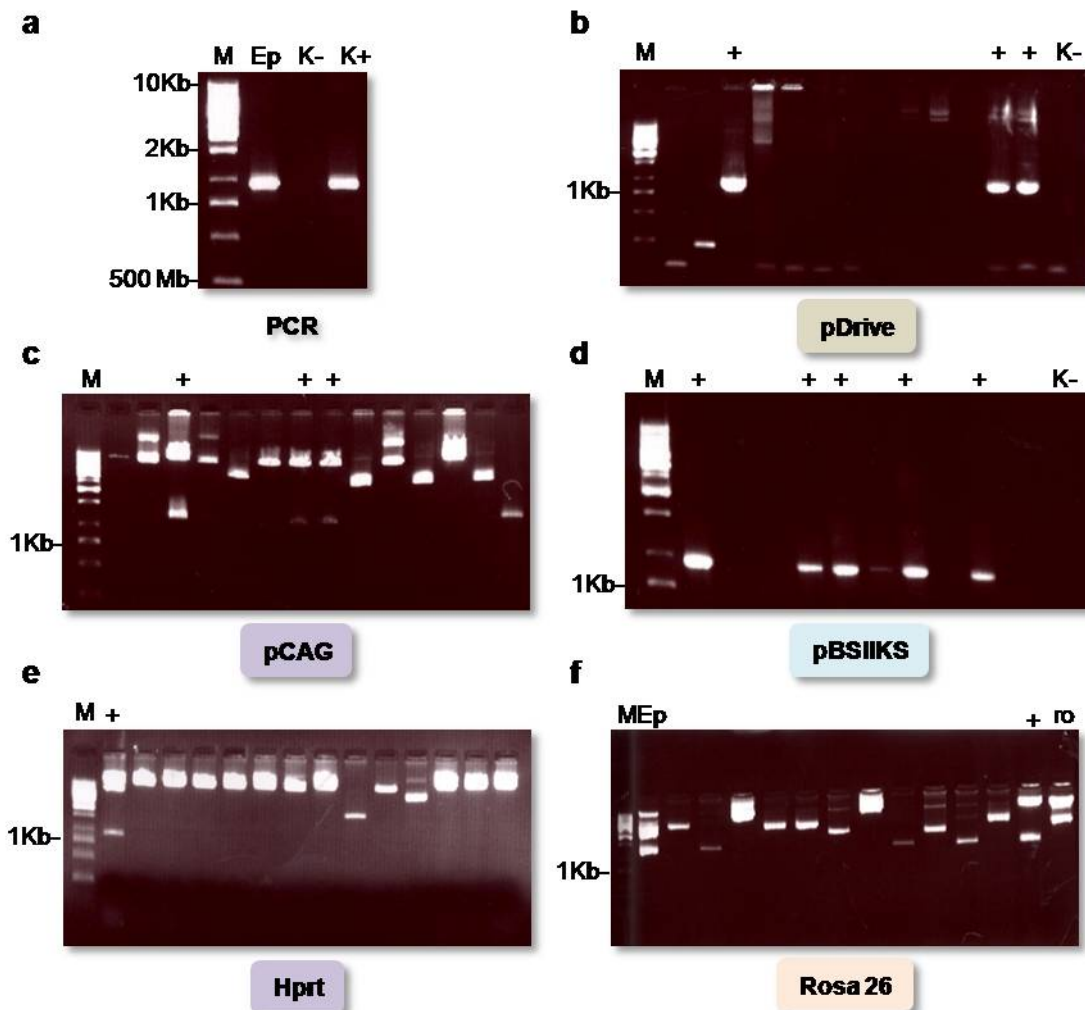


Abb. 4.23: Gelelektrophoretische Auftrennung von hEpCAM Klonen in unterschiedlichen Vektoren nach Restriktionsverdau zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierungen: Nach jedem Klonierungsschritt wurde die korrekte Integration der Konstrukte mittels PCR (a, b, d) und Restriktionsverdau (c, e, f) überprüft. Alle im Verdau positiven Klone wurden zusätzlich durch Sequenzierung verifiziert. (+: positive Klone; Ep: EpCAM; K-: negative Kontrolle; K+: Positivkontrolle; M: Marker; ro:Rosa26)

Vom Vektor pDrive ausgehend wurden die gewünschten Fragmente über die eingefügten Restriktionsschnittstellen PmeI und XbaI ausgeschnitten und das entstandene Fragment unidirektional in den Vektor pBluescript SK+ (pBSKIIS), der mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert wurde, subkloniert (Schematische Darstellung in Abb. 4.22; Analyse der Klone in Abb. 4.23 d). Daraufhin konnte die cDNA von hEpCAM über die Restriktionsschnittstelle AscI aus dem Vektor pBSKIIS isoliert und dadurch eine Polyadenylierungsstelle an die cDNA angefügt werden. Über diese Schnittstellen konnte das Konstrukt jeweils in den finalen Targetierungsvektor Rosa26 (Abb. 4.23 f) und in den

Vektor pCAG (Abb. 4.23 c) integriert werden. Die zusätzliche Subklonierung in pCAG ermöglichte die Integration von loxP-Erkennungsstellen sowie ein Neomycinresistenzgen, die nicht im Targetierungsvektor Hprt vorhanden waren. Das Konstrukt wurde schließlich über die Schnittstellen BstBI und MluI aus pCAG isoliert und in den finalen Targetierungsvektor Hprt über die gleichen Schnittstellen unidirektional integriert (Abb. 4.23e).

Alle Transformationen der Plasmide erfolgten in chemokompetente *E. coli* und die Selektion der Plasmid-enthaltenden Bakterienkolonien über die mitgeführte Ampizillinresistenz. Nach der Isolierung der Plasmiden wurden die resistenten Klone durch PCR Amplifikation, Restriktionsverdau und durch Sequenzanalyse (Sequiserie, Vaterstetten) verifiziert.

4.2.3 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Alle generierten Targetierungsvektoren (rosa26-hEpCAMwt, rosa26-hEpCAMtm, hprt-hEpCAMwt und hprt-hEpCAMtm) wurden nach einer Linearisierung jeweils mit KpnI (Rosa26) oder AseI (Hprt) in die murine embryonale Stammzelllinie E14TG2 α transfiziert (siehe Methoden). Die verwendete ES Linie E14TG2 α stammt aus Blastozysten einer 129/ola Maus. E14TG2 α Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Conrad zur Etablierung von genetisch modifizierten Mauslinien verwendet und in Bezug auf ihre Kapazität zur homologen Rekombination und Keimbahntransmission der transgenen Allele als geeignet befunden. Nach Elektroporation der Targetierungsvektoren wurden Einzelzellklone von ES Zellen unter Zugabe von Neomycin in das Kulturmedium selektioniert. Hprt-Klone wurden zusätzlich mit HAT (*hypoxanthine aminopterin thymidine*) selektioniert, so dass nur Klone, welche eine homologe Rekombination durchgeführt haben, im Medium überleben. Die einzelnen Zellklone von ES Zellen wurden mittels Southern Blot hinsichtlich homologer Rekombination getestet.

4.2.4 Identifikation der gewonnenen Klone durch Southern Blot

Die homologe Rekombination des Targetierungsvektors in den selektierten embryonalen Stammzellklonen wurde durch Southern Blot Experimente nachgeprüft. Genomische DNA aus ES Zellklonen, die aus einer positiven Selektion mit Neomycin hervorgingen, wurde extrahiert, mit EcoRI gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 4.24).

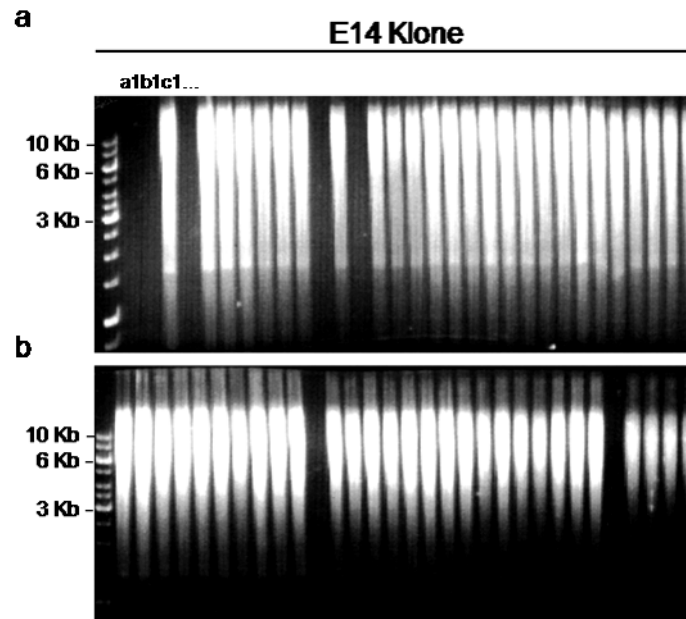


Abb. 4.24 Gelelektrophoretische Auftrennung der genomischen DNA von stabilen E14 ES Zellklonen: Nach der DNA-Extraktion und dem Verdau der genomischen DNA mit EcoRI wurde die DNA von ES Klonen zur Trennung der fragmentierten DNA auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen und anschließend mittels Southern Blot analysiert. **(a)** hEpCAM Wildtyp; **(b)** hEpCAM Triple Mutante.

Die aufgetrennte genomische DNA wurde im Southern Blot Verfahren auf eine Membran transferiert und mit der Rosa26-Sonde 1 hybridisiert (siehe Abb. 4.21a). Die Sonde 1 bindet an Sequenzen des *rosa26*-Lokus in einem Bereich, der 5' außerhalb der homologen Sequenzen des Targetierungsvektors liegt. Bei ES-Zellklonen, die den Targetierungsvektor nicht homolog integriert hatten (Wildtyp Situation -/-), detektiert die Sonde ein 15,4 Kb großes Fragment. Nach homologer Rekombination (heterozygote Situation +/-) wird zusätzlich ein 7,1 Kb großes Fragment, wie in der Abbildung 4.25 schematisch dargestellt, erkannt.

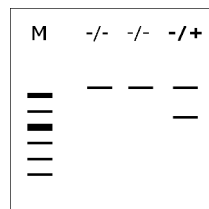


Abb. 4.25: Schematische Darstellung eines Southern Blots nach Hybridisierung mit der Sonde 1 und anschließender Autoradiographie: Die erwarteten genomischen DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit EcoRI differieren in Größe und Anzahl. Klone, welche keine homologe Rekombination aufweisen (-/-), sind durch ein Fragment von 15,4 Kb charakterisiert. Klone, welche eine homologe Rekombination durchgeführt haben (+/-), sind durch zwei Fragmente von 15,4 und 7,1 Kb charakterisiert.

ES Zellklone, die eine homologe Rekombination durchgeführt haben, sind durch eine zusätzlich DNA Bande von 7,1 Kb charakterisiert. Positive Klone sind in

der Abbildung 4.26 zu erkennen und die entsprechenden Spuren mit +/- gekennzeichnet. Gezeigt sind die Ergebnisse nach homologer Rekombination von rosa26-hEpCAM Wildtyp (Abb. 4.26a) und der Triple Mutante (Abb. 4.26b).

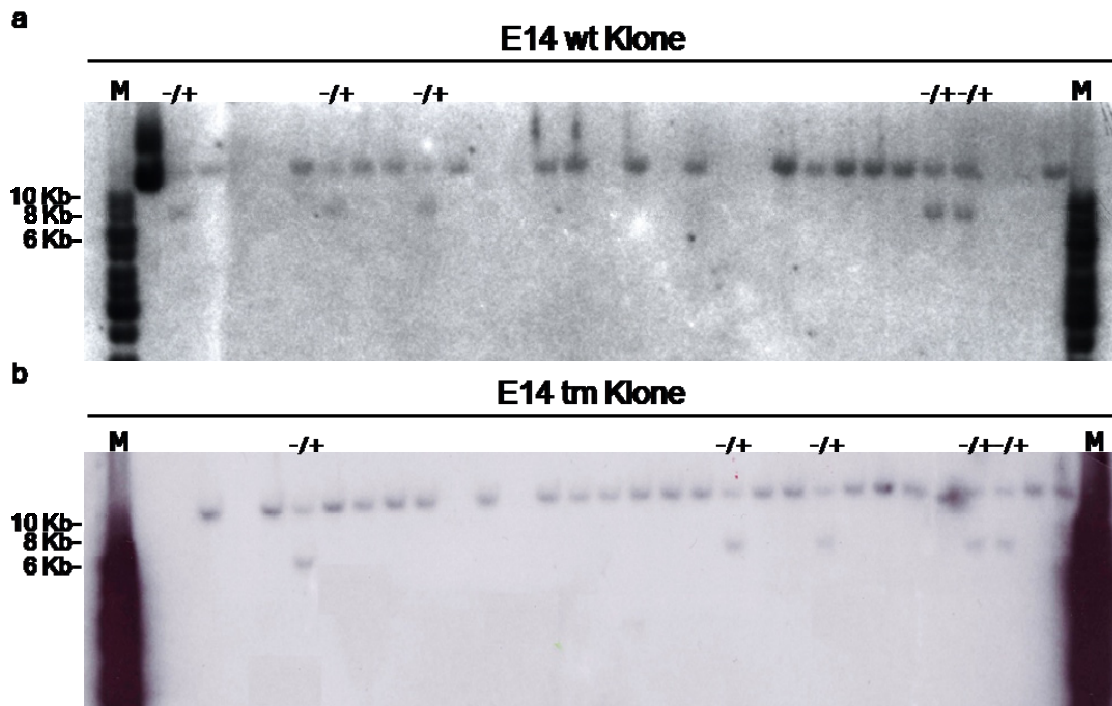


Abb. 4.26: Southern Blot Analyse zur Identifikation von homolog rekombinierten ES Klonen: Bei den homolog rekombinierten Klonen entsteht nach Restriktionsverdau mit EcoRI und Hybridisierung mit der Rosa26-Sonde neben der 15,4 Kb großen Wildtypbande, eine Nebenbande mit 7,1 Kb. Angezeigt sind die positiven Klone (+/-). **(a)** Gezeigt sind ES Zellklone mit dem rekombinierten hEpCAM Wildtypkonstrukt und **(b)** ES Klone mit dem rekombinierten unglykosylierbaren hEpCAM (Tripel Mutante).

Zur weiteren Überprüfung von potentiellen Kandidaten wurden die ES Zellklone bei denen eine homologe Rekombination nachgewiesen wurde mit einer Neomycinresistenzgen-spezifischen Sonde (Abb. 4.21b; Neo-Sonde2) untersucht (Daten nicht gezeigt). So wurden illegitime Integrationen des Konstrukts in das Genom der embryonalen Stammzellen ausgeschlossen. Bei einem homologen rekombinierten Klon detektiert die Sonde nach einem Verdau der DNA mit EcoRI ein 7,1 Kb großes Fragment. Die Größe der Fragmente bei Mehrfachintegration variiert. Keiner der Klone, in denen eine homologe Rekombination mit der Rosa26-Sonde 1 nachgewiesen wurde, war durch zusätzliche Integrationen des Targetierungsvektors gekennzeichnet. Insgesamt konnten 5 homolog rekombinierte Klone aus 288 getesteten identifiziert werden (Abb. 4.26 und Tab. 4.2). Die ermittelte Rekombinationsrate in den Rosa26

Lokus lag somit bei 1.7% für hEpCAMwt und bei 4.7% für hEpCAMtm (9/192 Klone).

Tab. 4.2: Erfassung der Daten nach Isolation und Verifizierung der homolog rekombinierten Klone

	Isolierte Klone nach G418-Selektion	Southern Blot positive Klone	%
rosa26-hEpCAMwt	288	5	1,7
rosa26-hEpCAMtm	192	9	4,7
hpert-hEpCAMwt	288	-	0
hpert-hEpCAMwt	-	-	0

4.2.5 Untersuchung der Cre/LoxP Rekombination in ES Zellklonen

Die oben beschriebenen Klone wurden im Folgenden auf ihre Fähigkeit die LoxP flankierte Stopp-Kassette in Anwesenheit von Cre auszuschneiden untersucht. Um die Funktionalität der Cre-Rekombinase vermittelten Deletion der Stopp-Kassette zu überprüfen, wurden die positive Stammzellklone in proteinfreiem Medium kultiviert und mit rekombinantem Cre Protein für 24 h behandelt. Die Expression von hEpCAM, die ein Indikator für die Deletion der Stopp-Kassette ist, wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern überprüft. Als negative Kontrolle wurden die gleichen Stammzellklone in Abwesenheit von Cre-Rekombinase verwendet.

Wie in der Abbildung 4.27 dargestellt, kann 24 h nach Zugabe des rekombinanten Cre Proteins eine homogene Subpopulation der ES Zellen, die das humane EpCAM auf der Zelloberfläche exprimieren (graue Diagramme), nachgewiesen werden. In unbehandelten Zellen wurde kein hEpCAM Protein auf der Zelloberfläche detektiert (offene Diagramme). Demnach blockiert die 5'-befindliche Stopp-Kassette die Transkription des Transgens sehr effektiv. Klon 2 und 4 wiesen eine überlegene Expression von hEpCAM nach Behandlung der Zellen mit rekombinantem Cre Enzym auf, und wurden aus diesem Grund für die Mikroinjektion in Blastozysten verwendet.

Eine mögliche Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen murines und humanes EpCAM wurde in Vorversuchen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

Abb. 4.27: Deletion der Stopp-Kassette und Expression von hEpCAM in E14TG2 α Stammzellen: Stabile E14TG2 α Zellklone wurden mit rekombinantem Cre behandelt um die Stopp-Kassette zu entfernen. Nach 24h wurden die Zellen durchflusszytometrisch mit hEpCAM-spezifischen und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als negative Kontrolle. Die Expression von humanem EpCAM war bereits nach 24 Stunden nachweisbar. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.6 Chimärenherstellung und Rückkreuzung der Chimären

Die Injektion der embryonalen Stammzellklone in Blastozysten erfolgte im Institut für Entwicklungsgenetik des Helmholtz Zentrums, Neuherberg, im Labor von Prof. Wurst. Die homolog rekombinierten, embryonalen Stammzellen der Klone 2 und 4 wurden in Mausblastozysten injiziert (Tab. 4.3), die von C57BL/6 Inzuchtmäusen gewonnen wurden. Die injizierten Blastozysten wurden mittels Embryotransfer in scheinchwangere und synchronisierte Empfängerweibchen implantiert. Es wurden insgesamt 8 chimäre Tiere geboren, die an dem gescheckten Haarkleid zu erkennen waren (Abb. 4.28). Etwa 70-95% des schwarzen Haarkleides stammte von der C57BL/6-Blastozyste, die restlichen 5-30% der Haare wiesen eine bräunliche Agouti Farbe auf. Diese Chimären wurden im Alter von 8-12 Wochen mit C57BL/6-Weibchen (n=5) oder

MC57BL/6-Männchen (n=3) verpaart. Kein Nachkommen aus diesen Verpaarungen hatte ein homogen braunes Agouti Fell, das auf eine Keimbahnübertragung des Transgens weist. Die injizierten ES Zellen konnten demnach keine funktionellen Spermien oder Eizellen bilden und somit keine Keimbahntransmission erzeugen.

Tab. 4.3: Erfassung der Daten der Blastozysteninjektionen, geborenen Chimären und Rückkreuzungen

	Klon 2	Klon 4
Mikroinjektion	14.02.08	21.02.08
Geboren	01.03.08	02.03.08
Tiere	10	6
Chimäre	4 ♂ , 3 ♀	1 ♂
% Chimerisch	5-30%	10%
Rückkreuzung	Kein Erfolg	Kein Erfolg

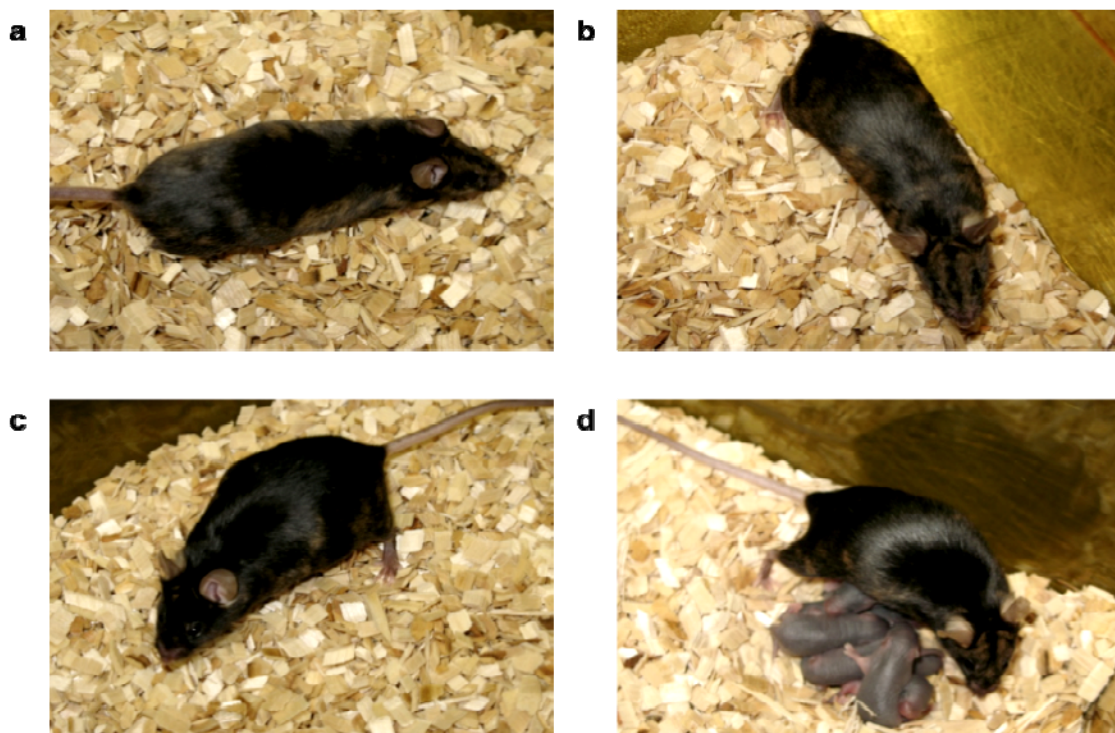


Abb. 4.28: Geborene Chimäre nach Blastozysteninjektionen. (a, b) 8-10 Wochen alte Männchen und Weibchen. (c) Trächtige Chimäre. (d) Chimäre Mutter mit Neugeborenen.

5. DISKUSSION UND AUSBLICK

Das humane Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM; CD326) ist ein Transmembranprotein, das auf Grund differentieller Glykosylierungen ein apparentes Molekulargewicht von 37 bis 42 KDa im Immunoblot aufweist (Chong und Speicher 2001, Pauli *et al.* 2003). EpCAM wurde bereits vor 30 Jahren durch die Verwendung monoklonaler Antikörper erstmals identifiziert und ist eines der ersten charakterisierten Tumor-assoziierten Antigene (Herlyn *et al.* 1979b; Koprowski *et al.* 1979). Eine starke Überexpression von EpCAM assoziierte mit der Tumorigenese epithelialer Gewebe (Went *et al.* 2004). EpCAM wurde in einer Vielzahl von Karzinomentitäten nachgewiesen (Moldenhauer *et al.* 1987, Momburg *et al.* 1987) und ist ein wertvoller prognostischer Marker. Die Überexpression in metastasierenden Mamakarzinomen ist als einzelner Parameter und gemeinsam mit dem Enzym Cyclooxygenase 2 ausreichend zur Prognose einer verkürzten Überlebensrate im Vergleich zu Patientinnen mit einer niedrigen EpCAM Expression (Spizzo *et al.* 2003, Spizzo *et al.* 2006, Spizzo *et al.* 2004). Die Expression von EpCAM an der Zelloberfläche qualifiziert es zudem als Zielmolekül für Antikörper und rekombinante Derivate von Antikörpern bei der Entwicklung von Immuntherapien und innovativen Behandlungsverfahren von Krebspatienten (Armstrong und Eck 2003, Baeuerle und Gires 2007, Braun *et al.* 1999, Di Paolo *et al.* 2003, Riesenberger *et al.* 2001).

Die simple Expression von EpCAM ist jedoch nicht ausschließlich mit einer malignen Transformation verbunden. EpCAM ist in Adulten in nahezu allen gesunden, unstratifizierten Epithelien exprimiert, fehlt jedoch in Plattenepithelien mit Ausnahme von Zellen in der proliferierenden Basalzellschicht (Balzar *et al.* 1999b, Cirulli *et al.* 1995, Litvinov *et al.* 1996, Litvinov *et al.* 1994b, Moldenhauer *et al.* 1987). Des Weiteren ist die Expression von EpCAM bei Prozessen der Entwicklung und Morphogenese essentiell (Cirulli *et al.* 1998, Trzpis *et al.* 2008a, Trzpis *et al.* 2008b, Trzpis *et al.* 2007b). In Nagern ist EpCAM in befruchteten Oozyten nachweisbar und in Zygoten bereits in dem Zweizellstadium der Morulation exprimiert (Tarmann *et al.* 1990). In embryonalen Mausstammzellen wurde das murine Homolog ebenfalls

nachgewiesen (Anderson *et al.* 1999), eine funktionelle Analyse von mEpCAM in diesen Zellen wurde jedoch bis *dato* nie durchgeführt.

EpCAM wurde als homotypisches, Ca^{2+} -unabhängiges Adhäsionsmolekül in gesunden Epithelzellen beschrieben (Balzar *et al.* 1998, Litvinov *et al.* 1994a, Litvinov *et al.* 1997). Die starke Überexpression von EpCAM in vielen Karzinomentitäten ist jedoch nur schwer mit einer einzigen Funktion als Adhäsionsmolekül zu vereinbaren. Meist kommt es im Zusammenhang mit Adhäsionsmolekülen zu einer Hemmung der Expression in metastasierenden Tumoren wie am Beispiel von β -Integrin eindrücklich nachgewiesen (Moser *et al.* 2009). Obwohl EpCAM bereits vor 30 Jahren isoliert wurde und seit nunmehr 20 Jahren als Zielmolekül für Antikörper verwendet wird, blieb die molekulare Funktion in normalen und transformierten Zellen erstaunlicherweise lange Zeit unerforscht. So wurde erst im Jahre 2004 eine Funktion von EpCAM in der Regulation der Zellzyklus-assoziierten Gene *c-myc*, Zyklin A und E publiziert (Munz *et al.* 2004b). Einhergehend mit dieser Genregulation konnte eine Wirkung von EpCAM auf die Proliferation von transformierten epithelialen Zellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Munz *et al.* 2004b, Osta *et al.* 2004). Eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung war, im Vergleich zu einer einzigen Funktion als Zelladhäsionsmolekül, vereinbar mit der starken Überexpression in einer Vielzahl von Karzinomen, welche größtenteils mit Metastasierung assoziierten, und mit einer schlechten Prognose für den betroffenen Patienten (Spizzo *et al.* 2003, Spizzo *et al.* 2006, Spizzo *et al.* 2004).

Eine weitere Wendung kam mit der Entdeckung der Überexpression von EpCAM in sogenannten Krebsstammzellen (Al-Hajj *et al.* 2003, Gires *et al.* 2009, Visvader und Lindeman 2008, Visvader und Lindeman 2009). Krebsstammzellen, auch Tumor-initiiierende Zellen genannt, bilden eine kleine Subpopulation von Tumorzellen, welche in der Lage sind einen Primärtumor in Mausmodellen zu rekapitulieren und mehrfach retransplantiert werden können (Rosen und Jordan 2009). Im Gegensatz zu ihren nicht-tumorigenen Gegenstücke, welche die Mehrheit der Tumormasse darstellen, haben Krebsstammzellen unter geeigneten Bedingungen, ähnlich wie gesunde embryonale Stammzellen, eine erhöhte Proliferationsrate und sind in der Lage in diverse Tumorzellen, die sich phänotypisch unterscheiden, aberrant zu differenzieren (Al-Hajj *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Hermann *et al.* 2007,

O'Brien *et al.* 2007, Prince *et al.* 2007, Ricci-Vitiani *et al.* 2007). Ein solch hierarchischer Aufbau von soliden Tumoren, obwohl er durchaus kontrovers diskutiert wird (Kelly *et al.* 2007, Quintana *et al.* 2008, Rosen und Jordan 2009), wirft weitere Fragen zu aktuellen Therapieformen auf (Park *et al.* 2009). Xenotransplantationsmodelle, die derzeit zur Verfügung stehen, basieren auf die Übertragung von angereicherten Zellen aus Primärkarzinomen in immundefiziente Mäuse und die anschließende Analyse der gebildeten Tumoren. Sie stellen somit nicht exakt die Situation *in vivo* im Patienten bei der Initiation und Progression von Tumoren dar und, aufgrund der unterschiedlichen Umgebung („*microenvironment*“) von humanen Zellen in dem murinen Empfänger, unterschätzen möglicherweise die Frequenz von Tumor-initiiierenden Zellen (Quintana *et al.* 2008, Rosen und Jordan 2009). Dennoch bleiben grundsätzliche Fragen zu Standardtherapieformen erhalten: Obschon die meisten Tumore für eine operative Entfernung zugänglich sind, kommt es teilweise schon in frühen Stadien der Tumorigenese zur Bildung von Metastasen und/oder Sekundärtumoren (Klein 2003, Klein 2008 Klein 2009), die in der Mehrheit der Fälle einen letalen Ausgang verursachen. Diese, als „*minimal residual disease*“ (MRD) und „*circulating/disseminating tumour cells*“ (CTC, DTC) bezeichneten Tumorzellen, stellen die eigentliche Problematik bei der Heilung von Krebspatienten dar (Kostler *et al.* 2000, Ross 1998). Ein Zusammenhang zwischen MRD, CTC und DTC Zellen und Krebsstammzellen wird derzeit sehr intensiv diskutiert (Klein 2008). Mehr und mehr wird angenommen, dass Standardtherapien im Wesentlichen nicht-tumorigene Krebszellen ausmerzen und Krebsstammzellen nur bedingt angreifen. Erste Ergebnisse zu einer fehlenden Sensitivität von Krebsstammzellen gegenüber gängigen Chemotherapien wurden in einem Mausmodell erzielt. Wiederholte Chemotherapie Zyklen induzierten eine relative Zunahme von Krebsstammzellen in Tumoren, die möglicherweise einen Aspekt der oben beschriebenen Problematik bei der Bekämpfung von Krebs darstellt (Dylla *et al.* 2008). Eine verstärkte Expression und enzymatische Aktivität der Aldehyd Dehydrogenase 1 und von „*Multiple-Drug-Resistance*“ (MDR) Glykoproteinen in Krebsstammzellen korrelierte mit einer signifikant erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika wie Cyclophosphamide (Dylla *et al.* 2008, Ginestier *et al.* 2007). In einer Vielzahl von Tumorentitäten ist EpCAM als Teil der Signatur von

Krebsstammzellen zu finden (Al-Hajj *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Gires *et al.* 2009, Li *et al.* 2007, O'Brien *et al.* 2007, Ricci-Vitiani *et al.* 2007, Visvader und Lindeman 2008, Visvader und Lindeman 2009). Diese Signatur, welche weiterhin Moleküle wie CD133, CD44, ABC-Glykoproteine umfasst, erlaubt eine prospektive Anreicherung von Krebsstammzellen und ist somit auch klinisch äußerst relevant.

Die bereits angesprochene Funktion von EpCAM bei der Regulation der Transkription des *c-myc* Gens war der erste Hinweis auf eine aktive Teilnahme von EpCAM an Signaltransduktionsvorgängen (Munz *et al.* 2004b). Weitere Zielmoleküle von EpCAM wurden daraufhin identifiziert, welche in Zellmetabolismus (Munz *et al.* 2009, Munz *et al.* 2004a, Munz *et al.* 2004b, Munz *et al.* 2005) und Proliferationsregulation involviert sind (Maaser und Borlak 2008). Die Mechanismen der Signaltransduktion von EpCAM in Karzinomzellen und die daran beteiligten Proteine wurden 2009 von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Die Aktivierung von EpCAM bedarf einer regulierten proteolytischen Spaltung in der extra- und intrazellulären Domäne, die zur Freisetzung des langen extrazellulären Anteils (EpEX, *EpCAM extracellular domain*) als Ektodomäne und des kurzen intrazellulären Anteils (EpICD, *EpCAM intracellular domain*) führt. In Assoziation mit Mitgliedern des WNT Signalweges, *i.e.* β -Catenin und FHL2, transloziert EpICD in den Kern, bindet Lef-1 und somit an zelluläre DNA, und reguliert die Expression von Zielgenen (Carpenter und Red Brewer 2009, Maetzel *et al.* 2009). Die an der aktivierenden Spaltung beteiligten Proteasen wurden als TACE (*Tumor Necrose Factor Alpha converting enzyme*) und einem Presenilin 2-beinhaltenden gamma-Sekretase Komplex identifiziert. Die Neuerkenntnis der Verwendung von Proteinen, welche in dem WNT Signalweg eine zentrale Rolle spielen, ergänzte das Verständnis um die Funktion von EpCAM in Karzinomzellen. Der WNT Signalweg und insbesondere der transkriptionelle ko-Aktivator β -Catenin sind häufig Ziele von aktivierenden Mutationen in Kolonkarzinomen und anderen Tumorentitäten (Reya und Clevers 2005, Reya *et al.* 2003, Reya *et al.* 2001). Zudem ist der WNT Signalweg an der Steuerung des Phänotyps von Hämatopoetischen und embryonalen Stammzellen essentiell beteiligt (Boiani und Scholer 2005, Reya und Clevers 2005). Diese Verbindung zu Stammzellen, die Fähigkeit die Transkription wichtiger Gene wie *c-myc* und Zyklinen zu

regulieren, und die starke Überexpression in Krebsstammzellen, warf die Frage nach einer möglichen Expression und Funktion von EpCAM in Vorläufer- und Stammzellen, insbesondere in pluripotenten embryonalen Stammzellen, auf.

5.1 mEpCAM in embryonalen Stammzellen

Die Frage nach einer möglichen Funktion von EpCAM in gesunden und malignen Stammzellen ist in vielerlei Hinsicht von wissenschaftlicher und klinischer Bedeutung. Einsichten in die Regulation des Stammzellphänotyps sind die Grundlage zur Verbesserung von Ansätzen zur regenerativen Medizin unter Verwendung von Stammzellen (Trounson 2009). Insbesondere im Hinblick auf die Bekämpfung von malignen Stammzellen, welche als innovative „*Targets*“ in der Tumorthherapie gelten, ist es unabdinglich zentrale Regulatoren in toti- und pluripotenten Zellen zu identifizieren, um anschließend therapeutisch wirksame Medikamente zu entwickeln. Die Wirkung von Tumorthapeutika, wie zum Beispiel EpCAM-spezifische Antikörper, auf gesunde Vorläufer- und Stammzellen kann ebenfalls nur im Wissen der Regulation dieser Zellen beachtet und somit Nebenwirkungen möglichst gering gehalten werden. Nicht zuletzt sind Mechanismen der Zelldifferenzierung und die Möglichkeit diese zu revertieren, interessante Ansatzpunkte der Zellbiologie, die im Rahmen der Generierung von „*induced pluripoten stem cells*“ (iPS) zum Tragen kommen (Hochedlinger und Jaenisch 2006, Hochedlinger und Plath 2009). Zusammenfassend sind embryonale Stammzellen als Zellen mit dem größten zellulären Potential zu betrachten. Dieses Potential bezieht sich sowohl auf ihre Fähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter (Meso, Ekto- und Endoderm) zu differenzieren und damit einen kompletten Organismus zu bilden, als auch auf sehr hohes malignes Potential, wie am Beispiel von Teratomen ersichtlich. Einsichten in die Biologie gesunder ES Zellen werden entsprechend neue Wege zum Verständnis und zur Bekämpfung von Krebsstammzellen eröffnen.

Die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen ist aus ethischen Beweggründen rechtlich auf wenige Zelllinien begrenzt. Aus diesem Grund ist ein Wechsel der Spezies mit einer Verwendung von murinen statt humanen ES Zellen eine deutliche Vereinfachung der Arbeitsschritte. Humanes und murines EpCAM besitzen eine hohe Homologie von 82% (Bergsagel *et al.* 1992), welche den Vergleich der Funktionen dieser beiden Proteine erlaubt. Eine

vergleichbare Homologie besteht zwischen den beiden intrazellulären Domänen von humanem und murinem EpCAM (81%; Abb. 5.1).

Im direkten Vergleich sind fünf Austausche von Aminosäuren zwischen dem murinen und dem humanen EpICD zu vermerken. Vier dieser differentiellen Aminosäuren befinden sich im N-terminalen Bereich der EpICD (Position 2, 3, 5 und 6, bezogen auf die 26 Aminosäuren von EpICD) und eine im C-terminalen Bereich (Position 20). Zwei Austausche (Position 2 und 6) führen zu biochemischen Modifikationen der jeweiligen Domäne von Threonin nach Arginin und Serin nach Methionin. Diese beiden Aminosäurenwechsel können die Funktion und Spezifität der Signaldomäne EpCAMs verändern. Drei der fünf Austausche jedoch beziehen sich auf Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Eigenschaften (Arginin zu Lysin und Isoleucin zu Methionin), so dass von sehr ähnlichen Eigenschaften und Signalfunktionen der intrazellulären Domänen von humanem und murinem EpCAM ausgegangen werden kann.

ClustalW Formatted Alignments

										10										20											30
<i>mIC-EpCAM</i>	V	L	V	I	S	T	R	K	K	S	A	K	Y	E	K	A	E	I	K	E	M	G	E	I	H	R	E	L	N	A	
<i>hIC-EpCAM</i>	V	L	V	I	S	R	K	K	R	M	A	K	Y	E	K	A	E	I	K	E	M	G	E	M	H	R	E	L	N	A	
	V	L	V	I	S	.	K	.	.	A	K	Y	E	K	A	E	I	K	E	M	G	E	.	H	R	E	L	N	A		

Abbildung 5.1: Sequenzhomologien innerhalb der intrazellulären Domänen von murinem und humanem EpCAM. Dargestellt sind die intrazellulären Domänen von murinem (*mIC-EpCAM*) und humanem EpCAM (*hIC-EpCAM*). Gleiche Aminosäuren sind dunkelgrau, Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Eigenschaften sind hellgrau und Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften sind nicht unterlegt.

Der bis *dato* einzige bestehende Nachweis einer Expression des murinen Homologs von EpCAM in Keim- und embryonalen Stammzellen war die Publikation von Anderson *et al.* (Anderson *et al.* 1999). Zwei verschiedene ES Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit auf die Expression von mEpCAM untersucht. mPfes und E14TG2 α ES Zellen exprimieren beide mEpCAM sehr stark an der Zelloberfläche. Dieser Befund bestätigt einerseits die publizierten Daten (Anderson *et al.* 1999), und weitete andererseits das Spektrum untersuchter Zelllinien aus und lässt die Vermutung zu, dass eine starke Expression von mEpCAM der Zustand von undifferenzierten ES Zellen ist. Der Entzug des essentiellen Faktors LIF, ein Mitglied der Interleukin 6 Familie (Okita

und Yamanaka 2006), führte zu einem Verlust der Proliferation und zur Differenzierung von E14TG2 α ES Zellen (Daten aus dieser Arbeit). Einhergehend kam es zur Reduktion der Expression bzw. Aktivität von klassischen Stammzellmarkern wie c-Myc, Oct3/4, Stat3, SSEA-1 und alkalische Phosphatase (Berrill *et al.* 2004). Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Expression von mEpCAM durch den Entzug von LIF aus dem Zellkulturmedium im Verlauf der Differenzierung ebenfalls um 50-70% abnimmt. mEpCAM ist demnach ein neuer potentieller Marker des Grades der Pluripotenz von ES Zellen. Die erneute Zugabe von LIF resultierte in einer Zellpopulation mit Charakteristika undifferenzierter E14TG2 α Zellen. Aufgrund des Versuchsaufbaus kann nicht differenziert werden, ob die Mehrheit der Zellen nach Entzug auf eine erneute Wiedergabe von LIF mit einer verstärkten Proliferation und einer De-Differenzierung reagierte, und/oder ob eine Subpopulation von Zellen, welche zum Zeitpunkt der Wiedergabe noch pluripotent ist, expandierte.

Untersuchungen in humanen ES Zellen, Hepatozyten- und Nierenzellvorläufern haben ein vergleichbares Expressionsmuster von humanem EpCAM gezeigt. EpCAM ist in humanen ES Zellen ein Marker zur prospektiven Anreicherung dieser Zellen (Kolle *et al.* 2009). Interessanterweise ist CD9, ein Protein aus der Tetraspanin Familie, ebenfalls als Marker für humane ES Zellen beschrieben worden und gleichermaßen ein Interaktionspartner von EpCAM (Claas *et al.* 2005, Kolle *et al.* 2009, Ladwein *et al.* 2005, Le Naour und Zoller 2008). Dieser Befund stärkt die Annahme der Bildung von Subdomänen innerhalb der Plasmamembran, die durch Mitglieder der Tetraspanin Familie unterstützt werden, und regulierende Einheiten des Phänotyps von Zellen und des Metastasierungspotenzials von Tumorzellen darstellen (Yunta und Lazo 2003, Zoller 2009). Im Falle von Leberzellen ist eine Expression von humanem EpCAM mit dem Phänotyp der Vorläuferzellen assoziiert (Schmelzer und Reid 2008, Schmelzer *et al.* 2006, Schmelzer *et al.* 2007). Nach einem Leberschaden repopulieren EpCAM⁺ Zellen das Organ, welche nach terminaler Differenzierung in Hepatozyten erneut EpCAM-negativ sind (de Boer *et al.* 1999). Ein ähnliches Expressionsmuster von EpCAM wurde nach Ischämie bei einer Regeneration der Niere in Ratten beschrieben (Trzpis *et al.* 2008a, Trzpis *et al.* 2008b, Trzpis *et al.* 2007a, Trzpis *et al.* 2007b). Die Notwendigkeit einer

regulierten Expression von EpCAM und insbesondere der Abnahme der Expression in differenzierten Zellen wird hervorragend durch Beispiele der malignen Transformation dargestellt. Hepatoblasten sind durch eine Expression von EpCAM gekennzeichnet, welche im Verlauf der Differenzierung zu Hepatozyten verloren geht. Hepatoblastome, pediatriische Tumore der Leber, lassen sich anhand der Stärke der EpCAM Expression prognostisch unterteilen. Eine verstärkte Expression von c-Myc, β -Catenin und EpCAM definiert invasive und metastasierende Hepatoblastome mit hoher Genauigkeit (Cairo *et al.* 2008). Dieses Proteinexpressionsmuster erinnert an Karzinomzelllinien und an primäre Karzinome des Kolons (Barker und Clevers 2006, Maetzel *et al.* 2009) In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine starke Expression von mEpCAM in Teratokarzinomen nachgewiesen. Teratokarzinome sind schwach differenzierte Tumore, welche von humanen oder murinen embryonalen Stammzellen hervorgehen (Blum und Benvenisty 2008). Eine starke Überexpression von EpCAM in diesen Zellen entspricht dem Phänotyp von Karzinomzellen und Krebsstammzellen.

Alle bisherigen Ergebnisse zur Expression von EpCAM in gesunden und in malignen Zellen weisen auf eine starke Assoziation der Expression dieses Proteins mit einem de-differenzierten und hoch proliferativen Phänotyp (Abb. 5.2).

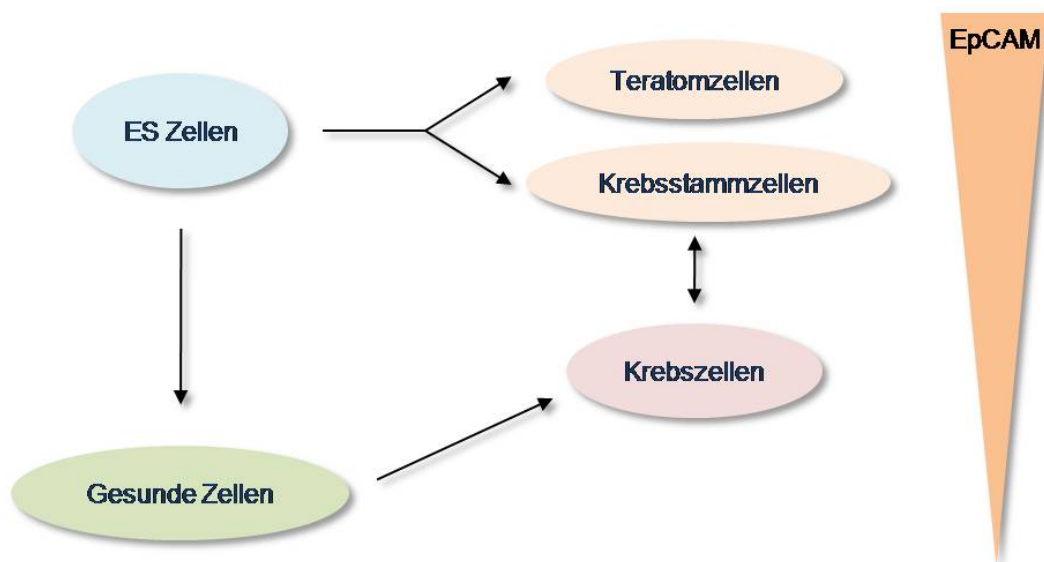


Abbildung 5.2.: Schematische Darstellung der Implikationen einer Expression von EpCAM in normalen und malignen Stammzellen, gesunden Epithelien und Tumorzellen. Eine starke Expression von EpCAM assoziiert mit dem Grad der Proliferation und Pluripotenz, und korreliert invers mit dem Differenzierungsgrad von Zellen.

5.2 mEpCAM ist beteiligt an der Regulation des Stammzellphänotyps

Die Möglichkeit einer Assoziation von EpCAM mit dem zellulären Phänotyp, insbesondere mit dem Proliferationszustand, wurde bereits 1994 durch Schön *et al.* formuliert (Schön *et al.* 1994). Untersuchungen an zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) zeigten ebenfalls eine Korrelation der Expression von humanem EpCAM mit Proliferation, gemessen an einer Ko-Expression des Proliferationsmarkers Ki67. Des Weiteren wurde eine inverse Korrelation von EpCAM mit den beiden Differenzierungsmarkern Involucrin und CK13 festgestellt (Litvinov *et al.* 1996). Obschon es sich bei diesen Arbeiten um reine Korrelationen von Proteinexpressionen handelte, wiesen sie auf die Möglichkeit einer aktiven Rolle EpCAMs an der Proliferation und am de-differenzierten Phänotyp.

Die starke Expression von mEpCAM in pluripotenten, embryonalen E14TG2 α Stammzellen und der Verlust der Expression nach Differenzierung unter LIF Entzug (siehe Kapitel 5.1), sind weitere Hinweise auf eine aktive Rolle EpCAMs bei der Aufrechterhaltung eines proliferativen und de-differenzierten Phänotyps. ES Zellen stellen ein hervorragendes Modellsystem zur zell- und molekularbiologischen Analyse der Beteiligung von EpCAM an diesen Prozessen dar. Je nach Kulturbedingungen (\pm LIF) wechseln ES Zellen zwischen einem proliferativen und de-differenzierten Phänotyp und einem Programm der Differenzierung, welches mit einer deutlichen Verlangsamung der Proliferation einhergeht. Eine künstliche Hemmung der Expression von mEpCAM unter Stammzellkulturbedingungen (+LIF) und eine konstitutive Expression unter Differenzierungsbedingungen (-LIF) wurden in der vorliegenden Arbeit zum Studium der Funktion von EpCAM gewählt. Diese experimentellen Ansätze sollten Aufschluss über eine mögliche essentielle Beteiligung von EpCAM geben.

In Anwesenheit von LIF im Kulturmedium war eine RNAi-vermittelte Suppression der Expression von mEpCAM um 50% ausreichend, um eine quantitative Reduktion der Proliferation um 40% zu erzielen. Diese verminderte Proliferation beruhte nicht auf einer erhöhten Apoptoserate der Zellen und stellt somit einen Effekt von EpCAM auf die Zellteilungsrate dar. Einhergehend mit dem Verlust der Proliferation resultierte die Hemmung der mEpCAM Expression in einer Reduktion der Expression des EpCAM Zielgens *c-myc* (González *et al.*

2009, Munz *et al.* 2009, Munz *et a.* 2004b) und in der verminderten Expression von klassischen Stammzellmarkern wie Oct3/4, Stat3, SSEA-1 und alkalische Phosphatase (González *et al.* 2009). Oct3/4 ist ein zentraler Regulator des Stammzellphänotyps (Okamoto *et al.* 1990) und notwendig zur Reprogrammierung von differenzierten Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) (Hochedlinger und Jaenisch 2002a, Hochedlinger und Jaenisch 2002b, Hochedlinger und Jaenisch 2003, Hochedlinger und Jaenisch 2006, Hochedlinger und Jaenisch 2007, Hochedlinger und Plath 2009, Wernig *et al.* 2007). Es ist derzeit noch unbekannt, ob mEpCAM aufgrund einer Fähigkeit zur Signaltransduktion in der Lage ist, die Expression von *oct3/4*, *c-myc* und anderen Genen direkt zu regulieren oder ob es sich hierbei um einen sekundären Effekt der mEpCAM Hemmung handelt. Zukünftige Experimente sollen daher Auskunft geben über (i) die Fähigkeit von mEpCAM zur aktiven Signaltransduktion in ES Zellen, und (ii) über eine potentielle Induktion der Transkription des *oct3/4* und des *c-myc* Gens durch EpCAM Signalwege. Die Untersuchung von mEpCAM Interaktionspartnern und Mechanismen der Regulation von Zielgenen, wie sie in Karzinomzellen für das humane EpCAM Molekül beschrieben wurden (Carpenter und Red Brewer 2009, Maetzel *et al.* 2009, Munz *et al.* 2009), ist Gegenstand derzeitiger Arbeit in unserem Labor.

In humanen Karzinomzellen verwendet hEpCAM Signalproteine aus dem WNT Weg (FHL2, β -Catenin, Lef1). Der WNT Signalweg ist ein essentieller Regulator der Selbsterneuerung („*self-renewal*“) und der Pluripotenz von hämatopoetischen und embryonalen Stammzellen (Boiani und Scholer 2005, Reya und Clevers 2005, Reya *et al.* 2003, Reya *et al.* 2001). Es ist daher vorstellbar, dass mEpCAM den Phänotyp von murinen ES Zellen durch die Induktion von Zielgenen, die denen des WNT Signalweges ähneln und/oder diese ergänzen, in einem proliferativen und de-differenzierten Status hält. So ist die Einführung einer zusätzlichen (DNA Bindungs-) Spezifität durch EpICD bei der Regulation der Transkription von Zielgenen durch Lef-1 vorstellbar. Signalwege, die an der Regulation des ES Zellphänotyps maßgeblich beteiligt sind, sind in Abbildung 5.3 schematisch dargestellt. LIF, *bone morphogenic proteins* (BMPs) und Wnt als Liganden des *Frizzled* Rezeptors sind akzeptierte Signale, die ES Zellen in einem undifferenzierten und proliferativen Zustand halten (Varga und Wrana 2005). Es ist bis *dato* gänzlich unbekannt, ob und an

welcher Stelle des Signalweges eine Kooperation zwischen EpCAM und Wnt Signalen stattfindet. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Wnt Signalweg und der Regulation der Transkription des *epcam* Gens durch den Tcf4 Faktor (Yamashita *et al.* 2007), untermauert die Annahme eines kooperativen Signals von Wnt und EpCAM.

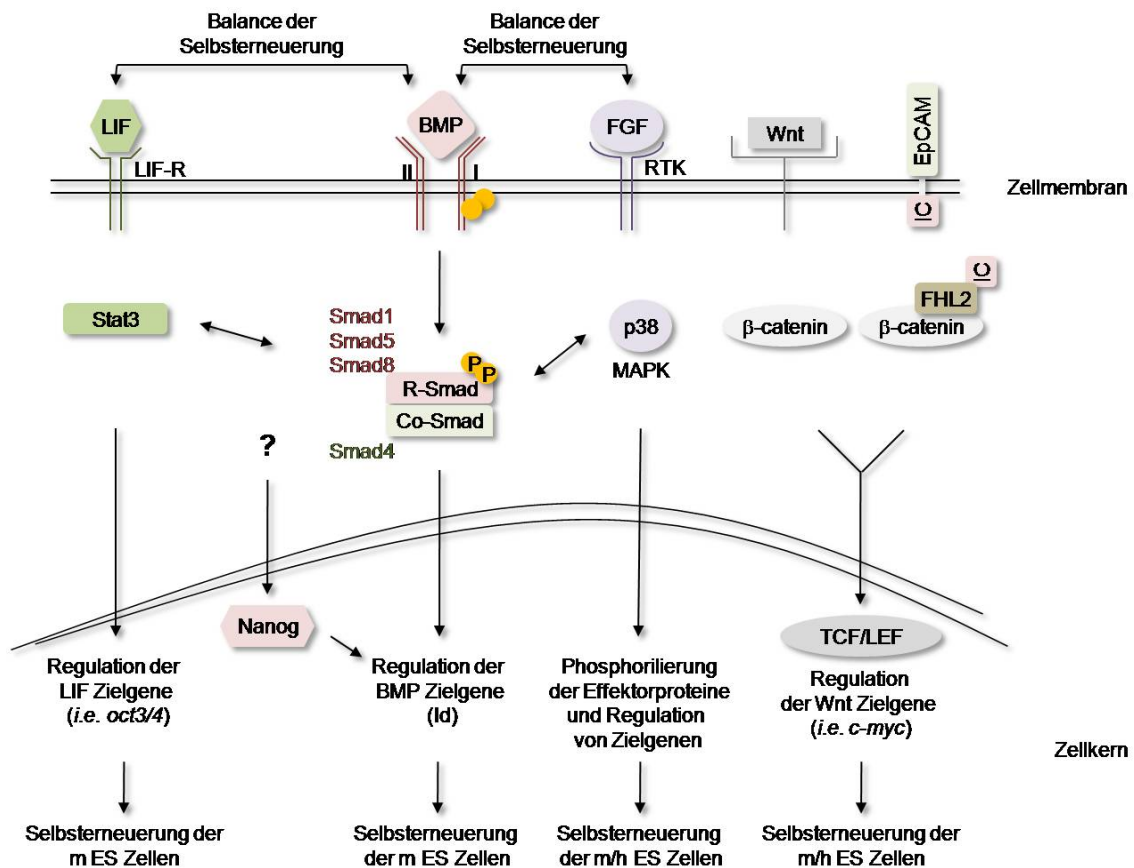


Abbildung 5.3: Signalwege der Regulation von embryonalem Stammzellenphänotyp in Mäusen. Schematische Darstellung der wichtigen Signalwege, die in murinen embryonalen Stammzellen eine essentielle Rolle bei der Phänotyperhaltung spielen. Eingefügt ist auch der Signalweg von EpCAM und seine mögliche Rolle bei Erhalt des undifferenzierten Zustands von ES Zellen in Kombination mit dem WNT Signalweg.

Ein Vergleich der Zielpromotoren von β -Catenin/Lef-1 und mEpICD/ β -Catenin/Lef1 Kernkomplexen soll zukünftig mit Hilfe eines *ChIP-on-Chip* Experimentes Auskunft über den möglichen Beitrag von mEpICD an der Genregulation im Vergleich zu einem WNT-vermittelten Signal geben. Zu diesem Zweck können Lef-1 und mEpICD mit spezifischen Antikörpern aus Kernextrakten von murinen ES Zellen gemeinsam mit der assoziierten DNA immunpräzipitiert werden (Chromatin IP = *ChIP*). Die auf diese Weise angereicherten DNA Fragmente werden anschließend auf einen *Chip*, welcher

murine Promotorsequenzen umfasst, hybridisiert. Der Vergleich, und insbesondere die Differenz der gebundenen Promotorsequenzen zwischen Lef1 und mEpICD, soll einen Einblick in den Beitrag von mEpICD an der Gentranskription, und somit an der Regulation des ES Zellphänotyps erlauben. Die alleinige Reduktion der mEpCAM Expression in Anwesenheit von LIF war ausreichend, um eine partielle Differenzierung von ES Zellen zu induzieren. Dies konnte selbst unter ES Zellbedingungen unter Zugabe von LIF beobachtet werden: ES Zellen, welche spontan differenzierten, waren durch einen gleichzeitigen Verlust der Expression von Oct3/4 und mEpCAM charakterisiert. Umgekehrt ist eine konstitutive Expression von mEpCAM in der Lage den Phänotyp eines LIF Entzuges zu verlangsamen, ein weiterer Hinweis, dass mEpCAM aktiv an der Regulation des ES Zellphänotyps beteiligt ist. In Abwesenheit von LIF im Kulturmedium waren E14TG2 α Transfektanten mit einer stabilen Expression von mEpCAM durch eine signifikant höhere Proliferation charakterisiert. Zudem kam es zu einer 3-fach stärkeren Aktivität der alkalischen Phosphatase und zu einer Stabilisierung der Oct3/4 Expression im Vergleich zu Kontrolltransfektanten. Eine stabile Expression von Oct3/4 wurde in Krebsstammzellen einer Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben, u.a. Osteosarkome, Prostata-, Lungen- und Ösophaguskarzinomen (Chen *et al.* 2008, Levings *et al.* 2009, Monsef *et al.* 2009). Auch in malignen Zellen mit Stammzellpotenzial spielt Oct3/4 eine tragende Rolle, wie bei CD133⁺ Krebsstammzellen von Lungenkarzinomen nachgewiesen wurde (Chen *et al.* 2008). CD133⁺, jedoch nicht CD133⁻ Zellen waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* tumorigen und durch die Expression von Stammzellmarkern wie Oct3/4 gekennzeichnet. Eine künstliche Hemmung der Expression von Oct3/4 in CD133⁺ Krebsstammzellen der Lunge resultierte in einem Verlust der Kapazität Sphäroide zu bilden, in einer Differenzierung in CD133⁻ Zellen und einer Reduktion der Tumorigenität *in vivo*. Krebsstammzellen von primären Kolonkarzinomen waren ebenfalls durch die Expression von CD133 und EpCAM charakterisiert, so dass auch bei dieser Entität ähnliche Mechanismen der Transformation vorstellbar sind. Zusammen mit den Befunden einer starken Überexpression in diversen Krebsstammzellen, ist die hier beschriebene Fähigkeit von EpCAM die Expression von Oct3/4 zu stabilisieren ein wichtiges

Element zum Verständnis von EpCAM Funktionen und dessen Signaltransduktion in der malignen Transformation (Munz *et al.* 2009).

Die präsentierten Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass mEpCAM ein essentielles aber alleine nicht ausreichendes Molekül bei der Aufrechterhaltung des Phänotyps gesunder ES Zellen ist. Zukünftige Experimente sollten zum Ziel haben diese essentielle Funktion *in vivo* in einem Mausmodell zu bestätigen. Ein konstitutiver „*Knockout*“, *i.e.* eine homozygote genetische Deletion der kodierenden Sequenz für EpCAM in der Maus, könnte aufgrund der hier vorgestellten Funktion von mEpCAM in ES Zellen embryonal letal sein. Der Ansatz eines konditionalen „*Knockout*“ in der Maus unter Verwendung von induzierbaren Systemen wie das Cre-Lox Modell und Tetrazyklin-regulierten, gewebsspezifischen Varianten der Cre Rekombinase sind daher zu bevorzugen (Aoki und Taketo 2008, Belteki *et al.* 2005). Die Verwendung solcher konditionaler und gewebsspezifischer Systeme ermöglicht eine exakte Untersuchung der Funktion von EpCAM in diversen Organen und insbesondere an definierten Zeitpunkten der Embryonalentwicklung und im adulten Tier.

Die Implikationen einer Rolle von EpCAM bei der Regulation des Phänotyps gesunder und maligner Stammzellen sind vielschichtig. EpCAM rückt immer weiter in den Fokus der Tumorthherapie als Marker für die Ursprungszellen von Tumoren. Zwei sich nicht ausschließende Ansatzpunkte zur Bekämpfung von Krebsstammzellen werden aktuell diskutiert. Zum einen können Krebsstammzellen durch spezifische Therapeutika gezielt ausgemerzt werden. Zum anderen ist eine Differenzierung dieser Zellen *in vivo*, welche zu einem Verlust der Tumorigenität führt, ein weiterer valider Ansatz (Sell 2004). Eine funktionelle Hemmung von EpCAM in Krebsstammzellen durch die kombinierte Verwendung von EpCAM-spezifischen Antikörpern und Inhibitoren von TACE und Presenilinen erscheint daher äußerst wünschenswert (Maetzel *et al.*, 2009; Munz *et al.* 2009). Des Weiteren stellt die Regulation der EpCAM Signaltransduktion eine innovative Möglichkeit zur gezielten Differenzierung gesunder ES Zellen im Rahmen einer regenerativen Medizin und dessen Hemmung in malignen Krebsstammzellen einen therapeutischen Angriffspunkt dar.

5.3 Konditionales Mausmodell zur Untersuchung der Funktion von hEpCAM in vivo

Murines EpCAM spielt eine zentrale Rolle in ES Zellen und ist ebenfalls in Teratokarzinomen stark exprimiert. Humanes EpCAM ist stark exprimiert in Karzinomen und erfährt eine weitere Hochregulation der Expression in Krebsstammzellen (Gires *et al.* 2009, Visvader und Lindeman 2008, Visvader und Lindeman 2009). Eine Funktion von hEpCAM in humanen ES Zellen kann aufgrund der starken Expression in diesen Zellen (Kolle *et al.* 2009) angenommen werden und wurde auf dem 2. Internationalen Symposium zu EpCAM und Krebsstammzellmarker vorgestellt. Ähnlich wie das murine Gegenstück spielt hEpCAM offenbar eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung des proliferativen und pluripotenten Phänotyps von humanen ES Zellen (Valerie Ng, *2nd International Symposium on EpCAM and Cancer Stem Cell Markers, Oct. 2008*; Informationen unter: www.epcam-symposium.de). Eine siRNA-vermittelte Hemmung der Expression von hEpCAM induzierte eine verminderte Proliferation und eine geringere Expression von Stammzellmarkern wie Oct3/4.

Mit dem Ziel einer Therapieentwicklung und zum erweiterten Verständnis der Funktion des Moleküls ist ein System zur konditionalen und gewebsspezifischen Expression des humanen EpCAM unabdinglich. Bisher verfügbare Mausmodelle exprimieren hEpCAM unter dem endogenen, humanen Promotor durch eine ungezielte Insertion eines 55kb BAC Klons in das Mausgenom (McLaughlin *et al.* 2001). In diesem Mausmodell zeigte hEpCAM ähnliche Expressionsmuster und -intensitäten wie in gesunden Geweben des Menschen. Die Inokulation einer EpCAM-positiven Tumorzelllinie und die darauffolgende Applikation des anti-EpCAM Antikörpers MOC31 offenbarte eine starke Anreicherung des therapeutischen Antikörpers an Tumorzellen und eine fehlende Markierung von Normalgeweben (McLaughlin *et al.* 2001). Nachteile dieses Mausmodells sind, dass (i) keine Überexpression von hEpCAM, wie sie in Tumoren vorliegt, erreicht wird, und (ii) eine Selektion der Zielgewebe und des Zeitpunkts der Expression technisch unmöglich ist. Auch die ungezielte Insertion des BAC Klons in dem Mausgenom macht eine Untersuchung des Phänotyps einer Expression von hEpCAM in der Maus, aufgrund eines möglichen Effektes der Insertion, unmöglich. In einem weiteren

Mausmodell haben Balzar und Kollegen humanes EpCAM unter die Kontrolle des MMTV Promotors (*mouse mammary tumour virus*) exprimiert. Eine Überexpression resultierte in Dysplasien des Epithels in der Mamma (Balzar *et al.* 1999b).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Weichen zur Etablierung einer konditionalen und gewebsspezifischen transgenen hEpCAM Maus gestellt. Die cDNA des humanen *epcam* Gens (auch *tacstd-1* genannt) wurde in Targetierungsvektoren zur Insertion in die murinen *rosa26* und *hprt* Loci kloniert. Diese beiden Loci wurden gewählt, weil die Deletion jeweils eines Allels beider Gene keinen Phänotyp aufweist (Belteki *et al.* 2005, Bradley *et al.* 1992, Giel-Moloney *et al.* 2007). Beide Promotoren weisen unterschiedliche Stärken auf (*rosa26*<*hprt*), so dass anschließend *in vivo* verschiedene Expressionsstärken von EpCAM erreicht werden können. Die Expression der humanen *epcam* cDNA wird, nach homologer Rekombination in das murine Genom, durch die Anwesenheit einer Stopp-Kassette verhindert. Flankierende Lox-P Sequenzen, welche durch die Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 (Nagy 2000, Rossant und Nagy 1995) erkannt werden, erlauben die anschließende Entfernung der Stopp-Kassette und dadurch die Expression des gewünschten Gens *in vitro* und *in vivo*. Eine Gewebsspezifität der Expression des Transgens kann *in vivo* durch die Kreuzung von hEpCAM transgenen Mäusen mit verschiedenen Cre transgenen Mäusen erreicht werden.

Durch Proteintransfer von rekombinantem Cre Enzym in transgene E14TG2 α ES Zellklone konnte hEpCAM in murinen ES Zellen konditional exprimiert und somit die Funktionalität des Systems *in vitro* untermauert werden. Dieses zelluläre *in vitro* System kann zum Vergleich der Funktionen von humanem und murinem EpCAM in ES Zellen ebenfalls herangezogen werden. In diesen Transfektanten kann beispielsweise die Expression von endogenem mEpCAM durch eine transiente Transfektion mit siRNA Oligonukleotiden gehemmt und gleichzeitig die Expression von hEpCAM durch die Gabe/Expression von Cre Rekombinase induziert werden. Eine phänotypische Auswirkung dieses Wechsels der EpCAM Moleküle kann anschließend zell- und molekularbiologisch studiert werden.

Chimäre Tiere, die durch eine Blastozysten Injektion und den Transfer in scheinsschwangere Mäuse generiert wurden, wiesen einen sehr geringen

Chimärismus von 5-15% auf, wie anhand der gemischten Fellfarbe erkennbar war (Black 6 *versus* Agouti). Eine Keimbahnübertragung durch diese Chimären war nicht realisierbar und ist möglicherweise auf den bereits geringen Anteil transgener DNA in den chimären Tieren zurückzuführen. Ein weiterer Grund für eine fehlende Keimbahntransmission der transgenen Zellen kann eine Zellkultur-bedingte Aneuploidie der ES Zellen sein (Longo *et al.* 1997), welche in der vorgestellten Arbeit nicht analysiert wurde.

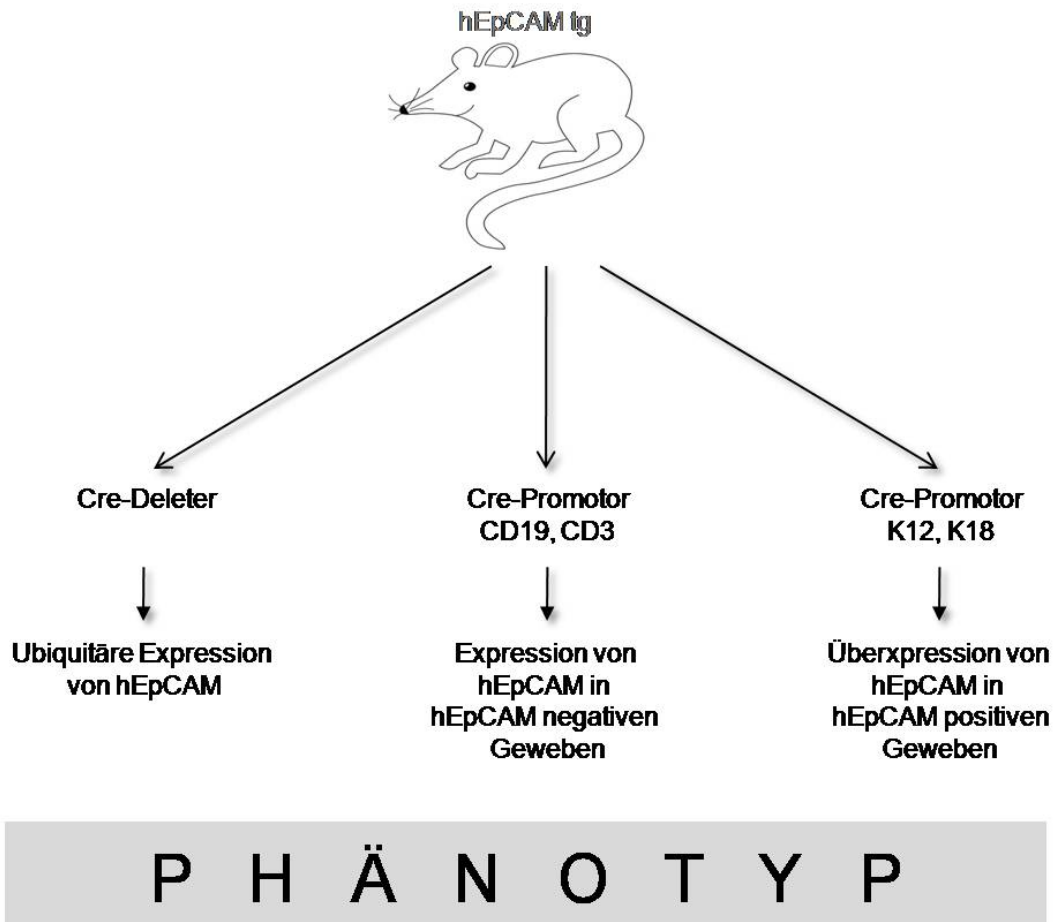


Abbildung 5.4.: Schematische Darstellung der Ziele nach Generierung einer hEpCAM konditionalen transgenen Maus. Hierzu sollen hEpCAM-transgene Mäuse mit adäquaten Cre-Mausstämmen gekreuzt werden, die eine homogene ubiquitäre Expression (Cre-deleter), eine Expression in lymphozytären Zellen (CD19-Cre; CD3-Cre) und eine Überexpression in Epithelzellen (Keratin18-Cre) erlauben.

Die wissenschaftlichen Ziele nach der Generation einer hEpCAM transgenen Maus sind vielfältig. Offensichtlich ist eine *de novo* oder Überexpression von EpCAM in diversen Geweben von großem Interesse in Bezug auf die Organo- und Tumorigenese. Eine Assoziation mit der Karzinogenese ist vielfach beschrieben worden. Die Fragen nach (i) einer initiierenden Funktion EpCAMs in der Karzinogenese, nach (ii) einer Rolle bei der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps und (iii) nach einer Rolle von EpCAM in weiteren

Malignomen blieben bis *dato* jedoch unbeantwortet. Diese Fragen können durch die Expression in *per se* EpCAM-negativen Geweben, durch eine ubiquitäre Expression, und durch eine Überexpression in EpCAM-positiven Geweben experimentell beantwortet werden. Hierzu sollen hEpCAM-Transgene mit adäquaten Cre-Mausstämmen gekreuzt werden, die eine homogene Expression (Tang *et al.* 2002), eine Expression in lymphozytären Zellen (Schmidt-Supprian *et al.* 2007) und in Epithelzellen (Keratin18-Cre) erlauben (Abb. 5.4).

Aufgrund der hohen Wertigkeit eines Systems zur konditionalen und gewebsspezifischen transgenen Expression von hEpCAM ist die Etablierung des beschriebenen Mausstammes ein zentraler Aspekt in unserem Labor.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist in einer Vielzahl von Epithelien exprimiert und weist eine starke Überexpression in Karzinomen und Krebsstammzellen auf. Letztere werden auch als Tumor-initiiierende Zellen bezeichnet und gelten als Ursprung von Malignomen und Metastasen. Ähnliche Funktionen von gesunden Stammzellen und Tumor-initiiierenden Zellen werden angenommen, wurden jedoch experimentell nicht dargestellt.

Neueste Erkenntnisse zur Funktion von EpCAM haben eine proliferationsfördernde und signaltransduzierende Fähigkeit in Karzinomzellen *in vitro* aufgewiesen. Die Aufgaben des Moleküls wurden jedoch bis *dato* weder *in vivo* noch in gesunden embryonalen und adulten Stammzellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des murinen Homologs von EpCAM (mEpCAM) in embryonalen Stammzellen untersucht.

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass:

- mEpCAM ein **essentielles Protein** in murinen embryonalen Stammzellen ist.
- die Expression von mEpCAM mit einem **de-differenzierten Stammzellphänotyp** einhergeht und im Verlauf der Differenzierung vermindert wird.
- eine **künstliche Hemmung der mEpCAM Expression** in diesen Zellen eine Hemmung der Proliferation induziert.
- die Expression von mEpCAM mit der Regulation von **Stammzellmarkern** (c-Myc, Oct3/4, SSEA-1, Alkalische Phosphatase) einhergeht.
- die **Überexpression von mEpCAM** den Entzug von essentiellen Faktoren (LIF) partiell komplementieren kann.

Des Weiteren wurden die Grundlagen zur Generierung eines konditionalen transgenen Mausmodells für hEpCAM geschaffen. Die kodierende Sequenz des humanen EpCAM Proteins wurde mit einer von LoxP Sequenzen flankierten Stopp Kasette in Vektoren zur Targetierung in die Rosa26 und Hprt *Loci* kloniert. Mit Hilfe der Cre Rekombinase kann die Stopp Kasette *in vivo* gewebsspezifisch entfernt und damit die Expression von hEpCAM induziert werden. Erste *in vitro* Ergebnisse beweisen die Funktionalität des Systems und bilden die Grundlage zur Generierung eines transgenen hEpCAM Mausmodells.

7. REFERENZEN

Abremski K, Gottesman S (1981) Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* **153**(1): 67-78

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988

Alberti S, Nutini M, Herzenberg LA (1994) DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5833-5837

Anderson R, Schaible K, Heasman J, Wylie C (1999) Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil* **116**(2): 379-384

Aoki K, Taketo MM (2008) Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. *Methods Mol Biol* **468**: 307-331

Armstrong A, Eck SL (2003) EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* **2**(4): 320-326

Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR (2007) OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* **120**(7): 1598-1602

Austin S, Ziese M, Sternberg N (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**(3): 729-736

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**(1): 126-140

Baeuerle PA, Gires O (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* **96**(3): 417-423

Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV (1998) Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* **18**(8): 4833-4843

Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmuller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV (2001) Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2570-2580

Balzar M, Prins FA, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV (1999a) The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* **246**(1): 108-121

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999b) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* **77**(10): 699-712

Barker N, Clevers H (2006) Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **5**(12): 997-1014

Becker AJ, Mc CE, Till JE (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454

Belteki G, Haigh J, Kabacs N, Haigh K, Sison K, Costantini F, Whitsett J, Quaggin SE, Nagy A (2005) Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre-mediated recombination and tetracycline induction. *Nucleic Acids Res* **33**(5): e51

Bergsagel PL, Victor-Kobrin C, Timblin CR, Trepel J, Kuehl WM (1992) A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol* **148**(2): 590-596

Berrill A, Tan HL, Wuang SC, Fong WJ, Choo AB, Oh SK (2004) Assessment of Stem Cell Markers During Long-Term Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cytotechnology* **44**(1-2): 77-91

Blum B, Benvenisty N (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* **100**: 133-158

Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B (2002) Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* **11**(3): 115-132

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**(6658): 404-407

Boiani M, Scholer HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 872-884

Borkowski TA, Nelson AJ, Farr AG, Udey MC (1996) Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells. *Eur J Immunol* **26**(1): 110-114

Bradley A, Ramirez-Solis R, Zheng H, Hasty P, Davis A (1992) Genetic manipulation of the mouse via gene targeting in embryonic stem cells. *Ciba Found Symp* **165**: 256-269

Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL (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**(12): 3999-4004

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**(1 Pt 2): 223-231

Brock R, Hamelers IH, Jovin TM (1999) Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* **35**(4): 353-362

Bumol TF, Marder P, DeHerdt SV, Borowitz MJ, Apelgren LD (1988) Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the KS1/4 monoclonal antibody. *Hybridoma* **7**(4): 407-415

Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A (1999) Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **210**(1): 30-43

Cairo S, Armengol C, De Reynies A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, Goga A, Balakrishnan A, Semeraro M, Gresh L, Pontoglio M, Strick-Marchand H, Levillayer F, Nouet Y, Rickman D, Gauthier F, Branchereau S, Brugieres L, Laithier V, Bouvier R, Boman F, Basso G, Michiels JF, Hofman P, Arbez-Gindre F, Jouan H, Rousselet-Chapeau MC, Berrebi D, Marcellin L, Plenat F, Zachar D, Joubert M, Selves J, Pasquier D, Bioulac-Sage P, Grotzer M, Childs M, Fabre M, Buendia MA (2008) Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* **14**(6): 471-484

Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, Palka G, Guerra E, Alberti S (2001) Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **92**(1-2): 164-165

Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1670-1674

Carpenter G, Red Brewer M (2009) EpCAM: Another Surface-to-Nucleus Missile. *Cancer Cell* **15**(3): 165-166

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**(5): 643-655

Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R (1999) Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res* **19**(3B): 2237-2242

Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH (2008) Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* **3**(7): e2637

Chong JM, Speicher DW (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**(8): 5804-5813.

Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Ptasznik A, Inverardi L, Ricordi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA, Hayek A (1998) KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* **140**(6): 1519-1534

Cirulli V, Ricordi C, Hayek A (1995) E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc* **27**(6): 3335

Claas C, Wahl J, Orlicky DJ, Karaduman H, Schnolzer M, Kempf T, Zoller Mh (2005) The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem J* **389**(Pt 1): 99-110

Costa FF, Le Blanc K, Brodin B (2007) Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* **25**(3): 707-711

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10158-10163

de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV (1999) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* **188**(2): 201-206

Di Paolo C, Willuda J, Kubetzko S, Lauffer I, Tschudi D, Waibel R, Pluckthun A, Stahel RA, 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**(7): 2837-2848

Durbin H, Rodrigues N, Bodmer WF (1990) Further characterization, isolation and identification of the epithelial cell-surface antigen defined by monoclonal antibody AUA1. *Int J Cancer* **45**(3): 562-565

Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL (2008) Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS ONE* **3**(6): e2428

Enver T, Pera M, Peterson C, Andrews PW (2009) Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell* **4**(5): 387-397

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819): 154-156

Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G (2006) Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* **61**(1): 31-5

Giel-Moloney M, Krause DS, Chen G, Van Etten RA, Leiter AB (2007) Ubiquitous and uniform in vivo fluorescence in ROSA26-EGFP BAC transgenic mice. *Genesis* **45**(2): 83-89

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**(5): 555-567

Gires O (2008) **TACSTD1 (tumor-associated calcium signal transducer 1)**. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* (February 2008):

<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/TACSTD1ID42459ch42452p42421.html>

Gires O, Eskofier S, Lang S, Zeidler R, Munz M (2003) Cloning and characterisation of a 1.1 kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter. *Anticancer Res* **23**(4): 3255-3261

Gires O, Kieu C, Fix P, Schmitt B, Munz M, Wollenberg B, Zeidler R (2001) Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer* **92**(3): 620-628.

Gires O, Klein CA, Baeuerle PA (2009) On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer* **9**(2): 143

González B, Denzel S, Mack B, Conrad M, Gires O (2009) EpCAM Is Involved in Maintenance of the Murine Embryonic Stem Cell Phenotype. *Stem Cells* **27**(8): 1782-1791

Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 9065-9069

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74

Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A (2002) Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* **100**(7): 2374-2386

Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580

Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H (1979a) Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* **9**(8): 657-659

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H (1979b) Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1438-1442

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **1**(3): 313-323

Hochedlinger K, Jaenisch R (2002a) Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* **415**(6875): 1035-1038

Hochedlinger K, Jaenisch R (2002b) Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 741-748

Hochedlinger K, Jaenisch R (2003) Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* **349**(3): 275-286

Hochedlinger K, Jaenisch R (2006) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* **441**(7097): 1061-1067

Hochedlinger K, Jaenisch R (2007) On the cloning of animals from terminally differentiated cells. *Nat Genet* **39**(2): 136-137

Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**(4): 509-523

- Jaenisch R, Young R** (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**(4): 567-582
- Kasper M, Behrens J, Schuh D, Muller M** (1995) Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol* **103**(4): 281-286
- Kellermann O, Kelly F** (1986) immortalization of early embryonic cell derivatives after the transfer of the early region of simian virus 40 into F9 teratocarcinoma cells. *Differentiation* **32**(1): 74-81
- Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A** (2007) Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* **317**(5836): 337
- Kidder BL, Yang J, Palmer S** (2008) Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One* **3**(12): e3932
- Klein CA** (2003) The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection. *Adv Cancer Res* **89**: 35-67
- Klein CA** (2008) Cancer. The metastasis cascade. *Science* **321**(5897): 1785-1787
- Klein CA** (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**(4): 302-312
- Kolle G, Ho SH, Zhou Q, Chy HS, Krishnan K, Cloonan N, Bertonecello I, Laslett AL, Grimmond SM** (2009) Identification of Human Embryonic Stem Cell Surface Markers by Combined Membrane-polysome Translation State Array Analysis and Immunotranscriptional Profiling. *Stem Cells* (Epub ahead of print)
- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P** (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* **5**(6): 957-971
- Koresawa Y, Miyagawa S, Ikawa M, Matsunami K, Yamada M, Shirakura R, Okabe M** (2000) Synthesis of a new Cre recombinase gene based on optimal codon usage for mammalian systems. *J Biochem* **127**(3): 367-372
- Kostler WJ, Brodowicz T, Hejna M, Wiltschke C, Zielinski CC** (2000) Detection of minimal residual disease in patients with cancer: a review of techniques, clinical implications, and emerging therapeutic consequences. *Cancer Detect Prev* **24**(4): 376-403
- Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ** (1987) A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* **326**(6110): 295-298
- Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zoller M** (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* **5**(6): 553-567
- Labalette C, Renard CA, Neuveut C, Buendia MA, Wei Y** (2004) Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol* **24**(24): 10689-10702

Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zoller M (2005) The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* **309**(2): 345-357

Le Naour F, Andre M, Greco C, Billard M, Sordat B, Emile JF, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E (2006) Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* **5**(5): 845-857

Le Naour F, Zoller M (2008) The tumor antigen EpCAM: tetraspanins and the tight junction protein claudin-7, new partners, new functions. *Front Biosci* **13**: 5847-5865

Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, Steindler DA, Gibbs CP (2009) Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res* **69**(14): 5648-5655

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**(3): 1030-1037

Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pycr JJ, Druck T, Huebner K (1993) Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* **13**(3): 1507-1515

Linnenbach AJ, Wojcierowski J, Wu SA, Pycr JJ, Ross AH, Dietzschold B, Speicher D, Koprowski H (1989) Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(1): 27-31

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO (1994a) Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* **2**(5): 417-428

Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO (1997) Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* **139**(5): 1337-1348

Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO (1996) Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* **148**(3): 865-875

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994b) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **125**(2): 437-446

Lo B, Parham L (2009) Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev* **30**(3): 204-213

Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP (1997) The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* **6**(5): 321-328

Maaser K, Borlak J (2008) A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM induced cell cycle regulators. *Br J Cancer* **99**(10): 1635-1643

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* **11**(2): 162-171

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**(6197): 348-352

Martin B, Schneider R, Janetzky S, Waibler Z, Pandur P, Kuhl M, Behrens J, von der Mark K, Starzinski-Powitz A, Wixler V (2002) The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* **159**(1): 113-122

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634- 7638

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* **18**(15): 4261-4269

McKay R (2000) Stem cells--hype and hope. *Nature* **406**(6794): 361-364

McLaughlin PM, Harmsen MC, Dokter WH, Kroesen BJ, van der Molen H, Brinker MG, Hollema H, Ruiters MH, Buys CH, de Leij LF (2001) The epithelial glycoprotein 2 (EGP-2) promoter-driven epithelial-specific expression of EGP-2 in transgenic mice: a new model to study carcinoma-directed immunotherapy. *Cancer Res* **61**(10): 4105-4111

McLaughlin PM, Trzpis M, Kroesen BJ, Helfrich W, Terpstra P, Dokter WH, Ruiters MH, de Leij LF, Harmsen MC (2004) Use of the EGP-2/Ep-CAM promoter for targeted expression of heterologous genes in carcinoma derived cell lines. *Cancer Gene Ther* **11**(9): 603-612

Mephram TB, Combes RD, Balls M, Barbieri O, Blokhuis HJ, Costa P, Crilly RE, de Cock Buning T, Delpire VC, O'Hare MJ, Houdebine LM, van Kreijl CF, van der Meer M, Reinhardt CA, Wolf E, van Zeller AM (1998) The Use of Transgenic Animals in the European Union: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 28. *Altern Lab Anim* **26**(1): 21-43

Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK (2007) Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* **11**(5): 981-1011

Moldenhauer G, Momburg F, Moller P, Schwartz R, Hammerling GJ (1987) Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* **56**(6): 714-721

Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ (2004) Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 700-707

Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* **47**(11): 2883-2891

- Monsef N, Soller M, Isaksson M, Abrahamsson PA, Panagopoulos I** (2009) The expression of pluripotency marker Oct 3/4 in prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Prostate* **69**(9): 909-916
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R** (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**(5929): 895-899
- Muller R, Lengerke C** (2009) Patient-specific pluripotent stem cells: promises and challenges. *Nat Rev Endocrinol* **5**(4): 195-203
- Mumm JS, Kopan R** (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**(2): 151-165
- Munz M, Baeuerle PA, Gires O** (2009) The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res* Munz M, Fellingner K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O (2008) Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci* **13**: 5195-5201
- Munz M, Hofmann T, Scheibe B, Gange M, Junghanns K, Zeidler R, Gires O** (2004a) The carcinoma-associated antigen EpCAM induces glyoxalase 1 resulting in enhanced methylglyoxal turnover. *Cancer Genomics and Proteomics* **1**(3): 241-247
- Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O** (2004b) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* **23**(34): 5748-5758
- Munz M, Zeidler R, Gires O** (2005) The tumor-associated antigen EpCAM up-regulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Letters* **225**(1): 151-157
- Nagy A** (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**(2): 99-109
- Nelson AJ, Dunn RJ, Peach R, Aruffo A, Farr AG** (1996) The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* **26**(2): 401-408
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A** (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**(3): 379-391
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K** (2009) A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**(7251): 118-122
- Novinec M, Kordis D, Turk V, Lenarcic B** (2006) Diversity and evolution of the thyroglobulin type-1 domain superfamily. *Mol Biol Evol* **23**(4): 744-755
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE** (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**(7123): 106-110
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H** (1990) A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* **60**(3): 461-472

Okita K, Yamanaka S (2006) Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **1**(1): 103-111

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE (2004) EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* **64**(16): 5818-5824

Palmiter RD, Brinster RL (1986) Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* **20**: 465-499

Park CY, Tseng D, Weissman IL (2009) Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther* **17**(2): 219-230

Pauli C, Munz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B, Lang S, Zeidler R, Gires O (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* **193**(1): 25-32

Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL (1990) Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* **141**(2): 344-352

Perez MS, Walker LE (1989) Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker. *J Immunol* **142**(10): 3662-3667

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (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**(3): 973-978

Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**(7222): 593-598

Raff M (2003) Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 1-22

Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**(7035): 843-850

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**(6938): 409-414

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**(6859): 105-111

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**(7123): 111-115

Riesenberg R, Buchner A, Pohla H, Lindhofer H (2001) Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem* **49**(7): 911-917

- Rosen JM, Jordan CT** (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* **324**(5935): 1670-1673
- Ross AA (1998) Minimal residual disease in solid tumor malignancies: a review. *J Hematother* **7**(1): 9-18
- Rossant J, Nagy A** (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* **1**(6): 592-594
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Second edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer B, Henderson N** (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5166-5170
- Schmelzer E, Reid LM** (2008) EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci* **13**: 3096-3100
- Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM** (2006) The Phenotypes of Pluripotent Human Hepatic Progenitors. *Stem Cells* **24**(8): 1852-8
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM** (2007) Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* **204**(8): 1973-1987
- Schmidt-Supprian M, Wunderlich FT, Rajewsky K** (2007) Excision of the Frt-flanked neo (R) cassette from the CD19cre knock-in transgene reduces Cre-mediated recombination. *Transgenic Res* **16**(5): 657-660
- Schnutgen F** (2006) Generation of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**(1): 15-18
- Schnutgen F, Stewart AF, von Melchner H, Anastassiadis K** (2006) Engineering embryonic stem cells with recombinase systems. *Methods Enzymol* **420**: 100-136
- Schon MP, Schon M, Klein CE, Blume U, Bisson S, Orfanos CE** (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**(6): 987-991
- Sell S** (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**(1): 1-28
- Shaw G, Kamen R** (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**(5): 659-667
- Sivagnanam M, Mueller JL, Lee H, Chen Z, Nelson SF, Turner D, Zlotkin SH, Pencharz PB, Ngan BY, Libiger O, Schork NJ, Lavine JE, Taylor S, Newbury RO, Kolodner RD, Hoffman HM** (2008) Identification of EpCAM as the Gene for Congenital Tufting Enteropathy. *Gastroenterology* **135**(2): 429-37

Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 435-462

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**(6200): 688-690

Smith AG, Hooper ML (1987) Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* **121**(1): 1-9

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**(6034): 230-234

Solter D, Knowles BB (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(11): 5565-5569

Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**(1): 70-71

Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P (2003) Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer* **88**(4): 574-578

Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, Mueller-Holzner E, Marth C, Gastl G, Zeimet AG (2006) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **103**(2): 483-8

Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Kochli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **86**(3): 207-213

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* **414**(6859): 98-104

Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Schulte Am Esch J, Knoefel WT, Hosch SB (2006) EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer* **6**(1): 165

Suda Y, Suzuki M, Ikawa Y, Aizawa S (1987) Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J Cell Physiol* **133**(1): 197-201

Szala S, Froehlich M, Scollon M, Kasai Y, Steplewski Z, Koprowski H, Linnenbach AJ (1990) Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3542-3546

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH (2001) Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* **194**(3): 298-302

- Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR** (2002) A Cre/loxP-deleter transgenic line in mouse strain 129S1/SvImJ. *Genesis* **32**(3): 199-202
- Tarmann T, Dohr G, Schiechl H, Barth S, Hartmann M** (1990) Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel)* **137**(2): 141-145
- Thampoe IJ, Ng JS, Lloyd KO** (1988) Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys* **267**(1): 342-352
- Thomas KR, Capecchi MR** (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**(3): 503-512
- Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW** (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**(2): 313-321
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM** (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391): 1145-1147
- Trounson A** (2009) New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med* **7**: 29
- Trzpis M, Bremer E, McLaughlin PM, de Leij LF, Harmsen MC** (2008a) EpCAM in morphogenesis. *Front Biosci* **13**: 5050-5055
- Trzpis M, McLaughlin P, van Goor H, Brinker M, van Dam G, de Leij L, Popa E, Harmsen M** (2008b) Expression of EpCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol* **216**(2): 201-8
- Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC** (2007a) Epithelial Cell Adhesion Molecule. More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *Am J Pathol* **171**(2): 386-95
- Trzpis M, Popa ER, McLaughlin PM, van Goor H, Timmer A, Bosman GW, de Leij LM, Harmsen MC** (2007b) Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol* **107**(4): e119-131
- Tsubura A, Senzaki H, Sasaki M, Hilgers J, Morii S** (1992) Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* **19**(1): 73-79
- Tsuda H, Maynard-Currie CE, Reid LH, Yoshida T, Edamura K, Maeda N, Smithies O, Jakobovits A** (1997) Inactivation of the mouse HPRT locus by a 203-bp retroposon insertion and a 55-kb gene-targeted deletion: establishment of new HPRT-deficient mouse embryonic stem cell lines. *Genomics* **42**(3): 413-421
- van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A** (2002) Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* **11**(3): 133-164

Varga AC, Wrana JL (2005) The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* **24**(37): 5713-5721

Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G (2004) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* **10**(9): 3131-3136

Verfaillie CM (2002) Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: a novel role for thrombopoietin. *J Clin Invest* **110**(3): 303-304

Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**(10): 755-768

Visvader JE, Lindeman GJ (2009) EpCAM and solid tumour fractionation. *Nat Rev Cancer* Viswanathan S, Benatar T, Rose-John S, Lauffenburger DA, Zandstra PW (2002) Ligand/receptor signaling threshold (LIST) model accounts for gp130-mediated embryonic stem cell self-renewal responses to LIF and HIL-6. *Stem Cells* **20**(2): 119-138

Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**(5457): 1427-1430

Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**(5457): 1442-1446

Went P, Dirnhofer S, Salvisberg T, Amin MB, Lim SD, Diener PA, Moch H (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* **29**(1): 83-88

Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA (2006) Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* **94**(1): 128-135

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* **35**(1): 122-128

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**(7151): 318-324

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**(6200): 684-687

Wilson L, Ching YH, Farias M, Hartford SA, Howell G, Shao H, Bucan M, Schimenti JC (2005) Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations. *Genome Res* **15**(8): 1095-1105

Winter MJ, Cirulli V, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV (2007) Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem* **302**(1-2): 19-26

Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV (2003a) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* **285**(1): 50-58

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV (2003b) The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* **163**(6): 2139-2148

Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* **152**(1): 212-219

Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **67**(22): 10831-10839

Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J (2007) CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* **120**(7): 1444-1450

Yoshida K, Chambers I, Nichols J, Smith A, Saito M, Yasukawa K, Shoyab M, Taga T, Kishimoto T (1994) Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev* **45**(2): 163-171

Yunta M, Lazo PA (2003) Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* **15**(6): 559-564

Zandstra PW, Le HV, Daley GQ, Griffith LG, Lauffenburger DA (2000) Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation. *Biotechnol Bioeng* **69**(6): 607-617

Zoller M (2009) Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**(1): 40-55

Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, Zorzos H, Elemenoglou J, Likourinas M (1995) Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol* **28**(3): 251-254

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aq. dest.</i>	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	<i>Circa</i>
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>disintegration per minute</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat Dehydrogenase
h	Human
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPR	<i>Horse-Radish Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
M	Molar
m	Milli
mA	Milliampere
ME	β-Mercaptoethanol
μ	Mikro
m	murin
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
t	Tag
T	Thymin
TA	Tumorantigen

Tab.	Tabelle
Tam	4-Hydroxytamoxifen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
siRNA	small interfering RNA
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Gires für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die Überlassung des reizvollen Themas. Es ist keine Selbstverständlichkeit einen derart offener Wissenschaftler als Chef zu haben. Danke für die Betreuung, die Möglichkeit mein Thema im Rahmen unterschiedlicher Tagungen vorstellen zu können, die wissenschaftlichen Diskussionen, die nicht fachlichen Ratschläge und die menschliche Art. Ich habe die letzten Jahre unglaublich viel gelernt.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Michael Ackmann für die wissenschaftliche und große moralische Unterstützung. Ich habe mich in diesen speziellen Lebensumständen sehr verstanden gefühlt.

Danken möchte ich außerdem Frau Brigitte Mack für die geniale Zusammenarbeit und für Ihre wissenschaftliche Unterstützung und Piri für die tollen Gespräche im Labor und die schönen aufmunternden Momente im „Café-Kuschel“.

Tamara Perisic und Marcus Conrad will ich besonders danken für ihre Hilfe bei der Klonierung von ES Zellvektoren und für die Unterstützung im und außerhalb des Labors.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der HNO-Forschung Arbeitsgruppe für ihre große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und das tolle Arbeitsklima, das ein Arbeiten im Labor auch in schlechten Phasen möglich machte. Besonders danke ich an dieser Stelle meiner „Labormitbewohnerin“ Sabine Denzel für ihre unendliche Geduld und Hilfe und auch den Mädels (Nadine, Yvonne, Valerie, Doro) für viele verschiedene Erfahrungen, die mich immer voran gebracht haben. Auch den Jungs will ich danken: Markus Münz, für die anregende Diskussionen in München und L.A. und Cuong Kieu, der mich in die wunderbare Welt der Klonierung einführte.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir letztendlich die Realisierung meiner Doktorarbeit durch ihre unermüdliche Unterstützung ermöglicht haben. Ohne sie hätte ich das bis hier nie geschafft.

10. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben:

Name: Bárbara González Carvajal
Geburtsdatum: 11. Mai 1978
Geburtsort: Madrid (Spanien)
Staatsangehörigkeit: spanisch
Familienstand: ledig
e-mail: bagoca@hotmail.com

Schulbildung / Studium:

1984 – 1988: Grundschule Lycée Français de Madrid
1988 – 1996: Gymnasium Deutsche Schule Madrid.
Schulabschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife.
1996 – 2002: Studium der Biologie an der „Universidad Autónoma de Madrid“.
2002 – 2003: ERASMUS-Student der „Friedrich-Schiller-Universität Jena“.
2003 - 2005: Studium der Biochemie und molekularen Biologie an der „Friedrich-Schiller-Universität“ Jena.
2003 - 2005: Diplomarbeit an der „Friedrich-Schiller-Universität“ im Friedrich-Loeffler-Institut (Jena) bei Dr. Angela Berndt.
Thema: „Charakterisierung der Interleukin-mRNA-Expression im Zäkum nach *Salmonella*-Immunisierung und –Infektion von Hühnerküken“
Seit August 2005: Promotion in der Klinischen Kooperationsgruppe „Molekulare Onkologie“ der „Ludwig-Maximilians-Universität“ München und des Helmholtz Zentrums München bei Dr. Olivier Gires.

Publikationen

González Carvajal B, Methner U, Pieper J, Berndt A. (2008) Effects of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. *Vaccine*. 3;26(42):5423-33

Teile dieser Arbeit wurde bisher wie folgt öffentlich präsentiert:

Poster: **Etablierung eines transgenen Mausmodells zur *in vivo* Studie der Funktion und Beteiligung des Tumor-assoziierten Antigens EpCAM an der Karzinogenese**

Bárbara González, Markus Münz, Marcus Conrad, Olivier Gires

“78. Jahresversammlung der Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde“. Mai 2007, München, Deutschland.

Vortrag zum Poster: **EpCAM expression during stem cell differentiation**

Bárbara González Carvajal, Brigitte Mack, Olivier Gires.

“The Role of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis“. Feb. 2008, Los Angeles, USA.

Vortrag: **EpCAM is a marker for murine embryonic stem cells**

“2nd international Symposium on EpCAM and Cancer Stem Cell Markers“. Okt. 2008, Tutzing, Deutschland.

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