

Aus dem Forschungslabor Molekulare Onkologie  
der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

# **Verwendung der Promotorelemente des Tumor-assoziierten Antigens EpCAM zur Genexpression in EpCAM-positiven Karzinomzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Stephanie Pöckl

aus

Landsberg am Lech

Jahr

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Matthias

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Strobl  
Priv. Doz. Dr. C. Berking

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. O. Gires

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, 2006

Stephanie Pöckl

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Ergebnisse bereits veröffentlicht:

- Targeted Gene Expression Using a 1.1 Kilobase Promoter Fragment of the Tumour-associated Antigen EpCAM, *Anticancer Research* 24:3715-22 (2004).

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Tumorentstehung .....	2
1.2	EpCAM in Tumorzellen .....	5
1.2.1	Das EpCAM-Protein als Zielantigen für einen therapeutischen Ansatz .....	5
1.2.2	Die EpCAM-Funktion .....	7
1.3	Der <i>epcam</i> -Promotor .....	9
1.4	Heterologe Genexpression .....	11
1.5	Aufgabenstellung .....	13
2	Material .....	15
2.1	Antikörper .....	15
2.2	Bakterien .....	16
2.3	Chemikalien, Hilfsmittel und Geräte .....	16
2.4	Enzyme .....	21
2.5	Oligonukleotide .....	21
2.6	Plasmide .....	22
2.7	Zelllinien .....	23
2.8	Dienstleistungen .....	24
3	Methoden .....	25
3.1	Klonierungsmethoden .....	25
3.1.1	Klonierungsschema der einzelnen Vektoren .....	25
3.1.2	Restriktionsverdau .....	26
3.1.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	26
3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	27
3.1.5	Ligation .....	27
3.1.6	Transformation von DNA-Fragmenten in <i>E.coli</i> .....	28
3.1.7	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> .....	28
3.2	Zellkultur .....	29
3.2.1	Kultivierung der Zelllinien .....	29

3.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	30
3.2.3	Aufbewahrung von Zelllinien.....	30
3.2.4	Transiente Transfektion von Zellen mit Metafectene™.....	30
3.2.5	Selektion stabiler Zellklone von humanen Zelllinien.....	31
3.3	Protein- und mRNA-Expression.....	31
3.3.1	Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	31
3.3.2	Immunoblotting Techniken (Western Blot).....	32
3.3.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	33
3.4	Funktionelle Charakterisierung.....	35
3.4.1	Bestimmung der Zellaktivität im MTT-Ansatz.....	35
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Klonierung der Vektoren mit <i>epcam</i> -Promotor und funktionellen Genfragmenten in pMEP4.....	37
4.1.1	Klonierung des pEpProm-Kontrolle als Leervektor.....	38
4.1.2	Klonierung des pEpProm-GFP zur Visualisierung der Aktivität des <i>epcam</i> -Promotors.....	42
4.1.3	Klonierung des Expressionsvektors pEpProm-TRADD.....	44
4.1.4	Klonierung des pEpProm-HSV1-TK zur Expression der HSV1-TK.....	48
4.2	Etablierung eines zellulären Modellsystems zur Analyse der <i>epcam</i> -Promotor regulierten Genexpression.....	51
4.2.1	Charakterisierung der EpCAM-Expression in Zelllinien.....	51
4.2.2	HEK293 und HEK293-EBNA1 als zelluläres Modellsystem.....	54
4.3	<i>Epcam</i> -Promotor vermittelte GFP-Expression in EpCAM-positiven Zellen.....	57
4.3.1	Transiente Transfektion von pEpProm-GFP.....	57
4.3.2	Analyse der GFP-Expression in pEpProm-GFP transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunoblot.....	59
4.4	TRADD-Expression in transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen.....	63
4.4.1	Immunoblot.....	63
4.4.2	<i>Tradd</i> -mRNA-Expression mittels RT-PCR.....	65

4.5	Transfektion von pEpProm-HSV1-TK vermittelt eine Ganciclovirsensitivität in EpCAM-positiven Zellen .....	66
4.5.1	Überprüfung der stabilen pEpProm-HSV1-TK Transfektanten mittels RT-PCR.....	67
4.5.2	Testung der Ganciclovirsensitivität stabiler HSV1-TK Transfektanten.....	68
5	Diskussion.....	71
5.1	HEK293 und HEK293-EBNA1 als zelluläres Modellsystem .....	71
5.2	<i>Epcam</i> -Promotor Regulation und TRADD.....	73
5.3	EpCAM-spezifische Expression von HSV1-TK als gentherapeutischer Ansatz .....	76
5.4	Gentransfer in Tumorzellen .....	81
5.5	<i>Epcam</i> -Promtor reguliertes HSV1-TK/GCV-System im Mausmodell.....	83
6	Zusammenfassung.....	86
7	Literaturverzeichnis .....	88
8	Abkürzungsverzeichnis.....	100
9	Danksagung .....	103
10	Lebenslauf.....	104

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der <i>epcam</i> -Promotor Konstrukte .....	38
Abbildung 2: Schema pEpProm-Kontrolle .....	40
Abbildung 3: Restriktionsverdau pEpProm-Kontrolle .....	41
Abbildung 4: Schema pEpProm-GFP .....	43
Abbildung 5: Restriktionsverdau pEpProm-GFP .....	44
Abbildung 6: Schema pEpProm-TRADD .....	46
Abbildung 7: Restriktionsverdau pEpProm-TRADD .....	47
Abbildung 8: Schema pEpProm-HSV1-TK .....	49
Abbildung 9: Restriktionsverdau pEpProm-HSV1-TK .....	50
Abbildung 10: FACS-Analyse der EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3 .....	52
Abbildung 11: FACS-Analyse der EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 .....	55
Abbildung 12: Ermittlung der GFP-Expression der HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen im Fluoreszenzmikroskop .....	58
Abbildung 13: FACS-Analyse der GFP-Expression der transient transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen .....	60
Abbildung 14: GFP-Expression von transient transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen im Immunoblot .....	62
Abbildung 15: TRADD-Expression in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen .....	64
Abbildung 16: RT-PCR der <i>tradd</i> mRNA-Expression .....	65
Abbildung 17: RT-PCR der <i>hsv1-tk</i> mRNA in EpCAM-positiven Zelllinien .....	67
Abbildung 18: Ganciclovirsensitivität von pEpProm-HSV1-TK transfizierten Zellen .....	69
Abbildung 19: Modell der TNFR1-vermittelten Apoptose .....	75



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper .....	15
Tabelle 2: Bakterien .....	16
Tabelle 3: Chemikalien.....	17
Tabelle 4: Reagenzien, Kits und Sonstiges .....	18
Tabelle 5: Plastikwaren .....	19
Tabelle 6: Geräte .....	20
Tabelle 7: Enzyme .....	21
Tabelle 8: Oligonukleotide .....	22
Tabelle 9: Plasmide.....	23
Tabelle 10: Zelllinien .....	24
Tabelle 11: Dienstleistungen .....	24
Tabelle 12: RT-PCR Protokoll .....	35
Tabelle 13: Restriktionsverdau pEpProm-Kontrolle .....	41
Tabelle 14: Restriktionsverdau pEpProm-GFP.....	43
Tabelle 15: Restriktionsverdau pEpProm-TRADD .....	46
Tabelle 16: Restriktionsverdau pEpProm-HSV1-TK .....	49
Tabelle 17: EpCAM-Oberflächenexpression der ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3 Zellen .....	53
Tabelle 18: EpCAM-Oberflächenexpression der HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen ...	56
Tabelle 19: Vergleich von EpCAM-Oberflächenexpression und GFP-Fluoreszenz der HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen.....	61

# 1 Einleitung

Unter einem Tumor versteht man eine abnorme Gewebsmasse, die auf eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht. Die Gewebsmasse gliedert sich weder strukturell noch funktionell in gesundes Gewebe ein. Da die Regulierung aus wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Faktoren nicht mehr funktioniert, findet unkontrolliertes Wachstum statt (Riede und Schäfer, 1999). Wenn mit beschleunigtem Wachstum eine fehlerhafte Differenzierung der Zellen einher geht, dann entartet der Tumor. Man spricht von bösartigen oder malignen Tumoren. Kennzeichen von malignen Tumoren sind schnelles Wachstum mit Infiltration in umliegendes Gewebe und die folgende Destruktion der histologischen Ordnung. Sobald die Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße einbrechen (Invasion), werden die Zellen über Blut und Lymphe gestreut und in andere Organe verschleppt: Der maligne Tumor metastasiert (Böcker et al, 2001). Das invasive Wachstum und die Ausbreitung im Körper führen zur Krebserkrankung des Patienten. Die Zahl der Krebsneuerkrankungen wird in Deutschland auf 200.000 Fälle bei Männern und 194.700 bei Frauen geschätzt. Etwa 109.000 Männer und 100.000 Frauen sterben jährlich an Krebsleiden (Broschüre: Krebs in Deutschland, [www.rki.de](http://www.rki.de)). Damit ist Krebs nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Als Risikofaktoren sind Rauchen (etwa 30% der Krebstodesfälle), falsche Ernährungsweise (20 - 40%), Infektionen (5%), genetische Faktoren (5%), erhöhter Alkoholgenuss (3%) und Luftschadstoffe (2%) zu nennen ([www.krebsinformation.de](http://www.krebsinformation.de)). Unterschiedliche Faktoren führen dazu, dass das Erbmateriale in den Körperzellen mutiert und das Gleichgewicht von Teilung, Wachstum und programmiertem Zelltod entgleist. Mit dem unkontrollierten Wachstum einer Zelle nimmt die Krebserkrankung ihren Lauf.

## 1.1 Tumorentstehung

Die Entartung einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle ist ein komplexer Prozess, der trotz aufschlussreicher Forschungsergebnisse noch nicht vollständig geklärt ist. Chemische und physikalische Noxen sowie bestimmte Viren können maligne Tumoren verursachen. Bedingt durch die tumorauslösende Eigenschaft nennt man diese Stoffe Karzinogene. Karzinogene führen in unterschiedlicher Weise zur Tumorentstehung: Umweltgifte, wie z.B. Aflatoxine, Benzpyrene oder heterocyclische Amine werden zu Karzinogenen verstoffwechselt und führen über DNA-Interferenzen zu Mutationen des Erbguts (Wogan et al., 2004). Viren können über Proteinwechselwirkungen zur Entartung der Zelle beitragen (Gatza et al., 2005). Ob gesunde Zellen zu Tumorzellen entarten, hängt von den Stoffen, die aus der Umwelt auf den menschlichen Körper einwirken, und der individuellen Bereitschaft zur Tumorentstehung ab.

Die Karzinogenese ist eine schrittweise Entwicklung. Nach dem Tumorprogressionsmodell gehen Veränderungen des Genoms in mehreren Stufen bis zur Tumorentstehung einher (Vogelstein und Kinzler, 1993). Eine einzige genetische Veränderung ist für die Transformation einer gesunden in eine Tumorzelle nicht ausreichend (Hahn et al., 1999). Akkumulierende genetische Veränderungen verschaffen der Zelle einen Wachstumsvorteil analog der darwinistischen Evolutionstheorie (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Dabei sind sechs entscheidende Änderungen der Zellphysiologie für maligne Entartung notwendig (*multistep process*, Hanahan und Weinberg 2000):

- Induktion von autokrinen Wachstumssignalen
- Verlust der Sensibilität gegenüber wachstumsinhibitorischen Signalen
- Resistenz der entarteten Zellen gegen Apoptose
- Verstärkte Angiogenese
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- Uneingeschränktes replikatives Potential

In Krebszellen häufen sich Fehler in der Regulation von Zellproliferation und Homöostase: Während der Tumorentstehung kommt es u.a. zu Mutationen von bestimmten Genen, die eine Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen (gain of function) hervorrufen oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (loss of function) führen (Hanahan und Weinberg, 2000).

In gesundem Gewebe regen Protoonkogene zu reguliertem Zellwachstum an. Wird ein Protoonkogen in seiner Regulator- oder Strukturregion mutiert oder überexprimiert, so stimulieren die entstandenen Onkogene Zellen zu unkontrolliertem Wachstum. Das hat zur Folge, dass sich die Zelle von Wachstumsimpulsen der Mikroumgebung des Zellverbandes entkoppelt und folglich entartet. Das Protoonkogen *c-myc*, das für den Transkriptionsfaktor c-Myc kodiert, wird in Abhängigkeit von mitogenen Faktoren exprimiert und von wachstumshemmenden und differenzierungsinduzierenden Signalen gehemmt. Sobald das Protoonkogen *c-myc* zum Onkogen wird, ermöglicht c-Myc eine Zellproliferation bei vermindertem Bedarf an Wachstumsfaktoren, unterbindet die Wachstumshemmung und wirkt der Zelldifferenzierung entgegen (Amati et al., 1998). In vielen Tumoren ist die c-Myc Expression aufgrund von Mutationen ständig erhöht. Beim Burkitt-Lymphom beispielsweise gelangt das Protoonkogen *c-myc* auf Chromosom 8 durch Translokation in die Nähe des Immunglobulinlokus auf Chromosom 4, sodass das Protoonkogen *c-myc* unter die Kontrolle des Promotors für die schwere Kette des Immunglobulins gelangt und dadurch dereguliert wird (Berger und Bernheim, 1985). Bei HNO-Karzinomen ist c-Myc in ca. 11% der Fälle überexprimiert: c-Myc korreliert mit dem Tumorstadium und somit einer schlechten Prognose (Field,1992; Rodrigo et al.,1996).

Tumorsuppressorgene kontrollieren das Zellwachstum, indem sie bei Zelldefekten den Zellzyklus anhalten oder den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Als Beispiel sei das Protein p53 „Guardian of the cell“ angeführt (Chen et al., 1990). Durch DNA-Schäden (z.B. durch Einwirkung ionisierender Strahlung), anormale Wachstumssignale (z.B. Expression des Onkogens *c-myc*) oder Chemotherapeutika wird in gesunden Zellen das

Protein p53 induziert (Vogelstein et al., 2000). In menschlichen Tumorzellen kann das Tumorsuppressorgen p53 vielfach nicht aktiviert werden (Levine, 1997). In 50% der Tumoren wird p53 durch Mutation inaktiviert, beziehungsweise durch Virusproteine oder durch fehlerhafte Bindungspartner in seiner Funktion beeinträchtigt. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens führt zum Funktionsverlust (loss of function) und der Weg zur Tumorentstehung ist gebahnt.

Neben Onkogenen und Tumorsuppressorgenen spielen Reparaturgene eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Sobald Mutationen der DNA bemerkt werden, induzieren Reparaturgene die Beseitigung der DNA-Schäden. Dabei werden fehlerhaft eingebaute Nukleotide entfernt („nukleotide-excision-repair genes“) oder in ihrer Reihenfolge korrigiert („mismatch-repair genes“) (Vogelstein et al., 2000).

Zellwachstum kann auch über Signalwege induziert werden, die über Rezeptoren vermittelt werden. So korreliert der aktivierte „epidermal growth factor“ (EGF) Rezeptor mit der Zellproliferation (Thompson et al., 1985). Der EGF-Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor aus der ErbB-Rezeptorfamilie, die eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung von Zellen spielen (Singh et al., 2005). Die Bedeutung von EGF-Rezeptor vermittelten Signalwegen für das Zellwachstum, Migration und Verhinderung der Apoptose wurde in zahlreichen humanen Tumorzellen untersucht (Fischer et al., 2003).

Ein weiteres epitheliales Protein, das Zellproliferation vermittelt ist das „epithelial cell adhesion molecule“ EpCAM. EpCAM ist in adulten Epithelzellen nicht nachweisbar, jedoch tritt es in Plattenepithelkarzinomen auf (Litvinov et al., 1996). Der fehlende Nachweis im gesunden Epithel und das Neuauftreten im entarteten Gewebe macht EpCAM für vergleichende Versuche interessant.

## 1.2 EpCAM in Tumorzellen

### 1.2.1 Das EpCAM-Protein als Zielantigen für einen therapeutischen Ansatz

Bei dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM (Litvinov et al., 1994) handelt es sich um ein 40 kD Transmembranglykoprotein, das von dem Gen GA733-2 auf Chromosom 4q kodiert wird (Linnenbach et al., 1993). Es ist auch unter den Namen EPG40, KSA, ESA,17-1A Antigen oder EPG2 bekannt. EpCAM weist einen extrazellulären Anteil mit drei potentiellen Glykosylierungsstellen und zwei EGF-ähnlichen Domänen auf (Balzar et al., 1999a): Es ist bekannt, dass viele Transmembranproteine mit EGF-ähnlichen Wiederholungen an Zelladhäsion und Signaltransduktion beteiligt sind (Davis, 1990). Der 23 Aminosäuren zählende Transmembrandomäne folgt ein zytoplasmatischer Anteil bestehend aus 26 Aminosäuren und zwei  $\alpha$ -Actinin-Bindungsstellen (Balzar et al., 1999a).

In der Embryonalentwicklung des Menschen konnte EpCAM in der fetalen Lunge, Leber, Pankreas, Haut und in Keimzellen nachgewiesen werden. Während im Erwachsenenalter das Bronchialepithel bei Fibrosierung noch EpCAM exprimieren kann (Kasper et al., 1995), weisen ausdifferenzierte Leberzellen des Erwachsenen kein EpCAM mehr auf (de Boer et al., 1999).

In Epithelzellen, die im adulten Gewebe kein EpCAM aufweisen, trifft die einsetzende EpCAM-Expression mit der neoplastischen Veränderung im Frühstadium zusammen (Balzar et al., 1999a). Das Vorhandensein von EpCAM wurde in fast allen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen festgestellt, jedoch in unterschiedlichen Ausprägungen (Litvinov et al., 1996). Die tumorassoziierte Expression von EpCAM findet sich in Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und in Adenokarzinomen des Kolons, Rektums, der Mamma und Zervix. In biphasischen Tumoren, die aus zwei verschiedenen Gewebetypen bestehen, ist nur der epitheliale Anteil des Gewebes EpCAM-positiv, z.B. in Synovialsarkomen mit epithelialen und mesenchymalen Anteilen.

Anhand der EpCAM-Ausprägung im Gewebe kann der Tumor der entsprechenden histopathologischen Kategorie zugeteilt werden (Went et al., 2004).

Molekularbiologisch betrachtet ist EpCAM ein homophiles  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiges Adhäsionsmolekül, das durch Zell-Zell-Kontakte die Aggregation von EpCAM-positiven Zellen bewirkt und dadurch morphologische Veränderungen in mehrschichtigen Zellstrukturen herbeiführt (Litvinov et al., 1994). Mit Hilfe von Antikörpern konnte die Lokalisation von EpCAM an den basolateralen Kontaktflächen der Zellmembranen nachgewiesen werden (Litvinov et al., 1994). Mit der Expression von EpCAM wird die gewebespezifische terminale Differenzierung der Epithelzellen gestört, die mit verminderter Expression der Differenzierungsmarker Zytokeratin 13 und Involukrin einhergeht (Litvinov et al., 1996). Des Weiteren weisen EpCAM-positive Tumorzellen vermehrte Proliferationsraten auf. So korreliert die Expression von EpCAM direkt mit dem Proliferationsstatus und dem Grad der Neoplasie der Epithelzellen (Balzar et al., 1999a). Im gesunden Gewebe liegt EpCAM als unglykosiliertes bzw. schwach glykosiliertes Protein vor, während in Plattenepithelkarzinomen von Kopf-Hals-Tumoren EpCAM mit glykosiliertem extrazellulären Anteil gefunden wurde (Pauli et al., 2003).

Hinsichtlich der klinischen Bedeutung von EpCAM liegen bereits einige Untersuchungen vor. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen konnten mittels RT-PCR EpCAM-positive Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut unter  $10^5$  EpCAM-negativen Zellen nachgewiesen werden (Chaubal et al., 1999). In immunzytochemischen Untersuchungen mit EpCAM-Antikörpern konnten Mikrometastasen von Plattenepithelkarzinomen bei Kopf-Hals-Tumoren im peripheren Blut festgestellt werden (Wirtschafter et al., 2002). Die EpCAM-Expression steht in negativem Zusammenhang mit der klinischen Prognose der Patienten mit Prostatakarzinom (Poczatek et al., 1999), Mammakarzinom (Gastl et al., 2000; Spizzo et al., 2004), Lungenkarzinom (Kubuschok et al., 1999) und Gallenblasenkarzinom (Varga et al., 2004). Patienten mit Kolonkarzinom, die postoperativ mit einem monoklonalen Antikörper gegen EpCAM behandelt wurden, zeigten eine

signifikante Zunahme der Überlebensrate im Vergleich zur Placebogruppe (Riethmüller et al., 1994, 1998). Zur verbesserten Behandlung von Mikrometastasen und kleinen Tumormassen wurde der monoklonale Antikörper anti-EpCAM im Mausmodell weiterentwickelt (Naundorf et al., 2002). Bei Ovarialzellkarzinomen konnte *ex vivo* eine Tumorzelllyse mittels bscEp-CAM/CD3 bispezifischer Antikörper erreicht werden (Wimberger et al., 2003). Des Weiteren führte der bispezifische Antikörper bscEp-CAM/CD3 im Mausmodell zu signifikanter Tumorreduktion von Kolon- und Ovarialzellkarzinomen bis hin zur Tumoreradikation (Schlereth et al., 2005). Durch die Behandlung von Tumorpatienten mit dem trifunktionellen Antikörper anti-EpCAM/anti-CD3 konnte die Aszitesbildung bei Peritonealkarzinose reduziert werden (Heiss et al., 2005). Zusätzlich wird die aktive Immunisierung gegen EpCAM untersucht: Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Vaccinia Virus, der EpCAM exprimiert (VV GA733-2), spezifisch die humorale und zelluläre Immunantwort gegen EpCAM-positive Tumorzellen induziert (Zaloudik et al., 2002). Die Kombination aus EpCAM-spezifischen Antikörpern mit den Cytokinen IL-2 und GM-CSF, die eine starke Immunantwort gegen Tumorzellen hervorrufen, führte zu Tumorzelllyse von EpCAM-positiven humanen Magenkarzinomzellen *in vitro* (Schanzer et al., 2006)

Aus den angeführten Gründen ist EpCAM ein vielversprechendes Zielantigen für einen therapeutischen Ansatz der Tumorbekämpfung.

### **1.2.2 Die EpCAM-Funktion**

Die Funktion EpCAMs in der Tumorentstehung ist noch nicht vollständig geklärt. Im Laufe der Tumorprogression nimmt die Bedeutung der durch EpCAM vermittelten Zelladhäsion zu: EpCAM ersetzt nach und nach den E-Cadherin vermittelten Zellkontakt und geht einher mit gesteigerter Proliferation der Tumorzellen (Litvinov et al., 1996). Was die Zelladhäsion betrifft, so bildet EpCAM keine Strukturkomplexe mit „tight junctions“ oder



Desmosomen aus. Die Expression von E-Cadherin wird zunehmend auf apikale Abschnitte reduziert, während EpCAM vermehrt an den lateralen Kontaktflächen der basalen Abschnitte gebildet wird und als flexible interzelluläre Verbindung im Wachstumsprozess der Zellen fungiert (Balzar et al., 1999b). Der Verlust von E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten in Epithelzellen trägt zur Umwandlung von benignen Adenomzellen zu invasiven und metastasierenden Karzinomzellen bei (Christofori et al., 1999). Des Weiteren ist anzunehmen, dass die tumorspezifische Glykosilierung (Pauli et al., 2003) einen Effekt auf die Bindungseigenschaften und die Funktion von EpCAM hat und dadurch funktionelle Unterschiede zwischen EpCAM in gesundem und kranken Gewebe bedingt.

In Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurde die EpCAM-Expression weiterführend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die EpCAM-Expression mit der posttranslationalen Veränderung des Enzyms Glyoxalase 1 einhergeht. Die Enzyme Glyoxalase 1 und 2 entgiften Methylglyoxal (MG), das in der Glykolyse anfällt. MG kann sowohl DNA, RNA als auch Proteine binden und somit Apoptose induzieren. Die EpCAM-Expression führt zu gesteigertem Metabolismus und erhöht die Enzymaktivität der modifizierten Isoform von Glyoxylase 1 in EpCAM-positiven Zellen (Münz et al., 2004a). Die Entgiftung des MG durch Glyoxylase 1 und 2 stellt einen wichtigen Schritt für Tumorzellen dar, denn damit können sie über eine vermehrte Glykolyse und einen gesteigerten Metabolismus verfügen. Es ist als Warburg Effekt beschrieben worden, dass Tumoren statt oxidativer Phosphorylierung mehr Glykolyse betreiben (Semenza et al., 2001).

In weiteren Untersuchungen wurde die Funktion EpCAMs in der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und des Metabolismus erforscht. Die Über- oder *de novo* Expression von EpCAM bewirkt die Überexpression des *c-myc* Onkogens, *Zyklin A* und *E*. Wenn EpCAM in Epithelzellen gebildet wird, führt dies über die Induktion des Onkogens *c-myc* zu gesteigertem Metabolismus und vermehrtem Zellwachstum. Ausserdem konnte

ein verminderter Bedarf an Wachstumsfaktoren in EpCAM-positiven Zellen festgestellt werden (Münz et al., 2004b). Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen, dass die Bildung des „epidermal fatty acid binding protein“ E-FABP über EpCAM reguliert wird. E-FABP spielt eine wichtige Rolle im Fettsäurestoffwechsel und kann in proliferativem Gewebe vermehrt nachgewiesen werden. E-FABP ist ein Zielprotein von c-Myc, welches wiederum durch EpCAM induziert wird (Münz et al., 2005).

### **1.3 Der *epcam*-Promotor**

Die Genexpression kann über die Initiation der Transkription reguliert werden. Die Initiation der Transkription beginnt am Promotor, eine dem Strukturgen vorgeschaltete DNA-Sequenz. An den Promotor binden eine DNA-abhängige RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren. Als weitere regulatorische Elemente sind Enhancer und Silencer zu nennen, die tausende von Basenpaaren vom Promotor entfernt liegen können. Enhancer und Silencer greifen über die Distanz mit Transkriptionsfaktoren in die Regulation der Transkription ein. In unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstartstelle liegt eine AT-reiche Konsensussequenz mit ihrem Zentrum bei etwa -25 Basenpaaren, die TATA-Box. Die TATA-Box ist für die Promotoraktivität entscheidend: Indem das „TATA-Box binding protein“ TBP an die TATA-Box bindet, wird die Transkription initiiert. Viele Promotoren enthalten zusätzlich noch eine CAAT-Box und GC-reiche Bereiche. Bei konstitutiven Genen finden sich in Promotoren gewöhnlich GC-reiche Bereiche. Konstitutive Gene sind Gene, die kontinuierlich exprimieren und nicht entwicklungsbedingt reguliert werden. Für die Transkription von Genen, deren Promotoren GC-reiche Bereiche aufweisen, ist das Protein von Säugerzellen SP-1 erforderlich. SP-1 kann an GC-Basenpaare binden und rekrutiert anschließend den Transkriptionsfaktor der Polymerase II (TFIID). Sobald TFIID an die DNA gebunden hat, folgen weitere Transkriptionsfaktoren und eine DNA-abhängige RNA-Polymerase: Der

---

Transkriptionsapparat ist vollständig, sodass die DNA transkribiert werden kann (Sims et al., 2004).

Was die *epcam*-Promotorsequenzen betrifft, so hat GA733-2 weder eine TATA-Box noch eine CAAT-Box vorzuweisen. Die 440bp-umfassende Promotorregion beinhaltet Konsensussequenzen für die Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (aktivierendes Protein 1) und SP-1, die für den Initiationskomplex am Promotor notwendig sind (Linnenbach et al., 1993). In Vorarbeiten wurde die Transkriptionsaktivität des 570 bp umfassenden Promotors untersucht. Hierzu wurde die Expression des Luciferaseenzym in Abhängigkeit des *epcam*-Promotors bestimmt. In EpCAM-positiven Zellen war der Promotor aktiv, jedoch nicht in EpCAM-negativen Zellen. Die Behandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) verminderte die Promotoraktivität um 50 - 75%, ebenso reduzierte sich die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche sowie der gesamte EpCAM-Gehalt in den Zellen. Weiterführende Untersuchungen konnten Aufschluss über die Wirkung von TNF $\alpha$  auf den *epcam*-Promotor geben: TNF $\alpha$  aktiviert den Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), der mit anderen Transkriptionsfaktoren um die Histon-Acetyltransferase p300/CBP konkurriert. Durch die Überexpression von p300/CBP wurde der inhibitorische Effekt von NF- $\kappa$ B auf den *epcam*-Promotor aufgehoben (Gires et al., 2001). Um besser zu verstehen, wie die Transkription des *epcam*-Gens reguliert wird, wurde in der Arbeitsgruppe das 570 bp *epcam*-Promotorfragment um 440 bp stromaufwärts erweitert und auf seine Eigenschaften hin untersucht. Die neu klonierte 1100 bp *epcam*-Promotorsequenz umfasst zwei Subfragmente, die synergistisch wirken. Ihre Transkriptionsaktivität war deutlich höher als das 570 bp umfassende Fragment und korrelierte mit der Menge an exprimiertem EpCAM. Die 1100 bp *epcam*-Promotorsequenz zeigte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt unter Gabe der NF- $\kappa$ B induzierenden Substanzen Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) (Gires et al., 2003). Dank der hohen Spezifität für EpCAM-positive Zellen eröffnet die klonierte

1100 bp *epcam*-Promotorsequenz die Möglichkeit, eine funktionelle Genexpression im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes zu untersuchen.

## 1.4 Heterologe Genexpression

Die moderne Medizin bietet ein breites Spektrum an onkologischen Therapiemodalitäten: Neben der operativen Tumorresektion kommen häufig Strahlen- und Chemotherapie zum Einsatz. Des Weiteren stellt die Hormontherapie eine Behandlungsoption für Hormonrezeptor-positive Mamma- und Prostatakarzinome dar. Auch eine Immuntherapie kann in Erwägung gezogen werden, wenn die Gesamtzellzahl des Tumors unter  $10^6$  Zellen gesunken ist und tumorassoziierte Antigene vorhanden sind. Nicht zuletzt ist die supportive Therapie zu erwähnen, die durch ausreichende Ernährung, antiemetische Therapie, Schmerzbehandlung und Prophylaxe der Nebenwirkung von Medikamenten das Leiden des Patienten mindert.

Die Idee, Tumorzellen mit gezieltem Gen-, Protein- oder Toxintransfer zu bekämpfen ist ein bedeutender Schritt zur Entwicklung eines neuen Therapiekonzepts. Dazu wurden in den letzten Jahren vielversprechende Ansätze ausgearbeitet:

- Retroviren mit sogenannten „single chain“ Antikörpern gegen Oberflächenproteine können verwendet werden, um ein letales Gen in Tumorzellen zu schleusen. Hierzu benötigt man Tumor-assoziierte Antigene auf der Plasmamembran, die für Antikörper zugänglich sind und eine hohe Spezifität für Tumorzellen besitzen (Khare et al., 2001).
- Karzinomzellen werden mit Antikörper gegen spezifische Oberflächenstrukturen, behandelt. Auf diese Weise werden Tumorzellen opsoniert und damit für das Immunsystem erkenntlich gemacht (Di Paolo et al., 2003).
- Kombinationstherapie von tumorspezifischen Antikörpern mit Antimetaboliten (5-Fluoruracil), Modulatoren der biologischen Antwort (Interferon alpha) und

---

hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Granulozyten-Makrophagen-CSF) (Liljefors et al., 2004).

- Gentransfer mit Verwendung von Promotoren, die eine hohe Spezifität für Tumorgewebe aufweisen (Barker et al., 2003; Greenberger et al., 2004).

Allen Konzepten liegt ein spezifisches Ankermolekül oder Promotor zugrunde, sodass ein selektiver Transfer in die entsprechenden Zielzellen gewährleistet ist.

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM könnte als therapeutisches Zielantigen bei der Tumorbekämpfung dienen. Zur Untersuchung der EpCAM-regulierten Genexpression stehen diverse Funktionsgene zur Verfügung, z.B. Grünes Fluoreszenzprotein (GFP), TNF receptor associated death domain protein (TRADD) und Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK).

Der grüne Fluoreszenzfarbstoff des GFPs dient zur Visualisierung der Promotoraktivität im Fluoreszenzmikroskop (Chalfie et al., 1994): Wenn der Promotor aktiv ist, findet eine GFP-Expression statt und die Zellen bilden grünen Fluoreszenzfarbstoff. Die Vergleichsgruppe zeigt bei inaktivem Promotor keinen grünen Fluoreszenzfarbstoff im Mikroskop.

Der programmierte Zelltod (Lockshin et al., 1965) und seine morphologische Entsprechung, die Apoptose (Kerr et al., 1972) sind unabdingbar für die Homöostase in erwachsenen Organismen. Besonders höherentwickelte Organismen, die durch ihre lange Lebenszeit mit vielen physikalischen und pathologischen Schädigungen der Zellen konfrontiert werden, müssen über ein gut funktionierendes System zur Beseitigung fehlerhafter Zellen verfügen (Danial et al., 2004). Wenn einzelne Komponenten der Apoptose verändert werden, können sie sich auf das dynamische System der Tumorentstehung auswirken (Hanahan et al., 2000). Da der programmierte Zelltod ein regulatorischer Prozess auf Molekularebene ist, verspricht man sich durch die gezielte Expression apoptoseinduzierender Gene ein effektives Hilfsmittel, um Tumorzellen zu eliminieren (Martin et al., 1994). TNF receptor associated death domain protein (TRADD)

ist ein 34 kD Protein, das mit dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor1 (TNFR1) wechselwirkt. Die Überexpression von TRADD führt zu zwei TNF-induzierten Phänomenen: Apoptose oder Aktivierung des nukleären Faktors kappa B (NF- $\kappa$ B) (Hsu et al., 1995).

Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK) als letales Gen trägt eine Information zur konditionellen Eliminierung von Zellen. Die Aktivierung des Suizidmechanismus erfolgt durch die Gabe des Virostatikums Ganciclovir. Die virale HSV1-TK unterscheidet sich von der menschlichen durch ihre Fähigkeit, das ungiftige Prodrug Ganciclovir durch Phosphorylierung in das toxische Ganciclovir-Triphosphat umzuwandeln. Das Guanosinanalogon wird bei der DNA-Replikation eingebaut und inhibiert die DNA-Synthese, blockiert den Zellzyklus und führt zum Zelltod (Craperi et al., 1999). Somit ist die HSV1-TK/GCV-Methode nur in Zellen effizient, die sich in Zellteilung befinden. Da schnell proliferierende Tumorzellen eine hohe Teilungsrate aufweisen, bietet sich die HSV1-TK Gentherapie in Kombination mit Ganciclovir an. Die therapeutische Wirkung von Ganciclovir wird durch den „bystander effect“ verstärkt, weil HSV1-TK exprimierende Tumorzellen auf die Nachbarzellen toxisch wirken (Robe et al., 2000).

## 1.5 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit zielte ich auf die Verwendung des 1100 bp *epcam*-Promotorfragments. Der *epcam*-Promotor sollte zur heterologen Genexpression eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden drei Proteine ausgewählt: Grünes Fluoreszenz Protein (GFP), TNF receptor associated death domain Protein (TRADD) und Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK). Der grüne Fluoreszenzfarbstoff von GFP dient der Visualisierung der Promotoraktivität im Fluoreszenzmikroskop. TRADD soll die Apoptose in EpCAM-positiven Tumorzellen induzieren. Mit Hilfe der spezifischen Expression der HSV1-TK in EpCAM-positiven Zellen sollten Tumorzellen für Ganciclovir sensitiviert werden. Eine Therapie mit Ganciclovir sollte das Absterben der Tumorzellen bewirken.

Es galt zunächst die heterologe Genexpression an einem zellulären Modellsystem von EpCAM-negativen Zellen HEK293 und EpCAM-positiven Zellen HEK293-EBNA1 auf die EpCAM-Spezifität mittels GFP-Expression zu testen. Anschließend sollten die Ergebnisse aus diesem Modellsystem auf Tumorzelllinien übertragen und auf die Expression der funktionellen Gene von TRADD und HSV1-TK untersucht werden. Wenn HSV1-TK in EpCAM-positiven transfizierten Zellen nachzuweisen ist, dann sollten die stabil transfizierten Zellen auf ihre Ganciclovirsensitivität getestet werden.

## 2 Material

### 2.1 Antikörper

Name des Antikörpers	Herkunft/Isotyp	Bezugsquelle
C215 (anti-EpCAM)	Maus/IgG	Freundlicherweise von Dr. H. Lindhofer (TrionPharma GmbH, München) zur Verfügung gestellt
anti-Actin(sc1616,J-19)	Ziege/IgG	Santa Cruz, Heidelberg
anti-GFP (sc-9996,B-2)	Maus/IgG <sub>2α</sub>	Santa Cruz, Heidelberg
anti-TRADD (H-278)	Kaninchen/IgG	Santa Cruz, Heidelberg
FITC anti-Maus Ig	Ziege/IgG (H+L)	Jackson Immuno Research/ Dianova, Hamburg
HRP anti-Ziege Ig	Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
HRP anti-Maus Ig	Ziege/IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
POX anti-Kaninchen Ig	Ziege/IgG (H+L)	Jackson Immuno Research/ Dianova, Hamburg

**Tabelle 1: Antikörper**



## 2.2 Bakterien

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterien eingesetzt:

Bakterien	Bezugsquelle
E.coli DH5 $\alpha$ (Hanahan,1985)	Gibco BRL (Eggenstein)

**Tabelle 2: Bakterien**

## 2.3 Chemikalien, Hilfsmittel und Geräte

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

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid	National Diagnostics, Hesse Hull, UK
Agarose	Sigma, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-RAD Laboratories, Richmond, USA
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Penicillin/Streptomycin)	Roche, Mannheim; Biochrom, Berlin
Bakterienmedien (Trypton, Hefeextrakt)	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt

---

Chemikalien	Bezugsquelle
Ganciclovir (Cymeven®)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hygromycin B	Calbiochem, Frankfurt/Main
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Bio-RAD Laboratories, Richmond, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
PBS-Tabletten (Phosphatgepufferte Saline)	Gibco BRL, Berlin
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Amersham Biosciences, Freiburg
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin/ EDTA	Gibco BRL, Berlin
Tween	Serva, Heidelberg

---

**Tabelle 3: Chemikalien**

Verwendete Kits, Reagenzien und Sonstiges	Bezugsquelle
1 kb DNA Marker Gene Ruler™ (250bp-10kb)	Fermentas, St.Leon-Rot
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Indianapolis,USA
3 MM Whatmann-Papier	Bender & Hobein, München
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
BCA Proteinassay	Pierce, Rockford, USA
dNTPs	Fermentas, St.Leon-Rot
Dublecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
ECL™ Westernblotting System	Amersham Biosciences, Freiburg
Fötale Kälberserum (FKS)	Seromed/Biochrom, Berlin
HighPure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Immobilon Transfermembran	Millipore, Massachusetts, USA
MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl- Tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Plasmidpräparation „Jetstar“	Genomed, Bad Oeyenhausen
Proteaseinhibitoren (Roche complete™)	Roche, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Transfektionsreagenz (Metafectene™)	Biontex, München

**Tabelle 4: Reagenzien, Kits und Sonstiges**

Die Versuche wurden mit den aufgelisteten Plastikwaren durchgeführt:

Plastikwaren	Bezugsquelle
Kryoröhrchen 2ml	Nunc, Wiesbaden
PCR Softtubes	Biozym, Olendorf
Pipettenspitzen	Gilson/BD, Heidelberg, RatioLab, Dreieich
Röhrchen, steril, Zellkultur (15ml/50ml)	Falcon/BD Le Pont de Claix (F); Nunc, Wiesbaden
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden; Falcon/BD, Heidelberg
Zentrifugationsgefäße 1,5ml/ 2ml	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 5: Plastikwaren**

Es wurde mit folgenden Geräten gearbeitet:

Verwendete Geräte	Hersteller
Bakterieninkubator	Heraeus, München
Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Elektrophorese-Kammern	Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophorese-Netzgeräte	Owl Scientific/ Nunc, Wiesbaden

---

Verwendete Geräte	Hersteller
ELISA-Reader EL <sub>x</sub> 800	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Entwickler Curix 60	AGFA, Köln
FACSCalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmkassetten	Amersham Biosciences, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
PCR-Gerät (Thermocycler)	Biometra, Göttingen
Photometer	Pharmacia, USA
Pipetten, Mikroliter-	Abimed, Langenfeld
Sterilwerkbank	Heraeus, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus, München
Waage	Sartorius, Göttingen
Zellinkubator	Heraeus, München

---

**Tabelle 6: Geräte**

## 2.4 Enzyme

Folgende Enzyme fanden in der Arbeit Verwendung:

Name des Enzyms	Bezugsquelle
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim; Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAse A	Roche, Mannheim
Caspase-family Inhibitor, Z-VAD-FMK	BioCat, Heidelberg

**Tabelle 7: Enzyme**

## 2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), TNF receptor associated death domain protein (TRADD), Herpes Simplex Virus 1Thymidinkinase (HSV1-TK).

Primer	Sequenz	Verwendung
GAPDH-FW	5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AGG AGA-3'	RT-PCR
GAPDH-BW	5'-AGA ACA TCA TCC CTG CCT CTA CTG-3'	RT-PCR

Primer	Sequenz	Verwendung
TRADD-FW	5'-CGC ATA CCT GTT TGT GGA GTC C-3'	RT-PCR
TRADD-BW	5'-AGC CGC ACT TCA GAT TTC GC-3'	RT-PCR
HSV1-TK-FW	5'-GAA AAC CAC CAC CAC GCA AC-3'	RT-PCR
HSV1-TK-BW	5'-ACC GCA CCG TAT TGG CAA GTA G-3'	RT-PCR

**Tabelle 8: Oligonukleotide**

## 2.6 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden nach den üblichen Klonierungstechniken (Maniatis *et al.*, 1989) generiert. Ein Teil der Plasmide war in der Arbeitsgruppe vorhanden, andere wurden freundlicherweise von weiteren Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit Sternchen (\*) gekennzeichneten Plasmide wurden von mir selbst kloniert.

Name des Plasmids	Eigenschaften
pGL3-Basic- 1100bpEpCAMprom	1100 bp <i>epcam</i> -Promotor in pGL3-Basic
pMEP4	pHEBo-Vektor mit EBNA1, <i>metallothionin</i> -Promotor, Hygromycin-Resistenz, Ampicillin-Resistenz, Ausgangsplasmid für die mit Sternchen gekennzeichneten Plasmide
pEGFP-C1	Grünes Fluoreszenzprotein Expressionsplasmid (BD Clontech, Heidelberg)

Name des Plasmids	Eigenschaften
TP602	Freundlicherweise von Dr. Arnd Kieser, GSF Großhadern, zur Verfügung gestellt, <i>myc-htradd</i> Wildtyp (TNF receptor associated death domain protein) in pRK5 (BD Clontech, Heidelberg)
pGex-6P-2-HSV1-TK	Freundlicherweise von Dr. Maria Fogli, ETH Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt, Herpes Simplex Virus1 Thymidinkinase (HSV1-TK) in pGex-6P
pEpProm-Kontrolle*	1100 bp <i>epcam</i> -Promotor in pMEP4
pEpProm-GFP*	1100 bp <i>epcam</i> -Promotor und <i>gfp</i> -Fragment in pMEP4
pEpProm-TRADD*	1100 bp <i>epcam</i> -Promotor und <i>tradd</i> -Fragment in pMEP4
pEpProm-HSV1-TK*	1100 bp <i>epcam</i> -Promotor und <i>hsv1-tk</i> -Fragment in pMEP4

**Tabelle 9: Plasmide**

## 2.7 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet bzw. etabliert (\*):

Name der Zelllinie	Ursprung
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, E1A und E1B (Adenovirus) transformiert (Graham et al., 1977)



Name der Zelllinie	Ursprung
HEK293-EBNA1	HEK293 stabil transfiziert mit einem Expressionsplasmid für das EBV nukleäre Antigen 1 (EBNA1)
SKBR3	Humane Mammakarzinom-Zelllinie (ATCC)
HEK293-pEpProm-Kontrolle*	pEpProm-Kontrolle stabil transfiziert in HEK293
HEK293-pEpProm-HSV1-TK*	pEpProm-HSV1-TK stabil transfiziert in HEK293
HEK293-EBNA1-pEpProm-Kontrolle*	pEpProm-Kontrolle stabil transfiziert in HEK293-EBNA1
HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK*	pEpProm-HSV1-TK stabil transfiziert in HEK293-EBNA1
SKBR3-pEpProm-Kontrolle*	pEpProm-Kontrolle stabil transfiziert in SKBR3
SKBR3-pEpProm-HSV1-TK*	pEpProm-HSV1-TK stabil transfiziert in SKBR3

**Tabelle 10: Zelllinien**

## 2.8 Dienstleistungen

Es wurde auf folgende Dienstleistungen zurückgegriffen:

Dienstleistung	Firma
DNA-Sequenzierung	Firma Sequiserve, Vaterstetten
Synthese der RT-PCR-Primer	Firma Metabion, Martinsried

**Tabelle 11: Dienstleistungen**

## 3 Methoden

### 3.1 Klonierungsmethoden

#### 3.1.1 Klonierungsschema der einzelnen Vektoren

##### 3.1.1.1 pEpProm-Kontrolle (10652bp)

Der *epcam*-Promotor (1100 bp) wurde aus dem Vektor pGL3-Basic-1100bpEpCAMprom mit Restriktionsenzymen NheI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) ausgeschnitten, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA isoliert. Das gewonnene DNA-Fragment wurde in den XbaI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) verdauten Vektor pMEP4 kloniert. Dabei wurde der *metallothionin*-Promotor des Vektors pMEP4 durch den *epcam*-Promotor ersetzt. Dieser Vektor wurde als pEpProm-Kontrolle bezeichnet.

##### 3.1.1.2 pEpProm-GFP (11422bp)

Der Vektor pEpProm-Kontrolle wurde mit NheI (5'-Ende) und BamHI (3'-Ende) verdaut. Das *gfp*-Fragment (799bp) wurde mit NheI (5'-Ende) und BamHI (3'-Ende) aus dem Vektor pEGFP-C1 isoliert und in den Vektor pEpProm-Kontrolle eingefügt. Der generierte Vektor wurde als pEpProm-GFP bezeichnet.

##### 3.1.1.3 pEpProm-TRADD (12186bp)

Das *myc-htradd* Wildtyp Fragment (1652bp) wurde aus dem Vektor TP602 mit SacII (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) isoliert und in den Vektor pGL3-Basic-1100bpEpCAMprom, der ebenfalls mit SacII (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) verdaut wurde, kloniert. In einem zweiten Schritt wurde das *myc-htradd* Wildtyp Fragment gemeinsam mit dem *epcam*-Promotor mit NheI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) isoliert.

Die Kasette aus *epcam*-Promotor und *myc-htradd* Wildtyp Fragment wurde in den NheI (5´-Ende) und HindIII (3´-Ende) verdauten Vektor pMEP4 eingefügt. Dieser Vektor wurde pEpProm-TRADD benannt.

#### **3.1.1.4 pEpProm-HSV1-TK (11398bp)**

Das *hsv1-tk* Fragment (1145 bp) wurde mit BamHI (5´-Ende) und SalI (3´-Ende) aus dem Vektor pGex-6P-2-HSV1-TK ausgeschnitten und in den BamHI (5´-Ende) und SalI (3´-Ende) verdauten Vektor pEpProm-Kontrolle kloniert. Der generierte Vektor wurde als pEpProm-HSV1-TK bezeichnet.

#### **3.1.2 Restriktionsverdau**

Die Vektoren (5 µg bis 15 µg DNA) wurden in einem präparativen Gesamtansatz (50 µl) mit zwei Restriktionsenzymen (je 1 U) eine Stunde lang bei 37 °C verdaut. Bei dem Restriktionsenzym BamHI wurde der Verdau in zwei Schritten durchgeführt: Dabei wurden nach jedem Schritt die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Zur Kontrolle fand nach jedem Klonierungsschritt ein Testverdau statt, indem 1 µg bis 5 µg DNA in 10 µl Gesamtansatz mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen gespalten wurden (1 U, 1 h, 37 °C).

#### **3.1.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels**

##### **Agarose-Gelelektrophorese**

Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,7%- bis 2%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose-Gele hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab. Kleine Fragmente wandern schnell im Spannungsfeld und können in Gelen mit höherem Agarosegehalt besser beurteilt werden. Für Experimente mit größeren DNA-Fragmenten

---

eignen sich hingegen Gele mit geringerem Agarosegehalt. Vor dem Gießen der Gele wurden 3 µl Ethidiumbromid der flüssigen Agarose (50 ml) beigemischt, um die Nukleinsäuren im UV-Licht sichtbar zu machen. Um die Basenpaargröße der DNA-Banden zu ermitteln, wurde aliquotierte Markerlösung verwendet. Die Laufbedingung wird durch die Spannung bestimmt, die sich aus dem Abstand der beiden Elektroden (3 V/cm) errechnet.

---

Laufpuffer: 1x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA)

Marker: 1 kb DNA Marker Gene Ruler™ (250 bp – 10 kbp), Fermentas

---

### 3.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente in Agarose-Gelen wurden die DNA-Banden unter UV-Licht detektiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.1.5 Ligation

Für die Ligation der DNA-Fragmente mit den entsprechenden Vektoren wurde ein 10 µl Ansatz pipettiert:

---

1 µl	Ligationspuffer
300 ng	geschnittenes Fragment („sticky ends“)
600 ng	geschnittener Vektor („sticky ends“)
1 U	T4 DNA-Ligase

---

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die T4 DNA-Ligase 10 min bei 65 °C inaktiviert.

### 3.1.6 Transformation von DNA-Fragmenten in *E.coli*

Aus dem Ligationsansatz (siehe Kapitel 3.1.5) wurden 2 µl zu 70 µl transformationskompetenten *E.coli* DH5α pipettiert. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis gekühlt, ehe er für 90 sec im Thermoblock bei 42 °C inkubiert wurde. Die behandelten Bakterien wurden nochmals 20 min auf Eis gekühlt, dann mit SOC (Glukosesupplementiertes SOB-Medium) versetzt und eine Stunde bei 37 °C angezüchtet. Nach der phänotypischen Expression wurde der Überstand abzentrifugiert (1 min, 4000 U/min, 20 °C) und bis auf 50 µl entfernt, die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

---

SOB: 2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl  
(sterilfiltriert), 10 mM MgSO<sub>4</sub> (sterilfiltriert)

SOC: SOB + 2% w/v Glucose

LB-Agar: 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 1,5% Agar

---

### 3.1.7 Plasmidisolierung aus *E.coli*

#### 3.1.7.1 Hitzaufschluß

Für die schnelle Methode der DNA-Isolierung wurde zunächst jede Kolonie vereinzelt und über Nacht bei 37 °C in LB Selektionsmedium inkubiert. Danach wurden die Bakterien von der Selektionsagarplatte entfernt und in jeweils 100 µl M-STET mit 10 µl Lysozym gegeben, 2 min bei 95 °C inkubiert und abzentrifugiert (30 min, 13.000 U/min, 4 °C).

---

<u>LB-Medium:</u>	1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl
<u>LB-Selektionsmedium:</u>	LB-Medium mit 50 mg/ml Ampicillin bzw. 30 mg/ml Kanamycin
<u>M-STET:</u>	0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA, 5% Triton-X-100
<u>Lysozym:</u>	Stocklösung 50 mg/ml

---

### 3.1.7.2 Plasmidaufbereitung über eine DNA-bindende Säule

Die Plasmidisolierung aus *E.coli* DH5 $\alpha$  erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen der Plasmidpräparation „Jetstar“ entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed, Bad Oeyenhausen). Die hierbei benötigten Lösungen wurden ebenfalls von der Firma Genomed bezogen.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Standardmedium wurde Duplecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, das mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) ergänzt wurde.

Zur Ernte der adhärennten Zellen wurde das Medium sorgfältig entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA aus dem Monolayerverband der Kulturflasche gelöst. Nach dem Waschen der Zellen mit Medium (10% FKS) wurden sie in der gewünschten Dichte neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte zur Behandlung der Zellen erfolgten in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen (7 min, 1100 U/min, 20 °C).

### 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde ein 20 µl Zellaliquot mit gleichem Volumen einer 0,2%igen Trypanblaulösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind im Mikroskop an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

### 3.2.3 Aufbewahrung von Zelllinien

Zur Aufbewahrung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Um eingefrorene Zellen zu rekultivieren, wurden sie in Standardmedium bei Raumtemperatur resuspendiert und abzentrifugiert (7 min, 1100 U/min,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die pelletierten Zellen wurden anschließend in frischem Standardmedium resuspendiert und in einer 10 ml Kulturflasche ausplattiert.

---

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

---

### 3.2.4 Transiente Transfektion von Zellen mit Metafectene™

HEK293, HEK293-EBNA1 und SKBR3 wurden über Nacht in 6-Loch Platten ( $4,5 \times 10^5$  Zellen/Loch) in antibiotikafreiem DMEM mit 10% FKS kultiviert. Die Transfektion von 1 - 2 µg Plasmid-DNA je Loch erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenz Metafectene™ in serumfreien Medium nach Angaben des Herstellers (Biontex, München). Zur Kontrolle der Effizienz wurde stets eine parallele Transfektion mit 1 µg *gfp*-Expressionsplasmid durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden am folgenden Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre GFP-Expression überprüft. Die Transfektionseffizienz lag je nach Zelllinie zwischen 20 - 40%.

### **3.2.5 Selektion stabiler Zellklone von humanen Zelllinien**

Um stabile Transfektanten zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe des liposomalen Transfektionsreagenz Metafectene<sup>TM</sup> wie beschrieben transfiziert und anschließend einer Selektion unterzogen. Die verwendeten Plasmide basieren auf pMEP4 als Ausgangsvektor, der für eine Hygromycin-Resistenz kodiert. Um transfizierte Zelllinien zu selektieren, wurde dem Standardmedium Hygromycin B (Calbiochem, Frankfurt/Main) in steigender Konzentration von 50 µg/ml bis 200 µg/ml hinzugefügt.

## **3.3 Protein- und mRNA-Expression**

### **3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)**

Die Proteinexpression von Einzelzellen kann in einem Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter, FACS) analysiert werden. Dazu misst man die Eigenfluoreszenz (z.B. GFP) der Zellen oder verwendet spezifische Antikörper gegen Oberflächenproteine, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind oder mit Hilfe markierter Sekundärantikörper abgegriffen werden. Der verwendete Sekundärantikörper war mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt und wurde in einem FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

#### **3.3.1.1 Bestimmung der GFP-Fluoreszenz**

Transiente Transfektanten von HEK293 und HEK293-EBNA1 wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Fluoreszenz untersucht.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit Trypsin/EDTA aus dem Monolayerverband gelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen wurden, folgte die Analyse im FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg).



---

PBS: 500 ml Aqua dest., 1 Tablette PBS (Gibco BRL, Berlin)

FACS-Puffer: PBS + 2% FKS

---

### **3.3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von EpCAM**

1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden pelletiert und in einer 1 : 50 Verdünnung des EpCAM spezifischen monoklonalen Antikörpers C215 in FACS-Puffer 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper FITC anti-Maus Immunglobulin erfolgte in einer 1 : 50 Verdünnung mit FACS-Puffer für weitere 30 min bei 4 °C in lichtgeschützter Umgebung. Nach zweimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression von EpCAM im Durchflusszytometer bestimmt.

### **3.3.2 Immunoblotting Techniken (Western Blot)**

1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 100 µl Lysispuffer über Nacht bei 4 °C lysiert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 14.000 U/min, 4 °C). Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit Hilfe des BCA Proteinassays (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nach Errechnen des einzusetzenden Volumens, wurden die Proteine mit 5 µl Lämmli-Lösung 3 min bei 95 °C inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 13.000 U/min, 20 °C).

---

Lysispuffer: TBS, 1% Triton, Proteaseinhibitoren

TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4

Lämmli-Puffer: Tris, SDS, Bromphenolblau, 2-Mercaptoethanol

---

Die vorbehandelten Proteine wurden in 10 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen in vertikaler Elektrophorese aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V, 30 mA/Gel, ca. 1 h) und anschließend auf eine Immobilon Transfermembran (Millipore, Massachusetts, USA) übertragen (Westernblot: 100 V, 500 mA, 45 min). Die Membran wurde kurz mit destilliertem Wasser gereinigt, durch Methanol gezogen und dann luftgetrocknet. Dieses Prozedere sowie die anschließende 30minütige Inkubation der Membran in Milchlösung verhindert die unspezifische Bindung von Antikörpern. Es folgte die Inkubation mit Primärantikörpern (1 : 200 bis 1 : 500 in Milchlösung) und peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpern (1 : 2000 in Waschpuffer). Nach jeder Inkubationsperiode wurden die Überstände mit destilliertem Wasser abgespült und die Membran dreimal je 5 min in Waschpuffer geschwenkt. Zur Detektion wurde das ECL™ Westernblotting System (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet.

---

<u>10x Laufpuffer:</u>	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
<u>10x Blotting-Puffer:</u>	250 mM Tris, 1,26 M Glycin
<u>Waschpuffer:</u>	Phosphatgepufferte Saline (PBS) + 0,2% Tween
<u>Milchlösung:</u>	3 - 5% Milchpulver in Waschpuffer

---

### 3.3.3 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Expression von *tradd*-mRNA in transienten Transfektanten und von *hsv1-tk*-mRNA in stabilen Transfektanten der entsprechenden Transfektanten zu analysieren, wurde eine Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit dem Expressionsplasmid pEpProm-TRADD, der Negativkontrolle pEpProm-Kontrolle und TP602 mit *myc-htradd* Wildtyp als Positivkontrolle transient transfiziert und nach 18 h geerntet. Zur Analyse der HSV1-TK Expression konnte auf stabil transfizierte Zelllinien zurückgegriffen werden. Die

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des HighPure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dann wurde der RNA-Gehalt im Photometer (Wellenlängen 260 nm/280 nm) bestimmt. Um eine spezifische Amplifikation einer gewünschten Sequenz mit Hilfe der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zu erlangen, wurden Primeroligonukleotide generiert. Das Plasmid pEpProm-TRADD bzw. pEpProm-HSV1-TK dienten hierzu als Matrize. In der RT-PCR wurden 100 pmol/ $\mu$ l der Primeroligonukleotide eingesetzt und die gleiche Menge an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Primeroligonukleotid zur Kontrolle verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde 1  $\mu$ g RNA eingesetzt und nach Angaben den Herstellers (Roche, Indianapolis, USA) unter Verwendung der AMV Reverse Transkriptase umgeschrieben.

Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion wurde im 50  $\mu$ l Ansatz pipettiert:

---

<u>Reaktionsansatz:</u>	5 $\mu$ l	cDNA aus cDNA-Synthese
	5 $\mu$ l	10x Puffer
	5 $\mu$ l	2 mM dNTPs
	6 $\mu$ l	25 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 $\mu$ l	FW Primer (100 pmol/ $\mu$ l)
	1 $\mu$ l	BW Primer (100 pmol/ $\mu$ l)
	1 U	Taq-DNA-Polymerase
	26 $\mu$ l	Millipore Wasser

---

Mit dem Ansatz wurde im Thermocycler das folgende Programm durchgeführt:

<u>TRADD</u>		<u>HSV1-TK</u>
95 °C – 30 sec	Denaturierung	95 °C – 30 sec
59 °C – 2 min	Primer Bindung	58 °C – 2 min
72 °C – 1 min	Elongation	72 °C – 1 min

**Tabelle 12: RT-PCR Protokoll**

Jeder Zyklus wurde 30 mal wiederholt. Die RT-PCR Produkte wurden anschließend auf einem 2%igen Agarose-Gel analysiert.

### 3.4 Funktionelle Charakterisierung

#### 3.4.1 Bestimmung der Zellaktivität im MTT-Ansatz

Die Konversion des Substrates MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch ein mitochondriales Enzym dient als Maß für den Metabolismus und die Vitalität der Zellen (Mosmann, 1983). Bei der enzymatischen Umsetzung entsteht Formazan, das durch Messung der optischen Dichte bei 690 nm quantifiziert wird. Je  $3 \times 10^3$  Zellen in 100 µl Startkonzentration wurden in 96-Loch Platten ausgesät und für 1 bis 6 Tage lang kultiviert. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurden verschiedene Ganciclovir-Konzentrationen (Cymeven®, Hoffmann-LaRoche, Grenzach) zugesetzt. Zur Messung der MTT-Konversion wurden den Zellen je 10 µl/Loch MTT Reagenz (Sigma-Aldrich, Steinheim) zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die gebildeten Kristalle in 200 µl/Loch MTT-Lysispuffer gründlich gelöst und anschließend die optische Dichte (OD) bei 690 nm in einem ELISA-Gerät gemessen. Zum Vergleich

verschiedener Experimente wurden die gemessenen OD-Werte stets auf den am ersten Tag einer Zeitreihe gemessenen Bezugswert standardisiert.

---

MTT-Reagenz: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid,  
20ml PBS

MTT-Lysispuffer: 24 : 1 Gemisch aus Isopropanol und 2 M HCl

Ganciclovir-Lösung: 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M Ganciclovir in Aqua dest.

---

## 4 Ergebnisse

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein Transmembranprotein, das nicht oder nur schwach in gesunden Plattenepithelzellen exprimiert wird. In Plattenepithelkarzinomen hingegen kommt es zu einer deutlichen Überexpression (Balzar et al., 1999a). Die *de novo* Expression in Tumorzellen geht mit einer erhöhten Proliferationsaktivität und Dedifferenzierung einher (Litvinov et al., 1996). In unserer Arbeitsgruppe wurde eine 1100 bp DNA-Sequenz des *epcam*-Promotorfragments kloniert und charakterisiert, die aus zwei Subfragmenten zu 550 bp und 570 bp besteht (Gires et al., 2003). Die beobachtete transkriptionelle Aktivität des 1100 bp DNA-Fragments zeigte für EpCAM-positive Zellen spezifische Eigenschaften unabhängig vom genetischen Hintergrund und korrelierte mit der Oberflächenexpression des Transmembranproteins EpCAM. Ziel meiner Arbeit war es, das klonierte 1100 bp Promotorfragment, das eine deutliche Spezifität für EpCAM-positive Zellen aufweist, für die gezielte Expression therapeutischer Gene in EpCAM-positiven Tumorzellen zu verwenden. Als Ansatz einer modellhaften Genterapie wurde die *epcam*-Promotor vermittelte Genexpression von Grünem Fluoreszenzprotein (GFP), TNF receptor associated death domain protein (TRADD) und Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK) in EpCAM-positiven Tumorzellen untersucht.

### 4.1 Klonierung der Vektoren mit *epcam*-Promotor und funktionellen Genfragmenten in pMEP4

Als Ausgangsplasmid diente der pHEBo-Vektor pMEP4, der über eine Hygromycin-Resistenz sowie eine Ampicillin-Resistenz verfügt. Der *metallothionin*-Promotor in pMEP4 wurde durch das 1100 bp *epcam*-Promotorfragment ersetzt. Die funktionellen Genfragmente, die für Grünes Fluoreszenzprotein (GFP), TNF receptor associated death

domaine protein (TRADD) und Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK) kodieren, wurden jeweils in Transkriptionsrichtung nach dem *epcam*-Promotor eingefügt, sodass sie unter der Kontrolle des *epcam*-Promotors stehen (siehe Abbildung 1).

#### **Abbildung 1: Schema der *epcam*-Promotor Konstrukte**

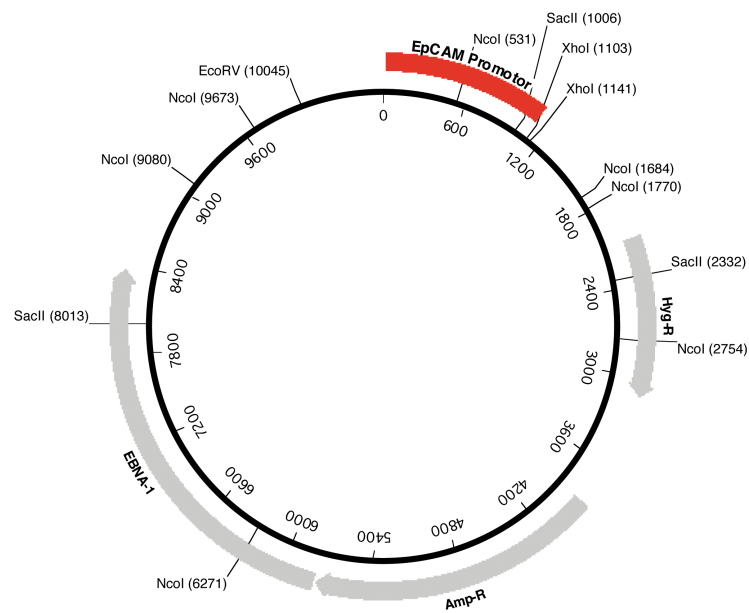
*Gezeigt ist der schematische Aufbau der Expressionsplasmide pEpProm-Kontrolle, pEpProm-GFP, pEpProm-TRADD und pEpProm-HSV1-TK mit epcam-Promotor, dem entsprechenden funktionellen Genfragment gfp, tradd oder hsv1-tk, CMV-Promotor und Hygromycin-Resistenz.*

##### **4.1.1 Klonierung des pEpProm-Kontrolle als Leervektor**

Das Plasmid pEpProm-Kontrolle dient als Negativkontrolle und beinhaltet den *epcam*-Promotor in dem pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz. Die schematische Darstellung des klonierten Plasmids pEpProm-Kontrolle

zeigt Abbildung 2. Zur Klonierung des pEpProm-Kontrolle wurde der *epcam*-Promotor aus dem Vektor pGL3-Basic-1100bpEpCAMprom mit den Restriktionsenzymen NheI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) ausgeschnitten, über ein präparatives Agarose-Gel aufgetrennt und die DNA aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde das gewonnene Insert mit dem durch XbaI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende) linearisierten Vektor pMEP4 ligiert und der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Transformanten erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden alle Einzelkolonien über Nacht expandiert, die DNA mittels Hitzeaufschluß isoliert und eine vorläufige Restriktionsanalyse mit SacII durchgeführt. Wenn die DNA-Fragmente des Restriktionsverdaus mit SacII einzelner Proben mit den errechneten Werten des Restriktionsverdaus mit SacII von pEpProm-Kontrolle übereinstimmten, wurden in einem zweiten Schritt die jeweiligen Klone hochgezogen und die Plasmide über DNA-bindende Säulen aufbereitet. Danach wurde die Restriktionsanalyse um die Enzyme EcoRV/XhoI und NcoI/XhoI erweitert. In Abbildung 3 sieht man die vollständige Restriktionsanalyse von pEpProm-Kontrolle mit den Enzymen SacII, EcoRV/XhoI und NcoI/XhoI. Der Marker dient als Größenreferenz für die DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdaus von pEpProm-Kontrolle. Man liest die Größe der einzelnen Fragmente aus dem jeweiligen Restriktionsmuster in Abbildung 3 ab und vergleicht das Ergebnis mit den zugehörigen berechneten Werten aus Tabelle 13. So konnte das geklonte Plasmid pEpProm-Kontrolle anhand des Restriktionsmusters verifiziert werden. Die korrekte Klonierung von pEpProm-Kontrolle wurde zusätzlich durch DNA-Sequenzierung bestätigt.





**Abbildung 2: Schema pEpProm-Kontrolle**

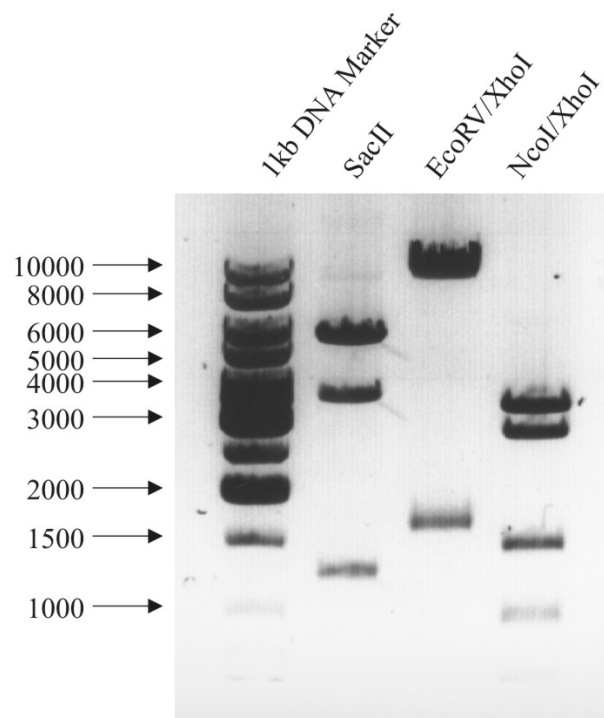
Das klonierte Plasmid pEpProm-Kontrolle besteht aus dem pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz und epcam-Promotor. Schematische Darstellung von pEpProm-Kontrolle inklusive der verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme SacII, EcoRV/ XhoI und NcoI/XhoI.

pEpProm-Kontrolle	Größe des Fragments	Enzyme	Von : Bis
Verdau mit SacII			
	5681	SacII	2333 : 8013
	3645	SacII	8014 : 1006
	1326	SacII	1007 : 2332
Verdau mit EcoRV/XhoI			
	8904	XhoI	1142 : 10045
	1710	EcoRV	10046 : 1103
	38	XhoI	1104 : 1141
Verdau mit NcoI/XhoI			
	3517	NcoI	2755 : 6271
	2809	NcoI	6272 : 9080
	1510	NcoI	9674 : 531
	984	NcoI	1771 : 2754
	593	NcoI	9081 : 9673
	572	NcoI	532 : 1103

pEpProm-Kontrolle	Größe des Fragments	Enzyme	Von : Bis
	543	XhoI	1142 : 1684
	86	NcoI	1685 : 1770
	38	XhoI	1104 : 1141

**Tabelle 13: Restriktionsverdau pEpProm-Kontrolle**

Es sind die berechneten Größen der DNA-Fragmente gelistet, die ein Restriktionsverdau von pEpProm-Kontrolle mit den genannten Enzymen ergibt. In der ersten Spalte werden die verwendeten Enzyme für den jeweiligen Ansatz genannt. In der zweiten Spalte ist die Größe des Fragments zu sehen, das durch das spezifische Enzym aus Spalte drei generiert wird. In Spalte vier wird die genaue Position der Schnittstelle auf dem Plasmid pEpProm-Kontrolle gezeigt

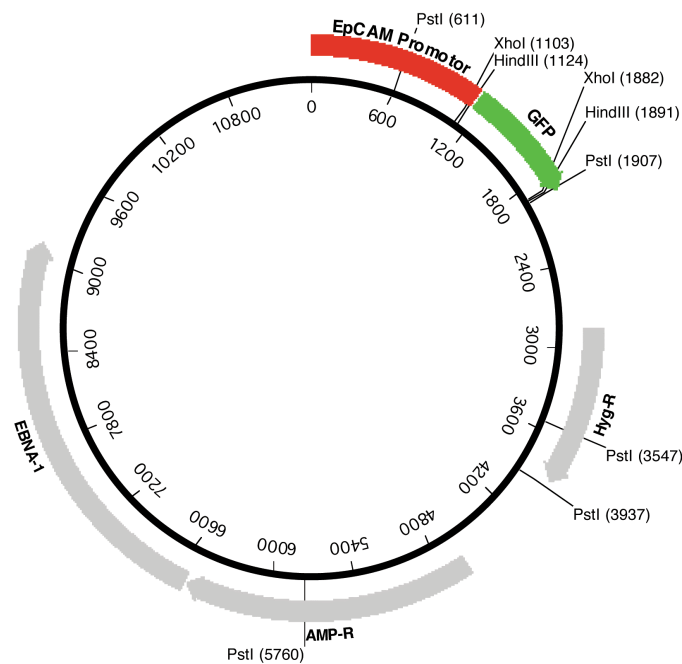


**Abbildung 3: Restriktionsverdau pEpProm-Kontrolle**

Das Plasmid pEpProm-Kontrolle wurde mit den Restriktionsenzymen SacII, EcoRV/XhoI und NcoI/XhoI behandelt, anschließend auf einem 0,7%igen Agarose-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die korrespondierenden Banden wurden im UV-Licht visualisiert. Gezeigt sind die Restriktionsmuster eines repräsentativen Experiments.

#### 4.1.2 Klonierung des pEpProm-GFP zur Visualisierung der Aktivität des *epcam*-Promotors

Das Plasmid pEpProm-GFP besteht aus dem *epcam*-Promotor und dem *gfp*-Expressionsgen in dem pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz. Die schematische Darstellung des klonierten Plasmids pEpProm-GFP zeigt Abbildung 4. Das DNA-Fragment, welches für das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) kodiert, wurde unter die Kontrolle des *epcam*-Promotors gestellt, sodass es in Abhängigkeit von der Promotoraktivität den grünen Fluoreszenzfarbstoff exprimiert. Dadurch kann die Funktion des *epcam*-Promotors im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Das *gfp*-Fragment (799bp) wurde mit NheI (5'-Ende) und BamHI (3'-Ende) aus dem Vektor pEGFP-C1 isoliert und in den Vektor pEpProm-Kontrolle eingefügt. Die einzelnen Schritte der Klonierung erfolgten wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Das klonierte Plasmid pEpProm-GFP wurde mit PstI, HindIII und XhoI im Restriktionsverdau überprüft: In Tabelle 14 können die berechneten Fragmentgrößen des Restriktionsverdaus von pEpProm-GFP nachgesehen werden. Abbildung 5 zeigt das Restriktionsmuster von pEpProm-GFP mit PstI, HindIII, XhoI und einer DNA-Probe zusammen mit Referenzmarker. Der Marker erlaubt die Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente. Da die Größen der DNA-Fragmente aus jedem Restriktionsansatz mit den zugehörigen berechneten Werten aus Tabelle 14 übereinstimmen, ist die Klonierung des Plasmids pEpProm-GFP korrekt. Zusätzlich erfolgte die Überprüfung des pEpProm-GFP mittels DNA-Sequenzierung.



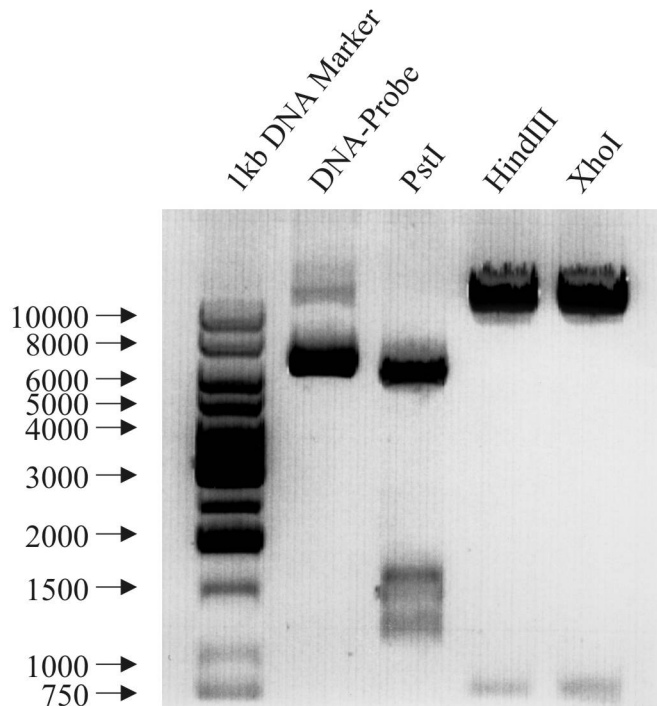
**Abbildung 4: Schema pEpProm-GFP**

Das klonierte Plasmid pEpProm-GFP besteht aus dem *epcam*-Promotor mit *gfp*-Insert im pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz. Schematische Darstellung von pEpProm-GFP inklusive der verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme PstI, HindIII und XhoI.

pEpProm-GFP	Größe des Fragments	Enzyme	Von : Bis
Verdau mit PstI	6273	PstI	5761 : 611
	1823	PstI	3938 : 5760
	1640	PstI	1908 : 3547
	1296	PstI	612 : 1907
	390	PstI	3548 : 3937
Verdau mit HindIII	10655	HindIII	1892 : 1124
	767	HindIII	1125 : 1891
Verdau mit XhoI	10643	XhoI	1883 : 1103
	779	XhoI	1104 : 1882

**Tabelle 14: Restriktionsverdau pEpProm-GFP**

In Tabelle 14 sind die berechneten Größen der DNA-Fragmente gelistet, die ein Restriktionsverdau von pEpProm-GFP mit den Enzymen PstI, HindIII und XhoI ergibt. Die erste Spalte nennt die verwendeten Enzyme für den jeweiligen Ansatz. In der zweiten Spalte folgt die Größe des Fragments, das durch das spezifische Enzym aus Spalte drei generiert wird. In Spalte vier wird die genaue Position der Schnittstelle auf dem Plasmid pEpProm-GFP gezeigt.



**Abbildung 5: Restriktionsverdau pEpProm-GFP**

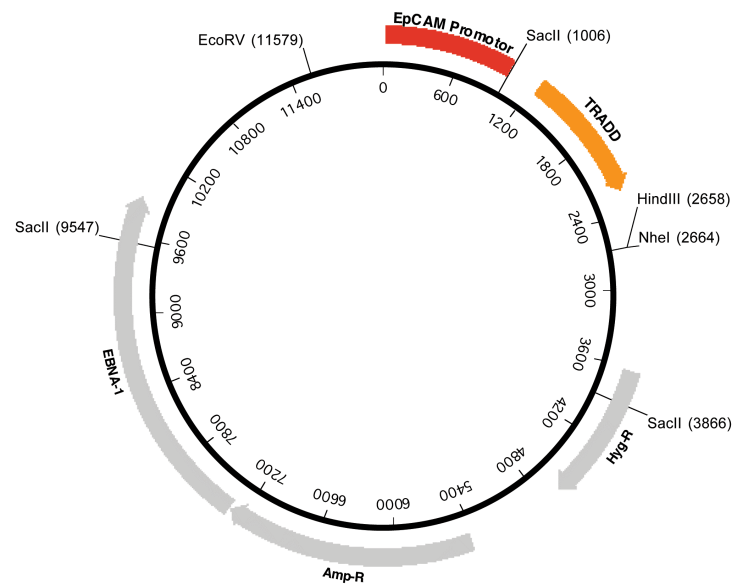
Das Plasmid pEpProm-GFP wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen behandelt, anschließend auf einem 0,7%igen Agarose-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die korrespondierenden Banden wurden im UV-Licht visualisiert. Es werden die Restriktionsmuster eines repräsentativen Experiments gezeigt.

#### 4.1.3 Klonierung des Expressionsvektors pEpProm-TRADD

Das klonierte Plasmid pEpProm-TRADD besteht aus dem *epcam*-Promotor mit *tradd*-Expressionsgen in dem pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz (siehe Abbildung 6). Die Klonierung des *tradd*-Gens unter der

---

Kontrolle des 1100 bp *epcam*-Promotors in pMEP4 soll die gezielte Apoptoseinduktion der EpCAM-positiven Tumorzellen herbeiführen. Das *myc-htradd* Wildtyp Fragment (1652 bp) wurde aus dem Vektor TP602 mit *SacII* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende) ausgeschnitten und in den Vektor pGL3-Basic-1100bpEpCAMprom kloniert. In diesem Fall wurde erst die funktionelle Einheit aus dem *epcam*-Promotor und Genfragment *tradd* im Vektor pGL3-Basic-1100bpEpCAMprom generiert, um dann in einem zweiten Schritt die Kassette von *epcam*-Promotor und *myc-htradd* Wildtyp Fragment mit *NheI* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende) in den Vektor pMEP4 einzufügen. Restriktion, Ligation, Transformation und Plasmidisolierung erfolgten analog der Beschreibung im Kapitel 4.1.1. In Tabelle 15 sind die berechneten Größen der DNA-Fragmente aus einem Restriktionsverdau von pEpProm-TRADD mit *SacII*, *EcoRV/HindIII* und *EcoRV/NheI* aufgeführt. Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 7 zu sehen: Neben dem Marker als Größenreferenz folgt der jeweilige Verdau mit den genannten Restriktionsenzymen. Da die berechneten Werte mit den Ergebnissen aus dem Experiment übereinstimmen, ist das klonierte Plasmid pEpProm-TRADD durch den Restriktionsverdau mit *SacII*, *EcoRV/HindIII* und *EcoRV/NheI* verifiziert. Des Weiteren wurde pEpProm-TRADD mittels DNA-Sequenzierung überprüft.



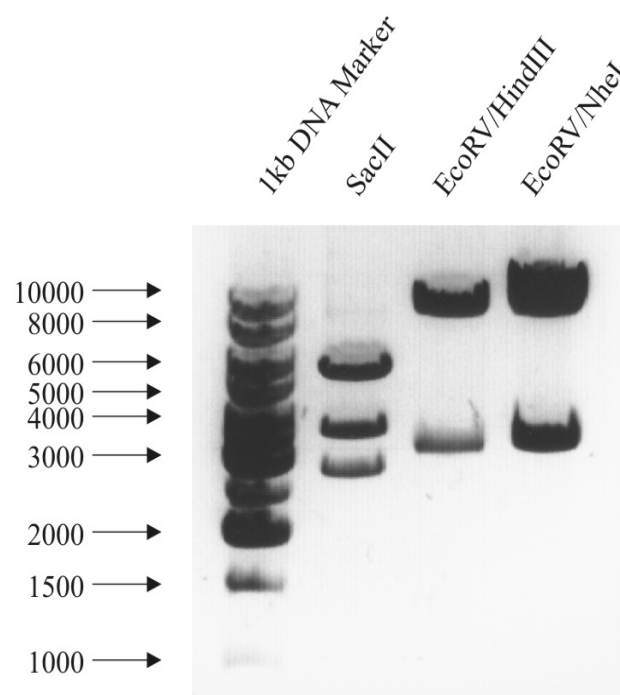
**Abbildung 6: Schema pEpProm-TRADD**

Der Expressionsvektor *pEpProm-TRADD* besteht aus dem *epcam*-Promotor mit Genfragment *tradd* im *pHEBo*-Vektor *pMEP4* mit *EBNA1*, *Hygromycin*- und *Ampicillin*-Resistenz. Schematische Darstellung des klonierten Plasmids *pEpProm-TRADD* inklusive der verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *SacII*, *EcoRV/HindIII* und *EcoRV/NheI*.

pEpProm-TRADD	Größe des Fragments	Enzyme	Von : Bis
Verdau mit <i>SacII</i>	5681	<i>SacII</i>	3867 : 9547
	3645	<i>SacII</i>	9548 : 1006
	2860	<i>SacII</i>	1007 : 3866
Verdau mit <i>EcoRV/HindIII</i>	8921	<i>HindIII</i>	2659 : 11579
	3265	<i>EcoRV</i>	11580 : 2658
Verdau mit <i>EcoRV/NheI</i>	8915	<i>NheI</i>	2665 : 11579
	3271	<i>EcoRV</i>	11580 : 2664

**Tabelle 15: Restriktionsverdau pEpProm-TRADD**

In Tabelle 15 sind die berechneten Größen der DNA-Fragmente gelistet, die ein Restriktionsverdau von pEpProm-TRADD mit den Enzymen *SacII*, *EcoRV/HindIII* und *EcoRV/NheI* ergibt. Es werden die verwendeten Enzyme für den jeweiligen Ansatz (erste Spalte), die Fragmentgröße (zweite Spalte), das Restriktionsenzym (Spalte drei) und die genaue Position der Schnittstelle auf dem Plasmid pEpProm-TRADD (Spalte vier) gezeigt.



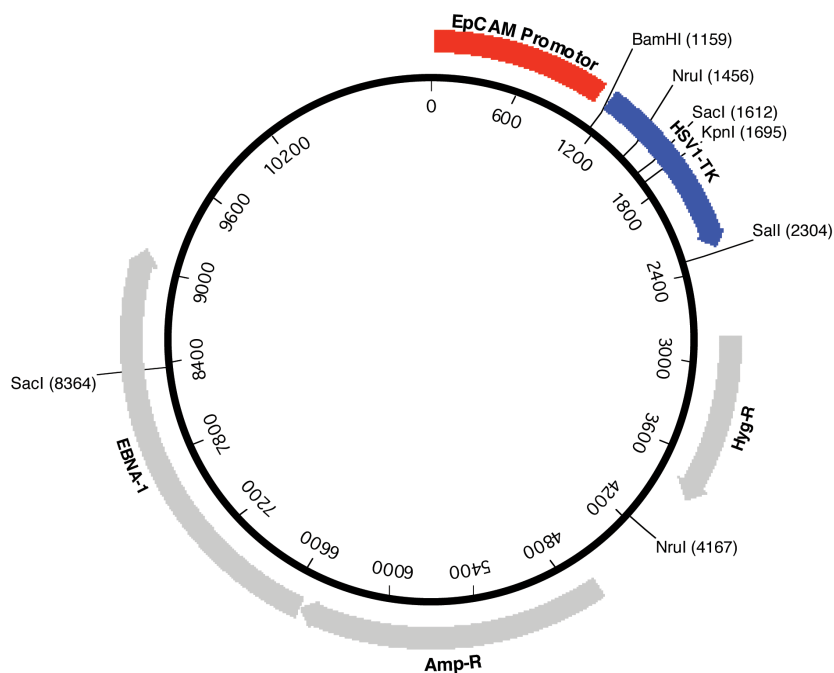
**Abbildung 7: Restriktionsverdau pEpProm-TRADD**

Das Plasmid pEpProm-TRADD wurde mit den Restriktionsenzymen *SacII*, *EcoRV/HindIII* und *EcoRV/NheI* behandelt und anschließend auf einem 0,7%igen Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Anfärbung mit Ethidiumbromid konnten die korrespondierenden Banden im UV-Licht visualisiert werden. Gezeigt sind die Restriktionsmuster eines repräsentativen Experiments.



#### 4.1.4 Klonierung des pEpProm-HSV1-TK zur Expression der HSV1-TK

Das klonierte Plasmid pEpProm-HSV1-TK besteht aus dem *epcam*-Promotor und dem *hsv1-tk* Gen in dem pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz (siehe Abbildung 8). Mit Hilfe der regulierten Expression der HSV1-TK durch den *epcam*-Promotor in EpCAM-positiven Zellen, werden die mit pEpProm-HSV1-TK transfizierten Zellen für Ganciclovir sensitiv und sterben unter Gabe des Medikaments ab. Das *hsv1-tk*-Fragment (1145 bp) wurde mit BamHI (5´-Ende) und SalI (3´-Ende) aus dem Vektor pGex-6P-2-HSV1-TK ausgeschnitten und in pEpProm-Kontrolle kloniert. Das Klonierungsschema entspricht der Generierung von pEpProm-GFP (siehe Kapitel 4.1.2). Das klonierte Plasmid pEpProm-HSV1-TK wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI, SacI, BamH/SalI und NruI verdaut und anhand des Restriktionsmusters verifiziert: Tabelle 16 listet die errechneten Fragmentgrößen auf, die ein Restriktionsverdau von pEpProm-HSV1-TK mit den genannten Enzymen ergibt. In Abbildung 9 sieht man einen Marker, eine Kontrolle und vier verschiedene Ansätze des Restriktionsverdaus von pEpProm-HSV1-TK auf Agarose-Gel aufgetragen. Anhand der Markerlinie kann die Größe der DNA-Fragmente jedes Restriktionsverdaus bestimmt und mit der errechneten Größe aus Tabelle 16 verglichen werden. Wie der Restriktionsverdau von pEpProm-HSV1-TK in Abbildung 9 zeigt, stimmen die errechneten Größen mit den korrespondierenden Banden in allen vier Ansätzen überein. Zur weiteren Kontrolle folgte eine anschließende DNA-Sequenzierung des Plasmids pEpProm-HSV1-TK.



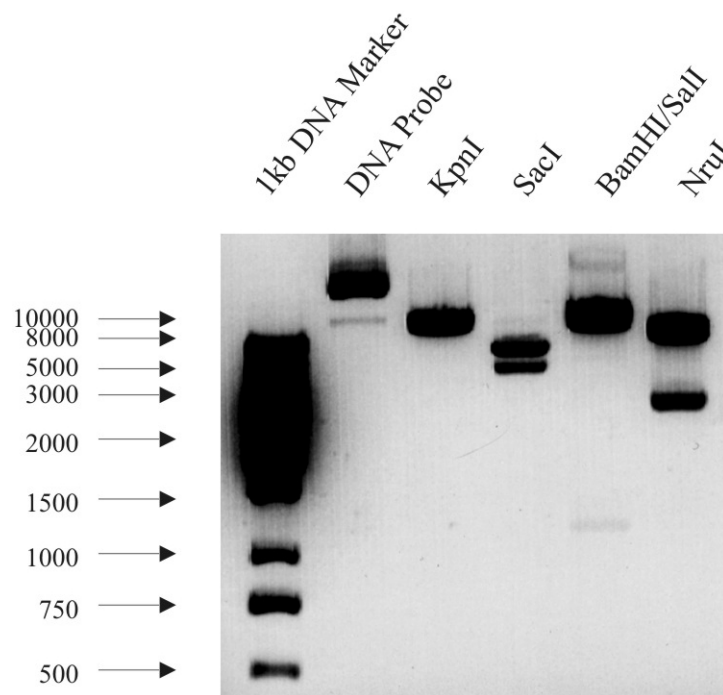
**Abbildung 8: Schema pEpProm-HSV1-TK**

Schematische Darstellung des klonierten Plasmids pEpProm-HSV1-TK besteht aus dem *epcam*-Promotor mit Genfragment *hsv1-tk* im pHEBo-Vektor pMEP4 mit EBNA1, Hygromycin- und Ampicillin-Resistenz inklusive der verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme KpnI, SacI, BamH/SalI und NruI.

pEpProm-HSV1-TK	Größe des Fragments	Enzyme	Von : Bis
Verdau mit KpnI	11398	KpnI	1696 : 1695
Verdau mit SacI	6752	SacI	1613 : 8364
	4646	SacI	8365 : 1612
Verdau mit BamHI/SalI	10253	SalI	2305 : 1159
	1145	BamHI	1160 : 2304
Verdau mit NruI	8687	NruI	4168 : 1456
	2711	NruI	1457 : 4167

**Tabelle 16: Restriktionsverdau pEpProm-HSV1-TK**

In Tabelle 16 sind die berechneten Größen der DNA-Fragmente gelistet, die ein Restriktionsverdau von pEpProm-HSV1-TK mit den Enzymen KpnI, SacI, BamHI/SalI und NruI ergibt. In der ersten Spalte werden die verwendeten Enzyme für den jeweiligen Ansatz genannt. In der zweiten Spalte ist die Größe des Fragments zu sehen, das durch das spezifische Enzym aus Spalte drei generiert wird. In Spalte vier wird die genaue Position der Schnittstelle auf dem Plasmid pEpProm-HSV1-TK gezeigt.



**Abbildung 9: Restriktionsverdau pEpProm-HSV1-TK**

Das Plasmid pEpProm-HSV1-TK wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI, SacI, BamHI/SalI und NruI behandelt und anschließend auf einem 0,7%igen Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Anfärbung mit Ethidiumbromid konnten die korrespondierenden Banden im UV-Licht visualisiert werden. Es werden die Restriktionsmuster eines repräsentativen Experiments gezeigt.

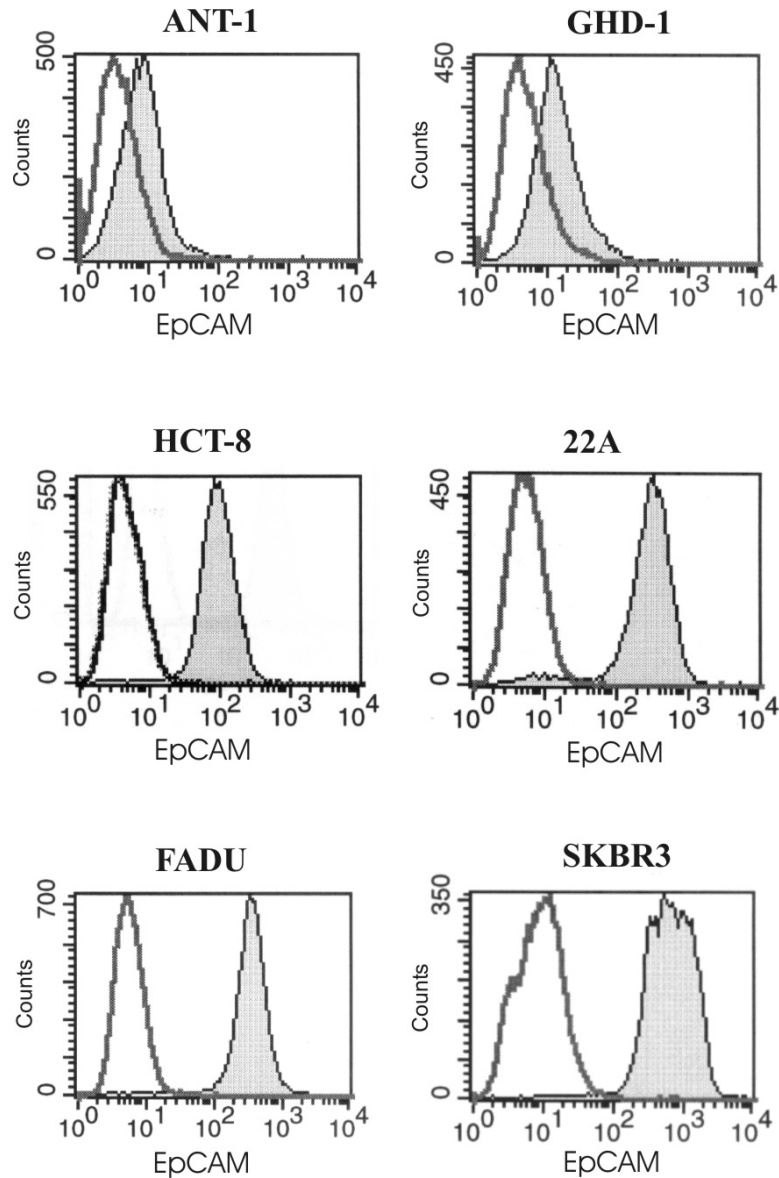
---

## 4.2 Etablierung eines zellulären Modellsystems zur Analyse der *epcam*-Promotor regulierten Genexpression

Um die *epcam*-Promotor regulierten Genexpression in einem Zellsystem zu untersuchen, ist es unabdingbar, zunächst die EpCAM-Expression der einzelnen Zelllinien zu bestimmen.

### 4.2.1 Charakterisierung der EpCAM-Expression in Zelllinien

Die Oberflächenexpression von EpCAM wurde in verschiedenen Zelllinien mit dem EpCAM-spezifischen Antikörpern C215 im Durchflusszytometer (Fluorescence activated cell sorter, FACS) untersucht. Dabei wurden folgende Zelllinien eingesetzt: HEK293, HEK293-EBNA1, ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3. HEK293 und HEK293-EBNA1 werden im folgenden Kapitel 4.2.2 gesondert behandelt. Die Herkunft der Zelllinien ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3 ist in Tabelle 17 beschrieben. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit dem EpCAM-spezifischen Antikörper C215 inkubiert und anschließend mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Messung der FITC-Fluoreszenz erfolgte im Durchflusszytometer FACSCalibur. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung der EpCAM-Oberflächenexpression zeigt Abbildung 10.



**Abbildung 10: FACS-Analyse der EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien**

**ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3**

*Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit dem EpCAM-spezifischen Antikörper C215 inkubiert und anschließend mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Messung der FITC-Fluoreszenz erfolgte im Durchflusszytometer FACSCalibur. Die Kontrolle wurde im Histogramm als durchgezogene Linie dargestellt, die Messwerte sind als graue Fläche unterlegt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment von drei.*

Die untersuchten Zelllinien zeigen unterschiedliche EpCAM-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer (Abbildung 10): Bei ANT-1 und GHD-1 Zellen konnte eine geringe, bei HCT-8 Zellen eine mässige EpCAM-Oberflächenexpression im Experiment nachgewiesen werden. Die Zelllinien 22A, FADU und SKBR3 wiesen eine starke EpCAM-Expression auf. Die EpCAM-Expression wird qualitativ mit Ø für fehlende, + für geringe, ++ für mässige und +++ für starke Expression bewertet und in Tabelle 17 gelistet. Als Grundlage für die Bewertung dienen die Ergebnisse aus Abbildung 10. Um die Vergleichbarkeit der EpCAM-Expression einzelner Zelllinien zu gewährleisten, wurde für jede Zelllinie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) als Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle berechnet. Eine Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien mit Stärke der EpCAM-Expression und zugehörigem MFI-Ratio bietet Tabelle 17.

Zelllinie	Ursprung	Stärke der EpCAM-Expression	MFI-Ratio
ANT-1	Zelllinie in unserem Labor etabliert aus Plattenepithelkarzinom	+	2,76 ± 0,4
GHD-1	Zelllinie in unserem Labor etabliert aus Plattenepithelkarzinom	+	3,30 ± 0,4
HCT-8	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie	++	25,72 ± 5,8
22A	Zelllinie in unserem Labor etabliert aus Plattenepithelkarzinom	+++	53,78 ± 13,3
FADU	Humane Zelllinie aus Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx	+++	66,92 ± 19,4
SKBR3	Humane Mammakarzinom-Zelllinie (ATCC)	+++	72,03 ± 7,7

**Tabelle 17: EpCAM-Oberflächenexpression der ANT-1, GHD-1, HCT-8, 22A, FADU und SKBR3 Zellen**

*Die EpCAM-Oberflächenexpression wird basierend auf den Ergebnissen von Abbildung 10 qualitativ mit Ø für fehlende, + für geringe, ++ für mässige und +++ für starke*

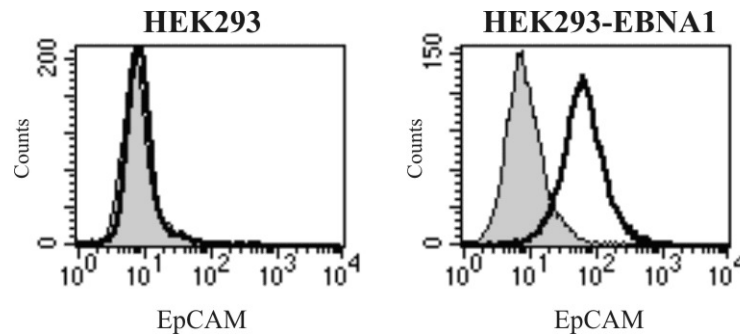
---

*Expression bewertet. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) wird als der Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle angegeben. Der MFI-Ratio mit Standardabweichung berechnet sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.*

Die variable EpCAM-Oberflächenexpression der einzelnen Zelllinien konnte mit dem MFI-Ratio gemessen werden: ANT-1 und GHD-1 sind im Labor etablierte Zelllinien, die von Plattenepithelkarzinomen abstammen und eine geringe EpCAM-Oberflächenexpression mit MFI-Ratio von  $2,76 \pm 0,4$  bzw.  $3,30 \pm 0,4$  zeigten. HCT-8 stammt von humanen Kolonkarzinomzellen ab. Im FACS wurde eine mässige EpCAM-Expression gemessen, die einem MFI-Ratio von  $25,72 \pm 5,8$  entspricht. Die Karzinomzelllinien 22A und FADU aus Plattenepithelkarzinomen und SKBR3 aus Mammakarzinom wiesen eine starke EpCAM-Oberflächenexpression auf. Der MFI-Ratio von 22A beträgt  $53,78 \pm 13,3$ , von FADU  $66,92 \pm 19,4$  und von SKBR3  $72,03 \pm 7,7$ . Damit ist SKBR3 die Zelllinie, die die deutlichste EpCAM-Expression aufwies.

#### **4.2.2 HEK293 und HEK293-EBNA1 als zelluläres Modellsystem**

Wie in Kapitel 4.2.1 erwähnt, werden die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 und HEK293-EBNA1 gesondert analysiert. HEK293-EBNA1 ist eine Variante der HEK293-Linie, die mit dem Expressionsplasmid für das Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) stabil transfiziert wurde. Die Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 wurden bezüglich der EpCAM-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer untersucht.



**Abbildung 11: FACS-Analyse der EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1**

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit EpCAM-spezifischen Antikörper C215 inkubiert, dann mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Messung der FITC-Fluoreszenz erfolgte im Durchflusszytometer FACSCalibur. Die Messwerte sind im Histogramm als durchgezogene Linie dargestellt, die Kontrollen sind mit grauer Fläche unterlegt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment von drei.

Wie in der Gegenüberstellung von Abbildung 11 zu sehen ist, exprimiert die Zelllinie HEK293 kein EpCAM, während bei HEK293-EBNA1 hingegen eine mässige Expression von EpCAM an der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Um die EpCAM-Expression in Zahlen zu fassen, wurde die entsprechende EpCAM-Oberflächenexpression der durchflusszytometrischen Messung als Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) berechnet. Dazu wird der Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle bestimmt. In Tabelle 17 sind der Ursprung und die charakteristische EpCAM-Expression beider Zelllinien aufgeführt.



Zelllinie	Ursprung	Stärke der EpCAM Expression	MFI-Ratio
HEK293	Humane embryonale Niere	∅	1,05 ± 0
HEK293-EBNA1	HEK293 stabil transfiziert mit einem EBNA1 Expressionsplasmid	++	6,4 ± 1,7

**Tabelle 18: EpCAM-Oberflächenexpression der HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen**

*Die EpCAM-Oberflächenexpression wird basierend auf den Ergebnissen von Abbildung 11 qualitativ mit ∅ für fehlende, + für geringe, ++ für mässige und +++ für starke Expression bewertet. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) wird als Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle angegeben. Der MFI-Ratio mit Standardabweichung berechnet sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.*

HEK293 sind benigne Zellen der humanen embryonalen Niere ohne EpCAM-Oberflächenexpression und einem MFI-Ratio von  $1,05 \pm 0$ . Zellen der Variante HEK293-EBNA1 bilden EpCAM mit MFI-Ratio von  $6,4 \pm 1,7$  in einem Umfang, der mit Tumorzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren vergleichbar ist, z.B. die Zelllinie GHD-1 mit MFI-Ratio von  $3,30 \pm 0,4$  (siehe Tabelle 17). Die molekulare Grundlage für die aufgetretene EpCAM-Expression der HEK293-EBNA1 ist unbekannt.

In einem zellulären Modellsystem für die experimentelle Untersuchung der *epcam*-Promotor regulierten Genexpression sollten die Zellen möglichst ähnliche Eigenschaften aufweisen und idealerweise über den gleichen genetischen Hintergrund verfügen, sich jedoch in der EpCAM-Expression deutlich unterscheiden. Mit Hilfe der angeführten durchflusszytometrischen Analyse (FACS) konnte in Abbildung 11 gezeigt werden, dass die humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 und eine stabil transfizierte Variante HEK293-EBNA1 diesen Anforderungen gerecht werden.

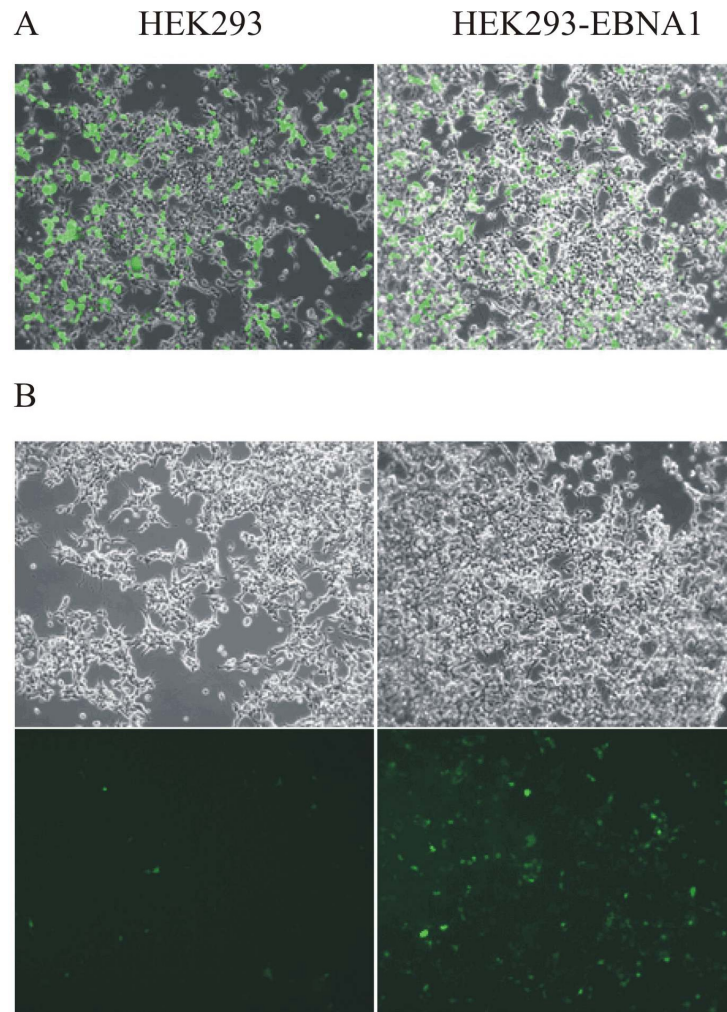
## 4.3 *Epcam*-Promotor vermittelte GFP-Expression in

### EpCAM-positiven Zellen

Anhand des zellulären Systems der EpCAM-negativen HEK293 und der EpCAM-positiven HEK293-EBNA1 wurde die *epcam*-Promotor induzierte GFP-Expression analysiert. Dabei sollte ein Modellsystem etabliert werden, das als Grundlage zur Untersuchung der *epcam*-Promotor abhängigen Genexpression in EpCAM-positiven Zellen dient.

#### 4.3.1 Transiente Transfektion von pEpProm-GFP

Um die *epcam*-Promotor abhängige GFP-Expression zu untersuchen, wurden die Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 ( $5 \times 10^5$  Zellen) mit je  $1 \mu\text{g}$  pEpProm-GFP transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Metafectene<sup>TM</sup>. Dabei wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe des *gfp*-Expressionsplasmids pEGFP-C1 ( $1 \mu\text{g}$ ) in jedem Experiment überprüft. Als Negativkontrolle wurden die Zellen HEK293 und HEK293-EBNA1 mit dem Leervektor pEpProm-Kontrolle transfiziert. Nach 24 h wurde die GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. In Abbildung 12A ist die Transfektionskontrolle mit pEGFP-C1 in Überlagerung von Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme zu sehen. Abbildung 12B zeigt Aufnahmen der Transfektionsexperimente von  $1 \mu\text{g}$  pEpProm-GFP als Fluoreszenzaufnahmen mit und ohne Überlagerung von Durchlichtaufnahmen.



**Abbildung 12: Ermittlung der GFP-Expression der HEK293 und HEK293-EBNA1**

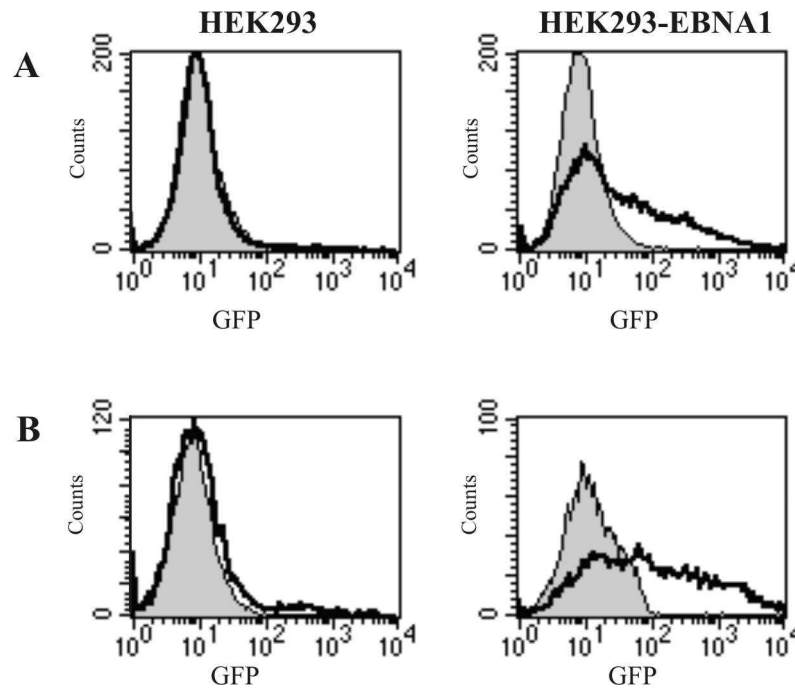
**Zellen im Fluoreszenzmikroskop**

A) Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen HEK293 und HEK293-EBNA1 ( $5 \times 10^5$  Zellen) mit  $1 \mu\text{g}$  pEGFP-C1 transient transfiziert und die GFP-Fluoreszenz nach 24 h beurteilt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen dreier unabhängiger Experimente, die durch Überlagerung von Durchlicht- und GFP-Fluoreszenzphotografien erzeugt wurden. B) pEpProm-GFP ( $1 \mu\text{g}$ ) wurde transient in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen ( $5 \times 10^5$ ) transfiziert. Nach 24 h wurde die GFP-Fluoreszenz beurteilt. Repräsentative Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente sind in den Abbildungen gezeigt (oben: Fluoreszenzphotografien mit Überlagerung von Durchlichtaufnahmen, unten: Fluoreszenzaufnahmen).

Die Beurteilung der GFP-Fluoreszenz 24 h Stunden nach transienter Transfektion mit pEpProm-GFP zeigte eine sporadische und nur auf wenige Zellen begrenzte GFP-Expression in HEK293 Zellen (siehe Abbildung 12B). Hingegen in HEK293-EBNA1 Zellen, die mit pEpProm-GFP transient transfiziert wurden, war stets eine deutliche GFP-Expression in Abbildung 12B festzustellen. Die Transfektionseffizienzen in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen waren vergleichbar, wie in Abbildung 12A über transiente Transfektionen des Vektors pEGFP-C1 mit GFP-Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors ersichtlich ist. In den Transfektanten mit dem Leervektor pEpProm-Kontrolle wurde erwartungsgemäß in keiner der beiden Zelllinien eine GFP-Expression erreicht (Daten sind nicht aufgeführt).

#### **4.3.2 Analyse der GFP-Expression in pEpProm-GFP transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunoblot**

Im vorherigen Kapitel wurde die *epcam*-Promotor abhängige Expression von GFP im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen erfolgte nach transienter Transfektion in der Durchflusszytometrie. Dazu wurden 1 µg pEpProm-GFP als Probe und 1 µg pEpProm-Kontrolle als Negativkontrolle in je  $5 \times 10^5$  Zellen HEK293 und HEK293-EBNA1 transient transfiziert. Die behandelten Zellen wurden nach 24 h bzw. 48 h geerntet, in FACS-Puffer aufgenommen und direkt im FACScalibur Durchflusszytometer (FL-1 Kanal) analysiert.



**Abbildung 13: FACS-Analyse der GFP-Expression der transient transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen**

Die GFP-Fluoreszenz der Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 wurde im Durchflusszytometer bestimmt (Kontrolle: graue Flächen, Probe: durchgezogene Linien). Nach der transienten Transfektion von HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen mit  $1\mu\text{g}$  pEpProm-GFP wurde die GFP-Fluoreszenz nach 24h (Abbildung A) und nach 48h (Abbildung B) gemessen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

HEK293 Zellen, die transient mit pEpProm-GFP transfiziert wurden, zeigten eine minimale Fluoreszenzintensität nach 24 h und nach 48 h (siehe Abbildung 13). Bei den analog behandelten HEK293-EBNA1 Zellen konnte im Gegensatz eine deutliche Fluoreszenzintensität nach 24 h gemessen werden, die nach 48 h weiter zunahm (siehe Abbildung 13). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten stimmten mit den Resultaten überein, die bei der Beurteilung der GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop erlangt wurden (siehe Abbildung 12). Um den Zusammenhang zwischen EpCAM- und

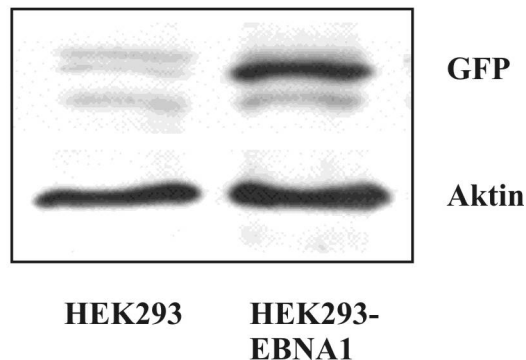
GFP-Expression zu veranschaulichen, wurden die durchflusszytometrischen Messungen der EpCAM-Oberflächenexpression und GFP-Fluoreszenz als Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) berechnet. Dazu wird der Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle sowie pEpProm-GFP und pEpProm-Kontrolle errechnet (siehe Tabelle 19). In den Zellen HEK293-EBNA1 war die GFP-Fluoreszenz bereits 24 h nach Transfektion schon stark und nahm 48 h nach Transfektion nochmals zu (MFI-Ratio  $9,8 \pm 5$  und  $20 \pm 5,4$ ). Außerdem bewegte sich die GFP-Fluoreszenz in HEK293-EBNA1 Zellen in derselben Größenordnung wie die zugehörige EpCAM-Expression (MFI-Ratio  $6,4 \pm 1,7$ ). In den Zellen HEK293 war 24 h nach Transfektion mit pEpProm-GFP noch keine messbare Fluoreszenzveränderung zu bemerken (MFI-Ratio  $1,1 \pm 0,2$ ), 48 h nach Transfektion wurde eine schwache Fluoreszenzzunahme festgestellt (MFI-Ratio  $1,78 \pm 0,03$ ). HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen, die mit pEpProm-Kontrolle transient transfiziert wurden, zeigten zu beiden Messzeitpunkten keine GFP-Fluoreszenz.

	EpCAM	GFP (24 h)	GFP (48 h)
HEK293	$1,05 \pm 0$	$1,1 \pm 0,2$	$1,78 \pm 0,03$
HEK293-EBNA1	$6,4 \pm 1,7$	$9,8 \pm 5$	$20 \pm 5,4$

**Tabelle 19: Vergleich von EpCAM-Oberflächenexpression und GFP-Fluoreszenz der HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen**

*Die durchschnittliche Intensität der GFP-Fluoreszenz wird als Verhältnis (mean fluorescence intensity ratio, MFI-Ratio) der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen berechnet. Dazu wird der Quotient aus EpCAM-spezifischer Fluoreszenz und Isotypenkontrolle sowie pEpProm-GFP und pEpProm-Kontrolle bestimmt. Es wurden die durchschnittlichen MFI-Ratios mit Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten zu den angegebene Zeitpunkten ausgewertet.*

Die GFP-Proteinexpression wurde 48 h nach der Transfektion von 1 µg pEpProm-GFP als Probe und 1 µg *gfp*-Expressionsplasmid pEGFP-C1 in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen mittels Western Blot bestätigt. Zu jedem Experiment wurde analog eine Kontrolle mit Aktin im Immunoblot erstellt.



**Abbildung 14: GFP-Expression von transient transfizierten HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen im Immunoblot**

*48 h nach Transfektion von pEpProm-GFP in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen wurde die Expression des GFP-Proteins im Immunoblot nachgewiesen. Aktin diente als Kontrolle über eine gleichverteilte Proteinbeladung der einzelnen Bahnen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.*

In HEK293-EBNA1 Zellen, die mit pEpProm-GFP transient transfiziert wurden, konnte die Bildung von GFP-Protein nach 48 h mittels Western Blot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). In analog behandelten HEK293 Zellen konnten nur Spuren einer GFP-Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). Der Immunoblot mit Aktin belegt, dass gleiche Mengen an Protein eingesetzt wurden. Da das GFP-Protein in EpCAM-positiven HEK293-EBNA1 Zellen im Immunoblot zu detektieren und in EpCAM-negativen HEK293 Zellen kaum erkennbar war, besteht ein Zusammenhang zwischen der *epcam*-Promotor regulierten GFP-Expression und der EpCAM-Expression der eingesetzten Zelllinien.

## 4.4 TRADD-Expression in transfizierten HEK293 und

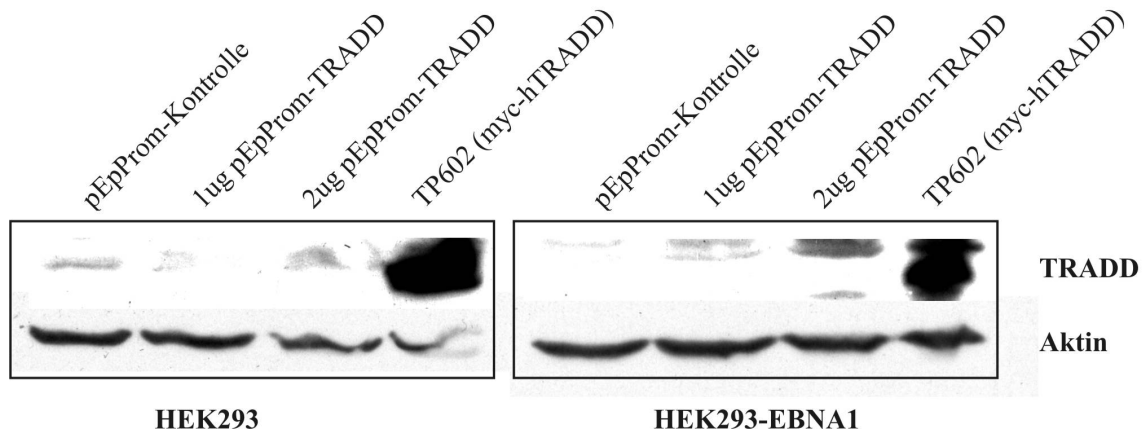
### HEK293-EBNA1 Zellen

Aus dem Expressionsmuster von EpCAM ist zu schließen, dass der *epcam*-Promotor in Plattenepithelkarzinomen selektiv aktiviert ist und in gesundem Plattenepithel nicht transkribiert wird. Das TNF receptor associated death domain (*tradd*) Gen wurde in den Vektor pMEP4 unter Kontrolle des *epcam*-Promotors kloniert, sodass die TRADD-Proteinbildung in EpCAM-positiven Tumorzellen durch den *epcam*-Promotor induziert wird. TRADD induziert Apoptose im Zellzyklus.

#### 4.4.1 Immunoblot

Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der Linien HEK293 und HEK293-EBNA1 mit  $1 \mu\text{g}$  und  $2 \mu\text{g}$  pEpProm-TRADD transfiziert. Als Negativkontrolle wurden  $1 \mu\text{g}$  pEpProm-Kontrolle und als Positivkontrolle  $1 \mu\text{g}$  des Plasmids TP602, das für myc-hTRADD Wildtyp kodiert, eingesetzt. Die Transfektion erfolgte mit Metafectene<sup>TM</sup>. Um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können, wurde  $1 \mu\text{g}$  des *gfp*-Expressionsplasmids pEGFP-C1 in jedem Ansatz kotransfiziert. Die transient transfizierten Zellen wurden nach 4 h, 12 h und 24 h lysiert und als Proteinlysate im Immunoblot aufgetrennt. In weiteren Versuchsreihen wurde den gleichen Ansätzen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium) kurz nach der Transfektion mit pEpProm-TRADD  $2 \mu\text{l}$  des Kaspaseinhibitors Z-VAD-FMK zugesetzt. Nach 48 h und 66 h erfolgte die Zellyse, um die Proteine im Immunoblot aufzutrennen.





**Abbildung 15: TRADD-Expression in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen**

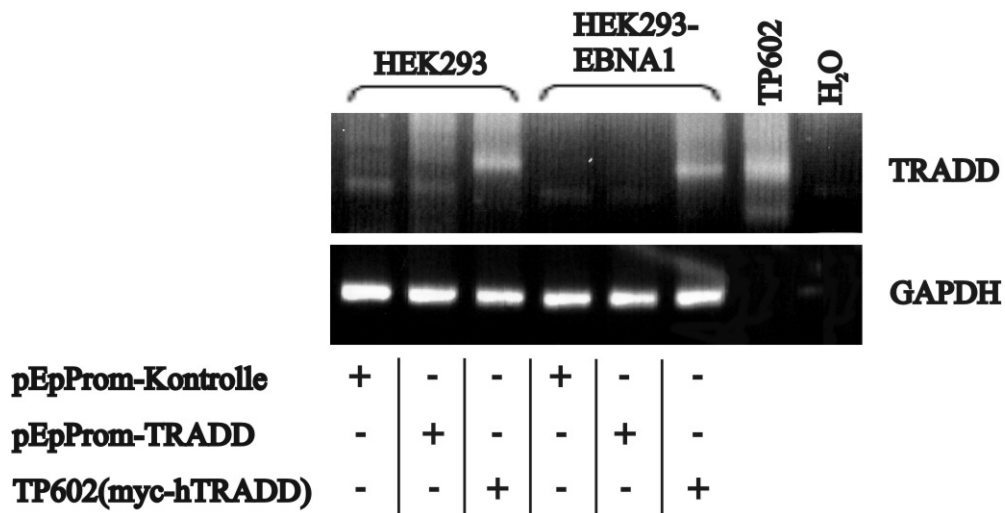
24 h nach Transfektion von 1 µg bzw. 2 µg pEpProm-TRADD in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen konnte die Expression des Proteins TRADD im Immunoblot nicht nachgewiesen werden. TRADD wurde von 1 µg TP602 Plasmid zu diesem Zeitpunkt stark exprimiert. Aktin diente als Kontrolle über eine gleichverteilte Proteinbeladung der einzelnen Bahnen. Es wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Wie im Immunoblot zu sehen ist, führte die transiente Transfektion von 1 µg bzw. 2 µg pEpProm-TRADD in HEK293 und HEK293-EBNA1 Zellen zu keiner nachweisbaren TRADD-Proteinbildung nach 24 h (siehe Abbildung 15). Die Positivkontrolle von 1 µg TP602 wurde zum entsprechenden Zeitpunkt stark exprimiert (siehe Abbildung 15). Die gleichen Ergebnisse zeigten sich auch 4 h und 12 h nach Transfektion (Daten sind nicht aufgeführt). Der Versuch, eine eintretende Apoptose mittels Kaspaseinhibitor Z-VAD-FMK zu hemmen, um TRADD besser nachweisen zu können, führte weder nach 48 h noch nach 66 h zu TRADD-Proteinnachweis im Immunoblot (Daten sind nicht aufgeführt). Nach Transfektion von TP602 mit *myc-htradd* Wildtyp wurde in den

beschriebenen Fällen stets TRADD im Immunoblot detektiert. Die verwendete Negativkontrolle mit pEpProm-Kontrolle zeigte erwartungsgemäß keine TRADD-Proteinbildung im Immunoblot.

#### 4.4.2 *Tradd*-mRNA-Expression mittels RT-PCR

Im Folgenden wurde die Expression der *tradd* mRNA-Bildung nach transienter Transfektion von  $1 \times 10^5$  Zellen HEK293 und HEK293-EBNA1 mit dem Funktionsplasmid 2  $\mu\text{g}$  pEpProm-TRADD, der Negativkontrolle 2  $\mu\text{g}$  pEpProm-Kontrolle und 2  $\mu\text{g}$  TP602 mit *myc-htradd* Wildtyp als Positivkontrolle untersucht. Die behandelten Zellen wurden nach 18 h lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration im Photometer erfolgte die cDNA-Synthese. Auf der Grundlage des Plasmids pEpProm-TRADD wurden Primeroligonukleotide generiert, um die spezifische Amplifikation der *tradd*-Sequenz mit Hilfe der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zu erreichen.



**Abbildung 16: RT-PCR der *tradd* mRNA-Expression**

Die transiente Transfektion von pEpProm-TRADD in den Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 lässt nach 18 h Stunden keine Expression von *tradd*-mRNA erkennen.

---

Zellen, die analog mit pEpProm-Kontrolle und TP602 mit myc-htradd Wildtyp transfiziert wurden, dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GAPDH wurde als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge verwendet. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Weder in der Zelllinie HEK293 noch in HEK293-EBNA1 ist eine Expression von *tradd-mRNA* 18 h nach Transfektion mit pEpProm-TRADD nachzuweisen (siehe Abbildung 16). Die transiente Transfektion des Plasmids TP602 führte zu nachweisbarer Bildung von *tradd-mRNA* in den untersuchten Zelllinien (siehe Abbildung 16). Es konnte erwartungsgemäß keine Expression von *tradd-mRNA* in Transfektanten der pEpProm-Kontrolle gemessen werden (siehe Abbildung 16). In den Versuchen wurden gleiche Mengen an cDNA eingesetzt, wie die Kontrollen mit GAPDH belegen. Da einer fehlenden Expression von *tradd-mRNA* in den pEpProm-TRADD transfizierten Zellen keine TRADD-Proteinbildung folgen kann, untermauert das Ergebnis der RT-PCR die Resultate der Immunoblots aus Kapitel 4.4.1.

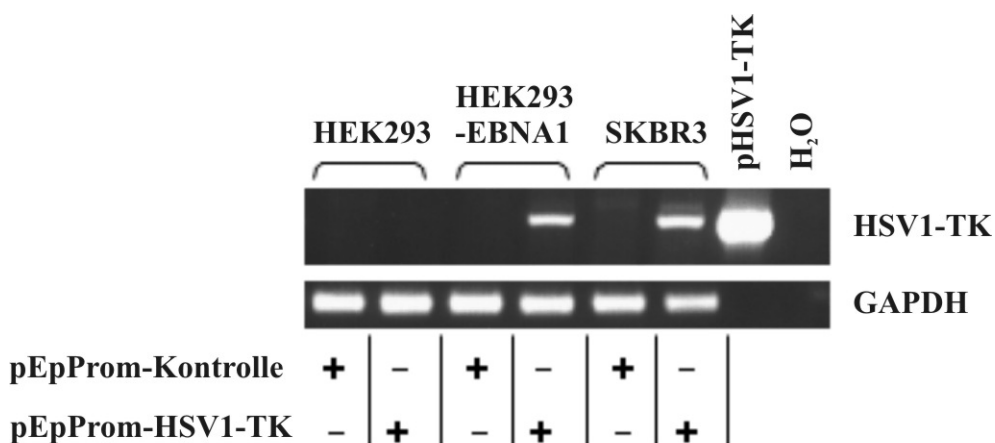
## **4.5 Transfektion von pEpProm-HSV1-TK vermittelt eine Ganciclovirsensitivität in EpCAM-positiven Zellen**

Das Gen für Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK) ist ein Suizidgen, dessen Expression den Zelltod der befallenen Zelle verursacht. Der Mechanismus wird unter Gabe des Virostatikums Ganciclovir ausgelöst. Das Gen für HSV1-TK wurde in das Plasmid pEpProm-HSV1-TK kloniert, sodass es der Kontrolle des *epcam*-Promotors unterliegt. Dadurch wird eine regulierte Expression der HSV1-TK in Abhängigkeit des *epcam*-Promotors in EpCAM-positiven Zellen angestrebt. Zellen, die mit pEpProm-HSV1-TK stabil transfiziert werden, sollen auf ihre Sensitivität für Ganciclovir getestet werden. In den Versuchsreihen wurde neben dem zellulären Modellsystem von

HEK293 und HEK293-EBNA1 die EpCAM-positive Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3 untersucht.

#### 4.5.1 Überprüfung der stabilen pEpProm-HSV1-TK Transfektanten mittels RT-PCR

Zunächst wurde die Expression der mRNA für die HSV1-TK in den EpCAM-positiven Zellen untersucht. Die Zelllinien HEK293, HEK293-EBNA1 und SKBR3 wurden mit je 1 µg pEpProm-HSV1-TK und pEpProm-Kontrolle unter Verwendung von Metafectene™ transfiziert und anschließend einer Selektion mit hygromycinhaltigem Medium unterzogen. Dadurch wurden stabil transfizierte Zelllinien selektiert: HEK293-pEpProm-Kontrolle und HEK293-pEpProm-HSV1-TK, HEK293-EBNA1-pEpProm-Kontrolle und HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK sowie SKBR3-pEpProm-Kontrolle und SKBR3-pEpProm-HSV1-TK. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen der stabilen Transfektanten wurden lysiert, die Gesamt-RNA aus den Zelllinien isoliert die Expression der *hsv1-tk* mRNA mittels Reverser Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt.



**Abbildung 17: RT-PCR der *hsv1-tk* mRNA in EpCAM-positiven Zelllinien**

Stabile Transfektanten von pEpProm-HSV1-TK in HEK293, HEK293-EBNA1 und SKBR3 Zellen wurden auf die Expression von *hsv1-tk* mRNA in der RT-PCR untersucht. GAPDH diente als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge. Das Plasmid pGex-6P-2-HSV1-TK

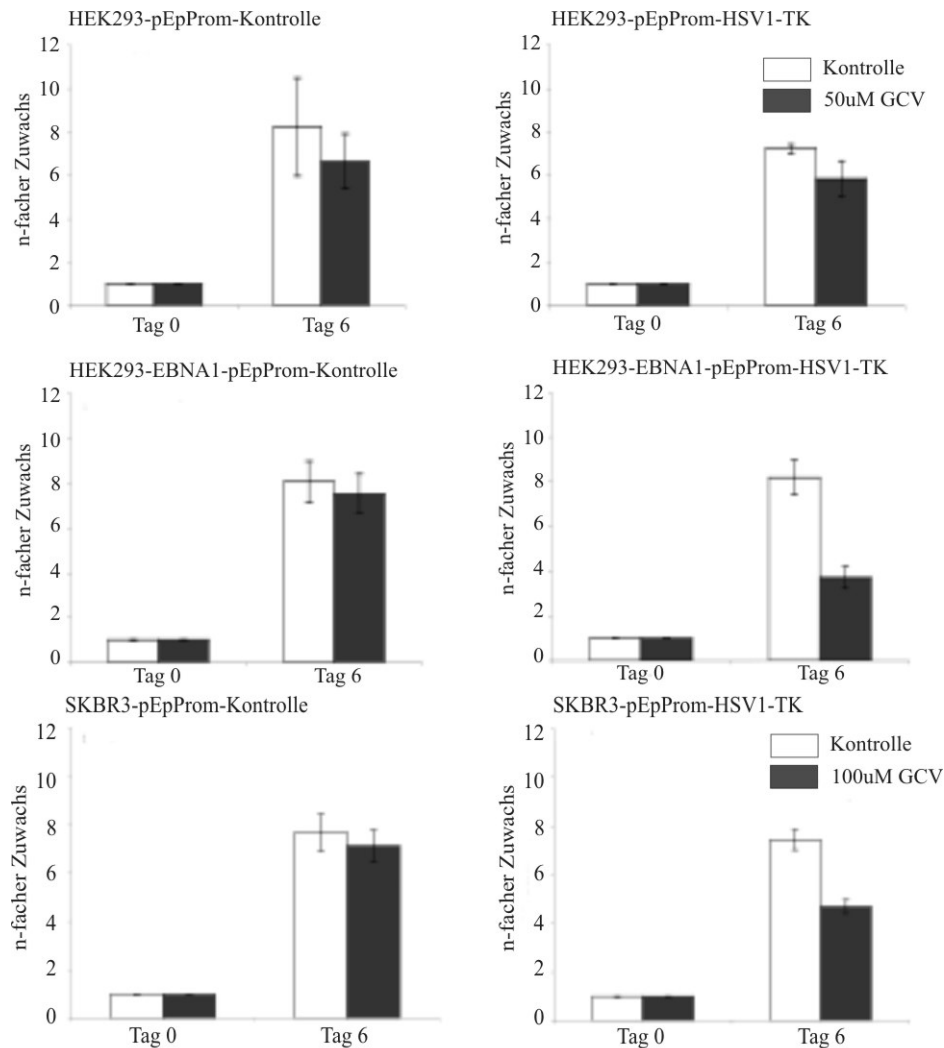
---

*fungierte als Positivkontrolle, Aqua dest. wurde als Negativkontrolle verwendet. Es werden die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.*

Die stabile Transfektion des Plasmids pEpProm-HSV1-TK in HEK293, HEK293-EBNA1 und SKBR3 Zellen führte zu einer spezifischen Transkription von *hsv1-tk* mRNA in EpCAM-positiven Zellen. So wurde eine deutliche Expression von *hsv1-tk* mRNA in den Zelllinien HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK und SKBR3-pEpProm-HSV1-TK nachgewiesen (siehe Abbildung 17). In EpCAM-negativen HEK293 Zellen konnten nur Spuren von *hsv1-tk* mRNA bestimmt werden (siehe Abbildung 17). Die stabilen Transfektanten mit pEpProm-Kontrolle zeigten erwartungsgemäß in keiner Zelllinie eine Expression von *hsv1-tk* mRNA.

#### **4.5.2 Testung der Ganciclovirsensitivität stabiler HSV1-TK Transfektanten**

Die Sensitivität stabiler Transfektanten gegenüber Ganciclovir ist ein direktes Maß für die Funktionalität des *hsv1-tk* Genvektors. Die stabil transfizierten Zelllinien HEK293-pEpProm-Kontrolle und HEK293-pEpProm-HSV1-TK, HEK293-EBNA1-pEpProm-Kontrolle und HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK sowie SKBR3-pEpProm-Kontrolle und SKBR3-pEpProm-HSV1-TK wurden mit 50 µM bzw. 100 µM Ganciclovir-Lösung behandelt und ihre Vitalität in einem Standard-MTT-Ansatz bestimmt.



### Abbildung 18: Ganciclovirsensitivität von pEpProm-HSV1-TK transfizierten Zellen

Stabile Transfektanten mit pEpProm-Kontrolle und pEpProm-HSV1-TK in den Zelllinien HEK293 (obere Abbildung), HEK293-EBNA1 (mittlere Abbildung) und SKBR3 (untere Abbildung) wurden unter Zugabe der genannten Ganciclovir-Konzentrationen kultiviert. Die MTT-Konversion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen und als n-facher Zuwachs im Vergleich zu Tag Null dargestellt. Es werden durchschnittliche Induktionen mit Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente gezeigt, die jeweils in Triplets ausgeführt wurden.

In Abbildung 18 wird die Ganciclovirsensitivität der Zelllinien HEK293, HEK293-EBNA1 und SKBR3, die stabil mit pEpProm-Kontrolle transfiziert wurden, mit den stabilen

---

Transfektanten von pEpProm-HSV1-TK dergleichen Zelllinien verglichen. Die Ganciclovirsensitivität korrelierte mit der EpCAM-Expression und der *hsv1-tk* mRNA-Bildung. In den EpCAM-positiven HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK und SKBR3-pEpProm-HSV1-TK Zellen konnte die Transkription von *hsv1-tk* mRNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Entsprechend zeigten diese Zelllinien unter Ganciclovirgabe eine merklich reduzierte metabolische Aktivität, die Werte bis zu 45% (HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK) und 62% (SKBR3-pEpProm-HSV1-TK) der unbehandelten Kontrollen aufwies (siehe Abbildung 18). Bei HEK293-pEpProm-HSV1-TK blieb die metabolische Aktivität unter 50  $\mu$ M Ganciclovir-Behandlung über sechs Tage unverändert im Vergleich zu HEK293-pEpProm-Kontrolle (Abbildung 18). Damit konnte die *epcam*-Promotor kontrollierte Funktion des eingesetzten letalen Gens *hsv1-tk* in EpCAM-positiven Zellen unter Beweis gestellt werden.

## 5 Diskussion

Das tumorassoziierte Antigen EpCAM ist seit seiner Entdeckung in den 80er Jahren in vielen Aspekten für die Tumorforschung interessant geworden. Über Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen EpCAM hat das epitheliale Glykoprotein bereits den Einzug in die Klinik geschafft (Riethmüller et al., 1998; Liljefors et al., 2004). Mit Hilfe der Grundlagenforschung wurde die Bedeutung von EpCAM für die Tumorbilogie auf molekularer Ebene untersucht: Neben Erkenntnissen über die Hochregulierung diverser Zielgene, inklusive des Protoonkogens *c-myc* im Zellzyklus proliferierender Tumorzellen (Münz et al., 2004b), ist die direkte Korrelation der EpCAM-Expression mit Karzinogenese und Grad der Neoplasie hervorzuheben (Litvinov et al., 1996).

### 5.1 HEK293 und HEK293-EBNA1 als zelluläres Modellsystem

Die veränderte Regulation von Zellproliferation und Homöostase ist ein Merkmal der Tumorzellen (Hanahan et al., 2000). Dabei geht die gesteigerte Promotoraktivität des Tumorgens *epcam* mit einer erhöhten Transkription einher. Welche molekularen Mechanismen an der Reaktivierung des Promotors des *epcam*-Gens beteiligt sind, um die beobachtete *de novo* Expression in den Zellen hervorzurufen, sind weitgehend unbekannt. Eine DNA-Sequenzanalyse deckte ein 1100 bp umfassendes regulatorisches Element stromaufwärts des *epcam*-Gens auf. Untersuchungen ergaben, dass die Transkriptionsaktivität der 1100 bp DNA-Sequenz mit der EpCAM-Expression übereinstimmt (Gires et al., 2003, McLaughlin et al., 2004). Bisher konnten keine Induktoren des Promotors ausgemacht werden, jedoch wurde die verminderte Transkriptionsaktivität des 1100 bp DNA-Fragments durch NF- $\kappa$ B nachgewiesen (Gires et al., 2001; Gires et al., 2003).



Um Fragen über die *epcam*-Promotor abhängige Genexpression experimentell beantworten zu können, wurde ein zelluläres Modellsystem etabliert mit dem Ziel, *epcam*-Promotor vermittelte Effekte in Zellen gleichen genetischen Hintergrunds zu studieren (siehe Kapitel 4.2.2). Dabei wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse die EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 untersucht. Die Messungen ergaben, dass die Zelllinie HEK293 kein EpCAM exprimiert (MFI-Ratio  $1,05 \pm 0$ ), während bei HEK293-EBNA1 Zellen eine mässige EpCAM-Expression (MFI-Ratio  $6,4 \pm 1,7$ ) an der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte.

Die Promotoraktivität kann durch eine promotorabhängige GFP-Expression visualisiert werden (Chalfie et al., 1994). Das Markerprotein GFP leuchtet als grüner Fluoreszenzfarbstoff auf, wenn der Promotor aktiv ist und das Gen abgelesen wird. Das Plasmid pEpPRom-GFP, das für den *epcam*-Promotor mit funktionellem *gfp*-Gen kodiert, wurde in die Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 transfiziert. Nach 24 h korrelierte die GFP-Fluoreszenz mit der Menge an EpCAM, wie die Ergebnisse im Durchflusszytometer belegen: MFI-Ratio  $9,8 \pm 5$  (GFP) und  $6,4 \pm 1,7$  (EpCAM) in HEK293-EBNA1 Zellen. Die Messungen 48 h nach der Transfektion von pEpProm-GFP zeigten in den transient transfizierten HEK293-EBNA1 Zellen eine Akkumulation von GFP mit einer MFI-Ratio von  $20 \pm 5,4$  an (Kapitel 4.3.2). Da die GFP-Fluoreszenz mit der EpCAM-Oberflächenexpression korrelierte und die EpCAM-Oberflächenexpression als Maß für die endogene *epcam*-Promotoraktivität zu betrachten ist, diente die GFP-Fluoreszenz als indirekte Messung zur Bestimmung der endogenen EpCAM-Expression. Ausserdem kann der *epcam*-Promotor verwendet werden, um heterologe cDNAs in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression transkribieren zu lassen. Das Modellsystem der GFP-Expression unter der Kontrolle des *epcam*-Promotors in EpCAM-positiven Zellen ist somit stimmig und kann als Schema für weitere heterologe DNA-Inserts verwendet werden.

## 5.2 *Epcam*-Promotor Regulation und TRADD

Die transiente Transfektion von pEpProm-TRADD in EpCAM-negative HEK293 und EpCAM-positive HEK293-EBNA1 führte weder zur Transkription von *tradd*-mRNA (Kapitel 4.4.2), noch zur Translation des TRADD-Proteins in den transfizierten Zellen (Kapitel 4.4.1). Es ist davon auszugehen, dass das intakte Plasmid pEpProm-TRADD in die Zellen gelangte, weil

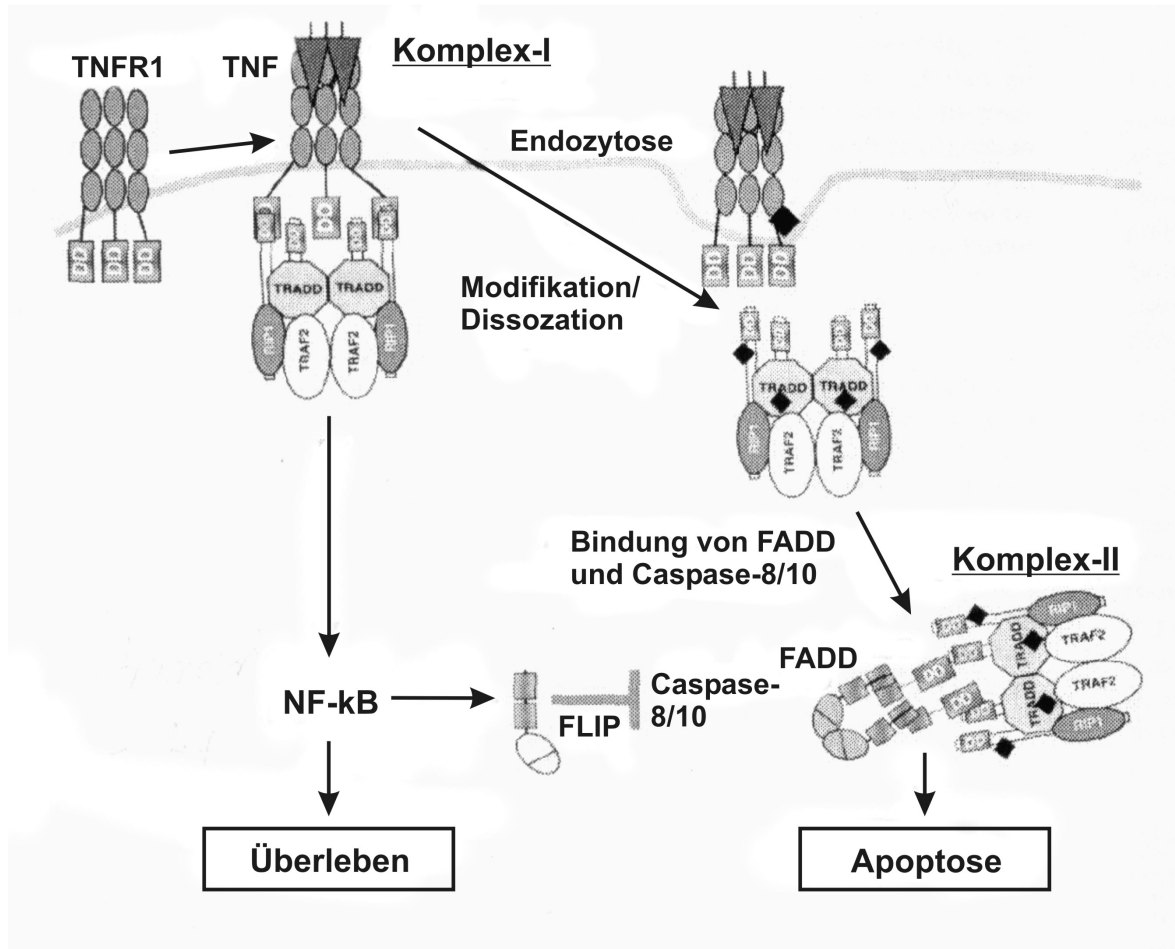
- das Plasmid pEpProm-TRADD durch Sequenzierung überprüft wurde,
- die Transfektion mit Metafectene<sup>TM</sup> analog dem Vorgehen mit pEpProm-GFP und pEpProm-HSV1-TK in den Zelllinien HEK293 und HEK293-EBNA1 durchgeführt wurde und die Genexpression in beiden Fällen nachgewiesen werden konnte,
- das Plasmid TP602, das für myc-hTRADD Wildtyp kodiert, als Positivkontrolle in den Nachweisverfahren positiv ausfiel und
- das *gfp*-Expressionsplasmid pEGFP-C1 als Transfektionskontrolle zu GFP-Fluoreszenz führte.

Die Transkription des Plasmids pEpProm-TRADD unterliegt der Kontrolle des *epcam*-Promotors. Über die Regulation des 1100 bp *epcam*-Promotors ist wenig bekannt: Aus den bisherigen Untersuchungen geht nicht hervor, wie der Promotor aktiviert und EpCAM *de novo* exprimiert wird. Eine Reduktion der Transkriptionsaktivität konnte durch Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) erreicht werden, die zu einer verminderten Bildung von *epcam*-mRNA und eine reduzierte EpCAM-Oberflächenexpression in Plattenepithelkarzinomen führte (Gires et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus ist die TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung von Nekrosefaktor kappa B (NF- $\kappa$ B), der mit Transkriptionsfaktoren um die Histonacetyltransferase p300/CBP konkurriert (Gires et al., 2001). Die NF- $\kappa$ B induzierte Repression des 1100 bp *epcam*-Promotors durch TNF $\alpha$  und Interferon alpha (IFN  $\alpha$ ) konnte in der EpCAM-positiven Tumorzelllinie SKBR3 belegt werden (Gires et al., 2003).

---

TRADD ist ein 34 kD Protein, das mit dem cytoplasmatischen Anteil des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1 (TNFR1) in Wechselwirkung tritt und folgende Signaltransduktionswege induziert: Einerseits Apoptose und andererseits die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, das zum Überleben der Zelle führt (siehe Abbildung 19). Es handelt sich dabei um zwei getrennte TNF-vermittelte Signaltransduktionswege, weil sich die Apoptoseinduktion durch das *crmA* Gen des Kuhpockenvirus inhibieren lässt, während die NF- $\kappa$ B Aktivierung dadurch unbeeinflusst bleibt (Hsu et al., 1995). Für die Apoptoseinduktion ist eine Domäne am TNFR1 nötig, die sogenannte death domain (DD), die auch TRADD und weitere Proteine tragen (Ashkenazi et al., 1998). Das Experiment mit dem Plasmid pEpProm-TRADD wurde unter der Annahme konzipiert, dass TRADD Apoptose induziert. Dazu bildet TRADD mit FADD (Fas-associated death domain protein) einen Komplex, der die Caspase-8 aktiviert und infolge die Apoptose einleitet (Hsu et al., 1996a).

TRADD ist in weitere Signalwege eingebunden und wird von verschiedenen Faktoren reguliert. Das receptor-interacting protein (RIB) bindet beispielsweise an TRADD. RIB wird die Induktion von NF- $\kappa$ B zugeschrieben, welches die Transkription von anti-apoptotischen Genen zur Folge hat (Hsu et al., 1996b). Es wird angenommen, dass NF- $\kappa$ B den Caspase-8 Inhibitor FLIP<sub>L</sub> induziert und damit den apoptoseinduzierenden TNF-Signalweg hemmt, sodass die Zelle überleben kann (Micheau et al., 2001). So findet ein Zusammenspiel von Faktoren, die den Zelltod auslösen, und Signalen, die das Überleben der Zelle fördern statt. Wie die Entscheidung für Zelltod oder Überleben der Zelle getroffen wird, ist noch weitgehend unbekannt.



**Abbildung 19: Modell der TNFR1-vermittelten Apoptose**

Das Zusammenspiel von TNF-induzierten Komplex-I und Komplex-II, die zur Apoptose führen (nach Micheau et al., 2003). Die durch TNF-vermittelte Apoptose geht in zwei Schritten vonstatten: Zunächst wird der plasmamembrangebundene Komplex-I aus TNFR1, TRADD, RIP und anderen Proteinen gebildet. Komplex-I aktiviert NF-κB. Komplex-II löst sich von TNFR1 und gliedert FADD und Procaspase-2 und Procaspase-8 an. Wenn Komplex-II im Zytoplasma vorliegt, wird Apoptose induziert. Die NF-κB Aktivierung durch Komplex-I kann auf den Signalweg des Komplex-II einwirken und durch FLIP<sub>L</sub>-Expression die Apoptose unterbinden (Micheau et al., 2003; Sheikh et al., 2003).

Wenn es nach Transfektion des Plasmids pEpProm-TRADD in den Zellen durch TRADD zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt, wird die *epcam*-Promotoraktivität reprimiert (Gires et al., 2001; Gires et al., 2003). Sobald der *epcam*-Promotor in seiner Funktion ausgeschaltet ist, kann das Plasmid pEpProm-TRADD nicht transkribiert und das Protein TRADD nicht gebildet werden: Es käme zu einer negativen Rückkopplung. Dieser Zusammenhang spricht für den fehlenden Nachweis von TRADD in pEpProm-TRADD transfizierten Zellen. In der Positivkontrolle mit dem für myc-hTRADD Wildtyp kodierenden Plasmid TP602 regelt der sehr starke virale *cmv*-Promotor die Expression von TRADD unabhängig vom *epcam*-Promotor. Nur in diesem Fall konnte TRADD gefunden werden. Da in den Experimenten mit pEpProm-TRADD und pEpProm-Kontrolle überhaupt kein TRADD nachzuweisen war, bleibt einzuwenden, dass TRADD in jeder Zelle unabhängig vom *epcam*-Promotor in sehr geringen Mengen endogen exprimiert wird und ebenso nicht nachzuweisen war: Die mRNA-Level von *tradd* werden auf weniger als 5 Moleküle pro Zelle geschätzt (Hsu et al., 1995), die unter Umständen für den Nachweis nicht ausreichen. Wie an den erläuterten Zusammenhängen ersichtlich, ist von einer TRADD- und infolge NF- $\kappa$ B induzierten Repression des 1100 bp *epcam*-Promotors auszugehen, die keine Transkription des Plasmids pEpProm-TRADD in EpCAM-positiven Zellen ermöglicht.

### **5.3 EpCAM-spezifische Expression von HSV1-TK als gentherapeutischer Ansatz**

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass das letale Gen *hsv1-tk* von dem 1100 bp *epcam*-Promotor spezifisch transkribiert werden kann. EpCAM-positive Tumorzellen wurden durch die Transfektion des *hsv1-tk* Gens für die wachstumshemmende Wirkung von Ganciclovir sensitiviert. Die schwache Transkriptionsaktivität des DNA-Fragments in EpCAM-negativen HEK293 war nicht

ausreichend, um eine signifikante Ganciclovirsensitivität zu vermitteln. In EpCAM-positiven Zellen HEK293-EBNA1 und SKBR3 konnte die *epcam*-Promotor regulierte HSV1-TK-Expression in einer RT-PCR veranschaulicht werden (Kapitel 4.5.1). Die dadurch erlangte Ganciclovirsensitivität der EpCAM-positiven Zellen konnte in MTT-Versuchen belegt werden (Kapitel 4.5.2).

Ein weiterer Aspekt kam in den MTT-Versuchen zum Vorschein: Wie in den durchflusszytometrischen Messungen nachgewiesen, ist die EpCAM-Oberflächenexpression in SKBR3 deutlich höher als in HEK293-EBNA1 (Kapitel 4.2.1, Kapitel 4.2.2), jedoch korrelierte die EpCAM-Expression nicht linear mit der reduzierten metabolischen Aktivität der SKBR3 und HEK293-EBNA1 Zellen (Kapitel 4.5.2). Dabei mögen eine Reihe von Faktoren die Wirkung des letalen Gens *hsv1-tk* auf EpCAM-positive Zellen unter Ganciclovir beeinflussen:

- Phase des Zellzyklus bei Applikation von Ganciclovir
- Unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zelllinien
- Resistenzentwicklung der Tumorzellen
- „bystander effect“ bei Applikation toxischer Wirkstoffe

Die HSV1-TK phosphoryliert Ganciclovir, das bei der DNA-Replikation als Guanosinanalogon eingebaut wird und die DNA-Synthese inhibiert (Hasegawa et al., 1995). Um die optimale Wirkung von Ganciclovir entfalten zu können, sollten möglichst viele Tumorzellen in der S-Phase des Zellzyklus vorliegen. Wenn im gleichen Stadium des Zellzyklus gezielt Ganciclovir auf verschiedene Zelllinien appliziert wird, könnten Störfaktoren der *hsv1-tk* Transfektion vermindert werden. Dadurch wäre eine bessere Vergleichbarkeit der Zelllinien hinsichtlich EpCAM-Expression und metabolischer Aktivität unter Ganciclovir möglich. Der klinisch erprobte Polyaminbiosynthese-Inhibitor DFMO (2-Difluoromethylornithin) führt zu einem zytostatischen Effekt, indem die Phase der DNA-Synthese verlängert wird. Dadurch

kommt es zu einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase, sodass ein größerer Angriffspunkt für das aktivierte Ganciclovir geboten ist und die Zytotoxizität der HSV1-TK/GCV-Methode verbessert wird. Dabei ist die zeitliche Abstimmung zwischen der Applikation von Ganciclovir und DMFO entscheidend (Pasanen et al., 2003). Bei Untersuchungen des HSV1-TK/GCV-Systems wurde die Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen, die ein wirkungsvoller Effektor der Apoptose ist. Eine Koexpression von Pro-Caspase-3 führt zu einer signifikanten Verbesserung der Effizienz der TK/GCV-Therapie in Ovarialkarzinomzellen. Als Ursache der verbesserten HSV1-TK/GCV-Wirksamkeit wird neben schnellerer Aktivierung von Caspase-3 und der Spaltung der Poly(-ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), ein S-Phase Block vermutet (McNeish et al., 2001). Mittels DMFO oder Kotransfektion der Pro-Caspase-3 zur Verbesserung der HSV1-TK/GCV-Wirksamkeit könnte untersucht werden, ob die reduzierte metabolische Aktivität tatsächlich nicht linear mit der EpCAM-Expression korreliert, oder ob es sich dabei um eine unterschiedliche Transfektionseffektivität der einzelnen Zelllinien handelt.

Möglicherweise zeigen SKBR3 Zellen eine geringere Gesamtstoffwechselaktivität als HEK293-EBNA1 Zellen. Diese Vermutung wird untermauert durch eine schwächere GFP-Fluoreszenz in SKBR3 Zellen im Vergleich zu den stark leuchtenden HEK293-EBNA1 Zellen im Fluoreszenzmikroskop: Obwohl beide Zelllinien mit gleichen Mengen des *cmv*-Promotor getriebenen pEGFP-C1 als Transfektionskontrolle behandelt wurden, konnte bei SKBR3 Zellen während den Forschungsarbeiten eine weniger intensive Fluoreszenz beobachtet werden als bei HEK293-EBNA1 Zellen. Eine geringere Gesamtstoffwechselaktivität von SKBR3 Zellen würde eine geringere *hsv1-tk*-Expression in Bezug auf die Zeit zur Folge haben, obwohl eine höhere EpCAM-Expression an der Oberfläche von SKBR3 gemessen wurde. Wenn relativ weniger HSV1-TK pro Zeiteinheit in Zellen gebildet wird, nimmt auch entsprechend geringer die metabolische Aktivität ab. Da im MTT zu determinierten Zeitpunkten das Verhältnis der metabolischen Aktivität einer

Zelllinie im Vergleich zum Ausgangswert gemessen wird, kann die reduzierte metabolische Aktivität aufgrund von verminderter Stoffwechselaktivität der *hsv1-tk* transfizierten, stark EpCAM-positiven SKBR3 Zellen höhere Werte annehmen als in *hsv1-tk* transfizierten, mässig EpCAM-positiven HEK293-EBNA1 Zellen gemessen wurde (SKBR3-pEpProm-HSV1-TK 62% bei MFI-Ratio  $72,03 \pm 7,7$ ; HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK 45% bei MFI-Ratio  $6,4 \pm 1,7$ ).

Tumorzellen kann es gelingen, die schädigenden Effekte der Therapie zu umgehen. *Hsv1-tk* transfizierte Mammakarzinomzellen konnten durch wochenlange Behandlung mit Ganciclovir auf das Guanosinanalogen resistent gemacht werden. Als Ursache für die Resistenzentwicklung wurde die Methylierung des *hsv1-tk* Gens, die eine Transkription verhindert, ausgemacht. Da die Phosphorylierung des Nukleosidanalogs durch die HSV1-TK ausblieb, wäre eine Therapie mit Ganciclovir wirkungslos (Degrève et al., 2000). Unter der Annahme, dass stark EpCAM-positive SKBR3-pEpProm-HSV1-TK Zellen schneller eine Resistenz gegen Ganciclovir entwickeln könnten als mässig EpCAM-positive HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK Zellen, so wäre die *epcam*-Promotor induzierte HSV1-TK Expression nicht mehr der bestimmende Faktor für die reduzierte metabolische Aktivität. Eine beginnende Resistenzentwicklung der stark EpCAM-positiven SKBR3-pEpProm-HSV1-TK Zellen könnte die Ursache für die höhere metabolische Aktivität von 62% im MTT sein, im Vergleich zu mässig EpCAM-positiven HEK293-EBNA1-pEpProm-HSV1-TK Zellen mit einer metabolischen Aktivität von 45%.

Des Weiteren ist eine toxische Wirkung der HSV1-TK exprimierenden Tumorzellen auf ihre Nachbarzellen unter Applikation von Ganciclovir zu erwähnen. Der sogenannte „bystander effect“ beruht auf einer durch gap-junction vermittelten Diffusion der phosphorylierten Ganciclovir-Metabolite (Robe et al., 2000). In EpCAM-positiven Zellen wurde mit zunehmender EpCAM-Expression und Zellproliferation die Abnahme von festen strukturellen Zellverbindungen zum Vorteil der relativ lockeren Adhäsionsverbindungen des EpCAM-Moleküls beobachtet (Balzar et al., 1999b). Hier könnte ein weiterer



Erklärungsansatz für die verminderte Ganciclovirsensitivität der stark EpCAM-positiven SKBR3 Zellen gegenüber schwächer EpCAM-exprimierenden HEK293-EBNA1 Zellen liegen. SKBR3 Zellen verfügen bei hoher EpCAM-Expression über relativ lockere Adhäsionsverbindungen, sodass die Toxizität der GCV-Therapie über den „bystander effect“ begrenzt ist. Im Gegensatz dazu sind HEK293-EBNA1 Zellen mit mässiger EpCAM-Expression über feste Strukturen verbunden, die einen Stoffaustausch der toxischen Ganciclovir-Metabolite erleichtern. Über den „bystander effect“ erhöhte sich die toxische Wirkung der HSV1-TK/GCV-Therapie, die sich auf die reduzierte metabolische Aktivität auswirken könnte. Der Zusatz von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das die Bildung von gap-junctions zwischen den Zellen induziert, könnte zu besseren Effekten der HSV1-TK/GCV-Therapie in EpCAM-positiven Zellen führen, analog den Versuchen Robes in Glioblastomzellen (Robe et al., 2000).

Unabhängig von den genannten Faktoren, die die Wirkung des letalen Gens *hsv1-tk* auf EpCAM-positive Zellen unter Gabe von Ganciclovir beeinflussen könnten, ist die gemessene EpCAM-Oberflächenexpression der Zelllinien für die fehlende lineare Korrelation von zytotoxischer Aktivität und EpCAM-Expression in Betracht zu ziehen. In Zellen, die EpCAM an der Oberfläche exprimieren, liegt EpCAM auch im Zytoplasma vor. In den Experimenten wurde die gemessene EpCAM-Oberflächenexpression mit der endogenen EpCAM-Expression gleich gesetzt. Jedoch könnten die Verhältnisse von membranständiger und endogener Fraktion voneinander abweichen (Balzar et al., 1999b). Obwohl die EpCAM-Oberflächenexpression von SKBR3 und HEK293-EBNA1 im Durchflusszytometer eindeutig bestimmt wurde (SKBR3 MFI-Ratio:  $72,03 \pm 7,7$ ; HEK293-EBNA1 MFI-Ratio:  $6,4 \pm 1,7$ ), kann eine unterschiedliche endogene EpCAM-Expression nicht ausgeschlossen werden. Auch die Arbeitsgruppe von Di Paolo musste in ihren Versuchen mit Immunotoxin-gekoppelten Antikörpern gegen EpCAM feststellen, dass die zytotoxische Aktivität nicht mit der Menge an gemessener Oberflächenexpression von EpCAM korrelierte (Di Paolo et al., 2003). Durch eine direkte

---

Bestimmung der endogenen EpCAM-Expression in EpCAM-positiven Zellen könnte der Zusammenhang von zytotischer Aktivität unter HSV1-TK/GCV-Therapie und EpCAM-Expression genauer untersucht werden.

Da für eine HSV1-TK-Gentherapie die Applikation von Ganciclovir notwendig ist, dürfen die Nebenwirkungen für einen klinischen Einsatz nicht außer Acht gelassen werden. Bei immungeschwächten Patienten traten unter intravenöser Ganciclovir-Behandlung infolge der intratumoralen *hsv1-tk*-Gen Injektion schwache Nebenwirkungen auf, wie z.B. mildes Fieber und vereinzelt ein Anstieg von Leberenzymen, die jedoch nach Beendigung der Therapie vollständig reversibel waren (Shalev et al., 2000). Neben dem HSV1-TK/GCV-System gibt es ein weiteres letales Gen für Tumorzellen, das keines chemotherapeutischen Zusatzes bedarf. Die induzierte Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) bildet das giftige Stickoxid (NO), das autotoxisch wirkt und durch einen „bystander effect“ die Zytolyse der umliegenden Tumorzellen herbeiführt (Khare et al., 2001). Bis auf einen gezielten Gentransfer ist keine zusätzliche medikamentöse Therapie nötig. So reduziert sich die Therapie auf eine Intervention, jedoch verliert man damit auch ein regulatorisches Element, um die gewünschte Tumorzellelimination zu kontrollieren.

Zusammengefasst wurde die gezielte Genexpression des letalen Gens *hsv1-tk* unter der Kontrolle des 1100 bp *epcam*-Promotors in EpCAM-positiven HEK293-EBNA1 und SKBR3 Zellen erreicht, die zu Ganciclovirsensitivität führte. Deshalb ist es andenkbar, das 1100 bp *epcam*-Promotor Fragment für die therapeutische Genexpression letaler Gene zur Elimination EpCAM-positiver Tumorzellen einzusetzen.

## 5.4 Gentransfer in Tumorzellen

Eine große Herausforderung für die Gentherapie stellt der Gentransfer in Tumorzellen dar. In den Versuchsreihen wurde die Transfektion mit Metafectene<sup>TM</sup> für Experimente *in vitro* durchgeführt: Die Transfektionseffizienz unterschied sich je nach Zelltyp um

15 - 50%. Durch eine virale Therapie könnte der Gentransfer in Tumorzellen verbessert werden. Zum Zeitpunkt der Transduktion ist der Gentransfer mittels modifizierten Retroviren auf proliferierende, DNA-synthetisierende Zellen beschränkt d.h. es sind nur Zellen betroffen, die sich in Teilung befinden. Somit böte sich ein retroviraler Gentransfer für maligne Zellen mit hohen Proliferationsraten an (Wang et al., 2004). Das *hsv1-tk* Gen wurde mit Hilfe eines von HIV1-abstammenden Lentivirus klonierten Vektors in Lebertumoren eingeschleust. Es konnten eine hohe transgene Expression sowie eine hohe Ganciclovirsensitivität erreicht werden. Durch den retroviralen Gentransfer des *hsv1-tk* Gens wurden Nekrosen induziert, die in Abhängigkeit von der TumorgroÙe bis zu 80% des Tumorgewebes betrafen, ohne bedeutende inflammatorische Reaktionen hervorzurufen. Die intratumorale Injektion von Ganciclovir zeigte keine lebertoxischen Folgen (Gerolami et al., 2004). Ähnliche Erfolge verbuchte die Arbeitsgruppe von Pasanen, die mit Hilfe des lentiviralen Gentransfers unter Zugabe von DFMO eine signifikante Reduktion der Tumormassen erlangen konnte (Pasanen et al., 2003). Auf der Grundlage eines adenoviralen Vektors wurde eine Variante konstruiert, deren natürliche Bindungsstellen mit breitem Tropismus entfernt, und eine neue Bindungsdomäne des bispezifischen single-chain Antikörpers gegen EpCAM als Ankermolekül eingefügt wurde. Durch die EpCAM-vermittelte Bindung konnte die Transduktionseffizienz spezifischer und effektiver gestaltet werden (Haisma et al., 1999; Heidemann et al., 2002). Dank der EpCAM-Spezifität trat keine Hepatitis durch adenovirale Transduktion als Nebenwirkung auf.

Neben der viralen Transduktion sei noch das nicht-virale Gentransfersystem GE7 erwähnt. Der Vektor für den GE7-vermittelten Gentransfer setzte sich aus drei Komponenten zusammen: Ein synthetisches Oligopeptid (GE7) wurde als spezifischer Ligand für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor) entworfen. HA20 ist ein endosomolytisch wirkendes Oligopeptid, das aus dem Hämagglutinin des Influenzavirus abgeleitet wurde. GE7 und HA20 wurden mit Polylysin über Disulfidbrücken

verbunden. Dieser Komplex kann DNA binden und spezifisch über den EGF-Rezeptor in die Zelle schleusen (Liu et al., 2003a). Dadurch können Transfektionseffizienzen bis 80% erreicht werden. Das System mit Vektor GE7 wurde bereits für die HSV1-TK/GCV-vermittelte Tumorbehandlung in Ovarialkarzinomzellen getestet (Liu et al., 2003b).

Der verbesserte Gentransfer mittels modifiziertem Retrovirus mit bispezifischen single-chain Antikörpern gegen EpCAM oder der GE7-vermittelte Gentransfer könnten die Transfektion der *hsv1-tk* DNA mit dem Reagenz Metafectene<sup>TM</sup> ersetzen und somit eine effizientere Transfektionsrate zur Weiterentwicklung des HSV1-TK/GCV-Systems erreichen.

## **5.5 *Epcam*-Promotor reguliertes HSV1-TK/GCV-System im**

### **Mausmodell**

Das Expressionsmuster von EpCAM im menschlichen Körper ist bekannt und eignet sich als Zielantigen für den Einsatz EpCAM-spezifischer Wirkstoffe (Went et al., 2004). Zusätzlich kann glykosiliertes EpCAM in Tumorzellen von unglykosiliertem EpCAM in gesundem Gewebe unterschieden werden (Pauli et al., 2003). Dadurch wird eine Differenzierung zwischen malignen und benignen Zellen möglich. Ein adenoviraler Vektor, der mit bispezifischen single-chain Antikörper gegen glykosiliertes EpCAM als Ankermolekül und der *hsv1-tk* Sequenz ausgestattet ist, könnte einen hochspezifischen Gentransfer in EpCAM-positive Tumorzellen bewerkstelligen.

Was die *hsv1-tk* Gentherapie unter Verwendung von Ganciclovir betrifft, so sollte den Versuchen *in vitro* die Überprüfung *in vivo* folgen. Ob Tiermodelle sinnvoll sind, um eine Vorhersage über die Wirksamkeit von *epcam*-Promotor regulierter Genexpression in Patienten machen zu können, hängt von den Homologien des EpCAM-Proteins des Menschen und den entsprechenden Tieren ab. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern

---

gegen EpCAM konnten Homologien zum menschlichen EpCAM-Antigen in Maus, Ratte und Primaten entdeckt werden (Zaloudik et al., 1997). In der Southern Blot Analyse der Gensequenz des humanen GA733-2 Gens, das für EpCAM kodiert, wurden Homologien zu Affen, Mäusen, Hamster und Hühnern aufgefunden (Linnenbach et al., 1993). Es ist daher anzunehmen, dass EpCAM in höheren Wirbeltieren gut konserviert vorliegt. Die Ergebnisse über die Konkordanz von menschlichen und murinen EpCAM Nukleotid- und Aminosäuresequenzen untermauern die These (Bergsagel et al., 1992). Daher ist ein Tiermodell mit Mäusen durchaus als aussagekräftig zu werten. Untersuchungen im Mausmodell wären eine Grundvoraussetzung für die klinische Anwendung der HSV1-TK/GCV-Methode und lieferten Erkenntnisse über die gezielte Gentransduktion und EpCAM-spezifische Expression von HSV1-TK mit folgender Ganciclovirsensitivität im lebenden Organismus.

Welche Rolle könnte das HSV1-TK/GCV-System der EpCAM-positiven Tumorzellen in der klinischen Anwendung spielen? Was die klinische Verwendung EpCAMs als Zielantigen anbelangt, so konnte die Behandlung mit 17-1A monoklonalen Antikörpern Mortalität, Rezidivrate und Metastasierung reduzieren. Dabei zeigte die 17-1A Antikörpertherapie große Wirkung auf disseminierte isolierte Tumorzellen, jedoch kaum auf massive Primärtumoren (Riethmüller et al., 1998). Eine systemische Therapie mit Spezifität für das Ankerprotein EpCAM wäre demnach ein vielversprechender Ansatz bei der „minimal residual disease“. Man spricht von „minimal residual disease“ einer Tumorerkrankung, wenn die komplette Rückbildung aller objektiven Befunde nach einer Therapie erreicht wurde, jedoch vereinzelt residuale Tumorzellen im Organismus zu finden sind. Im Anschluss an die herkömmliche Therapie der Plattenepithelkarzinome könnte das HSV1-TK/GCV-System über viralen Gentransfer eingesetzt werden, um im Organismus des Patienten die EpCAM-spezifische Expression von HSV1-TK mit einer einhergehenden Sensitivierung der transfizierten Tumorzellen auf Ganciclovir zu ermöglichen. Dadurch könnten die fortbestehenden vereinzelt (etwa  $10^3$ ) Zellen

eliminiert und die Patienten vor einem Rezidiv geschützt werden. Denn das Ziel einer Tumorthherapie ist die vollständige Elimination aller Tumorzellen eines Krebsgeschwulstes und seiner Metastasen.

## 6 Zusammenfassung

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist in der Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen über- oder *de novo* exprimiert. Zudem korreliert die EpCAM-Expression in Tumorzellen positiv mit Proliferation und Entdifferenzierung. Es wurde in Vorarbeiten ein 1100 bp *epcam*-Promotorfragment kloniert, das spezifisch in EpCAM-positiven Zellen transkriptionell aktiv ist und durch TNF $\alpha$  in der Promotoraktivität reprimiert wird (Gires et al., 2003).

In meiner Arbeit untersuchte ich, ob das 1100 bp *epcam*-Promotorfragment zur gezielten heterologen Genexpression geeignet ist. Zu diesem Zweck wurden drei Proteine ausgewählt: Grünes Fluoreszenz Protein (GFP), TNF receptor associated death domain Protein (TRADD) und Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase (HSV1-TK). GFP diente der Visualisierung der Promotoraktivität im Fluoreszenzmikroskop. TRADD sollte die Apoptose in EpCAM-positiven Tumorzellen induzieren. Mit Hilfe der spezifischen Expression der HSV1-TK in EpCAM-positiven Zellen sollten Tumorzellen für Ganciclovir sensitiviert werden. Eine Therapie mit Ganciclovir sollte das Absterben der Tumorzellen bewirken.

Die heterologe Genexpression wurde an einem zellulären Modellsystem von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen HEK293 Zellen getestet. Dabei zeigten EpCAM-positive Zellen eine deutliche GFP-Expression, während EpCAM-negative Zellen sporadisch eine minimale Fluoreszenzintensität aufwiesen. Die EpCAM-spezifische Expression von GFP konnte im Immunoblot bestätigt werden. Um den Zusammenhang zwischen EpCAM- und GFP-Expression zu veranschaulichen, wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der EpCAM-Oberflächenexpression mit der GFP-Fluoreszenz verglichen. Damit konnte im zellulären Modellsystem von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen HEK293 Zellen gezeigt werden, dass die *epcam*-Promotoraktivität zu einer heterologen Genexpression von GFP führt.

---

Das zelluläre Modellsystem von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen HEK293 Zellen wurde auf die Expression weiterer funktioneller Gene untersucht. Für das Funktionsgen TRADD konnte dabei weder eine EpCAM-spezifische heterologe Genexpression in der RT-PCR noch im Immunoblot nachgewiesen werden. In beiden Untersuchungen führten die Positivkontrollen zu einem Nachweis von TRADD. Da TRADD über komplexe Signalwege zur Bildung von TNF $\alpha$  führen kann, findet möglicherweise eine Inaktivierung des *epcam*-Promotors durch TNF $\alpha$  statt.

Die heterologe Genexpression von HSV1-TK unter der Kontrolle des *epcam*-Promotors konnte im zellulären Modellsystem in der RT-PCR nachgewiesen und auf die EpCAM-positive Tumorzelllinie SKBR3 übertragen werden. Durch die Genexpression von HSV1-TK wurden EpCAM-positive HEK293 Transfektanten sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Ganciclovir und zeigten eine deutlich reduzierte metabolische Aktivität im MTT-Ansatz bei Ganciclovirgabe. Dabei gewonnene Erkenntnisse wurden an der EpCAM-positiven Tumorzelllinie SKBR3 bestätigt.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die heterologe Genexpression von HSV1-TK unter der Kontrolle des *epcam*-Promotors zu Ganciclovirsensitivität in EpCAM-positiven Zellen führte, jedoch nicht in EpCAM-negativen Zellen. Somit ist es denkbar, das 1100 bp *epcam*-Promotorfragment für die therapeutische Genexpression letaler Gene zur Elimination EpCAM-positiver Tumorzellen zu verwenden.



## 7 Literaturverzeichnis

- Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J.** (1998); Myc and the cell cycle.; *Front Biosci.* 1998 Feb 15;3:D250-68.
- Ashkenazi A, Dixit VM.** (1998); Death receptors: signaling and modulation.; *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV.** (1999a) ; The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).; *J Mol Med.* 1999 Oct;77(10):699-712.
- Balzar M, Prins FA, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV.** (1999b); The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM.; *Exp Cell Res.* 1999 Jan 10;246(1):108-21.
- Barker SD, Dmitriev IP, Nettelbeck DM, Liu B, Rivera AA, Alvarez RD, Curiel DT, Hemminki A.** (2003); Combined transcriptional and transductional targeting improves the specificity and efficacy of adenoviral gene delivery to ovarian carcinoma.; *Gene Ther.* 2003 Jul;10(14):1198-204.
- Berger R, Bernheim A.** (1985); Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: a review.; *IARC Sci Publ.* 1985;(60):65-80.
- 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.* 1992 Jan 15;148(2):590-6.
- 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.* 1999 Jun;188(2):201-6.

- 
- Böcker W, Denk H, Heitz U.** (2001); Pathologie – Allgemeine Tumorpathologie.; *Urban & Fischer München Jena*:163-211
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.** (1994); Green fluorescent protein as a marker for gene expression.; *Science*. 1994 Feb 11;263(5128):802-5.
- 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*. 1999 May-Jun;19(3B):2237-42.
- Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH.** (1990); Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene.; *Science*. 1990 Dec 14;250(4987):1576-80.
- Christofori G, Semb H.** (1999); The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene.; *Trends Biochem Sci* 1999 Feb;24(2):73-6.
- Craperi D, Vicat JM, Nissou MF, Mathieu J, Baudier J, Benabid AL, Verna JM.** (1999); Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line.; *Hum Gene Ther*. 1999 Mar 1;10(4):679-88.
- Danial NN, Korsmeyer SJ.** (2004); Cell death: critical control points.; *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.
- Davis CG.** (1990); The many faces of epidermal growth factor repeats.; *New Biol*. 1990 May;2(5):410-9
- .

- Degreve B, De Clercq E, Balzarini J.** (2000); Selection of HSV-1 TK gene-transfected murine mammary carcinoma cells resistant to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and ganciclovir (GCV).; *Gene Ther.* 2000 Sep;7(18):1543-52.
- Field JK.** (1992); Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck.; *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992 Jul;28B(1):67-76.
- Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A.** (2003); EGFR signal transactivation in cancer cells.; *Biochem Soc Trans.* 2003 Dec;31(Pt 6):1203-8.
- Foulds L.** (1954); The experimental study of tumor progression: a review.; *Cancer Res.* 1954 Jun;14(5):327-39.
- Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G.** (2000); Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.; *Lancet.* 2000 Dec 9;356(9246):1981-2.
- Gatza ML, Chandhasin C, Ducu RI, Marriott SJ** (2005); Impact of Transforming Viruses on Cellular Mutagenesis, Genome Stability, and Cellular Transformation.; *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2005 Jan;45:304-25.
- Gerolami R, Uch R, Faivre J, Garcia S, Hardwigen J, Cardoso J, Mathieu S, Bagnis C, Brechot C, Mannoni P.** (2004); Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma using HIV-1-derived lentiviral vectors.; *Journal of Hepatology* 2003 Oct;40:291-7.
- 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.* 2001 Aug 1;92(3):620-8.

- Gires O, Eskofier S, Lang S, Zeidler R, Munz M.** (2003); Cloning and characterisation of a 1.1kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter.; *Anticancer Res.* 2003 Jul-Aug;23(4):3255-62.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.** (1997); Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.; *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
- Greenberger S, Shaish A, Varda-Bloom N, Levanon K, Breitbart E, Goldberg I, Barshack I, Hodish I, Yaacov N, Bangio L, Goncharov T, Wallach D, Harats D.** (2004); Transcription-controlled gene therapy against tumor angiogenesis.; *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(7):1017-24.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.** (1999); Creation of human tumour cells with defined genetic elements.; *Nature.* 1999 Jul 29;400(6743):464-8.
- Haisma HJ, Pinedo HM, Rijswijk A, der Meulen-Muileman I, Sosnowski BA, Ying W, Beusechem VW, Tillman BW, Gerritsen WR, Curiel DT.** (1999); Tumor-specific gene transfer via an adenoviral vector targeted to the pan-carcinoma antigen EpCAM.; *Gene Ther.* 1999 Aug;6(8):1469-74.
- Hanahan D, Weinberg RA.** (2000); The hallmarks of cancer.; *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hasegawa Y, Emi N, Shimokata K.** (1995); Retroviral transfer of HSV1-TK gene into human lung cancer cell line.; *J Mol Med.* 1995 Mar;73(3):107-12.

- Heideman DA, van Beusechem VW, Offerhaus GJ, Wickham TJ, Roelvink PW, Craanen ME, Pinedo HM, Meijer CJ, Gerritsen WR.** (2002); Selective gene transfer into primary human gastric tumors using epithelial cell adhesion molecule-targeted adenoviral vectors with ablated native tropism.; *Hum Gene Ther.* 2002 Sep 20;13(14):1677-85.
- Heiss MM, Strohle MA; Jager M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H.** (2005); Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies.; *Int. J. Cancer* 2005 May 19;117:435-43.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** (1995); The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.; *Cell.* 1995 May 19;81(4):495-504.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV.** (1996a); TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.; *Cell.* 1996 Jan 26;84(2):299-308.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.** (1996b); TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex.; *Immunity.* 1996 Apr;4(4):387-96.
- 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.* 1995 Apr;103(4):281-6.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** (1972); Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.; *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.

- Khare PD, Shao-Xi L, Kuroki M, Hirose Y, Arakawa F, Nakamura K, Tomita Y, Kuroki M.** (2001); Specifically targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing cells by a retroviral vector displaying single-chain variable fragmented antibody to CEA and carrying the gene for inducible nitric oxide synthase; *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61:370-75.
- Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K.** (1999); Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer.; *J Clin Oncol.* 1999 Jan;17(1):19-24.
- Levine AJ.** (1997); p53, the cellular gatekeeper for growth and division.; *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):323-31.
- Liljefors M, Ragnhammar P, Nilsson B, Ullenhag G, Mellstedt H, Frodin JE.** (2004); Anti-EpCAM monoclonal antibody (MAb17-1A) based treatment combined with alpha-interferon, 5-fluorouracil and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal carcinoma.; *Int J Oncol.* 2004 Sep;25(3):703-11.
- Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K.** (1993); Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes.; *Mol Cell Biol.* 1993 Mar;13(3):1507-15.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO.** (1994); Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.; *J Cell Biol.* 1994 Apr;125(2):437-46.
- 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.* 1996 Mar;148(3):865-75.

- Liu X, Tian PK, Ju DW, Zhang MH, Yao M, Cao XT, Gu JR.** (2003a); Systemic genetic transfer of p21<sup>WAF-1</sup> and GM-CST utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex; *Cancer Gene Ther.* 2003 Jan;10:529-39.
- Liu XJ, Xu CJ, Jin ZJ, Liu Y, Dai FH, Han JS, Tian PK, Gu JR.** (2003b); [In vitro experimental study of gene therapy for ovarian cancer with thymidine kinase gene of herpes simplex virus mediated by a non-viral GE7 delivery system]; *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2003 Oct;38(10):621-4.
- Lockshin RA, Williams CM.** (1965); Programmed cell death --I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkmoth.; *J Insect Physiol.* 1965 Feb;11:123-33.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J.** (1989); *Molecular Cloning: A laboratory manual.*; Cold Spring Harbour Press, New York.
- Martin SJ, Green DR.** (1994); Apoptosis as a goal of cancer therapy.; *Curr Opin Oncol.* 1994 Nov;6(6):616-21.
- McLaughlin PM, Trzpis M, Kroesen BJ, Helfrich W, Terpstra P, Dokter WH, Ruiters MH, de Leij LF, Harmsen MC.** (2004); Use of the EPG-2/Ep-CAM promoter for targeted expression of the heterologous genes in carcinoma derived cell lines.; *Cancer Gene Ther.* 2004 Sep;11(9):603-12.
- McNeish IA, Tenev T, Bell S, Marani M, Vassaux G, Lemoine N.** (2001); Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced cell death is enhanced by co-expression of caspase-3 in ovarian carcinoma cells.; *Cancer Gene Ther.* 2001 Apr;8(4):308-19.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J.** (2001); NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP.; *Mol Cell Biol.* 2001 Aug;21(16):5299-305.

- Micheau O, Tschopp J.** (2003); Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.; *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):181-90.
- Mosmann T.** (1983); Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.; *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Munz M, Hofmann T, Scheibe B, Gange M, Junghans K, Zeidler R, Gires O.** (2004a); The Carcinoma-Associated Antigen EpCAM induces Glyoxalase 1 and enhanced Methylglyoxal turnover; *Cancer genomics & Proteomics*. 2004 May 19;1:241-8.
- 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*. 2004 Jul 29;23(34):5748-58.
- Munz M, Zeidler R, Gires O.** (2005); The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP; *Cancer Lett*. 2005 Jul 8; 225(1):151-7.
- Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmüller G, Baeuerle PA, Dreier T.** *In vitro* and *in vivo* activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment.; *Int.J.Cancer*. 2002; 100:101-110.
- Nowell PC.** (1976); The clonal evolution of tumor cell populations.; *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
- 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*. 2003 Jul;9(7):2837-48.



- Pasanen T, Karppinen A, Alhonen L, Janne J, Wahlfors J.** (2003); Polyamine biosynthesis inhibition enhances HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir-mediated cytotoxicity in tumor cells.; *Int J Cancer*. 2003 Apr 10;104(3):380-8.
- 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*. 2003 Apr 10;193(1):25-32.
- Poczatek RB, Myers RB, Manne U, Oelschlager DK, Weiss HL, Bostwick DG, Grizzle WE.** (1999); Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia.; *J Urol*. 1999 Oct;162(4):1462-6.
- Riede UN, Schaefer HE.** (1999), Allgemeine und spezielle Pathologie – Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie).; *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York* 1999:344-92.
- Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R.** (1994); Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group.; *Lancet*. 1994 May 14;343(8907):1177-83.
- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R.** (1998); Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.; *J Clin Oncol*. 1998 May;16(5):1788-94.

- Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, Gielen J, Merville M, Bours V.** (2000); Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside.; *Biochem Pharmacol.* 2000 Jul 15;60(2):241-9.
- Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C.** (1996); MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck.; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 May;122(5):504-7.
- Schanzer JM, Baeuerle PA, Dreier T, Kufer P.** (2006); A human cytokine/single-chain antibody fusion protein for simultaneous delivery of GM-CSF and IL-2 to Ep-CAM overexpressing tumor cells.; *Cancer Immunity,* 2006 Feb 17;6:4-14.
- Schlereth B, Fichtner I, Lorenczewski G, Kleindienst P, Brischwein K, da Silva A, Kufer P, Lutterbuese R, Junghahn I, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Baeuerle PA.** (2005); Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct.; *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2882-9.
- Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H.** (2001); "The metabolism of tumors":70 years later. *Novartis Found Symp.* 2001;240:251-60.
- Shalev M, Miles BJ, Thompson TC, Ayala G, Butler EB, Aguilar-Cordova E, Kadmon D.** (2000); Suicide gene therapy for prostate cancer using a replication-deficient adenovirus containing the herpesvirus thymidine kinase gene.; *World J Urol.* 2000 Apr;18(2):125-9.
- Sheikh MS, Huang Y.** (2003); Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1.; *Cell Cycle.* 2003 Nov-Dec;2(6):550-2.

- Singh AB, Harris RC.** (2005); Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands.; *Cellular signalling*. 2005;17:1183-93.
- Sims III RJ, Belotserkovskaya R, Reinberg D.** (2004); Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it.; *Genes & Development* 2004;18:2437-68.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin HP, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Köchli 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 Research and Treatment* 2004;86:207-13.
- Sugden B, Marsh K, Yates J.** (1985); A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-Lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus.; *Molecular and Cellular Biology*. 1985 Feb; 5(2):410-413.
- Thompson DM, Gill GN.** (1985); The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy.; *Cancer Surv*. 1985; 4(4):767-88.
- Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Mühlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schäfer G, Gastl G, Spizzo G.** (2004); Overexpression of Epithelial Cell Adhesion Molecule Antigen in Gallbladder Carcinoma is an independent Marker for poor Survival.; *Clinical Cancer Research* 2004 May;10: 3131-6.
- Vogelstein B, Kinzler KW.** (1993); The multistep nature of cancer.; *Trends Genet*. 1993 Apr;9(4):138-41.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.** (2000); Surfing the p53 network.; *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

- Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS.** (2004); Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer.; *World J Gastroenterol.* 2004 Feb 1;10(3):400-3.
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S.** (2004); Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.; *Hum Pathol.* 2004 Jan;35(1):122-8.
- Wimberger P, Xiang W, Mayr D, Diebold J, Dreier T, Baeuerle PA, Kimmig R.** (2003); Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM/CD3-bispecific antibody; *Int J Cancer* 2003 Jun 10;105(2):241-8.
- Wirtschaffter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ.** (2002); Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: a preliminary report.; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 Jan;128(1):40-3.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA.** (2004); Environmental and chemical carcinogenesis.; *Seminars in Cancer Biology* 2004;14:473-86.
- Zaloudik J, Basak S, Nesbit M, Speicher DW, Wunner WH, Miller E, Ernst-Grotkowski C, Kennedy R, Bergsagel LP, Koido T, Herlyn D.** (1997); Expression of an antigen homologous to the human CO17-1A/GA733 colon cancer antigen in animal tissues.; *Br J Cancer.* 1997;76(7):909-16.
- Zaloudik J, Weiping L, Jacob L, Kieny MP, Somasundaran R, Acres B, Song H, Zhnag T, Li J, Herlyn D** (2002); Inhibition of the tumor growth by recombinant vaccinia virus expressing GA733/CO17-1A/EpCAM/KSA/KS1-4 antigen in mice.; *Cancer Gene Therapy* 2002;9:382-9.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP-1	Aktivierendes Protein 1
bp	Basenpaare
BW	backward
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	copy-DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DD	death domain
DFMO	2-Difluoromethylornithin
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid acid
EBNA1	Epstein-Barr virus nuclear antigen 1
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-FABP	Epidermal fatty acid binding protein
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FADD	Fas-associated death domain protein
FACS	Fluorescence-activated cell sorter, Durchflusszytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FW	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
HNO-	Hals-, Nasen-, Ohren-

---

HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSV1-TK	Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MFI-Ratio	Mean fluorescence intensity ratio
MG	Methylglyoxal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
NF- $\kappa$ B	Nuklear Faktor kappa B
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PARP	Poly(-ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pHEBo-Vektor	Vektor mit <i>oriP</i> -Element von Epstein-Barr-Virus und <i>hph</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> (Sugden et al., 1985)
PML	promyelocytic leukemia protein
POX	Peroxidase
p53	Tumorsuppressorgen p53
RIB	receptor-interacting protein
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleinacid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SKBR3	humane Mammakarzinomzelllinie
SP-1	Säugerzellenprotein 1
TBP	TATA-box binding protein
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRADD	TNF receptor associated death domain
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
W/V	Weight/Volume
z.B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben. Dank freundlicher Unterstützung und großer Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurden, hat es mir sehr viel Freude bereitet, diese Arbeit zu erstellen. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. A. Berghaus für die guten Arbeitsbedingungen im Forschungslabor.
- Herrn Prof. Dr. med. C. Matthias für die Unterstützung auf dem Weg zur Promotion.
- Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires für die Vergabe des Themas, die hervorragende Betreuung, die unermüdliche Bereitschaft, sich stets für meine vielen Fragen Zeit zu nehmen, die prompte und konkrete Hilfestellung bei allen Problemen und den bewundernswerten Einsatz, mit dem er für Forschung begeistern kann.
- Herrn Dr. rer. nat. Markus Münz für die Diskussionsbereitschaft, tatkräftige Unterstützung und analytische Kompetenz in allen Fragestellungen.
- Herrn Dr. rer. nat. Rob Chapman als externer Berater bei Klonierungen und Übersetzer im Dienst der englischen Sprache.
- Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe die freundliche Aufnahme in die Gruppe, für das harmonische Arbeitsklima, das Interesse an meiner Arbeit und die Geduld, mir alles zu erklären, die unterstützende Zellpflege in meiner Abwesenheit, die vielen guten Ratschläge und aufmunternden Zusprüche, wenn's mal gar nicht so gut lief, die guten Kuchen und alle großen Kleinigkeiten, die diese Arbeitsgruppe so einzigartig machen und dazu beigetragen haben, dass ich gerne ins Labor gegangen bin.
- Astrid, Martin und meinem Freund für die Hilfe in computertechnischen Fragen, sowie Isabelle und Julia für die Tipps und Tricks beim Schreiben der Arbeit.
- Meinen Eltern, dass sie mir die Möglichkeit eröffneten, eine aufwendige Arbeit zu erstellen, und meinem Freund für die liebevolle Unterstützung in dieser Zeit.



## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Stephanie Pöckl  
Geburtsdatum: 23. März 1979  
Geburtsort: Landsberg am Lech  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Maistraße 61  
80337 München

### Schulbildung/Studium

1989 - 1996 Dominikus-Zimmermann-Gymnasium, Landsberg am Lech  
1996 - 1997 Colegio "San José", Esperanza (Argentinien)  
1997 – 1999 Mariengymnasium, Kaufbeuren  
1999 Schulabschluss mit Allgemeiner Hochschulreife (Abitur)  
1999 – 2006 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
2000 – 2001 Auslandssemester an der Universität Miguel-Hernandez, Alicante (Spanien)  
2003 – 2004 Dissertation im Forschungslabor Molekulare Onkologie der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenranke Klinikum Großhadern, LMU München  
2005 - 2006 Praktisches Jahr an der University of Toronto (Nephrologie, Medizinische Onkologie), Université Pierre et Marie Curie, Paris (Chirurgie) und Ludwig-Maximilians-Universität, München (Innere Medizin, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde)  
2006 Ärztliche Prüfung

Dateiname: Poeckl\_Stephanie  
Verzeichnis: C:\WINDOWS\Desktop\Doktorarbeit  
Vorlage: U:\Daten\Templates\Office2000\Diplomarbeit.dot  
Titel: Verwendung der Promotorelemente des Tumor-assoziierten  
Antigens EpCAM zur Genexpression in EpCAM-positiven Karzinomzellen  
Thema:  
Autor: Stephanie Poeckl  
Stichwörter:  
Kommentar:  
Erstelldatum: 05.12.06 21:33  
Änderung Nummer: 5  
Letztes Speicherdatum: 08.12.06 22:58  
Zuletzt gespeichert von: stephanie pöckl  
Letztes Druckdatum: 08.12.06 23:20  
Nach letztem vollständigen Druck  
Anzahl Seiten: 113  
Anzahl Wörter: 20.012 (ca.)  
Anzahl Zeichen: 136.087 (ca.)