

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Untersuchung zur Regulation des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM

Dissertation

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



vorgelegt von

Peter Fix

aus Künzelsau

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Schmetzer

Priv. Doz. Dr. D. Rapaport

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

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 <i>Epidemiologie maligner Tumore</i>	3
1.2 <i>Tumorentstehung</i>	3
1.3 <i>EpCAM</i>	6
1.3.1 Das EpCAM-Gen.....	6
1.3.2 Das EpCAM-Protein.....	7
1.3.3 Kontrolle der eukaryotischen Transkription.....	11
1.3.4 Der EpCAM-Promotor.....	13
1.4 <i>Aufgabenstellung</i>	14
2 Material	15
2.1 <i>Geräte</i>	15
2.2 <i>Chemikalien</i>	16
2.3 <i>Oligonukleotide</i>	17
2.4 <i>Enzyme</i>	17
2.5 <i>Medien</i>	17
2.6 <i>Antikörper</i>	18
2.7 <i>Plasmide</i>	18
2.8 <i>Gen-Bibliotheken</i>	19
2.9 <i>Bakterielle Einzelklone</i>	19
2.10 <i>Zelllinien</i>	20
2.11 <i>Sonstiges</i>	20
3 Methoden	22
3.1 <i>Funktionelle Untersuchung der 440-bp-Promorteilsequenz</i>	22
3.1.1 Generierung eines EpCAM-Promotor-Reporterplasmides.....	22
3.1.2 System zur Messung der EpCAM-Promotorfragment-Aktivität.....	27
3.1.3 Behandlung von Zellen mit TNF α - oder TPA.....	29
3.1.4 EpCAM-Expression.....	30
3.1.5 Zellvitalitätsbeurteilung durch MTT-Assay nach Mosmann (1983).....	31
3.1.6 Zellzahlbestimmung.....	32
3.2 <i>Klonierung zusätzlicher Promotorsequenzen</i>	32
3.2.1 Screening einer Gen-Bibliothek mittels PCR.....	32
3.2.2 Screening einer Gen-Bibliothek mittels Southern-Blot-Hybridisierung.....	33
3.2.3 Screening bakterieller Einzelklone.....	34

4	Ergebnisse	37
4.1	<i>Amplifikation des EpCAM-Promotorfragmentes</i>	37
4.2	<i>Die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in verschiedenen Zelllinien</i>	37
4.3	<i>Einfluß von TNFα bzw. TPA auf die EpCAM-Promotoraktivität</i>	39
4.4	<i>Einfluß von TNFα auf das Wachstumsverhalten von Tumor-Zellen</i>	40
4.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von GHD-1-Zellen nach Behandlung mit TNF α	40
4.4.2	Vitalität von FaDu-Zellen nach Behandlung mit TNF α	41
4.5	<i>Einfluß von TNFα auf die Luziferase-Aktivität</i>	42
4.6	<i>Einfluß von TNFα bzw. TPA auf die Oberflächenexpression von EpCAM in Tumorzellen ..</i>	43
4.6.1	FACS-Analyse.....	43
4.6.2	Immuno-Blot-Analyse der EpCAM Expression	45
4.7	<i>Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch spezifische Signaltransduktion über den NF-κB-Signalweg</i>	47
4.7.1	Aktivierung von NF- κ B durch TNF α in GHD-1-Zellen.....	47
4.7.2	TRADD-DN blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc.....	48
4.7.3	DN-I κ B unterbindet die Aktivierung von NF- κ B.....	50
4.7.4	DN-I κ B blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc	51
4.7.5	p300 blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc.....	52
5	Diskussion.....	54
5.1	<i>Analyse der transkriptionellen Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes.....</i>	55
5.2	<i>Einfluß von Zytokinen auf die transkriptionelle Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes und die Expression von EpCAM.....</i>	55
5.3	<i>Identifikation der Mediatoren der TNFα vermittelten Inhibition des EpCAM Promotors ...</i>	56
5.4	<i>Klonierung weiterer Promotorbereiche des EpCAM-Promotors</i>	60
5.5	<i>Ausblick</i>	60
6	Zusammenfassung	61
7	Anhang	63
7.1	<i>Literatur.....</i>	63
7.2	<i>Abkürzungen.....</i>	81
7.3	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	84
7.4	<i>Danksagung.....</i>	85
7.5	<i>Lebenslauf.....</i>	86

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie maligner Tumore

In der westlichen Welt stehen die malignen Neoplasien, nach den kardiovaskulären Erkrankungen, an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik (**Tabelle 1**).

Die Inzidenzen vieler Malignome korrelieren mit dem Erreichen immer höherer Lebensalter, weshalb von Epidemiologen erwartet wird, daß diese in Zukunft noch weiter an Gewicht innerhalb der Todesursachenstatistik gewinnen werden und unter Umständen in Zukunft sogar zur Todesursache Nummer eins werden könnten.

Gegenstand der Nachweisung	Einheit	1996	1997	1998	1999
Häufigste Todesursachen					
Krankheiten des Kreislaufsystems	Anzahl	425 884	415 892	411 404	406 122
darunter: Hirngefäßerkrankungen	Anzahl	99 266	93 647	90 194	85 755
Herzinfarkt	Anzahl	85 206	82 893	81 988	76 961
Bösartige Neubildungen	Anzahl	212 888	210 090	212 748	210 837
darunter: der Bronchien und der Lunge	Anzahl	36 784	37 248	37 934	37 615
Krankheiten des Atmungssystems	Anzahl	53 843	50 434	49 084	51 505
Krankheiten des Verdauungssystems	Anzahl	41 940	40 814	40 510	40 154
darunter: Krankheiten der Leber	Anzahl	19 202	18 620	18 563	18 295
Unfälle	Anzahl	23 549	22 482	19 673	19 715
darunter: durch Sturz	Anzahl	10 237	9 384	7 229	7 302
Selbstbeschädigung (Suizid)	Anzahl	12 225	12 265	11 644	11 157
Gestorbene Säuglinge	Anzahl	3 962	3 951	3 668	3 496
darunter: Syndrom des plötzlichen Todes im Kindesalter	Anzahl	692	671	602	507
Schwangerschaftsabbrüche	Anzahl	130 899	130 890	131 795	130 471
Quelle: DeStatis - Aktualisierung 12.07.2001					

Tabelle 1: Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes (DeStatis)

1.2 Tumorentstehung

Heutzutage geht die Wissenschaft davon aus, daß die Karzinogenese, die Entstehung eines epithelialen Malignoms, ein sequentieller Vorgang ist, bei dem sich eine intakte Zelle schrittweise durch Akkumulation entsprechender Veränderungen bzw. Mutationen in eine maligne Zelle transformiert (Vogelstein et al., 1993; Hanahan et al., 2000).

Eine zentrale Rolle in diesem Prozeß nehmen hierbei zwei Gengruppen ein, die in gesunden Zellen Schlüsselpositionen in der Wachstumskontrolle der Zelle inne haben. Dies sind zum einen die Protoonkogene, die durch Mutation in Onkogene („gain of function mutation“) transformiert werden, und auf der anderen Seite Tumorsuppressorgene, die durch Mutation eine Funktionsverminderung bzw. sogar einen Funktionsverlust („loss of function mutation“) erfahren.

Bei kolorektalen Karzinomen ist dies als „Adenom-Karzinom-Sequenz“, also der Entwicklung eines Karzinoms aus normalem Drüsenepithel, schematisch beschrieben (Fearon et al., 1990). (vgl. **Abbildung 1**).

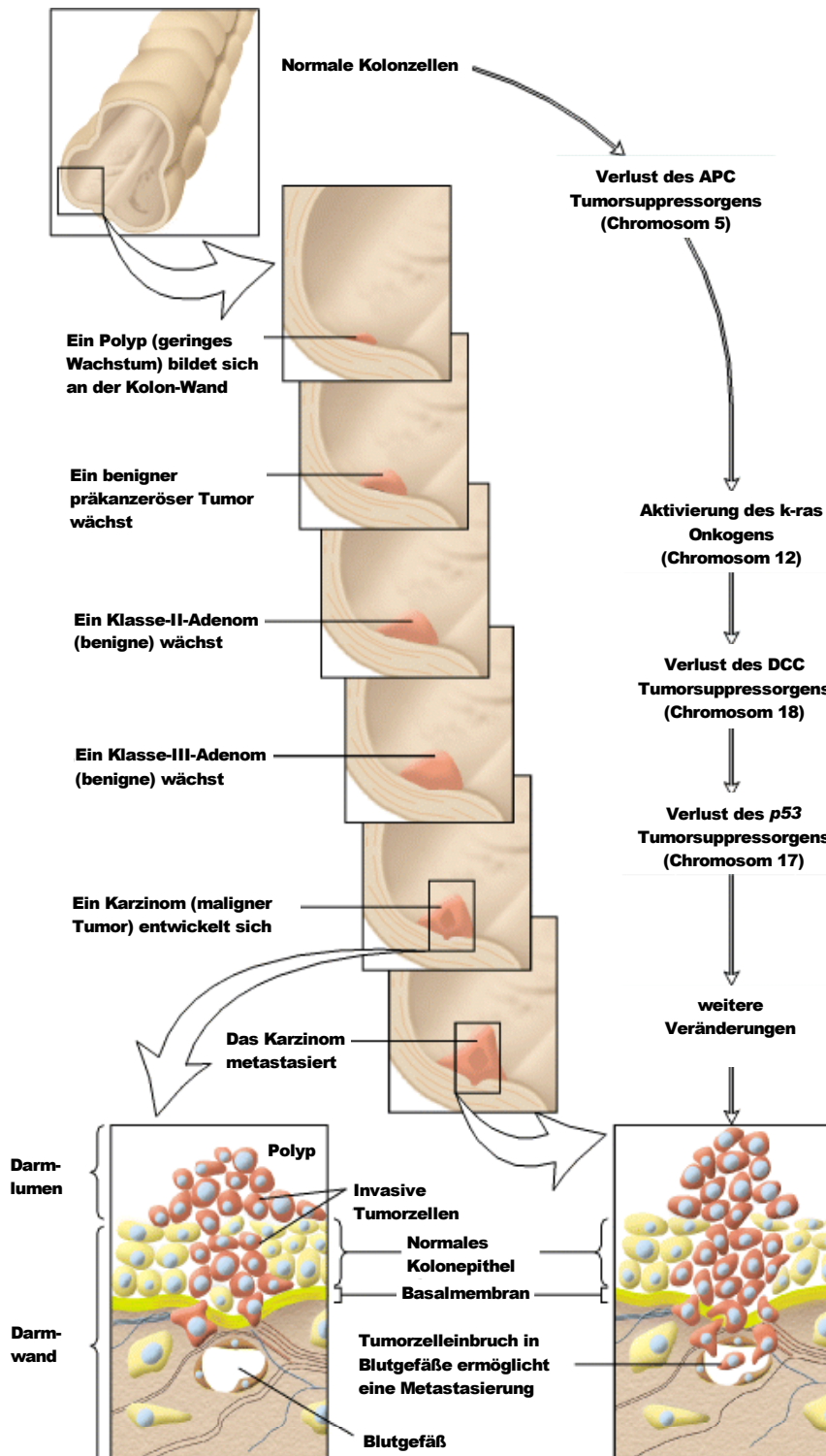


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz

(Lodish et al., 1994, *Molecular Cell Biology*, 4th ed)

Der Verlust des Tumorsuppressorgens APC (Adenomatous polyposis coli) ist der initiale Schritt der Mutationssequenz. Dies bedingt eine Hyperproliferation der betroffenen Epithelzelle, was morphologisch zur Ausbildung eines Adenoms führt (Adenome werden nach der WHO in 3 verschiedene Klassen, entsprechend ihrem fakultativen malignen Entartungspotential, eingeteilt). Als nächster Schritt entsteht durch Mutation aus dem Protoonkogen c-ras das Onkogen k-ras, dessen Proteinprodukt einem konstitutiv aktivem Ras-Protein entspricht, was weiteres Wachstum und Dysplasie des Adenoms zur Folge hat. Mit dem Verlust der Tumorsuppressorgene DCC (Deleted in colorectal cancer) und p53 ist schließlich ein Malignom entstanden, das sich der physiologischen Wachstumskontrolle entzieht und damit ungehemmt wachsen kann (Lodish et al., 1994; Houlston, 2001).

Eine weitere Eigenschaft, die aus **Abbildung 1** hervorgeht und die Malignome therapeutisch so schwer beherrschbar macht, ist Ihre Tendenz, ohne Rücksicht auf Gewebegrenzen infiltrierend und destruierend zu wachsen und dabei hämatogen und/oder lymphogen zu metastasieren. Eine Vielzahl verschiedener Faktoren bilden die molekulare Grundlage für die Invasivität und Metastasierung maligner Tumoren. So ermöglicht die Ausschüttung von Proteasen durch die Tumorzelle die Überwindung von Barrieren der extrazellulären Matrix. Ein Beispiel hierfür sind die Matrix-Metalloproteinasen zu nennen, eine Familie zinkabhängiger Endoproteinasen, deren enzymatische Aktivität gegen die Proteine der extrazellulären Matrix gerichtet ist, und die eine initiale Rolle bei der Metastasierung eines Tumors spielen (Chambers et al., 1997). Die Sezernierung angioproliferativer Faktoren sorgt für Anschluß des Tumors an das Blutgefäßsystem und dessen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Interessanterweise gibt es auch Onkogene, die die Metastasierung ermöglichen können wie bspw. das Onkogen H-ras (Thorgeirsson et al., 1985).

Nach der Vielzahl der Veränderungen, die eine Krebszelle durchläuft, ist es verwunderlich, daß das Immunsystem des Betroffenen die entarteten Zellen nicht attackiert, obwohl viele Tumorzellen durch entsprechende Tumor-Antigene quantitativ oder qualitativ identifizierbar sind. Bei näherer Erforschung dieses Umstandes konnte beobachtet werden, daß auf Tumorzellen bestimmte Oberflächenmoleküle, die im Rahmen einer Erkennung durch das Immunsystem eine wichtige Rolle spielen, wie bspw. MHC-I-Moleküle, nicht bzw. vermindert exprimiert werden (Bodmer et al., 1993). Eine andere Möglichkeit, wie sich die Tumorzelle vor dem Zugriff des Immunsystems schützt, ist die Sezernierung immunsuppressiver Substanzen wie bspw. TGF- β (Tada et al., 1991) und Prostaglandin E2 (Zeidler et al., 2000).

Wie bereits angesprochen, lassen sich Tumorzellen in der Tat durch ein verändertes Expressionsmuster bestimmter Moleküle charakterisieren, die deshalb auch als Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle im Rahmen einer Tumorerkrankung eingesetzt werden.

Sie lassen sich in 2 Gruppen einteilen:

1. Tumorspezifische Antigene (TSA), d.h. Moleküle, die ausschließlich in Tumoren zu finden sind, wie bspw. punktmutierte ras-Onkogene oder mutierte p53-Tumorsuppressorgene (Bast et al., 2000).
2. Tumorassoziierte Antigene (TAA), d.h. Moleküle, die sowohl in Tumoren als auch in gesundem Gewebe zu finden sind, aber quantitative Unterschiede bzgl. der Expression zeigen. Hierzu zählen die meisten Tumormarker und Tumorantigene. Als Beispiele sind das karzinoembryonale Antigen (CEA) (Hammarstrom, 1999), das - inzwischen gut erforschte - HER-2/neu-Protein (Ross et al., 1999), und das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (Akronym für „**E**pithelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule“) zu nennen, dessen Regulation zentrales Thema dieser Arbeit ist.

1.3 EpCAM

1.3.1 Das EpCAM-Gen

EpCAM wird durch das GA733-2-Gen kodiert, das zusammen mit dem GA733-1-Gen die GA733-Genfamilie bildet (Linnenbach et al., 1993). Das Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (Calabrese et al., 2001) und umfaßt ca. 14 kB (Linnenbach et al., 1993). Der Vergleich von genomischer DNA und der EpCAM mRNA zeigte, daß das Gen aus 9 Exons besteht (Linnenbach et al., 1993), die wie folgt kodieren:

- Exon 1: Signalpeptidsequenz, nicht translatierter 5'-Bereich
- Exon 2 – 6: Extrazellulärdomäne
- Exon 7: Transmembrandomäne
- Exon 8: Zytoplasmatische Domäne
- Exon 9: 13 AS zytoplasmatische Domäne, Stop-Codon, nicht translaterter 3'-Bereich

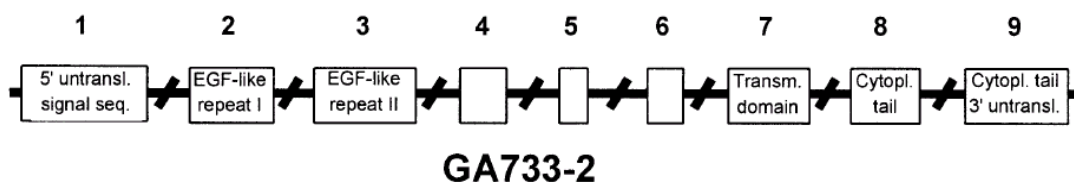


Abbildung 2: Schematische Darstellung von GA733-2 (Linnenbach et al., 1993)

Die transkribierte mRNA umfaßt 1,5 kB und weist im nicht translatierten 5'-Bereich eine Größenvariation von 16 bis 160 Basen auf (Perez et al., 1989; Simon et al., 1990). Der nicht translaterter 3'-Bereich enthält zwei potentiell wichtige Motive (Perez et al., 1989).

Das erste Motiv – ATTTA - wurde als Signal für den spezifischen Abbau von mRNA, die für Zytokine, Lymphokine und einige Protoonkogene kodiert, beschrieben (Shaw et al., 1986).

Das zweite Motiv – TTATTAT – wurde als Konsensussequenz im 3'-Bereich von Entzündungsmediatoren (bspw. Tumornekrosefaktor, Interleukin 1, Interferone, Colony stimulation factor) identifiziert (Caput et al., 1986).

Tatsächlich translatiert werden 942 Basen, die als offener Leserahmen abgelesen werden. Für diesen Bereich sind weder Variationen in der Literatur beschrieben noch Splicevarianten bekannt (Balzar et al., 1999).

1.3.2 Das EpCAM-Protein

Das EpCAM Glykoprotein wurde 1979 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAk) 17-1A auf der Oberfläche von Kolon-Karzinom-Zellen identifiziert (Herlyn et al., 1979; Koprowski et al., 1979). Das Molekül wurde seither unter mehreren Namen beschrieben, u.a. als MH99, AUA1, 323/A3, KS1/4, HEA125, KSA, EGP, EGP40, GA733-2 oder als TACSTD1 (Mattes et al., 1983; Durbin et al., 1990; Edwards et al., 1986; Varki et al., 1984; Momburg et al., 1987; Simon et al., 1990; Litvinov et al., 1994; Szala et al., 1990; Calabrese et al., 2001).

1.3.2.1 Expressionsmuster des EpCAM-Proteins

EpCAM wird vor allem auf der Zelloberfläche stark proliferierender Epithelien exprimiert. Es läßt sich auf nahezu allen iso- und hochprismatischen Epithelien, u.a. der Mucosa des Gastrointestinaltraktes, der Mucosa des tiefen Respirationstraktes, dem Stratum basale der Epidermis, dem Follikelepithel der Schilddrüse, den Gallengangsepithelien, dem Urothel, aber auch auf den Inselzellen des Pankreas, den Oozyten, und einer Vielzahl weiterer Gewebe nachweisen (Momburg et al., 1987; Klein et al., 1987; Tsubura et al., 1992; Zorzos et al., 1995; Cirulli et al., 1998; Balzar et al., 1999). Auch während der Embryonalentwicklung wird es temporär exprimiert. So ist es auf hepatozytären Vorläuferzellen nachweisbar, auf adulten Hepatozyten jedoch nicht (De Boer et al., 1999). Während der Entwicklung der Inselzellen des Pankreas wird es ebenfalls stark exprimiert, auf adulten Inselzellen hingegen wesentlich schwächer (Cirulli et al., 1998).

Platteneithelien sind EpCAM-negativ, interessanterweise kommt es zu einer *de novo* Expression von EpCAM in Plattenepithelkarzinomen, die einhergeht mit einer erhöhten Proliferation und Dedifferenzierung (Litvinov et al., 1996; Balzar et al., 1999). EpCAM ist somit ein tumorassoziiertes Antigen, aufgrund seiner Expression auf allen Karzinomen wird es mitunter auch als pan-Karzinom-Antigen bezeichnet (Roovers et al., 1998). Diese Eigenschaften machen EpCAM sowohl als Zielmolekül für die Differentialdiagnostik maligner epithelialer Erkrankungen (Ryan et al., 1997; Chaubal et al., 1999; Poczatek et al., 1999) als auch für die Therapie derselbigen sehr attraktiv. So kommen inzwischen sowohl monospezifische, als auch bispezifische mAk, die gegen EpCAM gerichtet sind, zum therapeutischen Einsatz

(Riethmüller et al., 1994; Mack et al., 1997; Braun et al., 1999; Basak et al., 2000; Schwartzberg, 2001) bzw. sind in der vorklinischen Erprobung (Zeidler et al., 1999; Zeidler et al., 2000). Kürzlich konnten vielversprechende Ergebnisse beim Einsatz solch eines bispezifischen mAk bei Patienten mit malignem Aszites bei Peritonealkarzinose erreicht werden (Heiss et al., 2005).

1.3.2.2 Morphologie des EpCAM-Proteins

EpCAM ist ein membranständiges Oberflächenmolekül bestehend aus 314 Aminosäuren (AS). 23 AS bilden dabei das Signalpeptid, 242 AS die extrazelluläre Domäne, 23 AS die Transmembran-Domäne und 26 AS die intrazelluläre Domäne (Balzar et al., 1999). In Abhängigkeit der N-Glykosylierungen seiner Extrazellulardomäne kann EpCAM ein Molekulargewicht von 38 kDa, 40 kDa oder 42 kDa aufweisen (Thampoe et al., 1988; Perez et al., 1989; Litvinov et al., 1994). Bezüglich der Tertiärstruktur von EpCAM werden derzeit 3 Modelle diskutiert (vgl. **Abbildung 3**):

- A) „Loop-like“-Modell nach Schön (Schön et al., 1993)
- B) „Tandem-EGF-like-motif“-Modell nach Balzar (Balzar et al., 1999)
- C) „Disulfid-Bindungs“-Modell nach Chong (Chong et al., 2001)

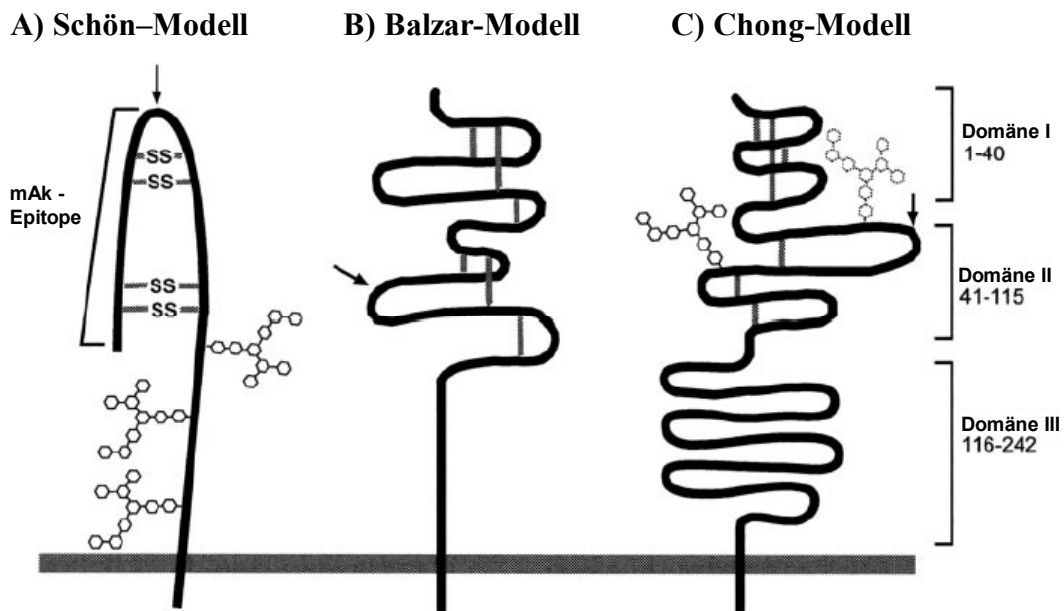


Abbildung 3: Konformationsmodelle des EpCAM Moleküls (Chong et al., 2001)

Die Pfeile markieren jeweils die Proteolyse-sensitiven Stellen an Position Arg⁵⁷/Arg⁵⁸, die alle Modelle gemeinsam haben. Die durch Hexagone skizzierten Seitenketten kennzeichnen die Glykosylierungsstellen. Disulfidbindungen sind als Linien dargestellt.

1.3.2.3 Funktion des EpCAM-Proteins

In Anlehnung an seine einzig direkt nachweisbare Funktion, nämlich als homophiles Adhäsionsmolekül auf der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen, wurde EpCAM unter diesem Namen erstmals 1994 beschrieben (Litvinov et al., 1994).

Da EpCAM-Moleküle untereinander Bindungen eingehen, wird EpCAM als homophiles Zelladhäsionsmolekül bezeichnet (Litvinov et al., 1994). Die Bindung ist Ca^{2+} -unabhängig und kann sowohl zwischen Molekülen auf derselben Zelle als auch interzellulär stattfinden (Litvinov et al., 1994; Balzar et al., 1999). Unter Zugrundelegung des Konformationsmodelles nach Balzar wird die interzelluläre Bindung durch das distale EGF-ähnliche Motiv, die Interaktion auf derselben Zelle durch das proximale EGF-ähnliche Motiv vermittelt (Balzar et al., 2001). In diesem Zusammenhang spielt auch die zytosolische (intrazelluläre) Domäne eine entscheidende Rolle, da sie die Bindungen, welche die Extrazellulärdomäne eingeht, stabilisiert, indem sie EpCAM am Zytoskelett verankert (Balzar et al., 1998). Verantwortlich hierfür sind zwei Bindungsstellen am carboxyterminalen Ende EpCAMs, die an α -Actinin binden (Balzar et al., 1998). Die durch EpCAM vermittelten Adhäsionen zeichnen sich durch eine große Stabilität aus, verglichen mit anderen Adhäsionsmolekülen wie bspw. den Cadherinen (Litvinov et al., 1994).

Es gibt noch weitere Effekte, die in Zusammenhang mit EpCAM genannt werden müssen. Bei diesen ist allerdings weder bekannt, ob es sich um direkte, also über die Induktion von Signalkaskaden vermittelte, oder indirekte Wirkungen handelt. So scheint die Expression von EpCAM auf Tumorzellen antimetastatisch zu wirken. Bei Larynx-Karzinomen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Expression EpCAMs auf dem Primärtumor mit der Metastasierung in Lymphknoten korreliert (Takes et al., 1997). Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Expression EpCAMs auf zirkulierenden Tumorzellen im Blut an Karzinomen erkrankter Patienten deutlich schwächer ist, verglichen mit der Expression auf Zellen der histologischen Probe des Karzinomgewebes (Rao et al., 2005). Experimentell wird dies unterstrichen durch die Tatsache, dass die Transfektion von EpCAM in murine Tumorzellen eine Inhibition der Metastasierung, im Vergleich zu nicht transfizierten murinen Tumorzellen, bewirkt (Basak et al., 1998).

Die Hyper- bzw. *de novo* Expression EpCAMs korreliert mit erhöhter Proliferationsrate und der Dedifferenzierung von Zellen (Zorzos et al., 1995; Litvinov et al., 1996; High et al., 1996). EpCAM ist ebenfalls in die Embryonalentwicklung involviert. So wird EpCAM in Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung wie bspw. der Zellen der Lunge (Kasper et al., 1995), der Inselzellen des Pankreas (Cirulli et al., 1998) und der Hepatozyten (De Boer et al., 1999) genannt, wo es jeweils temporär exprimiert wird (Balzar et al., 1999).

Die Behandlung humaner fetaler Pankreaszellen mit einem gegen EpCAM gerichteten Antikörperfragment führte zur Transkription und Translation der Gene für Insulin und Glukagon (Cirulli et al, 1998), was eine Induktion entsprechender Signalkaskaden durch EpCAM wahrscheinlich macht.

In unserer Arbeitsgruppe konnte Dr. M. Münz zeigen, dass EpCAM über die Induktion von c-myc einen verstärkten Zellmetabolismus und eine erhöhte proliferative Aktivität vermittelt (Münz et al., 2004).

1.3.3 Kontrolle der eukaryotischen Transkription

Höhere eukaryotische Organismen zeichnen sich durch eine Zell- bzw. Gewebsvielfalt aus, welche durch die differentielle Expression des Genoms zustandekommt. Die Regulation der Aktivität einzelner Gene kann auf mehreren Ebenen stattfinden. Der Transkription des Gens, also das Ablesen der DNA und die Synthese der mRNA durch die RNA-Polymerase II, kommt dabei eine besonders wichtige Rolle zu. Unter physiologischen Bedingungen liegt die genomische DNA als hochkondensierte 30 nm Fibrille vor, in enger Bindung an Histon-Proteine. Erst die Lösung dieser Bindung und die anschließende Dekondensation der DNA ermöglichen die Anlagerung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren an die DNA und damit die Initiation der Transkription.

Die Transkriptionsfaktoren lagern sich dabei bevorzugt an bestimmte Stellen auf einer, dem Gen vorgeschalteten DNA-Sequenz an, die als Promotor bezeichnet wird. Anhand spezifischer Konsensussequenzen innerhalb des Promotors lassen sich die Promotoren in zwei funktionelle Gruppen einteilen:

1. Promotoren für Gene, die nur bei Bedarf transkribiert werden (regulierte Promotoren).
2. Promotoren für Haushaltsgene, also für Gene die konstitutiv aktiv sind (konstitutive Promotoren).

Charakteristisches Merkmal für Ersterer ist ein thymin- und adeninreicher Bereich ca. 20 Basenpaare vor (5') dem eigentlichen Transkriptionsstartpunkt. An diesen, auch als TATA-Box bezeichneten Bereich, bindet der Transkriptionsfaktor TFIID mit einer Untereinheit, die als „tata-binding protein“ (TBP) bezeichnet wird. Mit dieser Bindung wird eine Kaskade weiterer Anlagerungen von Transkriptionsfaktoren ermöglicht, die zusammen mit der RNA Polymerase II den Initiationskomplex bilden. Der Initiationskomplex ist ein Multiproteinkomplex zu dem neben der RNA Polymerase II noch die Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE und TFIIF gehören. Erst durch die Bildung des Initiationskomplexes startet die eigentliche mRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II.

Promotoren von Haushaltsgenen hingegen fehlt die TATA-Box. Der Initiationskomplex wird hier an einer GC-reichen Sequenz ca. 40 Basenpaare vor dem eigentlichen Transkriptionsstartpunkt gebildet. Diese Sequenz wird als GC-Box bezeichnet, sie lässt sich allerdings auch bei den regulierten Promotoren finden. An die GC-Box bindet das Specificity protein 1 (Sp1). An dieses kann sich nun der Transkriptionsfaktor TFIID direkt, oder indirekt über ein Protein aus der TAF-Familie (TATA-binding protein associated factor) anlagern. Nach Anlagerung von TFIID kommt es analog der regulierten Promotoren zur sequentiellen Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren und damit zum Start der Transkription.

Die Ausbildung des Initiationskomplexes und der Start der Transkription sind schematisch in **Abbildung 4** dargestellt.

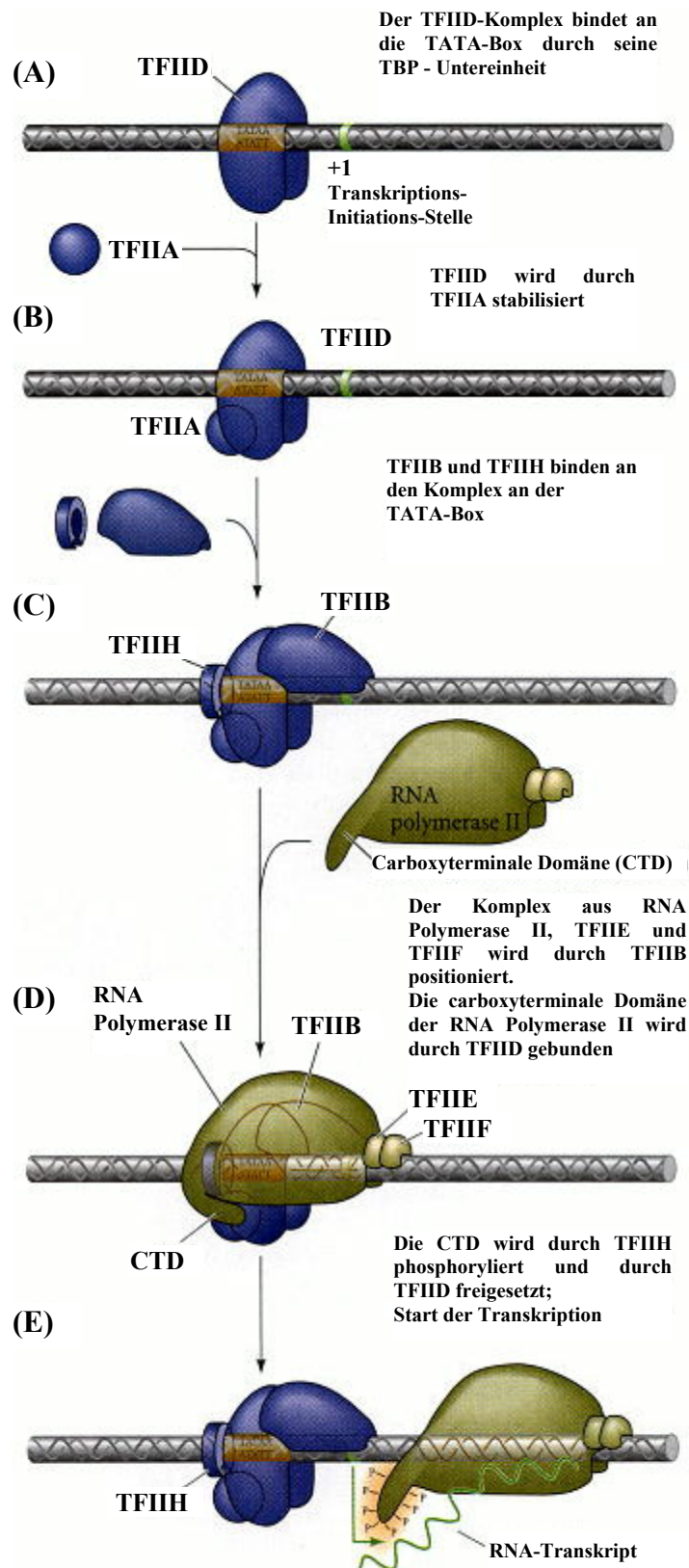


Abbildung 4: Ausbildung des Initiationskomplexes
(Gilbert SF, 2000, .Developmental Biology. 6th ed.)

Zusätzlich zur TATA-Box bzw. GC-Box kommen in Promotoren Sequenzen vor, die regulatorisch wirken, jedoch nicht an der Bildung des Initiationskomplexes beteiligt sind. Sie befinden sich 5' von der TATA- bzw. GC-Box. An sie können sich sogenannte **URFs** anlagern (Upstream regulatory factors). Zu diesen Regulationssequenzen gehört u.a. eine Sequenz, die als CAAT-Box bezeichnet wird und ca. 70 bp 5' des Transkriptionsstartpunktes gefunden werden kann. Sie dient als Bindungssequenz für Transkriptionsaktivatoren wie des „CAAT-Box binding protein“ (CBP).

Neben den beschriebenen Sequenzen innerhalb des Promotors gibt es noch Sequenzen, die mehrere hundert Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen können und die Transkription regulieren. Diese, als cis-regulierende-Elemente bezeichneten Sequenzen lassen sich in Enhancer (Verstärker) und Silencer (Repressor) unterteilen.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass es weitere Mechanismen, wie DNA-Methylierung, posttranskriptionelle RNA-Modifikation, Regulation der Translation und posttranslationale Proteinmodifikation gibt, um die Expression bzw. die Aktivität eines Genes zu regulieren (Alberts et al., 1995; Löffler et al., 1997; Lodish et al., 1999; Gilbert SF, 2000).

1.3.4 Der EpCAM-Promotor

Über die Regulation EpCAMs bzw. des EpCAM-Promotors ist sehr wenig bekannt. Obwohl 440 bp des EpCAM Promotors kloniert und sequenziert wurden (Linnenbach et al., 1993), ist über die Aktivierung oder Repression des Promotors bislang nichts publiziert.

Die 440-bp-Sequenz weist Konsensussequenzen für SP-1 und AP-1 auf, eine TATA-Box wurde nicht identifiziert (Linnenbach et al., 1993). AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der v.a. die Transkription von Genen, die den Zellzyklus und die Zellproliferation regeln, moduliert (Shaulian et al., 2001). Weitere wichtige Motive, wie bspw. eine CAAT-Box, sind nicht beschrieben (Linnenbach et al., 1993).

Der schematische Aufbau der 440-bp-Promotorsequenz ist in **Abbildung 5** grafisch dargestellt. Eingezeichnet sind die SP-1 und AP-1-Konsensussequenzen. Der Beginn des EpCAM-Genes wird durch den roten Pfeil rechts markiert.

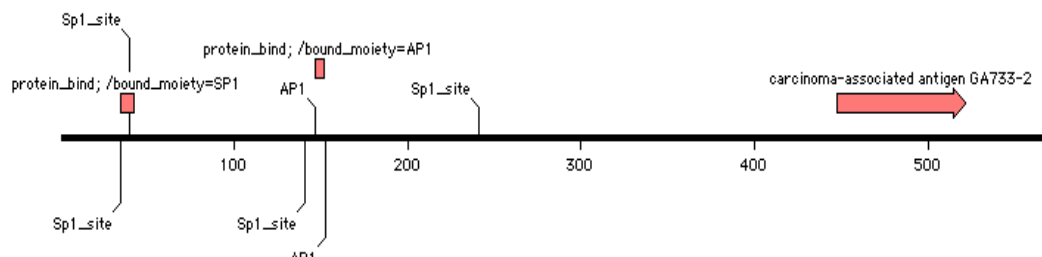


Abbildung 5: Schematische Darstellung des EpCAM-Promotorfragmentes (generiert mit der Software Mac Vektor 6.5)

Mehr ist bislang über den EpCAM-Promotor nicht bekannt. Aus dem streng vom Zelltyp abhängigen Expressionsmuster EpCAMs läßt sich zwar ableiten, daß der Promotor ebenfalls streng reguliert wird, Beweise hierfür stehen aber noch aus. Warum EpCAM insbesondere bei epithelialen Malignomen überexprimiert wird und wie es zur Transkription EpCAMs kommt, ist ebenfalls nicht bekannt.

Aus der Entschlüsselung dieses Regulationsmechanismus ließen sich möglicherweise neue therapeutische Strategien zur Behandlung epithelialer Malignome ableiten.

1.4 Aufgabenstellung

Da über die Regulation der Expression EpCAMs nahezu nichts bekannt ist, war das Ziel meiner Arbeit die Funktionsanalyse des bisher bekannten 440-bp-Promotorfragmentes.

Dazu gehörte die Etablierung eines zellulären Systems zur Messung der transkriptionellen Aktivität der 440-bp-Promotorsequenz. Basis hierfür sollte der Luziferase-Assay sein, wofür zunächst ein Luziferase-Reporterplasmid generiert werden sollte, das unter transkriptioneller Kontrolle des EpCAM-Promotorfragmentes steht. Hierfür sollte das bekannte Promotorfragment in ein Standard-Luziferase-Reporterplasmid kloniert werden.

Mit Hilfe dieses Reporterplasmides sollte die transkriptionelle Aktivität des Promotorfragmentes nach Transfektion in EpCAM-positive und -negative Zelllinien studiert werden. Insbesondere der Einfluß der kanzeromodulierenden Substanzen TNF α und TPA auf die Aktivität des Promotorfragmentes sollte untersucht werden.

Zusätzlich war, ausgehend von der bisher bekannten 440-bp-Promotorsequenz, die Isolation und Klonierung weiterer Promotorsequenzen aus einer humanen genomischen DNA-Bank, geplant. Mit Hilfe von Primern, die in der bisher bekannten Promotorsequenz binden, sollte durch PCR ein größerer Promotorbereich identifiziert und isoliert werden.

2 Material

2.1 Geräte

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Schüttelinkubator- „Certomat“

Beckman Coulter Inc., Fullerton Canada

Ultrazentrifuge

Becton Dickinson Biosciences, San Jose USA

Durchflußzytometer – „FACS Calibur“

Biometra, Göttingen

Gelelektrophorese-Apparatur, Thermocycler

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Elektroporationsgerät – „Gene Pulser“

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Thermomixer, Pipetten

Heraeus , München

Bakterieninkubator, Sterilwerkbank, Tischzentrifuge, Zellinkubator

Hettich

Kühlzentrifuge

Knick, Berlin

pH-Meter

Mettler Toledo, Greifensee

Feinwaage

Owl Scientific

Spannungsgerät

Perkin Elmer, USA

Luminometer

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Photometer

Sartorius GmbH, Göttingen

Waage

Zeiss, Göttingen

Fluoreszenzmikroskop

2.2 Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Trisma Base

Fermentas, St. Leon-Rot

Desoxyribonukleotidtriphosphate, PCR-Puffer (10x), Magnesiumchlorid (10x)

Gibco BRL, Berlin / Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Agar, Hefeextrakt, Lipofectamin, PBS-Tabletten, Trypton

E. Merck AG, Darmstadt

Butanol, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Dimethylsulfoxid, Ethanol,

Ethylendiamintetraacetat, Glycerin, Glycylglycin, Isopropanol, Kaliumacetat,

Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat,

Manganchlorid, Natriumchlorid, Saccharose, Triton-X-100

PAA Laboratories GmbH, Linz

Trypsin/EDTA

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Adenosintriphosphat, Luciferin, TriPure

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Natriumacetat, Phenol

Serva, Heidelberg

Calciumchlorid, Ethidiumbromid, Xylenyanol

Sigma, München

Agarose, Dithiothreitol, N-Morpholinolpropansulfonsäure

2.3 Oligonukleotide

ARK Scientific - Darmstadt

5'-Primer / **Ep-PRO-Up**: 5'-CCGAGCTCGATCCCTAACGCCGCCATGGAG-3'

3'-Primer / **Ep-PRO-Down**: 5'-CCCTCGAGTGCCCCCAGCCCAGCCC-3'

=> Amplifikat: 570 bp große Sequenz, die das bekannte 440-bp-EpCAM-Promotorfragment und einen Bereich von Exon 1/ Exon 2 enthält.

5'-Primer / **Exon1-Start** 5'-GCGCAGCATGGCGCCCCCGCAGGTCCT-3'

3'-Primer / **Exon1-End** 5'-CTTCCTGAGCTGCGGCAAAAGTC-3'

=> Amplifikat: 90 bp große Sequenz, die innerhalb von Exon-1 des EpCAM-Gens liegt.

5'-Primer / **Intron1-Start** 5'-CTCTGCTCCAATCCGCGCCTCAC-3'

3'-Primer / **Intron1-End** 5'-TGCCCCCAGCCCAGCCCAGCTCCACAA-3'

=> Amplifikat: 100 bp große Sequenz, die innerhalb von Intron-1 des EpCAM-Gens liegt.

2.4 Enzyme

Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsendonukleasen, Taq-DNA-Polymerase

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Alkalische Phosphatase, Lysozym, RNase A

2.5 Medien

Biochrom, Berlin

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)

Gibco BRL, Berlin / Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Optimem I

2.6 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
α -EpCAM (C215)	Dr. H. Lindhofer (GSF, München)
α -Actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
α -EGF-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
α -MHC-I	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
α -Maus-IgG-FITC*	Jackson Immuno Research Laboratories Inc. West Grove (PA), USA
α -Maus-IgG-HRP**	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

* FITC konjugierter Antikörper (AK) , ** HRP konjugierter AK; jeweils zum Einsatz als Sekundär-AK.

2.7 Plasmide

BD Biosciences Clontech, Heidelberg

pEGFP-C1: GFP-Expressionsplasmid

Promega Corporation, Madison, WI

pGL3-Basic Vector: Standard-Luciferase-Reporterplasmid

Dr. B. Sugden

NF- κ B-Luc: NF- κ B- Reporterplasmid (Mitchell et al.,1995).

Dr. A. Kieser,_(Kieser et al.,1999)

TRADD-DN: Expressionsplasmid - TRADD dominant negativ

TRAF2-DN: Expressionsplasmid - TRAF2 dominant negativ

DN-I κ B: Expressionsplasmid - NF- κ B-Inhibitor (I κ B) dominant negativ.

Dr. F. Kohlhuber

p300/CBP: Expressionsplasmid für die Histon-Acetyltransferase p300/CBP.

Dr. A. Linnenbach (Linnenbach et al., 1993)

22RS Plasmid, das die 440-bp-Promotorsequenz und einen Teil des Anfangbereiches des EpCAM-Gens enthält (Gesamtgröße 570 bp).

2.8 Gen-Bibliotheken

Die Genbibliotheken wurden allesamt über das

„Ressourcenzentrum / Primärdatenbank im deutschen Humangenomprojekt am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin“ (RZPD)

bezogen.

RPC11 (RZPD Nr. 704)

Aus humanen Blutzellen generierte genomische DNA-Bibliothek.

Vektor: pCYPAC2 Resistenz: Kanamycin Wirtstamm: E.coli DH10B

RPC16 (RZPD Nr. 709)

Aus humanen Blutzellen generierte genomische DNA-Bibliothek.

Vektor: pPAC4 Resistenz: Kanamycin Wirtstamm: E.coli DH10B

2.9 Bakterielle Einzelklone

Durch Onlinerecherche konnten zwei verschiedene E.coli-Klone ausfindig gemacht werden, die in sich ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) tragen, in dem sowohl der Anfangsbereich des EpCAM-Genes und mehrere Kilobasen vor dem Transkriptionsstartpunkt enthalten sind.

Die Klone können unter folgenden Katalognummern von Research Genetics, Huntsville, USA, bezogen werden. In Klammer ist jeweils die standardisierte Klonbezeichnung des **NCBI** (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) angegeben:

Cat.No. **RPCI-11.C-18K13** (RP11-18K13)

Cat.No. **RPCI-11.C-433O3** (RP11-433O3)

Vektor: pBACe3.6 Resistenz: Chloramphenicol Wirtstamm: E.coli DH5alpha

2.10 Zelllinien

- ANT-1 humane Hypopharynxkarzinom Zelllinie (in unserem Labor etabliert);
EpCAM positiv
- FaDu humane Hypopharynxkarzinom-Zelllinie (Rangan, 1972) ;
EpCAM positiv
- GHD-1 humane Hypopharynxkarzinom Zelllinie (in unserem Labor etabliert);
EpCAM positiv
- HEK293 humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et. al., 1977);
EpCAM negativ

2.11 Sonstiges

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Hybond N+™- Transfermembran, Hybond-C extra™-Transfermembran , Sephadex-G50-Säule (Nick column)

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Einmalspritzen verschiedener Volumina

Becton Dickinson, San Jose USA

Kanülen - Microlance™ (21G und 25G)

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

Fermentas, St. Leon-Rot

PUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker

Genomed GmbH , Bad Oeynhausen

Ionenaustauschersäulen und Puffer für Plasmidpräparationen (JETSTAR Plasmid Purification Kit)

Gibco BRL, Berlin / Invitrogen GmbH, Karlsruhe

1 kB – DNA – Marker

Greiner GmbH, Nürtingen

Plastik-Reagenzgefäße 10 und 50 ml, verschiedene Zellkulturflaschen,

96-Well-Platten, 6-Well-Platten

Millipore GmbH, Eschborn

Immobilon-P - Transfermembran

Nunc GmbH, Wiesbaden

CryoTubes 2 ml, Impfnadeln und -ösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen,

Zellkulturschalen

Roche Diagnostics, Mannheim

High Pure RNA Isolation Kit

3 Methoden

Eventuell nicht erwähnte Methoden wurden in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

3.1 Funktionelle Untersuchung der 440-bp-Promotorteilsequenz

3.1.1 Generierung eines EpCAM-Promotor-Reporterplasmides

3.1.1.1 Amplifikation des EpCAM-Promotorfragmentes durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Bereichen benutzt. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Amplifikation einer DNA-Sequenz, welche an ihrem (+)-Strang und ihrem (-)-Strang jeweils von komplementär homologen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, flankiert wird. Durch geeignete Wahl der Primer, kann somit theoretisch jede beliebige DNA-Sequenz vervielfältigt werden. Der Ablauf der verschiedenen Reaktionsschritte sieht dabei wie folgt aus:

Reaktionsschritt	Temperatur
1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize (= <i>Template-DNA</i>) in zwei Einzelstränge	94 °C
2. Anlagerung (= Annealing) der Primer an homologe Bereiche der nun einzelsträngigen Matrize (<i>der Temperaturbereich ist dabei abhängig von der Basen-sequenz der Primer</i>)	40 °C-60 °C
3. Synthese : Kopie der Matrize durch Strangverlängerung vom Primer ausgehend mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase, wie bspw. Taq-Polymerase (<i>die Temperatur dieses Reaktionsschrittes wird durch das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase bestimmt</i>)	72 °C

Durch 30– bis 40-faches Wiederholen dieses Zyklus wird die exponentielle Amplifikation der DNA-Matrize erreicht. Zur Optimierung der PCR werden sowohl der initiale Denaturierungsschritt, als auch der letzte Syntheseschritt üblicherweise über eine längere Dauer als innerhalb der regulären Zyklen durchgeführt. Damit wird initial eine bessere Trennung der DNA-Einzelstränge sowie eine Verminderung der beim Annealing störenden Sekundärstrukturen erreicht. Die Verlängerung des letzten Syntheseschrittes soll sicher stellen, daß auch alle begonnenen Amplifikate bis zur vollen Länge elongiert werden.

In dieser Arbeit wurde die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Hitzedenaturierung	94 °C	5 min.
1. Hitzedenaturierung	94 °C	1 min.
2. Anlagerung	60 °C	1 min.
3. Synthese	72 °C	1 min.
Finaler Syntheseschritt	72 °C	10 min.

} 30 Zyklen

Der Reaktionsansatz (Vgl. nachfolgende Tabelle) wurde auf Eis pipettiert und die DNA-Matrize unmittelbar vor Reaktionsbeginn zugegeben. Als Matrize wurde das Plasmid 22RS, welches die 440-bp-Promotorsequenz enthält, verwendet.

PCR Puffer (10 x)	5,0 µl
dNTP (2 mM)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 µl
Taq Polymerase (1U/µl)	1,0 µl
Ep-PRO-Up (50 pM)	1,0 µl
Ep-PRO-Down (50 pM)	1,0 µl
DMSO	2,5 µl
Aqua bidest	26,5 µl
Template-DNA (200 ng)	5,0 µl
Volumen pro Ansatz	Σ = 50,0 µl

Durch die benutzten Primer wurden dem Amplifikat am 5'-Ende eine *SacI* – Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XhoI* – Schnittstelle angefügt.

3.1.1.2 Isolation des Fragmentes durch Agarose-Gelelektrophorese:

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Agarose-Gelen geeigneter Konzentration aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei dem Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportional. Die Agarosekonzentration eines Gels betrug zwischen 0,7% und 2%. Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und sollte etwa 3V/cm betragen. Zum Nachweis der Nukleinsäuren wurde das Gel nach dem Lauf für 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (40 ng/ml) inkubiert und unter UV Licht betrachtet.

- *Laufpuffer: 1xTBE (45mM Tris-Borat, 1mM EDTA)*

- *Ethidiumbromidlösung: 40 ng/ml Ethidiumbromid in 1xTAE Puffer*

3.1.1.3 Fragmentaufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Fluoreszenz mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend zur Homogenisierung mit Hilfe einer Spritze durch eine Kanüle (25G) gepresst. Zur Isolierung der Nukleinsäuren aus den so gewonnenen Gelfragmenten wurden diese mit einem Volumen Phenol-Chloroform versetzt und gründlich gemischt (Vortex). Diese Mischung wurde zur besseren Freisetzung der DNA aus den noch vorhandenen Gelstückchen zweimalig bei – 80°C tiefgefroren und wieder aufgetaut. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich die enthaltenen Proteine zwischen beiden Phasen, in der sog. Interphase, anordnen. Nach anschließender Zentrifugation bei 15.000 rpm für ca. 20 Minuten wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Durch die erneute Zugabe von einem Volumen Chloroform wurde die wässrige Lösung von restlichem Phenol befreit. Nach gründlichem Vortexen beider Phasen und erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und eine Isopropanol-Natriumacetat-Fällung durchgeführt.

3.1.1.4 Isopropanol-Natriumacetat-Fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen muß ihnen die Hydrathülle entzogen werden. Dazu wurde die Lösung mit 0,1 Vol. 3M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt, mit dem 2-fachen Volumen 96% Ethanol, oder dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol vermischt und 20 Minuten inkubiert. Die Fällung erfolgte bei RT oder bei -20°C. Anschließend wurden die Nukleinsäuren 15 Minuten bei 15.000 rpm pelletiert und mit 1 Vol. 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen TE oder Aqua bidest. aufgenommen.

3.1.1.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Mit Entdeckung der Restriktionsendonukleasen (Arber, 1978), die in vielen Bakterienstämmen vorkommen und der Abwehr von Fremd-DNA (bspw. von Phagen) dienen, ist es möglich dsDNA zu spalten. Die am häufigsten verwendeten Enzyme vom Typ II, die auch in den Experimenten dieser Arbeit benutzt wurden, spalten sequenzspezifisch. Die Erkennungssequenz - bei Typ II – Endonukleasen identisch mit der Spaltungssequenz - ist dabei immer ein Palindrom meist aus 4 – 8 bp, d.h. die Sequenz (5' → 3') ist auf beiden Strängen identisch. Die durch die Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente können unter geeigneten Bedingungen durch Basenpaarung wieder zu einem Doppelstrang verknüpft werden. Die noch offenen Phosphodiester-Bindungen können *in vitro* mit Hilfe von DNA-Ligasen wieder geschlossen werden (Vgl. Ligation).

Durchführung: Für die weitere Klonierung des EpCAM-Promotor-Fragmentes wurde das EpCAM-Promotor-fragment-Amplifikat mit **SacI** und **XhoI** geschnitten. Die Restriktionsspaltungen wurden entsprechend der Herstellerangaben (Fermentas) in Ansatzvolumina zwischen 10 µl und 20 µl durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Pufferoptima fanden die Spaltungen sequentiell statt. Zwischen beiden Spaltungen wurde die DNA gefällt und nach Lösung in einem geeigneten Volumen H₂O erneut geschnitten.

Pro Spaltung wurden 1 µg DNA und 1 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die eigentliche Reaktion wurde bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt, anschließend noch aktives Enzym bei 65°C für 20 Minuten inaktiviert.

Erkennungs- / Schnittsequenz von **SacI**:

5'-G A G C T[^]C-3'

3'-C[^]T C G A G-5'

Erkennungs- / Schnittsequenz von **XhoI**:

5'-C[^]T C G A G-3'

3'-G A G C T[^]C-5'

Analog der oben beschriebenen Verfahrensweise wurde auch der Luziferase-Vektor **pGL3-Basic** mit **SacI** und **XhoI** geschnitten.

Das Ergebnis der Restriktionsschritte wurde jeweils mit einem analytischen Gel überprüft.

3.1.1.6 Dephosphorylierung von Vektoren

Zur Verhinderung der Spontanreligation wurde der Vektor nach der thermischen Inaktivierung der Restriktionsendonuklease dephosphoryliert. Dazu wurde dem Ansatz 1 U alkalische Phosphatase und 1/10 Volumen 10x Puffer hinzugefügt. Nach 30 min. Inkubation bei 37°C wurde die überschüssige Phosphatase für 10 min bei 65°C inaktiviert.

3.1.1.7 Klonierung des 440-bp-Fragmentes in den Luciferase-Vektor pGL3-basic

Die Ligation bezeichnet die enzymatische Verknüpfung eines unterbrochenen DNA-Strangs mit einer komplementären DNA-Sequenz durch eine Ligase. Die Ligation wird zur Zirkularisierung geschnittener Plasmide oder zur Rekombination eines Vektors mit einem DNA-Fragment eingesetzt. Für diesen Zweck sollten aus Kompatibilitätsgründen (Vektor zu DNA-Fragment), die zu verknüpfenden Enden der DNA-Stücke komplementäre Sequenzen besitzen.

Die Ligation wurde in einem Volumen von 10µl durchgeführt mit 100 ng geschnittener Vektor-DNA und 100 ng geschnittenem 570bp-Fragment, 1 Weiss U T4-DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligase Puffer, bei 16°C über Nacht. Zur Vermehrung und Analyse wurde der gesamte Ligationsansatz in chemisch kompetente E.Coli (DH5α) transformiert.

3.1.1.8 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation bezeichnet bei Bakterien oder bei niederen Eukaryonten das passive Einbringen von Fremd-DNA in diese Organismen. Entsprechend vorbehandelte Bakterien - sogenannte kompetente Bakterien - sind in der Lage, Plasmide aus Ihrem umgebenden Medium aufzunehmen.

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* -Stämme erfolgte durch Inkubation einer *E. coli* DH5α Kultur in TFB-Puffer auf Eis (Hanahan, 1991). Zu einem Aliquot (250µl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50ng eines Ligationsansatzes bzw. 1ng Plasmid-DNA und 7µl DMSO pipettiert. Anschließend folgte ein 2-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nach Zugabe von glukosesupplementiertem (10mM) SOB-Medium und einer 60-minütigen Anzucht bei 37°C im Thermomixer wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 U/min), und der Überstand bis auf 50 µl verworfen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

- TFB Puffer: 10mM K-Mes pH 6,2, 50mM CaCl₂, 45mM MnCl₂, 100mM RbCl

- SOB-Medium: Bacto-Trypton (20g), Bacto-Hefeextrakt (5g), NaCl (0,5g), 10mM MgCl₂, add 950ml H₂O.

3.1.1.9 Vermehrung des EpCAM-Promotor-Luciferase-Vektors in E.Coli

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum in geeigneter Konzentration zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde 1ml einer Bakterienkultur mit einer optischen Dichte (OD) von 0,4–0,6 (bei 600 nm) mit 10% DMSO versetzt und bei -80°C in einem Kryogefäß aufbewahrt.

Entsprechend der Antibiotika-Resistenz des Vektors, wurden die transformierten E.Coli in einem Gesamtansatz von 800 ml mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator angezüchtet.

- LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl

- Bacto-Agar Platten: 15g Bacto-Agar ad 1l LB-Medium

3.1.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die alkalische Lyse stellt ein Verfahren zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen dar (Birnboim et al., 1979, 1983). Nach Zellwandlyse (alkalischer Puffer) werden durch Absenkung des pH-Wertes bakterielle Proteine und genomische DNA ausgefällt, wohingegen Plasmid-DNA in Lösung bleibt, welche über anschließende Reinigungsschritte isoliert, oder direkt mit Isopropanol ausgefällt werden kann.

Die Plasmid-Präparation wurde entsprechend der Herstellerangaben des Plasmidpräparationskits (Genomed) durchgeführt, und die Plasmide anschließend entweder über die mitgelieferten Anionenaustauschersäulen des Kits bzw. über CsCl-Gradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt.

3.1.2 System zur Messung der EpCAM-Promotorfragment-Aktivität

3.1.2.1 Transiente Transfektion

Die Transfektionen in dieser Arbeit wurden transient, als Lipofektion (Felgner et al., 1987) mit Hilfe des Lipofectamin-Reagens durchgeführt.

Bei der Lipofektion wird die zu transferierende DNA mit Hilfe von Liposomen, also artifiziellen Lipidvesikeln, in die Zielzelle geschleust. Bei der hier benutzten kationischen Lipid-Methode bilden die Liposomen mit der DNA einen Komplex (Mannino et al., 1988), der von den Zielzellen mit relativ hoher Effizienz aufgenommen wird.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in einer 6-Loch Platte ausgesät (5×10^5 pro Loch) und über Nacht in DMEM (mit 10% FCS) kultiviert. Die anschließende Transfektion erfolgte mit-

tels Lipofectamin in serumfreiem Medium (Optimem I), entsprechend den Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurden je 0,5 µg der zu untersuchenden Plasmides, und 0,5 µg GFP-Expressionsplasmid (GFP = Green Fluorescence Protein) transfiziert. Durch die Kotransfektion mit dem GFP-Expressionsplasmid konnte am darauffolgenden Tag die Transfektionseffizienz bequem über die GFP-Expression, die unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt wurde, bewertet werden. Die Transfektionseffizienz lag dabei, je nach verwendeter Zelllinie, zwischen 20 % und 40 %.

3.1.2.2 Luciferase-Assay

Zur Untersuchung der Genexpression in eukaryontischen Zellen, hat sich der Luciferase-Assay, nicht zuletzt wegen seiner Sensitivität (Pazzagli et al., 1992), als viel benutzte Methode etabliert. Basis des Luciferase-Assays ist die Biolumineszenz, die bei folgender Reaktion (mit Mg^{2+} als Cofaktor) entsteht:

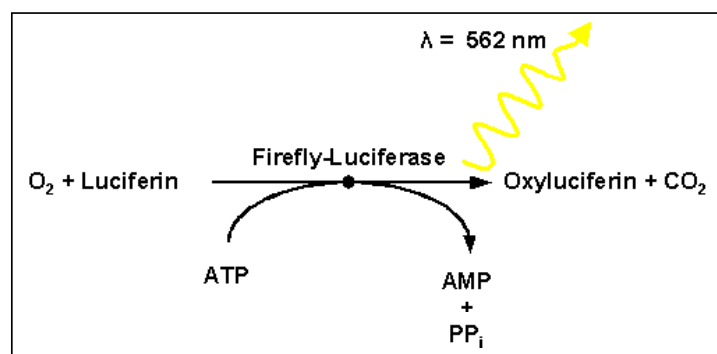


Abbildung 6: Bioluminiszenzreaktion

Das Enzym Luciferase wurde ursprünglich aus verschiedenen Glühwürmchen-Species (bspw. *Photinus pyralis*) und Leuchtkäfern (engl. *firefly*; bspw. *Pyrophorus plagiophthalmus*) isoliert. Es kommt in Säugerzellen nicht vor. Luciferase-Systeme, die auf diesen Enzymen basieren, werden als Firefly-Luciferase-Systeme bezeichnet (Ibelgaufts, 1993). Auch in dieser Arbeit wurde dieses System benutzt.

Unter Einsatz eines Luminometers läßt sich die Intensität des bei oben beschriebener Reaktion emittierten Lichtes quantifizieren.

Durch Klonierung des Luciferase-Gens (*Luc*) in geeignete Vektoren ist die Erstellung eines Reporter-Gen-Systems möglich, in welchem die Transkription von *Luc* (bei entsprechender Klonierung) unter die Kontrolle einer frei wählbaren regulatorischen Sequenz (Promotor. Enhancer etc.) gestellt wird. Die Transkription, welche selbst ein Maß für die Repression oder Aktivierung der vorangestellten regulatorischen Sequenz darstellt, lässt sich mit Hilfe von Luziferin als Substrat dabei indirekt über die Lumineszenz erfassen.

Nach entsprechender Vorbehandlung wurden transient transfizierte Zellen jeweils nach folgendem Schema für die eigentliche Messung vorbereitet:

1. Abnahme des ursprünglichen Mediums und Resuspension der adhären Zellen mit PBS.
2. Überführung der Suspension in ein Zentrifugationsgefäß (15 ml) und Zentrifugation (10 min., 1.200 U/min., RT)
3. Dekantierung des Überstandes und Resuspension des Pellets in 1 ml PBS.
4. Überführung der Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) und erneute Zentrifugation (5 – 10 min., 4.000 U/min., 4°C).
5. Absaugen des Überstandes und anschließend Resuspension des Pellets in 100 µl Lysis-Puffer. Inkubation für 15 min. bei RT.
6. Erneute Zentrifugation (5 – 10 min., 13.000 U/min., 4°C) und Überführung des Überstandes in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Zur Messung wurden jeweils 10 µl des so gewonnenen Überstandes mit 150 µl Testpuffer in jeweils eine Vertiefung der Meßplatte des Luminometers gegeben. Nach Beschickung des Luminometers mit der Meßplatte wurde die Lumineszenzreaktion durch Zugabe des Substrates (50 µl Luciferin) gestartet und mit einer Latenz von 2 Sekunden für 10 Sekunden die Lumineszenz gemessen. Diese Schritte (Reaktionsstart und Messung) wurden von dem in dieser Arbeit benutzten Luminometer vollautomatisch durchgeführt. Jede Probe wurde doppelt angesetzt und gemessen.

- *Lysis-Puffer: 1% Triton X100, 100mM K₂PO₄ (pH 7,0), 1 mM DTT*

- *Testpuffer: 25 mM Glycylglycerin (pH 7,8), 5mM ATP, 15 mM MgSO₄*

- *Luciferin: 5 mg /ml*

3.1.3 Behandlung von Zellen mit TNF α - oder TPA

Für die Luziferase-Assays, FACS-Analysen, Immuno-Blots, MTT-Assays und die Fluoreszenzmikroskopie wurden verschiedene Zelllinien mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) behandelt. Zu diesem Zweck wurden zunächst 5×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinie über Nacht kultiviert, und anschließend das Medium abgenommen und durch Medium mit der entsprechenden Konzentration an TNF α oder TPA ersetzt. Die eingesetzten Konzentrationen und die Dauer der Exposition werden detailliert im Ergebnisteil bei den entsprechenden Experimenten erläutert.

3.1.4 EpCAM-Expression

3.1.4.1 FACS-Analyse

Mit Hilfe des Fluorescent activated cell sorting (FACS), einem durchflußzytometrischen Verfahren, läßt sich die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen einer Zellsuspension bestimmen. Nach Markierung des zu untersuchenden Moleküls mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (MAK), der entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert wird kann die Expression über die im Durchflußzytometer gemessene Fluoreszenz beurteilt werden.

Die Zellsuspension wird beim Meßvorgang durch eine Kapillare gepumpt, so daß ein Einzelzellfluß entsteht, der von einem Laserstrahl erfasst wird. Die Streustrahlung des Laserlichtes und die Fluoreszenz des durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffes lassen somit Rückschlüsse auf Zellgröße und Zellgranularität sowie auf die Expressionsrate des markierten Moleküls zu.

Durchführung: FaDu-Zellen (5×10^5 Zellen pro Ansatz) wurden bei 5.000 U/min für 5 min. bei RT abzentrifugiert und in FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluß daran folgte die Inkubation mit den markierenden MAK (Konzentration 4,5 mg/ml) für je 30 min. bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen in FACS-Puffer wurde die Messung mit Hilfe des Durchflußzytometers (FACS Calibur™- Becton Dickinson) durchgeführt. Bei Benutzung von Sekundär-Antikörpern wurde mit diesen analog zu den Primärantikörpern (Konzentration 2,0 mg/ml) verfahren, und in einem 2. Inkubationsschritt und einem 2. Waschschrift eine spezifische Bindung an den Primärantikörper erreicht. Zum Nachweis avitaler Zellen wurde dem Meßansatz je 7 µl Propidiumjodid hinzugefügt.

- FACS Puffer: PBS + 5% FKS (Sambrook et. al, 1989).

- Propidiumjodid (50mg/ml)

3.1.4.2 Immunoblot

Immunoblots basieren auf der Western-Blot-Methode, mit dem Unterschied, daß die elektrophoretisch aufgetrennten Banden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden und nicht über Proteinfärbung wie beim konventionellen Westernblot.

FaDu Zellen (1×10^6 je Ansatz) wurden abzentrifugiert, in kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lysis-Puffer bei 4°C lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 U/min und 4°C abgetrennt.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe des BioRad-Proteinassays nach dem Protokoll des Herstellers. Die Proteinmengen aller Ansätze wurden daraufhin durch entsprechende Verdünnung der Lysate mit Lysis-Puffer angeglichen.

Nach Auftrennung gleicher Proteinmengen in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel (150

V, 30 mA), wurde das Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) geblottet. Die Detektion der Proteine wurde mit spezifischen Primärantikörpern (1:1000 in TBS-Tween) und HRP konjugiertem Sekundärantikörper (1:2000) mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nachgewiesen. Als Primärantikörper dienten der EpCAM-spezifische monoklonale Antikörper **C215** und ein gegen das Zellstrukturprotein Actin gerichteter monoklonaler Antikörper (α -Actin).

- *Lysis-Puffer: 20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 1 μ g/ml Leupeptin; 0,5mM β -Glyzerophosphat; 0,5mM Natriumpyrophosphat; 0,5mM Natriumorthovanadat; 0,5mM Natriumfluorid; 0,5mM Natriummolybdat; 1% Triton X-100*
- *Block Puffer: PBS/Milch (3-5%), PBS/BSA (1%) oder Roti-Block (Roth).*
- *TBS-Tween: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferte Lösung, 0,1% Tween 20*

3.1.5 Zellvitalitätsbeurteilung durch MTT-Assay nach Mosmann (1983)

Die Konversion des gelben Salzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen ist ein Maß für die Anzahl stoffwechselaktiver und damit vitaler Zellen (Mosmann, 1983). Durch die enzymatische Umsetzung entstehen blaue, wasserunlösliche Formazan-Kristalle. Nach Resuspension mit HCl angesäuertem Isopropanol folgt die Messung der optischen Dichte mit einem ELISA-Lesegerät. Die gemessene optische Dichte korreliert mit der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die in aktiven proliferierenden Zellen besonders hoch ist.

Durchführung: FaDu Zellen (3×10^3 Zellen pro Loch) wurden in einer 96-Loch-Platte ausplattiert und für 7 Tage kultiviert. Zur Messung der MTT-Konversion wurde den Zellen je $10 \mu\text{l}$ /Loch MTT-Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in $200 \mu\text{l}$ /Loch eines 24:1 Gemischs aus Isopropanol und 1M HCl gründlich suspendiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 550 nm (Testwellenlänge) und 690nm (Referenzwellenlänge) mit einem ELISA-Lesegerät gemessen. Die Messungen fanden jeweils am 1. Tag, 3. Tag, 4. Tag und am 7.Tag nach Ausplattierung statt.

- *MTT-Reagenz: Gemisch aus $990 \mu\text{l}$ einer Stammlösung aus 5mg/ml Thiazolblau [Sigma] in PBS und $110 \mu\text{l}$ einer Stammlösung aus 1mg/ml Superoxid-Dismutase [Sigma] in PBS*

3.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension mit 1 Volumen Trypan-Blau in PBS gemischt. Avitale Zellen nehmen den Farbstoff auf, und sind somit unter dem Mikroskop durch ihre Blaufärbung erkennbar.

3.2 Klonierung zusätzlicher Promotorsequenzen

Zur Identifikation weiterer Promotor-Bereiche wurden zwei genomische DNA-Banken verwandt (Lib. No. 704 und Lib. No. 709, RZPD - Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin). Beide Banken können mit Hilfe der PCR als auch durch Hybridisierung untersucht werden.

3.2.1 Screening einer Gen-Bibliothek mittels PCR

Nach der Generierung der genomischen Bibliothek in PACs (P1 artificial chromosomes) wurden die Einzelklone in einer 3-dimensionalen-Matrix aufbewahrt. Diese Matrix wurde durch vertikale Stapelung mehrerer 384-Loch-Platten (mit je 16 Reihen und 24 Spalten) konstruiert. Die Anzahl der Platten richtete sich dabei nach der Gesamtzahl der Einzelklone.

Damit nicht alle Klone einzeln durch PCR überprüft werden mussten, wurden zuerst die Klone auf jeweils einer Platte, zu mehreren sogenannten „Primary Pools“ zusammengeführt, wobei jeder „Primary Pool“ die Klone einer Platte repräsentierte. Jedem Primary Pool sind korrespondierende „Secondary Pools“ zugeordnet, die durch Zusammenführung der Klone der jeweiligen Reihen und Spalten einer Platte, gewonnen wurden. (Vgl. **Abbildung 7**)

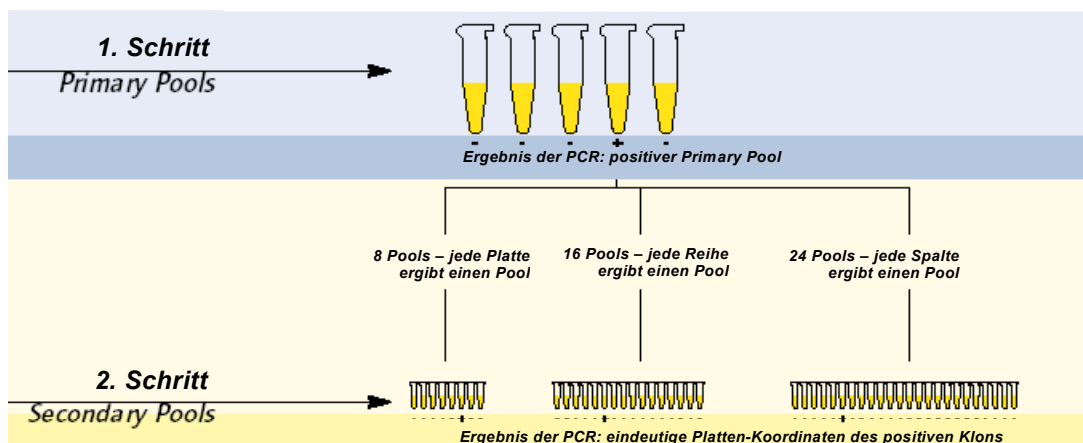


Abbildung 7: DNA Pools (Quelle RZPD)

Die PCR wurde wie in 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Als Primer wurden **Ep-PRO-Up** und **Ep-PRO-Down** verwandt, als DNA-Matrize die jeweiligen Pools. Im Anschluß daran erfolgte die Auswertung über eine analytische Gelelektrophorese.

3.2.2 Screening einer Gen-Bibliothek mittels Southern-Blot-Hybridisierung

Zusätzlich zum oben beschriebenen PCR-Screening wurde Lib. No. 704 auf Filter geordert und durch Hybridisierung untersucht.

Als Sonden wurden folgende PCR-Amplifikate verwendet:

Primerpaarung	Matrize	Produkt
Ep-PRO-Up + Ep-PRO-Down	22-RS	570-bp-EpCAM-Promotor-Sonde
Exon-1-Start + Exon-1-End	Tonsillen-DNA	90-bp-EpCAM-Sonde
Intron-1-Start + Intron-1-End	Tonsillen-DNA	100-bp-EpCAM-Sonde

3.2.2.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Oligonukleotide wurden für den Einsatz als Sonden mit Hilfe des „Random primed labelling Kit“ (Roche Diagnostics) radioaktiv markiert. Der Kit basiert auf der „Random-Primer-Methode“ (Feinberg et al., 1983), bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz (unter Abdeckung aller möglichen Kombinationen) als Primer für die Polymerasereaktion des Klenow-Fragmentes dienen. Als Matrize fungieren dabei die durch Hitzedenaturierung (für 5 min. bei 95 °, anschließend auf Eis) entstandenen Einzelstränge der oben beschriebenen Sonden. Mit Hilfe radioaktiver dNTPs, im konkreten Fall radioaktivem [α -³²P]dCTP, wurde die Probe radioaktiv markiert.

Die Markierung wurde mit ca. 200 ng DNA, entsprechend den Anweisungen des Kit-Herstellers, durchgeführt. Abschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt.

3.2.2.2 Hybridisierung

Hybridisierung beschreibt die Bildung eines doppelsträngigen Nukleotid-Moleküls (RNA oder DNA) aus zwei unterschiedlichen Einzelsträngen, an den jeweils zueinander homologen Sequenzen. Bei entsprechender Markierung (bspw. radioaktiv) eines Bindungspartners ist die Identifikation spezifischer DNA Sequenzen möglich.

Zunächst wurde der zu untersuchende Filter für 60 min bei 65°C in Hybridisierungspuffer (Church et al., 1984) prähybridisiert. Anschließend wurde der Puffer erneuert, und die radioaktiv markierte Sonde (ca. 4×10^7 dpm/ml) hinzugegeben. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C durchgeführt. Abschließend wurde der Filter für 2 x 20 min. bei 65°C in Waschpuffer gewaschen (Austausch des Waschpuffers nach 20 min), dann getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt.

Die verwendeten Puffer wurden vor Benutzung auf jeweils 65°C erwärmt.

- *Hybridisierungspuffer nach Church: 400 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaH₂PO₄ 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 7,2)*
- *Waschpuffer: 0,1 x SSC, 1% SDS*

3.2.2.3 Autoradiographie

Die durch die radioaktiven Sonden markierten DNA-Sequenzen auf den Filtern, wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen (XAR 5, Kodak) visualisiert (Expositionsdauer 48 h bei - 80°C).

3.2.3 Screening bakterieller Einzelklone

3.2.3.1 Gewinnung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Die Plasmide wurden analog der in 3.1.1.10 beschriebenen Methode aus bakteriellen Übernachtskulturen (800 ml) gewonnen. Aufgrund des mäßigen Reinheitsgrades schloß sich eine Aufreinigung mit Hilfe der Cäsiumchloridgradienten-Ultrazentrifugation an.

3.2.3.2 Plasmid-Aufreinigung durch Cäsiumchloridgradienten-Ultrazentrifugation

Die Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation ist eine Methode zum Erhalt hochreiner Plasmid-DNA durch Trennung von Proteinen, DNA und RNA im Dichtegradienten. Ein Dichtegradient entsteht bei Ultrazentrifugation einer CsCl-Lösung. Aufgrund der Zentrifugalkräfte wandern die Cäsium- und die Chlorid-Ionen in Richtung des Zentrifugenröhrchenbodens. Dieser Bewegung entgegen wirken Diffusionskräfte. Nach entsprechender Zentrifugationszeit bildet sich somit ein Konzentrationsgefälle in Richtung der Zentrifugalkräfte aus, mit der Folge daß die CsCl-Lösung zum Boden des Röhrchens hin immer dichter wird.

Makromoleküle, die sich bei der Zentrifugation in der CsCl-Lösung befinden, reichern sich an spezifischen Stellen des Gradienten an und bilden Banden. Dieser Vorgang ist von der jeweiligen Schwimmdichte der Moleküle abhängig. Für DNA liegt die Schwimmdichte bei etwa 1,7g /cm³, entsprechend sammeln sich die DNA-Moleküle an der Stelle des Gradienten, an der die CsCl-Lösung genau diese Dichte vorweist. Proteinmoleküle haben eine wesentlich geringere Schwimmdichte, und sammeln sich im Zentrifugenröhrchen oberhalb der DNA-Bande. RNA, die relativ dicht ist, setzt sich am Boden ab.

Wird diese Methode mit der Anfärbung der DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidium-Bromid (EtBr) kombiniert, kann überspiralisierte (supercoiled) von entspannter (relaxed) DNA getrennt werden. Die Interkalation sorgt dabei für partielle Entwindung der DNA-Doppelhelix und somit für eine Verminderung der Schwimmdichte. Bei gestreckter (entspannter) DNA beträgt die Minderung ca. 0,125 g/cm³. Supercoiled DNA, die keine freien

Enden und somit auch weniger Spielraum für eine solche Entwindung besitzt, verringert ihr Schwimmgewicht nur um ca. $0,085 \text{ g/cm}^3$.

Nach der Zentrifugation liegt die nunmehr hochreine Plasmid-DNA in der unteren Bande vor. Die Banden lassen sich unter UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$), durch die Fluoreszenz des EtBr darstellen.

Durchführung:

1. Lösung eines nach der alkalischen Lyse Methode gewonnenen DNA-Pellets in 5 ml TE und Einwaage von 5,35 g CsCl.
2. Überführung der DNA-haltigen CsCl-Lösung in ein Ultrazentrifugenröhrchen (11,5 ml, Sorvall).
3. Zugabe von 200 μl EtBr (1%) und anschließend komplette Füllung des Zentrifugenröhrchens mit CsCl-Lösung (1,07 g/ml).
4. Nach Verschluss und Verplombung des Zentrifugenröhrchens, Beschickung der Zentrifuge (Beckman Coulter L 60, Rotor Ti 70.1). Ultrazentrifugation bei 35.000 U/min, für ca. 48 h bei 20°C .
5. Absaugen der unteren Bande über einem UV-Transilluminator mit Hilfe einer Kanüle (21G) und einer Spritze unter Durchstechung des Ultrazentrifugenröhrchens.
6. EtBr-Entfernung durch Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol. Dabei bilden sich 2 Phasen: In der organischen (oberen) Phase befindet sich nun das EtBr und in der unteren (wässrigen) Phase löst sich die DNA. Mehrmalige Wiederholung (3-5 Mal) unter jeweiliger Abnahme der organischen Phase führt dabei zu entsprechender Befreiung der DNA von EtBr.
7. Isopropanolfällung – analog der Isopropanol-Natriumacetat-Methode, allerdings ohne Verwendung von Natriumacetat.
8. Lösung des Pellets in einem geeigneten Volumen TE.

3.2.3.3 *Restriktionsverdau der Plasmid-DNA*

Die durch Cäsiumchloridgradienten-Ultrazentrifugation gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von *Bam*HI bei 37°C für 3 h gespalten (1 U *Bam*HI / 3 μg DNA,) und abschließend *Bam*HI für 30 min. bei 80°C inaktiviert.

3.2.3.4 Southern-Blotting

150 µg *Bam*HI-geschnittene Plasmid-DNA, wurden in einem 0,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (80 V, 3 h). Nach Färbung mit EtBr und Kontrolle unter UV-Licht, wurde das Gel für 15 min. mit 0,25 M HCl behandelt. Die so induzierten Strangbrüche führten zu einer Fragmentierung der DNA, und ermöglichten so einen effizienteren Transfer. Anschließend wurde die DNA für 20 min in Denaturierungspuffer denaturiert und danach entsprechend der Kapillar-Transfer-Methode (Southern et al., 1975) auf eine Nylon-Membran (Hybond N+™) übertragen. Nach einer Transferzeit von 2 h wurde die Membran für 30 min. in 1xTBE gewaschen.

Denaturierungspuffer: 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl

4 Ergebnisse

4.1 Amplifikation des EpCAM-Promotorfragmentes

Ausgangspunkt der Generierung des Luziferase-Reporterplasmides zur Messung der Aktivität des EpCAM Promotorfragmentes war die Amplifikation des Promotorfragmentes mit Hilfe einer PCR. Als Matrize diente dabei das 22RS-Plasmid, welches die bisher bekannten 440 bp des Promotors und einen 5'-Anteil des EpCAM Gens enthält (Linnenbach et al., 1993). Als Primer kamen Ep-PRO-Up und Ep-PRO-down zum Einsatz, durch deren Verwendung das Amplifikat 5' mit einer *SacI*- und 3' mit einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle versehen wurde.

Die amplifizierte Sequenz umfaßt 570 bp. Sie enthält außer dem 440-bp-Promoterfragment noch 130 bp des EpCAM-Genes.

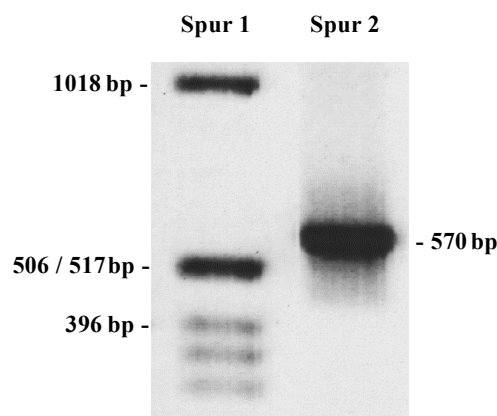


Abbildung 8: *Amplifikat des EpCAM-Promotorfragmentes*
(*Auftrennung in einem 1,2%-igen Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung; inverse Darstellung*)
Spur 1: 1 kb DNA-Marker Spur 2: 570-bp-Fragment

4.2 Die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in verschiedenen Zelllinien

Die eingeführten *SacI*- und *XhoI*-Schnittstellen ermöglichten die direkte Klonierung des Promotorfragmentes in den mit *SacI* und *XhoI* linearisierten Luziferase-Vektor pGL3-basic (Invitrogen). Nach der Transformation kompetenter Bakterien und Anzucht auf Agarplatten unter Selektion mit Ampicillin wurden die Plasmide isoliert. Anschließend wurden die jeweils richtigen Klone durch Restriktionsanalyse identifiziert, in Flüssigkulturen vermehrt, und die Plasmid-DNA isoliert. Zur Kontrolle wurde nochmals das Restriktionsmuster der Plasmide überprüft. Das so gewonnene Reporterplasmid, dessen Luziferase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des EpCAM-Promotorfragmentes steht, wird nachfolgend als **EpCAMprom-Luc** bezeichnet.

Zunächst galt es die Basalaktivität von **EpCAMprom-Luc** in EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen zu überprüfen. Das Reporterplasmid wurde zu diesem Zweck in die EpCAM-positiven Plattenepithelkarzinom-Zelllinien **GHD-1** und **ANT-1** sowie in die EpCAM-negative embryonale Nierenzelllinie **HEK-293** transfiziert, und die Luziferase-Aktivität 20 h nach der Transfektion bestimmt.

Die Lumineszenzwerte (y-Achse) zeigen die Aktivität von EpCAMprom-Luc in den EpCAM-positiven Zelllinien GHD-1 und ANT-1, sowie der EpCAM-negativen Zelllinie HEK-293, jeweils verglichen mit der Aktivität des Standard-Luziferase-Vektors pGL3-basic (Leervektor). In GHD-1-Zellen entwickelte EpCAMprom-Luc eine 34,1-fach höhere Aktivität als pGL3-basic, in ANT-1-Zellen eine 28,8-fach höhere und in HEK-293 nur eine 3,5-fach höhere Aktivität. Untereinander verglichen, wiesen GHD-1-Zellen eine 9,8-fach höhere und ANT-1-Zellen eine 6,5-fach höhere Aktivität als HEK-293-Zellen auf.

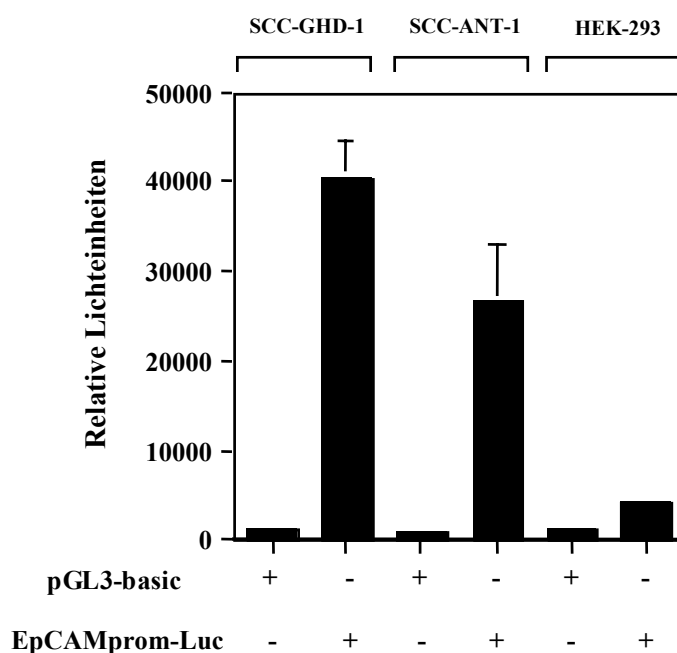


Abbildung 9: Luziferase-Aktivität von EpCAMprom-Luc in den EpCAM-positiven Zelllinien GHD-1 und ANT-1 sowie der EpCAM-negativen Zelllinie HEK-293 (jeweils 5×10^5 Zellen / Ansatz), 20 h nach Transfektion mit EpCAMprom-Luc ($0,5 \mu\text{g}$ / Ansatz) oder pGL3-basic ($0,5 \mu\text{g}$ / Ansatz). Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils doppelt durchgeführten Messungen dreier unabhängiger Experimente. Die Standardabweichungen sind grafisch über den Balken dargestellt.

4.3 Einfluß von TNF α bzw. TPA auf die EpCAM-Promotoraktivität

Zur Analyse des Einflusses von TNF α bzw. TPA auf die Aktivität des EpCAM Promotors wurden GHD-1-Zellen mit EpCAMprom-LUC transfiziert und in An- bzw. Abwesenheit dieser Substanzen kultiviert.

Die Promotorfragment-Aktivität unbehandelter GHD-1-Zellen wurde als Referenzwert auf 100 % festgelegt. Die Messwerte der behandelten Zellen sind prozentual dazu in dem folgenden Balkendiagramm (**Abbildung 10**) aufgeführt. Die Standardabweichung aus den Messwerten dreier unabhängiger Experimente ist jeweils über den Balken angegeben.

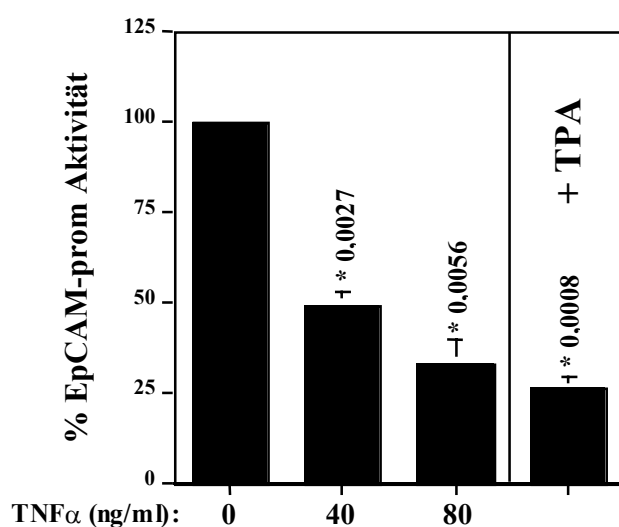


Abbildung 10: Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in GHD-1-Zellen

GHD-1-Zellen (5×10^5) wurden mit EpCAMprom-Luc ($0,5 \mu\text{g}$) transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach Behandlung mit TNF α bzw. TPA gemessen. TNF α wurde in steigender Konzentration (0 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml), TPA bei einer Konzentration von 400 ng/ml appliziert. Die Luziferase-Aktivität der mit TNF α -behandelten Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 16 h, die der mit TPA behandelten Zellen nach einer Inkubationszeit nach 20 h gemessen.

Sowohl TNF α , als auch TPA sorgten für eine Aktivitätsminderung des EpCAM-Promotorfragmentes. Der Grad der Repression war bei der Behandlung mit TNF α dosisabhängig. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen fiel die Aktivität von EpCAMprom-Luc bei der Behandlung mit 40 ng/ml TNF α auf 49%, bei Behandlung mit 80 ng/ml TNF α auf 33%. Die Behandlung mit TPA ergab im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Reduktion der Aktivität von EpCAMprom-Luc auf 27%.

4.4 Einfluß von TNF α auf das Wachstumsverhalten von Tumor-Zellen

Um auszuschließen, dass die Aktivitätsminderung des EpCAM-Promotor-Fragmentes durch TNF α möglicherweise über die Induktion von Apoptose oder Zellnekrose geschieht, wurde der Einfluß von TNF α auf das Wachstumsverhalten und die Vitalität von Tumorzellen untersucht.

4.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von GHD-1-Zellen nach Behandlung mit TNF α

GHD-1-Zellen (5×10^5 / Ansatz) wurden nach Transfektion mit **EpCAMprom-Luc** (0,5 μ g) und dem Expressionplasmid für das grün fluoreszierende Protein GFP **pEGFP-C1** (0,5 μ g), sowohl in Anwesenheit von TNF α (**80 ng/ml**) als auch ohne Behandlung mit TNF α über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen zur Darstellung von GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet

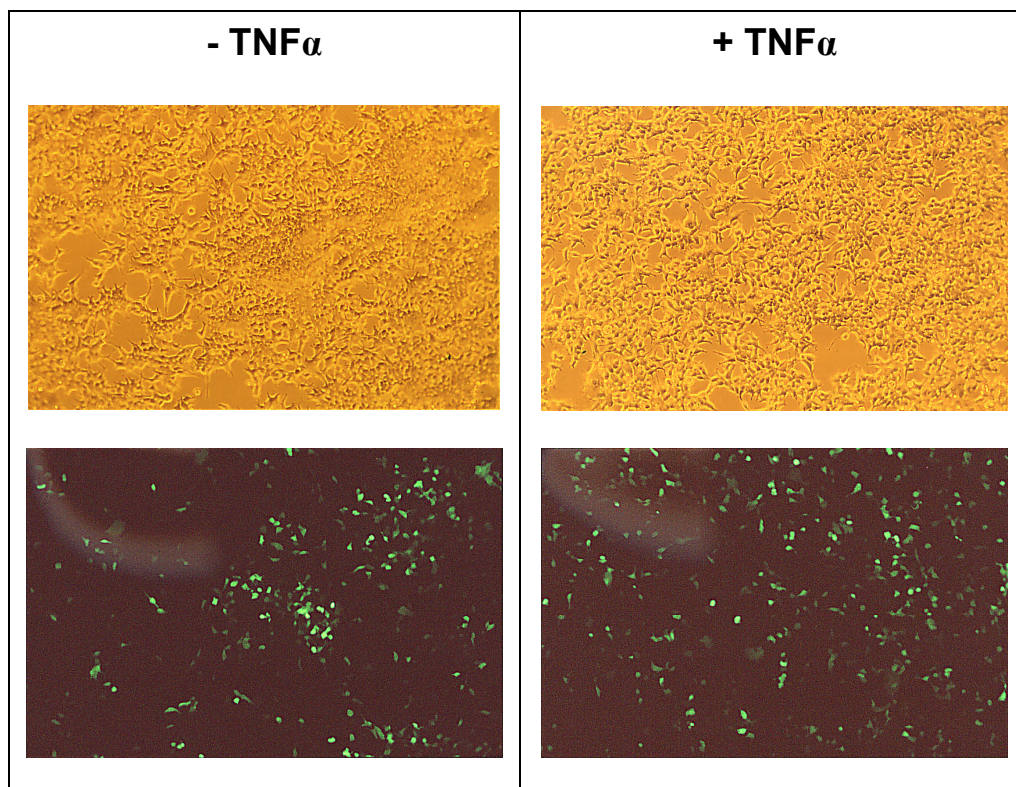


Abbildung 11: Mikroskopische Darstellung von GHD-1-Zellen

- Spalte links: Unbehandelte Zellen
- Spalte rechts: Behandelte Zellen (TNF α 80 ng/ml)
- obere Reihe: Lichtmikroskopische Darstellung
- untere Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Nach der Behandlung der Zellen mit TNF waren keine Unterschiede in der Dichte des Zellrasens, weder im Durchlicht, noch bei der GFP-Fluoreszenz, sichtbar. Für die Transfektionsrate, die sich aus der GFP-Fluoreszenz (Bildreihe unten) bestimmen lässt, traf dies auch zu. Dies deutet darauf hin, dass bei den eingesetzten Konzentrationen von TNF keine Apoptose oder Zellnekrose induziert wurde.

4.4.2 Vitalität von FaDu-Zellen nach Behandlung mit TNF α

Zur genaueren Quantifizierung der Zellvitalität wurden FaDu-Karzinomzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von TNF α kultiviert und die Vitalität mit Hilfe von MTT-Assays ermittelt. In **Abbildung 12** sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten grafisch dargestellt.

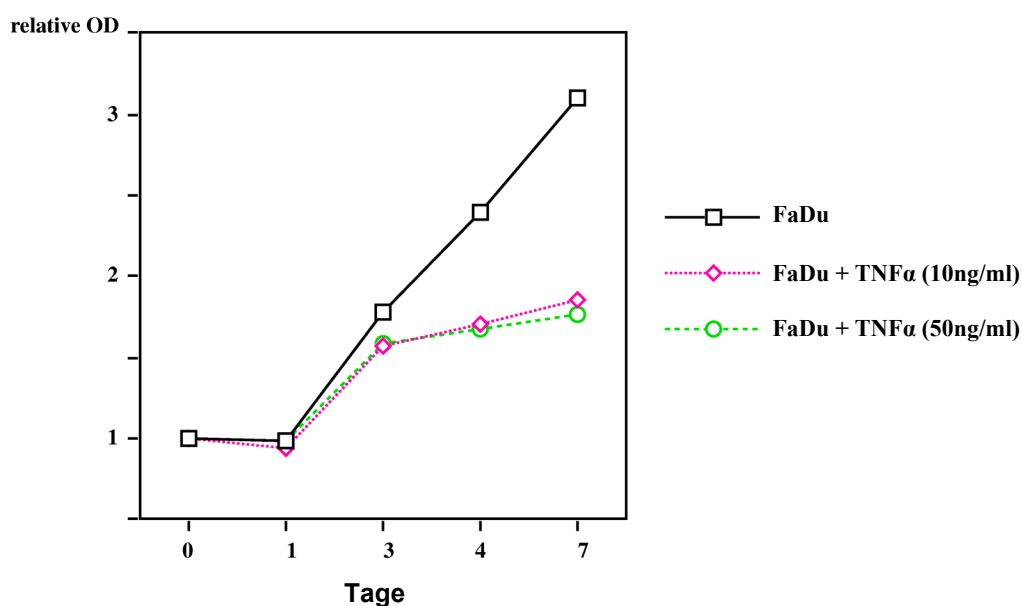


Abbildung 12: Zellvitalität von FaDu-Zellen nach Behandlung mit TNF α

FaDu-Zellen (3×10^3 /Ansatz) wurden für 7 Tage in Anwesenheit von 0 ng/ml TNF α , 10 ng/ml TNF α und 50 ng/ml kultiviert. Die Messungen der MTT-Konversion als Maß für die Stoffwechselaktivität und damit der Zellvitalität fanden unmittelbar nach Ausplattierung (Tag 0) bzw. an den Tagen 1, 3, 4 und 7 statt.

Als Referenzwert wurde der Mittelwert der Meßwerte vom Tag 0 festgelegt und eine relative OD (Optische Dichte) von 1 zugeordnet. Die weiteren Messungen wurden relativ zu diesem Wert dargestellt.

Bis Tag 1 war die Stoffwechselaktivität bei allen 3 Ansätzen nahezu gleich, erst anschließend kam es zu Unterschieden. Die nicht mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten FaDu-Zellen zeigten bis Tag 7 eine lineare Zunahme der Stoffwechselaktivität, wohingegen die mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Zellen, insbesondere ab Tag 3, lediglich eine reduzierte Zunahme der Stoffwechselaktivität verzeichneten. Dabei hatte die Höhe der hier eingesetzten Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ keinen Einfluß auf das Maß der Hemmung der Stoffwechselaktivität.

Wichtig ist nochmals auf den Umstand hinzuweisen, daß es bis zum Tag 1 zu keinen nennenswerten Unterschieden der Zellvitalität unbehandelter und mit $\text{TNF}\alpha$ behandelter Zellen kam, da in genau diesem Zeitbereich jeweils die Messungen zur EpCAM-Promotor-Fragment-Aktivität durchgeführt wurden.

4.5 Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Luziferase-Aktivität

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Repression der EpCAM-Promotoraktivität offensichtlich nicht durch Zelltod/Apoptose zustandekam, wurde der Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die enzymatische Aktivität der Luziferase untersucht. Die Fragestellung hierbei war, ob $\text{TNF}\alpha$ die enzymatische Aktivität der Luziferase unter den Bedingungen der bisherigen Messungen hemmt. Hierzu wurden GHD-1-Zellen mit dem Luziferase-Expressionsplasmid **CMV-Luc**, das eine starke Expression der Luziferase bewirkt, transfiziert und in An- bzw. Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ kultiviert. Nach 16 h wurde die Luziferase-Aktivität mit Luziferin als Substrat ermittelt. Die Durchschnittswerte mit Standardabweichung dreier unabhängig durchgeführter Experimente sind in **Abbildung 13** dargestellt.

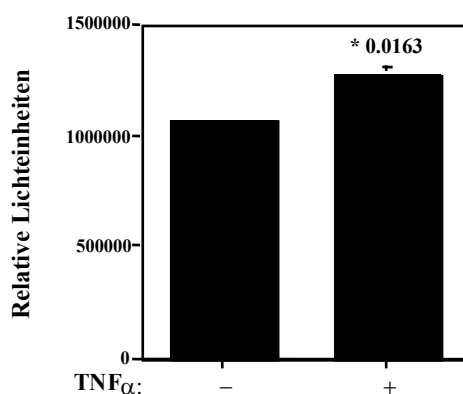


Abbildung 13: Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Luziferase-Aktivität in GHD-1-Zellen

GHD-1-Zellen (5×10^5 / Ansatz) wurden nach Transfektion mit CMV-Luc ($1 \mu\text{g}$) in An- bzw. Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ (Konzentration: 80 ng/ml) für 16 h kultiviert. Im Anschluß wurde die Enzymaktivität der Luziferase mit Luziferin als Substrat bestimmt.

Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ hatte keinen hemmenden Effekt auf die enzymatische Aktivität der Luziferase. Unter Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ zeigte sich sogar eine leichte Zunahme um 19%.

4.6 Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ bzw. TPA auf die Oberflächenexpression von EpCAM in Tumorzellen

4.6.1 FACS-Analyse

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf **FaDu-Zellen**, die mit $\text{TNF}\alpha$ bzw. TPA über einen Zeitraum von 20 h inkubiert wurden, wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

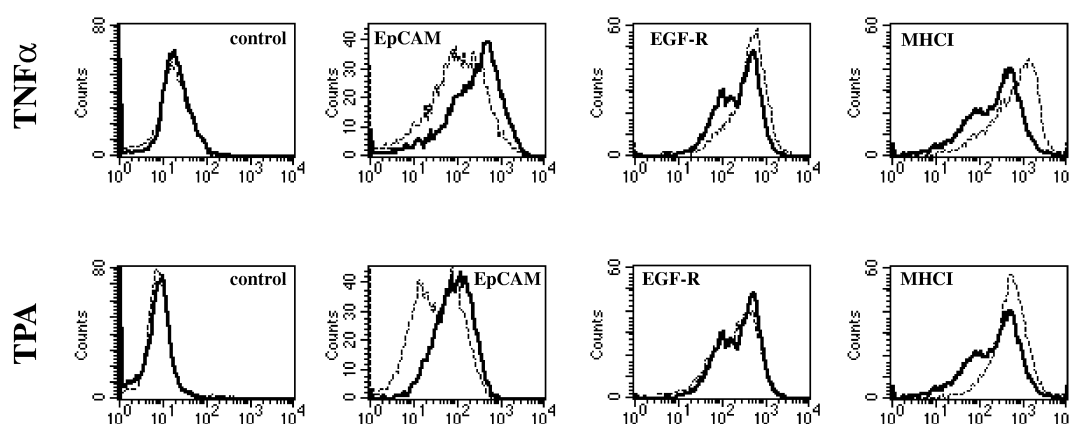


Abbildung 14: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in An- bzw. Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ oder TPA

5×10^5 FaDu Zellen pro Ansatz wurden entweder mit $\text{TNF}\alpha$ (Konzentration: 20 ng/ml oder TPA (Konzentration: 200 ng/ml) behandelt und für 20 h kultiviert. Im Anschluß daran wurde die Expression EpCAMs, des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) und des MHC Klasse I – Moleküls (MHC I) in der Durchflußzytometrie mit spezifischen Antikörpern bestimmt.

Die obere Reihe zeigt die Meßwerte nach Behandlung der FaDu-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$. Die durchgehenden Kurven stehen für die Meßwerte unbehandelter Zellen, die gestrichelten für die Meßwerte behandelter Zellen. Die Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) sind jeweils links dargestellt. Die untere Reihe zeigt analog die Meßwerte der FaDu-Zellen nach Behandlung TPA.

Repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente sind grafisch in **Abbildung 14** die Daten eines Experimentes gestellt.

TNF α führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression von EpCAM auf der Oberfläche von FaDu-Zellen. Die Expression des „Epidermal growth factor receptor“ (EGF-R) wurde durch TNF α leicht, die des „Major histocompatibility complex- class I molecule“ (MHCI) deutlich erhöht.

TPA Behandlung führte ebenfalls zu einer Reduktion der Expression EpCAMs auf der Oberfläche von FaDu-Zellen. Die MHCI Expression wurde nach Behandlung mit TPA schwach induziert. Die Expression des EGF-R wurde durch TPA nicht beeinflusst. Die mit Hilfe der FACS-Analyse gewonnenen Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten wurden zur Ermittlung der Expressionsminderung von EpCAM durch TNF α verwendet.

Der Durchschnittswert der EpCAM Expression un behandelter FaDu-Zellen wurde auf 100 % festgelegt, und relativ dazu der Durchschnittswert mit TNF α behandelte Zellen dargestellt (**Abbildung 15**).

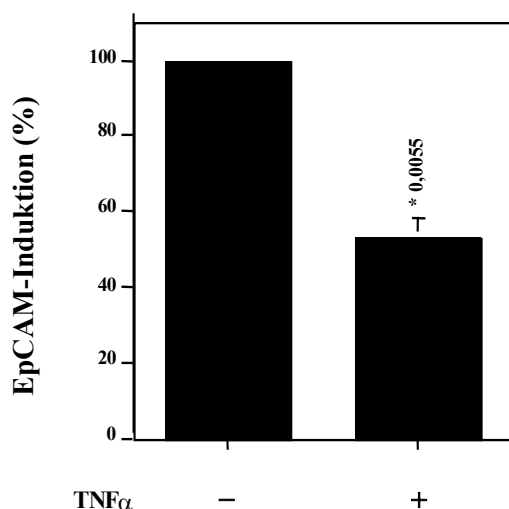


Abbildung 15: Reduktion der EpCAM Expression durch TNF α
Der linke Balken zeigt den Durchschnittswert der un behandelten Zellen, rechts ist der Durchschnittswert nach Behandlung mit TNF α aufgeführt.

Die Behandlung mit TNF α bewirkte eine Reduktion der Expression EpCAMs auf FaDu-Zellen um 53% im Vergleich zu un behandelten Zellen.

4.6.2 Immuno-Blot-Analyse der EpCAM Expression

Ebenfalls zur Kontrolle der Expression EpCAMs in Abhängigkeit von TNF wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. **Abbildung 16** zeigt repräsentativ einen von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Immunoblots.

Erwartungsgemäß zeigten die Actin-Banden behandelter und unbehandelter Zellen keinen

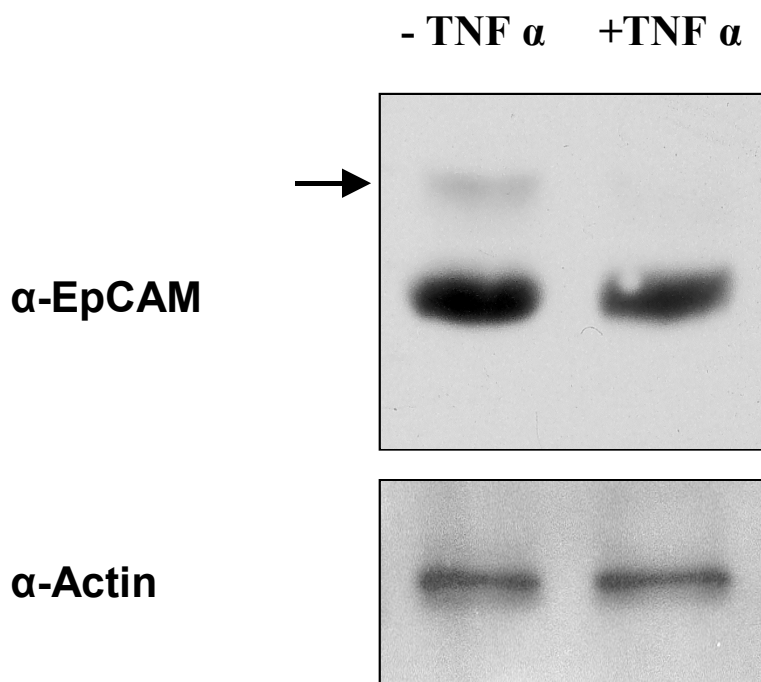


Abbildung 16: Immunoblot von EpCAM und Actin

FaDu-Zellen (5×10^5 / Ansatz) wurden bei einer TNF α -Konzentration von 20 ng/ml für 16 h bzw. ohne TNF α kultiviert und geerntet, und die exprimierten Proteine isoliert. Nach der Auftrennung gleicher Proteinmengen wurden die Einzelproteine durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Neben EpCAM wurde auch Aktin durch einen-spezifischen Antikörper markiert. Die Actinbande zeigt, dass überall die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden. Als Sekundär-Antikörper wurde α -Maus-IgG-HRP verwandt. Die eigentliche Detektion wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Bei der schwachen Bande im oberen Blot (Pfeil), die nur bei den unbehandelten Zellen auffällt, handelt es sich um eine glykosylierte Variante von EpCAM (Fernsten et al., 1991).

Unterschied. Die EpCAM-Bande unbehandelter Zellen ist etwas stärker.

Zur genaueren Quantifizierung der Expressionsunterschiede wurden die Blots eingescannt

und die Dichten der Banden mit der Software NIH-Image (National Institutes of Health, Bethesda / Maryland, USA) ermittelt. Es wurden jeweils Dichtewerte aus 5 voneinander unabhängigen Immunoblots gemessen und die Mittelwerte daraus gebildet. Grafisch ist dies in **Abbildung 17** dargestellt.

Die gemessenen Dichtewerte, die als Maß der Expression des jeweiligen Proteins zu verstehen sind, zeigten, daß TNF α auf die Expression von Actin in FaDu-Zellen keinen Effekt hatte. Die Expression EpCAMs hingegen wurde nach Behandlung von FaDu-Zellen mit TNF α um 41% reduziert.

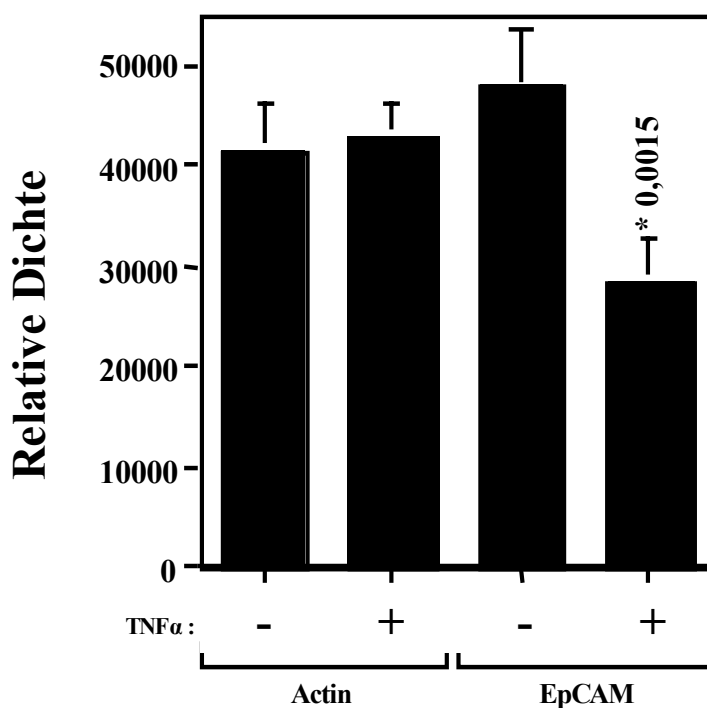


Abbildung 17: Actin- und EpCAM-Expression auf FaDu-Zellen in Abhängigkeit von TNF α

Die ersten beiden Balken zeigen jeweils die Werte für Actin, links ohne, rechts mit vorheriger Behandlung der FaDu-Zellen mit TNF α . Die beiden rechten Balken bilden jeweils die Dichtewerte, die für EpCAM gemessen wurden. Links ohne vorherige Behandlung, rechts nach vorheriger Behandlung der FaDu-Zellen mit TNF α . Die Standardabweichungen sind grafisch über den Balken dargestellt.

4.7 Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch spezifische Signaltransduktion über den NF- κ B-Signalweg

Nach den oben dargestellten Ergebnissen stellte sich nun die Frage, welcher molekulare Mechanismus für die Verminderung der Expression EpCAMs durch TNF α verantwortlich ist.

TNF α induziert durch Bindung an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF-R1), über eine spezifische Signalkaskade die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B), welcher im Zellkern die Transkription von Genen regulieren kann.

Zur Überprüfung, ob die Repression des EpCAM-Promotorfragmentes diesem Signalweg folgt, wurde dieser in mehreren Experimenten auf jeweils verschiedenen Ebenen der Signalkaskade künstlich unterbrochen und im Anschluß der Einfluß von TNF α auf das EpCAM-Promotorfragment untersucht.

4.7.1 Aktivierung von NF- κ B durch TNF α in GHD-1-Zellen

Zunächst konnte gezeigt werden, daß TNF α eine Aktivierung von NF- κ B in GHD-1-Zellen bewirkt. Hierzu wurden GHD-1-Zellen mit NF- κ B-Luc, einem Luziferase-Reporterplasmid für NF- κ B (Mitchell et al., 1995), transfiziert und bei steigenden TNF α -Konzentration kultiviert. Nach einer Expositionsdauer von 16 h wurde die NF- κ B-Aktivität im Luziferase-Assay bestimmt.

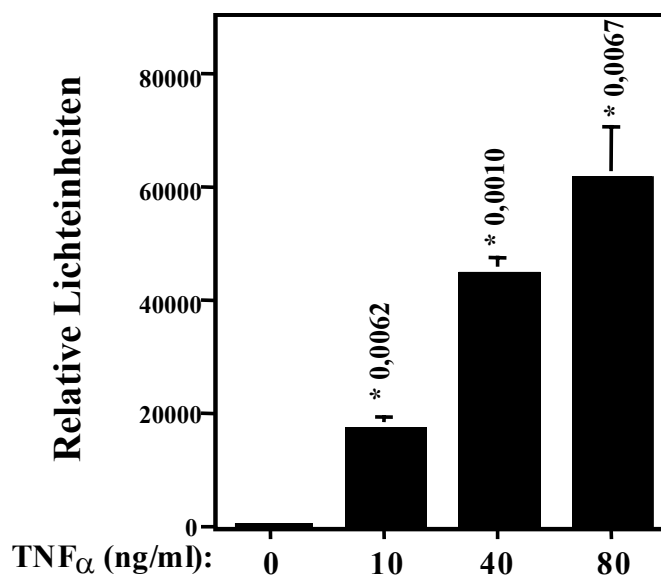


Abbildung 18: Aktivierung von NF- κ B durch TNF α in GHD-1-Zellen

GHD-1-Zellen (5×10^5 /Ansatz) wurden mit NF- κ B-Luc (100 ng) transfiziert, und bei TNF α -Konzentrationen von 0 ng/ml, 10 ng/ml, 40 ng/ml, und 80 ng/ml 16 h kultiviert. Im Anschluß wurde die NF- κ B-Aktivität durch einen Luziferase-Assay bestimmt.

Die Behandlung der GHD-1-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TNF α führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Aktivität von NF- κ B. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte die Behandlung mit TNF α bei einer Konzentration von 80 ng/ml zu einer 87-fach höheren Aktivität von NF- κ B.

4.7.2 TRADD-DN blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc

TRADD (TNF-receptor-1-associated death domain protein) ist das Adaptermolekül zwischen dem intrazellulären Anteil von TNF-R1 und dem sich im weiteren Verlauf ausbildenden Signalkomplex. Dadurch spielt es bei der Aktivierung von NF- κ B eine entscheidende Rolle.

Dieser Teil der Signalkaskade wurde mit Hilfe von TRADD-dominant negativ (TRADD-DN) unterbrochen. Dominant negativ bedeutet, dass ein mutantes Gen für ein Protein kodiert, welches gegenüber dem Genprodukt des Wildtypallels dominant ist, und dessen Funktion negativ beeinflusst. TRADD-DN ist ein Expressionsplamid, das für eine TRADD-Mutante kodiert, die zwar an TNF-R1 bindet, aber aufgrund des Fehlens der „death domain“ die weitere Signalkaskade dominant unterbricht (Kieser et al., 1999).

Da NF- κ B unter anderem auch durch TNF- α aktiviert wird, wurden GHD-1-Zellen mit EpCAMprom-Luc und entweder mit oder ohne TRADD-DN transfiziert. Anschließend wurde die Aktivität von EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α bestimmt.

Die Werte dreier unabhängiger Experimente sind in **Abbildung 19** dargestellt.

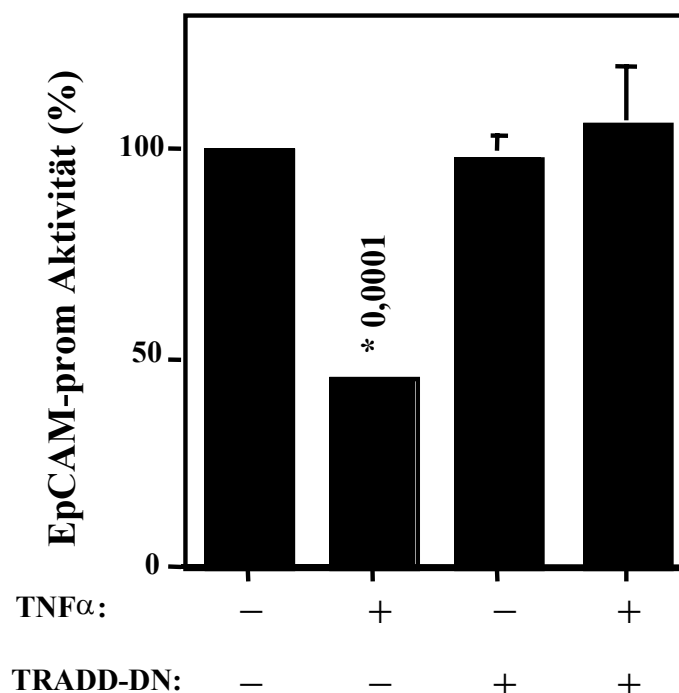


Abbildung 19: Einfluß von TRADD-DN auf die Aktivität von EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNFα.

Pro Ansatz wurden 5×10^5 GHD-1-Zellen mit EpCAMprom-Luc ($0,5 \mu\text{g}$) und mit TRADD-DN ($0,5 \mu\text{g}$) bzw. ohne kotransfiziert und in An- bzw. Abwesenheit von TNFα (Konzentration: 40 ng/ml) kultiviert. Nach 20 h wurde die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes mit Hilfe eines Luziferase-Assays ermittelt.

Der Durchschnittswert der EpCAM-Promotorfragmentaktivität unbehandelter und nicht mit TRADD-DN transfizierter GHD-1-Zellen wurde auf 100 % festgelegt. Die weiteren Werte sind relativ dazu in Prozenten dargestellt. Die Standardabweichungen sind jeweils grafisch über den Balken angegeben.

Die TNFα-Behandlung führte erwartungsgemäß zu einer Aktivitätsminderung von EpCAMprom-Luc um 55% (vgl. 2. Balken). Dieser Effekt wurde durch TRADD-DN vollständig unterbunden. Eine Behandlung mit TNFα hatte nach der Transfektion mit TRADD-DN keine Repression von EpCAMprom-Luc zur Folge.

4.7.3 DN-I κ B unterbindet die Aktivierung von NF- κ B

Die eigentliche Aktivierung von NF- κ B wird durch die Dissoziation des NF- κ B-Inhibitors (I κ B) von NF- κ B vermittelt. Dieser Schritt wurde mit Hilfe des Expressionsplasmid DN-I κ B unterbunden. DN-I κ B kodiert für eine nicht phosphorylierbare I κ B-Mutante, die weder ubiquitiniert, noch durch das Proteosom abgebaut werden kann. Für die Ablösung des Inhibitors von NF- κ B ist dies aber unabdingbar. Dieser Effekt ist dominant.

Zunächst sollte die Funktionalität der dominant-negativen I κ B Mutante auf die NF- κ B-Induktion durch TNF α in GHD-1-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden GHD-1-Zellen mit dem NF- κ B-Reporter NF- κ B-Luc und entweder mit oder ohne DN-I κ B transfiziert. Nach Behandlung der GHD-1-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an TNF α wurde die NF- κ B-Induktion mit Hilfe eines Luziferase-Assays bestimmt.

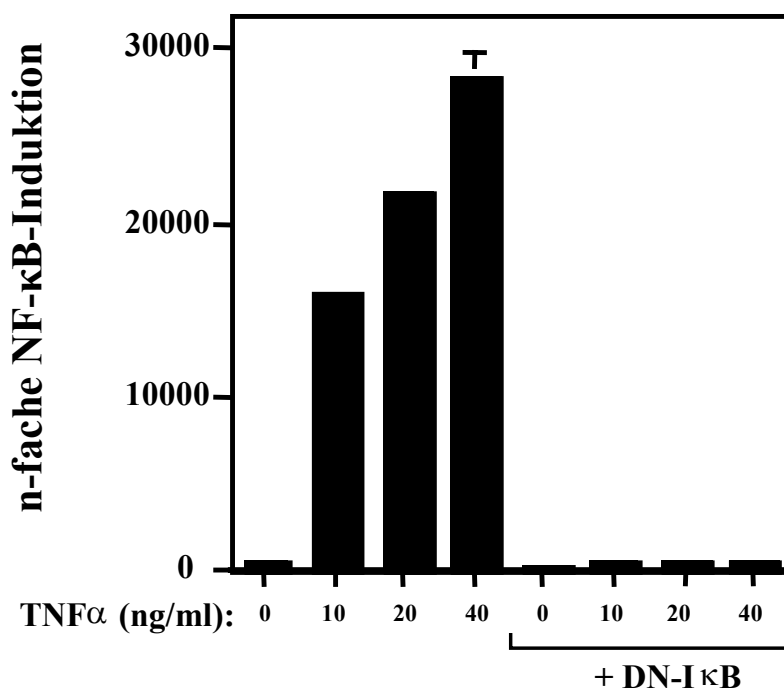


Abbildung 20: Einfluß von DN-I κ B auf NF- κ B-Luc in Abhängigkeit von TNF α

GHD-1-Zellen (5×10^5 pro Ansatz) wurden mit NF- κ B-Luc (100 ng) und mit DN-I κ B (1 μ g) bzw. ohne DN-I κ B bei steigenden Konzentrationen an TNF α kultiviert. Nach 16 h wurde die Induktion von NF- κ B durch einen Luziferase-Assay ermittelt.

Die Kofunktions von DN-I κ B führte zu einer vollständigen Hemmung der NF- κ B Aktivierung durch TNF α .

4.7.4 DN-I κ B blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc

Um zu überprüfen, ob DN-I κ B auch die Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch TNF α unterbindet, wurden GHD-1-Zellen mit EpCAMprom-Luc entweder mit oder ohne DN-I κ B kotransfiziert. Diese transfizierten Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von TNF α kultiviert. Nach 16 h wurde die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes mit Hilfe eines Luziferase-Assays bestimmt.

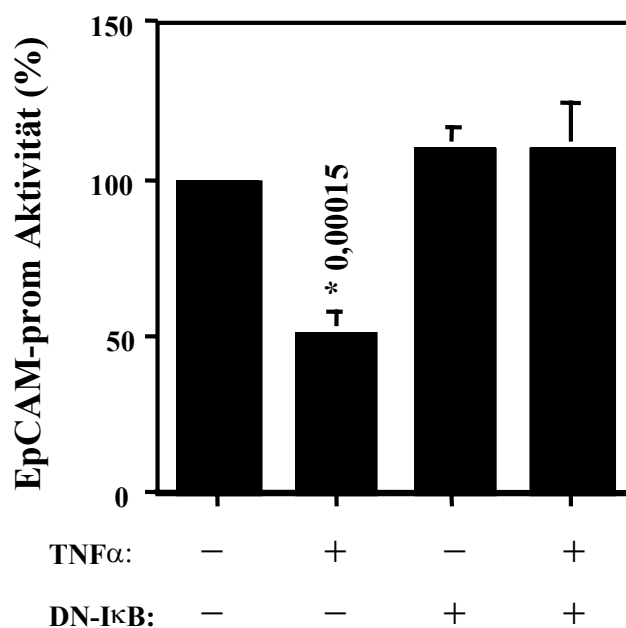


Abbildung 21: Einfluß von DN-I κ B auf EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α

GHD-1-Zellen (5×10^5 Zellen pro Ansatz) wurden mit EpCAMprom-Luc ($0,5 \mu\text{g}$) entweder mit DN-I κ B ($1 \mu\text{g}$) oder ohne DN-I κ B transfiziert und sowohl in Anwesenheit von TNF α (20 ng/ml) als auch ohne TNF α , 16h kultiviert. Im Anschluß wurde die Aktivität von EpCAMprom-Luc durch einen Luziferase-Assay bestimmt.

Als Referenzwert wurde der Mittelwert unbehandelter GHD-1-Zellen verwendet und auf 100 % festgelegt. Die anderen Werte sind relativ dazu in Prozenten dargestellt.

TNF α induzierte reproduzierbar eine Repression der Promotorfragment-Aktivität um 50%. Durch die Kotransfektion von DN-I κ B wurde die Repression komplett unterbunden. Auf die Aktivität des Promotorfragmentes bei fehlendem TNF α wirkte sich DN-I κ B nicht aus.

4.7.5 p300 blockiert die Effekte von TNF α auf EpCAMprom-Luc

NF- κ B wandert nach Dissoziation von seinem Inhibitor in den Zellkern, um dort die Transkription NF- κ B regulierter Gene zu aktivieren. Wichtiger Schritt dieser Aktivierung ist die Rekrutierung der Transkriptionskoaktivatoren p300 und CBP, die strukturelle Homologe sind und oft synonym verwandt werden (Sterner et al., 2000). p300 (CBP) wird zu den Histon-Azetyltransferasen (HAT) gerechnet, die den initialen Schritt der Dissoziation der Histonproteine von der DNA katalysieren, was, wie einleitend beschrieben, erst die Transkription erlaubt. Reprimierende Effekte auf die Aktivität von Promotoren durch NF- κ B können über p300 (CBP) vermittelt werden, in dem die p65-Untereinheit von NF- κ B um diese wichtigen Transkriptionskoaktivatoren kompetitiert und für die Transkription anderer Gene nicht zur Verfügung stehen (Hottiger et al., 1998; Sheppard et al., 1998; Illi et al., 2000; Nagarajan et al., 2000).

Zur Überprüfung, ob diese Konkurrenz auch für die Repression des EpCAM-Promoterfragmentes verantwortlich ist, wurden GHD-1-Zellen sowohl mit EpCAMprom-Luc als auch mit oder ohne p300/CBP transfiziert. Nach Behandlung mit oder ohne TNF α wurde die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes durch einen Luziferase-Assay bestimmt.

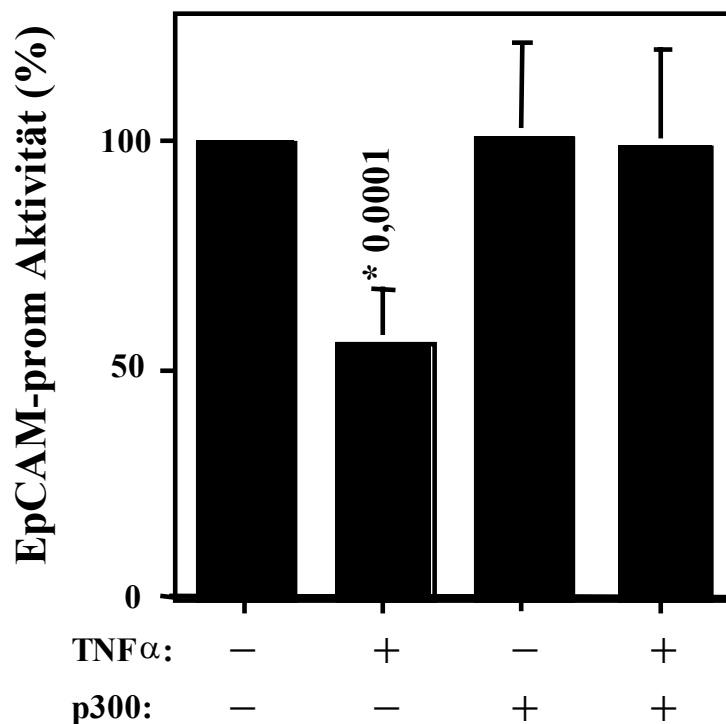


Abbildung 22: Einfluß von p300 auf EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α

GHD-1-Zellen (5×10^5 Zellen pro Ansatz) wurden mit EpCAMprom-Luc ($0,5 \mu\text{g}$) mit oder ohne p300/CBP ($0,1 \mu\text{g}$) kotransfiziert. Nach Behandlung mit TNF α (40 ng/ml) und ohne TNF α wurde die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes durch einen Luziferase-Assay bestimmt.

Als Referenzwert wurde der Durchschnittswert unbehandelter Zellen verwendet und auf 100% festgelegt. Die anderen Werte sind jeweils relativ dazu in Prozenten aufgeführt. Die Standardabweichungen sind jeweils grafisch über den Balken dargestellt.

TNF α reprimierte die EpCAM-Promotorfragment-Aktivität. Der Vergleich der ersten beiden Balken zeigt eine Repression in Höhe von 44%. Dieser Effekt wurde durch p300/CBP vollständig unterbrochen (rechter Balken). Auf die Promotorfragment-Aktivität hatte p300/CBP keinen Einfluß (3. Balken v.l.).

5 Diskussion

Die Karzinogenese ist ein vielschichtiger und komplexer Prozeß, bei dem es zu multiplen Zellveränderungen kommt (Hanahan et al., 2000). Diese schlagen sich auch im Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen der Zelle nieder. Das Expressionsmuster kann im Vergleich zu gesunden Zellen entweder qualitativ, d.h. in Form von spezifischen Molekülen, die nur auf Tumorzellen gefunden werden, den sogenannten tumorspezifischen Antigenen, oder quantitativ verändert sein. Oberflächenmoleküle, die in Malignomen eine quantitative Veränderung erfahren, bezeichnet man als tumorassoziierte Antigene, zu denen auch das Zelladhäsionsmolekül EpCAM zählt.

In den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rückte EpCAM, als Mitte der Neunziger Jahre erstmals ein monoklonaler Antikörper zur Therapie des Kolonkarzinoms eine Zulassung für den klinische Einsatz erhielt. Dieser Antikörper namens Panorex® (Edrecolomab) erkennt EpCAM als Zielantigen (Riethmüller et al., 1998). EpCAM wird auf allen Malignomen epithelialen Ursprungs, also auch in Kolon-Karzinomen, überexprimiert, in Plattenepithelkarzinomen kommt es sogar zu einer *de novo* Expression (Litvinov et al., 1996; Balzar et al., 1999). EpCAM findet deshalb als Tumormarker (Ryan et al., 1997; Chaubal et al., 1999; Poczatek et al., 1999) und als Zielantigen für therapeutische Antikörper im Rahmen maligner Neoplasien Verwendung. (Riethmüller et al., 1994; Mack et al., 1997; Braun et al., 1999; Zeidler et al., 1999; Zeidler et al., 2000; Basak et al., 2000; Schwartzberg, 2001; Heiss et al. 2005).

Trotz des vielfältigen Einsatzes von EpCAM ist erstaunlich wenig über die molekularen Vorgänge bekannt, die der Expression EpCAMs zugrundeliegen. Es ist bekannt, daß die Expression EpCAMs mit einer erhöhten Zellproliferationsrate und einem erhöhten Dysplasiegrad korreliert (Litvinov et al., 1996; Balzar et al., 1999). Ob EpCAM hierbei eine wesentliche Rolle spielt, ist noch nicht erforscht.

Über die Kontrolle der Expression von EpCAM ist ebenfalls wenig bekannt. So ist zwar ein 440-bp großes Fragment des EpCAM-Promotors kloniert und sequenziert worden, über dessen Regulation existieren jedoch bislang keine Daten (Linnenbach et al., 1993).

Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Untersuchung des bisher bekannten Promotorfragmentes. Als zweiter Teil war die Identifikation weiterer Promotorsequenzen geplant, um den kompletten EpCAM-Promotor zu klonieren und diesen ebenfalls funktionell zu untersuchen.

5.1 Analyse der transkriptionellen Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes

Zunächst galt es ein System zu etablieren, das die Messung der transkriptionellen Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in verschiedenen Zelllinien erlaubt. Als experimentelle Methode wurde der Luziferase-Assay verwandt (Pazzagli et al., 1992). Hierfür wurde ein Luziferase-Reporterplasmid konstruiert, bei dem das Luziferasegen unter der transkriptionellen Kontrolle des EpCAM-Promotorfragmentes steht (vgl. 4.2). Die Aktivität des Luziferase Markergens ist proportional zur Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes, welche im Luziferase-Assay durch die gemessene Lumineszenz dargestellt wird.

Die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes wurde in den EpCAM-positiven Zelllinien ANT-1 und GHD-1 und der EpCAM-negativen Zelllinie HEK-293 untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das EpCAM-Promotorfragment in EpCAM-positiven Zelllinien eine bis zu 10-fach höhere transkriptionelle Aktivität besitzt, als in der EpCAM-negativen Zelllinie (vgl. 4.2). Da das Reporterplasmid sowohl in den EpCAM-positiven, als auch in der EpCAM-negativen Zelllinie für die basalen Transkriptionsfaktoren frei zugänglich ist, läßt sich aus der deutlich höheren Aktivität in den EpCAM-positiven Zelllinien ableiten, daß in ihnen offenbar Transkriptionskoaktivatoren vorhanden sind, die die erhöhte Transkription ermöglichen. Aufgrund der wesentlich niedrigeren Transkription in EpCAM-negativen Zellen ist davon auszugehen, daß diese Koaktivatoren hier fehlen bzw. deren Aktivität/Expression deutlich vermindert ist. Die Aktivierung des EpCAM-Promotorfragmentes scheint somit von der Ausdifferenzierung der Zelle und konsekutiv daraus von der Aktivität bestimmter Koaktivatoren abhängig zu sein.

5.2 Einfluß von Zytokinen auf die transkriptionelle Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes und die Expression von EpCAM

Nach der experimentellen Bestätigung der Promotoraktivität des klonierten EpCAM-Promotorfragmentes sollte der Einfluß des Tumornekrosefaktors alpha (TNF α) und des karzinogenen Phorbolesters TPA auf die Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes untersucht werden. Dadurch sollten erste Einblicke in die Regulation des EpCAM-Promotors gewonnen werden.

Sowohl TNF α als auch TPA spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit malignen Neoplasien. So kann TNF α in malignen Tumoren Zellnekrose bzw. Apoptose induzieren (Carswell et al., 1975), indem es auf Tumorzellen spezifisch zytostatisch bzw. zytotoxisch wirkt (Petak et al., 2001). Zudem verstärkt TNF α die Immunabwehr gegen maligne Tumore durch die Induktion weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Ibelgauffs, 2002). Molekulare Basis für diese Wirkungen ist die Bindung von TNF α an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) und die daraus resultierende Induktion des NF- κ B Signalweges (Chung et al., 2002).

Der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) weist hingegen andere Eigenschaften auf. TPA ist ein Verstärker der malignen Transformationssequenz, wirkt aber nicht mutagen oder onkogen (Castagna, 1987; Yuspa et al., 1996). Dies wird durch die Aktivierung des Proteinkinase C-Signalweges und damit letztlich durch die Induktion des „Activator Protein 1“ (AP-1) erreicht (Bast et al., 2000). Das Protoonkogen AP-1 wirkt als Aktivator der Zellproliferation (Angel et al., 1991), woraus sich die Begünstigung der malignen Transformation erklären lässt (Yuspa et al., 1996). Allerdings kann TPA ebenfalls NF- κ B induzieren (Bhat-Nakshatri et al., 2002) und somit die Aktivität des Promotors reduzieren.

Sowohl unter Einfluß von TNF α als auch unter Einfluß von TPA kam es zu einer Repression des EpCAM-Promotorfragmentes (vgl. Kapitel 4.3, **Abbildung 10**). Dies deutet darauf hin, dass bei beiden Substanzen die Signaltransduktion über NF- κ B erfolgt.

Vor der weiteren Untersuchung der Signalwege, die zur Repression des EpCAM-Promotorfragmentes führen, wurde untersucht, ob das zelluläre Meß-System (bzw. die Aktivität von EpCAMprom-Luc) die tatsächliche Aktivität des physiologischen EpCAM-Promotors widerspiegelt. Die Expression von EpCAM auf der Zelloberfläche ist Ausdruck der Aktivität des EpCAM-Promotors. Die mit Hilfe des artifiziellen Meßsystems gewonnenen Lumineszenzwerte sollten somit im Einklang mit der Oberflächenexpression von EpCAM stehen, was die Untersuchung mit Hilfe von Immunoblots bzw. FACS-Scans auch bestätigte (vgl. 4.6). Sowohl die Behandlung von FaDu-Zellen mit TPA (vgl. 4.6.1) wie auch mit TNF α (vgl. 4.6.1, 4.6.2) führten zu einer reduzierten EpCAM Expression auf der Zelloberfläche. Mit Hilfe von EpCAMprom-Luc war es somit möglich die Aktivität und damit die Regulation des physiologischen EpCAM-Promotors zu untersuchen.

5.3 Identifikation der Mediatoren der TNF α vermittelten Inhibition des EpCAM Promotors

Wie oben bereits erwähnt, wirken sowohl TPA als auch TNF α reprimierend auf die Expression des tumorassoziierten Antigens EpCAM. Für TNF α konnte gezeigt werden, daß die Inhibition des Promotorfragmentes weder durch reduzierte Zellvitalität über Induktion von Apoptose (vgl. 4.4) noch durch eine reduzierte enzymatische Aktivität der Luziferase verursacht wurde (vgl. 4.5). Dies deutet darauf hin, daß die Behandlung EpCAM-positiver Zellen mit TNF α eine spezifische Repression des EpCAM-Promotors aufgrund der Induktion von NF- κ B bewirkt.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Repression des EpCAM-Promotors durch TNF α tatsächlich über die Induktion des NF- κ B-Signalweges durch TNF-R1 induziert wird, wurde der NF- κ B-Signalweg mit Hilfe mutanter Proteine, die im Rahmen dieser Signalkaskade eine Rolle spielen, unterbrochen, und damit eine Aktivierung von NF- κ B verhindert.

Sowohl der Einsatz einer dominant-negativen TRADD-Mutante (vgl. 4.7.2), als auch der Einsatz eines modifizierten NF- κ B-Inhibitors (vgl. 4.7.3, 4.7.4), verhinderten die Repression des EpCAM-Promotors durch TNF α . Die Repression des EpCAM-Promotors durch TNF α

muß somit über die Induktion von NF- κ B vermittelt werden. Der genaue molekulare Mechanismus, der zur Repression des EpCAM Promotors führt, erklärt sich hieraus allerdings noch nicht vollständig, zumal NF- κ B als Transkriptionsfaktor aktivierend auf entsprechend responsible Promotoren wirkt. Für die Repression des EpCAM-Promotors muß somit ein zusätzlicher Mechanismus verantwortlich sein.

NF- κ B liegt in der Zelle als Heterodimer, bestehend aus einer 50 kDa großen Untereinheit (p50) und einer 65 kDa großen Untereinheit (p65), vor (De Bosscher et al., 2000). p65, das auch als RelA bezeichnet wird, initiiert nach Bindung an den Promotor des zu transkribierenden Gens die Ausbildung des Initiationskomplexes durch Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren, wie den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (vgl. 1.3.3) und wichtigen Transkriptionskoaktivatoren, wie bspw. p300/CBP (vgl. 4.7.5) (Schmitz et al., 1995; Shepard et al., 1999; De Bosscher et al., 2000). Die Histonacetyltransferase p300/CBP ist an der Ausbildung eines sogenannten Enhanceosoms beteiligt, das die Aktivierung bzw. Verstärkung der Transkription entsprechender Gene vermittelt (Vo et al., 2001). Die Ausbildung dieses Komplexes unter Beteiligung von p300/CBP ist inzwischen bei der Transkription verschiedener Gene, u.a. dem Interferon- β Gen, dem Interleukin-6 Gen und dem E-Selectin-Gen, beschrieben (Vo et al., 2001; De Bosscher et al., 2000; Vanden Berghe et al., 1999; Gerritsen et al., 1997). Zum besseren Verständnis ist ein Modell zu diesem Komplex beispielhaft anhand der Transkription des Interleukin-6 Genes grafisch in **Abbildung 23** dargestellt.

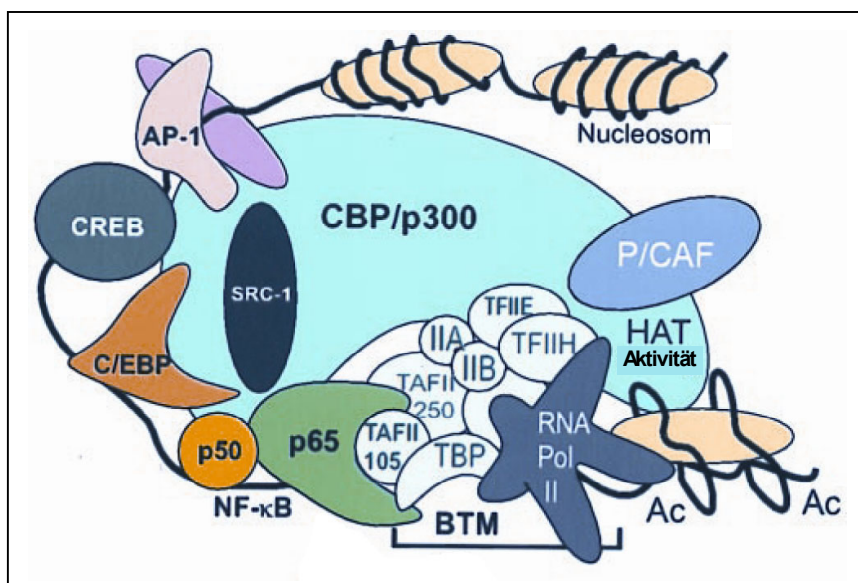


Abbildung 23: Enhanceosom bei der Transkription des IL-6-Genes (De Bosscher et al., 2000)

- Ac** = Azetylierte Histone, deren Bindung an die DNA gelockert ist, was zur Dekondensation der DNA führt, die somit transkribiert werden kann.
- AP-1** = Activator protein 1: Protoonkogen, das als Heterodimer aus Jun und Fos vorliegt, und ein Koaktivator der IL-6-Transkription ist (Vanden Berghe et al., 1999).
- BTM** = Basale Transkriptionsmaschinerie, bestehend aus den allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II.
- C/EBP** = CAAT – Enhancer-binding protein: Transkriptionsfaktor, der an der Transkription von Akut-Phase-Proteinen und Akut-Phase-Zytokinen, beteiligt ist (Vanden Berghe et al., 1999).
- CREB** = Cyclic AMP response element binding protein.
- NF-κB** = Nuclear factor κB: Transkriptionsfaktor der v.a. die Transkription proinflammatorischer Gene vermittelt; liegt hauptsächlich als Heterodimer aus p50 und p65 (RelA) vor (De Bosscher et al., 2000).
- P/CAF** = CBP-associated factor: Cofaktor der Gentranskription; Katalysiert synergistisch zu CBP/p300 die Histonazetylierung (Yang et al., 1996)
- SRC-1** = Steroid Receptor Coactivator – 1: Verstärker der NF-κB-vermittelten Genaktivierung (Sheppard et al., 1998).

Wie aus **Abbildung 23** ersichtlich, kommt NF- κ B eine zentrale Rolle bei der Ausbildung des Enhanceosoms zu. Die p65-Untereinheit interagiert sowohl mit der basalen Transkriptionsmaschinerie, als auch mit CBP/p300 (De Bosscher et al., 2000). Da CBP/p300 unter physiologischen Bedingungen der Zelle nur in begrenzter Anzahl zu Verfügung steht und es zudem bei der Transkription vieler Gene involviert ist, kommt es zur Konkurrenz um diesen wichtigen Transkriptionskoaktivator (Vo et al., 2001).

Auch im Rahmen der Infektion von dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) wurde die Konkurrenz um p300/CBP beschrieben. Die Transkription des viralen Genomes von HIV-1 wird durch TNF α verstärkt. Verantwortlich ist die Induktion von NF- κ B und dessen Bindung an zwei κ B-Sequenzen innerhalb des viralen Promotors LTR (Long terminal repeat). Die Transkriptionsverstärkung kann durch Interferon α (IFN- α), welches in der Wirtszelle den „Signal transducer and activator of transcription 2“ (STAT2) induziert, unterbrochen werden. Beide Transkriptionsfaktoren, NF- κ B bzw. p65 (RelA) und STAT2, konkurrieren um p300/CBP und sind jeweils in der Lage, die durch den Konkurrenten modulierte Transkription zu reprimieren (Hottiger et al., 1998).

Die Dominanz von p65 bzgl. der Konkurrenz um p300/CBP und der daraus resultierenden Repression der Promotoraktivität wurde in jüngster Zeit bei einer Vielzahl weiterer Gene beobachtet. Dies ist u.a. für den Östrogenrezeptor der glatten Muskelzellen der Koronarien beschrieben, dessen Transkription durch p65 (RelA), über die Konkurrenz um p300/CBP reprimiert wird (Speir et al., 2000). Analog wird die Repression des Smad7-Promotors und daraus resultierend die verminderte Expression von Smad7, einem Signalmolekül des TGF- β -Signalweges, durch p65 (RelA) erklärt (Nagarajan et al., 2000).

Weitere Beispiele sind cyp1a1 (Cytochrom P-450 1a1) (Ke et al., 2001), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (Farmer et al., 2000), die alle durch die Aktivierung von NF- κ B und der Konkurrenz von p65 (RelA) um p300/CBP reprimiert werden.

Auch die Repression des EpCAM-Promotors durch TNF α ist durch die Konkurrenz von NF- κ B um p300/CBP zu erklären. Diese wurde experimentell mit Hilfe eines Expressionsplasmides für p300/CBP aufgehoben (vgl. 4.7.5). Die Konkurrenz um p300/CBP scheint für eine Vielzahl von Signalkaskaden verantwortlich zu sein. Neben NF- κ B interagiert auch AP-1 mit p300/CBP und kann ebenfalls durch Konkurrenz um diesen limitierenden Faktor die Transkription von Genen reprimieren (Kamei et al., 1996; Horvai et al., 1997; Albanese et al., 1999; Verrechia et al., 2000).

Der reprimierende Effekt durch Behandlung mit TPA lässt sich auch in Einklang mit den für TNF α gewonnenen Erkenntnisse bringen. Zu erhöhter Proliferation und damit zur malignen Transformation von Zellen kommt es, wenn TPA über den Proteinkinase C Signalweg AP-1 (Lee et al., 1994; Przybyszewski et al., 2001; Zhong et al., 2001) induziert.

Den Gegenteiligen Effekt, wie im Falle des EpCAM Promotorfragmentes hat TPA, wenn NF- κ B induziert wird (Gao et al., 2001).

5.4 Klonierung weiterer Promotorbereiche des EpCAM-Promotors

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Klonierung weiterer Promotorbereiche mit Hilfe von Genbibliotheken, sowie bakterieller Einzelklone. Der 5'-flankierende Bereich des EpCAM-Genes beinhaltet den EpCAM-Promotor. Dieser weist einen hohen Gehalt an Guanin- (G) und Cytosin- (C) auf. Diese GC-reichen Promotorbereiche können mit sich selbst Bindungen einzugehen und Sekundärstrukturen auszubilden. Aus diesem Grund gelang es bisher nicht ein größeres Promotorfragment per PCR zu amplifizieren (vgl. 3.2). Auch eine Isolierung über die Southern-Blot Methode mit dem bekannten Fragment als Sonde gelang bisher nicht.

5.5 Ausblick

Da bisher nur ein Teilbereich des EpCAM-Promotors isoliert werden konnte, ist ein Ziel nachfolgender Experimente zusätzliche Promotorbereiche, im Idealfall den gesamten Promotor, per PCR oder über Southern Blot-Hybridisierung zu isolieren. Diese Bereiche könnten dann ebenfalls über einen Luziferase-Assay auf ihre transkriptionelle Aktivität überprüft werden. Außerdem sollte der Einfluß von weiteren Zytokinen auf die isolierten Promotorbereiche untersucht werden. Insbesondere die Suche nach Aktivatoren des EpCAM-Promotors wäre von Interesse, da es bisher nicht gelang, den Promotor positiv zu beeinflussen. Zusätzlich könnten mit Hilfe von Band-shift-Assays Proteine isoliert werden, die an den Promotor binden, und in weiteren Experimenten geklärt werden, wie sie die transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Mit dem besseren Verständnis der Regulation des EpCAM Promotors kann evtl. ein wichtiger Beitrag bei der Suche nach gezielten Therapien gegen epitheliale Malignome geleistet werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Erforschung der Regulation des tumorassoziierten Antigens EpCAM. Die *de novo* Expression dieses Moleküls geht mit der malignen Entartung von Zellen einher. Diesem Umstand verdankt EpCAM seine besondere Attraktivität als Zielmolekül moderner Therapiestrategien gegen Krebs. Über die Regulation dieses Antigens ist allerdings bisher nahezu nichts bekannt. Aus dem Wissen um die Regulation EpCAMs ließen sich unter Umständen neue Ansätze bei der Therapie maligner Neoplasien ableiten.

Um tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen dieser Regulation zu gewinnen, wurde ein System etabliert, das die Messung der transkriptionellen Aktivität des bisher bekannten Promotor-Fragmentes ermöglichte. Hierzu wurde ein Luciferase Reporterplasmid konstruiert, in dem das Luziferase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des bisher bekannten, 440 bp großen EpCAM-Promotor-Fragmentes steht.

Zunächst wurde die transkriptionelle Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in verschiedenen Zelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß diese in EpCAM-positiven Zellen wesentlich höher als in EpCAM-negativen Zellen ist.

Die weitere funktionelle Analyse des Reporterplasmides ergab, daß sich das EpCAM-Promotor-Fragment durch TNF α und TPA reprimieren lässt. Die Repression des EpCAM-Promotor-Fragmentes durch TNF α kam dabei weder durch Induktion von Apoptose, noch durch Reduktion der Zellvitalität noch durch eine direkte Minderung der Luziferase-Aktivität zustande.

Sowohl TNF α als auch TPA bedienen sich des NF- κ B-Signalweges zur Vermittlung ihrer Effekte. Durch gezielte Unterbrechung dieser Signalkaskade auf verschiedenen Ebenen mit Hilfe von dominant negativen Mutanten konnte gezeigt werden, daß der NF- κ B-Signalweg auch für die Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch TNF α verantwortlich ist.

Eine Unterbrechung der Signaltransduktion am TNF-R1 mit Hilfe einer dominant-negativen TRADD-Mutante unterband die Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch TNF α genauso wie die Hemmung von NF- κ B durch eine dominant-negative Mutante des NF- κ B-Inhibitors I κ B.

NF- κ B kann durch eine Konkurrenz um die Histonazetyltransferasen p300 und CBP, welche wichtige Transkriptionskoaktivatoren sind, eine Repression der transkriptionellen Aktivität von Promotoren verursachen. Wird die Limitierung durch Überexpression von p300 und CBP aufgehoben, so kommt es zu keiner Repression des EpCAM-Promotorfragmentes durch TNF α .

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Expression EpCAMs durch TNF α gehemmt wird. Molekulare Basis ist hierbei die Aktivierung des TNF α -Rezeptors 1 (TNF-R1) durch TNF α und die nachfolgende Induktion des NF- κ B-Signalweges. NF- κ B kompetitiert dabei mit den Transkriptionsfaktoren des EpCAM-Genes um die Transkriptionskoaktivatoren p300 und CBP, die somit bei der Transkription EpCAMs nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, und somit für den reprimierenden Effekt auf den EpCAM-Promotor verantwortlich sind, was letztlich zur verminderten Expression EpCAMs führt.

7 Anhang

7.1 Literatur

Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantaggiati M, Somasundaram K, Thimmapaya B, Pestell RG.

Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis.

J Biol Chem. 1999 Nov 26;274(48):34186-95.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.

Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995, ISBN 3-527-30055-4

Angel P, Karin M.

The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.

Biochim Biophys Acta. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57. Review.

Arber W.

Restriction Endonucleases

Angew Chem Int Ed Engl 1978 Feb;17(2):73-9

Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV.

Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule.

Mol Cell Biol. 1998 Aug;18(8):4833-43.

Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmuller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV.

Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions.

Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(7):2570-80.

Balzar M, Prins FA, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV.

The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM.

Exp Cell Res. 1999 Jan 10;246(1):108-21.

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV.

The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).

J Mol Med. 1999 Oct;77(10):699-712. Review

Basak S, Eck S, Gutzmer R, Smith AJ, Birebent B, Purev E, Staib L, Somasundaram R, Zaloudik J, Li W, Jacob L, Mitchell E, Speicher D, Herlyn D.

Colorectal cancer vaccines: antiidiotypic antibody, recombinant protein, and viral vector.

Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;910:237-52; discussion 252-3.

Basak S, Speicher D, Eck S, Wunner W, Maul G, Simmons MS, Herlyn D.

Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue.

J Natl Cancer Inst. 1998 May 6;90(9):691-7.

Bast, Robert C.; Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Holland, James F.; Frei, Emil, editors.

Cancer Medicine, 5th ed.

Canada: BC Decker Inc; 2000.

Bhat-Nakshatri P, Sweeney CJ, Nakshatri H.

Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells.

Oncogene. 2002 Mar 27;21(13):2066-78.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Birnboim HC.

A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.

Methods Enzymol. 1983;100:243-55

Bjork P, Jonsson U, Svedberg H, Larsson K, Lind P, Dillner J, Hedlund G, Dohlsten M, Kalland T.

Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell- surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody.

J Biol Chem. 1993 Nov 15;268(32):24232-41.

Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG.

Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms.

Ann N Y Acad Sci. 1993 Aug 12;690:42-9. Review

Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL.

Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow.

Clin Cancer Res. 1999 Dec;5(12):3999-4004.

Brown, Terence A

Gentechnologie für Einsteiger : Grundlagen, Methoden, Anwendungen.

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 1993, ISBN 3-86025-207-0

Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, Palka G, Guerra E, Alberti S.

Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization.

Cytogenet Cell Genet. 2001;92(1-2):164-5.

Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A.

Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Mar;83(6):1670-4.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.

An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3666-70.

Castagna M.

Phorbol esters as signal transducers and tumor promoters.

Biol Cell. 1987;59(1):3-13. Review.

Chambers AF, Matrisian LM.

Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.

J Natl Cancer Inst. 1997 Sep 3;89(17):1260-70. Review.

Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R.

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 F, Castranova V, Shi X.

New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation.

Am J Pathol. 2001 Aug;159(2):387-97. Review.

Chen G, Goeddel DV.

TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.

Science. 2002 May 31;296(5573):1634-5. Review.

Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R.

Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jun 7;91(12):5695-9.

Chong JM, Speicher DW.

Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep- CAM).

J Biol Chem. 2001 Feb 23;276(8):5804-13

Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H.

All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction.

J Cell Sci. 2002 Feb 15;115(Pt 4):679-88. Review.

Church GM, Gilbert W.

Genomic sequencing.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Apr;81(7):1991-5.

Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Ptasznik A, Inverardi L, Ricordi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA, Hayek A.

KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development.

J Cell Biol. 1998 Mar 23;140(6):1519-34.

Dahl AM, Klein C, Andres PG, London CA, Lodge MP, Mulligan RC, Abbas AK.

Expression of bcl-X(L) restores cell survival, but not proliferation off effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes.

J Exp Med. 2000 Jun 19;191(12):2031-8.

De Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV.

Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver.

J Pathol. 1999 Jun;188(2):201-6.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G.

Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):3919-24.

Demeke T, Adams RP.

The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR.

Biotechniques. 1992 Mar;12(3):332-4.

Durbin H, Rodrigues N, Bodmer WF.

Further characterization, isolation and identification of the epithelial cell-surface antigen defined by monoclonal antibody AUA1.

Int J Cancer. 1990 Mar 15;45(3):562-5.

Eckert KA, Kunkel TA.

High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase.

Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11;18(13):3739-44.

Eckert KA, Kunkel TA.

DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.

PCR Methods Appl. 1991 Aug;1(1):17-24. Review.

Edwards DP, Grzyb KT, Dressler LG, Mansel RE, Zava DT, Sledge GW Jr, McGuire WL.

Monoclonal antibody identification and characterization of a Mr 43,000 membrane glycoprotein associated with human breast cancer.

Cancer Res. 1986 Mar;46(3):1306-17.

Farmer PK, He X, Schmitz ML, Rubin J, Nanes MS.

Inhibitory effect of NF-kappaB on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and retinoid X receptor function.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 Jul;279(1):E213-20.

Fearon ER, Vogelstein B.

A genetic model for colorectal tumorigenesis.

Cell. 1990 Jun 1;61(5):759-67. Review

Feinberg AP, Vogelstein B.

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.

Anal Biochem. 1983 Jul 1;132(1):6-13.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.

Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Nov;84(21):7413-7

Fernsten PD, Pekny KW, Reisfeld RA, Walker LE.

Biosynthesis and glycosylation of the carcinoma-associated antigen recognized by monoclonal antibody KS1/4.

Cancer Res. 1990 Aug 1;50(15):4656-63.

Filichkin SA, Gelvin SB.

Effect of dimethyl sulfoxide concentration on specificity of primer matching in PCR.

Biotechniques. 1992 Jun;12(6):828-30. No abstract available.

Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T.

Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster

Cell 1980 Apr;19(4):959-72

Gao X, Ikuta K, Tajima M, Sairenji T.

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase.

Virology. 2001 Jul 20;286(1):91-9.

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T.

CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):2927-32.

Gilbert, SF.

Developmental Biology. 6th ed.

Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.; 2000, ISBN 0-87893-243-7

Gires O, Kieu C, Fix P, Schmitt B, Munz M, Wollenberg B, Zeidler R.

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.

Hammarstrom S.

The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues.

Semin Cancer Biol. 1999 Apr;9(2):67-81. Review.

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR .

Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria.

Methods Enzymol. 1991;204:63-113

Hanahan D, Weinberg RA.

The hallmarks of cancer.

Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review. No abstract available.

Heiss MM, Strohle MA, Jager M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H.

therapy of malignant ascites with trifunctional antibodies.

Immuno-

Int J Cancer.

2005 May 19; [Epub ahead of print]

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H.

Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Mar;76(3):1438-52.

High AS, Robinson PA, Klein CE.

Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias.

J Oral Pathol Med. 1996 Jan;25(1):10-3.

Horvai AE, Xu L, Korzus E, Brard G, Kalafus D, Mullen TM, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK.

Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Feb 18;94(4):1074-9.

Hottiger MO, Felzien LK, Nabel GJ.

Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the coactivator p300.
EMBO J. 1998 Jun 1;17(11):3124-34.

Houlston RS.

What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer.
Mol Pathol. 2001 Aug;54(4):206-14. Review.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.

The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.
Cell. 1995 May 19;81(4):495-504.

Ibelgaufts H

C O P E - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia - Version 8.7
<http://www.copewithcytokines.de>, April 2002

Ibelgaufts, Horst

Gentechnologie von A bis Z. - 1. korrigierter Nachdruck – Studienausgabe
Wiley-VCH Verlag, 1993, ISBN 3-527-30008-2

Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC, Gaetano C.

Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter.
Circ Res. 2000 Jun 23;86(12):E110-7.

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ.

A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments
Nat Genet 1994 Jan;6(1):84-9

Janeway CA, Travers P, Walport M; Shlomchik M.

Immunobiology. 5th ed.
Garland Publishing, New York and London; 2001.

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG.

A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.

Cell. 1996 May 3;85(3):403-14.

Kasper M, Behrens J, Schuh D, Muller M.

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.

Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y.

Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.

J Biol Chem. 2001 Oct 26;276(43):39638-44.

Khandjian EW.

UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals.

Mol Biol Rep. 1986;11(2):107-15.

Kieser A, Kaiser C, Hammerschmidt W.

LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2.

EMBO J. 1999 May 4;18(9):2511-21.

Klein CE, Cordon-Cardo C, Soehnchen R, Cote RJ, Oettgen HF, Eisinger M, Old LJ.

Changes in cell surface glycoprotein expression during differentiation of human keratinocytes.

J Invest Dermatol. 1987 Nov;89(5):500-6.

Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P

Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.

Somatic Cell Genet. 1979 Nov;5(6):957-71.

LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE.

The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.

Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3247-59. Review.

Lee WY, Butler AP, Locniskar MF, Fischer SM.

Signal transduction pathway(s) involved in phorbol ester and autocrine induction of interleukin-1 alpha mRNA in murine keratinocytes.

J Biol Chem. 1994 Jul 8;269(27):17971-80.

Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H.

RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.

Biochemistry. 1977 Oct 18;16(21):4743-51

Lejeune FJ.

High dose recombinant tumour necrosis factor (rTNF alpha) administered by isolation perfusion for advanced tumours of the limbs: a model for biochemotherapy of cancer.

Eur J Cancer. 1995 Jun;31A(6):1009-16. No abstract available.

Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K.

Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes.

Mol Cell Biol. 1993 Mar;13(3):1507-15.

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO.

Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion.

Cell Adhes Commun. 1994 Oct;2(5):417-28.

Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO.

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.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO.

Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.

J Cell Biol. 1994 Apr;125(2):437-46.

Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E.

Molecular Cell Biology, 4th ed.

New York: W H Freeman & Co; c1999.

Löffler G, Petrides PE.

Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1997, ISBN 3-540-59006-4

Mack M, Gruber R, Schmidt S, Riethmuller G, Kufer P.

Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity.

J Immunol. 1997 Apr 15;158(8):3965-70.

Mannino RJ, Gould-Fogerite S.

Liposome mediated gene transfer.

Biotechniques. 1988 Jul-Aug;6(7):682-90.

Mattes MJ, Cairncross JG, Old LJ, Lloyd KO.

Monoclonal antibodies to three widely distributed human cell surface antigens.

Hybridoma. 1983;2(3):253-64.

Mitchell T, Sugden B.

Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus.

J Virol. 1995 May;69(5):2968-76.

Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P.

Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.

Cancer Res. 1987 Jun 1;47(11):2883-91.

Mosmann T.

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

Mueller H.

Tumor necrosis factor as an antineoplastic agent: pitfalls and promises.

Cell Mol Life Sci. 1998 Dec;54(12):1291-8. Review.

Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O.

The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.

Oncogene. 2004 Jul 29;23(34):5748-58.

Nagarajan RP, Chen F, Li W, Vig E, Harrington MA, Nakshatri H, Chen Y.

Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappaB.

Biochem J. 2000 Jun 15;348 Pt 3:591-6.

Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR.

Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism.

Mol Cell Biol. 1996 Feb;16(2):694-703.

Passlick B, Siene W, Seen-Hibler R, Wockel W, Thetter O, Pantel K.

The 17-1A antigen is expressed on primary, metastatic and disseminated non-small cell lung carcinoma cells.

Int J Cancer. 2000 Aug 15;87(4):548-52.

Pazzagli M, Devine JH, Peterson DO, Baldwin TO.

Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells.

Anal Biochem. 1992 Aug 1;204(2):315-23.

Perez MS, Walker LE.

Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker.

J Immunol. 1989 May 15;142(10):3662-7.

Petak I, Houghton JA.

Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy.

Pathol Oncol Res. 2001;7(2):95-106. Review.

Poczatek RB, Myers RB, Manne U, Oelschlager DK, Weiss HL, Bostwick DG, Grizzle WE.

Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia.

J Urol. 1999 Oct;162(4):1462-6.

Pomp D, Medrano JF.

Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction.

Biotechniques. 1991 Jan;10(1):58-9. No abstract available.

Pozzatti R, Muschel R, Williams J, Padmanabhan R, Howard B, Liotta L, Khoury G.

Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials.

Science. 1986 Apr 11;232(4747):223-7.

Przybyszewski J, Yaktine AL, Duysen E, Blackwood D, Wang W, Au A, Birt DF.

Inhibition of phorbol ester-induced AP-1-DNA binding, c-Jun protein and c-jun mRNA by dietary energy restriction is reversed by adrenalectomy in SENCAR mouse epidermis.

Carcinogenesis. 2001 Sep;22(9):1421-7.

Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, Figer A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E, Jones D, Dethling J, Colman J, Coward L, MacGregor S.

Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study.

Lancet. 2002 Aug 31;360(9334):671-7.

Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW.

Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors.

Int J Oncol. 2005 Jul;27(1):49-57.

Reed JC.

Bcl-2 family proteins.

Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3225-36. Review.

Renard N, Lienard D, Lespagnard L, Eggermont A, Heimann R, Lejeune F.

Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumour necrosis factor alpha (rTNF alpha).

Int J Cancer. 1994 Jun 1;57(5):656-63.

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.

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.

Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al.

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.

Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF.

Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 24;91(11):4731-5.

Roovers RC, Henderikx P, Helfrich W, van der Linden E, Reurs A, de Bruine AP, Arends JW, de Leij L, Hoogenboom HR.

High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting.
Br J Cancer. 1998 Dec;78(11):1407-16.

Ross JS, Fletcher JA.

HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer.
Am J Clin Pathol. 1999 Jul;112(1 Suppl 1):S53-67. Review.

Ryan PJ, Oates JL, Crocker J, Stableforth DE.

Distinction between pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma using MOC31 in an asbestos sprayer.
Respir Med. 1997 Jan;91(1):57-60.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.

Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989

Schmitz ML, Stelzer G, Altmann H, Meisterernst M, Baeuerle PA.

Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators.
J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7219-26.

Schon MP, Schon M, Mattes MJ, Stein R, Weber L, Alberti S, Klein CE.

Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4.
Int J Cancer. 1993 Dec 2;55(6):988-95

Schwartzberg LS.

Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma.

Crit Rev Oncol Hematol. 2001 Oct;40(1):17-24. Review

Shaulian E, Karin M.

AP-1 in cell proliferation and survival.

Oncogene. 2001 Apr 30;20(19):2390-400. Review.

Shaw G, Kamen R.

A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.

Cell. 1986 Aug 29;46(5):659-67.

Sheppard KA, Phelps KM, Williams AJ, Thanos D, Glass CK, Rosenfeld MG, Gerritsen ME, Collins T.

Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1.

J Biol Chem. 1998 Nov 6;273(45):29291-4.

Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T.

Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators.

Mol Cell Biol. 1999 Sep;19(9):6367-78.

Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ.

Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2755-9.

Southern EM.

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J Mol Biol. 1975 Nov 5;98(3):503-17. No abstract available.

Speir E, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ, Cannon RO 3rd.

Competition for p300 regulates transcription by estrogen receptors and nuclear factor-kappaB in human coronary smooth muscle cells.

Circ Res. 2000 Nov 24;87(11):1006-11.

Statistisches Bundesamt

Elektronische Veröffentlichungen, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden
<http://www.destatis.de>

Sterner DE, Berger SL.

Acetylation of histones and transcription-related factors.
Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Jun;64(2):435-59. Review.

Strnad J, Hamilton AE, Beavers LS, Gamboa GC, Apelgren LD, Taber LD, Sportsman JR, Bumol TF, Sharp JD, Gadski RA.

Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA.
Cancer Res. 1989 Jan 15;49(2):314-7.

Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T.

Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state.
J Immunol. 1991 Feb 1;146(3):1077-82.

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV, van Krieken JH.

Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997 Apr;123(4):412-9.

Thampoe IJ, Ng JS, Lloyd KO.

Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing.
Arch Biochem Biophys. 1988 Nov 15;267(1):342-52.

Thorgeirsson UP, Turpeenniemi-Hujanen T, Williams JE, Westin EH, Heilman CA, Talmadge JE, Liotta LA.

NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice.
Mol Cell Biol. 1985 Jan;5(1):259-62.

Trebak M, Begg GE, Chong JM, Kanazireva EV, Herlyn D, Speicher DW.

Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion.

J Biol Chem. 2001 Jan 19;276(3):2299-309.

Tsubura A, Senzaki H, Sasaki M, Hilgers J, Morii S.

Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors.

J Cutan Pathol. 1992 Feb;19(1):73-9.

Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G.

The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter.

J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):32091-8.

Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A.

Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation.

J Biol Chem. 2000 Sep 29;275(39):30226-31.

Vo N, Goodman RH.

CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation.

J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):13505-8. Review. No abstract available.

Vogelstein B, Kinzler KW.

The multistep nature of cancer.

Trends Genet. 1993 Apr;9(4):138-41. Review

Wadgaonkar R, Phelps KM, Haque Z, Williams AJ, Silverman ES, Collins T.

CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling.

J Biol Chem. 1999 Jan 22;274(4):1879-82.

Webster GA, Perkins ND.

Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53.

Mol Cell Biol. 1999 May;19(5):3485-95.

Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y.

A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A.

Nature. 1996 Jul 25;382(6589):319-24.

Yuspa SH, Dlugosz AA, Denning MF, Glick AB.

Multistage carcinogenesis in the skin.

J Investig Dermatol Symp Proc. 1996 Apr;1(2):147-50. Review.

Zeidler R, Mayer A, Gires O, Schmitt B, Mack B, Lindhofer H, Wollenberg B, Walz A.

TNFalpha contributes to the antitumor activity of a bispecific, trifunctional antibody.

Anticancer Res. 2001 Sep-Oct;21(5):3499-503.

Zeidler R, Mysliwietz J, Csanady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, Wollenberg B, Lindhofer H.

The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells.

Br J Cancer. 2000 Jul;83(2):261-6.

Zeidler R, Csanady M, Gires O, Lang S, Schmitt B, Wollenberg B.

Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1.

FASEB J. 2000 Apr;14(5):661-8.

Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H.

Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing.

J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1246-52.

Zhong S, Quealy JA, Bode AM, Nomura M, Kaji A, Ma WY, Dong Z.

Organ-specific activation of activator protein-1 in transgenic mice by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate with different administration methods.

Cancer Res. 2001 May 15;61(10):4084-91.

Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, Zorzos H, Elemenoglou J, Likourinas M.

Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study.

Eur Urol. 1995;28(3):251-4.

7.2 Abkürzungen

AMP.....	Adenosin-Monophosphat
APC.....	Adenomatous polyposis coli
AP-1.....	Activator protein 1
AS.....	Aminosäuren
ATP.....	Adenosin-Triphosphat
Bcl-x.....	B-Cell Lymphoma / Leukemia x
Bcl-2.....	B-Cell Lymphoma / Leukemia 2
bp.....	Basenpaare
C/EBP.....	CAAT – Enhancer-binding protein
CAD.....	Caspase-activated DNase
CBP.....	CREB binding protein
cDNA.....	complementary DNA
CEA.....	Karzinoembryonales Antigen
ciAPs.....	cellular inhibitors of apoptosis proteins
CREB.....	Cyclic AMP response element binding protein
CsCl.....	Cäsium-Chlorid
CSF.....	Colony stimulating factor
cyp1a1.....	Cytochrom P-450 1A1
DCC.....	Deleted in colorectal cancer
DD.....	Death domain
DMEM.....	Dullbecco's minimal essential medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dpm.....	disintegrations per minute
dsDNA.....	Doppelstrang-DNA
DTT.....	Dithiothreitol
ECL.....	Enhanced chemoluminescence
E.coli.....	Escherichia coli
EGF.....	Epidermal growth factor
EGF-R.....	Epidermal growth factor receptor
EpCAM.....	Epithelial cell adhesion molecule
EtBr.....	Ethidium-Bromid
FACS.....	Fluorescent-activated cell sorter
FADD.....	Fas-associated death domain protein

FITC.....	Fluorescein-Isothiocyanat
GFP.....	Green fluorescing protein
HAT.....	Histon-Azetyl-Transferase
HER-2/neu.....	Human EGF-receptor 2
HIV.....	Humanes Immundefizienz Virus
HIV-I.....	Humanes Immundefizienz Virus Typ I
HRP.....	Horseradish peroxidase
IFN- α	Interferon α
I κ B.....	NF- κ B-Inhibitor
IKK.....	I κ B-Kinase
IL-1.....	Interleukin 1
IL-6.....	Interleukin 6
ITIM.....	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
kb.....	Kilobasen
kDa.....	Kilo-Dalton
LTR.....	Long terminal repeat
mAk.....	monoklonaler Antikörper
MAP.....	Mitogen activated protein
MAP3K.....	MAP kinase kinase kinase
mg.....	Milligramm
MHC-I.....	Major histocompatibility complex- class I molecule
min.....	Minuten
ml.....	Milliliter
mRNA.....	Messenger-RNA
MOPS.....	3-[N-Morpholino]-2-hydroxypropansulfonsäure
MTT.....	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NF- κ B.....	Nuclear factor κ B
NK-Zellen.....	Natürliche Killer-Zellen
ng.....	Nanogramm
OD.....	optische Dichte
P/CAF.....	CBP-associated factor
PAC.....	P1 artificial chromosome
PAGE.....	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR.....	Polymerase Ketten Reaktion
PP _i	Pyrophosphat
RIP.....	Receptor interacting protein

RNA.....	Ribonukleinsäure
RT.....	Raumtemperatur
RXR.....	Retinoid-X-Rezeptor
SDS.....	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Smad7.....	Sma- and mad-related protein 7
Sp1.....	Specificity protein 1
SRC-1.....	Steroid receptor coactivator 1
STAT2.....	Signal transducer and activator of transcription 2
TAA.....	Tumor-assoziierte-Antigene
TAF.....	TATA-binding protein associated factor
Taq.....	Thermus aquaticus
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNF-R1.....	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TPA.....	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat
TRADD.....	TNF-receptor-1-associated death domain protein
TRAF2.....	TNF-receptor-associated factor 2
TRE.....	TPA-responsive element
TSA.....	Tumor-spezifische-Antigene
URF.....	Upstream regulatory factor
VDR.....	Vitamin-D-Rezeptor

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung von GA733-2	6
Abbildung 3: Konformationsmodelle des EpCAM Moleküls	8
Abbildung 4: Ausbildung des Initiationskomplexes	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des EpCAM-Promotorfragmentes	14
Abbildung 6: Biolumineszenzreaktion	28
Abbildung 7: DNA Pools	32
Abbildung 8: Amplifikat des EpCAM-Promotorfragmentes	37
Abbildung 9: Luziferase-Aktivität von EpCAMprom-Luc in den EpCAM-positiven Zelllinien GHD-1 u. ANT-1 sowie der EpCAM-negativen Zelllinie HEK-293.....	38
Abbildung 10: Aktivität des EpCAM-Promotorfragmentes in GHD-1-Zellen	39
Abbildung 11: Mikroskopische Darstellung von GHD-1-Zellen	40
Abbildung 12: Zellvitalität von FaDu-Zellen nach Behandlung mit TNF α	41
Abbildung 13: Einfluß von TNF α auf die Luziferase-Aktivität in GHD-1-Zellen	42
Abbildung 14: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in An- bzw. Abwesenheit von TNF α oder TPA	43
Abbildung 15: Reduktion der EpCAM Expression durch TNF α	44
Abbildung 16: Immunoblot von EpCAM und Actin	45
Abbildung 17: Actin- und EpCAM-Expression auf FaDu-Zellen in Abhängigkeit von TNF α	46
Abbildung 18: Aktivierung von NF- κ B durch TNF α in GHD-1-Zellen	47
Abbildung 19: Einfluß von TRADD-DN auf die Aktivität von EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α	49
Abbildung 20: Einfluß von DN-I κ B auf NF- κ B-Luc in Abhängigkeit von TNF α	50
Abbildung 21: Einfluß von DN-I κ B auf EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α	51
Abbildung 22: Einfluß von p300 auf EpCAMprom-Luc in Abhängigkeit von TNF α	53
Abbildung 23: Enhanceosom bei der Transkription des IL-6-Genes.....	58

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Die kollegiale und hilfsbereitschaftige Atmosphäre innerhalb des gesamten Laborteams gestaltete die experimentelle Arbeit höchst angenehm. Besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Dr. rer. nat. Olivier Gires für seine immense Geduld, die hervorragende Betreuung und v.a. für die Einführung in die tieferen Geheimnisse des Aliquotierens.

Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler für die thematische Betreuung und die Übernahme der Pflichten des „Doktorvaters“, sowie für die vielen interessanten Gespräche.

Prof. Dr. med. Stefan Lang für die zeitraubende Arbeit des Korrekturlesens, sowie der gemeinsamen Börsenlehrjahre.

Dr. rer. nat. Markus Münz für die Unterstützung in Sachen Methodik und Durchführung der Experimente.

Dr. rer. nat. Andreas Moosmann für die selbstlose Bereitstellung seines umfangreichen Chemikaliensortiments.

Dr. rer. nat. Tanja Hofmann für die allzeit freundliche Hilfsbereitschaft und den vertrauten Dialekt.

Cuong Kieu für die tieferen Einblicke in die vietnamesische Philosophie, sowie die interessanten Diskussionen über die deutsche Grammatik.

Bärbel Schmitt für ihre durchgehend gute Laune und ihre nette und hilfsbereite Art.

Hr. Prof. emeritus Dr. E. Kastenbauer in besonderem Gedenken für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen des Forschungslabors der HNO-Klinik.

Meinem Bruder Martin Fix für fortlaufende Unterstützung in Sachen Hard- und Software, sowie für die Denkanstöße die Dinge mit anderen Augen zu sehen.

Meinen Eltern für die liebevolle und treue Unterstützung mit denen sie mich auf meinem bisherigen Lebensweg bedacht haben.

Meiner Partnerin Sylvia, die durch ihre selbstlose Liebe und ausgleichende Art geholfen hat den ein und anderen Tiefpunkt zu überwinden.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Fix
Adresse: Am Horn 25
99425 Weimar (Thüringen)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig
Geburtsdatum/-ort: 09.10.1973 in Künzelsau
(Baden Württemberg)



Schulische Ausbildung

1980 – 1984 Grund- und Hauptschule Ingelfingen
1984 – 1993 Ganerben Gymnasium Künzelsau
Abitur

Ersatzdienst / Berufsausbildung

1993 – 1994 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Künzelsau, parallel dazu
1-jährige Ausbildung zum Krankenpflegehelfer.

Studium / Beruf

1995 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.
1999 – 2001	Experimenteller Teil der Dissertation in der HNO-Forschung am Klinikum Großhadern - Klinische Kooperationsgruppe Molekulare Onkologie (GSF-Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik und HNO-Klinik des Klinikums Großhadern). Thema: Untersuchung zur Regulation des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM
2002 - 2003	Assistent der Geschäftsführung der HPN Verpackungstechnik GmbH, 74676 Niedernhall – Baden Württemberg
2003 - 2004	18 Monate Arzt im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abt. Hämatologie/Onkologie
Oktober 2004	Approbation als Arzt
Seit Oktober 2004	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abt. Hämatologie/Onkologie

Wissenschaftliche Publikationen

2001	Gires O, Kieu C, Fix P , Schmitt B, Munz M, Wollenberg B, Zeidler R. 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.
------	--

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Peter Fix, geb. 09.10.1973 in Künzelsau, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchung zur Regulation des epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich die Arbeit noch keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Weiterhin erkläre ich, dass gegen mich kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren schwebt.

Weimar, 2005