

Untersuchungen zur Signaltransduktion des epithelialen Adhäsionsmoleküls EpCAM

Dissertation

an der Fakultät der Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

durchgeführt in der HNO-Forschung des Klinikum Großhadern, München

Leitung: Dr. Olivier Gires

Vorgelegt von

Michael Benk

München, Mai 2006

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dirk Eick betreut.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 12.05.2006

Michael Benk

Dissertation eingereicht am 12.05.2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Datum der mündlichen Prüfung: 26.07.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Karzinogenese	6
1.1.1	Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen	7
1.1.2	Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen	8
1.1.3	Apoptose-Resistenz	9
1.1.4	Unlimitiertes replikatives Potential	9
1.1.5	Induktion von Angiogenese	10
1.1.6	Gewebe-Invasion und Metastasierung	11
1.2	Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM	12
1.2.1	Charakterisierung des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM)	12
1.2.2	Struktur des EpCAM-Genes	13
1.2.3	Struktur des Glykoproteins EpCAM	14
1.2.4	EpCAM-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen	17
1.2.5	EpCAM-Expressionsmuster und Tumorentwicklung	18
1.2.6	EpCAM und intrazelluläre Signaltransduktion	18
1.3	Ziel der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Sonstige Reagenzien	21
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4	Fertigsätze (Kits)	23
2.1.5	Plasmide	24
2.1.6	Zelllinien	25
2.1.7	Hefestämme	25
2.1.8	Bakterienstämme	26
2.1.9	Rekombinante Vaccinia Viren	26
2.1.10	Oligonukleotide	26
2.1.11	cDNA-Bibliothek	27
2.1.12	Antikörper	27
2.1.13	Molekulargewichtsstandards	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Kultivierung von Zellen, Bakterien und Hefen	29
2.2.1.1	Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien	29
2.2.1.2	Bakterienkultur	30
2.2.1.3	Hefekultur	30
2.2.2	Gentechnische Methoden	31
2.2.2.1	Isolierung von RNA	31
2.2.2.2	cDNA-Synthese	31
2.2.2.3	Agarose Gelelektrophorese	31
2.2.2.4	Plasmid-Minipräparationen aus Hefe-Zellen	32

2.2.2.5	Klonierung unter Verwendung von Restriktionsenzymen	32
2.2.2.6	Klonierung über homologe Rekombination	33
2.2.2.6.1	Klonierung in pDONR 207	33
2.2.2.6.2	Subklonierung in pGADT7-dest („destination“-Vektor)	33
2.2.2.7	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Calciumphosphat	34
2.2.2.8	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien mittels Hitzeschock	34
2.2.2.9	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien mittels Elektroporation	35
2.2.2.10	Sequentielle Transformation von <i>S.cerevisiae</i> mit der PEG/LiAc-Methode	36
2.2.2.10.1	Transformation im kleinen Maßstab	36
2.2.2.10.2	Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab	37
2.2.2.11	Titration und Amplifikation der cDNA-Bibliothek	38
2.2.2.12	Reinigung der cDNA-Bibliothek im diskontinuierlichen CsCl-Gradienten	38
2.2.2.13	Sonstige DNA-Arbeitstechniken	40
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	41
2.2.3.1	Präparation von Protein-Extrakten aus Hefekulturen nach der Harnstoff/SDS-Methode	41
2.2.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen und „Pull down“ Assay	41
2.2.3.3	Immunoblot	42
2.2.3.4	Ko-Immunpräzipitation	43
2.2.4	Sonstige Methoden	44
2.2.4.1	Identifizierung der cDNA-Sequenzen aus positiven Yeast Two-Hybrid-Transformanten	44
2.2.4.2	β -Galactosidase Filter Assay	44
2.2.4.3	Bestimmung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie	45
3.	Ergebnisse	
3.1	Expression von EpCAM in humanen Epithelzellen	46
3.1.1	Modulation der Transkription von Egr-1, CaM I und RhoB durch EpCAM	46
3.1.2	EpCAM-Expression beeinflusst die CaM I-Transkription in Karzinomzelllinien	48
3.2	Intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen von EpCAM	49
3.2.1	Herstellung eines AH109-Bait-Stammes für einen Yeast Two-Hybrid-Screen	49
3.2.2	Transformation des Bait-Hefestammes mit der HEK293 cDNA-Bibliothek	53
3.2.3	Verifizierung der Protein-Protein-Interaktionen durch die Retransformation des Bait-Hefestammes mit den Prey-Plasmiden	54
3.2.4	Identifikation der Prey-Sequenzen der Yeast Two-Hybrid Klone	55
3.2.5	β -Galactosidase Filter Assay zur Verifizierung von Yeast Two-Hybrid-Interaktionen	59
3.2.6	Ko-Immunpräzipitation von FHL2 oder Cyclophilin A und EpCAM	61
3.2.7	„Pull down“ Assays mit rekombinanten FHL2-GST-Konstrukten	66

4.	Diskussion	
4.1	Verändertes Transkriptom in humanen Nieren- bzw. Karzinomzellen durch die Expression von EpCAM	69
4.2	Potenzielle Interaktionspartner von EpCAM	71
4.3	EpCAM interagiert mit Cyclophilin A in Hefen und in humanen Zellen	77
4.4	EpCAM interagiert mit FHL2 in Hefen und in humanen Zellen	78
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literatur	83
	Curriculum Vitae	93

1. Einleitung

1.1 Karzinogenese

Bei der Karzinogenese handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der die progressive Transformation gesunder Epithelien in maligne Abkömmlinge umfasst. Verursacht wird dieser Prozess durch genetische Veränderungen in der Zelle. So sind für eine Transformation von kultivierten Maus-Zellen mindestens zwei genetische Veränderungen notwendig, wohingegen für die Transformation von humanen Zellen umfangreichere genetische Veränderungen nötig sind (Hahn et al., 1999). Für die Entstehung eines humanen Tumors sind vier bis sechs somatische oder Keimbahnmutationen notwendig (Renan, 1993). In Übereinstimmung damit konnten für die Pathogenese von Darmkarzinomen vier bis sechs unterschiedliche histopathologische Stadien während der Karzinogenese definiert werden (Kinzler & Vogelstein, 1996). Zu diesen Stadien gehören die Bildung von hyperplastischem Epithelium, dysplastischem Epithelium, verschiedenen Typen von Adenomen und schließlich malignen Karzinomen. Die assoziierten genetischen Defekte von Krebszellen haben Auswirkungen auf regulatorische Kreisläufe, welche Proliferation und Homöostasis der Zellen kontrollieren. Es existieren mehr als 100 unterschiedliche Typen von Tumoren. Dennoch ist davon auszugehen, dass der veränderte Genotyp maligner Zellen sich in sechs essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie manifestiert (Hanahan & Weinberg, 2000):

1. Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen,
2. Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen,
3. Apoptose-Resistenz,
4. Unlimitiertes replikatives Potential,
5. Induktion von Angiogenese,
6. Gewebe-Invasion und Metastasenbildung.

Diese Eigenschaften werden von den Zellen während der Karzinogenese neu erworben und ihr gemeinsames Auftreten ist kennzeichnend für alle Arten von humanen Tumorzellen.

1.1.1 Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen

Gesunde Zellen benötigen Wachstumssignale, um von einem Ruhezustand in einen proliferativen Zustand überzugehen. Die notwendigen Signalmoleküle werden von transmembranen Rezeptoren gebunden, über eine Signalkaskade in das Innere der Zelle übermittelt und führen schließlich zur Regulation von Zielgenen im Zellkern. Verschiedene Klassen von Signalmolekülen sind bekannt: diffundierende Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Es ist kein gesunder Zelltyp bekannt, der in Abwesenheit von solchen stimulatorischen Signalen proliferieren kann (Hanahan & Weinberg, 2000). Dagegen ist bei Tumorzellen die Abhängigkeit von exogener Wachstumsstimulation sehr stark reduziert. Von zahlreichen Onkogenen ist bekannt, dass sie auf unterschiedliche Art und Weise normale Signalwege von Wachstumsmolekülen simulieren (Hanahan & Weinberg, 2000).

Zu den drei häufigsten molekularen Strategien, die maligne Zellen dazu befähigen weitgehend unabhängig von exogener Stimulation zu proliferieren, gehören die Veränderung von extrazellulären Wachstumssignalen, von transmembranen Rezeptoren, die für die Signalübertragung in das Zellinnere verantwortlich sind, oder von intrazellulären Signalwegen.

Viele Krebszellen sind in der Lage Wachstumsfaktoren zu synthetisieren, welche die eigene Proliferation stimulieren. Beispiele für diesen Prozess, der als autokrine Stimulation bezeichnet wird, sind Glioblastomas und Sarkomas, die PDGF (**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actors) und TGF α (**t**umor **g**rowth **f**actor **α**) produzieren (Fedi et al., 1997). Der zweite Mechanismus, der sich in den Tumorzellen durch eine deregulierte Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren manifestiert, führt zu einer Hypersensibilität gegenüber Wachstumsfaktoren. Beispiel hierfür ist der HER2/*neu*-Rezeptor, der in Brustkarzinomen überexprimiert ist (Slamon et al., 1987). Darüberhinaus kann die starke Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder die Mutation der Rezeptoren zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Signalkaskaden führen (z.B. EGF-Rezeptor) (Fedi et al., 1997). Der dritte Mechanismus, der zu einer Autonomie bezüglich Wachstumssignalen führt, ist die Veränderung von Molekülen, welche für die Prozessierung der Signale im Zytoplasma der Zellen verantwortlich sind. Hierbei ist die SOS-Ras-Raf-MAPK Kaskade von zentraler Bedeutung. In ca. 25 % der humanen Tumore liegen Ras-Proteine in strukturell unterschiedlichen Varianten vor. Diese Varianten setzen unabhängig von der

Stimulation durch „upstream“-Regulatoren konstitutiv mitogene Signale in der Zelle frei (Medema & Bos, 1993).

Es ist davon auszugehen, dass zur Proliferation von Tumorzellen auch benachbarte gesunde Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen, erheblich beitragen. In gesunden Geweben wird das Wachstum der Zellen durch benachbarte Zellen (heterotypische Signale) oder über systemische (endokrine) Signale gesteuert. Tumorzellen erwerben nicht nur die Fähigkeit unabhängig von exogenen Wachstumssignalen zu proliferieren, sondern sind auch in der Lage bei gesunden, benachbarten Zelltypen die Freisetzung von Wachstumsstimulierenden Signalen zu induzieren. Ein Beispiel dafür sind HaCat-Zellen, die ektopisch überexprimiertes PDGF-B sezernieren und dadurch die Proliferation von ko-kultivierten Fibroblasten stimulieren (Skobe & Fusenig, 1998).

1.1.2 Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen

In gesunden Geweben erhalten antiproliferative Signale die Zellen im arretierten Zustand und die Gewebe-Homöostasis. Diese Signale können als lösliche Wachstumsinhibitoren oder als immobilisierte Inhibitoren, die in der extrazellulären Matrix oder auf benachbarten Zellen lokalisiert sind, vorliegen. Transmembrane Rezeptoren binden die inhibitorischen Signalmoleküle und aktivieren intrazelluläre Signalwege.

Es existieren zwei unterschiedliche Mechanismen, wie die inhibitorischen Signale die Proliferation blockieren. Zellen können reversibel in der G_0 -Phase des Zellzyklus arretiert werden. Das proliferative Potential der Zellen geht dagegen irreversibel verloren, wenn der Eintritt in postmitotische Stadien induziert wird. Beim Eintritt in postmitotische Stadien erwerben Zellen Eigenschaften, die spezifisch für ihre Differenzierung sind.

Während der G_1 -Phase des Zellzyklus entscheiden Zellen aufgrund von extrazellulären Signalen, ob sie proliferieren, arretieren oder in einen postmitotischen, differenzierten Zustand übergehen. Auf molekularer Ebene wird angenommen, dass nahezu alle antiproliferativen Signale durch das Retinoblastoma Protein (pRb) und zwei eng verwandte Proteine (p107, p130) vermittelt werden. In hyperphosphoryliertem Zustand blockiert pRb über eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F die Proliferation. E2F reguliert die Expression von zahlreichen Genen, die für einen Übergang der Zellen von der G_1 - in die S-Phase verantwortlich sind (Weinberg, 1995). Zellen verlieren ihre Sensitivität gegenüber

anti-proliferativen Signalen, wenn über eine Störung im pRb-Signalweg E2F konstitutiv aktiv ist und die Zellen während der G₁-Phase nicht mehr blockiert werden.

Ein Beispiel dafür, dass Zellen ihre Sensitivität für anti-proliferative Signale verlieren, sind Zellen, die einen dysfunktionalen TGFβ-Rezeptor exprimieren (Markowitz et al., 1995). Das lösliche Signalmolekül TGFβ bindet in gesunden Zellen an den TGFβ-Rezeptor. Dies führt zur Phosphorylierung von pRb und stimuliert die Proliferation.

1.1.3 Apoptose-Resistenz

Die Expansion von Tumorzellen wird nicht nur durch die Proliferationsrate der Zellen gesteuert, sondern auch durch den Anteil der Zellen, die in Apoptose gehen. Bei der Apoptose handelt es sich um einen programmierten Zelltod, der durch physiologische Signale ausgelöst wird und innerhalb von 30-120 min zur kompletten Zerstörung der Zelle führt. Es ist erwiesen, dass der Erwerb einer Resistenz gegen Apoptose eine kennzeichnende Eigenschaft der Karzinogenese von humanen Zellen ist (Wyllie et. al., 1980).

Der Mechanismus der Apoptose kann in die zwei Komponenten Sensoren und Effektoren aufgeteilt werden. Als Sensoren dienen Zelloberflächenrezeptoren, die Überlebens- bzw. Todes-Signalmoleküle binden können. Ein Todes-Signal ist z.B. die Bindung des FAS-Liganden an den FAS-Rezeptor (Ashkenazi und Dixit, 1999). Die Effektoren der Apoptose sind zahlreiche intrazelluläre Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Caspasen haben die Funktion subzelluläre Strukturen und Organellen sowie das Genom zu zerstören. Für das bcl-2-Onkogen war es möglich eine anti-apoptotische Aktivität nachzuweisen (Voux et al., 1988).

1.1.4 Unlimitiertes replikatives Potential

Die drei bisher erwähnten Eigenschaften, die gesunde Zellen während ihrer Entwicklung zu malignen Tumorzellen erwerben, beruhen auf einer Zerstörung der Signalübertragung vom extrazellulären Milieu in das Zellinnere. Es ist davon auszugehen, dass die daraus resultierende deregulierte Proliferation der Zellen nicht für die Entstehung eines makroskopischen Tumors ausreicht. Sämtliche Typen von eukaryontischen Zellen tragen ein intrinsisches Programm, welches ihre Teilungsfähigkeit begrenzt. Dieses Programm arbeitet unabhängig von äußeren Signalen.

Zellen, die in Kultur gehalten werden, haben ein begrenztes replikatives Potential (Hayflick, 1997). Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen (60-70) stellen gesunde, humane Zellen ihr Wachstum ein. Dieser Prozess wird als Seneszenz bezeichnet und kann durch Mutation von bestimmten Tumor-Suppressorproteinen (pRb, p53) unterdrückt werden (Wright et al., 1989). Nach weiteren Zellteilungen sterben diese mutierten Zellen in einem als Krise bezeichneten Zustand aber trotzdem ab. Die meisten Typen von Tumorzellen dagegen können in Kultur ohne Limitierung gezüchtet werden. Dieser Phänotyp wird als immortalisiert bezeichnet (Wright et al., 1989).

Zurückzuführen ist das Sterben der Zellen im Zustand der Krise auf eine sukzessive Verkürzung (50-100 Basenpaare/Replikation) der Telomere während der S-Phasen des Zellzyklus. Dies führt letztendlich zu einer Fusion der Chromosomen-Enden, zum Verlust essentieller kodierender Sequenzen und zu dem Tod der Zellen (Counter et al., 1992). Den Erhalt der Telomere und die dadurch bedingte Immortalisierung erreichen maligne Zellen überwiegend (85 – 95 %) durch eine Überexpression des Enzyms Telomerase (Shay & Bacchetti, 1997). Dieses Enzym addiert Hexanukleotide an die Enden der Chromosomen und ermöglicht dadurch einen Schutz der Chromosomen-Enden vor einem Abbau.

1.1.5 Induktion von Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Entstehung neuer Blutkapillaren. Im Tumor ist die Angiogenese essentiell, da die Ausbildung von Blutgefäßen die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt. Zur Entwicklung eines makroskopischen Tumors ist es notwendig, dass neoplastische Zellen die Fähigkeit entwickeln Angiogenese zu induzieren (Hanahan & Folkman, 1996).

Die Angiogenese wird reguliert über negative und positive Signale, die die Ausbildung neuer Kapillaren hemmen bzw. fördern. Eine wichtige Rolle spielen dabei lösliche Faktoren und deren Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Endothel-Zellen lokalisieren. Ein zentraler Angiogenese-initiiierender Faktor ist VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor), der an den transmembranen Tyrosin-Kinase-Rezeptor VEGF-R bindet (Veikkola & Alitalo, 1999). Thrombospondin-1 dagegen bindet an den endothelialen Rezeptor CD36 und hat inhibitorische Wirkung auf die Angiogenese (Bull et al., 1994).

In Mausmodellen hat sich gezeigt, dass die Angiogenese bereits in neoplastischen Zellen aktiviert wird (Hanahan & Folkman, 1996). Für diese Aktivierung ist u.a. eine veränderte

Gentranskription verantwortlich. Beispielsweise induziert eine Aktivierung des *ras*-Onkogens in Fibroblasten und epithelialen Zellen die verstärkte Expression von VEGF (Rak et al., 1995). Desweiteren kann die Angiogenese über die Aktivität von Proteasen in der extrazellulären Matrix reguliert werden. Ein Beispiel hierfür ist Plasmin, durch dessen Selbstspaltung der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin freigesetzt wird (Gately et al., 1997).

1.1.6 Gewebe-Invasion und Metastasierung

Während der Karzinogenese kommt es bei der Mehrheit von humanen Tumoren zu einer Invasion einzelner maligner Zellen in das umliegende Gewebe. Nachdem diese Zellen in Blut-Lymphbahnen innerhalb des Körpers transportiert werden, bilden sie neue Kolonien in gesunden Geweben und Organen. Die neu gebildeten Kolonien von malignen Zellen werden als Metastasen bezeichnet und sind für 90 % der Todesfälle von Krebspatienten verantwortlich (Sporn, 1996). Die Metastasierung ermöglicht die Ausbreitung des primären Tumors, die aufgrund der Nährstoffversorgung und des Platzangebotes limitiert ist. Die Prozesse der Invasion und Metastasierung sind bezüglich ihres Mechanismus sehr eng miteinander assoziiert. Bei beiden Prozessen ändern sich die Bindungseigenschaften der Zellen an benachbarte Zellen bzw. an die extrazelluläre Matrix und die Aktivität von extrazellulären Proteasen.

Verschiedene Klassen von Proteinen sind für die Bindung von Zellen an ihre Umgebung in einem Gewebe verantwortlich. Bei invasiven und metastatischen Zellen sind u.a. Proteine der Calcium-abhängigen Cadherin-Familie und Integrine betroffen. E-Cadherin beispielsweise vermittelt in epithelialen Zellen homotypische Zell-Zell-Interaktionen. Die Adhäsion von Zellen über E-Cadherin-Moleküle vermittelt anti-proliferative Signale, indem β -Catenin sequestriert und dadurch die Induktion von Genen durch β -Catenin/Lef/Tcf gehemmt wird (Christofori & Semb, 1999). Ein Verlust der adhäsiven Eigenschaften von E-Cadherin, der in einer Vielzahl epithelialer Tumore auftritt, resultiert in einem invasiven und metastatischen Phänotyp der betroffenen Zellen (Christofori & Semb, 1999). Folglich fungiert E-Cadherin in epithelialen Zellen als Suppressor von Invasion und Metastasierung und trägt durch seine Inaktivierung wesentlich zum Erwerb der beiden typischen Eigenschaften von malignen Zellen bei.

Ein weiteres gut dokumentiertes Ereignis, das die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen vermittelt, ist die veränderte Expression von Integrinen. Integrine vermitteln

die Interaktion von Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix. Invasive und metastasierende Tumorzellen verändern die Mikroumgebung in einem Gewebe und verursachen dadurch die Existenz neuer Matrix-Komponenten. Die Kolonialisierung einer auf diese Weise entstandenen neuen Mikroumgebung wird durch eine veränderte Expression von α - und β -Untereinheiten der Integrine an der Zelloberfläche vermittelt. Integrine, die in invasiven Zellen exprimiert werden, bevorzugen die Bindung an die über Proteasen abgebauten Komponenten der extrazellulären Matrix (Varner & Cheresch, 1996). Durch eine Überexpression von Integrin-Untereinheiten kann in Kultur-Zellen das invasive und metastasierende Verhalten von Zellen gehemmt bzw. induziert werden (Varner & Cheresch, 1996).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Zellen spielen extrazelluläre Proteasen. Matrix-degradierende Proteasen sind über spezifische Protease-Rezeptoren oder Integrine mit der Zelloberfläche assoziiert und vermitteln auf diese Weise in ihrem aktiven Zustand die Invasion von Zellen in das benachbarte Stroma, durch die Wand von Blutkapillaren und durch normale, epitheliale Zellschichten (Werb, 1997).

Adhäsive Rezeptoren wie beispielsweise E-Cadherin und Integrine, die eine Interaktion mit benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix vermitteln, spielen eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese. Bei dem **Epithelial Cell Adhesion Molecule**, kurz EpCAM, handelt es sich ebenfalls um ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül. Die Eigenschaften von EpCAM suggerieren, dass es ebenfalls in den Prozess der Karzinogenese involviert ist. Im Folgenden wird dieser Rezeptor deshalb näher beschrieben.

1.2 Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM

1.2.1 Charakterisierung des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM)

Strukturell lassen sich die Zelladhäsionsmoleküle in vier Hauptfamilien einteilen: Integrine, Selektine, Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine (Aplin et al., 1998). Zusätzlich sind Moleküle mit adhäsiven Eigenschaften bekannt, die sich aufgrund ihrer Struktur nicht diesen Hauptfamilien zuordnen lassen. Beispiele hierfür sind Syndekane, CD44 und EpCAM.

EpCAM ist ein Typ I Transmembran Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa und vermittelt Ca^{2+} -unabhängige, homophile Zell-Zell-Adhäsionen. Aufgrund von zwei

EGF-ähnlichen („**E**pidermal **g**rowth **f**actor“) Domänen im extrazellulären Bereich des Proteins wurde EpCAM eine Funktion als Zelladhäsionsmolekül (Simon et al., 1990) oder als Zelloberflächenrezeptor, der Signaltransduktion vermitteln kann (Schön et al., 1994), zugeschrieben.

Die Expression von EpCAM beschränkt sich bei differenzierten Zellen auf Epithelien. Das Molekül wird auf der basolateralen Seite der Zellmembran von allen einfachen, pseudostratifizierten und Übergangsepithelien exprimiert (Balzar et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind gesunde Platten-Epithelien EpCAM-negativ. Bei einer Zellproliferation kann bei zahlreichen Platten-Epithelien eine *de novo*-Expression von EpCAM beobachtet werden. Beispiele einer *de novo*-Expression von EpCAM in Verbindung mit pathogener Zellproliferation sind neoplastische Platten-Epithelien des Gebärmutterhalses (Litvinov et al., 1996) und dysplastische Epithelien der oralen Schleimhaut (High et al., 1996). Aber auch in gesunden Hepatozyten der Leber korreliert eine *de novo*-EpCAM-Expression mit der entwicklungsbedingten Zellproliferation, wobei differenzierte Hepatozyten keine EpCAM-Expression aufweisen (De Boer et al., 1999).

Medizinisch interessant ist EpCAM hauptsächlich aufgrund seiner Überexpression in zahlreichen humanen Karzinomen, wie zum Beispiel Brust-, Kopf/Hals-, Prostata- und Leberkarzinomen (Spizzo et al., 2003; Pauli et al., 2003; Poczatek et al., 1999; De Boer et al., 1999). Aus diesem Grund kann EpCAM sowohl zu immuntherapeutischen als auch zu diagnostischen Zwecken als Zielmolekül fungieren. Immuntherapeutische Ansätze basierend auf dem Einsatz monoklonaler (Braun et al., 1999) bzw. bispezifischer Antikörper (Zeidler et al., 1999) gegen EpCAM sind in der Literatur bereits mehrfach beschrieben.

1.2.2 Struktur des EpCAM-Genes

EpCAM wird von dem GA733-2-Gen kodiert. Der putative Promotor für das GA733-2-Gen enthält Konsensus-Sequenzen für die Bindung der Transkriptionsfaktoren *Sp1* und *AP-1*, aber keine TATA- oder CAAT-Boxen (Linnenbach et al., 1993). Für ein 440 bp-Fragment des EpCAM-Promoters konnte in Karzinomzellen eine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden. Die EpCAM-Expression dieses Minimalpromoters wird durch eine Aktivierung des Nukleären Faktors κ B inhibiert (Gires et al., 2000). Mit Hilfe einer Deletionsanalyse wurde ein 687 bp-Fragment stromaufwärts vom EpCAM-Transkriptionsstartpunkt als notwendige proximale Promotorregion definiert (McLaughlin

et al., 2004; Gires et al., 2004). Die Intron-Exon-Struktur des Genes ist in Abb. 1.1 dargestellt.



Abb. 1.1

Struktur des GA733-2-Genes. Das für EpCAM kodierende Gen setzt sich aus neun kodierenden Exons zusammen. Exon 1 kodiert für eine Signalpeptid-Sequenz, Exon 2 – 6 für die extrazelluläre Domäne, Exon 7 für die Transmembranregion und Exon 8/9 für den zytoplasmatischen Anteil. Lokalisiert ist das Gen auf Chromosom 4 (modifiziert nach Linnenbach et al., 1993).

Die gesamte Größe des humanen Genes beträgt 14 kb, wobei die mRNA eine Größe von 1,5 kb aufweist. Splice-Varianten der mRNA, die verschiedene Isoformen von EpCAM codieren, sind in der Literatur nicht beschrieben.

1.2.3 Struktur des Glykoproteins EpCAM

Ein Vergleich der humanen Aminosäuresequenz von EpCAM mit dem murinen Protein ergab eine Homologie von 86 % (Bergsagel et al., 1992). Darüberhinaus konnten in den Genomen von sämtlichen Säugetieren und Vögeln Proteine identifiziert werden, deren Sequenzen große Ähnlichkeiten mit der Sequenz von humanem EpCAM aufweisen (Linnenbach et al., 1993). Diese hohe evolutionäre Konservierung der Aminosäuresequenz von EpCAM suggeriert eine wichtige funktionelle Bedeutung des Proteins.

Das größte offene Leseraster für EpCAM kodiert für ein Polypeptid mit 314 Aminosäuren. Es setzt sich zusammen aus einer „leader“-Sequenz (23 Aminosäuren), einer extrazellulären Domäne (242 Aminosäuren) mit zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen und einem Cysteinereichen N-terminalen Anteil, einer Transmembrandomäne (23 Aminosäuren) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (26 Aminosäuren) (siehe Abb. 1.2) (Szala et al., 1990). Beide EGF-ähnlichen Wiederholungen (27-59: CX₁CX₈CX₇CX₁CX₁₀C und 66-135: CX₃₂CX₁₀CX₅CX₁CX₁₆C) in der extrazellulären Domäne von EpCAM sind eng verwandt mit der vierten und fünften EGF-ähnlichen Wiederholung innerhalb der Stäbchen-ähnlichen

Domäne von Nidogen (Positionen 776-809 und 819-889), einem Laminin-bindenden extrazellulären Matrixprotein (Balzar et al., 1999). Die zweite EGF-ähnliche Wiederholung von EpCAM zeigt außerdem eine Homologie zu der Thyroglobulin Typ I-Wiederholung (96-160; CX₂₃CX₁₀CX₆CX₁CX₁₉C). Deletionsexperimente zeigten, dass beide EGF-ähnlichen Domänen für die von EpCAM vermittelten homophilen Adhäsionen nötig sind, wobei die erste für interzelluläre und die zweite für laterale Interaktionen zwischen EpCAM-Molekülen verantwortlich sind (Balzar et al., 2001).

Eine Analyse der drei potentiellen N-Glykosylierungssequenzen in der extrazellulären EpCAM-Domäne zeigte, dass in Insektenzellen Asn¹⁷⁵ nicht, Asn⁸⁸ vollständig und Asn⁵¹ teilweise glykosyliert sind (Chong & Speicher, 2001). In humanen Karzinomen ist EpCAM meistens unterschiedlich stark glykosyliert und demzufolge können EpCAM-Isoformen mit einem Molekulargewicht von 37, 40 und 42 kDa detektiert werden (Litvinov et al., 1994). Für Karzinome im Hals/Kopf-Bereich zeigte sich, dass Tumorzellen EpCAM ausschließlich in der glykosylierten Variante exprimieren. Der Grad der Glykolisierung ist dabei unterschiedlich und variiert zwischen drei Glykolisierungsmustern (Pauli et al., 2003). Allerdings sind funktionelle Unterschiede der EpCAM-Isoformen nicht bekannt.

Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM, bestehend aus 26 Aminosäuren, enthält das Internalisationsmotiv NPXY, welches bereits in mehreren Zelloberflächen-Rezeptoren (z.B. LDL-Rezeptor) identifiziert wurde. Zudem weist der relativ kurze zytoplasmatische Anteil von EpCAM zwei Bindungsseiten für α -Actinin an den Positionen 289-296 und 304-314 der Aminosäuresequenz auf. Über die direkte Bindung von α -Actinin an EpCAM wird die adhäsive Funktion des Moleküls reguliert, da der Rezeptor über α -Actinin direkt an dem Actinzytoskelett verankert ist (Balzar et al., 1998). Desweiteren vermittelt die intrazelluläre Domäne von EpCAM in humanen Karzinomzellen eine direkte Interaktion von EpCAM mit dem „tight junction“-Protein Claudin-7 (Ladwein et al., 2005).

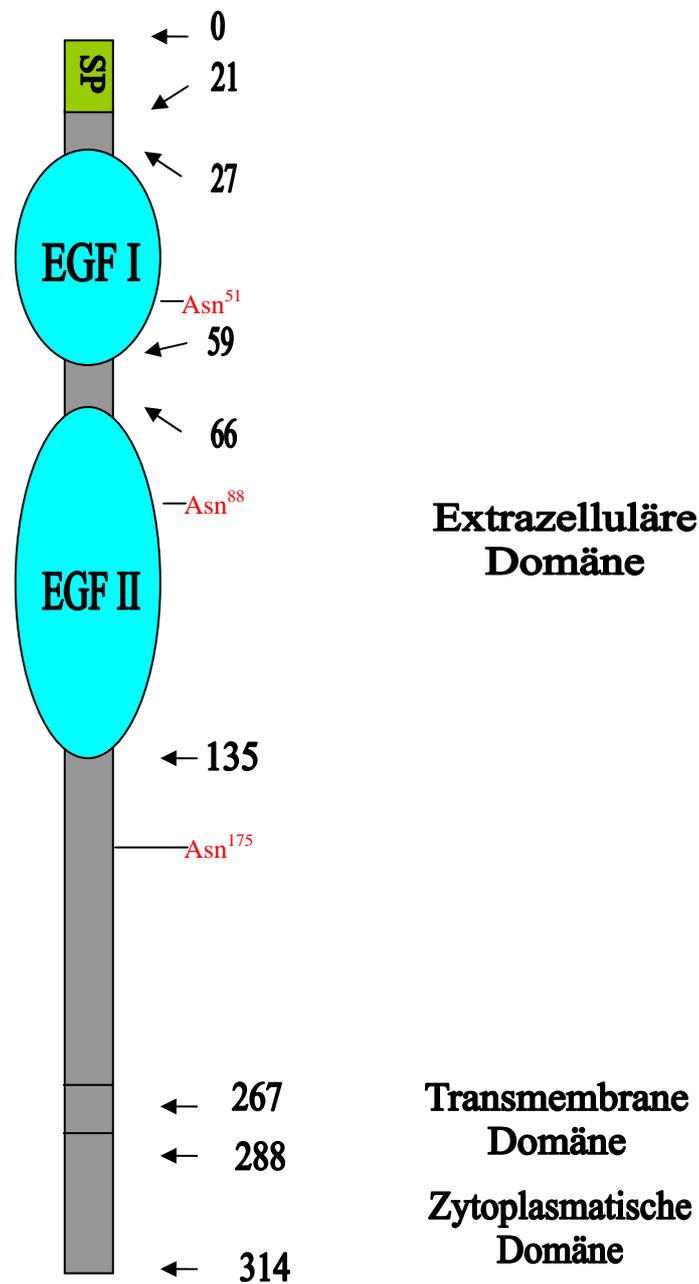


Abb. 1.2

Schematische Darstellung des EpCAM-Proteins. SP: Signalpeptid, EGF: EGF-ähnliche Domäne. Die Ziffern geben die Aminosäurereste an, die die einzelnen Bereiche des Proteins markieren (nach Winter et al., 2003). Die Aminosäurereste für eine potentielle N-Glykosilierung sind Asn¹⁷⁵, Asn⁸⁸ und Asn⁵¹.

1.2.4 EpCAM-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen

Die von EpCAM-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen sind unabhängig von Ca^{2+} -Ionen und homophiler Natur. An der Zelloberfläche bilden sich aufgrund lateraler Wechselwirkungen EpCAM-Dimere, die interzelluläre Adhäsionen mit EpCAM-Molekülen gegenüberliegender Zellen eingehen (Balzar et al., 2001). Eine direkte Beteiligung von EpCAM an der Ausbildung von Zell-Zell-Aggregation konnte für epitheliale Zellen der Bauchspeicheldrüse gezeigt werden, deren Reaggregation mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die extrazelluläre EpCAM-Domäne gehemmt werden konnte (Cirulli et al., 1998).

Wird EpCAM in Maus-Fibroblasten exprimiert, die in ihrem nativen Zustand nicht in der Lage sind interzelluläre Adhäsionen auszubilden, kann bei den resultierenden Transfektanten die Bildung von Zell-Aggregaten beobachtet werden. Dabei liegt keine homogene Verteilung von EpCAM-Molekülen an der Zelloberfläche vor, sondern eine Konzentration des Adhäsionsmoleküls an den Zell-Zell-Bindungsstellen (Litvinov et al., 1994). Für die Bildung von Zell-Aggregaten ist die zytoplasmatische Domäne erforderlich. Die Deletion der zytoplasmatischen EpCAM-Domäne hat keinen Einfluß auf die homophile Spezifität von EpCAM, verhindert aber die Ausbildung stabiler Adhäsionen.

Die von EpCAM vermittelten Adhäsionen sind im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel klassische Cadherine schwächer. So wird in Cadherin-positiven Zellen die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion durch eine Überexpression von EpCAM abgeschwächt, wobei dieser Effekt bei der Expression einer EpCAM-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne nicht zu beobachten ist (Litvinov et al., 1997). Membranständiges EpCAM führt zu einer Dissoziation von Cadherin-vermittelten Adhäsionen und verursacht eine Akkumulation von Detergenz-löslichen E-Cadherin/ α -Catenin-Komplexen. Werden die adhäsiven Eigenschaften von EpCAM berücksichtigt, suggeriert diese Beobachtung, dass während der Zellteilung die E-Cadherin-vermittelten interzellulären Adhäsionen abgebrochen und ihre Funktion durch die schwächeren EpCAM-vermittelten Adhäsionen übernommen wird (Winter et al., 2003). Nach Beendigung der Proliferation sinkt die Expression von EpCAM und E-Cadherin vermittelt wieder die interzellulären Adhäsionen.

1.2.5 EpCAM- Expressionsmuster und Tumorentwicklung

Eine EpCAM-Überexpression kann in malignen Epithelien bzw. eine *de novo*-Expression von EpCAM in dysplastischen Plattenepithelien beobachtet werden. Die Intensität der EpCAM-Expression in Karzinomen ist unterschiedlich und steht in Zusammenhang mit einer Dedifferenzierung der Tumorzellen. In frühen Stadien der Neoplasie von Gebärmutterhals-Gewebe kann eine EpCAM-*de-novo*-Expression häufig in Bereichen mit atypischen, undifferenzierten Plattenepithel-Zellen beobachtet werden (Litvinov et al., 1996). Auch in dysplastischen Geweben der Mundschleimhaut konnte nachgewiesen werden, dass eine Dedifferenzierung des Plattenepithels mit der Expression von EpCAM korreliert (High et al., 1996).

EpCAM ist auch an der Bildung von Metastasen beteiligt. Eine Analyse der Genexpression in Metastasen und den korrespondierenden primären Tumoren in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen führte zu einem unterschiedlichen EpCAM-Expressionsmuster. Eine EpCAM-Expression war in den Metastasen weniger häufig zu detektieren als in den korrespondierenden Primärtumoren (Takes et al., 2001). Durch das niedrige Expressionslevel von E-Cadherin in Karzinomen treten die durch EpCAM vermittelten, schwächeren Zell-Zell-Adhäsionen in den Vordergrund. Dies führt wahrscheinlich zu einem Verlust an Zell-Zell-Adhäsion und vermittelt die Bildung von Metastasen (Winter et al., 2003).

Bei invasivem Brustkrebs ist eine EpCAM-Überexpression mit einer schlechten Überlebensprognose beschrieben. Dieser Zusammenhang suggeriert, dass eine EpCAM-Überexpression die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördert (Spizzo et al., 2002). Die Migration und Invasion von Brustkrebszellen konnte auch *in vitro* durch eine Hemmung der EpCAM-Expression vermindert werden (Osta et al., 2004).

1.2.6 EpCAM und intrazelluläre Signaltransduktion

Die molekulare Grundlage der schwerwiegenden phänotypischen Veränderungen, die bei einer veränderten EpCAM-Expression in epithelialen Zellen beobachtet werden kann, ist weitgehend unklar. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse in EpCAM-negativen Plattenepithelien zeigen zwar einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer EpCAM-*de novo*-Expression und der Transformation bzw. Dedifferenzierung der Zellen, ein Beweis für den direkten Einfluss von EpCAM auf den Zellzyklus und die Proliferation konnte aber erst

in jüngster Zeit erbracht werden. In stabilen HEK293-EpCAM-Transfektanten konnte gezeigt werden, dass EpCAM eine Expression des Proto-Onkogens c-myc und der Zellzyklusregulatoren Cyclin A und E induziert (Münz et al., 2004). Eine kinetische Analyse der c-myc-Regulation durch EpCAM ergab, dass die Expression von c-myc schnell induziert wird. Die Expression einer Fusion der intrazellulären Domäne von EpCAM und der transmembranen Domäne von LMP1 (**l**atent **m**embrane **p**rotein 1) in HEK293-Zellen zeigte zudem, dass für eine Induktion von c-myc die Aggregation der zytoplasmatischen Domänen von EpCAM ausreicht (Münz et al., 2004).

1.3 Ziel der Arbeit

Die Über- bzw. *de novo*-Expression des transmembranen Adhäsionsmolekül EpCAM ist in zahlreichen humanen Epithelien mit einer Karzinogenese assoziiert. Die Intensität der Überexpression korreliert dabei mit dem Entwicklungsgrad und der Proliferationsrate der dysplastischen Zellen. Auf molekularer Ebene ist für diesen veränderten Phänotyp der Zellen eine EpCAM-vermittelte Signaltransduktion mitverantwortlich. So konnte in humanen Nierenzellen und Fibroblasten der Maus gezeigt werden, dass EpCAM in der Lage ist eine Überexpression des Proto-Onkogens c-myc und der Cycline A und E zu induzieren. Eine essentielle Rolle bei der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion scheint dabei der aus 26 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Anteil des Moleküls zu spielen. Es liegen bis *dato* keine Erkenntnisse darüber vor, welche weiteren Moleküle an der Übertragung der Signale von EpCAM in den Zellkern beteiligt sind.

Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit weitere potentielle „down stream“-Zielmoleküle von EpCAM analysiert werden. Ziel war es dabei, eine EpCAM-regulierte Expression von Proteinen nachzuweisen.

Desweiteren erschien es interessant Proteine zu identifizieren, die direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM interagieren und auf diese Weise an der vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollte mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM ein Two-Hybrid Screening in Hefen durchgeführt werden. Die in Hefen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen sollten anschließend in humanen Zellen verifiziert werden. Darüber hinaus sollten unter Verwendung von Deletionsmutanten für interessante Proteine die Bindungsdomänen identifiziert werden.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filmentwicklungsmaschine	Optimax Laborgeräte, Heidelberg
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank (- 20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (- 80 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gelelektrophorese-Kammern	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Gelelektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, München; Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubatoren für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, Hanau; Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	AEG, Berlin
PCR Thermal Cycler GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich; Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Technomara, Zürich, Schweiz
Schüttelinkubatoren	Kühner, Bürsfelden, Schweiz
Sonifizierer	Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA
Sterilbank	The Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Überkopf-Mixer	Heidolph, Schwabach
Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
UV-Mikrophotometer Gene Quant II	Amersham Biosciences, Freiburg
UV-Transilluminator	LKB, Freiburg
Vortex Mixer	IKA Works, Inc., Wirmington, USA

Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach; GFL, Burgwedel
Zentrifuge GP	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge J2-21	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge Labofuge T	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Sonstige Reagenzien

β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamide 37,5/1	Roth, Karlsruhe
Adeninhemisulfat	Sigma, München
Agar	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Agarose electrophoresis grade	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxidisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bakterienmedienkomponenten (Pepton, Trypton, Hefeextrakt)	Gibco BRL, Karlsruhe; BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMF (N,N-Dimethylformamid)	Sigma, München
DNA-modifizierende Enzyme	Fermentas Life Sciences, Burlington, Kanada; Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dropout-Ergänzung für Hefemedien	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt; Sigma, München
Ethylendiamintetraacetatdinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Glycin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Carrier DNA	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Hygromycin B	Merck, Darmstadt
Isopropylthio-b-D-galactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Lithiumacetat	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Lyticase	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka, Seelze
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Pefabloc	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin-Streptonycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Pfu-Polymerase	Fermentas Life Sciences, Burlington, Kanada
Polyethylenglykol (PEG 3350)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmsatdt

SD Basis Medium	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	Roche Diagnostics, Mannheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Biosciences, Freiburg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
YPD Plus Liquid Medium	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
X- α -Gal	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier (3 mm)	Whatman Ltd., Maidstone, England
PVDF Membran	Millipore, Corp., Billerica, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipettenspitzen	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich
Röhrchen, steril, Zellkultur	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg; Eastman-Kodak, Rochester, USA
Sterilfilter	Millipore, Corp., Billerica, USA
Ultraszenrifugenröhrchen	Beckman, Palo Alto, USA
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 bzw. 2ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Fertigsätze (Kits)

1st Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR	Roche Diagnostics, Mannheim
BCA Protein Assay	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
ECL TM Western blotting Detektionssystem	Amersham Biosciences, Freiburg

Gateway® BP Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Pharmacia GFX PCR DNA Gel Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Plasmide

pACT2-HEK293 cDNA	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pBluescriptR-FHL2	RZPD (Clone ID: IRAKp961N1348Q)
pcDNA3.1-EpCAM	eigene Arbeitsgruppe
pGADT7-dest	freundlicherweise von PD Dr. Dr. Jürgen Haas zur Verfügung gestellt, Pettenkofer-Institut, München
pDONR207	Invitrogen
pGADT7	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGADT7-dest-FHL2	diese Arbeit
pGADT7-dest-Cyclophilin A	diese Arbeit
pGADT7-RecT	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGBKT7	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGBKT7-53	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGBKT7-EpIC	diese Arbeit
pGBKT7-Lam	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGEX-4T-1	freundlicherweise von PD Dr. Dr. Jürgen Haas zur Verfügung gestellt, Pettenkofer-Institut, München
pGEX-4T-1-FHL2	freundlicherweise von Dr. Yonghua Yang zur Verfügung gestellt, Moffit Cancer Center, Tampa, USA
pGEX-4T-1-FHL2: aa1-40	freundlicherweise von Dr. Yonghua Yang zur Verfügung gestellt, Moffit Cancer Center, Tampa, USA

pGEX-4T-1-FHL2: aa1-100	freundlicherweise von Dr. Yonghua Yang zur Verfügung gestellt, Moffit Cancer Center, Tampa, USA
pGEX-4T-1-FHL2: aa1-162	freundlicherweise von Dr. Yonghua Yang zur Verfügung gestellt, Moffit Cancer Center, Tampa, USA
pGEX-4T-1-FHL2: aa1-221	freundlicherweise von Dr. Yonghua Yang zur Verfügung gestellt, Moffit Cancer Center, Tampa, USA
pOTB7-Cyclophilin A	RZPD (Clone ID: IRALp962K104Q)
pTIT-GFP	freundlicherweise von Dr. Klaus Conzelmann zur Verfügung gestellt, Genzentrum, München

2.1.6 Zelllinien

Ant-1	Hypopharynx-Karzinom (eigene Arbeitsgruppe)
HEK293	humane embryonale Nieren-Zelllinie (ATCC #CRL1573: Graham et al., 1977)
HEK293-EpCAM	eigene Arbeitsgruppe
HEK293-ΔEpCAM	eigene Arbeitsgruppe
HeLa	Cervix-Karzinom (ATCC #CRL10302: Freedman et al., 1982)
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom (Pittsburgh Cancer Institute)
FaDu	Hypopharynx-Karzinom (ATCC #HTB43: Rangan, 1972)

2.1.7 Hefestamm

Stamm	Genotyp
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i> (James et al., 1996)

2.1.8 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hannahan, 1985)
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mrcBC</i>), Φ 80dlacZ Δ M15, Δ <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>
BL21	<i>E.coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> λ (DE3)

2.1.9 Rekombinante Vaccinia Viren

Das rekombinante Vaccinia Virus vTF-7, welches die T7-Polymerase exprimiert, wurde vom NIH AIDS Reagent Program zur Verfügung gestellt (Fuerst et al., 1986).

2.1.10 Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma ARK (Darmstadt) bzw. Metabion (München) bezogen.

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
attB1 external forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCT
attB1 external reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGT
CaM I bw	GCCATCCTTATCAAACACACG
CaM I fw	GACCAACTGACTGAAGAGCAG
Egr-1 bw	TGGGTGCCGCTGAGTAAATG
Egr-1 fw	CCGCAGAGTCTTTTCCTGACA
EpIC bw	GGGGGGCTGCAGTTATGCATT
EpIC fw	GGGGGGCATATGTCCAGAAA
FHL2-bw	AGAAAGCTGGGTCTAGGCAGTAGG CAAAGTCATCG
FHL2-fw	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTGC GGTGCCGTGAGTACC

GAPDH bw	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG
GAPDH fw	AGAACATCATCCCTGCCTCTA
Cyclophilin A-bw	AGAAAGCTGGGTCTATTCGAGTTG TCCACAGTCAG
Cyclophilin A-fw	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACCG CCGAGGAAAACCGTG
RhoB bw	GAGGTAGTCGTAGGCTTGGAT
RhoB fw	TGTGCTTCTCGGTGGACAGC

2.1.11 cDNA-Bibliothek

In der Arbeit wurde eine MATCHMAKER cDNA-Bibliothek von BD Biosciences Clontech verwendet, die aus einer Gesamt-RNA der embryonalen Nieren-Zelllinie 293 (ATCC #CRL1573) generiert wurde. Zur Amplifikation der mRNAs wurden Xho I-(dT)₁₅-Oligonukleotide verwendet. Die cDNA-Bibliothek war bei ihrer Verwendung bereits in den Vektor pACT2 kloniert und *E.coli*-Bakterien des Stammes BNN132 waren mit der pACT2-Bibliothek transformiert. Zur Kontrolle der Qualität wurden vom Hersteller folgende Angaben gemacht:

Anzahl der Kolonien, die eine cDNA exprimieren (geschätzt)	86 %
Anzahl unabhängiger Klone	2,5 x 10 ⁶
Durchschnittliche Größe der cDNAs	1,5 kb
Größenabdeckung der cDNAs	0,5 – 4,0 kb
Anteil an β -Actin-cDNA	0,25 %

2.1.12 Antikörper

Primäre Antikörper:

α -c-myc	9E10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -EpCAM	C215 und HO-3, freundlicherweise von Dr. Lindhofer zur Verfügung gestellt, Thion Pharma, München
α -HA	3F10 (Roche Diagnostics, Darmstadt)
α -GST	Clone GST-2 (Sigma, München)

Sekundäre Antikörper (Peroxidase-konjugiert):

Ziege anti-Maus IgG (H+L),

Kat.-Nr. 415-035-166

Dianova, Hamburg

Ziege anti-Ratte IgG (H+L),

Kat.-Nr. 212-035-082

Dianova, Hamburg

2.1.13 Molekulargewichtstandards

Gene Ruler 100 bp DNA ladder

New England Biolabs, Beverly, USA

Generuler DNA 1 kb ladder

Fermentas Life Sciences, Burlington,

Kanada

BenchMark Protein ladder

Invitrogen, Karlsruhe

SeeBlue Plus2 Protein Standard

Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen, Bakterien und Hefen

2.2.1.1 Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5 % CO₂ und in einer wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Standardmedium für adhärente Zellen war Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotikum (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Medien und Zusätze wurden von Biochrom (Berlin) bezogen. Im Fall von stabilen Transfektanten wurde das Kulturmedium mit 200 µg/ml Hygromycin B supplementiert. Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst, einmal in Medium mit 10 % FCS gewaschen und in gewünschter Dichte ausplattiert. Die Zentrifugation von eukaryontischen Zellen zum Zweck der Konzentrierung oder des Waschens erfolgte in der Regel in 50 ml Einmal-Zentrifugengefäßen bei 350 g für 5 – 10 min bei 20°C.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen ($10^6 - 10^7$ pro Aliquot) in 0,75 ml Kulturmedium resuspendiert, auf Eis gekühlt, mit 0,75 ml kaltem FCS/DMSO (v/v 4:1) gemischt und in ein 1,8 ml-Kryogefäß (Nunc) überführt. Zur langsamen Abkühlung wurden die Zellen zunächst in einem allseitig verschlossenen Styroporbehälter auf - 80 °C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurde der Röhrcheninhalt durch Resuspension mit Kulturmedium (Raumtemperatur) möglichst schnell aufgetaut und in 20 ml Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in FCS-haltigem Medium resuspendiert und kultiviert.

2.2.1.2 Bakterienkultur

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurde LB-Medium mit Ampicillin, Gentamycin bzw. Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50, 15 bzw. 30 µg/ml supplementiert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienkultur mit 15 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

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

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

2.2.1.3 Hefekultur

Hefe-Zellen wurden als Flüssigkulturen in YPDA-Medium bei 30 °C kultiviert. Zur Vereinzelnung der Kolonien wurden Hefe-Zellen auf YPDA-Agarplatten ausplattiert, 3 – 5 Tage bei 30 °C inkubiert und einzelne Kolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, die einen Durchmesser von mindestens 2 – 3 mm hatten und nicht älter als zwei Monate waren.

Zur längeren Aufbewahrung bei - 80 °C wurden Hefe-Zellen in 500 µl YPDA-Medium aufgenommen und mit 500 µl einer 50 %-igen Glycerollösung versetzt. Zur Kultivierung bzw. Lagerung von transformierten Hefe-Klonen wurde anstelle des YPDA-Mediums ein SD-Medium („Synthetic Dropout“) verwendet, welchem die zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes erforderlichen Aminosäuren bzw. Nährstoffe fehlten.

YPDA-Medium: 20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 0,003 % Adeninhemisulfat,
2 % Glucose

SD-Medium: 26,7 g/l Minimal SD Base (BD Biosciences Clontech),
100 ml/l 10 X Dropout-Ergänzung

2.2.2 Gentechnische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von RNA

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von gesamtzellulärer RNA dienten 1×10^6 Zellen. Die Lyse der Zellen und die Reinigung der RNA wurde mit Lösungen und Säulen des High Pure RNA Isolation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Qualität und Menge der isolierten RNA wurden anschließend auf einem denaturierenden 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegel nach einer Färbung der 18S- und 28S-Bande mit Ethidiumbromid überprüft.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Die Synthese einzelsträngiger cDNA erfolgte unter Verwendung der Komponenten des 1st Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR (Roche Diagnostics, Mannheim) und richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial diente $1 \mu\text{g}$ gesamtzelluläre RNA. Bei den Oligonukleotiden handelte es sich um Hexa-Nukleotide deren Sequenz zufällig war („Random Primer“). Die einzelsträngige cDNA diente anschließend als Matrize für die Amplifikation relevanter Gene mittels RT-PCR und genspezifischen Oligonukleotiden (siehe Abschnitt 2.1.10).

2.2.2.3 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 der verwendeten Gele betrug 0,7 bis 3 %. Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und sollte etwa 3 V/cm betragen. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Gel nach dem Lauf für ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (40 ng/ml) gebadet und unter UV-Licht betrachtet.

*Laufpuffer: 1 X TBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) oder
1 X TAE (40 mM Tris Acetat, 1 mM EDTA)*

2.2.2.4 Plasmid-Minipräparationen aus Hefe-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen war ein enzymatischer Abbau der Zellwand unter Verwendung einer Lyticase-Lösung (5 units/ μ l) und einer Inkubation für 2 h auf 37 °C notwendig. Zusätzlich wurden die Zellen in einer 20 %igen SDS-Lösung für 1 min stark gevortext und einmalig auf -20 °C schockgefroren. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit einer Phenol-Chloroform-Mischung (25:24) extrahiert und mit 100 %igem Ethanol präzipitiert. Da die Ausbeute an Plasmid-DNA im Verhältnis zu genomischer DNA gering war, konnte die Konzentration weder photometrisch noch im Agarose-Gel bestimmt werden und eine zusätzliche Transformation von *E.coli*-Bakterien mit der aufgereinigten DNA war erforderlich. Die plasmidäre DNA wurden nach der Lyse der Bakterien über adsorptive GFX-Säulen (Amersham Pharmacia) isoliert.

2.2.2.5 Klonierung unter Verwendung von Restriktionsenzyme

Die relevante DNA-Sequenz wurde mit sequenzspezifischen Primern mittels einer Standard-PCR amplifiziert, aus einem Agarose-Gel aufgereinigt und in den TOPO pCR 2.1-Vektor (Invitrogen) kloniert. Um Fehler bei der DNA-Synthese zu vermeiden wurde eine Pfu-Polymerase (2,5 u/ μ l, MBI fermentas) mit proofreading-Eigenschaften verwendet und die Elongationszeit auf 2 min verlängert. Eine anschließende Inkubation (10 min, 72 °C) mit einer Taq-Polymerase ermöglichte die Generierung von Adenin-Überhängen am 3'- und 5'-Ende des Amplifikats, welche für eine Ligation in den TOPO pCR 2.1-Vektor erforderlich sind. Mit einem Aliquot des Ligationsansatzes wurden chemisch kompetente TOPO 10 F' One Shot *E.coli*-Bakterien (Invitrogen) transformiert und nach einer Blau-Weiß-Selektion die Plasmid-DNA aus den positiven, weißen Transformanten isoliert. Da mit Hilfe der verwendeten Primer an den Enden des Amplifikats Schnittstellen für Restriktionsenzyme generiert wurden, konnte mittels Restriktionsverdau und Gelextraktion das Amplifikat aufgereinigt werden.

Zur Ligation des Amplifikats in den Expressionsvektor wurde der Vektor linearisiert, an den 5'-Phosphat-Enden dephosphoryliert und aus einem Agarose-Gel unter Verwendung eines Extraktions-Kits (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Diagnostics) aufgereinigt. Für die Ligation wurden 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug 1:3. Die Reaktion wurde in 20 μ l 1x Reaktionspuffer (Fermentas Life Sciences) mit 5 U der T4 DNA Ligase (Fermentas Life Sciences) durchgeführt. Zuerst

wurde der Vektor mit dem Insert im Reaktionspuffer vermischt und anschließend die Ligase zugefügt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Mit 50 ng des Ligationsansatzes wurden anschließend chemisch kompetente Bakterien des Stammes DH5 α transformiert und die Transformanten auf die durch den Expressionsvektor vermittelte Antibiotika-Resistenz selektiert. Die aus positiven Transformanten isolierten Plasmide wurden nach einem Kontrollverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen zur Sequenzierung an die Firma Sequiserve abgegeben.

2.2.2.6 Klonierung über homologe Rekombination

2.2.2.6.1 Klonierung in pDONR 207 („donor“-Vektor)

Die Gene für Cyclophilin A (CyA) und FHL2 wurden unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (siehe Abschnitt 2.1.10) mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden über die Sequenz der Oligonukleotide an den Enden des PCR-Produktes *attB*-Seiten eingeführt. Als Matrizen dienten die jeweiligen RZPD-cDNA-Klone (siehe Abschnitt 2.1.5). Die PCR-Produkte wurden in zwei Schritten generiert. Für die erste PCR wurden die für das jeweilige Gen spezifischen Oligonukleotide verwendet. Die zweite PCR wurde mit externen Oligonukleotiden durchgeführt („attB1 external forward“ und „attB1 external reverse“). Die angewendeten PCR-Programme sind in Abb. 2.1 beschrieben.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und isoliert und nach den Angaben des Herstellers über homologe Rekombination in das Plasmid pDONR207 kloniert (Gateway® BP Clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen).

2.2.2.6.2 Subklonierung in pGADT7-dest („destination“-Vektor)

Die beiden Gene für CyA und FHL2 wurden über homologe Rekombination in den eukaryotischen Expressionsvektor pGADT7-dest kloniert. Die Rekombination zwischen pDONR207 und pGADT7-dest ist eine gerichtete, enzymatische Reaktion, die durch Proteine aus dem Bakteriophagen λ und einem *E.coli*-kodierten Protein vermittelt werden. Bei der Subklonierung wurde das Protokoll des Herstellers (Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen) berücksichtigt, wobei die Rekombination zusätzlich mit 10 U einer DNA-Topoisomerase I unterstützt wurde. 1 μ l der LR-Reaktion wurde schließlich für die Transformation von elektrokompenten Bakterien des Stammes DH10B verwendet. Zur

µl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA und 7 µl DMSO pipettiert und für 2 min bei 42 °C im Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von glukosesupplementiertem (10 mM) SOB-Medium und einer 90-minütigen Anzucht bei 37 °C wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten, die mit den entsprechenden Antibiotika angereichert waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

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

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

2.2.2.9 Transformation von *E.coli*-Bakterien mittels Elektroporation

Zur Präparation von elektrokompetenten *E.coli*-Bakterien des Stammes DH10B wurde eine Kultur (1 l) in 2 X YT-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 (nach ca. 3 h Inkubation) wurde die Kultur für 20 min auf Eis abgekühlt. Die durch Zentrifugation (6000 UpM, 10 min, 4 °C) in einem vorgekühlten Rotor pelletierten Bakterien wurden zweimal mit jeweils 250 ml kaltem H₂O gewaschen und abzentrifugiert (s.o.). Nach zweimaligem Waschen in 125 ml 10 % Glycerol wurden die Zellen in 3 ml 10 % Glycerol resuspendiert, zu 50 µl aliquotiert und auf -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Zur Transformation wurden 50 µl der elektrokompetenten DH10B-Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10 -200 ng plasmidärer DNA und einer Inkubation von 15 min auf 4 °C wurden die Zellen in bereits auf Eis vorgekühlte Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Spannung von 2,5 kV für 5 ms elektroporiert. Nach Aufnahme der Bakterien in 1 ml SOC-Medium und Schütteln für 90 min auf 37 °C wurden sie auf LB-Platten ausplattiert, die mit einem dem plasmidären Selektionsmarker entsprechenden Antibiotikum angereichert waren.

SOC-Medium: 2 % Bactotrypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

2 X YT-Medium: 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl

2.2.2.10 Sequentielle Transformation von *S.cerevisiae*-Hefen mit der PEG/LiAc-Methode (Ito et al., 1983; Schiestl & Gietz, 1989; Hill et al., 1991; Gietz et al., 1992)

S.cerevisiae -Hefen des Stammes AH109 wurden nacheinander zuerst mit dem Bait-Vektor und anschließend mit dem Prey-Vektor transformiert. Bei dem Prey-Vektor handelte es sich um eine cDNA-Bibliothek aus HEK293-Zellen, die bereits in das Plasmid pACT2 integriert war (siehe unter 2.1.11).

2.2.2.10.1 Transformation im kleinen Maßstab

Für die Transformation des Hefestammes AH109 mit einem Plasmid, das für ein Fusionsprotein von einer GAL4-DNA-Bindedomäne und dem Bait kodierte, war eine Transformation im kleinen Maßstab ausreichend. Die Hefezellen wurden mit der PEG/LiAc-Methode chemisch kompetent gemacht. Dazu wurden 3 ml YPDA-Medium mit einer Hefekolonie angeimpft und 8 h auf 30 °C geschüttelt. 5 µl der Vorkultur wurden in 50 ml YPDA-Medium überführt und die Kultur bei 30 °C für 16 h geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 700 g für 5 min bei Raumtemperatur wurde das Zell-Pellet in 100 ml YPDA-Medium aufgenommen und erneut bei 30 °C geschüttelt bis die OD₆₀₀ einen Wert zwischen 0,4 und 0,5 erreichte. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation (s.o.) zuerst mit 60 ml TE-Puffer und anschließend mit 3 ml 1,1 X TE/LiAc-Lösung gewaschen. Die Resuspension wurde auf zwei Eppendorf-Gefäße verteilt, abzentrifugiert (s.o.) und jeweils in 600 µl 1,1 X TE/LiAc aufgenommen. Die Transformation wurde wie in Tabelle 2.1 beschrieben angesetzt.

Nach einer Inkubation des Transformationsansatzes für 30 min auf 30 °C und leichtes vortexen alle 10 min, wurde jedem Ansatz 20 µl DMSO zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 15 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und dabei alle 5 min leicht gevortext. Nach kurzem Abzentrifugieren ist das Zell-Pellet in 1 ml YPD Plus Liquid Medium™ aufgenommen und für 90 min bei 30 °C inkubiert worden. Die Hefe-Zellen wurden auf SD-Platten ausplattiert und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Dabei war in dem SD-Medium eine essentielle Aminosäure nicht enthalten, deren endogene Synthese durch die plasmidäre DNA ermöglicht wurde.

Plasmid-DNA	250 ng
Herring Testes Carrier DNA(10 mg/ml), denaturiert*	50 µg
Kompetente AH109-Zellen	50 µl
PEG/LiAc	500µl

Tab. 2.1

Transformationsansatz für *S.cerevisiae*-Hefen im kleinen Maßstab.* Die Carrier-DNA wurde bei 95 °C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Denaturierung wurde zweimal wiederholt.

1,1 X TE/LiAc: *1 X TE-Puffer, 100 mM LiAc*

PEG/LiAc: *40 % PEG (Polyethylenglykol 3350), 1 X TE-Puffer, 100 mM LiAc*

2.2.2.10.2 Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab

Um Hefen mit der DNA einer cDNA-Bibliothek zu transformieren war eine Transformation im großen Maßstab notwendig. Verwendet wurden dabei Hefen des Stammes AH109, die bereits mit dem Bait-Plasmid transformiert waren. Die Hefe-Zellen wurden dafür wie unter 2.2.2.10.1 beschrieben mittels der LiAc-Methode chemisch kompetent gemacht. Die Transformation wurde wie in Tabelle 2.2 beschrieben angesetzt.

Plasmidäre cDNA (0,54 µg/µl)	32,4 µg
Herring Testes Carrier DNA(10 mg/ml), denaturiert	2 mg
AH109-Bait	1 ml
PEG/LiAc	6 ml

Tab. 2.2

Transformation von stabilen Hefe-Klonen mit einer cDNA-Bibliothek im großen Maßstab.

Technisch hatte die Transformation den gleichen Ablauf wie im kleinen Maßstab. Die folgenden Volumina bzw. Inkubationszeiten wurden erhöht: 700 µl DMSO, Hitzeschock für 20 min, Resuspension der Zellen nach dem Hitzeschock in 5 ml YPDA Plus Liquid Medium (BD Biosciences Clontech). Die Zellen wurden in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und mit hoher Stringenz auf eine Bait-Prey-Interaktion selektioniert. Dazu wurden jeweils 200 µl

des Transformationsansatzes auf insgesamt 50 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade-Platten (150 mm) ausplattiert und für mindestens 8 Tage bei 30 °C inkubiert.

Parallel zu der Transformation im großen Maßstab wurde eine Kontrolltransformation mit pACT2 im kleinen Maßstab wie unter 2.2.2.10.1 durchgeführt. Von der Kontrolltransformation wurden 1:100- bzw. 1:1000-Verdünnungen auf SD/-Leu/-Trp-Agarplatten ausplattiert und für 72 h auf 30°C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien konnte so die Transformationseffizienz bestimmt werden.

2.2.2.11 Titration und Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Von der MATCHMAKER HEK 293 cDNA-Bibliothek (siehe Abschnitt 2.1.11) wurden 50 bzw. 100 µl einer 1:100.000-Verdünnung auf LB/Amp-Platten ausplattiert und 36 h bei 30 °C inkubiert. Die Anzahl der unabhängigen Klone pro ml Medium wurde anschließend bestimmt (cfu/ml).

Um insgesamt 4×10^6 unabhängige Klone zu amplifizieren wurden 3,125 µl der cDNA-Bibliothek in 20 ml LB/Amp-Medium aufgenommen, auf 100 150 mm LB/Amp-Platten ausplattiert und 36 h bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden mit jeweils 5 ml LB/Amp-Medium von den Agar-Platten in eine Suspensionskultur überführt und vereinigt.

2.2.2.12 Reinigung der cDNA-Bibliothek im diskontinuierlichen CsCl-Gradienten

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden 25 ml der mit der cDNA-Bibliothek transformierten Bakterienkultur in 1 l LB/Amp resuspendiert und für 5,5 h bei 30 °C kultiviert. Die plasmidäre DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von *Birnboim & Doly* (1979) und *Ish-Horowicz & Burke* (1981) durch alkalische Lyse isoliert. Dazu wurden 500 ml der Bakterien-Kultur für 15 min bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert, das Zell-Pellet in 18 ml Lösung 1 resuspendiert und 2 ml einer frisch angesetzten Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris, pH 8,0) zugegeben. Nach Zugabe von 40 ml der Lösung 2, mehrmaligem Invertieren der Suspension und Inkubation für 10 min bei RT wurde die Alkalische Lyse durch Zugabe von 20 ml eiskalter Lösung 3 beendet. Das Lysat wurde anschließend 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4 °C mit 4000 UpM zentrifugiert. Um verbleibende Zellbestandteile im Überstand zu entfernen wurde die Lösung über einen mehrlagigen Mull zusätzlich filtriert. Die DNA wurde mit 36 ml Isopropanol

(Volumenanteil von 0,6) durch Zentrifugation schließlich gefällt. Nachdem die Plasmid-DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 3 ml TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen wurde, konnte die DNA-Konzentration mittels Extinktion bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt werden.

Um die DNA zu reinigen wurde eine Gleichgewichtszentrifugation in einem diskontinuierlichen CsCl-Gradienten durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 8,4 g CsCl versetzt, die Suspension auf 30°C erhitzt und gerührt bis das Salz vollständig gelöst war. Das Gewicht der Lösung wurde mit TE-Puffer exakt auf 13,2 g eingestellt. Um die DNA im Gradienten sichtbar zu machen wurde die Lösung mit 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in H₂O) versetzt und umgehend geschüttelt bis der Farbstoff homogen verteilt war. Nach Zentrifugation der Lösung mit 8000 UpM bei Raumtemperatur bildete sich ein Schaum an der Oberfläche, der aus Komplexen von bakteriellen Proteinen und Ethidiumbromid besteht. Die rotgefärbte, klare Lösung wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt, das bereits mit einer CsCl-Lösung ($r = 1,47$ g/ml) befüllt wurde. Die DNA-Lösung wurde dabei unter die CsCl-Lösung geschichtet. Der Gradient wurde anschließend in einer Ultrazentrifuge für 24 h bei 60000 UpM zentrifugiert. Die höher laufende der zwei sichtbaren, rotgefärbten DNA-Banden besteht aus linearer, chromosomaler bzw. aufgebrochener zirkulärer DNA. Die im Gradienten niedriger laufende Bande mit einer höheren Dichte enthält die superhelikale plasmidäre DNA, die mit einer Infusionsnadel entnommen wurde. Dazu wurde das Zentrifugenröhrchen mit einer zusätzlichen Infusionsnadel auf der Oberseite angestochen. Die Einstichstelle der Infusionsnadel zur Entnahme der superhelikalen DNA lag unterhalb der DNA-Bande, um ein passives Abfließen der Lösung zu ermöglichen und wurde vorher mit einem Tape-Band abgeklebt. Die Plasmid-DNA wurde in einem Eppendorf-Cup aufgefangen.

Das zwischen die DNA-Stränge interkalierte Ethidiumbromid wurde durch eine Extraktion mit einer n-Butanol-Lösung (gesättigt mit 1M NaCl)/Wasser-Emulsion (Volumen-verhältnis 1:1) entfernt. Die Extraktion wurde bis zur Farblosigkeit der beiden Phasen mehrmals wiederholt. Die extrahierte DNA in der wässrigen Phase wurde mit 10 M Ammoniumacetat (Volumenverhältnis 1:1) und 95 %igem Ethanol (Volumenverhältnis 2:1) gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 4°C inkubiert und bei 10000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen, in 200 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Lösung 1: 50 mM Glucose, 25 mM Tris HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)

Lösung 2: 0,2 N NaOH, 1% SDS

Lösung 3: 60 ml 5 M Na-Acetat, 11,5 ml Eisessigsäure, 28,5 ml H₂O

2.2.2.13 Sonstige DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemeiner Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie beispielsweise Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren und deren Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase, Präparation von Plasmid-DNA über Affinitätsmatrices, Ligation freier DNA-Enden, usw. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (*Maniatis et al.*, 1989).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Protein-Extrakten aus Hefekulturen nach der Harnstoff/SDS-Methode (*Printen & Sprague, 1994*)

50 ml-Flüssigkulturen wurden mit Übernachtskulturen des jeweiligen Hefestammes beimpft und bei 30 °C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 erreicht wurde. Nach schnellem Abkühlen der Kulturen durch Überführen in 50 ml-Falcons, die zur Hälfte mit Eis gefüllt waren, wurden die Zellen in einem vorgekühlten Rotor mit 1000 g bei 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit eisgekühltem H₂O wurden die Zellen bis zur Lyse auf - 80 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung der Protein-Extrakte wurde die Harnstoff/SDS-Methode nach *Printen & Sprague* (1994) verwendet. Für 7,5 OD₆₀₀-Einheiten wurden jeweils 100 µl Cracking-Puffer eingesetzt. Die OD₆₀₀-Einheiten berechnen sich aus dem Volumen der eingesetzten Hefekultur in ml multipliziert mit der gemessenen OD₆₀₀. Der Cracking-Puffer wurde auf 60°C vorgewärmt, auf das gefrorene Zell-Pellet gegeben und die Suspension weitere 2 min auf 60 °C inkubiert. Da PMSF mit einer Halbwertszeit von ca. 7 min in wässrigen Lösungen sehr schnell degradiert wird, wurde es dem Cracking-Puffer erst kurz vor der Verwendung und im Verlauf des Aufschlusses in Abständen von ca. 7 min zugegeben. Jede Zellsuspension wurde anschließend mit Glas-Kügelchen (80 µl Glas-Kügelchen für 7,5 OD₆₀₀-Einheiten) für 1 min gevortext, die Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14000 UpM für 5 min pelletiert und der Überstand in einem neuen Eppendorf-Gefäß auf - 80 °C aufbewahrt.

Cracking-Puffer: 8 M Harnstoff, 5 % SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6,8),
 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau,
 10 µl β-Mercaptoethanol, 70 µl Protease Inhibitor
 Cocktail (Roche Diagnostics), 50 µl 100 X PMSF-
 Stocklösung, ad 1ml H₂O

2.2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen und “Pull down“ Assay

Bakterien des Stammes BL21 wurden mit GST-Konstrukten (Glutathion-S-Transferase) transformiert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Nach Zugabe von 1 mM

IPTG und einer weiteren Kultivierung über Nacht bei 30°C wurde die Bakterienkultur für 15 min bei 4°C und 5000 UpM abzentrifugiert, das Pellet in 2 ml PBS/Lysozym (1 mg/ml) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden zusätzlich dreimal für jeweils 10 sec mit einem Branson Sonifier 450 sonifiziert (output control level 3). Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 14000 UpM und 4 °C wurde der Überstand mit 75 µl Glutathion Sepharose vermischt. Die Bindung der GST-Konstrukte an die Glutathion Sepharose erfolgte durch 30 minütiges Schütteln bei RT. Die Glutathion-GST-Präzipitate wurden anschließend pelletiert und dreimalig mit Waschpuffer gewaschen. Für die Analyse der Proteinexpression mit der Coomassie Blue-Färbung wurden die Präzipitate in Lämmli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C erhitzt. Für die „Pull down“-Assays wurden die GST-Präzipitate mit Gesamtzell-Lysaten der Zelllinie FaDu über Nacht bei 4°C inkubiert. Die pelletierten Glutathion-GST-Komplexe wurden anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach einer Resuspension in Lämmli-Puffer für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Bindungsreaktion wurde mittels Immunoblot analysiert.

Waschpuffer: 50 mM Tris pH 7,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 %Triton X-100

2.2.3.3 Immunoblot

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in 10 – 17 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laufbedingungen: 120 V, 30 mA/Gel) und anschließend auf Immobilon-P Transfer- bzw. Nitrocellulose-Membranen übertragen (Westernblot, 100 V, 500 mA). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 2 h in Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern (1:1000-Verdünnung in TBS/Tween), wobei die immobilisierten Proteine über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert wurden. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS/Tween wurde der primäre Antikörper durch einen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper detektiert (1 h, RT) und die Membran wiederum mehrmals mit TBS/Tween gewaschen. Zur Visualisierung des gebundenen sekundären Antikörpers wurde der ECL-Kit (Amersham Pharmacia) verwendet und die Membran entsprechend den Vorgaben des Herstellers behandelt.

Blockpuffer: PBS/Milch (3-5 %), PBS/BSA (1 %) oder Roti-Block (Roth)

TBS/Tween: *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferte Lösung,
0,2 % Tween 20*

2.2.3.4 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation wurde mit Lysaten von Zellen durchgeführt, die mit den Plasmiden pGADT7-dest und pcDNA3.1 kotransfiziert waren. Der T7-Promoter der beiden Plasmide diente als Bindungsstelle für eine T7-RNA-Polymerase, die von dem rekombinanten Vaccinia-Virus vT7 exprimiert wurde. HeLa-Zellen wurden auf 10 cm Kulturplatten kultiviert und mit vT7-Virus in Serum-freiem Medium infiziert. Direkt nach der Infektion wurden die Zellen mit jeweils 10 µg der beiden Expressionsvektoren nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert und für 24 h inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde durch ein GFP-Plasmid mit einem T7-Promoter kontrolliert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation mit 1 ml Lysispuffer (50 mM Oktylglucosid bzw. 0,5 % Triton X-100) auf 4°C. Zur Entfernung von ungelösten Zellbestandteilen wurden die Lysate bei 20500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 50 µl Protein G-Sepharose inkubiert. Die Präzipitation der Proteine aus dem Überstand wurde mit 1 µg eines anti-EpCAM-Antikörpers (HO-3) bzw. eines anti-HA-Antikörpers (Klon 3F10, Roche Diagnostics) und 50 µl Protein G-Sepharose durchgeführt. Der Ansatz wurde dazu über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Sepharose-Kügelchen wurden anschließend dreimal mit jeweils 500 µl eiskaltem Lysispuffer gewaschen und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Nach Erhitzen der Proben für 10 min auf 95 °C wurden die Präzipitate mit der SDS-PAGE aufgetrennt.

50 mM Oktylglucosid: *50 mM Oktylglucosid, 140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM
Tris pH 7,6, 1 X Protease Inhibitor Cocktail (Roche
Diagnostics)*

0,5 % Triton X-100: *0,5 % Triton X-100, 140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris
pH 7,6, 1 X Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics)*

2.2.4 Sonstige Methoden

2.2.4.1 Identifizierung der cDNA-Sequenzen aus positiven Yeast Two-Hybrid-Transformanten

Um die cDNA-Sequenzen zu identifizieren, die für eine positive Two-Hybrid-Interaktion verantwortlich waren, wurden die Plasmide aus den AH109-Klonen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2.4), die unter hoher Stringenz auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade-Platten proliferierten. Die unterschiedlichen bakteriellen Resistenzmarkergene auf dem Bait- und dem Prey-Vektor ermöglichten die Isolierung des Prey-Plasmides durch eine Selektion auf Ampicillin-Resistenz.

Zur Sequenzierung wurden die isolierten cDNA-Plasmide an die Firma Sequiserve abgegeben. Die DNA-Sequenzen wurden im Leseraster der GAL4-Aktivierungsdomäne in die entsprechende Aminosäure-Sequenz translatiert und mit Hilfe eines Datenbankabgleichs homologe Sequenzen bereits bekannter, humaner Proteine identifiziert (Protein-protein BLAST von NCBI = National Center for Biotechnology Information).

2.2.4.2 β -Galactosidase Filter Assay (*Breeden & Nasmyth, 1985*)

Bei einer Protein-Protein-Interaktion zwischen dem intrazellulären Anteil von EpCAM und einem Peptid der cDNA-Bibliothek wird die Expression des *lacZ*-Genes induziert. Das Substrat X-Gal kann von den Hefen, die interagierende Proteine exprimieren, verstoffwechselt werden und führt zu einer Blaufärbung der entsprechenden Klone.

Positive Two-Hybrid-Klone wurden für 2-4 Tage auf SD/-Leu/-Trp-Platten bei 30°C kultiviert. Die Kolonien wurden anschließend durch Auflegen von sterilem Whatman-Filter auf den Agar aufgenommen und das Whatman-Filter zur Permeabilisierung der Zellen in flüssigem Stickstoff für 10 sec schockgefroren (*Schneider et al., 1996*). Nachdem der Filter mit den permeabilisierten Zellen bei RT aufgetaut war, wurde er mit den Hefe-Kolonien auf der Oberseite auf einen weiteren Whatman-Filter gelegt, der mit Z-Buffer/X-Gal-Lösung getränkt war. Die Whatman-Filter wurden anschließend für 5 h bei 30°C inkubiert.

Z-Puffer: Na_2HPO_4 16,1 g/l, NaH_2PO_4 5,5, KCl 0,75, $MgSO_4$ 0,246

Z-Puffer/X-gal-Lösung: Z-Puffer 100 ml, β -Mercaptoethanol 0,27 ml, X-gal
(20 mg/ml in DMF) 1,67 ml

2.2.4.3 Bestimmung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen an der Oberfläche von Zellen kann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und eines Durchflusszytometers quantifiziert werden. 2×10^5 Zellen wurden mit einer 1:50-Verdünnung eines α -EpCAM-Antikörpers in FACS-Puffer für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in einer 1:50-Verdünnung eines für den Primärantikörper spezifischen α -IgG-FITC-markierten Antikörpers (1 mg/ml) suspendiert und für 30 min inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde die Oberflächenexpression von EpCAM in einem FACScalibur™ (Becton-Dickinson) bestimmt.

FACS-Puffer: *PBS + 5 % FCS*

3. Ergebnisse

3.1 Expression von EpCAM in humanen Epithelzellen

3.1.1 Modulation der Transkription von Egr-1, CaM I und RhoB durch EpCAM

Die Expression von EpCAM verursacht unter Serum-reduzierten Bedingungen in humanen Epithelzellen eine verstärkte Proliferation, morphologische Veränderungen der Zellen und eine erhöhte metabolische Aktivität (Münz et al., 2004). Über die Veränderungen auf molekularer Ebene die für diese phänotypischen Veränderungen ursächlich sind, ist bis dato wenig bekannt. Anhand von nukleären Run-On Experimenten mit Clontech Atlas Arrays Human Cancer 1.2 konnten bereits mehrere Gene identifiziert werden, deren Expression von einer EpCAM-Expression moduliert wird (Quelle: Promotionsarbeit M. Münz). Es erschien deshalb interessant diese Ergebnisse mit einem alternativen Versuchsansatz zu bestätigen.

Mittels reverser Transkription einer gesamtzellulären cDNA und Amplifikation relevanter mRNAs über eine PCR ist es möglich die transkriptionelle Aktivität von Genen quantitativ zu erfassen. Herangezogen wurde dazu die zelluläre RNA von stabilen Klonen der Zelllinie HEK293, die mit EpCAM bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert sind. Eine differentielle Genexpression, die mit den bereits vorhandenen Daten aus den Run-On-Experimenten übereinstimmen, konnte für die Gene von Egr-1, CaM I und RhoB gezeigt werden (Abb. 3.1). Für die Gene von CDC28 Protein Kinase 1, RFC 37, CD59 und 14-3-3 sigma konnte die in Run-On Experimenten ermittelte Regulation nicht bestätigt werden. Die Menge an eingesetzter cDNA war in den verwendeten Zelllinien, wie an der Amplifikation der mRNA für das „Housekeeping“-Gen GAPDH zu erkennen ist, vergleichbar.

Die Menge an Transkripten der Gene für CaM I und RhoB wird in den HEK293-EpCAM-Zellen durch die Expression von EpCAM erhöht, während die transkriptionelle Aktivität des Egr-1-Genes durch eine EpCAM-Expression gehemmt wird (Abb. 3.1).

Der EpCAM-reprimierte Transkriptionsfaktor Egr-1 („Early growth response“) supprimiert die Transformation und fördert die Apoptose von Zellen (Li et al., 1998). Das EpCAM-

induzierte RhoB („**Ras homolog B**“) ist an der Regulation des Cytoskeletts und der Adhäsion beteiligt (Hall, 1998).

Bei dem Protein CaM I (Calmodulin I) handelt es sich um eine Ca^{2+} -bindendes Protein, das eine große Anzahl von Enzymen, welche am Zellzyklus und -wachstum beteiligt sind, reguliert (Means et al., 1991). Da die Überexpression von EpCAM den Zellzyklus beeinflusst, erschien es interessant eine EpCAM-induzierte transkriptionelle Aktivierung von Calmodulin I mit weiteren Experimenten zu verifizieren.

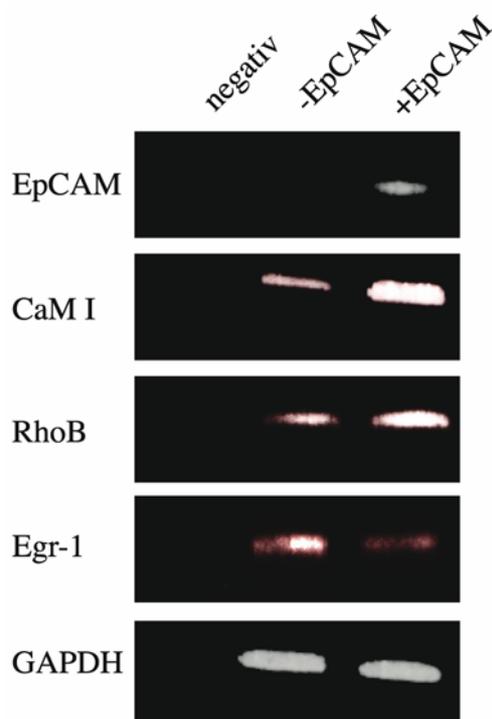


Abb. 3.1

Regulation der Transkription von CaM I, Rho B und Egr-1 durch EpCAM. Die mRNA-Menge der analysierten Gene wurde mittels RT-PCR quantifiziert. Die gesamtzelluläre RNA wurde aus HEK293-Zellen isoliert, die mit einem EpCAM-Expressionsplasmid bzw. dem entsprechenden Leervektor stabil transfiziert waren. Die Verwendung gleicher Mengen an cDNA wurde über die RT-PCR von GAPDH kontrolliert. Die PCR-Amplifikate wurden in einem 2%-igem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Negativ-Kontrolle: RT-PCR ohne cDNA.

3.1.2 EpCAM-Expression beeinflusst die CaM I-Transkription in Karzinomzelllinien

Die mögliche Korrelation zwischen der Expression von EpCAM und Calmodulin I wurde in Karzinomzelllinien untersucht, die sich bezüglich ihrer EpCAM-Expression an der Zelloberfläche signifikant unterscheiden. Die Menge an EpCAM, die in Karzinomzelllinien an der Zelloberfläche exprimiert wird, wurde mit den EpCAM-spezifischen Antikörpern HO-3 bzw. C215 im Durchflusszytometer bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Hypopharynx-Karzinomzelllinien PCI-I, FaDu und Ant-1 bezüglich ihrer EpCAM-Expression signifikant unterscheiden. Deshalb wurden für die Synthese der cDNA diese drei Zelllinien herangezogen. Die Amplifikation der CaM I-cDNA erfolgte unter Verwendung von genspezifischen Primern (CaM I bw, CaM I fw). Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, war die Menge an eingesetzter gesamtzellulärer cDNA über die RT-PCR des „Housekeeping“-Genes GAPDH kontrolliert worden.

Es zeigte sich, wie in Abb. 3.2 dargestellt, dass die Menge an CaM I-mRNA in den Karzinomzelllinien mit der Menge an EpCAM an der Oberfläche der Zellen korrelierte. Sowohl EpCAM als auch die mRNA von Calmodulin wurden bei PCI-I-Zellen am stärksten exprimiert. Signifikant schwächer ausgeprägt sind die beiden Versuchsparameter bei der FaDu-Zelllinie. Die Ant-I-Zellen sind sehr schwach EpCAM-positiv und weisen gleichzeitig die geringste Menge an CaM I-mRNA auf. Die gezeigten transkriptionellen Effekte einer *de novo*- bzw. einer nativen Expression von EpCAM in humanen Zelllinien konnten aufgrund der unzureichenden Spezifität der erhältlichen Antikörper auf der Proteinebene nicht verifiziert werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit stand es im Vordergrund Proteine zu identifizieren, die mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM direkt interagieren.

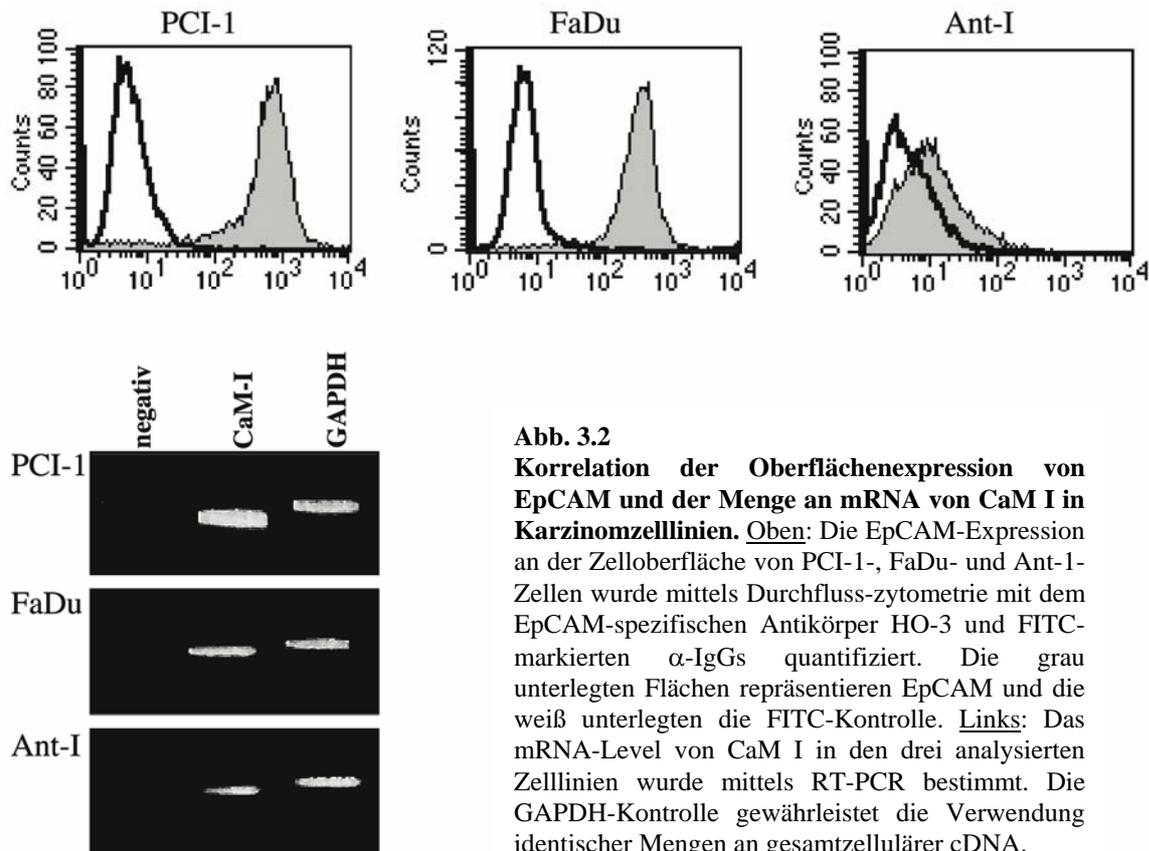


Abb. 3.2

Korrelation der Oberflächenexpression von EpCAM und der Menge an mRNA von CaM I in Karzinomzelllinien. Oben: Die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche von PCI-1-, FaDu- und Ant-1-Zellen wurde mittels Durchfluss-zytometrie mit dem EpCAM-spezifischen Antikörper HO-3 und FITC-markierten α -IgGs quantifiziert. Die grau unterlegten Flächen repräsentieren EpCAM und die weiß unterlegten die FITC-Kontrolle. Links: Das mRNA-Level von CaM I in den drei analysierten Zelllinien wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die GAPDH-Kontrolle gewährleistet die Verwendung identischer Mengen an gesamtzellulärer cDNA.

3.2 Intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen von EpCAM

3.2.1 Herstellung eines AH109-Bait-Stammes für einen Yeast Two-Hybrid-Screen

Bei einem Yeast Two-Hybrid-Screen werden ein Bait-Gen als Fusion mit einer GAL4-DNA Bindungsdomäne (DNA-BD) und Gene einer cDNA-Bibliothek als Fusion mit einer GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD) in einem Hefe-Reporterstamm exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Bait- und einem cDNA-Fusionsprotein werden die DNA-BD und die DNA-AD in räumliche Nähe gebracht, wodurch die Transkription von Reporter-Genen aktiviert wird (siehe Abb. 3.3). Als Expressionssystem wird der *S.cerevisiae*-Hefestamm AH109 verwendet. Die vier Reportergene in AH109 *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* stehen unter der Kontrolle von drei verschiedenen GAL4 UASs („upstream activating sequences“) und TATA-Boxen (siehe Abb. 3.4). *ADE2* und *HIS3* ermöglichen

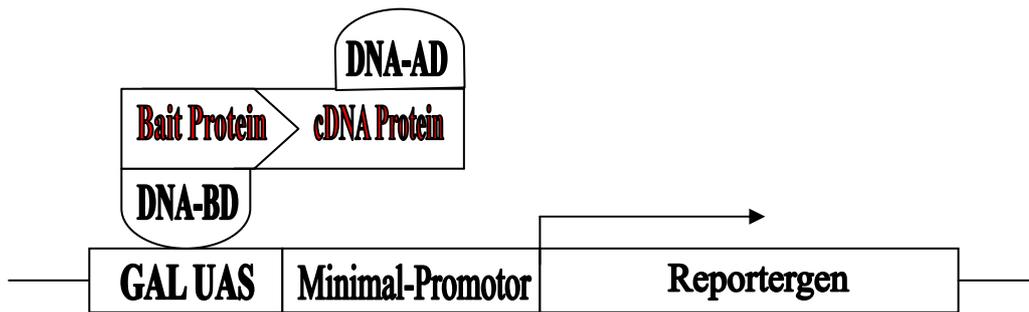


Abb. 3.3

Prinzip des Yeast Two-Hybrid. Die DNA-Bindedomäne (DNA-BD) besteht aus den Aminosäuren 1 – 147 des GAL4-Proteins. Das GAL4-Protein bindet GAL UAS im 5'-Bereich des Reportergens. Die DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD) besteht aus den Aminosäuren 768 – 881 des GAL4-Proteins und fungiert als transkriptioneller Aktivator.

eine Nährselektion mit hoher Stringenz und reduzieren dadurch das Auftreten von falsch-positiven Klonen (James et al., 1996). *MEL1* und *lacZ* stehen unter der Kontrolle des gleichen GAL4 Promoters, wobei *MEL1* für eine α - und *lacZ* für eine β -Galactosidase codiert.

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Abb. 3.4

Reportergen-Konstrukte in dem Hefestamm AH109. Die Reportergene *HIS3*, *ADE2*, *lacZ/MEL1* stehen unter der Kontrolle von drei vollständig heterologen cis-aktivierenden Transkriptions- (UAS: „upstream activating sequence“) und Minimal-Promotorelementen (TATA-Boxen), wobei die Genaktivität über die Bindung eines GAL4-Proteins an die UASs reguliert wird. Mit Ausnahme des endogenen GAL4-regulierten *MEL1*-Genes werden *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* durch artifizielle Promotoren reguliert.

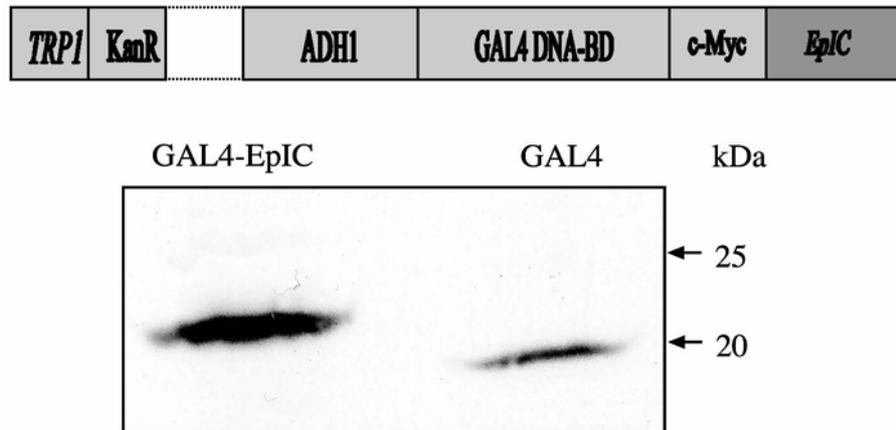
Zur Aufklärung intrazellulärer Signaltransduktionswege an denen EpCAM beteiligt ist, sollten zytoplasmatische Interaktionspartner von EpCAM identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die Nukleotidsequenz von EpCAM, die für die Expression der zytoplasmatischen Domäne (26 Aminosäuren, EpIC) des Proteins verantwortlich ist, in das Hefe-Expressionsplasmid pGBKT7 kloniert. Das aus 78 Basen bestehende Oligonukleotid wurde über Nde I- und Pst I-Restriktionsschnittstellen gerichtet und im Leseraster der GAL4 DNA-BD in den Vektor pGBKT7 kloniert (siehe Abb. 3.5). Das Fusionsprotein in pGBKT7 wird über ein 700-bp-Fragment des *ADHI*-Promotors konstitutiv und mit einem c-Myc-Epitop exprimiert (Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., 1995).

Nach der Transformation des pGBKT7-EpIC-Konstrukts in den Hefestamm AH109 war sicherzustellen, dass das DNA-BD-Fusionsprotein die Transkription der Reportergene nicht autonom aktiviert. Dazu wurde die Proliferation der transformierten AH109-EpIC-Klone auf SD/-Trp/X- α -Gal-, SD/-His/-Trp/X- α -Gal- und SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal-Medien getestet. Ein Wachstum der transformierten Kolonien war nur auf SD/-Trp/X- α -Gal-Medium nachzuweisen, wobei es zu keiner Blaufärbung der Kolonien kam. Folglich führt die Expression der DNA-BD-EpIC-Fusion in AH109-Hefezellen zu keiner transkriptionellen Aktivierung der *ADE2*-, *HIS3*- und *MEL1*-Reportergene (siehe Abb.3.5).

Die Toxizität der DNA-BD-EpIC-Fusion für die AH109-Hefezellen wurde überprüft, indem die Proliferation der Transformanten mit der Proliferation von Hefezellen verglichen wurde, die mit dem Leervektor pGBKT7 transformiert waren. Nach einer Inkubation der entsprechenden Suspensionskulturen bei 30 °C für 23 h und unter Selektion auf Tryptophan war die Proliferation der Hefezellen durch die Transformation mit dem pGBKT7-EpIC-Konstrukt im Vergleich zum Leervektor um 40 % reduziert. Die Beeinträchtigung der Proliferation von Hefezellen durch eine Expression der DNA-BD-EpIC-Fusion kann durch den *ADHI*-Promoter begründet werden, der, wie bereits erläutert, konstitutiv aktiv ist und das Fusionsprotein in sehr großen Mengen exprimiert. Die Existenz von großen Mengen des DNA-BD-EpIC-Fusionsprotein im Zellkern der Hefen kann zu einer Beeinträchtigung der Proliferation der Hefen führen. Die Proliferation der transformierten Hefen wurde aber als ausreichend für ein Two-Hybrid Screening eingestuft.

Die Expression der DNA-BD-EpIC-Fusion wurde mittels eines Immunoblots mit einem für das c-Myc-Epitop spezifischen Antikörper verifiziert. Dazu wurden Protein-Extrakte von Hefe-Zellen hergestellt, die mit pGBKT7-EpIC bzw. pGBKT7 transformiert waren (Printen

& Sprague, 1994). Die Protein-Extrakte wurden in einem 15 %-igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der beobachtete Größenunterschied von ca. 3 kDa entspricht den 26 Aminosäureresten der zytoplasmatischen EpCAM Domäne (siehe Abb. 3.5).



SELEKTIONSMEDIUM	PROLIFERATION	FARBE DER KOLONIEN
SD/-Trp/X- α -Gal	+	weiß
SD/-Trp/-His/X- α -Gal	-	-
SD/-Trp/-Ade/X- α -Gal	-	-

Abb. 3.5
pGBKT7-EpIC-Konstrukt und -Expression in AH109. Oben: Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM (*EpIC*) wird als Fusionsprotein mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne und mit einer C-terminalen c-Myc-Markierung unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI*-Promoters exprimiert. Mitte: Analyse der Proteinexpression von Lysaten des Hefestammes AH109, die mit pGBKT7 transformiert wurden. Das GAL4-Fusionsprotein wurde mit einem Antikörper gegen c-myc detektiert. Gezeigt wird die Expression einer GAL4-EpIC-Fusion mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. Das GAL4-Peptid hat in der SDS-PAGE ein nominelles Molekulargewicht von 19 kDa. Unten: Phänotyp des AH109-EpIC-Stammes, der eine autonome Aktivierung der Promotoren für *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* durch die GAL4-DNA-Bindungsdomäne ausschließt.

3.2.2 Transformation des Bait-Hefestammes mit der HEK293 cDNA-Bibliothek

Generell können bei einem Yeast Two-Hybrid Screening die Hefezellen mit dem Bait- und Prey-Vektor ko- oder sequenziell transformiert werden. In dieser Arbeit wurde einer sequentiellen Transformation der Vorrang eingeräumt, da die Versuchsbedingungen besser zu kontrollieren sind. Zum Beispiel kann eine autonome Aktivierung der Reportergene durch das DNA-BD-EpIC-Fusionsprotein nur bei einer sequentiellen Transformation nachgewiesen werden.

Für das Screening wurde eine kommerziell erhältliche cDNA-Bibliothek bestehend aus $2,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen, die aus der HEK293-Zelllinie generiert wurde, verwendet. Die cDNA-Bibliothek war bereits in das pACT2-Plasmid kloniert und in *E.coli* transformiert. Das Plasmid pACT2 trägt das *LEU2*-Gen zur Selektion in Hefe (Vgl. pGBKT7: *TRP1*). Eine Titration der verwendeten pACT2 Bibliothek ergab einen Titer von $7,8 \times 10^{11}$ cfu/ml. Diesem Titer entsprechend wurden 4×10^6 unabhängige Klone der pACT2-Bibliothek unter Selektion auf Ampicillin-Resistenz amplifiziert. Eine Anzucht der cDNA-Klone auf Agarplatten war notwendig, um eine Überrepräsentation von dominierenden cDNA-Sequenzen zu verhindern. Da nach der anschließenden Resuspension der Klone die Bakteriendichte sehr hoch ($OD_{600} > 1,0$) war, wurde die Plasmidpräparation mittels Dichtezentrifugation in einem CsCl-Gradienten in einer 1:25-Verdünnung durchgeführt. Anschließend wurde der EpIC-Hefestamm nach der PEG/LiAc-Methode transformiert (Ito et al., 1983; Schiestl & Gietz, 1989; Hill et al., 1991; Gietz et al., 1992). Die Transformanten wurden unter stringenten Bedingungen auf die Expression von *ADE2* und *HIS3* selektioniert.

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden die mit dem Bait-Vektor transformierten, kompetenten Hefezellen mit einer definierten Menge des pACT2-Plasmids transformiert und auf prototrophe Transformanten bezüglich Leucin und Tryptophan selektioniert. Es ergab sich eine Transformationseffizienz von $6,0 \times 10^5$ cfu/ μ g Prey DNA. Da 32 μ g DNA der HEK293 Prey Genbank für die Transformation eingesetzt wurden, wurden bei der Transformation der cDNA-Bibliothek $1,94 \times 10^7$ unabhängige Klone getestet. Die Anzahl der Transformanten, die nach der sequentiellen Transformation unter den stringenten Selektionsbedingungen proliferierten, betrug 170. Im Folgenden wurden 106 positive Klone zur weiteren Analyse herangezogen. Die Proliferation von 37 Yeast-Two-Hybrid Klonen ist in Abb. 3.6 dargestellt. Es sind die Transformanten dargestellt, deren

Prey DNA-Sequenz bei der später durchgeführten Sequenzierung eindeutig einem bereits bekannten Protein in der NCBI-Datenbank zugeordnet werden konnte. Für die verbleibenden 69 Transformanten war es nach der Sequenzierung des Prey-Plasmides nicht möglich eine übereinstimmende Aminosäure-sequenz in der NCBI-Datenbank zu identifizieren.

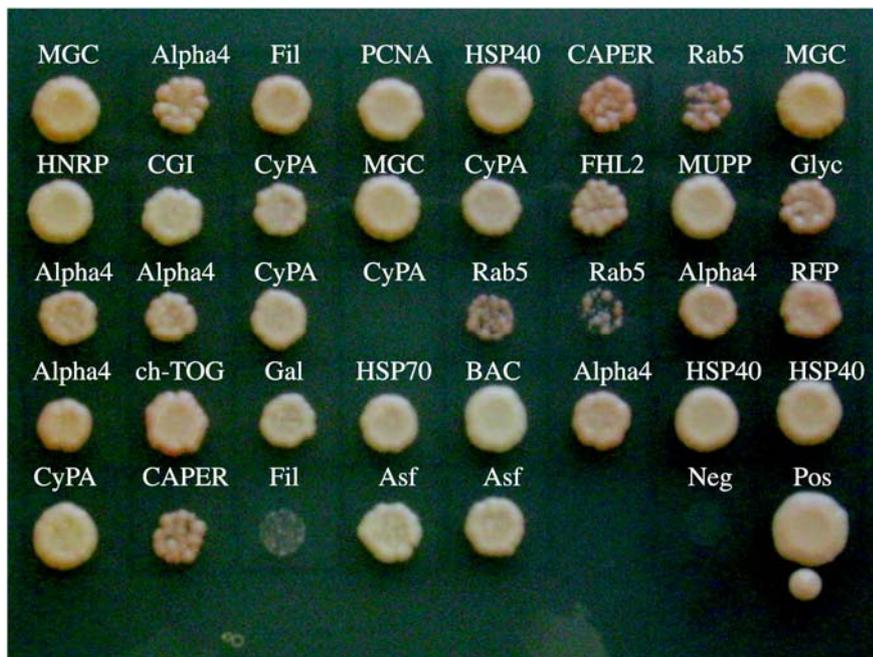


Abb. 3.6
Proliferation von Yeast Two-Hybrid Klonen des Stammes AH109, die einen prototrophen Phänotyp für Trp, Leu, Ade und His aufweisen. Die Hefe-Zellen wurden sequentiell mit pGBKT7-EpIC und einer pACT2-cDNA-Bibliothek transformiert und für 5 Tage auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade-Agarplatten inkubiert. Als Kontrollen wurden die Hefe-Zellen mit pGADT7-RecT/pGBKT7-53 (positiv) bzw. pGADT7-RecT/pGBKT7-Lam (negativ) transformiert.

3.2.3 Verifizierung der Protein-Protein-Interaktionen durch die Retransformation des Bait-Hefestammes mit den Prey-Plasmiden

Um sicherzustellen, dass die positiven Klone des Yeast Two-Hybrid Screenings nicht aufgrund unspezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen proliferieren, war eine Retransformation des Bait-Hefestammes mit den cDNA-pACT2-Plasmiden notwendig. Aufgrund der unterschiedlichen bakteriellen Selektionsmarker von pACT2 und pGBKT7 war es möglich, nach der Isolierung der Plasmide aus den Hefe-Klonen und der

Transformation von Bakterien, mit Ampicillin auf das Prey-Plasmid zu selektionieren. Zur Kontrolle wurden die aufgereinigten Plasmidpräparationen mit dem Restriktionsenzym Bgl II verdaut und anhand der entstehenden DNA-Fragmente belegt, dass ausschließlich homogene Populationen von Prey-Plasmiden vorliegen und keine Bait-Plasmide in den Präparationen enthalten sind. Eine Retransformation des Bait-Hefestammes mit der Prey-Plasmid DNA führte bei allen 106 Retransformanten zu einer *ADE2*- und *HIS3*-Auxotrophie. Dieses Ergebnis bestätigt, dass das Auftreten von falsch-positiven Klonen aufgrund unspezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die sehr stringenten Selektionsbedingungen eliminiert werden kann.

3.2.4 Identifikation der Prey-Sequenzen der Yeast Two-Hybrid Klone

Die Heterogenität der erhaltenen Prey cDNAs wurde zunächst mittels einer Restriktionsanalyse der isolierten pACT2-Plasmide analysiert. Die Größe der cDNA Fragmente nach einem Verdau mit der Restriktionsendonuclease Bgl II variierte zwischen 0,4 und 4,0 kb, wobei die Größenverteilung heterogen war. Aufgrund der Ergebnisse der Retransformation und der hohen Heterogenität bezüglich der Länge wurden sämtliche Prey-Plasmide sequenziert.

Anschließend wurde die bestimmte Nukleinsäuresequenz im Leseraster der GAL4-Aktivierungsdomäne in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert. Durch einen BLAST Search gegen die Datenbank für humane Proteine des NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurden 37 der 106 Klone identifiziert (siehe Tab. 3.1). Da bei der cDNA-Synthese das Ablösen der Reversen Transkriptase vom Matrizen-Strang unabhängig vom Leseraster für die Proteinsynthese erfolgt, werden statistisch 66 % artifizielle Peptide synthetisiert. Bei den 69 nicht identifizierbaren Aminosäuresequenzen handelt es sich um artifizielle Peptide, die mit dem Bait interagieren.

Besonders interessant war die Identifikation von Proteinen, die an der von EpCAM vermittelten Signaltransduktion beteiligt sein könnten oder einen Einblick geben könnten, wie der Rezeptor am Aktin-Zytoskelett verankert ist.

Das Phosphoprotein Alpha 4, das in sechs unabhängigen Klonen identifiziert werden konnte, ist in B-Zellen mit dem Immunoglobulin-Rezeptor assoziiert und wahrscheinlich am Rapamycin-sensitiven FRAP-vermittelten Signalweg beteiligt (Inui et al., 1994; Chen et al., 1998). Ein Abgleich der translatierten cDNA-Sequenz der aufgereinigten Prey Plasmide mit

der Aminosäure-Sequenz von Alpha 4 in der NCBI-Datenbank ergab eine Übereinstimmung von 65 % (siehe Abb. 3.7).

In fünf unabhängigen Klonen konnte Cyclophilin A (CyA) identifiziert werden. CyA ist ein zytosolischer Rezeptor, der in humanen T-Zellen an der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist (Schreiber et al., 1991). Die isolierten CyA-Prey-Plasmide kodierten für die vollständige Aminosäuresequenz von CyA.

FHL2 („four and a half Lim domain 2“) konnte in einem Yeast Two-Hybrid Klon identifiziert werden. Es handelt sich um ein LIM-Protein, dass mit den zytoplasmatischen α - und β -Untereinheiten von Integrin interagiert und auf diese Weise in Adhäsionskomplexe rekrutiert wird (Wixler et al., 2000). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors β -Catenin, der als Bindungspartner von E-Cadherin ebenfalls an Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt ist, wird über eine Bindung an FHL2 koaktiviert (Wei et al., 2003). In den aufgereinigten FHL2-Prey-Plasmiden konnte die vollständige Aminosäuresequenz von FHL2 identifiziert werden.

Filamin 1 ist ein F-Actin-bindendes Protein, das über eine gleichzeitige Interaktion mit dem transmembranen Rezeptor Integrin zur Stabilität der Membran beiträgt und die Migration von Zellen beeinflusst (Cunningham et al., 1992). Aufgrund der bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen von Alpha 4, Cyclophilin A, FHL2 und Filamin 1 und ihrer zellulären Lokalisation kommen sie als potenzielle, zytoplasmatische Interaktionspartner von EpCAM in Frage.

MUPP1 ist ein Protein mit 13 putativen PDZ-Domänen, das in vielen Geweben exprimiert wird. Eine Interaktion mit dem Gehirn-spezifischen Rezeptorprotein 5HT_{2C} ist bereits in der Literatur beschrieben (Ulmer et al., 1998). Bei Proteinen mit PDZ Domänen handelt es sich um „scaffolding“-Proteine, die die Aufgabe besitzen Signalmoleküle in einem Signaltransduktionskomplex zu vereinigen.

Bisher weder funktionell charakterisiert noch zellulär lokalisiert sind die hypothetischen Proteine MGC11349 und CGI-128. Das Rab5 interacting-Protein, das am N-Terminus eine transmembrane Domäne aufweist, interagiert mit Rab5. Das Rab5-Protein spielt eine Schlüsselrolle bei der homotypischen Endosomen-Fusion (Hoffenberg et al., 2000). Eine Bindung an EpCAM kann daher für diese Proteine nicht ausgeschlossen werden.

Protein	Anzahl unabhängiger Klone	Sequenz-homologie in %	Beschreibung	NCBI Accession Nummer
Alpha 4 (IGBP1)	6	65	B-Zell Signaltransduktionsmolekül, Assoziation mit PP2A, PP4 und PP6, 45 kDa-Phosphoprotein	NP001542
Cyclophilin A	5	100	Interaktion mit CD99, T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion, 18 kDa	AAU13906
FHL2	1	100	Transkriptionelle Ko-Aktivierung von β -Catenin, Integrin-Signalweg, 29 kDa	NP963850
Filamin 1	2	100	Zytoskelett-Plasmamembran-Linker, Migration, Interaktion mit PKC α , 291 kDa	NP001447
MGC11349 Protein	3	100	Hypothetisches Protein, 54 kDa	AAH02940
Rab5 interacting-Protein	3	86	Membran-assoziiert, Interaktion mit Rab5 (Homotypische Endosomen-Fusion), 75 kDa	Q9UH99
MUPP1	1	100	„multi-PDZ-domain protein“, Interaktion mit 5-HT2C-Rezeptor, 226 kDa	CAI41239
CGI-128 Protein	1	100	Hypothetisches Protein, 17,7 kDa	NP057146
Galectin-1	1	100	Extrazellulär, Interaktion mit beta-1 Untereinheit von Integrin, 14 kDa	AAP35421
CAPER	2	100	„Coactivator of activating protein-1 (AP-1) and estrogenreceptors (ERs)“, 58 kDa	NP909122
ASF1 B	2	100	„Anti-silencing function 1 homolog B“, Aktivierung transkriptionell stillgelegter Gene, 22 kDa	NP001447
ch-TOG protein	1	100	„Colonic and hepatic tumor overexpressed gene“, Organisation von Spindel-Mikrotubuli, 218 kDa	NP001008938
PCNA	1	96	„Proliferating cell nuclear antigen“, DNA-Replikation und -Reperatur, 29 kDa	NP060624
HNRPDL protein	1	78	„Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein DL“, mRNA-Prozessierung, 27,2 kDa	NP112740
ring finger protein 1	1	100	Transkriptioneller Repressor, 41 kDa	CAI17651
DnaJ (HSP40) Homolog	3	100	Proteinsynthese, -faltung und -sekretion, ER-assoziiert, 39 kDa	NP057390
N-Glycanase 1	1	100	Abbau falsch gefalteter Glykoproteine, 72 kDa	AAH07226

Tab. 3.1

Identifizierung der cDNA-Sequenzen aus Yeast Two-Hybrid Klonen. Die Translation der pACT2-cDNAs, die aus Yeast Two-Hybrid-Klonen isoliert wurden, in die entsprechende Aminosäuresequenz erfolgte im Leseraster der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne. Mittels eines Protein-Protein BLASTs in der NCBI-Datenbank für humane Proteine konnten die Aminosäuresequenzen identifiziert werden. (Nicht berücksichtigt sind in der Tabelle die Klone für BAC und HSP70). **Rot:** Signaltransduktion, **grün:** Zytoskelett-Membran-Linker, **violett:** nukleäre Proteine, **blau:** Chaperone, schwarz: sonstige oder unbekannt Funktionen.

Eine Interaktion von EpIC mit Molekülen die im Nukleus (in Tab. 3.1 violett markiert) lokalisiert sind, ist möglich, falls EpIC in den Zellkern gelangt oder das nukleäre Protein transient in das Zytoplasma transloziert.

Eine Interaktion von EpIC mit Proteinen, die im luminalen Teil des Endoplasmatischen Reticulums (in Tab. 3.1 blau markiert) lokalisiert sind, könnte während der Synthese von EpCAM oder beim Transport des Proteins an die Membran eine Rolle spielen.

```

      10      20      30      40      50      60
MAAEDELQLP RLPELFETGR QLLDEVEVAT EPAGSRIVQE KVFKGLDLEE KAAEMLSQLD

      70      80      90     100     110     120
LFSRNEDLEE IASTDLKYLL VPAFQGALTM KQVNPSKRLD HLQRAREHFI NYLTQCHCYH

      130     140     150     160     170     180
VAEFELPKTM NNSAENHTAN SSMAYPSLVÄ MASQRQAKIQ RYKQKKELEH RLSAMKSAVĒ

      190     200     210     220     230     240
SGQADDERVR EYLLHLQRW IDISLEEIES IDQEIKILRE RDSREASTS NSSRQERPPV

      250     260     270     280     290     300
KPFILTRNMA QAKVFGAGYP SLPTMTVSDW YEQHRKYGAL PDQGIAKAAP EEFKAAQQQ

      310     320     330
EEQEEKEEED DEQTLHRARE WDDWKDTHPR GYGNRQNMG

```

Abb. 3.7

Vergleich der translatierten cDNA-Sequenz der Alpha 4-Prey-Plasmide und der Aminosäuresequenz von Alpha 4 in der NCBI-Datenbank. Dargestellt ist die vollständige Aminosäuresequenz von Alpha 4. Rot unterlegt ist die Sequenz, die in den Prey-Plasmiden der sechs positiven Yeast Two-Hybrid-Klone identifiziert werden konnte. Alpha 4 ist, da es in sechs unabhängigen Klonen identifiziert werden konnte und eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen nachgewiesen ist, ein sehr interessanter Kandidat für eine Interaktion mit EpIC. Wie aus der Abbildung hervorgeht fehlen aber drei längere Peptidsequenzen in den Prey Proteinen. Dies war ausschlaggebend dafür, das Alpha 4 bei der Verifizierung der Protein-Protein Interaktionen im humanen Zellsystem nicht berücksichtigt wurde.

Zur Verifizierung der Interaktion zwischen den identifizierten Proteinen und der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM in Hefezellen wurde anschließend die Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes mit Hilfe eines β -Galactosidase Filter Assays untersucht.

3.2.5 β -Galactosidase Filter Assay (*Breeden & Nasmyth, 1985*) zur Verifizierung von Yeast Two-Hybrid-Interaktionen

Wie bereits erwähnt, trägt der verwendete Hefestamm AH109 das Reporter-Gen *lacZ*, welches für eine β -Galactosidase kodiert und dessen Expression durch Zugabe des Substrates X-Gal nachgewiesen werden kann. Anhand einer Blaufärbung der Hefekolonien ist es möglich die Aktivität des *lacZ*-Promotors sichtbar zu machen. Die Klone, die bereits in Abb. 3.6 einen prototrophen Phänotyp für Adenin und Histidin aufweisen und deren Prey-Peptid einer homologen Aminosäuresequenz in der Datenbank zugeordnet werden konnte, sind auf die Aktivität ihres *lacZ*-Promotors getestet worden (Abb. 3.8). Die Ergebnisse des β -Galactosidase Filter Assay sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Es konnte für elf der 16 identifizierten Preys eine Expression des *lacZ*-Reportergenes nachgewiesen werden.

Bei Cyclophilin A konnte für keinen der fünf Klone eine Expression des *lacZ*-Reportergenes nachgewiesen werden. In Abb. 3.4 sind die drei unterschiedlichen cis-aktivierenden Transkriptions- (UAS) und Minimal-Promotorelemente der *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*-Reportergene dargestellt. Es ist vorstellbar, dass die Bindung des GAL4-Proteins an die MEL1 UAS des *lacZ*-Genes aufgrund der Anwesenheit der CyA-cDNA nicht möglich ist und dadurch die Aktivierung des *lacZ*-Promotors verhindert wird. Eine Aktivierung des *lacZ*-Genes ist als ein weiteres Indiz dafür zu werten, dass es zu einer Interaktion zwischen EpIC und dem Prey Protein kommt. Es handelt sich bei dem β -Galactosidase Filter Assay allerdings um einen qualitativen Test, der nicht ausreicht eine unter Selektion auf Adenin und Histidin beobachtete Protein-Protein-Interaktion zu verwerfen.

β -Galactosidase-Expression

positiv	positiv & negativ	negativ
Alpha4, FHL2, MGC11349, MUPP1, ch-TOG, Rab5 interacting protein, PCNA, HNRPDL, Ring finger protein, DnaJ-Homolog, N-Glycanase 1	Filamin 1, CAPER	Cyclophilin A, CGI-128, ASF1 B, Galectin-1

Tab. 3.2

Zusammenfassung der Ergebnisse des β -Galactosidase Filter Assays. Aufgeführt sind Prey-Proteine, die bei einer Kotransformation mit dem Bait-Protein im Hefestamm AH109 den Promotor für das *lacZ*-Reportergen aktivierten (positiv) bzw. nicht aktivierten (negativ). Für die Preys Filamin 1 und CAPER war das *lacZ*-Gen jeweils in einem Klon aktiv und im zweiten inaktiv.

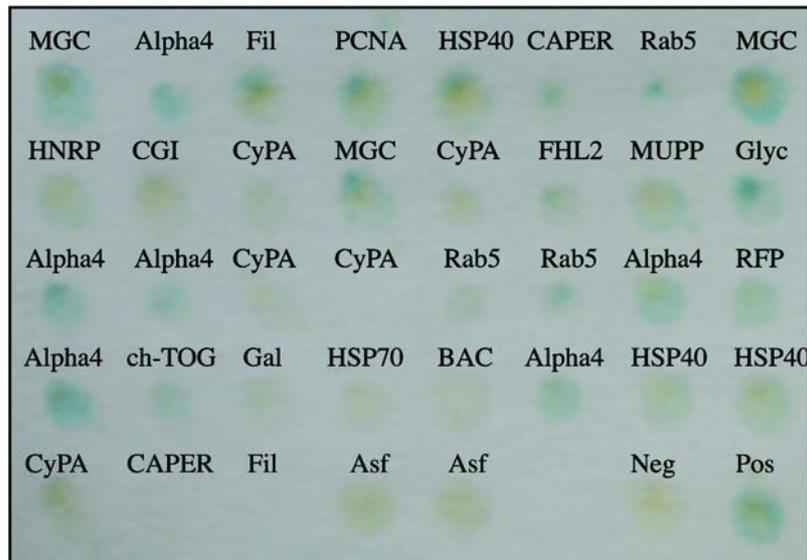


Abb. 3.8

Qualitativer Nachweis einer Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes in den analysierten Yeast Two-Hybrid Klonen. Die Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes führt zu einer Expression der β -Galactosidase und kann mit Hilfe eines β -Galactosidase Filter Assay visualisiert werden. Durch die Umsetzung des Substrates X-Gal kommt es zu einer Blaufärbung der Hefekolonien. Die Hefezellen proliferierten 4 Tage auf SD/-Trp/-Leu-Agarplatten und wurden nach der Lyse 5 h mit dem X-Gal-Farbstoff inkubiert. Als Kontrollen wurden Hefe-Zellen verwendet, die mit pGADT7-RecT/pGBKT7-53 (positiv) bzw. pGADT7-RecT/pGBKT7-Lam (negativ) transformiert waren.

Für die Klone für Filamin 1 (Fil) und CAPER konnte jeweils für einen Klon eine Aktivität des *lacZ*-Promotors und für einen weiteren, identischen Klon keine Expression der β -Galactosidase nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.8). Diese Beobachtung belegt das ein inaktiver *lacZ*-Promotor kein Beweis dafür ist, das keine Interaktion zwischen dem Prey- und dem Bait-Protein stattfindet.

Die bisherigen Ergebnisse über potenzielle Interaktionspartner von EpIC wurden ausschließlich über eine Überexpression der beteiligten Proteine in Hefezellen erbracht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde aus diesem Grund untersucht, ob sich die Protein-Protein-Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation aus humanen Zellen reproduzieren lassen.

3.2.6 Ko-Immunpräzipitation von FHL2 oder Cyclophilin A und EpCAM

Wie bereits erwähnt, war ein Ziel der Arbeit ein Protein zu identifizieren, welches mit der intrazellulären Domäne von EpCAM interagiert und auf diese Weise die Signaltransduktion des Rezeptors in den Nukleus vermittelt. Die Proteine Alpha 4 ($\alpha 4$), Cyclophilin A (CyA) und FHL2 konnten mittels des durchgeführten Yeast Two-Hybrid Screenings als potenzielle Interaktionspartner von EpCAM identifiziert werden und sind in der Literatur bereits als Signaltransduktionsmoleküle beschrieben. Außerdem sind die genannten Proteine aufgrund ihrer Lokalisation im Zytoplasma der Zelle in der Lage mit einem membranständigen Rezeptor zu interagieren.

Die kodierenden cDNA-Sequenzen der Prey-Plasmide von $\alpha 4$ konnten dem C-terminalen Anteil von $\alpha 4$ (Aminosäure 198 bis 339) zugeordnet werden. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes fehlten den Prey-Peptiden drei längere Aminosäure-Sequenzen (AS 201-215, AS 221-234 und AS 295-313) (s. Abb. 3.7). Dagegen kodierten die Prey-Plasmide von CyA und FHL2 für die vollständige Aminosäuresequenz der beiden Proteine und die Sequenzen stimmten zu 100% mit den Aminosäuresequenzen in der NCBI-Datenbank überein. Aus diesen Gründen beschränkte sich die weitere Analyse der Protein-Protein-Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitation auf CyA und FHL2.

Da keine spezifischen Antikörper gegen CyA und FHL2 verfügbar waren und der pACT2-Vektor als Expressionsplasmid die Proteine nicht als Fusion mit einem Peptid-Tag exprimiert, war die Klonierung der entsprechenden cDNAs in ein geeignetes Plasmid notwendig. Im Folgenden wurde deshalb die Gene für CyA und FHL2 in einen modifizierten pGADT7-Prey-Vektor kloniert. Dieser Vektor exprimiert das Insert unter der Kontrolle eines T7-Promoters mit einer C-terminalen HA-Markierung. Die Modifikation des verwendeten Vektors gegenüber dem originalen pGADT7 besteht darin, das er eine Rekombinationskassette enthält, die eine Klonierung mittels Rekombinatorial Cloning (GATEWAY[®]) ermöglicht. Als Templates für die cDNA-Synthese von FHL2 wurde der Klon IRAKp961N1348Q und von CyA der Klon IRALp962K104Q (bezogen vom RZPD) verwendet. Die cDNAs von FHL2 und CyA wurden nach einer PCR mittels Rekombinatorial Cloning zuerst in den Entry Vektor pDONR207 und anschließend in den modifizierten Prey Vektor pGADT7 kloniert. Die korrekte Klonierung der cDNAs wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Die Ko-Immünpräzipitation erfolgte aus HeLa-Zellen, die transient mit dem FHL2 bzw. CyA Prey- und dem EpCAM Bait-Vektor kotransfiziert waren. Die Zellen wurden anschließend mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert, die die T7 RNA Polymerase exprimieren. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden Vaccinia-infizierte HeLa-Zellen mit dem T7-responsiven pTIT-GFP transfiziert und die Expression von GFP (green fluorescent protein) unter UV-Licht nachgewiesen (siehe Abb. 3.9).

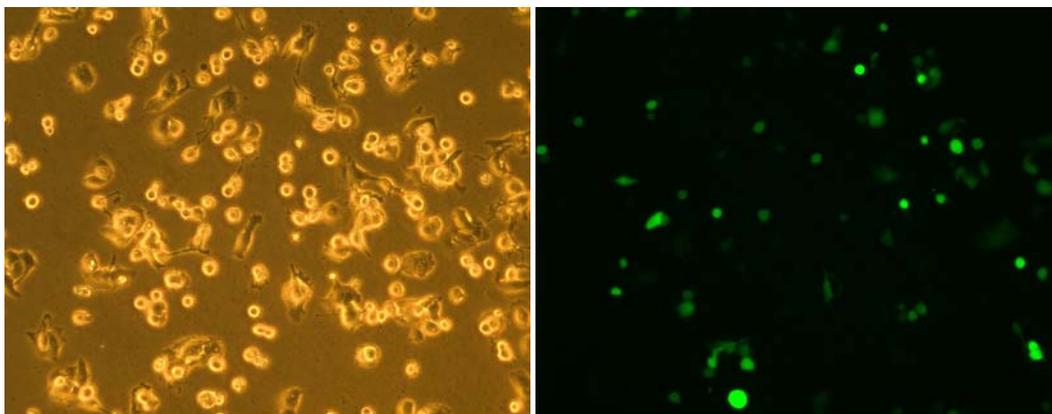


Abb. 3.9

Transfektion von Vaccinia-infizierten HeLa-Zellen mit GFP. Gezeigt sind mit Vaccinia-Viren infizierte HeLa-Zellen 24 h nach der Transfektion mit pTIT-GFP (lichtmikroskopische Aufnahmen links unter Normal- und rechts unter UV-Licht).

Die Expression von EpCAM und FHL2 in den kotransfizierten HeLa-Zellen wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtzelllysate und dem anschließenden Transfer auf Nitrocellulose-Membranen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (anti-EpCAM HO-3 und anti-HA Klon 3F10) nachgewiesen (siehe Abb. 3.10). FHL2 und EpCAM wurden über die jeweils spezifischen Antikörper, die auf Protein G-Sepharose immobilisiert waren, aus den HeLa-Gesamtzelllysaten immunpräzipitiert, die Präzipitate elektrophoretisch aufgetrennt und angereichertes FHL2 bzw. EpCAM mit dem jeweils spezifischen Antikörper (anti-HA bzw. HO3) nachgewiesen. Die Membranen mit den immobilisierten FHL2- bzw. EpCAM-Immünpräzipitaten wurden anschließend mit dem anti-EpCAM- bzw. anti-HA-Antikörper inkubiert. Auf diese Weise konnte nach einer Immünpräzipitation von FHL2 bzw. EpCAM die Ko-Immünpräzipitation des jeweiligen potenziellen Interaktionspartners nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Die Ko-Immünpräzipitation von

EpCAM und FHL2 konnte nach einer Lyse der Zellen mit 50 mM Oktylglucosid oder 0,5 % Triton nachgewiesen werden.

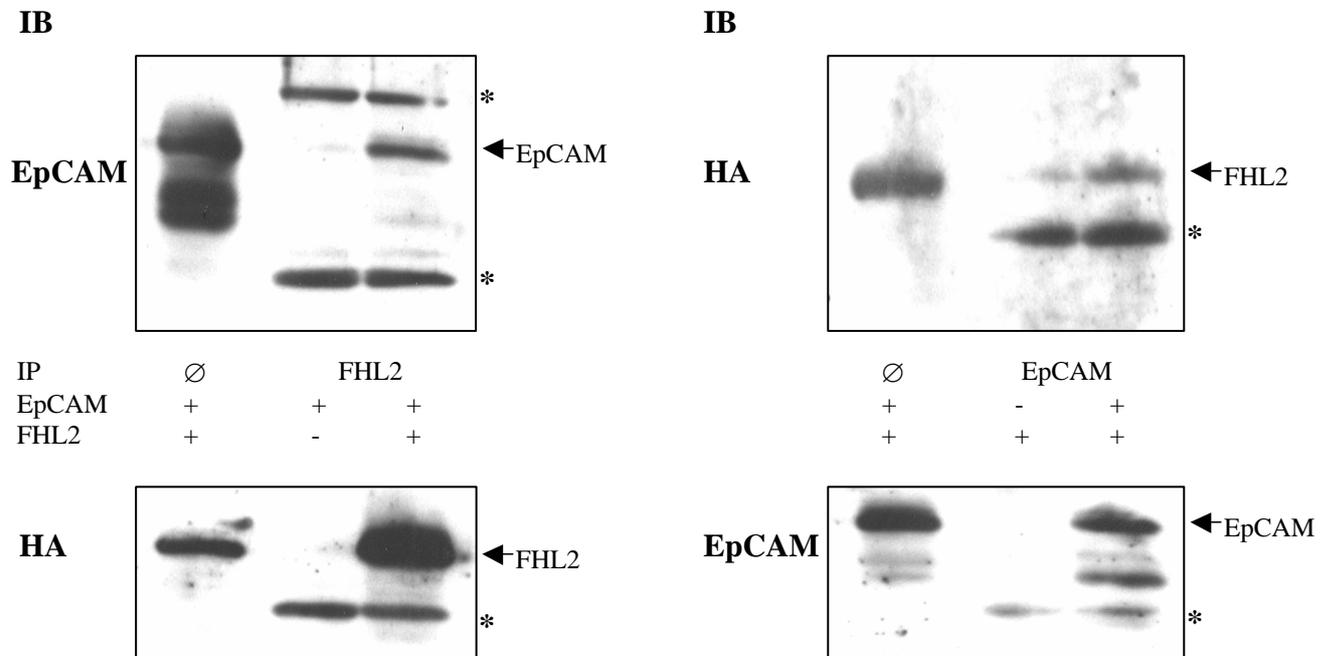


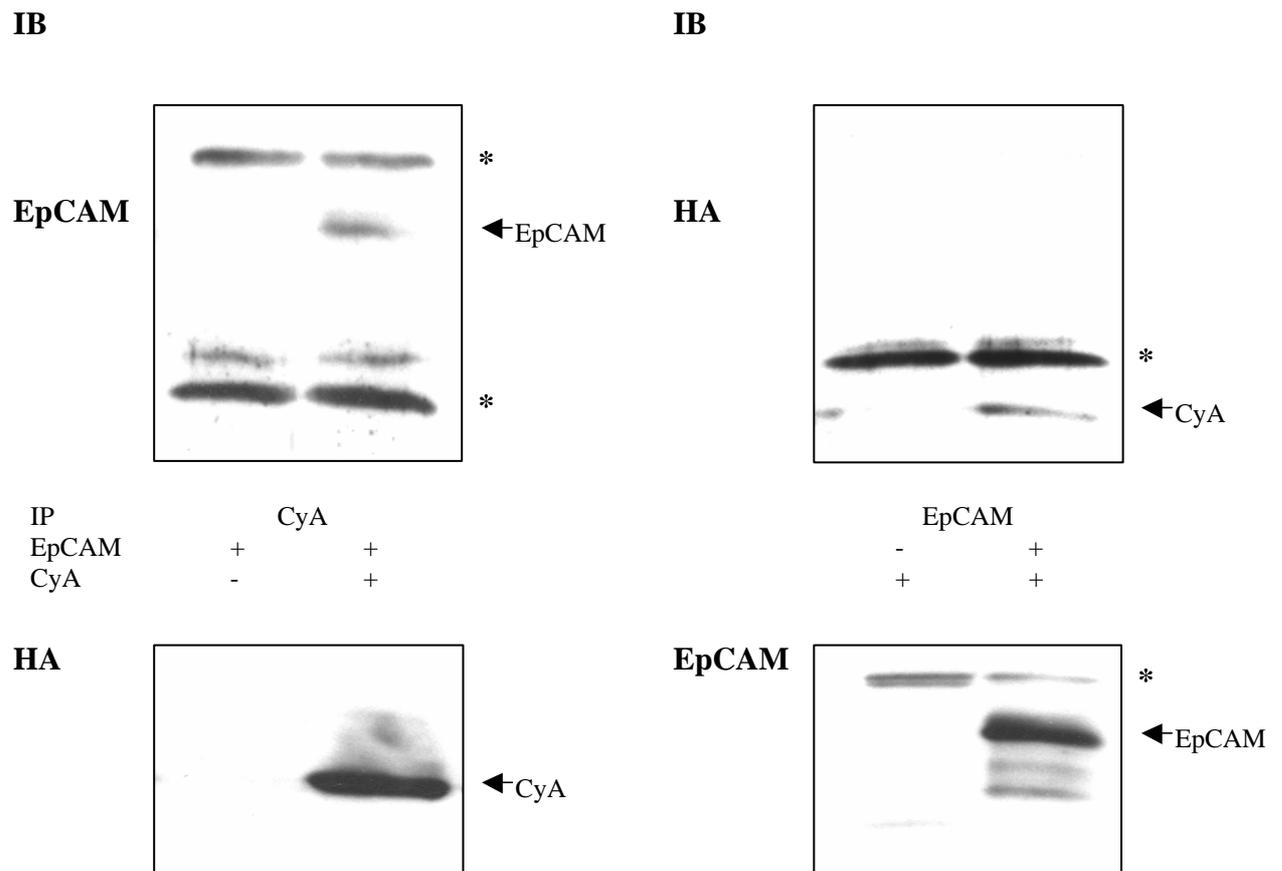
Abb. 3.10

Ko-Immünpräzipitation von FHL2 und EpCAM aus HeLa-Zellen. Die beteiligten Proteine wurden durch eine transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit pcDNA3.1-EpCAM und pGADT7-FHL2 überexprimiert. Die Immunpräzipitation (IP) von EpCAM und FHL2 erfolgte mit dem α -EpCAM-Antikörper HO-3 bzw. mit einem monoklonalen α -HA Antikörper. Eine Ko-Immünpräzipitation von EpCAM erfolgte nach der IP von FHL2 (links). Nach einer IP von EpCAM konnte in den Präzipitaten eine signifikante Anreicherung von FHL2 nachgewiesen werden (rechts). Als sekundäre Antikörper wurden POX-konjugierte α -Ratte bzw. α -Maus IgGs verwendet (mit * markiert sind die leichte bzw. schwere Kette des verwendeten Antikörpers).

Die Analyse der Interaktion zwischen EpCAM und CyA wurde wie für EpCAM und FHL2 beschrieben durchgeführt. Anstatt FHL2 wurde lediglich CyA in den HeLa-Zellen überexprimiert. Es zeigte sich, dass bei der Lyse der Zellen mit 25 mM Oktylglucosid unspezifische Wechselwirkungen sowohl zwischen EpCAM und den anti-HA-Protein G-Sepharose-Komplexen, als auch zwischen CyA und den anti-EpCAM-Protein G-Sepharose-Komplexen auftreten. Wurde dagegen 50 mM Oktylglucosid oder 0,5 % Triton als Lysispuffer verwendet konnte nach einer Immunpräzipitation von EpCAM bzw. CyA eine Ko-Immunpräzipitation von CyA bzw. EpCAM nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11).

Zur Kontrolle wurde jeweils der für die Immunpräzipitation verwendete Antikörper auf Protein G-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Lysaten von Zellen inkubiert, die keine Expression des zu präzipitierenden Proteins zeigten. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Anreicherung des ko-präzipitierten Proteins auf einer unspezifischen Bindung an den Antikörper oder die Protein G-Sepharose zustande kommt. Nach der Immunpräzipitation von FHL2 war in der Kontrolle ohne FHL2-Expression kein unspezifisch präzipitiertes EpCAM zu detektieren (s. Abb. 3.10 linke Seite). Die Kontrolle der Ko-Immunpräzipitation von FHL2 nach einer Immunpräzipitation von EpCAM war bei Verwendung von 0,5 % Triton als Lysispuffer schwach positiv (s. Abb. 3.10 rechte Seite). Allerdings konnte eine signifikante Anreicherung von FHL2 nach einer Immunpräzipitation von EpCAM nachgewiesen werden. Dabei war es möglich die Anreicherung von FHL2 nach einer Lyse der Zellen mit 0,5 % Triton bzw. mit 50 mM Oktylglucosid zu reproduzieren. Die jeweiligen Kontrollen für die Ko-Immunpräzipitation von EpCAM bzw. CyA waren negativ (s. Abb. 3.11 rechte bzw. linke Seite).

Im weiteren Verlauf der Arbeit erschien es interessant die Domänen von FHL2 zu bestimmen, die für eine Interaktion mit EpCAM verantwortlich sind. Dazu wurden sog. „Pull down“-Experimente mit GST-Fusionsproteinen von FHL2-Mutanten unterschiedlicher Länge durchgeführt.

**Abb. 3.11**

Ko-Immunpräzipitation von CyA und EpCAM aus HeLa-Zellen. CyA und EpCAM wurden transient in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Immunpräzipitation (IP) von EpCAM und CyA erfolgte mit dem α -EpCAM-Antikörper HO-3 bzw. mit einem monoklonalen α -HA Antikörper. Eine Ko-Immunpräzipitation von EpCAM erfolgte durch eine IP von CyA (links). Nach einer IP von EpCAM konnte in den Präzipitaten CyA nachgewiesen werden (rechts). Als sekundäre Antikörper wurden POX-konjugierte α -Ratte bzw. α -Maus IgG-Antikörper verwendet (mit * markiert sind die leichte bzw. schwere Kette des verwendeten Antikörpers).

3.2.7 „Pull down“-Assays mit rekombinanten FHL2-GST-Konstrukten

Nachdem für FHL2 eine Interaktion mit EpCAM in Hefen und in humanen Karzinom-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend untersucht, welche Domänen von FHL2 für diese Interaktion notwendig sind. FHL2 setzt sich zusammen aus einer N-terminalen halben „LIM zinc binding“-Domäne und vier weiteren „LIM zinc-binding“-Domänen (s. Abb. 3.12).

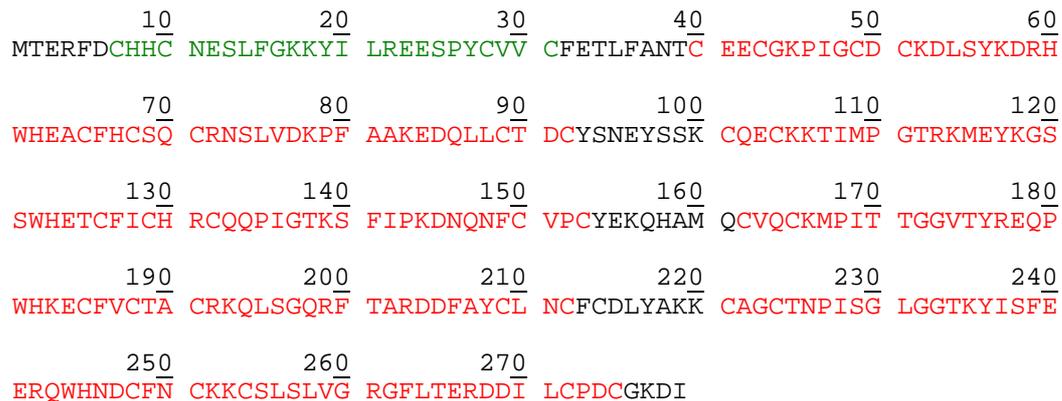


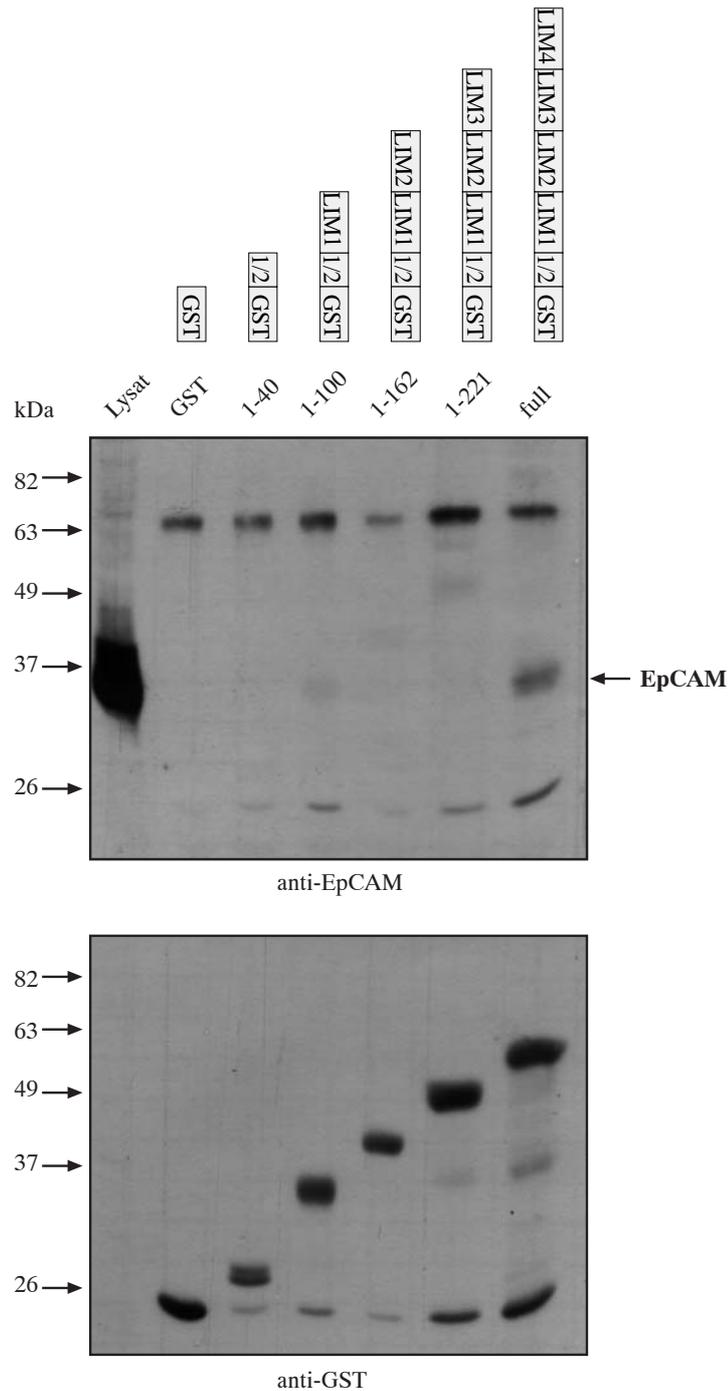
Abb. 3.12

Domänenstruktur von FHL2. Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur von FHL2, die sich zusammensetzt aus einer halben „LIM zinc binding“-Domäne am N-Terminus (grün markiert) und vier „LIM zinc-binding“-Domänen (rot markiert).

Für die Analyse der Bindung an EpCAM wurden Konstrukte von FHL2 verwendet, die beginnend am C-Terminus jeweils um eine LIM-Domäne deletiert wurden. Zusätzlich waren die Konstrukte am N-Terminus mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Die Fusion mit dem GST-Peptid ermöglichte die Aufreinigung der zuvor in *E.coli*-Bakterien des Stammes BL21 überexprimierten Konstrukte über eine Immobilisierung an Glutathion Sepharose-Kügelchen. Die auf diese Weise aufgereinigten, rekombinanten GST-FHL2-Fusionsproteine wurden anschließend durch eine Inkubation mit Gesamtzellysaten der stark EpCAM-positiven Karzinomzelllinie FaDu auf ihre Fähigkeit EpCAM zu binden getestet. Die Analyse der Bindung von EpCAM an die verschiedenen GST-FHL2-Konstrukte erfolgte mittels eines Immunoblots gegen EpCAM (HO-3 α -EpCAM Antikörper). Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an rekombinanten GST-FHL2-Konstrukten wurde die

gleiche Membran mit einem monoklonalen α -GST Antikörper (1 : 5000-Verdünnung) inkubiert und mit einem Peroxidase-gekoppeltem α -Maus Antikörper detektiert.

Es zeigte sich, dass ein „Pull down“ von EpCAM nur mit der vollständigen Variante von FHL2 möglich ist (s. Abb. 3.13). Bereits die Deletion der LIM4-Domäne verhindert eine Bindung von FHL2 an EpCAM. Dies bedeutet, dass die LIM4-Domäne von FHL2 für eine Interaktion mit EpCAM notwendig ist.

**Abb. 3.13**

„Pull-down“ von EpCAM mit FHL2-GST-Fusionsproteinen. Schematisch dargestellt ist das GST-FHL2-Fusionsprotein. Die „Pull-down“ Experimente wurden mit FHL2 bzw. deletierten Formen dieses Proteins durchgeführt. Die deletierten Formen von FHL2 wurden schrittweise beim C-Terminus beginnend jeweils um eine LIM-Domäne verkürzt. In der Abbildung ist ein Immunoblot gegen EpCAM dargestellt, nachdem die Lysate von FaDu-Zellen mit aufgereinigten GST-Fusionen von FHL2 bzw. verkürzten Formen von FHL2 inkubiert wurden. EpCAM konnte lediglich bei einem „Pull-down“ mit der „full-length“-Version von FHL2 detektiert werden. Zur Kontrolle wurden die rekombinanten FHL2-Konstrukte unterschiedlicher Länge mit einem Immunoblot gegen den N-terminalen GST-Tag nachgewiesen. Zur Kontrolle des Inputs an EpCAM ist zusätzlich 10 % des eingesetzten Gesamtzelllysates aufgetragen (Spur 1).

4. Diskussion

4.1 Verändertes Transkriptom in humanen Nieren- bzw. Karzinomzellen durch die Expression von EpCAM

Eine Über- bzw. *de novo*-Expression des transmembranen Adhäsionsmolekül EpCAM ist in zahlreichen humanen Epithelien mit der Karzinogenese assoziiert (Balzar et al., 1999). Eine aktive Beteiligung von EpCAM an Prozessen der Karzinogenese wurde *in vitro* untersucht. Es konnte in humanen Nierenzellen und Fibroblasten der Maus gezeigt werden, dass EpCAM in der Lage ist eine Überexpression des Proto-Onkogens c-myc und der Cycline A und E zu induzieren (Münz et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EpCAM in HEK293-Zellen die Transkriptionsrate von Egr-1, CaM I und RhoB verändert. Die mRNA-Synthese des Transkriptionsfaktors Egr-1 wird reprimiert. Die Transkription der Gene von CaM I, einer Calcium-abhängigen Kinase, und von RhoB wird dagegen induziert. Die bereits in Run On-Experimenten beobachteten Effekte einer EpCAM-Expression auf die Transkriptionsrate von CDC28 Protein Kinase 1, RFC 37, CD59 und 14-3-3 sigma konnten nicht bestätigt werden (Quelle: Doktorarbeit Münz M.).

Egr-1 (early growth response-1) ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, dessen Biosynthese über mitogene Stimulation induziert wird (Sukhatme et al., 1988). Die biologische Funktion von Egr-1 während der Karzinogenese ist umstritten. Eine Überexpression von Egr-1 konnte in humanen Prostata-Karzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet werden (Eid et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen die Entwicklung von Prostata-Karzinomen signifikant reduziert war, wenn Egr-1 nicht vorhanden war (Abdulkadir et al., 2001). Neben den Wachstums- und Proliferationsvermittelnden Eigenschaften, die eine Karzinogenese positiv beeinflussen können, werden für Egr-1 auch pro-apoptische Eigenschaften diskutiert (Liu et al., 1998). In Melanomzellen beispielsweise induziert Egr-1 direkt die Transkription des p53 Tumorsuppressor-Genes (Nair et al., 1997). Da

eine Überexpression von p53 Apoptose induziert, kann Egr-1 über eine Stimulation der p53-Synthese pro-apoptisch wirken. Darüberhinaus induzieren Apoptose-fördernde Agenzien eine Überexpression von Egr-1. In diesem Zusammenhang konnte über eine Inhibition der Egr-1-Expression die essentielle pro-apoptische Funktion von Egr-1 nachgewiesen werden (Ahmed et al., 1996). Die EpCAM-induzierte Repression der Egr-1-Transkription könnte somit zu der erhöhten Proliferation der humanen Nierenzellen beitragen.

Rho B gehört zur Familie der Rho-Proteine (**ras homolog B**), deren strukturelles Kennzeichen eine GTPase-Domäne vom Rho-Typ ist. Alle Rho-Proteine besitzen eine hohe Affinität für die Bindung von GTP und GDP. Funktionell aktiv sind die Proteine der Rho-Familie in einem GTP-gebundenen und inaktiv in einem GDP-gebundenen Zustand. Zusätzlich kann RhoB am C-Terminus durch verschiedene Isoprenoidlipide posttranslational modifiziert werden. Diese Modifikationen tragen dazu bei, dass RhoB in der Zelle mit der Plasmamembran und endomembranen Vesikeln assoziiert ist (Krister & Channing, 2004). Die Synthese der RhoB-mRNA und des Proteins werden durch Wachstumsfaktoren während der G1- und der S-Phase des Zellzyklus induziert (Zalzman et al., 1995). Dies deutet auf eine Rolle von RhoB in der Zell-Proliferation hin. Im Gegensatz zu RhoA und RhoC scheint RhoB einen inhibitorischen Effekt auf die Zell-Proliferation zu haben. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteins in invasiven Kopf-Hals-Karzinomen supprimiert ist (Adnane et al., 2002). Desweiteren konnte man bei gesunden RhoB-defizienten Mäusen eine verstärkte Karzinogen-induzierte Entwicklung von Haut-Tumoren beobachten (Liu et al., 2001). Allerdings ist die Rolle von RhoB in der Zell-Proliferation abhängig vom Zelltyp. So ist es möglich durch konstitutiv aktiviertes RhoB Fibroblasten der Maus zu transformieren (Prendergast et al., 1995; Wang et al., 2003). Ebenso könnte die beobachtete Überexpression von RhoB in den HEK293-Zellen, die durch die Expression von EpCAM hervorgerufen wird, zur Transformation und die damit einhergehende erhöhte Proliferation der Zellen beitragen.

Für Calmodulin I (CaM I) konnte zusätzlich zur Induktion durch EpCAM in HEK293-Zellen eine Korrelation der mRNA-Synthese mit der endogenen EpCAM-Expression in Karzinom-Zelllinien nachgewiesen werden. Calmodulin I ist ein

intrazellulärer Calcium-Rezeptor, der ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Die Bindung von Calcium verursacht Konformationsänderungen, die es ermöglichen, dass Calmodulin die Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin und die Ca^{2+} /CaM-abhängigen Protein-Kinasen I und II (CaMKI, CaMKII) und MLCK (**m**yo**s**in **l**ight **c**hain **k**inase) aktiviert. Beide Typen von Enzymen sind in eukaryotischen Zellen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Phänotypisch äußert sich eine CaM-Überexpression in eukaryotischen Zellen in einer Beschleunigung der Zellproliferation (Rasmussen et al., 1987). Darüberhinaus bedingt eine Transformation von eukaryotischen Zellen ein erhöhtes Level an CaM (Chafouleas et al., 1981).

Auf molekularer Ebene regulieren die Ca^{2+} /CaM-abhängige Phosphatase Calcineurin und die CaMK den Zellzyklus und damit die Proliferationsrate der Zellen, indem sie neben der Transkription und Translation von Cyclin D1 auch die Transkription und Aktivität von Cdk4 in der G_1 -Phase des Zellzyklus beeinflussen. Eine Hemmung von Calcineurin bzw. der CaMK führt zu einem Arrest der Zellen in der G_1 -Phase. Die CaMKII beeinflusst darüberhinaus die Aktivität von Cdc 2 und reguliert auf diese Weise den G_2 /M-Übergang der Zellen (Kahl & Means, 2003). MLCK ist an der Regulation der Zellmigration, der Mitose, der Zytoskelett-Dynamik und der Sekretion beteiligt (Means et al., 1991).

Die Stimulation der Zellproliferation durch Ca^{2+} /CaM und die beobachtete Korrelation zwischen der CaM I-Transkription und der Oberflächenexpression von EpCAM in Tumorzellen deuten darauf hin, dass die erhöhte Proliferationsrate, die in EpCAM-exprimierenden Zellen zu beobachten ist, u.a. über Ca^{2+} /CaM-abhängige Signalwege vermittelt werden (Münz et al., 2004).

4.2 Potenzielle Interaktionspartner von EpCAM

Durch eine veränderte Transkription der Gene von Egr-1, RhoB und CaM I war es auf molekularer Ebene möglich einen Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen, die bei einer deregulierten Expression von EpCAM beobachtet werden können, und Veränderungen im Expressionsmuster der Zellen, die ursächlich für den transformierten Phänotyp sind, herzustellen. Um herauszufinden, welche Signalwege an einer Signalübertragung von dem Rezeptor in den Zellkern beteiligt

sind und u.a. die Transkription von c-myc induzieren, war es notwendig Interaktionspartner von EpCAM zu identifizieren. Durch ein Two-Hybrid Screening in Hefen konnten für die kurze, zytoplasmatische Domäne von EpCAM (26 Aminosäuren) 17 Proteine identifiziert werden, die als potenzielle Interaktionspartner in Frage kommen (s. Tab. 3.1). Die identifizierten Proteine sind hinsichtlich ihrer Funktion und ihrer Lokalisation in der Zelle sehr heterogen.

Bei Alpha 4 ($\alpha 4$), das auch unter IGBP1 (immunoglobulin (CD79a) binding protein) bekannt ist, handelt es sich um ein 45 kDa-Phosphoprotein. Es wurde ursprünglich in B-Zellen identifiziert, wo es mit dem B-Zellrezeptor Komplex assoziiert ist und bei einer Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert wird (Inui et al., 1995). Die Expression von humanem $\alpha 4$ beschränkt sich nicht nur auf Immunzellen, sondern konnte auch in nicht-lymphoiden Geweben nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde eine starke Expression von $\alpha 4$ in Geweben des Herzens, der Skelettmuskulatur und der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen. Weniger stark exprimiert ist $\alpha 4$ dagegen in Zellen des Gehirns, der Plazenta, der Lunge, der Leber und der Niere (Onda et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass humanes $\alpha 4$ konstitutiv mit den katalytischen Untereinheiten der Proteinphosphatasen 2A, 4 und 6 assoziiert ist (Chen et al., 1998). Die Aminosäuresequenz von $\alpha 4$ ist zu 37 % homolog zu dem *S.cerevisiae*-Protein Tap42. Von Tap42 ist bekannt, dass es mit der katalytischen Untereinheit von PP2A und Sit4 (Hefe-Homolog von PP6) assoziiert ist (Di Como et al., 1996). Diese Assoziation ist unabhängig vom Zellzyklus, wird durch Wachstumssignale reguliert und ist sensitiv gegenüber dem Immunsuppressor Rapamycin (Di Como et al., 1996). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Tap42 an dem Rapamycin-sensitiven Tor-Signalweg beteiligt ist. Dieser Signalweg wird durch Tor-Proteine vermittelt. Das eukaryotische Homolog zu den Tor-Proteinen ist FRAP/RAFT1. Dieses Protein vermittelt in eukaryotischen Zellen die Transduktion von mitogenen Signalen in den Zellkern (Brown & Schreiber, 1996). Aufgrund der Homologie zum Tor-Signalweg in Hefen wird angenommen, dass $\alpha 4$ an dem ebenfalls Rapamycin-sensitiven FRAP-Signalweg in eukaryotischen Zellen beteiligt ist (s. Abb. 4.1).

In sechs unabhängigen Hefe-Klonen konnte $\alpha 4$ als Interaktionspartner von EpCAM identifiziert werden. Allerdings war bei sämtlichen Klonen die Aminosäuresequenz

von $\alpha 4$ nicht vollständig. Es fehlten neben dem N-terminalen Bereich von Aminosäure 1 – 197 auch drei längere Sequenzen im C-terminalen Bereich (Aminosäure 201 – 215, 221 – 234 und 295 – 313). Da aber für $\alpha 4$ bereits eine Beteiligung an der vom B-Zellrezeptor vermittelten Signaltransduktion, die zu einer Proliferation der B-Zellen führt, nachgewiesen werden konnte

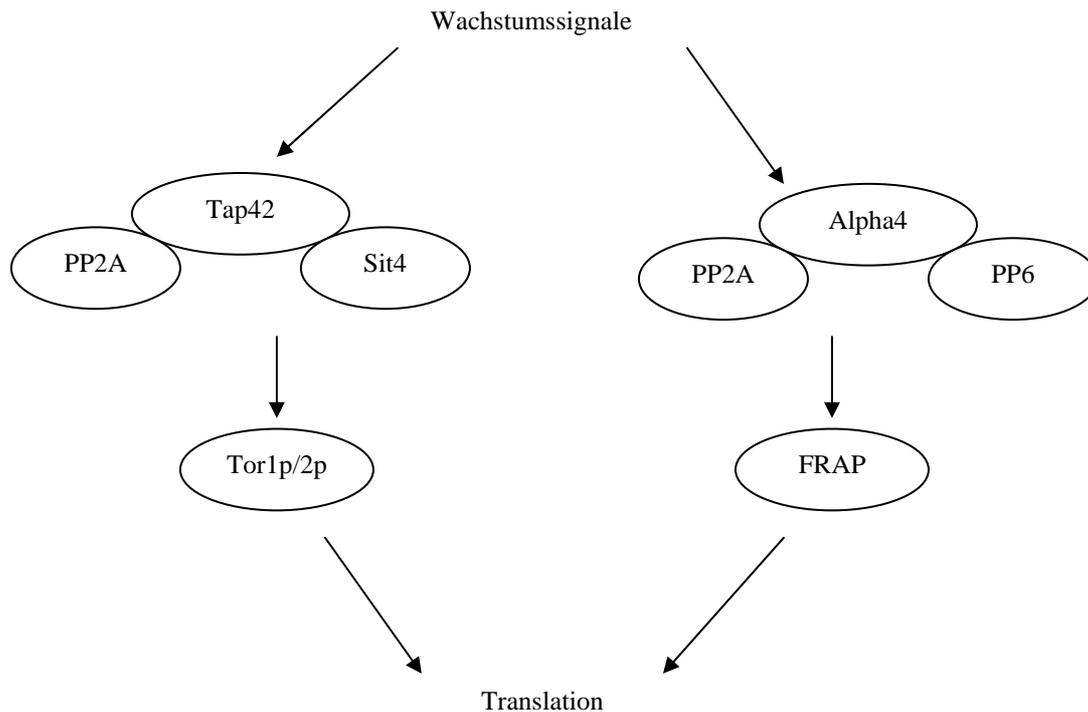


Abb. 4.1

Homologien des Tor-Signalweges (*S.cerevisiae*) mit dem eukaryotischen FRAP-Signalweg. Die Assoziation von Tap42 mit der Phosphatase 2A und Sit4 wird über Wachstumssignale reguliert und vermittelt über Tor1p und Tor2p in Hefen die Translation von Zielgenen (links). Die Aminosäuresequenz von Alpha 4 ist zu 37 % homolog zu Tap42 und könnte über den eukaryotischen FRAP-Signalweg Wachstumssignale in den Kern vermitteln (rechts).

und eine Beteiligung am FRAP-Signalweg diskutiert wird, würde eine Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM sinnvoll erscheinen. Um den Nachweis für eine tatsächliche Interaktion zu erbringen wäre es notwendig, die Assoziation von $\alpha 4$ und EpCAM in humanen Zellen mittels Ko-Immunopräzipitationen zu validieren.

Ein weiterer interessanter Kandidat, der als potenzieller Bindungspartner von EpCAM identifiziert werden konnte, ist Filamin A. Die Aminosäuresequenz, die sich aus der Translation der Prey-cDNAs der zwei unabhängigen Hefe-Klone ergab, stimmte zu 100 % mit dem C-terminalen Bereich von Filamin A überein. Die Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes konnte in einem der beiden Klone qualitativ nachgewiesen werden.

Filamin A gehört zur Familie der Filamine, deren drei Isoformen A, B und C eine Sequenzhomologie von 60 – 80 % aufweisen (Stossel et al., 2001). Funktionell sind Filamine große Actin-bindende Proteine, die in der Lage sind dreidimensionale Netzwerke von Actinfilamenten zu stabilisieren und sie mit der Zellmembran zu verknüpfen. Strukturell kennzeichnend für Filamine sind die N-terminale Actin-bindende Domäne und eine lange Stäbchen-ähnliche Domäne mit 24 Wiederholungen von anti-parallelen β -Faltblättern. Die Assoziation von Filaminen mit der Membran wird über eine direkte Bindung der C-terminalen β -Faltblatt-Wiederholungen mit Transmembran-Proteinen, wie beispielsweise β -Integrinen, vermittelt (Calderwood et al., 2000). Die Interaktion mit Integrinen oder Integrin Ko-Rezeptoren rekrutiert Filamine zu Zell-Matrix Adhäsionsstellen (Zamir et al., 2001; Nikki et al., 2002). Eine Rolle von Filamin A in der Signaltransduktion suggerieren zahlreiche weitere Interaktionen mit unterschiedlichen Liganden (Feng & Walsh, 2004). Beispielsweise reguliert Filamin A die Aktivität von Rho-GTPasen über eine Interaktion mit diesen Molekülen (Ohta et al., 1999). Ebenso ist bekannt, dass die Funktion von Filaminen durch unterschiedliche Signale verändert werden kann. So führt eine Phosphorylierung von Filamin durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II zu einer reduzierten Bindungsaffinität für Actin (Ohno et al., 1990).

Die bekannten Interaktionen von Filamin A mit transmembranen Rezeptoren und die mehrfach in der Literatur beschriebene Fähigkeit von Filamin A, die zytoplasmatische Signalweiterleitung zu beeinflussen, lassen dieses Protein als einen relevanten Interaktionspartner von EpCAM erscheinen.

Die Analyse von drei Prey-Plasmiden ergab eine Aminosäuresequenz, die identisch ist mit dem hypothetischen Protein MGC11349. Die Untersuchung der β -Galactosidase-Aktivität der Hefeklone zeigte bei allen Klonen eine Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes. Über die Lokalisierung und die physiologische Funktion von

MGC11349 ist in der Literatur nichts beschrieben. Aus diesem Grund kann über die Möglichkeit einer Bindung von MGC11349 an die zytoplasmatische Domäne von EpCAM keine Aussage gemacht werden. Vergleichbares trifft für das ebenfalls hypothetische Protein CGI-128 zu, das in einem Klon identifiziert worden ist. Allerdings konnte für CGI-128 keine Aktivität des *lacZ*-Genes nachgewiesen werden.

Ein weiteres Protein, das mit Hilfe des Two-Hybrid Screenings als potenzieller EpCAM-Interaktionspartner identifiziert werden konnte, ist das Rab5 Interacting Protein. Das Rab5 Interacting Protein ist in humanen Geweben ubiquitär exprimiert und ist strukturell gekennzeichnet durch eine N-terminale transmembrane Domäne und zentrale coiled-coil Strukturen (Hoffenberg et al., 1999). Eine physiologische Rolle spielt das Protein bei der homotypischen Fusion von Endosomen, die es durch eine Interaktion mit der Ras-verwandten GTPase Rab5 beschleunigt und mit denen es auch assoziiert ist (Hoffenberg et al., 1999). Ein funktioneller Zusammenhang, der eine Interaktion mit EpCAM plausibel erscheinen lässt, kann mit den bisher in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des Rab5 Interacting Proteins nicht hergestellt werden.

In einem Two-Hybrid Klon war die DNA-Sequenz des Preys nach der Translation identisch mit der Aminosäuresequenz des **Multiple PDZ domain proteins 1** (MUPP1). Darüberhinaus bedingte eine Ko-Expression des MUPP1-Prey-Peptides und des Bait-Peptides eine Transkription des *lacZ*-Reportergen. Strukturell ist MUPP1 aus 13 PDZ-Domänen (**PSD-95**, **Dlg**, **ZO-1**) aufgebaut (Ulmer et al., 1998). Proteine mit PDZ-Domänen spielen als sog. „scaffolding“-Proteine eine Rolle in der Organisation bzw. Regulation von Signaltransduktions-Komplexen. Eine Interaktion von MUPP1 mit einem Serotonin_{2C} Rezeptor (5-HT_{2C} R) ist in der Literatur beschrieben, wobei die physiologische Funktion dieser Interaktion unklar ist (Parker et al., 2002). Darüberhinaus konnte für MUPP1 die Lokalisation in sog. „tight junctions“ nachgewiesen werden. MUPP1 wird dabei durch eine Bindung an den CA-Rezeptor (coxsackievirus and adenovirus receptor) in die „tight junctions“ rekrutiert (Coyne et al., 2004). Auch für EpCAM konnte eine Lokalisation in „tight junctions“ gezeigt werden (Ladwein et al., 2005). Da sowohl EpCAM als auch MUPP1 in „tight junctions“ lokalisieren, wäre eine native Interaktion der beiden Proteine in epithelialen Zellen möglich. Aufgrund der bekannten Funktion von Proteinen mit

PDZ-Domänen Signaltransduktions-Komplexe zu organisieren und zu regulieren, könnte eine Interaktion mit MUPP1 auch eine Rolle in der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion spielen.

Für die weiteren Proteine, die aufgrund der Ergebnisse des Two-Hybrid Screening potenziell dazu in der Lage sind mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM zu interagieren, ist die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen Interaktion in eukaryotischen Zellen klein. Diese Beurteilung beruht auf der Tatsache, dass für EpCAM bisher ausschließlich eine Assoziation mit der Plasmamembran beschrieben ist und daher eine Bindung an Proteine die extrazellulär, im Nukleus oder im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisieren sind, unwahrscheinlich ist. Eine reale Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM mit einem Nukleus-assoziierten Protein wäre nur durch eine intrazelluläre Spaltung von EpCAM zu realisieren. Zusätzlich müsste die zytoplasmatische EpCAM-Domäne durch die Bindung an ein Shuttle-Protein in den Zellkern transportiert werden. Zum Zeitpunkt der Arbeit war kein Antikörper gegen EpIC verfügbar. Deshalb war es nicht möglich die Lokalisation von EpIC im Nukleus humaner Zellen zu untersuchen.

Galectin-1 ist ein 14kDa Lectin, das extrazellulär an β -Galactoside in Oligosacchariden und Glykoproteinen bindet (Cho et al., 1997). Das DnaJ Homolog und die N-Glykanase 1 sind in ihrer Funktion als Chaperone im ER lokalisiert. Bei CAPER handelt es sich um einen transkriptionellen Ko-Aktivatoren der im Nukleus lokalisiert ist (Jung et al., 2002). Ausschließlich im Kern lokalisiert sind darüber hinaus das zur Modulation von Chromatinstrukturen befähigte ASF1 B, der transkriptionelle Repressor RING 1, der Replikationsfaktor PCNA, das mRNA-prozessierende HNRPDL und das Mikrotubuli-assoziierte ch-TOG.

Eine artifizielle Interaktion mit diesen Proteinen könnte in einem Two-Hybrid Screening deshalb zustande kommen, da die zytoplasmatische Domäne von EpCAM aufgrund der Fusion mit einer Kernlokalisierungssequenz, im Gegensatz zu dem nativen Protein, nach der Expression in den Zellkern der Hefen transportiert wird.

4.3 EpCAM interagiert mit Cyclophilin A in Hefen und in humanen Zellen

Ein potenzieller intrazellulärer Bindungspartner von EpCAM, der in fünf unabhängigen Hefe-Klonen identifiziert wurde, ist Cyclophilin A (CyA). Dabei konnte in allen Klonen die vollständige Aminosäuresequenz von CyA mit einer Länge von 165 Aminosäuren identifiziert werden.

Nach der ektopischen Überexpression von CyA und EpCAM in HeLa-Zellen konnte eine Assoziation der beiden Proteine in humanen Zellen validiert werden. Die Interaktion konnte durch eine Ko-Immunpräzipitation von CyA bzw. EpCAM nachgewiesen werden, nachdem Immunpräzipitate von EpCAM bzw. CyA elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Bei CyA handelt sich um ein ubiquitär verbreitetes, zytoplasmatisches Protein, das eine Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase-Aktivität aufweist (Howard et al., 2003). Mit Hilfe dieser Aktivität beeinflusst CyA die Faltung und Aktivität von Proteinen wie beispielsweise Peroxiredoxine oder CD147 (Lee et al., 2001; Yurchenko et al., 2002). Desweiteren konnte für CyA eine Rolle in der Regulation von zellulären Signalwegen nachgewiesen werden. In T-Zellen ist CyA beispielsweise an der Regulation der T-Zellrezeptor-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CyA einen stabilen Komplex mit Itk (Interleukin-2 tyrosine kinase) bildet und dadurch die Aktivität dieser Nichtrezeptor Protein Tyrosin-Kinase hemmt (Brazin et al., 2002). Außerdem konnte für CyA eine Interaktion mit dem Rezeptor-Glykoprotein CD99 nachgewiesen werden, wobei die Funktion dieser Bindung unklar ist (Kim et al., 2004). Über die Rolle von CyA in der Signaltransduktion von Zellen nicht-lymphoider Herkunft ist bis heute wenig bekannt. Allerdings suggeriert die Überexpression von CyA, die bereits u.a. in Leber-, Lungen- und Mundschleimhaut-Karzinomen beschrieben ist, eine Funktion dieses Proteins im Zusammenhang mit der Karzinogenese nicht-lymphoider Zellen (Lim et al., 2002; Campa et al., 2003; Chen et al., 2004).

4.4 EpCAM interagiert mit FHL2 in Hefen und in humanen Zellen

Ein weiteres Protein, das über ein Screening mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM in der cDNA-Bibliothek einmal als Bindungspartner identifiziert werden konnte, ist FHL2. In dem positiven Hefe-Klon konnte die vollständige Aminosäuresequenz von FHL2 (**f**our and a **h**alf **L**IM **2**) mit einer Länge von 287 Aminosäuren identifiziert werden.

Nach der Überexpression von EpCAM und einem HA-markierten Fusionsprotein von FHL2 in HeLa-Zellen konnte über Ko-Immunpräzipitationen außerdem gezeigt werden, dass die beiden Proteine auch im humanen Zellsystem unter physiologischen Bedingungen interagieren. Eine Ko-Immunpräzipitation war nachweisbar für EpCAM oder FHL2 nachdem die Immunpräzipitate von FHL2 und EpCAM gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

FHL2 wurde erstmals in Myoblasten identifiziert, die dieses Protein differenziell in gesunden Myoblasten und ihren malignen Abkömmlingen, den Rhabdomyosarkoma Zellen, exprimieren (Genini et al., 1997). Aus diesem Grund wird FHL2 auch als DRAL (**D**ownregulated in **R**habdomyosarcoma **L**IM Protein) bezeichnet. Die Struktur von FHL2 ist gekennzeichnet durch fünf LIM-Domänen (**L**IN-11, **I**SL-1, **M**EC-3), wobei die LIM-Domäne am N-Terminus nur aus der zweiten Hälfte des Konsensus-Motives besteht. Zwei Zinkfinger bilden eine LIM-Domäne und werden über hydrophobe Wechselwirkungen in einer Konfiguration zusammengehalten, die in der Abbildung 4.2 dargestellt ist.

FHL2 besitzt außer den LIM-Domänen keine weiteren bekannten funktionellen oder strukturellen Domänen und gehört daher zu der Familie der sog. LIM-only Proteine. Die wesentliche Funktion von LIM-Domänen ist die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die es FHL2 ermöglichen mit transmembranen Rezeptoren, zytosolischen Proteinen, nukleären Shuttle-Proteinen wie β -Catenin oder Transkriptionsfaktoren wie FOXO1 (**F**orkhead **b**ox class **O**), zu interagieren (Wixler et al., 2000, Stilo et al., 2002; Martin et al., 2002; Yang et al., 2005).

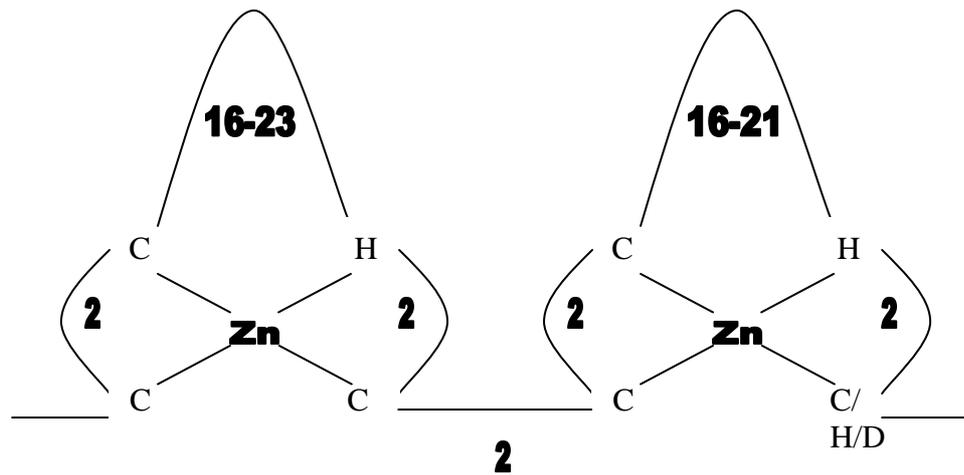


Abb. 4.2

Struktur einer LIM-Domäne. Dargestellt sind zwei Zinkfinger, die eine LIM-Domäne bilden. Im ersten Zinkfinger komplexieren drei Cysteine (C) und ein Histidin (H) und im zweiten Zinkfinger zwei Cysteine, ein Histidin und ein Cystein, Histidin oder Aspartat (D) ein Zinkatom (Zn). Die Ziffern geben die Anzahl der Aminosäurereste an (nach Bach, 2000).

Häufig wird über eine Interaktion mit FHL2 die transkriptionelle Aktivität von Zielmolekülen reguliert. Beispielsweise ist bekannt, dass FHL2 β -Catenin über eine Assoziation ko-aktiviert (Wei et al., 2003). Eine zytosolische Akkumulation von β -Catenin führt zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern. Im Zellkern bildet β -Catenin Komplexe mit DNA-bindenden Faktoren der TCF/LEF-Familie (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) und aktiviert auf diese Weise u.a. die Transkription des Proto-Onkogens c-myc (He et al., 1998). Die Überexpression von EpCAM induziert ebenfalls die Transkription des c-myc-Genes (Münz et al., 2004). Es ist daher vorstellbar, dass die Assoziation von FHL2 und EpCAM eine Funktion bei der EpCAM-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von c-myc spielt.

Darüber hinaus ist bekannt, dass FHL2 durch eine Bindung an zytosolische Untereinheiten des Integrin-Rezeptors zu Adhäsions-Komplexen rekrutiert wird (Wixler et al., 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in NIH 3T3-Zellen kleine Rho GTPasen, insbesondere RhoB, eine transkriptionelle Aktivierung von FHL2 induzieren. Außerdem transloziert FHL2 während der Karzinogenese von Prostata-Zellen in Abhängigkeit von den Rho GTPasen Signale von der Zelloberfläche in den Nukleus (Müller et al., 2002). Durch eine Analyse des Transkriptoms von EpCAM-HEK293-Transfektanten konnte im Vergleich zu EpCAM-negativen HEK293-Zellen eine erhöhte Transkription von RhoB gezeigt werden (siehe unter Punkt 4.1). Somit könnte RhoB die Signaltransduktion, die von EpCAM ausgeht und über FHL2 möglicherweise in den Zellkern transloziert, positiv

beeinflussen. FHL2 interagiert außerdem mit einer Region (AS 269-298) innerhalb einer großen hydrophilen Schleife des Rezeptorproteins Presenilin-2 (Tanahashi et al., 2000). Diese Assoziation ermöglicht FHL2 eine Translokation in den Zellkern (Kang et al., 2005). Möglicherweise werden FHL2-Moleküle durch die Interaktion mit EpCAM an die Plasmamembran rekrutiert, dadurch deren Assoziation mit Presenilin-2 und die Translokation in den Zellkern ermöglicht (siehe Abb. 4.3).

In dieser Arbeit bleibt die Frage offen, ob zur Signalweiterleitung durch FHL2 die Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne von EpCAM gelöst wird oder ob vielleicht nach einer proteolytischen Spaltung ein Komplex aus FHL2 und EpIC in den Nukleus transloziert.

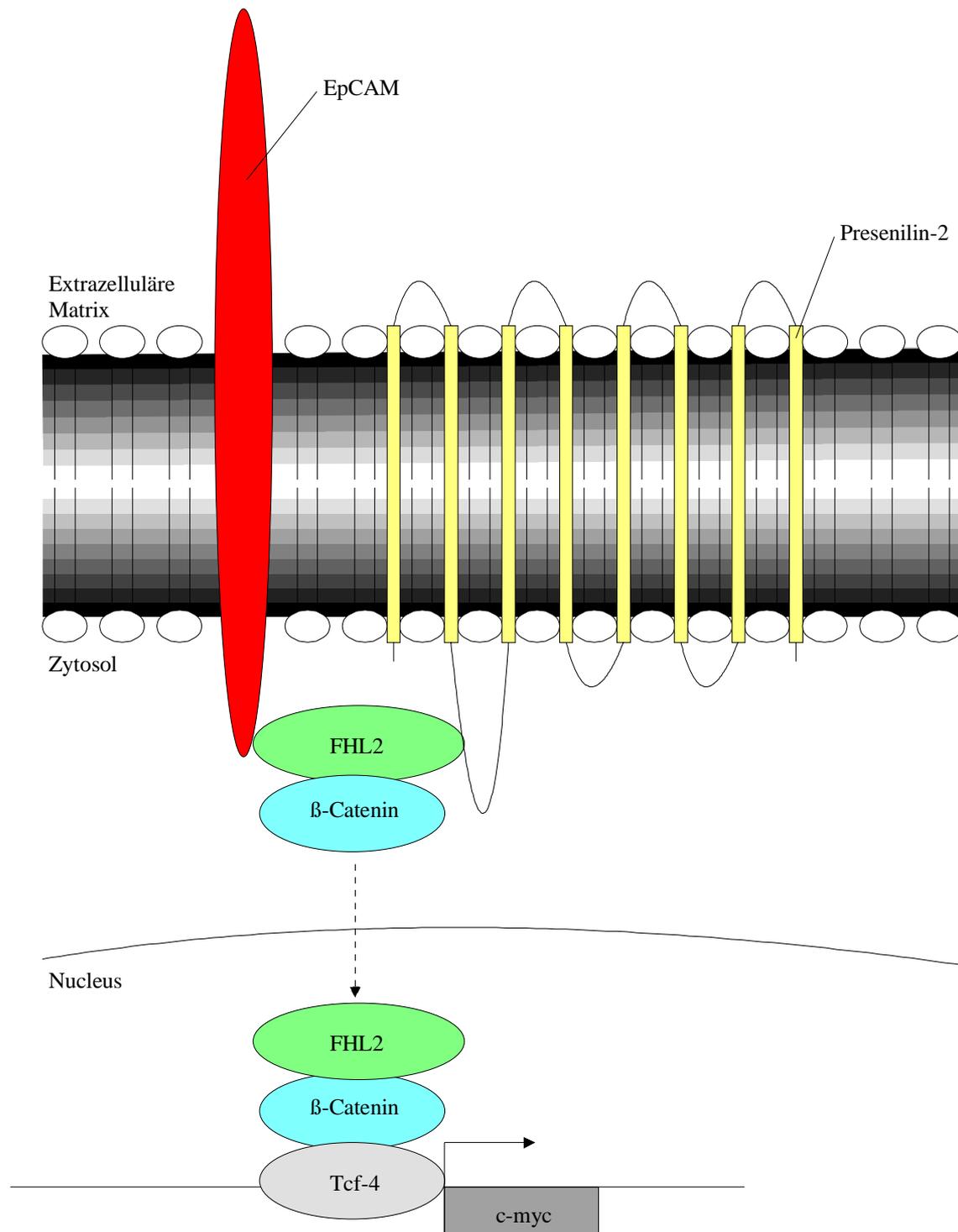


Abb. 4.3

Vorgeschlagenes Modell zur Rolle von FHL2 in der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion. FHL2 interagiert mit der zytosomatischen Domäne von EpCAM und wird auf diese Weise an die Plasmamembran rekrutiert. Die Assoziation von FHL2 mit Presenilin-2 ermöglicht den FHL2/β-Catenin-Komplexen in den Zellkern zu translozieren und die Transkription von c-myc zu induzieren.

5. Zusammenfassung

Das Epithelial Cell Adhesion Molecule, kurz EpCAM, ist ein transmembranes Zelladhäsionsmolekül, dessen Expression mit einer erhöhten Proliferation epithelialer Zellen einhergeht. Die veränderten proliferativen Eigenschaften werden durch eine EpCAM-vermittelte Signaltransduktion hervorgerufen, die u.a. die Transkription des Proto-Onkogens c-myc induziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EpCAM die Transkription weiterer „down stream“-Zielmoleküle reguliert. Die mRNA-Synthese des Transkriptionsfaktors Egr-1 wird durch EpCAM reprimiert. Dagegen induziert EpCAM die Transkription der Gene für RhoB und Calmodulin I. Außerdem korreliert in unterschiedlichen Karzinomzelllinien die native EpCAM-Expression mit der Transkriptionsrate von Calmodulin I.

Zur Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner wurde mit der kurzen zytoplasmatischen Domäne (26 Aminosäuren) von EpCAM ein Two-Hybrid Screening in Hefen durchgeführt. Es konnten 17 potentielle Interaktionspartner aus einer humanen cDNA-Bank identifiziert werden. Für die zwei Signaltransduktionsmoleküle FHL2 und Cyclophilin A war es möglich, eine Interaktion mit EpCAM in humanen Zellen nachzuweisen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die C-terminale LIM-Domäne von FHL2 für eine Assoziation mit EpCAM notwendig ist. Somit konnte in dieser Arbeit die Grundlage für eine weitere Analyse der EpCAM-vermittelten Signaltransduktion geschaffen werden.

6. Literatur

- Abdulkadir, S.A., Qu, Z., Garabedian, E., Song, S.K., Peters, T.J., Svaren, J., Carbone, J.M., Naughton, C.K., Catalona, W.J., Ackerman, J.J., Gordon, J.I., Humphrey, P.A., Milbrandt, J. (2001). Impaired prostate tumorigenesis in Egr-1-deficient mice. *Nat. Med.* **7**:101-107.
- Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S.M., and Munoz-Antonia, T. (2002). Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **8**:2225-2232.
- Ahmed, M.M., Venkatasubbarao, K., Fruitwala, S.M., Muthukkumar, S., Wood, D.P., Sells, S.F., Mohiuddin, M., and Rangnekar, V.M. (1996). EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **271**:29231-29237.
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. and Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**:197-263.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:255-260.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech. Dev.* **91**:5-17.
- Balzar, M., Briaire-De Bruijn, I.H., Rees-Bakker, H.A.M., Prins, F.A., Helfrich, W., De Leji, L., Riethmüller, G., Alberti, S., Warnaar, S.O., Fleuren, G.J. and Litvinov, S.V. (2001). Epidermal Growth Factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM Molecules on homophilic adhesions. *Mol. Cell. Biol.* **21**:5270-2580.
- Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). *J. Mol. Med.* **77**:699-712.
- Bergsagel, P.L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C.R., Trepel, J., Kuehl, W.M. (1992). A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J. Immunol.* **148**:590-596.
- Brazin, K.N., Mallis, R.J., Fulton, D.B., Andreotti, A.H. (2002). Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase Cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:1899-1904.
- Breeden, L. & Nasmyth, K. (1985). Regulation of the Yeast HO Gene. *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.* **50**:643-650.

- Brown, E.J. and Schreiber, S.L. (1996). A signaling pathway to translational control. *Cell* **86**:517-520.
- Bull, H.A., Brickell, P.M., and Dowd, P.M. (1994). Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett.* **351**:41-44.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* **275**:22607-22610.
- Campa, M.J., Wang, M.Z., Howard, B., Fitzgerald, M.C., Patz Jr., E.F. (2003). Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and Cyclophilin A as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **63**:1652-1656.
- Chafouleas, J.G., Pardue, R.L., Brinkley, B.R., Dedman, J.R., Means, A.R. (1981). Regulation of intracellular levels of Calmodulin and Tubulin in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:996-1000.
- Chen, J., He, Q.Y., Yuen, A.P., Chiu, J.F. (2004). Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics* **4**:2465-2475.
- Chen, J., Peterson, T.P. and Schreiber, S.L. (1998). $\alpha 4$ associates with Protein Phosphatases 2A, 4 and 6. *Biochem. Biophys. Research Com.* **247**:827-832.
- Cho, M.J., Cummings, R.D. (1997). Galectin-1: oligomeric structure and interactions with polylectosamine. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9**:47-56.
- Chong, J.M. and Speicher, D.W. (2001). Determination of disulfide bond assignments and N.glycosylation sites of the human Gastrointestinal Carcinoma Antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J. Biol. Chem.* **276**:5804-5813.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* **24**:73-76.
- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G.M., Mally, M.I., Lopez, A.D., Fannon, A., Ptaznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., Ellisman, M., Reisfeld, R.A., Hayek, A. (1998). KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J. Cell. Biol.* **140**:1519-1534.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Baccetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**:1921-1929.

- Coyne, C.B., Voelker, T., Pichla, S.L. and Bergelson, J.M. (2004). The Coxsackievirus and Adenovirus receptor interacts with the Multi-PDZ Domain Protein-1 (MUPP-1) within Tight Junction. *J. Biol. Chem.* **279**:48079-48084.
- Cui, Y., Mikia, K., Florence Fu, Y.H., Zhu, L., Yokoyama, K.K., Chiu, R. (2002). Interaction of retinoblastoma gene product, RB, with Cyclophilin A negatively affects cyclosporin-inhibited NFAT signaling. *J. Cell. Biochem.* **86**:630-641.
- De Boer, C.J., Van Krieken, J.H.J.M., Janssen-Van Rhijn, C.M., Litvinov, S.V. (1999). Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J. Pathol.* **188**:201-206.
- Di Como, C.J. and Arndt, K.T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* **10**:1904-1916.
- Eid, M.A., Kumar, M.V., Iczkowski, K.A., Bostwick, D.G., Tindall, D.J. (1998). Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res.* **58**:2461-2468.
- Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). In *Cancer Medicine*.(Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 41-64.
- Feng, Y. and Walsh, C. (2004). The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biol.* **6**:1034-1038.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8122-8126.
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Cundiff, D.L., Grella, D., Castellino, F.J., Enghild, J., Kwaan, H.C., Lee, F., Kramer, R.A., et al. (1997). The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10868-10872.
- Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F., Remppis, A., Mattei, M.G. and Schafer, B.W. (1997). Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell. Biol.* **16**:433-442.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**:1425.
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Münz, M., Wollenberg, B, Zeidler, R. (2001). Tumor Necrosis Factor α negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen Epithelial Cell Adhesion Molecule. *Cancer* **92**:620-628.
- Gires, O., Pockl, S., Chapman, R.D., Münz, M. (2004). Targeted gene expression using a 1.1 kilobase promoter fragment of the tumor-associated antigen EpCAM. *Anticancer Res.* **24**:3715-3721.

- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* **400**:464-468.
- Hanahan, D and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**:353-364.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for Transformation of *E.coli*. IRL Press, Oxford: 109-135.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* **62**:1180-1190.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**:1509-1512.
- High, A.S., Robinson, P.A., Klein, C.E. (1996). Increased expression of a 38 kDa cell-surface glycoprotein MH99 (KS1/4) in oral mucosal dysplasias. *J. Oral. Pathol. Med.* **25**:10-13.
- Hill, J., Donald, K. A. & Griffiths, D. E. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**:5791.
- Hoffenberg, S., Liu, X., Nikolova, L., Hall, H.S., Dai, W., Baughn, R.E., Dickey, B.F., Barbieri, M.A., Aballay, A., Stahl, P.D. and Knoll, B.J. (2000). A novel membran-anchored Rab5 Interacting Protein required for homotypic endosome fusion. *J. Biol. Chem.* **275**:24661-24669.
- Howard, B.R., Vajdos, F.F., Li, S., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (2003). Structural insights into the catalytic mechanism of Cyclophilin A. *Nat. Struct. Biol.* **10**:475-481.
- Inui, S., Kuwahara, K., Mizutani, J., Maeda, K., Kawai, T., Nakayasu, H., Sakaguchi, N. (1995). Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction. *J. Immunol.* **154**:2714-2723.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-1436.
- Jung, D.J., Na, S.Y., Na, D.S., and Lee, J.W. (2001) Molecular Cloning and characterization of CAPER, a novel coactivator of Activating Protein-1 and Estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* **277**:1229-1234.

- Kahl, C.R. and Means, A.R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/Calmodulin-dependent pathways. *Endocrine Reviews* **24**:719-736.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., Busse, T., Yermian, N., Ie, L. and Koo, E.H. (2005). Presenilins mediate P13K/Akt and ERK activation via select signaling receptors: selectivity of PS2 in PDGF signalling. *J. Biol. Chem.* **280**:31537-31547.
- Kim, H.J., Chong, K.H., Kang, S.W., Lee, J.R., Kim, J.Y., Hahn, M.J., Kim, T.J. (2004). Identification of Cyclophilin A as a CD99-binding protein by yeast two-hybrid screening. *Immunol. Lett.* **95**:155-159.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-170.
- Krister, W., and Channing, J.D. (2004). Rho-family GTPases: its not only Rac and Rho. *J. Cell Sci.* **117**:1301-1312.
- Ladwein, M., Pape, U.F., Schmidt, D.S., Schnölzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G., Zöller, M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp. Cell Res.* **309**:345-357.
- Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K.S., Kim, H.J., Kim, K. and Chae, H.Z. (2001). Cyclophilin A binds to Peroxiredoxins and activates its Peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **32**:29826-29832.
- Lim, S.O., Park, S.J., Kim, W., Park, S.G., Kim, Y.I., Kim, H.J., Sohn, T.S., Noh, J.H., Jung, G. (2002). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**:1031-1037.
- Linnenbach, A.J., Seng, B.A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyrc, J.J., Druck, T., Huebner, K. (1993). Retroposition in a family of carcinoma associated antigen genes. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1507-1515.
- Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A.M., Briaire-De Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1997). Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J. Cell. Biol.* **139**:1337-1348.
- Litvinov, S.V., van Driel, W., van Rhijn, C.M., Bakker, H.A.M., van Krieken, H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am. J. Pathol.* **148**:865-875.
- Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A.M., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* **125**:437-446.

- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P. and Prendergast, G.C. (2001). Rho B is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**:6906-6912.
- Liu, C., Rangnekar, V.M., Adamson, E., Mercola, D. (1998). Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by Egr-1. *Cancer Gene Ther.* **5**:3-28.
- Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J. (1989). „Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Markowitz, S., Wang, J., Meyeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R., Zborowska, E., Kinzler, K., Vogelstein, K., et al. (1995). Inactivation of type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**:1336-1338.
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., von der Mark, K., Starzinski-Powitz, A. and Wixler, V. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J. Cell. Biol.* **159**:113-122.
- McLaughlin, P.M., Trzpis, M., Kroesen, B.J., Helfrich, W., Terpstra, P., Doktor, W.H., Ruiters, M.H., de Leij, L.F. and Harmsen, M.C. (2004). Use of the EGP-2/EpCAM promoter for targeted expression of heterologous genes in carcinoma derived cell lines. *Cancer Gene Therapy* **11**:603-612.
- Means, A.R., Van Berkum, M.F.A., Bagchi, I, Lu, K.P., Rasmussen, C.D. (1991). Regulatory functions of Calmodulin. *Pharmacol. Ther.* **50**:255-270.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993). The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncog.* **4**:615-661.
- Müller, M.J., Metzger, E., Greschik, H., Bosserhoff, A.K., Mercep, L., Buettner, R. and Schüle, R. (2002). The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J.* **21**:736-748.
- Münz, M. (2002). Funktionelle Charakterisierung des Tumor-assoziierten epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM. Dissertation an der LMU München.
- Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R. and Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* **23**:5748-5758.
- Nair, P., Muthukumar, S., Sells, S.F., Han, S.-S., Sukhatme, V.P., Rangnekar, V.M. (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J. Biol. Chem.* **272**:20131-20138.
- Nikki, M., Merilainen, J. and Lehto, V.P. (2002). FAP52 regulates actin organization via binding to filamin. *J. Biol. Chem.* **277**:11432-11440.

- Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990). A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. *J. Biol. Chem.* **265**:6296-6300.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (1999). The small GTPase Ral A targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:2122-2128.
- Onda, M., Inui, S., Maeda, K., Suzuki, M., Takahashi, E. and Sakaguchi, N. (1997). Expression and chromosomal localization of the human $\alpha 4$ /IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 Protein of the Rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* **46**:373-378.
- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J. and Gillanders, W.E. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Research* **64**:5818-5824.
- Parker, L.L., Backstrom, J.R., Sanders-Bush, E. and Shieh, B.H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the Serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with Multiple PDZ Protein 1. *J. Biol. Chem.* **278**:21576-21583.
- Pauli, C., Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R., Gires, O. (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Letters* **193**:25-32.
- Poczatek, R.B., Myers, R.B., Manne, U., Oelschlager, D.K., Weiss, H.L., Bostwick, D.G., Grizzle, W.E. (1999). Ep-CAM levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *J. Urol.* **31**:1055-1061.
- Prendergast, G.C., Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Kurzawa, H., Lebowitz, P.F., and Der, C.J. (1995). Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* **10**:2289-2296.
- Printen, J. A. & Sprague, G. F. Jr. (1994). Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**:609-619.
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., and Kerbel, R.S. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **14**:263-277.
- Rasmussen, C.D., Means, A.R. (1987). Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. *EMBO J.* **6**:3961-3968.
- Renan, M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinogenesis* **7**:139-146.

- Ruohonen, L., Aalto, M. K. & Keränen, S. (1995). Modification of the *ADHI* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* **39**:193-203.
- Ruohonen, L., Penttilä, M. & Keränen, S. (1991). Optimization of *Bacillus* α -amylase Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**:337-346.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**:339-346.
- Schneider, S., Buchert, M. & Hovens, C. M. (1996). An *in vitro* assay of β -galactosidase from yeast. *BioTechniques* **20**:960-962.
- Schön, M.P., Schön, M., Klein, C.E., Blume, U., Bisson, S., Orfanos, C.E. (1994). Carcinoma-associated 38-kDa membrane glycoprotein MH99/KS1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J. Invest. Dermatol.* **102**:987-991.
- Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**:787-791.
- Simon, B., Podolsky, D.K., Moldenhauer, G., Isselbacher, K.J., Gattoni-Celli, S., Brand, S.J. (1990). Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2755-2759.
- Skobe, M., and Fusenig, N.E. (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1050-1055.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER2/neu oncogene. *Science* **235**:177-182.
- Spizzo, G., Gastl, G., Wolf, D., Gunsilius, E., Steurer, M., Fong, D., Amberger, A., Margreiter, R. and Obrist, P. (2003). Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Brit. J. Canc.* **88**:574-578.
- Spizzo, G., Obrist, P., Ensinger, C., Theurl, I., Dünser, M., Ramoni, A., Gunsilius, E., Eibl, G., Mikuz, G. and Gastl, G. (2002). Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int. J. Cancer* **98**:883-888.
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* **347**:1377-1381.
- Stilo, R., Leonardi, A., Formisano, L., Di Jeso, B., Vito, P., Liguoro, D. (2002). TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF- κ B activation. *FEBS Let.* **521**:165-169.

Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**:138-145.

Sukhatme, V.P., Cao, X., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C.P., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., LeBeau, M.M., Adamson, E.D. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* **53**:37-43.

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

Takes, P.R., Baatenburg de Jong, R.J., Wijffels, K., Schuurig, E., Litvinov, S.V., Hermans, J. and van Krieken, J.H.J.M. (2001). Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J. Pathol.* **194**:298-302.

Tanahashi, H. and Tabira T. (2000). Alzheimer`s disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, a LIM-domain protein. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2281-2289.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.

Ulmer, C., Schmuck, K., Figge, A., Lübbert, H. (1998). Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Letters* **424**:63-68.

Varner, J.A., and Cheresch, D.A. (1996). Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:724-730.

Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, T.M. (1988). Bcl-2 promotes the survival of hematopoietic cells and cooperates with c-myc immortalize pre-B cells. *Nature* **335**:440-442.

Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **9**:211-220.

Wang, L., Yang, L., Luo, Y., and Zheng, Y. (2003). A novel strategy for specifically downregulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **278**:44617-44625.

Wei, Y., Renard, C.A., Labalette, C., Wu, Y., Levy, L., Neuveut, C., Prieur, X., Flajolet, M., Prigent, S. and Buendia, M.A. (2003). Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of β -Catenin. *J. Biol. Chem.* **278**:5188-5194.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**:323-330.

Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**:439-442.

Winter, M.J., Nagteaal, I.D., van Krieken, J.H.J.M. and Litvinov, S.V. (2003). The Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am. J. Pathol.* **163**:2139-2148.

Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aimalley, M, Sonnenberg, A. and Paulsson, M. (2000). The LIM-only DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several α and β Integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J. Biol. Chem.* **275**:3369-33678.

Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3088-3092.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**:251-306.

Yang, Y., Hou, H., Haller, E.M., Nicosia, S.V. and Bai, W. (2005). Suppression of FOXO1 activity by SIRT-mediated deacetylation. *EMBO J.* **24**:1021-1032.

Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W.W., Franchin, G., Hao, T., Guo, T., Hung, H.C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., Bukrinsky, M. (2002). Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.*, **277**:22959-22965.

Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A. and Olofsson, B. (1995). Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* **10**:1935-1945.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Science* **114**:3583-3590.

Zeidler, R., Reisbach, B., Wollenberg, B., et al. (1999). Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J. Immunol.* **163**:1246-1252.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Michael Benk
Geburtsdatum: 27.11.1974
Geburtsort: Lindenberg im Allgäu
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig, keine Kinder
Wohnort: Fraunhoferstr. 29
80469 München

Schulbildung/Studium

1981-1985: Grundschule Lindenberg im Allgäu
1985-1994: Gymnasium Lindenberg im Allgäu,
Allgemeine Hochschulreife
1995-2001: Studium der Biologie
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Diplom-Biologie Univ.
2001-2006: Promotionsstudium in der HNO-Forschung,
Universitätsklinikum Großhadern,
Ludwig-Maximilians-Universität München