

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

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

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

---

**„Proteolytische Spaltung von humanem EpCAM und deren Einfluss  
auf die Zelladhäsion“**

---

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

vorgelegt von

**Thanos Tsaktanis**

aus Ulm

2018



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Vogeser  
Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach  
Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2018

# Eidesstattliche Versicherung

Tsaktanis, Thanos

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

## **„Proteolytische Spaltung von humanem EpCAM und deren Einfluss auf die Zelladhäsion“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.06.2018

Ort, Datum

T.Tsaktanis

Unterschrift Doktorand

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Krebs.....	4
1.1.1 Karzinogenese .....	4
1.1.2 Metastasierung .....	7
1.1.3 Modelle der Krebsentstehung .....	9
1.1.3.1 Klonale Evolutionstheorie .....	9
1.1.3.2 Tumorstammzell-Theorie.....	9
1.2. EpCAM.....	12
1.2.1 Das EpCAM Gen .....	14
1.2.2 Das EpCAM Protein.....	15
1.2.3 Die Funktionen von EpCAM.....	18
1.2.3.1 Zelladhäsion.....	18
1.2.3.2 Spaltungsabhängige Induktion der Proliferation.....	21
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Material</b> .....	<b>26</b>
3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	26
3.1.1 Chemikalien .....	26
3.1.2 Kits.....	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	29
3.1.4 Geräte.....	30
3.1.5 Computerprogramme .....	32
3.1.6 Dienstleistungen .....	32
3.2 Antikörper .....	32
3.3 Oligonukleotide.....	33
3.3.1 Primer .....	33
3.3.2 qRT-PCR Primer.....	34
3.4 Plasmide und CRISPR-Cas9 Konstrukt.....	34
3.5 Bakterien .....	35
3.6 Zelllinien .....	35
<b>4. Methoden</b> .....	<b>37</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden .....	37
4.1.1 Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR ( <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> ) .....	37
4.1.1.1 RNA Extraktion und Generierung von cDNA.....	37
4.1.1.2 Real-time-quantitative-PCR .....	37

4.1.2 Herstellung von Plasmiden .....	38
4.1.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung nach Agarose Gelelektrophorese .....	39
4.1.2.2 Restriktion und Ligation .....	40
4.1.2.3 Transformation der Bakterien nach der Hitzeschockmethode .....	40
4.1.2.4 DNA Präparation .....	40
4.1.3 Grundlagen des <i>Genome-Engineering-Systems</i> CRISPR-Cas9 .....	41
4.2 Proteinbiochemische Methoden .....	42
4.2.1 Quantitative Proteinkonzentrationbestimmung (BCA-Assay) .....	43
4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting .....	43
4.2.3 Immunpräzipitation .....	44
4.2.4 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie .....	44
4.2.5 Aufreinigung des humanen EpEX-Fc Konstrukts .....	45
4.2.6 Bestimmung der Schnittstellen von humanen EpCAM .....	46
4.2.6.1 Extrazelluläre Schnittstellen .....	46
4.2.6.2 Transmembrane Schnittstellen .....	47
4.3 Mikrobiologische Methoden .....	48
4.3.1 Bakterienkultivierung und -konservierung .....	48
4.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien .....	48
4.4 Zellbiologische Methoden .....	48
4.4.1 Kultivierung und Konservierung der Zellen .....	49
4.4.2 Zellzahlbestimmung .....	49
4.4.3 Transfektion durch MATra ( <i>Magnet-Assisted Transfection</i> ) .....	49
4.4.4 Generierung eines zellulären Knockouts mittels CRISPR-Cas9 Technologie .....	50
4.4.4.1 Transfektion des CRISPR-Cas9 Konstrukts .....	50
4.4.4.2 Isolierungen der transfizierten Zellen .....	50
4.4.4.3 Generierung von Einzelzellklonen ( <i>single cell clones</i> ) und Identifizierung zellulärer Knockouts .....	50
4.4.5 Adhäsionsassay .....	51
4.4.5.1 Zell-Matrix-Adhäsionsassay mit und ohne Kalzium .....	51
4.4.5.2 Zell-Zell-Adhäsionsassay mit und ohne Kalzium .....	52
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
5.1 Extrazelluläre Schnittstellen .....	54
5.2 Transmembrane Schnittstellen .....	59
5.3 Einfügen der Schnittstellen in die 3D Struktur von hEpCAM .....	64
5.4 Einfluss der Spaltung auf die Zelladhäsion .....	66
5.5 Generierung eines zellulären hEpCAM Knockouts in HCT-8 Zellen mittels CRISPR-Cas9 Technologie .....	70

5.6 Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Zelladhäsion .....	72
5.7 Generierung und Aufreinigung eines humanen EpEx-Fc Proteins .....	74
5.8 Bestimmung der Protein-Protein Interaktion von hEpEx mittels <i>atomic force microscopy</i> (AFM) .....	76
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>78</b>
6.1 Spaltung des humanen EpCAMs.....	78
6.2 Degradation von hEpCAM.....	83
6.3 Einfluss der Spaltung auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT).....	85
6.4 Einfluss der Spaltung auf die Zelladhäsion hEpCAMs .....	86
6.5 Einfluss eines zellulären hEpCAM Knockouts auf die Zelladhäsion .....	87
6.6 Adhäsionsfunktionstest von hEpCAM mittels AFM .....	88
<b>7. Ausblick.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>94</b>
<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>11. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>12. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>13. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>14. Danksagung .....</b>	<b>112</b>
<b>15. Publikation .....</b>	<b>113</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Krebs

Krebs ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Im Laufe des Lebens werden statistisch gesehen 50% der Menschen in den Industrieländern daran erkranken (Greaves, 2015). Deshalb wird enorme Anstrengung in die Forschung investiert, um die molekularen Grundlagen von Krebs zu verstehen und dadurch Patienten effektiver zu behandeln. Krebs, hat bei Behandlungen in frühen Stadien und je nach Tumorart eine gute Prognose. Doch laut Meinungen von Experten geht es bei den meisten fortgeschrittenen Karzinomen nicht mehr um Heilung *per se*, sondern darum möglichst viele Signalwege zu blockieren, um Krebs in eine chronische Erkrankung zu verwandeln, ähnlich wie es bei AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*) der Fall ist (Pepper, Scott Findlay, Kassen, Spencer, & Maley, 2009). Aber um das zu Erreichen ist es von enormer Wichtigkeit die grundlegenden Schritte der Karzinogenese zu verstehen.

Auf Grund der multifaktoriellen Ursachen für die Entstehung von Krebs ist neben einer verbesserten Früherkennung, die Entwicklung zielgerichteter Therapien eine Grundvoraussetzung für eine effizientere Behandlung dieser Erkrankung. Über Jahrzehnte hinweg wurde immer wieder versucht die Pathophysiologie des Krebses zu verstehen, zunächst nur auf morphologischer und später auf molekularbiologischer Ebene. Das Verständnis der molekularen Mechanismen nimmt dabei einen immer wichtigeren Stellenwert ein (Sudhakar, 2009).

### 1.1.1 Karzinogenese

Der komplexe Prozess, der zur Entwicklung von Malignomen aus Zellen epithelialen Ursprungs führt, wird als Karzinogenese bezeichnet. Die molekularen Ursachen der Krebsentstehung sind vielfältig. Genomische Mutationen sind verantwortlich für die Entstehung eines malignen Tumors aus gesunden Epithelzellen. Die Endstufe der Karzinogenese bezeichnet man dabei als Krebs, welcher durch Akkumulation genetischer Mutationen über Jahre oder Jahrzehnte hinweg entsteht. Die Mehrzahl der dabei entstehenden Mutationen wird normalerweise durch das DNA-Reparatursystem erkannt und beseitigt. Funktioniert dieses Reparatursystem nicht mehr, kommt es zum Verlust der genomischen Stabilität. Die Folgen sind chromosomale und genomische Veränderungen, die weitere Mutationen begünstigen, welche das Tumorwachstum fördern. Chronische Entzündungsreaktionen, vermittelt durch das angeborene Immunsystem, schaffen zusätzlich ein tumorfreundliches Milieu. Dabei sezernieren Abwehrzellen unter anderem wachstumsstimulierende Faktoren und schaffen dadurch eine tumorfördernde Umge-

bung. Makrophagen und Granulozyten setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffverbindungen frei, durch die es im entzündlichen Gewebe zu DNA-Schäden kommt (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Aufgrund der DNA-Schäden werden Transkriptionsfaktoren wie Nf- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) exprimiert, die das Immunsystem aktivieren und dadurch die Entzündung weiter anfeuern (Kidane et al., 2014). Die beschriebenen Grundvoraussetzungen bieten die Basis für genetische und epigenetische Veränderungen in den Zellen, welche zur Bildung eines Tumors, mit den Eigenschaften zu überleben, zu proliferieren und zu disseminieren, führen können. Im Gegensatz zu normalen Zellen, deren Zellzyklus und Zellteilung streng kontrolliert wird, ist dieser Kontrollmechanismus in Tumorzellen, aufgrund von Mutationen nicht mehr vorhanden. Diese tumorfördernden Mutationen werden auch als *Driver*-Mutationen bezeichnet. Die Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung ergab, dass in einem Tumor 2-8 *Driver*-Gen Mutationen vorkommen, neben unzähligen *Passenger*-Mutationen, welche bis dato keinen essentiellen Einfluss auf das Tumorstadium zu haben scheinen. Die *Driver*-Gen Mutationen kontrollieren dabei 12 Signalwege, welche das Zellschicksal, das Zellüberleben und das Zellgenom eines Tumors beeinflussen (Vogelstein et al., 2013). Hauptsächlich ermöglichen *Driver*-Gen Mutationen bzw. onkogene Mutationen das Tumorstadium. Mutationen entstehen innerhalb der genomischen DNA in Form von Punktmutationen, Deletionen, Translokationen, Amplifikation bzw. chromosomale Alterationen. Aber auch die Messenger-RNA und damit indirekt die Proteinexpression werden durch epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen beeinflusst und können zudem durch miRNA posttranskriptionel moduliert werden (Ali, Humphreys, McKinnon, & Michael, 2015; Schnekenburger, Florean, Dicato, & Diederich, 2015). Die dabei exprimierten Proteine lassen sich in proliferationsfördernde Proteine (Protoonkogen) und proliferationshemmende Proteine (Tumorsuppressorgene) einteilen.

Eine Überexpression von Protoonkogenen führt zur Proliferation von Tumorzellen wie z.B. die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) EGFR und Neu/ErbB2, welche das Wachstum von Brust- und Lungenkarzinomen fördern (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Auch haben genetische Untersuchungen ergeben, dass es innerhalb von Signalkaskaden zu Mutationen kommen kann. Ein prominentes Beispiel ist die Punktmutation des Kras Proteins, welches zur Familie der Ras G-Proteine gehört. Mutationen in Ras führen dabei zu einer verstärkten oder permanenten Aktivierung des G-Proteins und somit zur unkontrollierten Aktivierung zahlreicher Signalwege. Betroffene Signalwege sind unter anderem

der Raf/MEK/ERK und der PI3K/PDK1/AKT Weg, welche vor allem in kleinzelligen Lungen- und Pankreaskarzinomen aktiv sind (Eser et al., 2013).

Demgegenüber stehen die Tumorsuppressorgene, die eine regulatorische und schützende Funktion in Bezug auf die Bildung von Tumoren erfüllen. Durch Mutationen kommt es hier zum Verlust der Expression von Proteinen mit proliferationshemmenden Eigenschaften. Das Tumorsuppressorprotein TP53 reguliert den Zellzyklus und initiiert bei DNA-Schäden und Ressourcenknappheit, wie z.B. bei einer verringerten Verfügbarkeit an Nukleotiden, eine Reparatur bzw. die Apoptose von Zellen. Aus diesem Grund wird TP53 auch „Wächter des Genoms“ genannt und ist in 60% aller Krebsfälle mutiert (Machado-Silva, Perrier, & Bourdon, 2010). Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für ein proliferationsinhibierendes Protein ist das Retinoblastomprotein pRb. Dieses Protein verhindert den Übergang im Zellzyklus von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase. Durch Missense- bzw. Nonsense-Mutationen von Tumorsuppressorgenen kann es schließlich zu einer unkontrollierten Aktivierung des Zellzyklus kommen (Weinberg, 1995).

Hanahan und Weinberg fassten diese und weitere Ursachen der Karzinogenese, welche bisher bekannt waren, in der Publikation *The Hallmarks of Cancer* zusammen (Hanahan & Weinberg, 2000). Diese sind:

- Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen
- Sensitivitätsverlust gegenüber Wachstumssuppressoren
- Uneingeschränktes replikatives Wachstumspotential
- Gewebeanvasion und Metastasierung
- Induktion von Angiogenese
- Resistenz gegenüber Apoptose

Neben den „klassischen“ Faktoren, die die Karzinogenese einleiten bzw. fördern, gibt es auch andere Einflüsse, die eine Tumorzelle widerstandsfähiger machen (Hanahan & Weinberg, 2011). Diese Einflüsse sind:

- Ein veränderter Metabolismus, der es Krebszellen erlaubt, auch in widriger Umgebung zu wachsen, wie z.B. einer hypoxischen Umgebung. Durch einen anaeroben Metabolisierungsweg (Warburg-Effekt), werden genug Rohstoffe bereitgestellt, um ein suffizientes Zellwachstum und Zellteilung auch in einer ungünstigen Umgebung zu gewährleisten.
- Instrumentalisierung des Immunsystems: Tumorzellen können sich durch Rekrutierung regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>) bzw. Ausschüttung von immunsuppressiven

Chemokine wie CCL5 erfolgreich der körpereigenen immunologischen Abwehr entziehen.

- Bildung eines *tumor microenvironment*: Eine heterogene Ansammlung von Zellen in der Nähe des Tumors bildet das *tumor microenvironment* (TME). Sie lassen sich in infiltrierende Immunzellen (IIC), Krebs-assoziierte Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts*; CAFs) und angiogenetische vaskuläre Zellen (AVC) einteilen. Durch Interaktionen des Tumors mit den Zellen der Tumorumgebung wird ein Milieu geschaffen, welches Proliferation, Angiogenese und Metastasierung fördert (Hanahan & Coussens, 2012).

Trotz des unkontrollierten Tumorwachstums, verursacht durch zufällige genetische Mutationen, begünstigt durch Inflammation und Fehler im DNA-Reparatursystem, ist der Tumor keine einfache Ansammlung von homogenen malignen Zellen. Im Gegenteil, der Tumor ist ein komplexes System, bestehend aus Tumorzellen, infiltrierenden Endothel-, Stroma-, hämatopoetischen Zellen, sowie anderen Zellen, die die Eigenschaften eines Tumors beeinflussen (Kreso & Dick, 2014). Zudem hat der Ort und der Zeitpunkt der Mutationen einen immensen Einfluss auf die Karzinogenese. Ersichtlich wird das beispielweise beim Betrachten der Telomerase, welche bei Überexpression gewährleistet, dass die Chromosomenenden erhalten bleiben und somit ein uneingeschränktes replikatives Wachstumspotential für die Zelle ermöglicht. Doch initial in prä-malignen Läsionen kann ein Verlust der Telomerase die Voraussetzungen schaffen für eine bösartige Entartung, da es zu chromosomalen Alterationen kommt (Kawai, Hiroi, Nakanishi, & Meeker, 2007). Im Laufe der Tumorgenese kommt es dann unter anderem wieder zur vermehrten Expression des Telomerase-Enzyms und der damit einhergehenden Immortalisierung und Stabilisierung des Krebsgenoms (Artandi et al., 2000; Artandi & DePinho, 2010). Folglich sind der Ort und der Zeitpunkt der genetischen Veränderungen von Relevanz für die Entartung einer Zelle.

### **1.1.2 Metastasierung**

Die Todesursache bei einer Krebserkrankung sind in 90% der Fälle Metastasen, die aus dem Primärtumor hervorgehen (Chaffer & Weinberg, 2011). Es wird allgemein angenommen, dass ein Karzinom nach seiner Entstehung mit zunehmender Malignität zunächst lokal invasiv wächst und schlussendlich metastasiert. Voraussetzungen für die Migration der Tumorzellen ist ein initiales Loslösen von Zellen aus der Umgebung. Der Prozess des Loslösens wird durch den phänotypischen Wechsel von epithelial zu mesenchymal begünstigt. Dieser phänotypische Wechsel wird auch als epithelial-

mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Dabei werden epitheliale Marker herunterreguliert, wobei der epitheliale Phänotyp graduell verloren geht. Es kommt daher zu einem Verlust von Zellverbindungen, der apikal-basalen Zellpolarität und zu einer Reorganisation des Zytoskeletts. Initiiert werden diese Schritte unter anderem durch die Proteine TGF $\beta$ , EGF, Notch, Wnts, IGF und HIF (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Dabei kann TGF $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) die EMT durch die Aktivität von SMAD Proteine initiieren oder durch die PI3K- und MAPK-Signalwege (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Normalerweise aktivieren diese Signalwege EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren, wie Snail, Twist und Zeb, welche direkt oder indirekt das zentrale Zelladhäsionsmolekül und epitheliale Marker E-Cadherin herunterregulieren (De Craene & Berx, 2013).

Ein frühes Ergebnis der EMT ist der Verlust des Zell-Zell-Kontaktes. Der Zell-Zell-Kontakt wird generell durch *tight junctions*, *adherens junctions* und Desmosomen vermittelt. Durch die verringerte Expression von Claudinen und Occludin wird die *tight junction* geschwächt (R. Y. Huang, Guilford, & Thiery, 2012). Die Destabilisierung der *adherens junctions* erfolgt durch proteolytische Spaltung von E-Cadherin und nachfolgender Degradierung (Yilmaz & Christofori, 2009). Parallel kommt es durch  $\beta$ -Catenin und der Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer verminderten E-Cadherin Expression (Kourtidis, Ngok, & Anastasiadis, 2013). Auch werden Desmosome und *gap junction* herunterreguliert (Bax et al., 2011; Yilmaz & Christofori, 2009). Als Folge des Verlusts des Zell-Zell-Kontaktes kommt es zu einer Auflösung der apikal-basalen Zellpolarität, durch verminderte Expression und Degradierung von Polaritäts-beeinflussenden Proteinen, wie Crumbs, PAR und Scribble (SCRIB) (Lamouille et al., 2014). Im Gegenzug werden die mesenchymalen Proteine Vimentin, NCAM und N-Cadherin exprimiert, die eine erneute Zelladhäsion unterbinden (Lehembre et al., 2008; Yilmaz & Christofori, 2009).

Es kommt zu einer Reorganisation des kortikalen Aktinzytoskeletts und zur Formierung von Lamellipodia, Filopodia und Invadopodia (Ridley, 2011). Die phänotypische Veränderung geht dabei von polygonal/epithelial zu spindelförmig/mesenchymal über (Thiery et al., 2009; Thiery & Lim, 2013). Fortbewegen können sich die invasiven Zellen durch die Formation von Aktin Fibrillenbündel (*actin stress fiber*), welche durch das ERM (*ezrin, radixin and moesin*) Protein Moesin vermittelt wird (Haynes, Srivastava, Madson, Wittmann, & Barber, 2011).

Nach Loslösen aus dem Primärtumor infiltrieren Tumorzellen Blut- bzw. Lymphgefäße und zirkulieren nun im Blut-/Lymphgefäß als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tu-*

*mor cells*; CTCs) (Thiery, 2002). Diese zirkulierenden Tumorzellen scheinen nach neueren Untersuchungen nicht alle einen mesenchymalen Phänotyp zu besitzen, sondern es wird vermutet, dass die zirkulierenden Tumorzellen ein heterogenes Zellgemisch bilden, das aus epithelialen und mesenchymalen Zellen besteht. Durch die adhäsiven Eigenschaften der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen können die mesenchymalen und epithelialen Zellen einfacher Zellcluster ausbilden. Durch diese Clusterbildung sind sie einerseits resistent gegenüber Anoikis und andererseits erhöht sich die Wahrscheinlichkeit in Kapillaren festhängen zu bleiben, um dort zu extravasieren und anschließend im Gewebe Metastasen zu bilden (Jolly et al., 2015). Aus den Mikrometastasen kann sich schließlich ein Sekundärtumor bilden (Cavallaro & Christofori, 2004; Thiery, 2002).

### **1.1.3 Modelle der Krebsentstehung**

Tumore bestehen aus einem heterogenen Zellgemisch. Hinsichtlich der Tumorentstehung existieren zwei grundlegende Theorien, um die intratumorale Heterogenität zu erklären (Marusyk & Polyak, 2010). Dabei wird zwischen dem klonalen Evolutionsmodell und der Tumorstammzelltheorie unterschieden (Marjanovic, Weinberg, & Chaffer, 2013; Visvader & Lindeman, 2008).

#### **1.1.3.1 Klonale Evolutionstheorie**

Die klonale Evolutionstheorie besagt, dass alle Zellen ähnliche Eigenschaften, sowie das gleiche tumorinduzierende Potential besitzen (Boveri, 1912; Greaves & Maley, 2012). Dabei wird von einer sukzessiven Ansammlung von Mutationen ausgegangen. Die Folge ist eine genetische Diversität, welche man in tumorfördernde *Driver*-Mutationen und bis dato neutrale *Passenger*-Mutationen unterteilen kann. Dabei ermöglichen *Driver*-Mutationen eine bessere Anpassung an die Umgebung und führen somit zu einem Selektionsvorteil, sodass sich diese Mutanten in der Gesamtzellpopulation besser durchsetzen können. Vereinfacht kann man es als Darwins Evolutionstheorie im Mikrokosmos Zelle beschreiben (Bernards & Weinberg, 2002; Nowell, 1976). Auch nach der Entstehung eines Tumors findet eine fortdauernde Selektion statt. Aus diesen Prozessen können auch metastasierende Zellen entstehen (Yachida et al., 2010).

#### **1.1.3.2 Tumorstammzell-Theorie**

Die Tumorstammzell-Theorie beschreibt eine hierarchische Gliederung innerhalb eines Tumors. Dabei besitzt nur eine Subpopulation des Tumors die Fähigkeit einen Tumor vollständig zu generieren (Visvader, 2011). Diese Subpopulation wird durch zwei Eigenschaften charakterisiert. Sie ist multipotent und besitzt die Fähigkeit zur Selbster-

neuerung. Auf Grund der Gemeinsamkeit von Stammzellen und dieser Subpopulation bezeichnet man sie als Tumorstammzellen (*cancer stem cells*; CSC) bzw. Tumor-initiiierende Zellen (*tumor initiating cells*; TICs) (Shackleton, Quintana, Fearon, & Morrison, 2009). Erstmals wurden TICs in AML Leukämiezellen beschrieben (Hope, Jin, & Dick, 2004; Lapidot et al., 1994). Durch Xenotransplantationen von Tumorzellen aus soliden Tumoren wie Mammakarzinomen (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003), Glioblastomen (S. K. Singh et al., 2004), Kolorektalkarzinomen (Dalerba et al., 2007), Pankreaskarzinomen (C. Li, Lee, & Simeone, 2009) und Ovarkarzinomen (S. Zhang et al., 2008) in Mäuse konnte ebenfalls eine Subpopulation von Zellen isoliert werden, welche imstande war einen Tumor in Mäusen zu generieren. Die Isolierung erfolgte anhand selektierter Antigene, welche vermehrt auf tumorinduzierenden Zellen gefunden wurden. Zu diesen Tumorstammzellmarkern gehören unter anderem CD20, CD24, CD34, CD44, CD90, CD117, CD133, CD166, ALDH, Nestin und EpCAM (Ebben et al., 2010; Gires, 2011; Lobo, Shimono, Qian, & Clarke, 2007). Die angereicherten Subpopulationen zeigten teils durch die Expression von ATP-abhängigen Effluxpumpen wie zum Beispiel ABCG2 eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Kuhnle et al., 2009; To et al., 2015). Auch bietet die langsamere Zellteilung einen Schutz gegen Bestrahlung und Chemotherapie. Basierend auf einer verminderten Zellteilung und einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wird davon ausgegangen, dass TICs für die Rezidivbildung von Tumoren verantwortlich sind (Carnero et al., 2016; X. Li et al., 2008). Aber auch die Fähigkeit zur EMT wird TICs zugesprochen. Dabei werden TICs durch z.B. Wnt und TGF $\beta$  aktiviert und sind in der Lage Metastasen zu bilden (A. Singh & Settleman, 2010). Aufgrund ähnlicher Eigenschaften zwischen tumorinduzierenden Zellen und Stammzellen, sowie Nutzung derselben Signalwege wie Wnt, Hedgehog, Notch vermutete man, dass die Ursprungszelle des Tumors eine mutierte Stammzelle sein kann (Hope et al., 2004). Doch neuere Überlegungen und Beobachtungen weisen darauf hin, dass sogenannte Vorläuferzellen (Progenitorzellen) den Ursprung der hierarchischen Tumorstruktur bilden. Stochastisch gesehen ist die Wahrscheinlichkeit, von vorteilsbringenden *Driver*-Mutationen in den sich häufiger teilenden Progenitorzellen höher, als in der kleinen, sich kaum teilenden Stammzellpopulation. Es liegt nahe, dass Progenitorzellen durch epigenetische Veränderungen dedifferenzieren und somit stammzellähnliche Eigenschaften erwerben, welche es ihnen erlaubt einen Primärtumor zu bilden (Chaffer & Weinberg, 2015). Deshalb ist die Bezeichnung TICs (*tumor initiating cells*) sachgemäßer, als CSC (*cancer stem cells*). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das *tumor microenvironment* (TME). Dabei wer-

den von den Zellen, in direkter Umgebung, Faktoren sezerniert, wie HGF, die den Wnt Signalweg aktivieren und somit stammzellähnliche Eigenschaften (*stemness*) in Tumorzellen induzieren (Vermeulen et al., 2010).

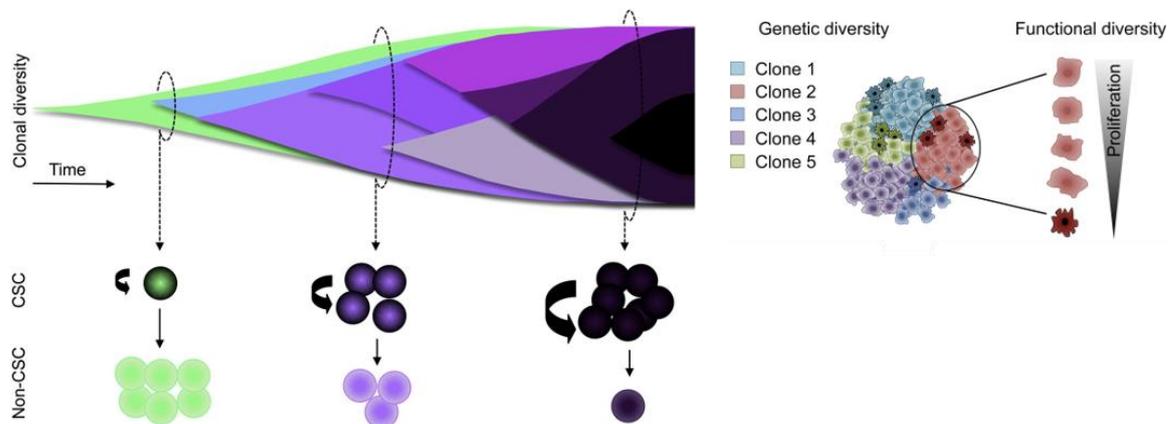
Die klonale Evolutionstheorie und die Tumorstammzell-Theorie wurden früher als getrennte, eigenständige Theorien betrachtet. Doch diese beiden Theorien spielen möglicherweise beide eine Rolle in der Krebsentstehung. Histologische Untersuchungen ergaben, dass ein Tumor aus verschiedenen Subklonen besteht (Marusyk, Almendro, & Polyak, 2012). Diese Subklone unterscheiden sich in genetischer Hinsicht. Ein Tumor hat folglich nicht nur ein „Genom“, sondern beinhaltet multiple „Genome“, welche den verschiedenen Subklonen zuzuordnen sind. *Driver*-Mutationen bilden den Anfang der Tumorentstehung. Nach klonaler Selektion herrscht eine genetische Vielfalt zwischen den Subklonen vor. Parallel dazu laufen in den Subklonen epigenetische Modifikationen der DNA, Histone und nicht kodierender RNAs ab, welche die Genexpression beeinflussen. Diese epigenetischen Veränderungen haben einen direkten Einfluss auf zentrale Eigenschaften wie die Multipotenz, das Proliferationsverhalten und den Ruhezustand (*dormancy*) einer Tumorzelle. Die Subklone des Tumors lassen sich je nach TIC und Non-Tic Häufigkeit in eine hierarchische bzw. eine homogene Struktur unterteilen. In Subklonen mit einer hierarchischen Struktur, also einer geringen Anzahl an TICs und vielen Non-TICs, besitzen nur TICs das Potential einen Tumor zu generieren (hierarchische/heterogene Verteilung). Anders ist es in Subklonen, die hauptsächlich aus TICs bestehen, in denen fast jede Zelle des Subklons das Potential hat einen Tumor zu generieren („klonale“/homogene Verteilung) (Abbildung 1). Zusammenfassend werden TICs durch genetische, epigenetische und die Tumorumgebung beeinflusst (Kreso & Dick, 2014).

TICs besitzen, neben Charakteristika wie Multipotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung weitere Eigenschaften, die sie von den Non-TICs abgrenzen:

- vermehrte Apoptoseresistenz
- vermehrte Therapieresistenz
- Fähigkeit zur Einnahme eines *dormancy* Zustandes

Je mehr TICs Bestandteil eines Tumors sind, desto schlechter ist das Therapieansprechen und die Prognose (Bao et al., 2006; Carnero et al., 2016; Eppert et al., 2011; Merlos-Suarez et al., 2011). Deshalb ist es von großer Wichtigkeit TICs zu identifizieren und therapeutisch zu adressieren. Doch eine erfolgreiche Behandlung ist nur dann möglich, wenn der Unterschied zwischen TICs und Non-TICs ersichtlich ist. Aus diesem

Grund sind eine Charakterisierung und Identifizierung der tumorinduzierenden Stammzelle, sowie deren Tumorstammzellmarkern von entscheidender Bedeutung (Kreso & Dick, 2014).



### Abbildung 1: Vereinheitlichtes Modell der klonalen Evolutions- und der Tumorstammzell-Theorie

(Links) Über die Zeit kommt es zu einer sukzessiven Ansammlung genetischer Mutationen in einem Tumor, was zu einer genetischen Vielfalt von Subklonen führt. Die Subklone bilden den Tumor, dabei unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer genetischen und funktionellen Eigenschaften. Das widerspiegelt sich in dem Verhältnis TICs/CSCs und Non-TICs wieder, dadurch beobachtet man innerhalb der Subklone entweder eine klare Hierarchie mit wenigen TICs an der Spitze und vielen Non-TICs oder es ist durch die hohe TIC/CSC Anzahl keine hierarchische Struktur mehr erkennbar. Folglich haben alle Zellen in den Subklonen, in denen fast alle Zellen TICs/CSCs sind, das Potential einen Tumor zu generieren. In den hierarchisch angeordneten Subklonen, haben nur die wenigen TICs/CSCs ein tumorinduzierendes Potential. (Rechts) (Kreso & Dick, 2014).

### 1.2. EpCAM

Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM wurde erstmals 1979 als Tumorantigen beschrieben, aufgrund der Bildung von Antikörper in mit Kolonkarzinom inokulierten Mäusen (Herlyn, Herlyn, Steplewski, & Koprowski, 1979). Weitere biochemische Untersuchungen des Antigens EpCAM, welches durch den Antikörper Co-17-1A erkannt wurde, charakterisierten es als ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 34-42 kDa (H. Gottlinger, Johnson, & Riethmuller, 1986; H. G. Gottlinger, Funke, Johnson, Gokel, & Riethmuller, 1986; Moldenhauer, Momburg, Moller, Schwartz, & Hammerling, 1987). Molekulare Untersuchungen ergaben, dass EpCAM ein homophiles, kalziumunabhängiges Zelladhäsionsmolekül ist (Litvinov et al., 1997; Litvinov, Velders, Bakker, Fleuren, & Warnaar, 1994) und mit dem proliferativen Verhal-

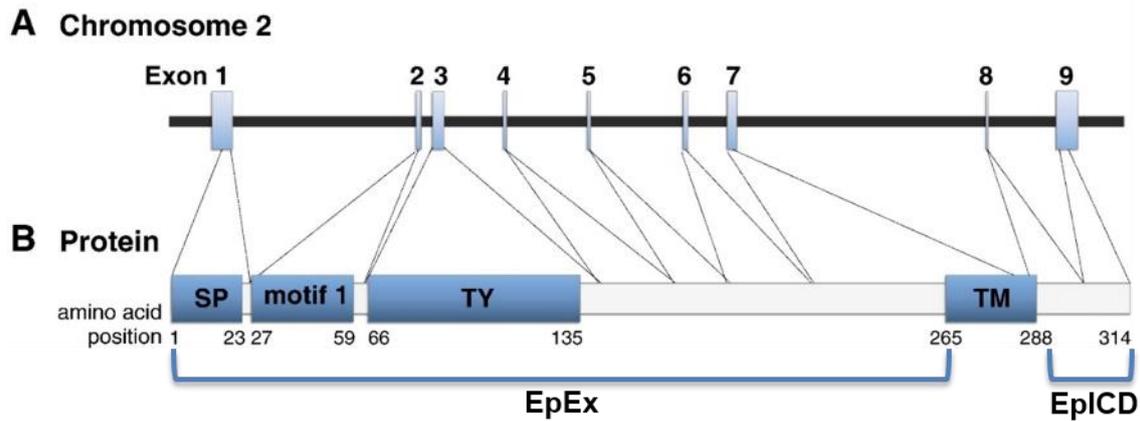
ten von Tumoren assoziiert ist (Litvinov et al., 1996; Schon et al., 1994). EpCAM wird in fast allen Epithelzellen des Körpers exprimiert, wohingegen in hämatopoetischen-, mesenchymalen-, neuroendokrinen- und Muskelzellen keine EpCAM Expression nachweisbar ist (Moldenhauer et al., 1987; Trzpis, McLaughlin, de Leij, & Harmsen, 2007). Auch wurde eine hohe Expression von EpCAM in humanen (Ng, Ang, Chan, & Choo, 2010) und murinen (Gonzalez, Denzel, Mack, Conrad, & Gires, 2009) embryonalen Stammzellen festgestellt, sowie der Einfluss EpCAMs auf die Embryogenese beschrieben (Trzpis et al., 2007). Über die Jahre hinweg erkannte man, dass eine hohe EpCAM-Expression mit einer reduzierten Überlebensrate in nodal-positiven Mammakarzinomen (Spizzo et al., 2004), Ovarialkarzinomen (Spizzo et al., 2006), Pankreasgallengangskarzinomen (Fong et al., 2008), Gallenblasenkarzinomen (Varga et al., 2004) und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Stoecklein et al., 2006) korrelierte. Dabei beschränkt sich die Expression von EpCAM nicht nur auf die basolaterale Membran, wie in normalen Geweben, sondern ist in Karzinomzellen auf der gesamten Oberfläche exprimiert (Trzpis et al., 2007). Dies bietet gute Angriffsmöglichkeiten gegen das EpCAM Molekül, da es von allen Seiten für z.B. eine Antikörper- oder *small-inhibitor-molecule*-Therapie zugänglich ist. Deshalb wurden schon in den 1990er Jahren Antikörper entwickelt, einerseits zu diagnostischen Zwecken, aber auch zur therapeutischen Anwendung (Sears, Herlyn, Steplewski, & Koprowski, 1984; Weiner et al., 1986). 1995 kam der erste monoklonale murine Antikörper Edrecolomab (17-1A) auf den Markt, welcher bei metastasierendem Kolonkarzinom genutzt wurde (J. Li & Zhu, 2010; Riethmuller et al., 1998; Riethmuller et al., 1994). Er wurde 2000 wieder in Deutschland aufgrund fehlender Wirksamkeit gegenüber der Standardbehandlung vom Markt genommen (Hartung et al., 2005; Punt et al., 2002). Zurzeit sind folgende Antikörper gegen EpCAM vorhanden: Catumaxomab ist ein trifunktionaler, bispezifischer Antikörper welcher EpCAM und das CD-3 Antigen auf T-Zellen bindet und diese dadurch aktiviert. Er wird zur Behandlung des malignen Aszites eingesetzt (Jager et al., 2012; Ruf et al., 2007). Des Weiteren wurde der humane monoklonale Antikörper Adecatumumab (MT201) entwickelt, der das Komplementsystem aktiviert, wenn er an EpCAM bindet, was zur Lyse der Zelle führt. In klinischen Studien zeigte sich bei den behandelten Patienten ein Überlebensvorteil bei metastasierendem Brustkrebs mit hoher EpCAM Expression (Schmidt et al., 2010). Der bispezifische T-Zellaktivator MT110 ist ein sogenanntes BiTE Molekül (*bispecific T-cell engager*), welches EpCAM und CD3 erkennt und dadurch das Immunsystem gegen EpCAM exprimierende Zellen aktiviert. MT110 zeigte einen signifikante Überlebensvorteil bei Brust- und Lungenkrebs im Mausmodell

(Brischwein et al., 2006). Auch ein bispezifischer EpCAM/CD133 Antikörper ist zurzeit in der Entwicklung. Dieser soll zielgerichtet TICs, durch ein an ihn gekoppeltes Toxin attackieren (Waldron, Barsky, Dougherty, & Vallera, 2014). Die Entwicklungen zeigen, dass EpCAM eine hohe Relevanz für die Krebstherapie hat und dass es von großer Notwendigkeit ist das Protein EpCAM näher zu charakterisieren.

### 1.2.1 Das EpCAM Gen

Das humane EpCAM Protein wird durch das Gen TACSTD1 kodiert (*tumour-associated-calcium-dependent signal transducer 1*) und ist auf dem Chromosom 2 (2p21) lokalisiert. Es gehört der Genfamilie GA-733 an, welches die Typ-I Transmembranproteine EpCAM und Trop-2 umfasst (Baeuerle & Gires, 2007; Calabrese et al., 2001; Szala et al., 1990). Ein klonierter, ca. 1,1kb umfassender Promoterbereich wurde beschrieben, welcher weder eine TATA- noch eine CAAT-Box enthält (Linnenbach et al., 1993). Die transkriptionelle Aktivität des TACSTD1 Gens wird durch NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  negativ (Gires, Eskofier, Lang, Zeidler, & Munz, 2003; Gires et al., 2001) und durch TCF4 positiv reguliert (Yamashita, Budhu, Forgues, & Wang, 2007). Zudem wirkt sich eine Demythelierung des EpCAM Gens positiv auf dessen Expression aus (Alberti, Nutini, & Herzenberg, 1994). Das EpCAM Gen erstreckt sich über 17,69 kb und besteht aus 9 Exons. Exon 1 besteht aus einem langen 5'-untranslatierten Bereich und kodiert für das Signalpeptid. Exon 2-8 werden vollständig translatiert und Exon 9 kodiert für den C-Terminus des Proteins, während der größte Teil des Exons 9 untranslatiert bleibt. Das aus Exon 1 translatierte Signalpeptid, ist für den Transport an die Plasmamembran erforderlich. Die extrazelluläre Domäne EpCAMs (EpEx) wird von den Exons 2-6 kodiert, wobei Exon 2 die EGF-ähnliche (*epidermal growth factor*) und Exon 3 die Thyroglobulin (TY) Domäne kodiert. Die Transmembrandomäne (TMD) wird von Exon 7 und die intrazelluläre Domäne EpCAMs (EpiCD) von den Exons 8 und 9 kodiert. Der kodierende Bereich der EpCAM mRNA umfasst 945 bp (Balzar, Winter, de Boer, & Litvinov, 1999) (Abbildung 2).

Verschiedene Mutationen des EpCAM Gens können zu einer gestörten Proteinstruktur führen. Eine dieser Mutationen führt zu einer Deletion des Exons 4 und manifestiert sich klinisch in einer schwer entzündlichen Darmerkrankung (*congenital tufting enteropathy*; CTE) (Mueller, McGeough, Pena, & Sivagnanam, 2014). Hierbei kommt es zu einem Fehlen von EpCAM an der Plasmamembran und dadurch zu einer gestörten Integrität des Darmepithels (Guerra et al., 2012; Kozan et al., 2015; Lei et al., 2012).



### Abbildung 2: Das EpCAM-Gen

(A) Darstellung der 9 Exons von hEpCAM auf dem Chromosom 2p21 (B) Zuordnung der Exons zu den entsprechenden EpCAM Proteinbestandteilen (Schnell, Cirulli, & Giepmans, 2013).

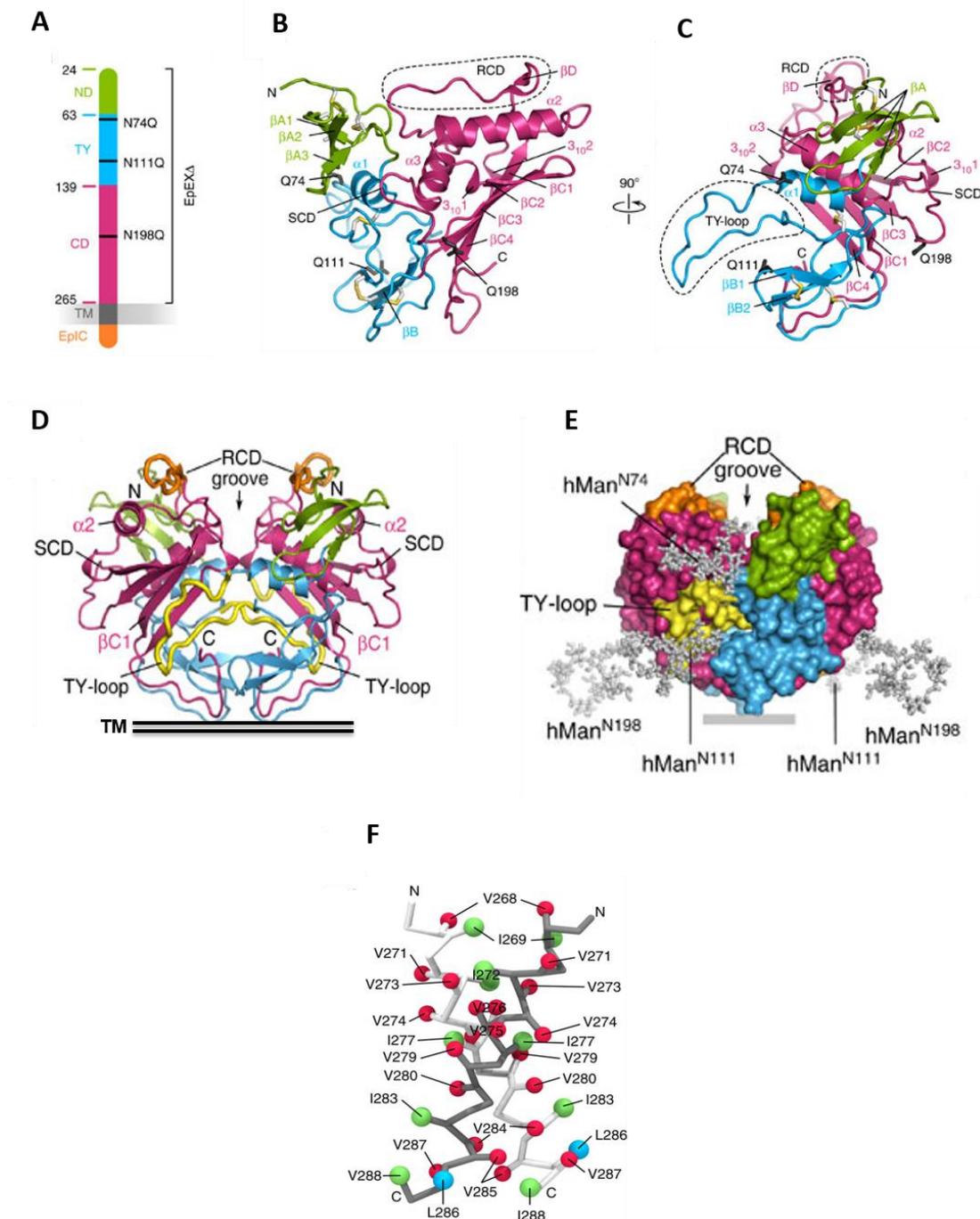
#### 1.2.2 Das EpCAM Protein

EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein vom Typ-I, d.h. der N-Terminus befindet sich außerhalb und der C-Terminus innerhalb der Zelle. EpCAM besteht aus 314 Aminosäuren. Dabei bilden die ersten N-terminalen Aminosäuren das Signalpeptid, das für den Transport in die Plasmamembran notwendig ist und danach zwischen Alanin<sup>23</sup> und Glutamin<sup>24</sup> abgespalten wird (Szala et al., 1990). Danach schließen sich weitere 242 Aminosäuren an, welche die extrazelluläre Domäne (EpEx) bilden. Diese besteht aus einer EGF-ähnlichen Domäne und einer Thyreoglobulin Domäne. Darauf folgt eine cysteinarme Region. Die Transmembrandomäne (TMD) besteht aus 23 hydrophoben Aminosäuren. Die intrazelluläre Domäne (EpICD) umfasst 26 Aminosäuren, bestehend aus zwei  $\alpha$ -Aktinin Bindestellen (Position 289-296 und 304-314). Mittels  $\alpha$ -Aktinin kann EpCAM mit dem Aktinzytoskelett interagieren (Balzar et al., 1998). Doch trotz Kenntnis der genauen Aminosäureanzahl von 314, was einem Molekulargewicht von 34,9 kDa entsprechen würde (Wilkins et al., 1999), ergaben sich bei der Analyse von Karzinomzellen im Western Blot Molakulargewichte von 38 bis 42 kDa (Litvinov, Velders, et al., 1994; Schon et al., 1993). Die beobachteten Banden lassen sich durch drei N-Glykosylierungsstellen an Asparaginresten (N<sup>74</sup>, N<sup>111</sup>, N<sup>198</sup>) erklären. Dabei hat die Glykosylierung an Asparagin<sup>198</sup> (N<sup>198</sup>), im Vergleich zu den Glykosylierungen an N<sup>74</sup>, N<sup>111</sup>, den stärksten Effekt auf die Stabilisierung EpCAMs (Munz, Fellingner, Hofmann, Schmitt, & Gires, 2008). Interessanterweise ist EpCAM in Tumoren des Hals-Kopf-Bereiches durch eine Hyperglykosylierung charakterisiert (Pauli et al., 2003). Zudem bildet EpCAM vor allem in Karzinomen mit den Proteinen Claudin 7, CO-029 (*tumour-associated scaffolding protein*) und dem Hyaluronsäure Rezeptor CD44v6 ein Tetramer.

Diese Ansammlung integraler Membranproteine kommen in Tetraspanin-reichen Mikrodomänen (TEMs) vor und korrelieren mit einer geringen Überlebensrate bei Patienten mit Kolonkarzinomen (Kuhn et al., 2007).

Bis dato war die genaue dreidimensionale Struktur von EpCAM unbekannt. 2014 wurde die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne (EpEx) mittels Röntgenanalyse untersucht und strukturanalytisch mittels Rosetta Software ausgewertet. Die Analyse zeigte in der Quartärstruktur die Form einer dichtgepackten, herzförmigen Kristallstruktur. Sie besteht aus einem cis-Dimer, zweier extrazellulärer EpCAM Domänen. Die extrazelluläre Domäne des Polypeptids hEpEx ist dabei in drei Domänen gefaltet: N-Domäne (ND), Thyroglobulin Domäne (TY) und Carboxyterminale Domäne (CD). Die Domänen sind im Dreieck angeordnet und bilden Kontaktflächen. Die ND (Glu<sup>24</sup>-Leu<sup>62</sup>) besteht aus einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ A1-3), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden ist. Es schließt sich die TY Domäne an (Ala<sup>63</sup>-Arg<sup>138</sup>), bestehend aus einem antiparallel verlaufenden zweisträngigen  $\beta$ B-Faltblatt, das eine  $\beta$ -Hairpin bildet und über eine hervorstehende Schleife (TY Schleife) mit der  $\alpha$ 1 Helix verbunden ist. Die Sekundärstruktur der dritten Carboxyterminale Domäne (CD, Val<sup>139</sup>-Lys<sup>265</sup>) beinhaltet  $\alpha$ -Helices und ein antiparallel verlaufendes  $\beta$ C-Faltblatt. Die prominente Schleife (RCD) wird durch den Verbund der  $\alpha$ 3-Helix mit dem  $\beta$ C-Faltblatt gebildet. *In vitro* bilden die beiden extrazellulären EpCAM Domänen ein cis-Dimer. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen der TY-Schleife (Arg<sup>80</sup>, Arg<sup>81</sup>, Arg<sup>83</sup>) und dem  $\beta$ C-Faltblatt der C-Domäne (Glu<sup>147</sup>, Glu<sup>187</sup>, Asp<sup>194</sup>) (Abbildung 3 A-D).

Der C-Domäne schließt sich die Transmembrandomäne an. Die Transmembrandomänen von zwei EpCAM Molekülen bilden innerhalb der Transmembran ein Helix Dimer aus. Sie sind durch die Aminosäuren Val<sup>276</sup>-Val<sup>280</sup> miteinander verbunden (Abbildung 3 F). Dies vermittelt einen stabilisierenden Einfluss auf die cis-Dimerisierung EpCAMs (Pavsic, Guncar, Djinovic-Carugo, & Lenarcic, 2014; Pavsic & Lenarcic, 2011).



### Abbildung 3: 3D-Struktur des humanen EpCAM Proteins

**(A)** Schematische Darstellung von EpCAM. Der extrazelluläre Anteil besteht aus drei Domänen: N-Domäne (ND, grün), TY-Domäne (blau) und CD (pink). **(B)** Cartoon Struktur der kompletten extrazellulären Domäne, in verschiedenen Orientierungen. Farbkodierung entspricht (A). Sekundäre Elemente wurden von N- Richtung C-Terminus durchnummeriert. Die mutierten N-Glykosylierungen wurden schwarz markiert. **(C)** 90° Drehung des EpCAM Monomers (B) um die y-Achse. **(D)** Cartoon Darstellung des EpEx cis-Dimer von der Seite. Farbkodierung entspricht (A), weiter ist der Loop der TY-Domäne in Gelb und RCD in der C-Domäne in Orange dargestellt. **(E)** Molekulare Darstellung der Oberfläche von der Seite mit implementierten Mannose Ketten an den glykosylierten Stellen (N<sup>74</sup>, N<sup>111</sup>, N<sup>198</sup>). Farbkodierung wie in (A) **(F)** Darstellung der Transmembrandomänen (TMD) des hEpCAM Dimers. (Pavsic et al., 2014)

## 1.2.3 Die Funktionen von EpCAM

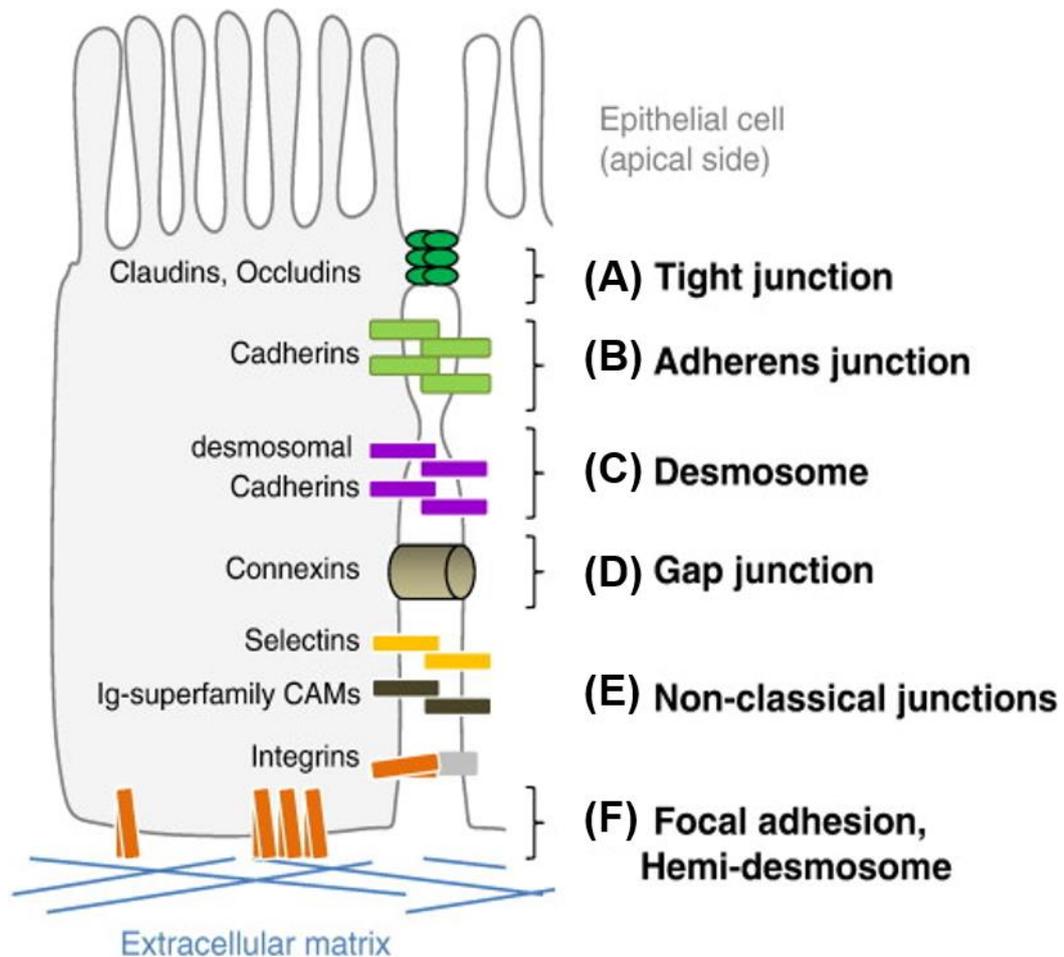
### 1.2.3.1 Zelladhäsion

Zell-Zell-Adhäsion ist ein wichtiger Regulator der Integrität von Zellkomplexen, welcher zudem eng mit Proliferation und Differenzierung verbunden ist. Die Zelladhäsion wird in der Regel durch Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecule*; CAMs) vermittelt, die in drei Superfamilien aufgeteilt werden: Cadherine, Claudine und die Immunglobulin Superfamilie (Cavallaro & Dejana, 2011). Dabei gehören drei Arten von Zell-Zell-Verbindungen zu den prominentesten (Abbildung 4 A-B; D):

Die *tight junctions* gewährleisten eine Abdichtung des inneren Milieus gegenüber der Außenwelt, sie werden durch Occludine und Claudine gebildet (Abbildung 4 A), letztere bestehen aus mehr als 20 Mitgliedern und sind integrale Membranproteinen mit vier Transmembrandomänen. Sie bilden die *tight junctions* an der Grenze zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, Nava, & Jaramillo, 2003).

Die *adhesive junctions* sorgen für den mechanischen Zusammenhalt von Zellen bzw. Zellverbänden und werden von Cadherinen gebildet (Abbildung 4 B). Dabei sind sie über die intrazelluläre Domäne mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin assoziiert, welche die Bindung an das Aktin-Zytoskelett vermittelt (Jiang, 1996).

Die *gap junctions* stellen direkte Verbindungen zwischen den Zellen dar, sie werden durch Connexine gebildet (Abbildung 4 D). Dabei sind die *gap junctions* mit Mikrofilamenten befestigt und verbinden das Zytoplasma zweier adhärenter Zellen (Schnell et al., 2013). Diese ermöglichen einen schnellen Austausch von Ionen und Metaboliten. Im menschlichen Genom wurden etwa 20 Connexine identifiziert (Evans & Martin, 2002).



#### Abbildung 4: Zelladhäsion

Schematische Darstellung der Zelladhäsionsmoleküle und Adhäsionsverbindungen (*adhering junctions*). (A) Claudine und Occludine sind mit Aktinfilamenten verbunden und bilden *tight junctions* zwischen benachbarten Zellen aus. (B) Cadherine sind mit dem Aktinzytoskelett verbunden und bilden *adherens junctions*. (C) Desmosomale Cadherine sind mit Intermediärfilamenten verbunden und bilden *desmosome*. (D) Connexine sind mit den Mikrofilamenten verbunden und bilden *gap junctions*. (E) Die Nicht-klassischen Adhäsionsverbindungen (*non-classical junctions*) werden von Selektinen bzw. aus Proteinen aus der Ig-Zelladhäsionssuperfamilie (*Ig-superfamily CAMs*) gebildet. (F) Integrine vermitteln die Zell-Matrix-Verbindung (Schnell et al., 2013).

EpCAM wurde initial als Zelladhäsionsmolekül beschrieben, lässt sich jedoch keiner der 3 Superfamilien von Adhäsionsverbindungen (*tight junction*, *adherens junction*, *gap junction*) zuordnen (Schnell et al., 2013). Es wurde als homophiles, kalziumunabhängiges Adhäsionsmolekül beschrieben, da es bei Überexpression von hEpCAM in murinen Fibroblasten und in der Brustkrebszelllinie L153S zu einer vermehrten Aggregation der Zellen kam (Litvinov, Velders, et al., 1994). Die Zelladhäsion soll durch eine direkte trans-Interaktion der extrazellulären EpCAM Domänen (EpEx) des EpCAM Dimers vermittelt werden (Pavsic et al., 2014). Dabei könnte EpCAM durch die zytoplasmatische Domäne über  $\alpha$ -Aktinin mit dem Zytoskelett verbunden sein (Balzar et al., 2001; Trebak et al., 2001).

Anfängliche Untersuchungen bezüglich der Funktion EpCAMs wurden vor allem in Fibroblasten und Karzinomzellen mesenchymalen Phänotyps durchgeführt, welche kaum andere Zelladhäsionsmoleküle exprimierten und somit keine natürliche Zell-Zell-Adhäsion aufwiesen (Litvinov, Velders, et al., 1994). Deshalb untersuchte man die Funktion in der natürlichen Umgebung EpCAMs, in Epithel- und Karzinomzellen. EpCAM ist dabei über die gesamte basolaterale Membrandomäne verteilt, ohne dabei in *adherens junction* und *tight junctions* angereichert zu sein (Balzar, Prins, et al., 1999). Obwohl zunächst eine Expression EpCAMs zu einer verstärkten Zelladhäsion in mesenchymalen Zellen führte, welche kaum CAMs exprimierten, hatte eine Überexpression in epithelialen E-Cadherin exprimierenden Zellen eine Schwächung der Zell-Zell-Adhäsion zur Folge. Dieser Effekt wurde durch eine EpCAM-vermittelte Zerstörung der Verknüpfung des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett erklärt. Dabei wird der relativ starke E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakt durch die schwach vermittelte Adhäsion EpCAMs ersetzt (Litvinov et al., 1997). Die Phosphoinositol-3-Phosphat Kinase (PI3K) wurde dabei als Signalwegmodulator identifiziert. Dabei bindet die PI3K an  $\alpha$ -Catenin, wodurch die Bindung zwischen dem Cadherin Komplex und dem Aktinzytoskelett geschwächt wird (Winter, Cirulli, Briaire-de Bruijn, & Litvinov, 2007).

Um die grundlegenden molekularen Mechanismen der EpCAM Funktion genauer zu verstehen, wurden Untersuchungen *in vivo* bei Maus-, Krallenfrosch und Zebrafischmodellen durchgeführt. Drei unabhängige Gruppen etablierten murine EpCAM Knockout Modelle in Mäusen. Der erste murine EpCAM Knockout ergab einen embryonal letalen Phänotyp an Tag 12,5 der Gestation aufgrund eines Plazentadefekts. Das Ergebnis legte nahe, dass EpCAM für die Differenzierung vitaler Organe einschließlich des Darms, der Niere, des Pankreas, der Lunge, der Augen und der Gliedmaßen von Bedeutung ist (Nagao et al., 2009). Doch Guerra *et al.* konnten keinen embryonal letalen Phänotyp bestätigen, sondern beschrieben ein vermindertes Wachstum der Mäuse und eine Störung der mukösen Darmarchitektur. Die Veränderungen waren histologisch vergleichbar zu der im Menschen vorkommenden Krankheit CTE (*congenital tufting enteropathy*). Die damit einhergehenden Darmprobleme in den Knockout Mäusen führten perinatal zum Tode (Guerra et al., 2012). Denselben Phänotyp konnten Lei *et al.* ebenfalls beobachten, jedoch mit einer geringeren Rate an embryonal letalen Vorkommnissen (Lei et al., 2012). In beiden Knockout Modellen wurde eine Zerstörung der Darmarchitektur beschrieben. Doch kamen die beiden Gruppen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen in Bezug auf die molekularen Gründe für den beobachteten Phäno-

typ. Guerra *et al.* führten die morphologischen Veränderungen der Darmarchitektur auf eine Zerstörung der *adhesive junctions* zurück. Dabei sollte ein Verlust EpCAMs zu einer Mislokalisierung von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin an der Zellmembran führen und somit zu deren Schwächung. Der Einfluss EpCAMs auf die *adhesive junction* wurde auch im Zebrafisch und im *Xenopus laevis* Modell beschrieben (Maghzal, Kayali, Rohani, Kajava, & Fagotto, 2013; Slanchev *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu, sahen Lei *et al.* bezüglich der E-Cadherin Lokalisation in den Knockout Mäusen keinen Unterschied zum Wildtyp. Die Gruppe beobachtete hingegen eine Schwächung der *tight junctions* verursacht durch die fehlende Rekrutierung von Claudinen durch mEpCAM. Ähnliches wurde auch im Rattenmodell beschrieben. Dort konnte man eine Mislokalisierung von Claudin 7 beobachten, was zusammen mit EpCAM, CO-029 und CD44v zum Tetraspaninkomplex gezählt wird (Thuma & Zoller, 2013).

### 1.2.3.2 Spaltungsabhängige Induktion der Proliferation

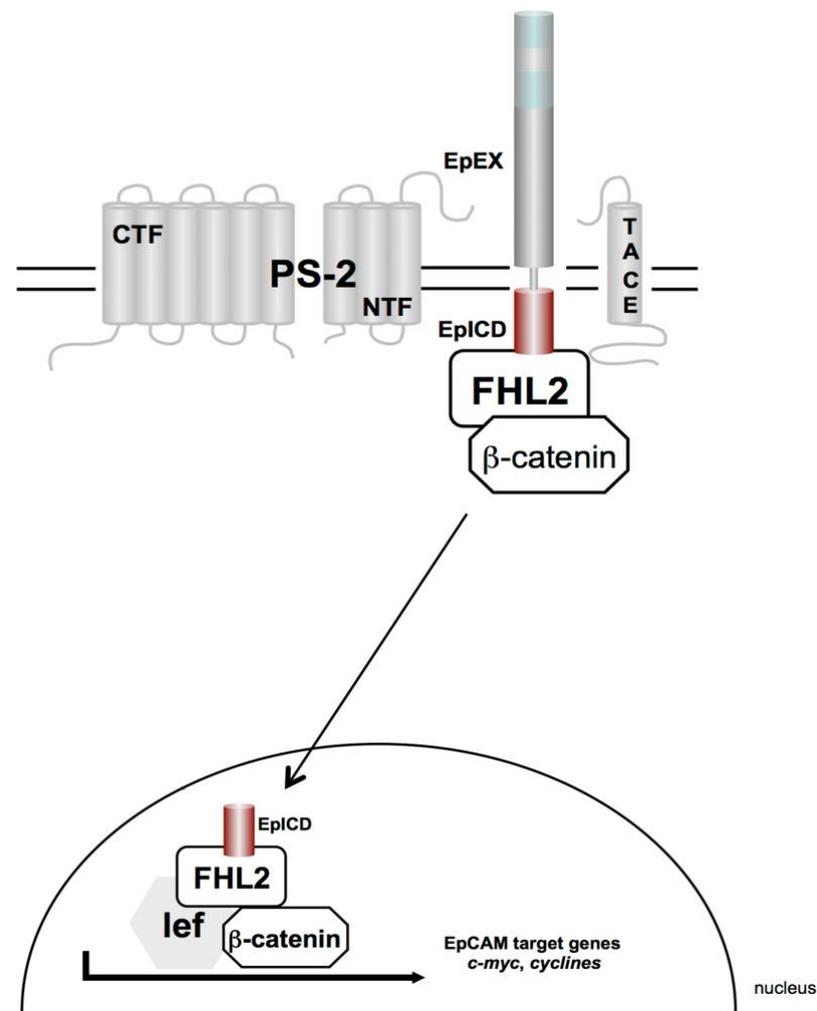
In unterschiedlichen Karzinomen konnte durch eine vermehrte EpCAM Expression eine höhere Zellteilungsrate beobachtet werden (Baeuerle & Gires, 2007; Munz *et al.*, 2004; Wenqi *et al.*, 2009). Durch eine weiterführende Aufschlüsselung der Signalkaskade mittels Immunfluoreszenz und biochemischen Methoden konnte eine Spaltung des Proteins nachgewiesen werden. Grundlage der Spaltung EpCAMs stellt dabei die regulierte intramembrane Proteolyse RIP dar (Maetzel *et al.*, 2009). Die regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) ist ein hochkonserviertes System zur Degradierung von Proteinen und zur Induktion von Signalkaskaden (Kopan & Ilagan, 2004; Urban & Freeman, 2002). Der Ablauf lässt sich generell in drei Spaltungen gliedern. Die erste Spaltung ist der geschwindigkeitsbestimmende und damit regulierende Schritt und kann im Zytsolol oder an der Zellmembran stattfinden. Er verkürzt den extrazellulären Anteil auf weniger als 30 Aminosäuren und generiert dadurch ein membranständiges C-terminales Fragment (CTF). Nun ist der  $\gamma$ -Sekretasekomplex in der Lage, das Substrat durch einen  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Schnitt weiter zu spalten, wobei extrazelluläre A $\beta$ -ähnliche Fragmente und intrazelluläre Fragmente (ICDs) entstehen (Brown, Ye, Rawson, & Goldstein, 2000). Prominente Beispiele für Substrate der RIP sind unter anderem das *Amyloid Precursor Protein* APP und Notch. Durch fehlerhafte Spaltung von APP kommt es zur Akkumulation von A $\beta$ -Fragmenten, die durch eine pathologische Aggregation im Gehirn von Patienten zur Alzheimer Erkrankung führt (Lichtenthaler, Haass, & Steiner, 2011). In Notch führt die regulierte intramembrane Proteolyse, zur Freisetzung eines intrazellulären Fragments (NICD). Vier unterschiedliche Notch Rezeptoren (Notch 1-4) können durch die fünf ver-

schiedenen Liganden Jagged 1-2 und Delta 1-3 aktiviert werden. Nach Aktivierung kommt es zur Spaltung von Notch Rezeptoren durch Proteasen der ADAM Familie und zur Generierung eines CTF-Fragments, welches nach Endozytose durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert wird. Das resultierende Notch-ICD kann in den Kern translozieren und über die Bindung an das CSL Adaptorprotein einen Repressor der Transkription verdrängen, Aktivatoren rekrutieren und somit die Transkription von Zielgenen steuern. Dies führt zur Expression von Proteinen, die für die Organdifferenzierung von Bedeutung sind (Mumm & Kopan, 2000).

EpCAM wird ähnlich wie Notch Rezeptoren an der Zellmembran durch die RIP aktiviert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der regulierten intramembranen Proteolyse von EpCAM ist die erste Spaltung innerhalb der extrazellulären Domäne. Sie wird ausgeführt durch die Metalloprotease *tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme* (TACE/ADAM17), ein Mitglied der ADAM Proteinfamilie (Edwards, Handsley, & Pennington, 2008). Es kommt ebenfalls zur Generierung eines membranständigen C-terminalen Fragments (CTF). Das CTF wird mit hoher Effizienz von dem  $\gamma$ -Sekretasekomplex, welcher Presenilin-2 (PS-2) enthält, weiter gespalten (Maetzel et al., 2009). Bei murinem EpCAM spaltet die  $\gamma$ -Sekretase das C-terminale Fragment (CTF) an zwei verschiedenen  $\gamma$ -Schnittstellen unter Generierung von A $\beta$ -Fragmenten und an vier unterschiedlichen  $\epsilon$ -Schnittstellen, was zum Freisetzen von intrazellulären Domänen (EpiCD) von mEpCAM ins Zytosol führt (Hachmeister et al., 2013). Das generierte EpiCD wechselwirkt mit dem zentralen Interaktionspartner *four and a half LIM domains* Protein (FHL-2) und  $\beta$ -Catenin, und bildet einen Komplex, der im Zellkern gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor *lymphoid enhancer-binding factor 1* (Lef-1) transkriptionell aktiv ist (Maetzel et al., 2009). Das ermöglicht unter anderem die Induktion des Zellzyklusproteins Zyklin D 1 und des onkogenen Transkriptionsfaktors c-Myc (Abbildung 5), welche mit Proliferation assoziiert sind (Chaves-Perez et al., 2013; Munz et al., 2004). In humanen embryonalen Stammzellen und in Krebsstammzellen wurde eine Funktion der RIP und von EpiCD bei der Regulation der Reprogrammierungsfaktoren c-Myc, Oct-4, Nanog, Sox2 und Klf4 nachgewiesen (H. P. Huang et al., 2011; Imrich, Hachmeister, & Gires, 2012; Lin et al., 2012; Lu et al., 2010). Diese induzieren Stammzelleigenschaften, wie Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Lu et al., 2010). Zusätzlich wird eFABP durch EpCAM-abhängige Prozesse reguliert. Folglich beeinflusst EpCAM neben den Stammzelleigenschaften und proliferativen Signalwegen, auch den zellulären Metabolismus (Munz, Zeidler, & Gires, 2005). Die Prozessierung EpCAMs scheint vor allem in Karzinomzellen vorzukommen und nicht in normalen Epithelgewebe (Ralhan, He,

et al., 2010). Des Weiteren wurde die Lokalisation von EpICD im Nukleus in mehreren Karzinomen nachgewiesen, unter anderem in Kolon-, Brust-, Prostata-, Kopf-Hals- und Ösophaguskarzinomen. Wohingegen in der normalen Darmmukosa, dem normalen Brust-, Prostata, Kopf-Hals- und Ösophagusgewebe EpICD vor allem membranständig lokalisiert ist (Maetzel et al., 2009; Ralhan, He, et al., 2010).

Bei der Identifizierung der Schnittstellen auf der Ebene einzelner Aminosäuren bei murinem EpCAM und Untersuchung der Spaltung von humanem EpCAM wurde neben der ADAM Protease, eine zusätzliche Protease, namens  $\beta$ -Sekretase-1 beschrieben (BACE1) (Hachmeister et al., 2013). BACE1 spielt eine zentrale Rolle bei der Alzheimer Erkrankung (Ghosh, Brindisi, & Tang, 2012). BACE1 erreicht das Optimum seiner enzymatischen Aktivität bei dem pH Wert 4,5 (Cole & Vassar, 2007). Dieses pH-Optimum legt nahe, dass EpCAM von BACE1 vor allem in einem sauren Milieu gespalten wird, was auch von Hachmeister *et al.* gezeigt worden ist (Hachmeister et al., 2013). Weiterhin wurde ersichtlich, dass mEpICD sowie hEpICD einer effizienten proteasomalen Degradation unterliegt, welche indirekt durch Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT und direkt durch Hemmung des Proteasoms mittels  $\beta$ -Clasto-Lactacystin inhibiert werden kann (Hachmeister et al., 2013).



### Abbildung 5: Spaltungsabhängige Induktion der Proliferation

Schematische Darstellung der Spaltung von EpCAM. EpCAM Spaltung durch RIP mittels TACE und PS-2. EpICD bildet zusammen mit FHL2 und β-Catenin einen Komplex im Zytosol, welcher im Nukleus mit Lef interagiert und an die DNA bindet. Es kommt unter anderem zur Expression von c-Myc und Zyklin D1, welche unter anderem die Proliferation fördern (Imrich et al., 2012; Maetzel et al., 2009).

## 2. Zielsetzung

Das Typ-I Transmembranprotein EpCAM ist ein Tumor-assoziiertes Antigen, welches in der Mehrzahl von Karzinomen stark exprimiert wird. In der Klinik wird EpCAM als diagnostischer Marker und zur immuntherapeutischen Behandlung von Karzinompatienten eingesetzt. Funktionell spielt EpCAM eine Rolle in der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und der Proliferation. Die Eigenschaft EpCAMs Zellproliferation zu steuern wird durch eine regulierte intramembrane Proteolyse initiiert, die in der Freisetzung einer signaltransduzierenden intrazellulären Domäne resultiert.

Ein Hauptziel meiner Arbeit war es, die proteolytischen Spaltungen eingehender zu charakterisieren und die Spaltsequenzen zu definieren. Unter Verwendung zell- und biochemischer Ansätze und massenspektrometrischer Analysen sollten die in die Spaltung involvierten Proteasen und relevante Aminosäuren innerhalb der EpCAM Sequenz identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es, *in vitro* die Rolle von EpCAM und dessen Spaltung auf die Zell-Zell-Adhäsion in Karzinomzelllinien zu charakterisieren. Zu diesem Ziel sollten einerseits niedermolekulare Inhibitoren der RIP zur Hemmung der EpCAM Spaltung verwendet werden und andererseits zelluläre hEpCAM Knockout mittels CRISPR-Cas9 Technologie in Karzinomzellen generiert werden. Mit Hilfe solcher EpCAM-negativen Karzinomzellen sollte der Beitrag EpCAMs zur Zell-Zell-Adhäsion eingehend studiert werden. Diese Arbeiten sollten anschließend durch die proteinbiochemische Anwendung des *atomic force microscopy* (AFM) ergänzt werden. Hier sollte in einem zellfreien System die Fähigkeit von EpCAM Molekülen zur Bildung von adhäsiven Komplexen bestimmt werden.

Die geplanten Arbeiten sollten einen detaillierten Einblick in die molekulare Funktionsweise von EpCAM in der Regulation von Zellproliferation und –adhäsion erlauben und somit EpCAM als Zielmolekül in der molekularen Onkologie besser definieren.

## 3. Material

### 3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Artikel	Firma
Acrylamide, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Hercules (USA)
Aprotinin	VWR, Darmstadt
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bromophenol blau	Serva GmbH, Heidelberg
C3	Merck, Darmstadt
Calcein AM	PromoKine/PromoCell GmbH, Heidelberg
c-Myc Agarose Affinity Gel antibody	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DAPT	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4,5g/l glucose/ with L-glutamine)	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM high glucose/ w/o calcium/ w/o L-glutamine)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
DNA Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
ECL Blotting Substrat	Pierce, Bonn
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
FLAG-Agarose-Beads	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
G418 (Geneticin)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Gene Ruler 1kb DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
GFP-Trap	Chromotek, München
GI254023X	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hanks's buffered saline solution	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
HEPES Puffer (1M)	Biochrom AG, Berlin
High Pure Plasmid Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore, Bedford (USA)
Leupeptin	VWR, Darmstadt
Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Nukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Organische Lösungsmittel	Merck, Darmstadt
PBS Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
PBS Lösung	Apotheke Klinikum Großhadern, München
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pepstatin	VWR, Darmstadt
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
PEG (Polyethylenglycol)	Merck, Darmstadt
Protein A Sepharose	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Proteasomeninhibitor Lactacystin $\beta$ -Lacton	Santa Cruz Biotechnology Dallas (Texas)
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete, EDTA free	Roche, Mannheim
Proteinmarker V	Peqlab, Erlangen
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
RNAse A	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase, PCR Reagenzien	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, Richmond (USA)
AcTEV™ Protease	Invitrogen, Köln
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	IBA, Göttingen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween	Serva, Heidelberg

### 3.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Artikel	Firma
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore, Bedford (USA)
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
MATra Transfektionsreagenz	Iba GmbH, Göttingen
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machery and Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Machery and Nagel, Düren
Proteingrößenstandard „Protein Marker V“	Peqlab, Erlangen
Quiagen Plasmid Purification	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Vewendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
3MM Whatman-Papier	Roche, Mannheim
6-well Zellkultur Platte, flacher Boden	Nunc, Wiesbaden
96-well Zellkulturplatte, flacher Boden	Nunc, Wiesbaden
96-well Zellkulturplatte, runder Boden	Nunc, Wiesbaden
96 Magnetplatte	Iba GmbH, Göttingen
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipette	Costar, New York (USA)
Erlenmeyerkolben	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
Faltenfilter	Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München

Handschuhe Latex	Sempermed, Wien (AU)
Handschuhe Nitril	Sempermed, Wien (AU)
Immobilion-P Membran (0,45µm)	Millipore, Bedford (USA)
Kryogefäße	Becton Dickinson, Heidelberg
Mica sheets	SPI Supplies, West Chester, PA
Microlance 3/24G Kanüle	Millipore, Schwalbach
Parafilm	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	American National Can, Menasha (USA)
Pipettenspitzen (gestopft)	Starlab, Hamburg
Reagenzreservoir	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F)
Si3N4-Spitzen für den Cantilever	MLCT, Bruker, Mannheim
Skalpell	Feather/PFM, Köln
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Stripetten, Corning Costar®	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäß 1,5ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäß 1,5ml (Nukleasefrei)	Costar, New York (USA)
Zentrifugengefäß 15ml/50ml	Becton, Dickinson, Heidelberg

### 3.1.4 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Autoclave Systec 95	Systec GmbH, Wettenberg
Blotting Kammer	BioRad, Hercules (USA)
ChemiDoc XRS+ imaging system	BioRad, Hercules (USA)
Durchflusszytometer „FACS Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer „CyFlow®Cube 8“	Sysmex, Norderstedt

Durchflusszytometer und Zellsorter FACSAria	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgeräte	BioRad, Hercules (USA)
ELISA-Reader ELx800	BioTek Instruments, Winooski (USA)
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank (-4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlsystem mit flüssigen Stickstoff	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroliter-Pipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
Mikrowelle	AEG, Berlin
Multikanalpipette „Transferpette-8“	Brand GmbH, Wertheim
Nanowizard III	JPK Instruments, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Halbergmoos
Plattenausleser „MRX“	Dynatech Laboratories, Bad Nauheim
Pipetboy® Comfort	Integra Biosciences, Fernwald
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttelinkubator 2Certomat	Braun, Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
Thermocycler „RoboCycler Gradient 96“	Stratagene, La Jolla (USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Victor Wallac	PerkinElmer, Waltham (USA)
Vortex Mixer	IKA Works Inc., Wilmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zellkulturinkubator, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus, Hanau

### 3.1.5 Computerprogramme

Tabelle 5: Vewendete Computerprogramme

Computerprogramm	Firma
ApE	Wayne Davis (Utah Universität), Salt Lake City (USA)
BD Cell Quest Pro Version 5.2.1	Becton Dickinson, Heidelberg
Data Explorer TM Version 4.3	Applied Biosystems Inc., Waltham (USA)
Endnote	Thomson Reuters Corporation, NY (USA)
FlowJo	TreeStar (USA)
Image Lab	BioRad, Hercules (USA)
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
MS Office 2010	Microsoft, Redmond (USA)
PyMol	Schrödinger
Rosetta software (Robetta modeling server)	Washington D.C, (USA)

### 3.1.6 Dienstleistungen

Tabelle 6: Vewendete Dienstleistungen

Dienstleistung	Dienstleister
DNA-Sequenzierung	GATC, Köln
DNA-Sequenzierung	Sequiserve, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried

### 3.2 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Anwendung
Primärantikörper		
Anti-Dsg3, Maus (AK23)	Biozol, Eching	AFM
Anti-hEpCAM (24-93AS) (C-10), Maus	Santa Cruz, USA	WB
Anti-hEpCAM (Ber-EP4), Maus	DakoCytomation, (DK)	FACS, AFM

Anti-FLAG (F1804), Maus Monoklonal	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	FACS, WB
Anti-GAPDH, Kaninchen	Bethyl-Laboratories, (USA)	WB
Anti-YFP, Kaninchen	Abcam, (UK)	WB
<b>Sekundärantikörper</b>		
PO Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, (USA)	WB
HRP Ziege-anti Maus IgG	DakoCytomation, (DK)	WB
FITC Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, (USA)	FACS

### 3.3 Oligonukleotide

#### 3.3.1 Primer

Verwendete Primer wurden von der Firma Metabion International AD (Planegg) hergestellt.

**Tabelle 8: Verwendete Primer**

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5`-3`Orientierung)</b>	<b>Verwendung</b>
<b>hEpCAM-TEV-FLAG</b>	FW_NheI_Kozak_hEpCAM (PCR-Primer 1)	AAAGCTAGCGCCGCCACCAT- GGATGGCGCCCCCGCAGGTCC	Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen (hEpCAM)
	BW_hEpCAM_FLAG_TEV (PCR-Primer 3)	CTTATCGTCGTCATCCTTG- TAGTCTCCTTGAAAG- TATAGGTTTTCTT- GAGAAGAATTTTGAACCA	Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen (hEpCAM)
	FW_TEV_FLAG_hEpCAM (PCR-Primer 2)	GAAAACCTATACTTTCAAG- GAGACTACAAGGAT- GACGACGATAAGAAACTCA- GAATGATGTGGA	Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen (hEpCAM)
	BW_NheI_hEpCAM (PCR-Primer 4)	TTTGCTAGCTTATGCATT- GAGTTCCCTAT	Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen (hEpCAM)
<b>hEpEX-Fc</b>	FW_HindI I_Kozak_hEpEX	GATCAAGCTTGCCGCCACCAT- GGCGCCCCCGCAGGTCC	Bestimmung der Adhäsionskraft mittels AFM
	BW_Sal I_hEpEx	GATCGTCGACTTTTAGAC- CCTGCATTGAGA	Bestimmung der Adhäsionskraft mittels AFM

### 3.3.2 qRT-PCR Primer

Alle Sequenzen der aufgelisteten Primer wurden der „Harvard PrimerBank“ entnommen.

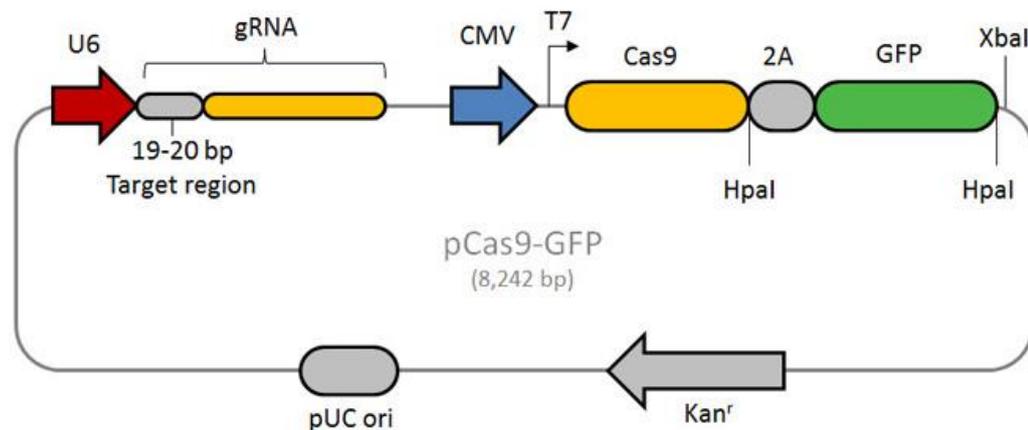
Tabelle 9: Verwendete qRT-PCR Primer

Primer	Sequenz (5´-3´ Orientierung)
FW_hEpCAM	GCAGCTCAGGAAGAATGTG
BW_hEpCAM	CAGCCAGCTTTGAGCAAATGAC
FW_GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC
BW_GAPDH	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

### 3.4 Plasmide und CRISPR-Cas9 Konstrukt

Tabelle 10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
141-pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycin Resistenz	Prof. T. Schröder
141 pCAG-3SIP: YFP	Expression von YFP	M. Hachmeister
141 pCAG-3SIP: hEpICD-YFP	Expression von EpICD (hEpCAM)-YFP	H.Kremling
141 pCAG-3SIP: Myc-hCTF-FLAG-TEV-YFP	Expression von Myc-C-terminales Fragment (hEpCAM)-FLAG-TEV-YFP	K. Boboswki
141 pCAG-3SIP: hEpCAM-TEV-FLAG	Expression von hEpCAM-TEV-FLAG	Vorliegende Arbeit
PS521 MCS-Fc in PCR-3	CH2 & CH3 Domäne von IgG1, CMV, SV40, Kanamycin/Neomycin Resistenz	Prof. P. Schneider
PS521 MCS-Fc in PCR3: hEpEx-Fc	Expression von rekombinanten hEpEx-Fc	Vorliegende Arbeit
CRISPR-Cas9 Konstrukt (Abbildung 6)	Sequenz gRNA (5´-3´ Orientierung) und Beschreibung	Referenz
CRISPR-Cas9 gRNA: hEpCAM (Exon 3)	CCAAATGTTTGGTGATGAAGGC Targetierung von Exon 3 des Reversenstrangs (3´-5´) von hEpCAM	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen



**Abbildung 6: CRISPR-Cas9 Konstrukt von Sigma-Aldrich GmbH**

Der Vektor enthält unter anderem eine gRNA, das Cas9, GFP und eine Kanamycin Resistenz. Die gRNA enthält 19-20bp, welche komplement zu der entsprechenden Ziel DNA Region sind und daran binden. Das Cas9 ist das Enzym, welches an der gebundenen Sequenz einen Doppelstrangbruch durchführt. Das durch die GFP Sequenz kodierende Protein, wird verwendet um transfizierte Tellen anhand der grünen Fluoreszenz (Anregungs-/Emissionsmaximum: 483/506nm) zu identifizieren und zu sorten. Die Kanamycin Resistenz wird verwendet, um transformierte Bakterien zu selektionieren.

(Sigma-Aldrich: Tips for Cell Engineering using Cas9-GFP CRISPR plasmids – 5. Plasmid Map and Features, URL: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/tips-for-cell-engineering-crispr-cas9.html>, 10.01.2017)

### 3.5 Bakterien

Tabelle 11: Verwendete Bakterien

Bakterium	Beschreibung	Herkunft
E. coli DH10 $\beta$	Plasmidamplifikation	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.6 Zelllinien

Tabelle 12: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz/Bemerkung
HEK 293	Embryonale Nierenzelllinie (Homo sapiens)	(Graham, Smiley, Russell, & Nairn, 1977); DSMZ#ACC305
HEK 293: YFP	Embryonale Nierenzelllinie (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: YFP
HEK 293: EpICD-YFP	Embryonale Nierenzelllinie (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: hEpICD-YFP
HEK 293: EpCAM-TEV-	Embryonale Nierenzelllinie	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: hEpCAM-TEV-

FLAG	(Homo sapiens)	FLAG
HEK 293: Myc-CTF-TF-YFP	Embryonale Nierenzelllinie (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: Myc-hCTF-FLAG-TEV-YFP
HEK 293: hEpEx-Fc	Embryonale Nierenzelllinie (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor PS521 MCS-Fc in PCR3: hEpEx-Fc
FaDu	Hypopharynx Karzinom (Homo sapiens)	ATCC®-HTB-43™
FaDU: EpCAM-TEV-FLAG	Hypopharynx Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: hEpCAM-TEV-FLAG
FaDu: Myc-CTF-TF-YFP	Hypopharynx Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: Myc-hCTF-FLAG-TEV-YFP
HCT-8	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	ATCC®-CC-244™
HCT-8: EpCAM-TEV-FLAG	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: hEpCAM-TEV-FLAG
HCT-8: Myc-CTF-TF-YFP	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor 141 pCAG-3SIP: Myc-hCTF-FLAG-TEV-YFP
HCT-8-CC#L21+	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor CRISPR-Cas9 (hEpCAM): hEpCAM positiv
HCT-8-CC#L13	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor CRISPR-Cas9 (hEpCAM): hEpCAM K.O.
HCT-8-CC#L20	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor CRISPR-Cas9 (hEpCAM): hEpCAM K.O.
HCT-8-CC#H4	Kolon Karzinom (Homo sapiens)	Transfektion mit Vektor CRISPR-Cas9 (hEpCAM): hEpCAM K.O.
CHO	Ovar (Hamster)	AG Prof. Spindler
CHO: DSG3-Fc	Ovar (Hamster)	AG Prof. Spindler

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Untersuchung der Genexpression mittels qRT-PCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*)

##### 4.1.1.1 RNA Extraktion und Generierung von cDNA

Die Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit (Quiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aus Zellen extrahiert. Dafür wurde das Zellpellet zunächst in RLT Puffer lysiert, auf eine QiaShredder Spin Säule aufgetragen und für 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 600  $\mu$ l Ethanol und vollständigem Mischen wurde die Probe auf eine RNeasy Spin Säule pipettiert, woran die RNA bindet. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Waschen der Säule und Trockenzentrifugation wurde die RNA mit 30  $\mu$ l RNase freiem Wasser in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. Die Konzentration wurde mittels Quarz Küvette (1  $\mu$ l RNA+ 99  $\mu$ l 10 mM Tris) in einem GeneQuantPro Spektrophotometer bestimmt.

1000 ng der Gesamt-RNA wurde mit dem Quiagen Kit QuantiTect Reverse Transcription, nach Verdau restlicher genomischer DNA, in cDNA umgeschrieben. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

##### 4.1.1.2 Real-time-quantitative-PCR

Um den mRNA Gehalt selektierter Gene quantitativ bestimmen zu können, wurde die hergestellte cDNA mittels qPCR analysiert. Der Ansatz enthielt *Forward* und *Backward* Primer zum Amplifizieren der zu untersuchenden Genabschnitte, Wasser, die hergestellte cDNA und den LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix, welcher doppelsträngige DNA bindet. Durch den in SYBR Green I Master enthaltenen Cyanin-Farbstoff wird bei Bindung an doppelsträngiger DNA grünes Licht ( $\lambda_{\max} = 521$  nm) emittiert. Das freigesetzte Licht wurde mit Hilfe eines Plattencycler LightCycler® 480 analysiert, wodurch die Menge an cDNA und dadurch indirekt der mRNA-Gehalt bestimmt werden konnte. Ein Mastermix Ansatz (Tabelle 13) wurde entsprechend der Probenanzahl vorbereitet. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert.

*Verwendeter Reaktionsansatz:*

Tabelle 13: Reaktionsansatz qPCR

Reagenz	Volumen
SYBR Green I Master	5 µl
cDNA (Verdünnung 1:10)	1 µl
Primer sense (10 µM)	1 µl
Primer antisense (10 µM)	2 µl
Σ	10 µl

Analysiert wurden die Ansätze mittels LightCycler® 480 (Roche).  
Als Protokoll wurden folgende Temperaturen und Zeiten gewählt.

Tabelle 14: qPCR Protokoll

Temperatur	Zeit	Ramp rate (°C/s)	Zyklen	Detektionsmodus	Reaktion
95°C	10 min	4,4	1	--	Vorinkubation
95°C	10 s	4,4	45	--	Amplifikation
65°C	10 s	2,2		--	
72°C	15 s	4,4		„Single“	
95°C	5 s	4,4	1	--	Schmelzkurve
65°C	1 min	2,2		--	
97°C		1,1		kontinuierlich	
40°C	30 s		1	--	Kühlung

Ausgewertet wurde mittels der Software LightCycler® 480 SW 1.5 (Roche) und Microsoft Excel unter Beachtung der Schmelzkurve, der Wasserkontrolle und RNA Kontrolle.

**4.1.2 Herstellung von Plasmiden**

Ziel ist es spezifische Gene in eukaryotische Zellen einzuschleußen, um die entsprechenden Proteine zu exprimieren. Die gewünschten proteinkodierenden mRNAs wurden aus Zellen mittels *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) amplifiziert, mit entsprechenden Sequenzen zur Erkennung und Spaltung durch Restriktions-

enzyme versehen und durch die Polymerase Kettenreaktion vervielfältigt und anschließend in geeignete Expressionsplasmide kloniert.

#### 4.1.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung nach Agarose Gelelektrophorese

Die Polymerase Kettenreaktion dient zur Amplifikation von Genabschnitten unter Verwendung Sequenz-spezifischer Primerpaare.

*Folgende Reaktionsansätze wurden verwendet:*

**Tabelle 15: Reaktionsansatz PCR**

Reagenz	Volumen
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
10x Taq Puffer mit KCl	2 µl
dNTP (25 mM)	2 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Backward Primer (10 µM)	1 µl
Template	2 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	9,5 µl
Σ	20 µl

Die Amplifikation der DNA gliedert sich in drei sich wiederholende Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Daran schließt sich nochmals eine 10-minütige Elongationsphase an, um unvollständige PCR Produkte zu vervollständigen.

**Tabelle 16: PCR Protokoll**

Temperatur	Zeit	Zyklen	Reaktion
95 °C	5 min	1	Denaturierung
95 °C	30 s	25-35x	Denaturierung
54-64 °C	30 s		Annealing
72 °C	45 s		Elongation
72 °C	10 min	1	Elongation

4 °C	∞	1	Kühlung
------	---	---	---------

Die PCR Produkte wurden mit 10x DNA Ladepuffer gemischt und je nach zu erwartender Produktgröße auf ein 1,5%-5% Ethidiumbromid-haltiges Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 80-100 V für 40-60 min bis zur vollständigen Auftrennung der Produkte. Die Produkte wurden kurz unter UV-Licht visualisiert, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Geextraktionskit (Machery and Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

#### 4.1.2.2 Restriktion und Ligation

Die amplifizierten PCR Produkte und der Vektor wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen in den dazugehörigen Puffern für eine Stunde bei 37°C verdaut. Um eine Ligation des Vektors zu verhindern, wurde das Restriktionsprodukt des Vektors mit der Fast AP Phosphatase für weitere 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde das geschnittene PCR Produkt und der Vektor mittels Ligase in entsprechendem Puffer bei 16°C über Nacht ligiert. Dabei betrug das Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 bzw. 1:6.

#### 4.1.2.3 Transformation der Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Unter Transformation versteht man die Einschleusung von Fremd-DNA in ein Empfängerbakterium. 50 µl der kompetenten Bakterien DH10β (4.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien) wurden auf Eis aufgetaut. 10 µl des Ligationsansatz wurde zu den Bakterien ohne zu resuspendieren hinzugeben. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C, dabei gelangt das Plasmid durch entstandene Poren in das Bakterium. Die Bakterien wurden für 2 min auf Eis gestellt. Es wurde 950 µl LB Medium (Luria Broth Medium) zum Ansatz gegeben und für 30-45 min bei 37 °C unter Schütteln (800 rpm) inkubiert. Schlussendlich wurden die Bakterien bei RT für 2-3 min abzentrifugiert (2000-3000 rpm) und der Überstand abgekippt. Im restlichen Medium wurden die Bakterien resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Bakterienbrutschrank kultiviert.

#### 4.1.2.4 DNA Präparation

Nach Kultivieren der transformierten Bakterien auf der Agar Platte wurden zunächst 15 ml LB Medium angeimpft und die Bakterien über Nacht bei 37 °C kultiviert. Es erfolgte

eine Minipräparation der Plasmid-DNA aus 4 ml Bakteriensuspension nach Angaben des Herstellers (NucleoSpin® Plasmid, Machery und Nagel). Anschließend erfolgte ein spezifischer Restriktionsverdau zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation. Identifizierte Plasmide wurden zur Bestätigung sequenziert. Um entsprechende Mengen von Plasmiden für die Transfektion zu generieren, erfolgte eine Maxipräparation aus 200 ml Bakteriensuspension nach Angaben des Herstellers (Quiagen Plasmid Purification).

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Plasmide erfolgte photometrisch (Absorptionsverhältnis 260 nm und 280 nm).

#### 4.1.3 Grundlagen des *Genome-Engineering-Systems* CRISPR-Cas9

Um ein Phänomen kausal einer Proteinfunktion zuzuordnen zu können, werden in der Biologie Knockout bzw. Knockdown Modelle verwendet (Abbildung 7).

In jüngster Zeit wird das CRISPR-Cas System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated*) benutzt, um Gene auszuknocken, indem gezielt ein Doppelstrangbruch (DSB) in der DNA durch die CAS Endonuklease durchgeführt wird. Das CRISPR-Cas System wurde erstmals in Bakterien entdeckt. Dort dient es als immunologischer Abwehrmechanismus gegenüber Phagen. Es wurden dabei drei Typen von CRISPR-Cas Systemen beschrieben. Jeder Typ beinhaltet dabei eine Anhäufung von CAS Genen, nichtkodierende RNAs und eine bestimmte Anzahl an sich wiederholenden Elementen. Die sich wiederholenden Elemente sind gespickt von kurzen exogenen DNA Sequenzen (Protospacer), normalerweise stammend aus Phagen-DNA. Zusammen bilden sie die CRISPR-RNA (crRNA). Für die experimentelle Anwendung wurde von den drei Typen der CRISPR-Cas Systemen, der Typ II aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* verwendet, welcher die Nuklease Cas9 enthält. Um den zu schneidenden DNA Abschnitt zu erkennen, muss der Ziel DNA eine PAM-Sequenz (5'-NGG) vorausgehen. Die crRNA bindet zusammen mit der tracrRNA (*transactivating crRNA*) an das Cas9 und bringt sie zu der Ziel DNA, indem 20 Nukleotide der crRNA komplementär dazu sind. Für den experimentellen Ansatz sind die crRNA und tracrRNA zu einer sgRNA (*single guide RNA*) fusioniert. Entsprechend kann durch unterschiedliche sgRNA, Cas9 zu jedem DNA Abschnitt geleitet werden, der in seiner Umgebung ein PAM Motif (*protospacer adjacent motif*) enthält. Dabei wird der zu schneidenden DNA Abschnitt mittels einer in den CRISPR-Cas Sequenz enthaltenen sgRNA erkannt. Daraufhin wird die Endonuklease CAS rekrutiert, die die DNA schneidet und einen Doppelstrangbruch verursacht (Ran et al., 2013). Für die Reparatur des DSB wird entweder die Nicht-Homologe Rekombination (NHEJ; *non-homologous end joining*)



---

	Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau
10x Blotting-Puffer:	250 mM Tris; 1,26 M Glycerin
Wasch-Puffer:	PBS; 0,2% Tween
Puffer zum Blocken:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer
Lösung primärer Antikörper:	3% BSA in Waschpuffer
Lösung sekundärer Antikörper:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer

#### 4.2.1 Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Assay)

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Zellen mittels Lyse-Puffer lysiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay Kit (Pierce, Rockford) als Triplikat, nach dem Protokoll des Herstellers. Ausgewertet wurde die Konzentration mit dem ELISA-Reader ELx800.

#### 4.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

Mittels Western Blot können Proteine im Zelllysate bzw. nach einer Immunpräzipitation (IP) mit einem Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Zelllysate mit Laemmli Puffer bei 95 °C für 5 min im vorgeheizten Heizblock aufgeköcht (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel. Das Gel besteht aus einem Sammelgel zum Fokussieren der Proben und einem Trenngel zum Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Nach dem Zusammenbauen der Gelkammer wurde zunächst das Trenngel gegossen. Die Polymerisation des Trenngels wurde nach Zugabe von TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) gestartet. Anschließend wurde zum Nivellieren, Isopropanol auf das gegossene Trenngel pipettiert. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abpipettiert und das Sammelgel auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen. Nach Aktivierung der Polymerisation des Sammelgels durch TEMED und APS wurde ein Kamm eingesetzt, der Geltaschen bildet, die später mit den Proben beladen werden können. Nach Vorbereiten des Gels wurde die fertige Gelkammer in eine Laufwanne gestellt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Marker Proteinstandard V (10-250 kDa) und die aufgeköchten Proben wurden aufgetragen. Zum Fokussieren der Proben im Sammelgel, wurden zunächst 180 Volt und 15 mA für 15 min eingestellt. Das Auftrennen der Proben nach Proteingröße erfolgte bei 30 mA und 180 V für circa 2 h im Trenngel.

Nach dem Auftrennen der Proteine, wurden die Proben auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und die Proteine von dem Polyacrylamid-Gel mittels einer Blotting Kammer auf die Membran bei 100 V, 500

mA für 50 min transferiert. Die Proteine wurden durch nochmaliges Eintauchen in Methanol fixiert. Die Membran wurde anschließend mit Wasser gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen an die Proteine zu verhindern, erfolgte die Blockierung mittels 5%igen Milchpulver Lösung. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit Waschpuffer wurde die Membran mit dem ersten Antikörper bei RT, in einer speziell für jeden Antikörper ausgetesteten Verdünnung (1:1000-1:5000) für 1h bzw. bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Inkubation erfolgt ein dreimaliges Waschen à 10 min mit Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000-1:5000) für 30-90 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen à 10 min und Zugabe eines Peroxidase Substrats, erfolgte die Auswertung mit dem ChemiDoc XRS+ imaging system, durch Detektion der emittierten Chemilumineszenz.

Der Blot wurde mit dem Image Lab Programm (BioRad) ausgewertet.

#### 4.2.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient dazu selektierte Proteine spezifisch anzureichern. Es wurden Sepharosekügelchen (*beads*) verwendet, an die mit Hilfe von Protein G, spezifische Antikörper gekoppelt wurden, um die Spaltfragmente von EpCAM anzureichern, welche massenspektrometrisch analysiert werden sollten. Außerdem wurden auch Sepharosekügelchen mit dem Protein A verwendet, weil die Affinität des Fc-Teils von hEpEx-Fc dazu größer ist.

Zunächst wurden die Sepharosekügelchen mit eiskalten PBS Puffer gewaschen und abzentrifugiert, um enthaltenes Konservierungsmittel zu entfernen. Anschließend wurden die equilibrierten Kügelchen zu dem Medium bzw. zum Zellysat hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Drehung inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Abzentrifugation bei 280 g mit anschließendem Abpipettieren des Überstands. Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Waschen mit eiskalten PBS.

Schließlich wurden die Proteine mit 20 µl Lämmli Puffer bei 95°C für 5 min aufgekocht bzw. mit saurem Glycinpuffer (100 mM; pH 2,5) inkubiert. Dadurch wurden die Proteine durch Denaturierung von den Sepharosekügelchen eluiert.

#### 4.2.4 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie

*Benötigte Reagenzien:*

FACS-Puffer:	PBS mit 5% FKS
Propidiumiodid (PI)-Färbelösung:	PBS mit 5% FKS; 1 µg/ml Propidiumiodid

Die Durchflusszytometrie wird unter anderem zum spezifischen Nachweis von Proteinen, an der Zellmembran verwendet.

Nach dem Lösen der Zellen mittels Trypsin wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper (1:50 in 50 µl FACS Puffer) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und es wurde 3 Mal mit 100 µl FACS Puffer gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (1:50 in 50 µl FACS Puffer), an welchen FITC (Fluorescein Isothiocyanat) konjugiert war, für 15 min bei RT. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und mit 100 µl FACS Puffer 3 Mal gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, welches 2 µl PI (Propidiumiodid) enthält, um tote Zellen anzufärben, die später aus der Analyse herausfallen. Als Negativkontrolle werden Zellen direkt mit dem 2. Antikörper für 15 min bei RT inkubiert. Die Analyse der behandelten Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer von BD FACS-Calibur bzw. CyFlow®Cube 8. Ausgewertet wurde mittels CellQuest Pro bzw. FlowJo, wobei die Messdaten der gegateten lebenden Zellen durch die entsprechende Negativkontrolle dividiert wurde, um die Werte der verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen zu können.

#### **4.2.5 Aufreinigung des humanen EpEX-Fc Konstrukts**

Nach Generierung einer stabilen HEK293 hEpEX-Fc Zelllinie erfolgte die Aufreinigung des hEpEX-Fc Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand durch eine Affinitätschromatographie, da die Zellen das Protein hEpEx-Fc sezernieren. Die Zellen wurden auf 15 Platten (Durchmesser=20 cm) mit einem Endvolumen von 25 ml Medium/Platte ausplatziert. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurde das Medium abpipettiert und frisches Medium mit Ultra low IgA FKS dazugegeben. Nach fünftägiger Inkubation ohne Mediumwechsel erfolgte die Überführung des Überstands in 50 ml Falcon Gefäße. Der Überstand wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 min abzentrifugiert, um restliche Zellen zu Entfernen. Es wurden die Proteaseinhibitoren Pepstatin, Leupeptin und Aprotinin hinzupipettiert, um den Abbau des Konstrukts zu verhindern. Erneut wurden die Falcons für 20 min bei 4°C und 10000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben filtriert und bei 4°C gelagert.

Für die Affinitätschromatographie wurden spezifische Säulen mit Agarose A befüllt und anschließend mit 50 ml PBS gewaschen. Das konditionierte Medium wurde über die Agarose A enthaltende Säule laufen gelassen. Anschließend wurde die Agarose A mit

50 ml PBS gewaschen. Das hEpEX-Fc Produkt wurde mit 4 ml, 20 mM Natriumcitratlösung (pH 2,4) in 4 Eppendorfgefäße (1,5 ml) eluiert. Der pH-Wert wurde mit einem pH Papier bestimmt und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Nach Vortexen wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße in Zentrifugenfilterröhrchen überführt und bei 4°C und 5000 rcf für 17 min zentrifugiert. Das Protein bleibt im Filter und wird in 1 ml HBSS (kalziumfrei) gelöst. Es folgte die Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay Kit und die Visualisierung mittels Western Blot diente als Ergebniskontrolle.

#### 4.2.6 Bestimmung der Schnittstellen von humanen EpCAM

*Benötigte Reagenzien:*

Glycinpuffer:	100mM Glycin, pH 2,5
TRIS Puffer:	100mM TRIS, pH 8

##### 4.2.6.1 Extrazelluläre Schnittstellen

Um die extrazellulären Schnittstellen von humanem EpCAM ohne weiteren tryptischen Verdau massenspektrometrisch bestimmen zu können, wurden HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen mit einem humanen EpCAM Konstrukt (hEpCAM-TF) stabil transfiziert. Es enthält 42 Aminosäuren N-terminal der Transmembrandomäne, direkt nach Glutamat<sup>223</sup>, eine TEV (Tobacco Etch Virus) Proteasen-spezifische Spaltsequenz und darauffolgend ein FLAG Epitop (DYKDDDDK) (Hopp et al., 1988). Die Vermehrung der Zellen nach Selektion erfolgte durch Ausplattieren auf fünf Zellkulturplatten (d=20 cm). Das Konstrukt hEpCAM-TF wird gespalten und der N-terminale Anteil in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Bei Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurde das Medium erneuert. 24 Stunden danach erfolgte eine Aufreinigung des abgespalteten N-terminalen Fragments mittels 30 µl FLAG-Beads (Sigma-Aldrich) unter Rotation bei 4 °C über Nacht aus 50 ml Zellkulturüberstand. Vor der Immunpräzipitation erfolgte eine Zentrifugation (280 g, 5 min, 4 °C) des Überstands, um restliche Zellen zu entfernen. Am nächsten Morgen wurden die FLAG-Beads dreimal mit eiskaltem PBS und zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Eluierung der Fragmente mit 40 µl Glycinpuffer (100 mM, ph 2,5) für 20 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 280 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 200 µl TRIS (100 mM, ph 8) neutralisiert. Der größte Teil des hEpEx Fragments, welches sich N-terminal der Schnittstellen befindet, konnte anschließend mittels TEV Protease, entsprechend dem Protokoll des Herstellers (AcTEV™ Protease, Invitrogen), abgespalten werden. Dabei spaltet die TEV

Protease zwischen Glycin (G) und Asparaginsäure (D). Die entstandenen Fragmente wurden mittels 15 µl FLAG-Beads bei 4°C für 4 h unter Rotation aufgereinigt. Die FLAG Kügelchen wurden dreimal mit eiskaltem PBS und zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Es folgte die Eluierung durch 10 µl 4-Hydroxy- $\alpha$ -Cyanozimtsäure-gesättigter Lösung. Die weitere Analyse der Fragmente erfolgte mittels MALDI-ToF Gerät (Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight; Voyager-DE STR, Applied Biosystems). Ausgewertet wurden die Daten mit dem Computerprogramm Data Explorer 4.3 (Applied Biosystems Inc., Waltham).

#### **4.2.6.2 Transmembrane Schnittstellen**

##### **Bestimmung der $\gamma$ -Schnittstellen**

HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen wurden mit dem Myc-C-terminalen-Fragment-FLAG-TEV-YFP Konstrukt stabil transfiziert. Es wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen ausplattiert. Bei 100%iger Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 24 h wurde der Überstand abpipettiert und abzentrifugiert. Die nach Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase entstandenen N-terminalen Fragmente befanden sich im Zellkulturüberstand. Die Aufreinigung erfolgte mittels Immunpräzipitation unter Verwendung cMyc-spezifischer Antikörper aus dem Zellkulturüberstand (50 ml). Dafür wurden die cMyc-spezifischen Antikörper zunächst 3 Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, zur Equilibrierung und danach zu dem Zellkulturüberstand dazu gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter Rotation. Anschließend wurden die Kügelchen gewaschen (dreimal mit eiskaltem PBS und zweimal mit eiskaltem Wasser) und massenspektrometrisch analysiert. Ausgewertet wurden die Daten mit dem Computerprogramm Data Explorer 4.3 (Applied Biosystems Inc., Waltham).

##### **Bestimmung der $\epsilon$ -Schnittstellen**

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Schnittstellen erfolgte aus dem Zelllysats der stabil transfizierten HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen mit dem Myc-C-terminalen-Fragment-FLAG-TEV-YFP Konstrukt. Es folgte eine Immunpräzipitation, wie in 4.2.3 beschrieben, der intrazellulären Fragmente aus 4000 µg des Zelllysats mittels 30 µl GFP Trap. Anschließend erfolgte ein TEV Verdau nach Protokoll des Herstellers. Durch nochmalige Immunpräzipitation mit 15 µl FLAG-Beads wurden die gesuchten Fragmente aufgereinigt und konnten massenspektrometrisch analysiert werden. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Data Explorer 4.3 (Applied Biosystems Inc., Waltham).

### 4.3 Mikrobiologische Methoden

#### Verwendete Reagenzien:

LB-Medium:	1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,2
Agar-Platten:	1,5% Agar/Liter LB Medium
Antibiotikakonzentrationen:	Ampicillin 50 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml 100 mM KCl; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 30 mM KAc; 10 mM
TfB I-Puffer	CaCl <sub>2</sub> , 15% Glycerin; pH = 5,8
TfB II-Puffer	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerin; pH 7,0

#### 4.3.1 Bakterienkultivierung und -konservierung

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte nach Auftauen eines Aliquots des DH10β Stammes in Luria Broth Medium (LB) im Schüttler (225 Upm) bei 37°C über Nacht. Eingefroren wurden die Bakterien unter Zugabe von 15%igen Glycin bei -80°C.

#### 4.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung von transformationskompetenten E.coli-Stämmen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Dafür wurden 200 ml LB-Medium mit einer 5 ml Übernachtskultur von E. coli angeimpft. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) zwischen 0,3-0,6 wurde die Bakteriensuspension auf Eis heruntergekühlt und nacheinander mit den Puffern TfBI und TfBII gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien nach Zugabe von 15%igen Glycin in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 4.4 Zellbiologische Methoden

#### Verwendete Reagenzien:

PBS:	8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l H <sub>2</sub> O
HEK 293 Medium:	DMEM, 10%FKS, 1%Streptomycin/Penicillin (100 µg/ml / 100 U/ml)
FaDu Medium:	DMEM, 10%FKS, 1%Streptomycin/Penicillin (100 µg/ml / 100 U/ml)
HCT-8 Medium:	DMEM, 10%FKS, 1%Streptomycin/Penicillin (100 µg/ml / 100 U/ml)
Selektionszusatz bei Vektor	
141-pCAG-3SIP	Zelltypspezifisches Medium + Puromycin (1 µg/ml)
Selektionszusatz bei Vektor	
PS521 MCS-Fc	Zelltypspezifisches Medium + G418 (1,25 mg/ml)
Einfriermedium:	50%DMEM, 40% FKS, 10% DMSO

#### 4.4.1 Kultivierung und Konservierung der Zellen

Alle Zellen wurden in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre, bei 37 °C und 95%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellkulturarbeit erfolgte unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Verbrauchsmaterialien und Lösungen. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zentrifugationsschritte bei 280 g für 5 min bei RT durchgeführt.

Zum Erhalt einer 60-70%igen Konfluenz in T75-Zellkulturflaschen wurden die Zellen alle 2-3 Tage gesplittet. Sie wurden mit PBS gewaschen, um das verbliebene FKS zu entfernen und 6-8 Minuten mit 0,05%iger Trypsin/EDTA Lösung inkubiert, um sie von der Zellkulturflasche zu lösen. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von FKS. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:4-1:30 verdünnt. Die Zellen wurden resuspendiert und es wurde zelltypspezifisches Medium hinzugegeben bis zu einem Endvolumen von 15 ml.

Die Konservierung der Zellen erfolgte nach Abernten der Zellen. Sie wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, anschließend in 1,8 ml Kryogefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

Bei Rekultivierung wurden die Zellen aufgetaut und abzentrifugiert, um das überstehende Einfriermedium zu verwerfen. Anschließend wurden sie mit frischem Medium in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, um nicht adhärente Zellen zu verwerfen.

#### 4.4.2 Zellzahlbestimmung

20 µl Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau resuspendiert, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Ausgezählt wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer. Die exakte Zellzahl wurde mit der Formel bestimmt:

Zellen/ml= (gezählte Zellen/ Anzahl der gezählten Quadrate) x 2 x 5000

#### 4.4.3 Transfektion durch MATra (*Magnet-Assisted Transfection*)

Als Transfektion wird das Einbringen von DNA in den Zellkern von eukaryotischen Zellen in Form von Plasmiden bezeichnet (4.1.2 Herstellung von Plasmiden).

Die Transfektion der HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen erfolgte mit dem MATra-Reagenz (*Magnet-Assisted Transfection*). Die Zellen wurden dafür in einer 6-Well Platte ausplattiert und kultiviert bis sie eine 60%ige Konfluenz erreichten. Der Transfektionsansatz bestand aus 1 ml Serum-freiem DMEM, 1 µg Plasmid und 1 µl MATra-A, was vor Gebrauch gevortext wurde. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert, sodass sich die magnetischen MATra Kügelchen an das Plasmid anlagern konnten. Der Ansatz wurde auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das 6-Well auf eine Magnetplatte

im Inkubator bei 37 °C für 15 min gestellt. Nach 24 h wurde das Medium erneuert. Die Selektion wurde mit entsprechendem Selektionsantibiotikum durchgeführt.

#### **4.4.4 Generierung eines zellulären Knockouts mittels CRISPR-Cas9 Technologie**

Um die genaue Funktion von Proteinen zu untersuchen, werden unter anderem genetische Knockout-Mutanten *in vitro* und *in vivo* verwendet. Mittels CRISPR-Cas9 Technologie lassen sich zelluläre Knockout Modelle herstellen (4.1.3 Grundlagen des *Genome-Engineering-Systems* CRISPR-Cas9).

##### **4.4.4.1 Transfektion des CRISPR-Cas9 Konstrukts**

Um eine ausreichende Menge an Zellen zu generieren, wurden sieben T75 Zellkulturflaschen kultiviert, bis jeweils eine Konfluenz von 60-70% erreicht wurde. Sechs Flaschen wurden transfiziert, eine Flasche diente als spätere Negativkontrolle. Die Transfektion erfolgte mittels MATra (4.4.3 Transfektion durch MATra (*Magnet-Assisted Transfection*)) 36 h vor dem Sorten der Zellen.

##### **4.4.4.2 Isolierungen der transfizierten Zellen**

36 h nach der Transfektion wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop, zur Überprüfung der Transfektion, angeschaut. Transfizierte Zellen leuchteten grün, aufgrund des im CRISPR-Cas9 Plasmid enthaltenen grünen Fluoreszenzproteins GFP (Abbildung 6). Die Zellen wurden geerntet. Die GFP-positiven Zellen wurden mittels FACSaria Durchflusszytometer angereichert und anschließend in ein neues mediumhaltige Falcon Gefäß (15 ml) überführt.

##### **4.4.4.3 Generierung von Einzelzellklonen (*single cell clones*) und Identifizierung zellulärer Knockouts**

Die CRISPR-Cas9 transfizierten Zellen wurden abzentrifugiert und in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in 96-Well Platten mit einer Dichte von 0,5 Zellen/Well ausplattiert.

Die Zellen wurden kultiviert und je nach Konfluenz zunächst in 24-Well Platten und später in 6-Well Platten überführt.

Bei ausreichender Menge, wurde jeweils ein Anteil der verschiedenen Einzelzelllinien mit hEpCAM Antikörper inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die Expression von hEpCAM zu bestimmen (4.2.4 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie).

#### 4.4.5 Adhäsionsassay

Der Adhäsionsassay dient dazu das Adhäsionspotenzial von Zellen zu charakterisieren. Da EpCAM als kalziumunabhängiges Adhäsionsprotein beschrieben wurde, wurde der Adhäsionsassay unter kalziumreichen Bedingungen und unter Kalziumentzug durchgeführt.

##### 4.4.5.1 Zell-Matrix-Adhäsionsassay mit und ohne Kalzium

Es wurden 96-Well Platten (flacher Boden) mit 50 µl Matrigellösung/Well beschichtet und über Nacht bei 37 °C in einen Inkubator gestellt. Das Matrigel dient als Modell der extrazellulären Matrix (Benton, Kleinman, George, & Arnaoutova, 2011). Am nächsten Tag wurden die zu untersuchenden Zellen mit PBS gewaschen und gezählt. Pro Well wurden 20.000 Zellen verwendet. Es wurde Calcein AM (Acetoxymethylester) 2 µl/ml zu 3 ml FKS freien Medium hinzupipettiert. Zum Anfärben der Zellen wurden die entsprechenden Zellmengen in der 2 µM Calcein-haltigen Lösung resuspendiert. Calcein AM ist ein fluoreszierendes Acetomethoxy Derivat von Calcein, womit lebende Zellen angefärbt werden (Akeson & Woods, 1993). Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen zur Entfernung des restlichen Calcein AM. Daraufhin wurden sie in Adhäsionsmedium resuspendiert und 20.000 Zellen/Well in einem Volumen von 50 µl auf die mit Matrigel beschichteten 96-Well Platten ausplattiert. Die als Hintergrundkontrolle dienenden Wells blieben zellfrei. Der Adhäsionsassay dauerte 2 h bei 37 °C im Inkubator. Anschließend wurden die Wells zwei Mal mit 200 µl PBS/Well gewaschen. Dabei wurde die zu waschende Kulturplatte auf eine andere 96-Well Platte mit 200 µl PBS/Well gelegt und zwei Mal gedreht. Die Zellen, welche als Positivkontrolle dienten, wurden nicht gewaschen. Nach Waschen der Zellen wurde das Volumen in den gewaschenen Wells mit 50 µl aufgefüllt. Nun wurden alle Zellen mit 50 µl Lysispuffer lysiert. Schlussendlich wurde die durch die Lyse freigesetzte Calcein Fluoreszenz mittels Victor Wallac Gerät gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

Zur Durchführung des kalziumfreien Zell-Matrix-Adhäsionsassay wurden die Zellen geerntet, gezählt und 20.000 Zellen auf eine 10 cm Petrischale für 24 h in Zellkulturmedium kultiviert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden dreimal mit einem PBS/EDTA Gemisch gewaschen, um restliches Kalzium zu entfernen. Es wurde 5 ml kalziumfreies Medium zu den gewaschenen Zellen dazugegeben und über Nacht kultiviert. Gleichzeitig wurden Matrigel-beschichtete 96-Well Platten vorbereitet. Am nächsten Tag wurden die Zellen gezählt (20.000 Zellen/ Well), gewaschen und für

eine Stunde bei 37 °C in einer 2 µM Calcein AM Lösung, welche kein Kalzium enthielt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Es wurden 20.000 Zellen/ Well, außer auf die als Hintergrundkontrolle dienenden Wells, ausplattiert. Die Inkubationszeit dauerte 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Well Platten zweimal mit 200 µl PBS/Well gewaschen unter Zuhilfenahme einer zweiten 96-Well Platte gewaschen. Nach Waschen der Zellen wurde das Volumen in den gewaschenen Wells mit 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Victor Wallac Fluoreszenz Gerät ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel Software.

#### **4.4.5.2 Zell-Zell-Adhäsionsassay mit und ohne Kalzium**

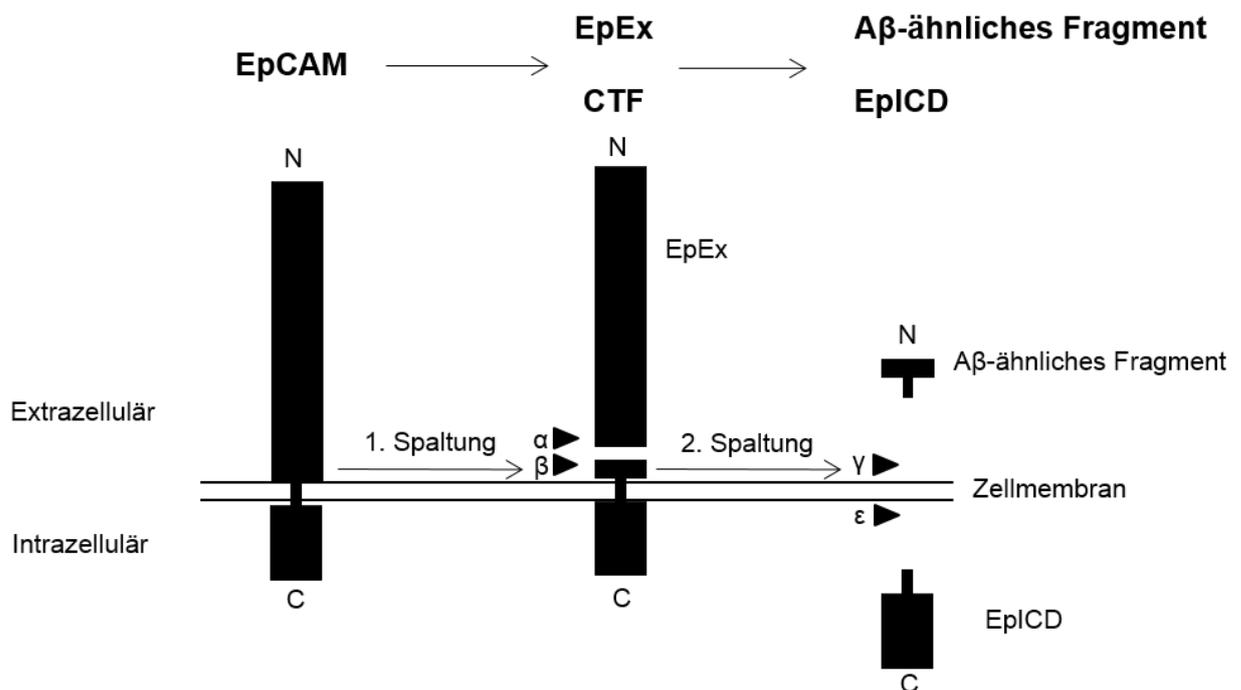
Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen/Well ausplattiert und über Nacht in Medium kultiviert. Am nächsten Morgen wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen zu 100% konfluent waren. Das weitere Prozedere entspricht dem in 4.4.5.1 beschriebenen Vorgehen.

Für das kalziumfreie Zell-Zell-Adhäsionsassay wurden  $5 \times 10^6$  Zellen/Well ausplattiert und über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen und kalziumfreies Medium hinzugegeben. Nach 24 h wurde das Medium nochmals verworfen, die Zellen gewaschen und die entsprechenden Calcein AM-markierten Zellen ausplattiert. Das weitere Prozedere entspricht dem in 4.4.5.1 beschriebenen Vorgehen.

## 5. Ergebnisse

### Spaltung von humanem EpCAM

EpCAM wird in Karzinomzellen und HEK293 durch eine regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) gespalten, welche sich in eine extrazelluläre und eine transmembrane Spaltung unterteilen lässt. Dabei entstehen bei der ersten Spaltung, durchgeführt durch BACE1 bzw. Metalloproteasen, unterschiedlich große membranständige CTF Fragmente, sowie verschieden große hEpCAM Ektodomänen. Die zweite Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase, lässt sich in einen  $\gamma$ -Schnitt und in einen  $\epsilon$ -Schnitt unterteilen. Der  $\gamma$ -Schnitt führt zur Generierung von A $\beta$ -ähnlichen Fragmenten und der  $\epsilon$ -Schnitt setzt intrazelluläre EpiCD Fragmente ins Zytosol frei (Abbildung 8). Die genauen Schnittstellen auf Ebene der Aminosäuren wurden bisher nur für murines EpCAM beschrieben (Hachmeister et al., 2013).

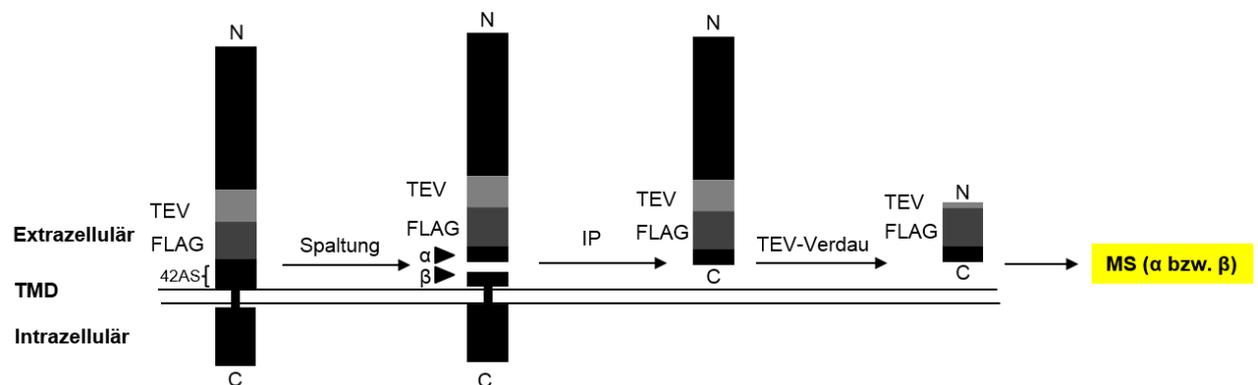


#### Abbildung 8: Spaltung von EpCAM

Schematische Darstellung der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP), sowie der dabei generierten Spaltprodukte. Die 1. Spaltung führt zur Freisetzung von extrazellulären EpCAM-Ektodomänen (EpEx) und zur Generierung von membranständigen C-terminalen Fragmenten (CTF). Dabei wird die 1. Spaltung entweder durch eine ADAM Protease ( $\alpha$ ) oder die BACE1 Protease ( $\beta$ ) durchgeführt. Die 2. Spaltung wird durch die  $\gamma$ -Sekretase durchgeführt und lässt sich in eine  $\gamma$ -Spaltung und eine  $\epsilon$ -Spaltung untergliedern. Bei der  $\gamma$ -Spaltung entstehen A $\beta$ -ähnliche Fragmente, wobei bei der  $\epsilon$ -Spaltung EpiCD-Fragmente generiert werden.

## 5.1 Extrazelluläre Schnittstellen

Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der EpCAM Prozessierung ist die extrazelluläre Spaltung. Um diese Schnittstellen auf Aminosäureebene zu charakterisieren, wurden zunächst EpCAM-negative HEK293 Zellen mit einer humanen EpCAM Variante (hEpCAM-TF) stabil transfiziert. Die durch die Spaltung entstehenden Fragmente wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und durch den Vergleich mit den theoretisch errechneten Massen, konnten die spezifischen Schnittstellen identifiziert werden (Abbildung 9).

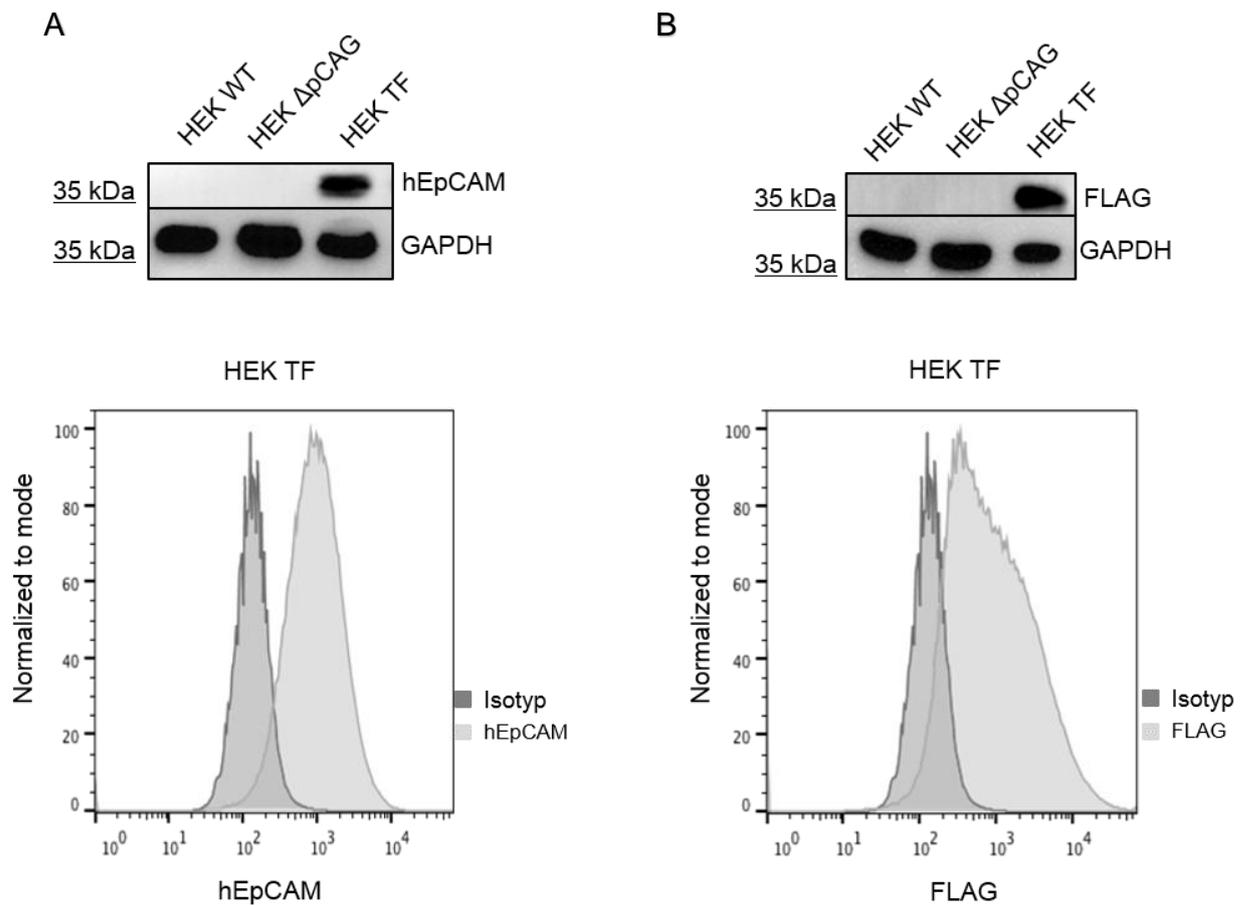


### Abbildung 9: Schematische Darstellung des hEpCAM-TF Konstrukts

Darstellung der Fragmente, welche für die  $\alpha$ -Schnittstellen bzw.  $\beta$ -Schnittstellen mittels Massenspektrometer (**MS**) analysiert werden.

Die EpCAM Variante hEpCAM-TF besteht aus dem nativen humanen EpCAM und enthält 42 Aminosäuren vor der Transmembrandomäne N-terminal eine *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Erkennungssequenz und darauffolgend ein FLAG-Epitop (Abbildung 9). Der Abstand von der Transmembrandomäne beträgt 42 Aminosäuren, da die meisten RIP-assoziierten Sekretasen extrazellulär innerhalb von 30 Aminosäuren proximal zur Transmembrandomäne schneiden (Brown et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2011). Weiterhin kann man den größten Teil der resultierenden Ektodomäne EpCAMs durch die TEV Protease abspalten und erhält dadurch Fragmente, welche nicht glykosyliert und klein genug sind, um sie direkt massenspektrometrisch ohne weiteren tryptischen Verdau zu untersuchen. hEpCAM-TF wurde mittels zwei Stufen PCR generiert.

Die stabile Expression von hEpCAM-TF in HEK293 Zellen an der Zellmembran wurde mittels anti-hEpCAM und anti-FLAG spezifischen Antikörpern durch das Durchflusszytometer bzw. im Zelllysat mittels Western Blot bestätigt (Abbildung 10).



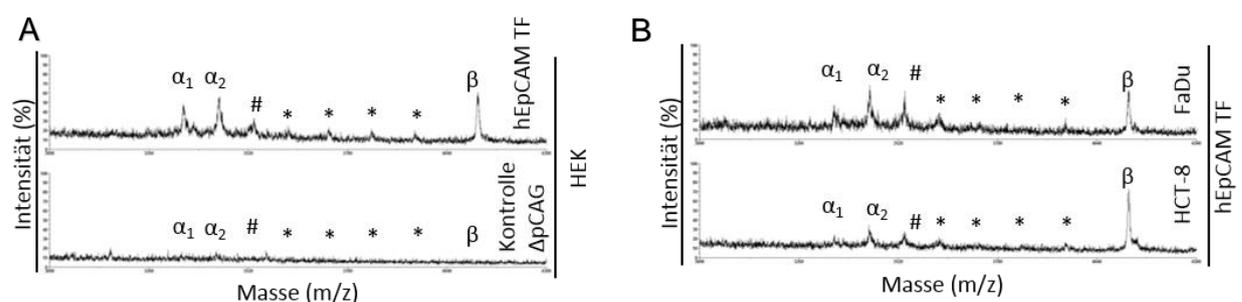
### Abbildung 10: Expressionsnachweis des hEpCAM-TEV-FLAG Konstrukts

**(A)** Western Blot: (Oben) Expressionsnachweis von hEpCAM-TF im Zelllysat von HEK293 WT, HEK293  $\Delta$ pCAG (Kontrollvektor) und HEK293 EpCAM-TF mittels anti-hEpCAM Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. (Unten) Die Expression von hEpCAM-TF an der Zelloberfläche, wurde mittels Durchflusszytometrie und anti-hEpCAM spezifischen Antikörper bestimmt.

**(B)** Western Blot: (Oben) Expressionsnachweis von hEpCAM-TF im Zelllysat von HEK WT, HEK  $\Delta$ pCAG (Kontrollvektor) und HEK EpCAM-TF mittels anti-FLAG Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. (Unten) Die Expression von hEpCAM-TF an der Zelloberfläche, wurde mittels Durchflusszytometrie und FLAG-spezifischen Antikörper bestimmt.

Nach stabiler Expression von hEpCAM-TF in HEK293 wurden die spezifischen Schnittstellen auf Ebene der Aminosäuren identifiziert. Nach 24 h wurde aus dem Zellkulturüberstand, mittels Sepharose Kügelchen, an welche ein FLAG-spezifischer Antikörper gekoppelt war, die abgespaltenen Ektodomänen immunpräzipitiert. Der größte Teil der extrazellulären Domäne kann N-terminal mittels TEV-Verdau entfernt werden (siehe schematische Darstellung in Abbildung 9). Die Schnittstelle der TEV-Protease ist zwischen Glycin (G) und Asparaginsäure (D) innerhalb der TEV-Erkennungssequenz (ENLYFQG/D) lokalisiert. Die resultierenden kleinen Fragmente wurden mittels FLAG-Antikörper angereichert und waren nun klein genug, um mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie ohne weiteren tryptischen Verdau detektiert zu werden. Die gemessenen

Masse/Ladung ( $m/z$ ) Werte im Massenspektrometer wurden mit den theoretisch berechneten Werten aus der Aminosäuresequenz verglichen und die Differenz daraus gebildet. Bei einem Differenzwert von  $< 5$  Da war die Schnittstelle identifiziert. Die massenspektrometrischen Messungen wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt und jeweils mit den theoretischen Werten verglichen. Im MS Spektrum der hEpCAM-TF transfizierten HEK293 Zellen wurden im Vergleich zu HEK293, welche mit dem Leervektor  $\Delta pCAG$  transfiziert wurden, drei prominente Peaks detektiert:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$  mit den Massen 3346,88 Da, 3442,8 Da und 4118,38 Da (Abbildung 11 A). Um die Schnittstellen in hEpCAM positiven Zellen zu Reproduzieren, wurde hEpCAM-TF stabil in FaDu (Hypopharynxkarzinome) und HCT-8 (Kolonkarzinom) transfiziert. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde der Zellkulturüberstand nach 24 h mit FLAG-Beads über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die aufgereinigten Ektodomänen wurden mittels TEV-Protease behandelt, um anschließend die beim Verdau entstandenen kleinen Fragmente, mittels FLAG-Beads anzureichern. Die angereicherten Fragmente wurden im Massenspektrometer analysiert. Es konnten dieselben  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$  Peaks wie in den HEK293 Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in allen Spektren ein # Peak, welcher keiner Peptidlänge EpCAMs zugeordnet werden konnte. Die \* Peaks konnten unterschiedlichen Peptidlängen EpCAMs zugeordnet werden. Dabei zeigen die \* Peaks, dass eine Aminosäure nach der anderen abgespalten wird, höchstwahrscheinlich durch unspezifische Proteasen. (Abbildung 11 B).



C

Peptid	Bezeichnung	Berechnete Masse (Da)	Detektierte Masse (Da)	Fehler (Da)	Ladung
R <sub>1</sub> -KKMDLTVNGEQLDLDD	$\alpha_1$	3342,59	3346,88	4,29	1
R <sub>1</sub> -KKMDLTVNGEQLDLDP	$\alpha_2$	3439,71	3442,8	3,09	1
R <sub>1</sub> -KKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIY	$\beta$	4115,49	4118,38	2,89	1
R <sub>1</sub> =GDYKDDDDKSLFHS					

**Abbildung 11: Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen von hEpCAM auf Ebene der Aminosäuren.**

**(A)** Repräsentatives Massenspektrum aufgereinigter Ektodomänen aus dem Überstand von HEK ΔpCAG und HEK293 EpCAM-TF nach TEV Verdau und FLAG IP, mit Darstellung von zwei α- und einer β Schnittstelle, sowie weiteren Spaltstellen (\*) und (#). **(B)** Repräsentatives Massenspektrum aus dem Überstand von FaDu und HCT-8, mit Darstellung von zwei α- und einer β Schnittstelle, sowie weiteren Spaltstellen (\*) und (#). **(C)** Tabellarische Auflistung der Ladung der identifizierten Peptide, sowie die Differenzen zwischen gemessenen und theoretisch berechneten Werten.

Die Substrate der RIP werden häufig durch die α-Sekretasen ADAM 10 und 17 (*A Disintegrin And Metalloprotease*) und durch die β-Sekretase BACE1 (*Beta-site APP Cleaving Enzyme 1*) gespalten. Die Charakterisierung der beteiligten Sheddases erfolgte unter Verwendung von spezifischen ADAM und BACE1 Proteaseinhibitoren wie GI254023X und C3, wohingegen die Kontrollbehandlung mit DMSO erfolgte, was als Lösungsmittel für die Inhibitoren diente.

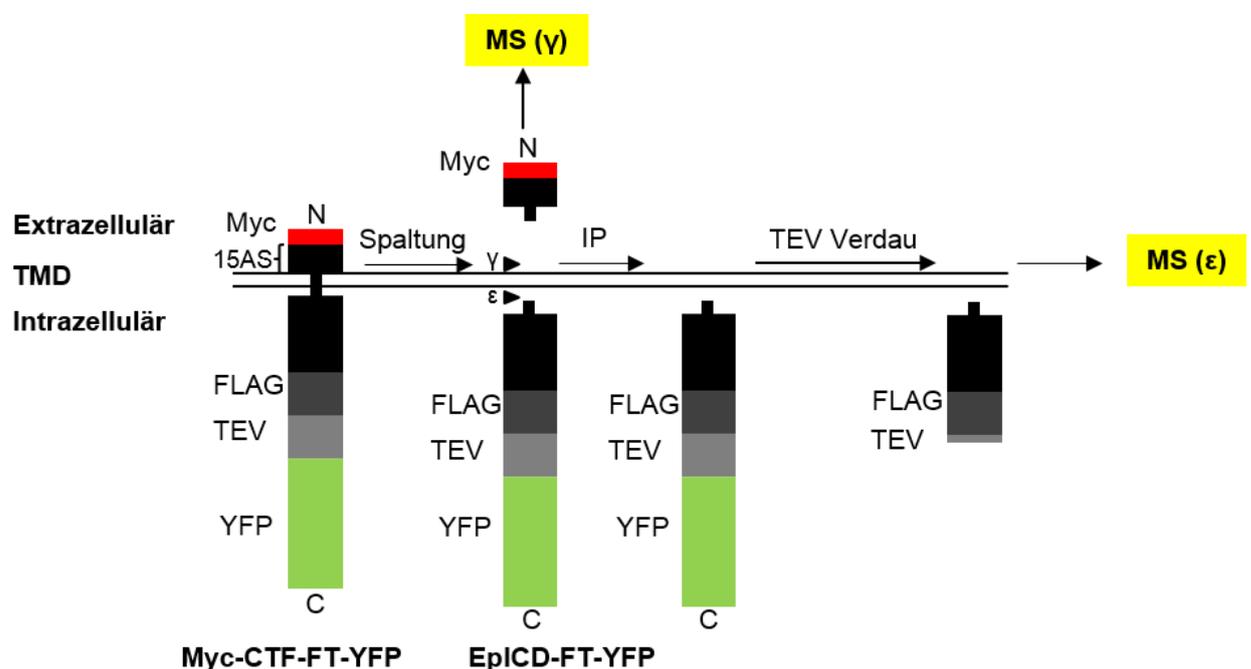
Die Peaks  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  lassen sich den Aminosäuren Schnittstellen Aspartat<sup>243</sup> / Prolin<sup>244</sup> und Prolin<sup>244</sup>/Glyzin<sup>245</sup> zuordnen. Nachdem HEK293 hEpCAM-TF Zellen mit dem ADAM Protease Inhibitor GI254023X für 24 h behandelt wurden, waren beide  $\alpha$  Peaks im Vergleich zum  $\beta$ -Peak reduziert. Die Behandlung der HEK293 Zellen mit dem ADAM Protease-induzierenden Phorbol Ester PMA führte zu einer Zunahme der  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Peaks. Somit lassen sich die Peaks den ADAM-assoziierten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Schnittstellen zwischen Aspartat<sup>243</sup>/ Prolin<sup>244</sup> und Prolin<sup>244</sup>/Glyzin<sup>245</sup> zuordnen (Abbildung 12 A).

Zur Identifizierung der BACE1-spezifischen Schnittstellen wurden HEK293 Zellen mit dem β-Sekretase Inhibitor C3 für 24 h behandelt. Dabei entspricht der β-Peak der Schnittstelle zwischen den Aminosäuren Tyrosin<sup>250</sup>/Tyrosin<sup>251</sup>. Neben den drei zuordnbaren prominenten Peaks wurden ebenfalls kleinere Peaks detektiert (\*), welche wahrscheinlich durch proteolytische Abspaltungen durch Endopeptidasen generiert wurden, da sie den theoretischen berechneten Massen ausgehend von Tyrosin<sup>250</sup> Richtung C-Terminus zugeordnet werden konnten. Ein Peak (#) konnte keinem theoretischen Wert zugeordnet werden (Abbildung 12 B).



## 5.2 Transmembrane Schnittstellen

Nach der extrazellulären Spaltung durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen (Sheddasen) und Abspaltung der N-terminalen Ektodomäne verbleibt ein membranständiges C-terminales EpCAM Fragment (CTF) in der Transmembrandomäne. Das Fragment wird mit hoher Effizienz von dem  $\gamma$ -Sekretase Komplex, welcher aus Präsenilin, APH-1, PEN-2 und Nicastrin besteht, weiter prozessiert. Aufgrund der Untersuchung von prominenten Typ-I Transmembranproteinen wie APP, Notch und murinem EpCAM, war das Spaltungsmuster der  $\gamma$ -Sekretase bekannt. Das Spaltungsmuster beinhaltet mehrere N-terminale Spaltprodukte ( $\gamma$ -Schnitt), sowie mehrere C-terminale Spaltprodukte ( $\epsilon$ -Schnitt) (siehe schematische Darstellung am Beispiel des Myc-CTF-FT-YFP Proteins in Abbildung 14).

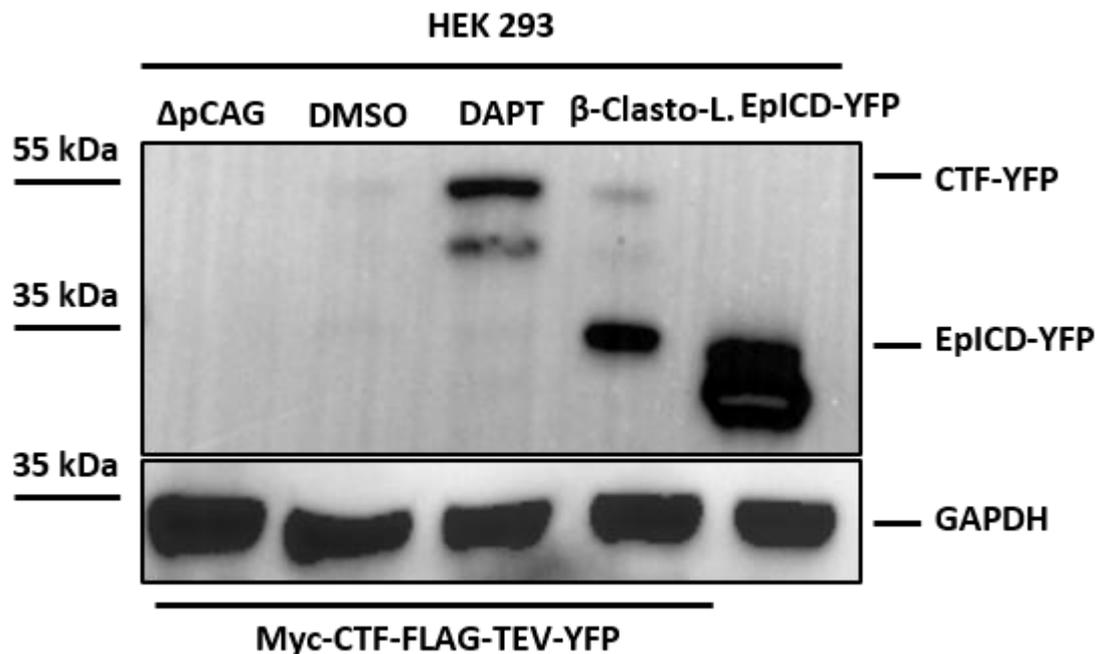


**Abbildung 14: Schematische Darstellung des Myc-CTF-Flag-Tev-YFP Konstrukts**

Darstellung der Fragmente, welche für die  $\gamma$ -Schnittstellen ( $\gamma$ ) bzw.  $\epsilon$ -Schnittstellen ( $\epsilon$ ) mittels Massenspektrometer (MS) analysiert werden.

Um die durch die  $\gamma$ -Sekretase generierten Schnittstellen in der Transmembrandomäne zu identifizieren, wurden zunächst HEK293 Zellen mit einem hEpCAM-CTF-ähnlichem Fragment transfiziert. Das hEpCAM-CTF-YFP Konstrukt besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid und einem cMyc-Epitop, welches N-terminal 15 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt liegt. Der Abstand zur Transmembrandomäne wurde gewählt, um das kleinst mögliche CTF zu generieren, damit ein möglicher Einfluss durch BACE1 auf die Spaltung verhindert wird. Daran schließen sich die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne EpCAMs (EpICD) an. Zusätzlich wurde C-terminal an EpICD ein FLAG-Epitop, sowie eine TEV-Erkennungssequenz und ab-

schließlich das YFP Protein kloniert, um die intrazellulären Spaltungsfragmente zu stabilisieren und aufzureinigen zu können.



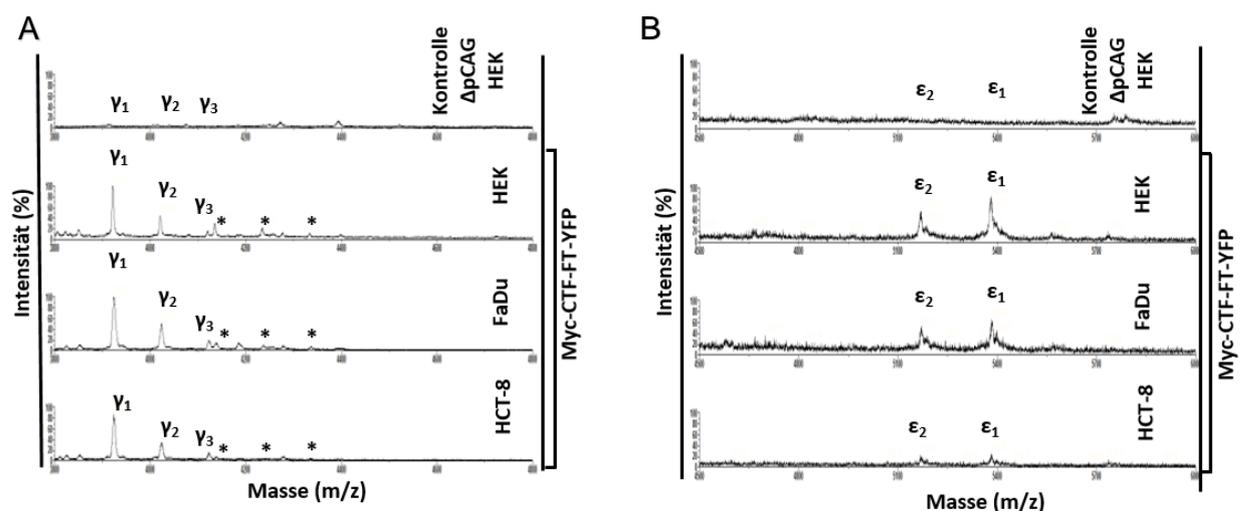
**Abbildung 15: Proteosomaler Abbau von hEpICD nach Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase**  
HEK293 Zellen, welche stabil Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP exprimieren, wurden mit DMSO (Kontrollbehandlung), DAPT ( $\gamma$ -Sekretase Inhibitor) und  $\beta$ -Clasto-Lactacystin (proteosomaler Inhibitor) vorbehandelt. Die Zellysate von den unterschiedlich transfizierten ( $\Delta$ pCAG, Myc-CTF-Flag-Tev-YFP bzw. EpICD-YFP) und behandelten (DMSO, DAPT bzw.  $\beta$ -Clasto-Lactacystin) HEK293 Zellen wurden mittels Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine wurden mit einem anti-YFP Antikörper detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Zur Überprüfung der Expression und Funktionalität des Konstrukts wurde ein Western Blot aus dem Lysat von stabil transfizierten HEK293 Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP gegen das YFP Epitop durchgeführt. Als Kontrolle dienten mit dem Leervektor  $\Delta$ pCAG transfizierte HEK293 Zellen, welche keinerlei Expression im Western Blot zeigten. Die im Western Blot dargestellte Proteinmenge von hEpCAM-CTF und hEpICD in den mit DMSO behandelten Zellen war sehr gering (CTF) bzw. unter der Nachweisgrenze (EpICD). Die geringe bzw. fehlende Proteinmenge kann aufgrund einer fehlerhaften Expression oder am wahrscheinlichsten durch eine Spaltung und darauffolgend einen vermehrten Abbau der Proteine zustande gekommen sein. Daher wurden HEK293 Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt, um die molekulare Ursache für die schwache Expression zu untersuchen. Eine Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT führte zur Akkumulation von zwei CTF Varianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Das hEpICD Fragment konnte weiterhin nicht detektiert

werden. Die massive Anreicherung von hEpCAM-CTF Fragmenten nach Inhibition durch DAPT spricht für eine äußerst effiziente und nahezu vollständige  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Spaltung von hEpCAM-CTF. Jedoch scheint das durch die  $\gamma$ -Sekretase generierte hEpICD Fragment nicht stabil zu sein. Die Degradierung von intrazellulären Proteinen erfolgt häufig durch das Proteasom. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit dem Proteasomen-Inhibitor  $\beta$ -Clasto-Lactacystin behandelt, woraufhin hEpICD stark angereichert werden konnte (Abbildung 15). Als Kontrolle wurde ein Konstrukt bestehend aus den 26 intrazellulären Aminosäuren in Fusion mit YFP in HEK293 Zellen exprimiert. hEpICD-YFP, welches nach Spaltung des hEpCAM-CTF-YFP Proteins durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert wurde, wies ein geringfügig höheres Molekulargewicht auf. Dies suggeriert, dass endogen prozessiertes hEpICD nicht nur aus den 26 intrazellulären Aminosäuren, sondern aus zusätzlichen intramembranen Aminosäuren aufgebaut wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hEpICD sehr effizient aus hEPCAM-CTF generiert und anschließend proteasomal abgebaut wird.

Nach Bestätigung der Funktionalität und der  $\gamma$ -Sekretasen-abhängigen Spaltung des Konstrukts, galt es die Aminosäuren-spezifischen Schnittstellen zu identifizieren. Zur Identifizierung des  $\gamma$ -Schnitts wurden konfluente Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP HEK293 Zellen für 24 h in Petrischalen inkubiert. Dabei führt die Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase zu einer Freisetzung von Fragmenten aus dem Myc-CTF-FLAG-TEV Konstrukt in den Zellkulturüberstand. Dieser wurde gesammelt und mit Hilfe von Sepharose-Kügelchen, an welchen ein Myc-spezifischer Antikörper gekoppelt war, wurden Peptide ( $\beta$ -ähnliche Fragmente) aus dem Zellkulturüberstand angereichert. Die immunpräzipitierten Fragmente konnten aufgrund des geringen Molekulargewichts direkt mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die gemessenen und theoretisch errechneten Massen wurden in drei unabhängigen Experimenten miteinander verglichen und die jeweiligen Differenzen errechnet. Es konnten reproduzierbar im Spektrum drei prominente Peaks detektiert werden:  $\gamma_1$  (3919,55 Da),  $\gamma_2$  (4018,68 Da) und  $\gamma_3$  (4120,59 Da), welche den Aminosäurenschnittstellen zwischen Valin<sup>273</sup>/Valin<sup>274</sup>, Valin<sup>274</sup>/Valin<sup>275</sup> und Valin<sup>275</sup>/Valin<sup>276</sup> zugeordnet werden konnte. Entsprechende Peaks fehlten in den mit  $\Delta$ pCAG transfizierten Kontrollzellen. Ein kleiner Peak konnte der Schnittstelle Valin<sup>272</sup>/Valin<sup>273</sup> zugeordnet werden (Abbildung 16 A, C). Alle  $\gamma$ -Schnittstellen konnten in den Karzinomzelllinien FaDu und HCT-8, welche mit dem Plasmid Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP transfiziert wurden, bestätigt werden (Abbildung 16 B, C).

Um die  $\varepsilon$ -Schnittstellen zu identifizieren, die C-Terminal vom  $\gamma$ -Schnitt lokalisiert sind, wurden Zellysate aus den Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP HEK293 Zellen hergestellt. Aus dem Lysat konnten die intrazellulären EpICD Fragmente mittels GFP-Trap angereichert und der YFP Anteil durch einen TEV-Verdau entfernt werden. Nach einer Flag-spezifischen Immunpräzipitation konnten die EpICD Fragmente massenspektrometrisch analysiert und mit den theoretisch errechneten Massen verglichen werden. Die Experimente wurden drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt und die Differenz der Massen errechnet. Die Bestimmung der  $\varepsilon$ -Schnittstellen von hEpCAM-CTF ergaben zwei Fragmente:  $\varepsilon_1$  (5379,12 Da) und  $\varepsilon_2$  (5166,83 Da), welche Spaltungen zwischen Valin<sup>284</sup>/Valin<sup>285</sup> und Valin<sup>285</sup>/Leucin<sup>286</sup> zugeordnet werden konnten (Abbildung 16 A, C). Die entsprechenden Peaks fehlten in den  $\Delta$ pCAG Kontrollzellen und den HEK293 Zellen. Beide Schnittstellen wurden in den Karzinomzelllinien HCT-8 und FaDu, welche mit dem Konstrukt Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP transfiziert wurden, bestätigt (Abbildung 16 B, C).



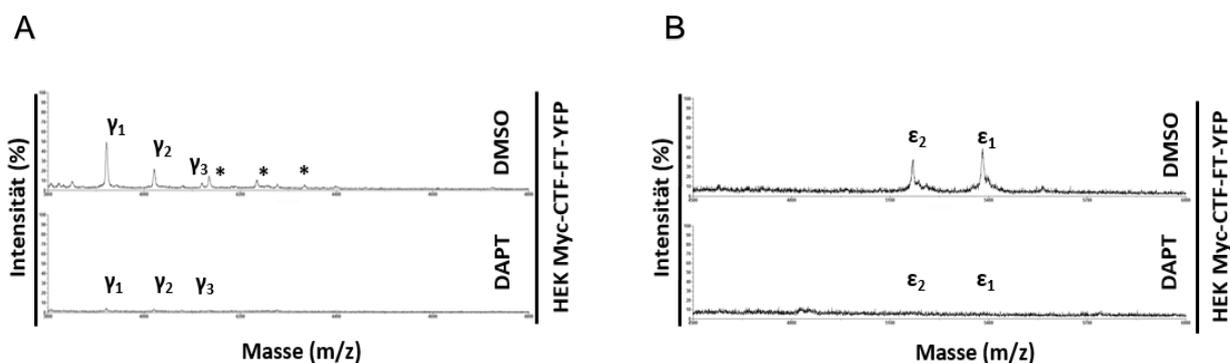
C

Peptid	Bezeichnung	Berechnete Masse (Da)	Detektierte Masse (Da)	Fehler (Da)	Ladung
R <sub>1</sub> -VIAVIV	Y <sub>1</sub>	3919,55	3921,88	2,33	1
R <sub>1</sub> -VIAVIVV	Y <sub>2</sub>	4018,68	4021,03	2,35	1
R <sub>1</sub> -VIAVIVVV	Y <sub>3</sub>	4117,81	4120,59	2,78	1
VLVISRK-R <sub>2</sub>	$\varepsilon_1$	5379,12	5378,55	0,57	1
VISRK-R <sub>2</sub>	$\varepsilon_2$	5166,83	5168,23	1,4	1
R <sub>1</sub> =LREQKLISEEDLYVDEKAPEFSMQGLKAG					
R <sub>2</sub> =KRMAYEKAIEKEMGEMHRELNADYKDDDDKENLYFQ					

**Abbildung 16: Charakterisierung der Proteasen, welche an der Spaltung von hEpCAM beteiligt sind**

(A) Repräsentatives Massenspektrum aus dem Zellkulturüberstand von HEK293  $\Delta$ pCAG, sowie mit dem Konstrukt Myc-CTF-FT-YFP stabil transfizierter HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen, mit Darstellung von drei  $\gamma$ -Schnittstellen, sowie weiteren Spaltstellen (\*). (B) Repräsentatives Massenspektrum aus dem Zelllysat HEK  $\Delta$ pCAG, sowie mit dem Konstrukt Myc-CTF-FT-YFP stabil transfizierter HEK293, FaDu und HCT-8 Zellen, mit Darstellung von zwei  $\epsilon$ -Schnittstellen. (C) Tabellarische Auflistung der Ladung, der identifizierten Peptide, sowie die berechneten Differenzen zwischen den gemessenen und theoretisch berechneten Werten.

Zur Bestätigung der  $\gamma$ -Sekretase spezifischen Schnittstellen wurden die Zellen für 24 h mit dem  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT behandelt. Nach Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse der Fragmente konnte man bei den HEK293 Myc-CTF-FT-YFP Zellen eine Reduktion der Peaks >80% feststellen. Folglich wurde das membranständige C-terminale Fragment mit hoher Effizienz von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert (Abbildung 17).

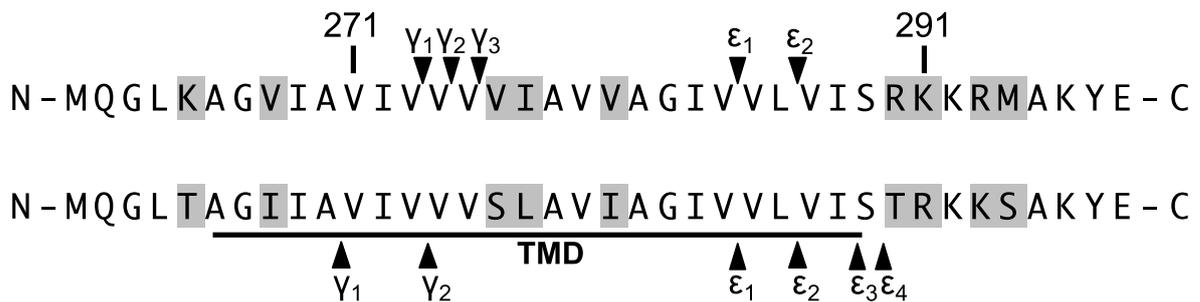


**Abbildung 17: Charakterisierung der  $\gamma$ -Protease, welche an der Spaltung von hEpCAM beteiligt ist.**

(A) Identifikation der  $\gamma$ -Schnittstellen: Repräsentatives Massenspektrum aus dem Überstand von HEK293 Myc-CTF-FT-YFP Zellen, welche mit DMSO und DAPT vorbehandelt wurden. (B) Identifikation der  $\epsilon$ -Schnittstellen: Repräsentatives Massenspektrum aus dem Zelllysat von HEK293 Myc-CTF-FT-YFP, welche mit DMSO und DAPT vorbehandelt wurden.

Zusammenfassend kommt es durch den Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase zur Generierung von drei A $\beta$ -ähnlichen Fragmenten ( $\gamma$ -Schnitt) aus dem CTF, welche in den extrazellulären Raum freigesetzt werden, sowie zur Freisetzung von zwei zytoplasmatischen EpICD Fragmenten ( $\epsilon$ -Schnitt). Im Vergleich der Schnittstellen von hEpCAM zu mEpCAM, ergab sich eine identische  $\gamma$ -Schnittstelle ( $\gamma_1$ ) und zwei identische  $\epsilon$ -Schnittstellen ( $\epsilon_1$  und  $\epsilon_2$ ). Die  $\gamma_2$ -,  $\epsilon_1$ - und  $\epsilon_2$ -Schnittstellen in murinem EpCAM konnten in humanem EpCAM nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18).

## humanes EpCAM



## murines EpCAM

### Abbildung 18: Zuordnung der transmembranen Spaltsequenzen von humanen und murinen EpCAM

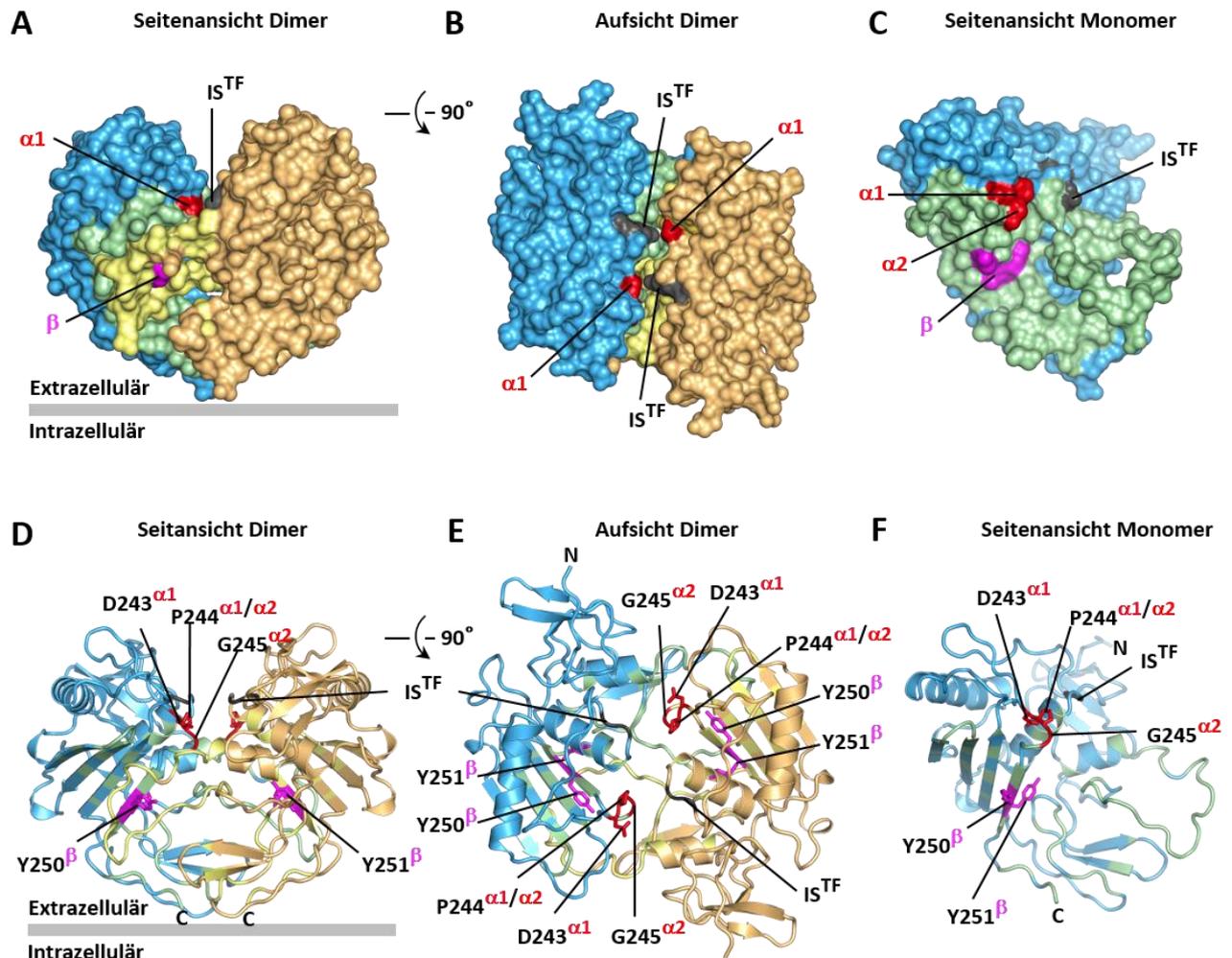
Darstellung  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Schnittstellen. Zuordnung der Schnittstellen von hEpCAM (oben) und mEpCAM (unten). Grau, sind nicht homologe Aminosäuren zwischen hEpCAM und mEpCAM; TMD entspricht der Transmembrandomäne.

### 5.3 Einfügen der Schnittstellen in die 3D Struktur von hEpCAM

Die Kristallstruktur EpCAMs wurde 2014 publiziert und gibt einen Einblick in die Quartärstruktur des Proteins (Pavsic et al., 2014). Zwei Monomere von hEpCAM bilden an der Zelloberfläche eine cis-Dimer Konfiguration. Die extrazelluläre Domäne hEpCAMs (hEpEX) besteht aus einer N-Domäne (ND), einer Thyreoglobulin Domäne (TY) und einer Carboxy-terminalen Domäne (CD).

Um die genaue dreidimensionale Lokalisation und damit auch die Zugänglichkeit der Schnittstellen darzustellen, wurden die extrazellulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnittstellen in die 3D Struktur des hEpEX Dimer von der Gruppe um Brigita Lenarčič implementiert. Die  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Schnittstellen befinden sich in der prominenten Schleife (RCD) der Carboxy-terminalen Domäne, welche durch den Verbund der  $\alpha_3$ -Helix mit dem  $\beta$ C-Faltblatt gebildet wird. Die  $\beta$ -Schnittstelle befindet sich proximal zur Membran und ist durch die Dimerbildung der extrazellulären Domänen komplett bedeckt. Die Schnittstellen sind in der nativen cis-Dimerformation kaum zugänglich für Proteasen, da sie sich nicht an der Oberfläche befinden (Abbildung 19). Die Lokalisierung der Schnittstellen legen nahe, dass eine Konformationsänderung des cis-Dimers oder eine Auflösung des Dimers notwendig ist, um die Schnittstellen zugänglich für die Proteasen zu machen. Das Implementieren des TEV-FLAG-Epitops in die Monomer- und in die cis-Dimerform zeigen, dass die Lokalisation an der Dimeroberfläche ist. Doch obwohl das TEV-FLAG Epitop größer als zehn Aminosäuren ist, hat es voraussichtlich keinen Einfluss auf die Konfor-

mation des Dimers (persönliche Mitteilung von Miha Pavšič), da es Teil der an der Oberfläche frei liegende Verbindungsregion ist (Abbildung 19).

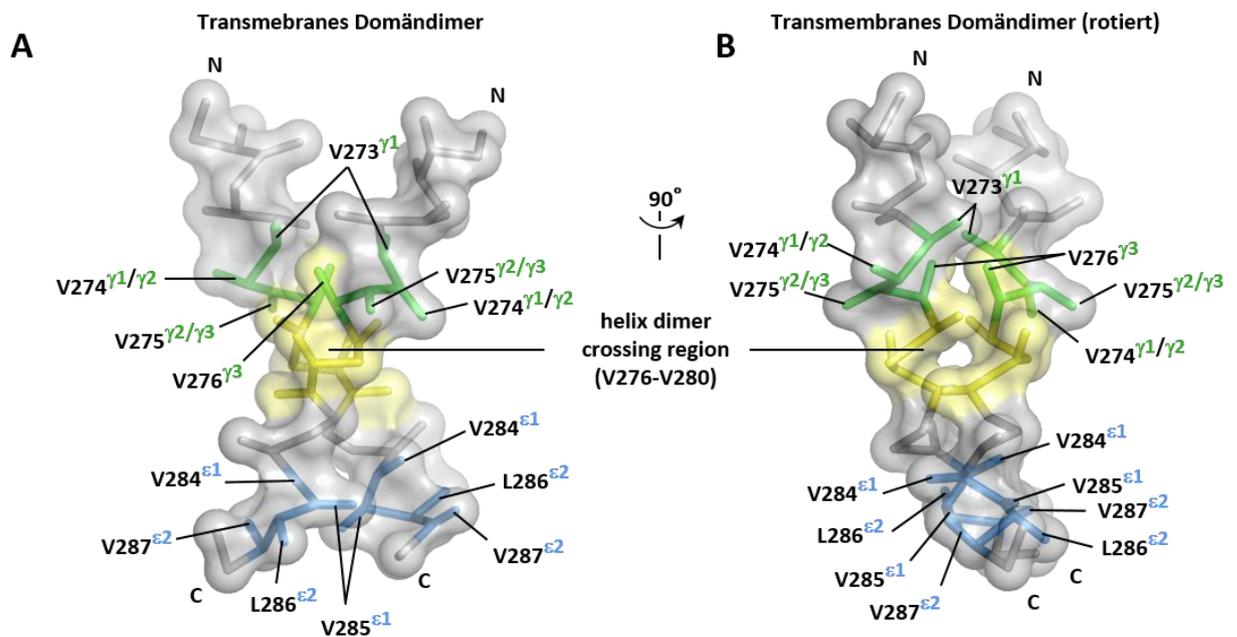


**Abbildung 19: Implementierung der extrazellulären Schnittstellen in das 3D-Modell von hEpCAM**

(A) Implementierung der  $\alpha$ - (rot),  $\beta$ - (magenta) Schnittstellen und des TEV-FLAG Epitops ( $IS^{TF}$ ) in das molekulare cis-Dimermodell von hEpCAM. Die Monomere sind in blau und hellorange dargestellt. Der cis-Dimerkontakt zwischen den Monomeren ist in grün bzw. gelb dargestellt. (Seitenansicht). (B) Beschriftung wie in (A). Aufsicht auf das hEpCAM Dimer. (C) Implementierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ -Schnittstellen und des TEV-FLAG Epitops ( $IS^{TF}$ ) in das hEpCAM Monomere. Farbkodierung wie in (A) (Seitenansicht) (D-F) Cartoon Darstellung mit derselben Farbkodierung wie in (A). (D) Seitansicht des hEpCAM Dimers. (E) Aufsicht auf das hEpCAM Dimer. (F) Seitansicht auf das hEpCAM Monomer.

Die transmembranen  $\gamma$ - und  $\varepsilon$ -Schnittstellen wurden in die Dimerhelix der Transmembrandomäne hEpCAMs eingefügt. Es wurde dafür eine Simulationssoftware benutzt, die ein molekulares stabförmiges (*coarse-grained*) Modell erstellte. Zwei Transmembrandomänen von hEpCAM bilden zusammen ein Helix-Dimer, die über die Aminosäuren

Valin<sup>276</sup> bis Valin<sup>280</sup> verbunden sind. Die  $\gamma$ -Schnittstellen befinden sich N-terminal, der Kreuzungsregion von den beiden Transmembrandomänen. Die  $\epsilon$ -Schnittstellen befinden sich C-terminal der Verbindungsregion. Folglich werden die Schnittstellen nicht bedeckt und sollten frei zugänglich für die  $\gamma$ -Sekretase sein, auch in der nativen Dimerform (Abbildung 20). Diese Zugänglichkeit erklärt die hohe Spaltungsrate des CTF-EpCAM Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase.



**Abbildung 20: Implementierung der transmembranen Schnittstellen in das 3D-Modell von hEpCAM**

(A) Implementierung der  $\gamma$ - (grün) und  $\epsilon$ - (blau) Schnittstellen in die Dimer bildende Transmembrandomäne. Die Darstellung des TMD Dimers erfolgt in einer gemischt molekularen, stabförmigen (*coarse-grained*) Darstellung. Der Berührungsbereich der beiden Monomere ist in Gelb dargestellt (V<sup>276</sup>-V<sup>280</sup>). (B) Bezeichnung wie in (A). Rotation von 90° um die y-Achse.

#### 5.4 Einfluss der Spaltung auf die Zelladhäsion

EpCAM wird durch eine RIP gespalten und die resultierenden EpICD-Fragmente spielen eine Rolle bei der Regulation der Proliferation in Karzinomzellen (Chaves-Perez et al., 2013; Maetzel et al., 2009). Der Einfluss einer RIP auf die EpCAM-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion bleibt bislang unerforscht. Im Folgenden sollte daher der Einfluss der RIP auf die EpCAM-vermittelte Zelladhäsion untersucht werden.

EpCAM wurde als homophiles Zelladhäsionsmolekül von Litvinov *et al.* beschrieben (Litvinov, Velders, et al., 1994). Gleichzeitig wurde in Karzinomzellen eine Reduktion der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion durch EpCAM beobachtet (Litvinov et al., 1997). Deshalb soll nun die Adhäsionsfähigkeit EpCAMs in Abhängigkeit von der regu-

latorisch intramembranen Proteolyse (RIP) analysiert werden. Da die RIP nicht nur erforderlich für den Signalweg ist, sondern auch Zellmembranproteine degradieren kann (Maretzky et al., 2005), könnte dieser Vorgang auch einen Einfluss auf die EpCAM-vermittelte Adhäsion haben. Um die Spaltung zu inhibieren wurden HCT-8 Zellen mit einer Kombination aus Proteaseinhibitoren behandelt. Als Kontrollbehandlung wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet. Das Adhäsionsverhalten sollte einmal auf einer mit Matrigel beschichteten Oberfläche, was die extrazelluläre Matrix darstellen soll, untersucht werden und auf einer mit Zellen beschichteten Oberfläche, um die Zell-Zell-Adhäsion untersuchen zu können.

Es wurden HCT-8 Kolonkarzinomzellen verwendet, welche EpCAM positiv sind. Sie wurden für 24 Stunden entweder mit DMSO, was als Kontrolle diente, oder mit der Kombination aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren (GI254023X, C3, DAPT) vorbehandelt. Danach wurden die Zellen zur Lebendfärbung mit Calcein AM behandelt. Zur Untersuchung der Zell-Matrix-Adhäsion wurden die vorbehandelten und Calcein AM-gefärbten HCT-8 Zellen auf eine mit Matrigel beschichtete 96-Well Platte ausplattiert und entsprechend der Vorbehandlung für zwei Stunden in Anwesenheit von GI254023X, C3, DAPT bzw. DMSO kultiviert. Danach wurden die 96-Well Platten gewaschen und die noch anhaftenden Zellen lysiert. Die Intensität des freigesetzten Calcein AM wurde gemessen, sowie die Intensität der Inputkontrolle, welche nicht gewaschen wurde. Die Inputkontrolle wurde auf 100% gesetzt, um davon den prozentualen Anteil der adhärierenden Zellen zu bestimmen (Abbildung 21 A, B). Eine Behandlung der HCT-8 Zellen mit den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren zeigte, dass 26,90% der Zellen adhärent waren. Bei den mit DMSO behandelten Zellen waren 28,3% der Zellen adhärent. Folglich hatte die Behandlung der Zellen mit den Sekretasen Inhibitoren keinen signifikanten Effekt auf die Zell-Matrix-Adhäsion (Abbildung 21 D, links).

Um den Einfluss der RIP auf die Zell-Zell-Adhäsion zu untersuchen, wurden HCT-8 Zellen, wie zuvor schon beschrieben für 24 Stunden mit den Sekretasen Inhibitoren (GI254023X, C3 und DAPT) bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurden sie mit Calcein AM behandelt und auf eine mit Sekretasen Inhibitoren (GI254023X, C3 und DAPT) bzw. DMSO vorbehandelte HCT-8 Zellschicht ausplattiert. Anschließend wurden sie für zwei Stunden mit GI254023X, C3 und DAPT bzw. DMSO kultiviert. Nach Waschen und Lysieren der HCT-8 Zellen wurde die Intensität des freigewordenen Calcein AM gemessen und mit der 100%igen Inputkontrolle verrechnet (Abbildung 21 A, C). Dabei waren 20,81% der mit Inhibitoren behandelten und 20% der mit DMSO behandelten HCT-8

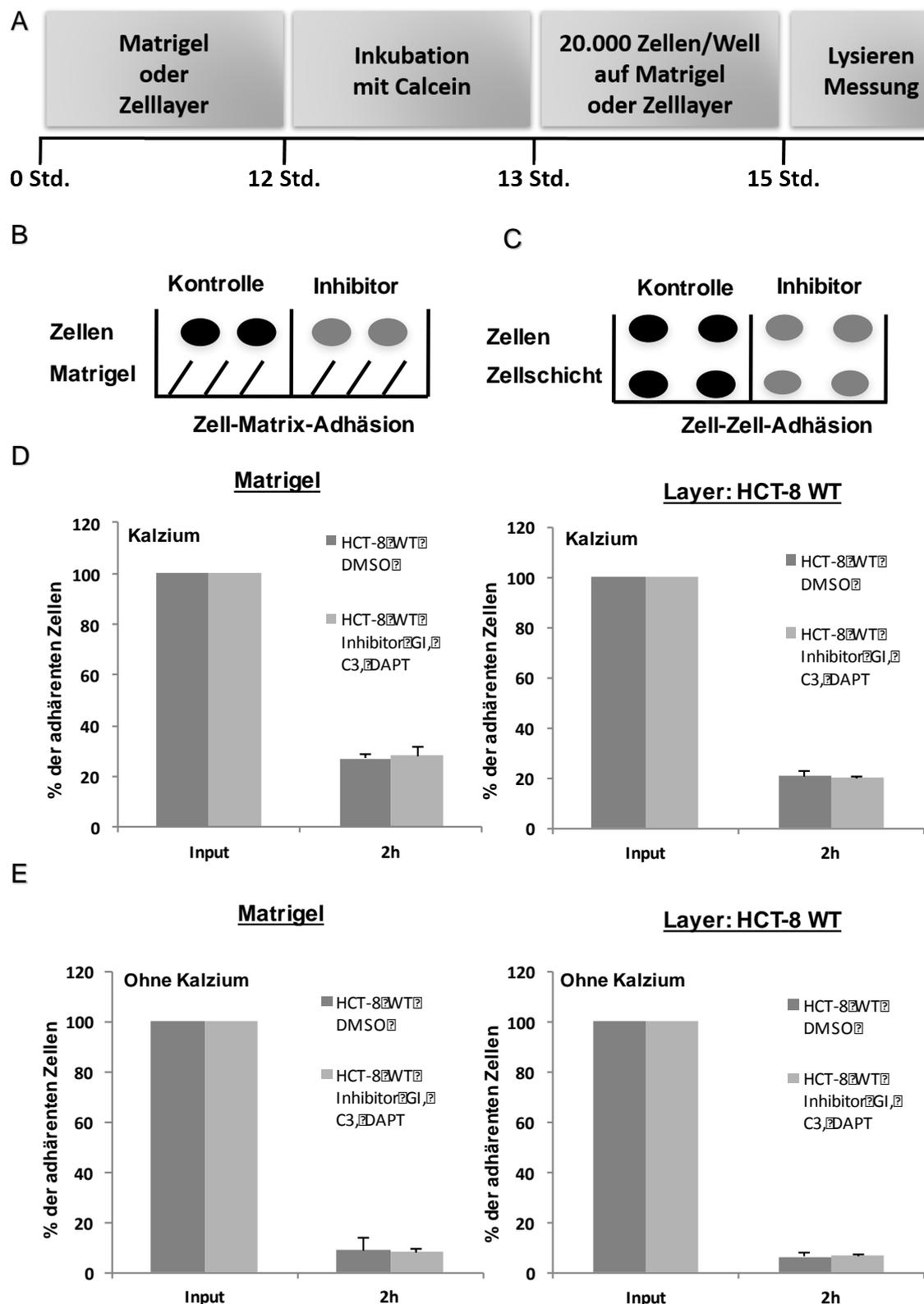
Zellen adhären. Folglich hatte die Inhibierung der Sekretasen keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion (Abbildung 21 D, rechts).

Um den Einfluss von E-Cadherin auf die Zelladhäsion zu minimieren und weil EpCAM als kalziumunabhängiges Zelladhäsionsmolekül beschrieben wurde, wurden alle Experimente unter Kalziumentzug wiederholt.

HCT-8 Zellen wurden in FKS- und kalziumfreiem Medium für 24 h preinkubiert, bevor sie wie bereits beschrieben, entsprechend in kalziumfreier Umgebung mit den Sekretasen Inhibitoren GI254023X, C3 und DAPT bzw. DMSO behandelt wurden. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Adhärenz von 20-30% (mit Kalzium) auf 6-9% (kalziumfrei). Dies zeigt den generellen Verlust der E-Cadherin vermittelten Adhäsion. Jedoch war kein Unterschied unter Kalziumentzug zwischen GI254023X, C3, DAPT- und DMSO-behandelten Zellen in der Zell-Matrigel- bzw. Zell-Zell-Adhäsion zu erkennen (Abbildung 21 E).

Zusammenfassend lassen die hier durchgeführten Experimente folgende Schlüsse zu:

- Die RIP von EpCAM spielt keine maßgebliche Rolle in der Zell-Matrix und Zell-Zell-Adhäsion von EpCAM-positiven Karzinomlinien.
- Ein Einfluss der RIP auf Zell-Matrix und Zell-Zell-Adhäsion in Abwesenheit von Kalzium und somit bei fehlender E-Cadherin Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: Einfluss der Inhibierung der Spaltung auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion**

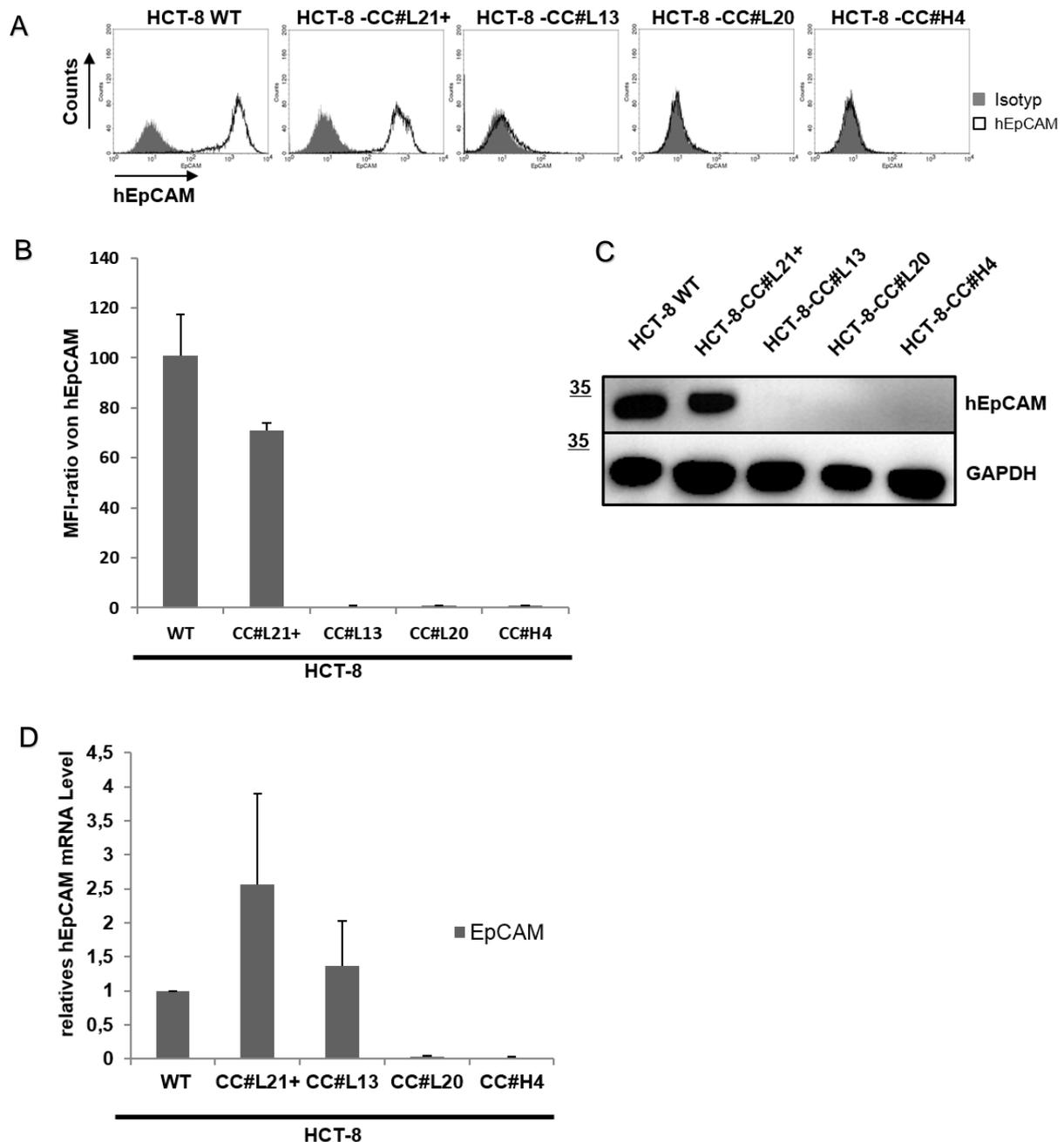
(A) Schematische Darstellung des experimentellen Verlaufs. (B) Schematische Darstellung des Zell-Matrix-Adhäsionsassays. (C) Schematische Darstellung des Zell-Zell-Adhäsionsassays. (D) HCT-8 Kolonkarzinomzellen wurden vor und während des Zell-Matrix- (links) bzw. während des Zell-Zell-Adhäsionsassays (rechts) mit DMSO oder mit einer Kombination von GI24023X, C3 und DAPT in der Anwesenheit von Kalzium behandelt. (E) Vorgehen wie in (D) in Abwesenheit von Kalzium.

### 5.5 Generierung eines zellulären hEpCAM Knockouts in HCT-8 Zellen mittels CRISPR-Cas9 Technologie

Die Hemmung der RIP von EpCAM hatte keinen Einfluss auf die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion. Auch bei Entzug von Kalzium konnte kein Einfluss EpCAMs auf die Zell-Adhäsion festgestellt werden. Um die Funktion EpCAMs bei der Adhäsion von Karzinomzellen weiterführend zu untersuchen, sollten genetische Knockout Klone von hEpCAM in HCT-8 Zellen mittels CRISPR-Cas9 Technologie generiert werden.

Zur Generierung eines zellulären hEpCAM Knockouts mittels CRISPR-Cas9 Technologie wurden zunächst HCT-8 Zellen mit einem CRISPR-Cas9 Plasmid, welches das Exon 3 targetiert und zudem eine YFP Expressionskassette trägt, transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die HCT-8 Zellen anhand ihrer YFP Expression mittels FACS isoliert und in 96-Well Platten als Einzelzellklone ausplattiert. Angewachsene Klone wurden mit einem anti-hEpCAM Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie in drei unabhängigen Experimenten analysiert (Abbildung 22 A). Die im Durchflusszytometer detektierte MFI-Ratio (*mean-fluorescence-intensity Ratio*) der HCT-8 WT Zellen wurde auf den Wert 100 gesetzt. Die gemessenen Werte von den EpCAM-positiven Kontrollzelllinie HCT-8-CC#L21 und den EpCAM-negativen HCT-8-CC#L13, HCT-8-CC#L20 und HCT-8-CC#H4 wurden dazu in Relation gesetzt. In der positiven Kontrollzelllinie HCT-8-CC#L21 zeigt sich eine relative MFI-Ratio von 70, wohingegen, die HCT-8-CC#L13, HCT-8-CC#L20 und HCT-8-CC#H4 Zellen eine relative MFI-Ratio von 1 zeigten. Bei Dividierung der gemessenen Zelllinien durch ihre Negativkontrolle, spricht ein Wert von 1 für keinerlei hEpCAM Expression. Die Ratio von 1 ist bei den EpCAM-negativen Zellen feststellbar (Abbildung 22 B). Folglich wurden drei EpCAM negative Klone generiert, sowie eine EpCAM-positive Kontrollzelllinie. Zur Bestätigung eines kompletten EpCAM Knockouts wurden zusätzlich Western Blots und qRT-PCRs durchgeführt. Im Western Blot wiesen der HCT-8 WT, sowie die EpCAM-positive Kontrollzelllinie HCT-8-CC#L21 eine EpCAM Expression auf, wohingegen im Zelllysate der HCT-8-CC#L13, HCT-8-CC#L20 und HCT-8-CC#H4 Zellen kein Signal detektierbar war (Abbildung 22 C). Zur Untersuchung der EpCAM mRNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich eine 2,5-fach erhöhte mRNA Menge in der Positivkontrolle HCT-8-CC#L21, keinerlei mRNA Expression in den HCT-8-CC#L20 und HCT-8-CC#H4 Zellen und eine mRNA Expression auf HCT-8 WT Niveau in den HCT-8-CC#L13 Zellen (Abbildung 22 D). Jedoch wurde weder im Western Blot, noch im FACS eine EpCAM Expression in den HCT-8-CC#L13 Zellen detektiert. Die mRNA Expression in den HCT-8-CC#L13 Zellen lässt sich am wahrscheinlichsten dadurch erklären, dass der Doppelstrangbruch, nicht

zu einem Stopcodon geführt hat, wodurch die mRNA weiterhin abgelesen wird bzw. die benutzten RNA Primer weiterhin an den mRNA Abschnitt binden kann. Jedoch wird das abgelesene mRNA Fragment nicht translatiert, denn es konnte weder in der Durchflusszytometrie, noch im Western Blot das EpCAM Protein nachgewiesen werden.



#### Abbildung 22: Zellulärer hEpCAM Knockout mittels CRISPR-Cas9

(A) Mittels CRISPR-Cas9 Technologie wurde in HCT-8 Kolonkarzinomzellen das humane EpCAM Gen mutiert. Die Expression von hEpCAM an der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie und hEpCAM-spezifischen Antikörper bestimmt. Es wurden HCT-8 Wildtyp (WT), ein hEpCAM positiver Klon HCT-8-CC#L21+ und drei hEpCAM negative Klone HCT-8-CC#L13, -CC#L20, -CC#H4 untersucht. Isotypkontrolle ist in grau dargestellt und hEpCAM Bindung durch die schwarze Linie (repräsentatives Ergebnis von drei voneinander unabhängigen

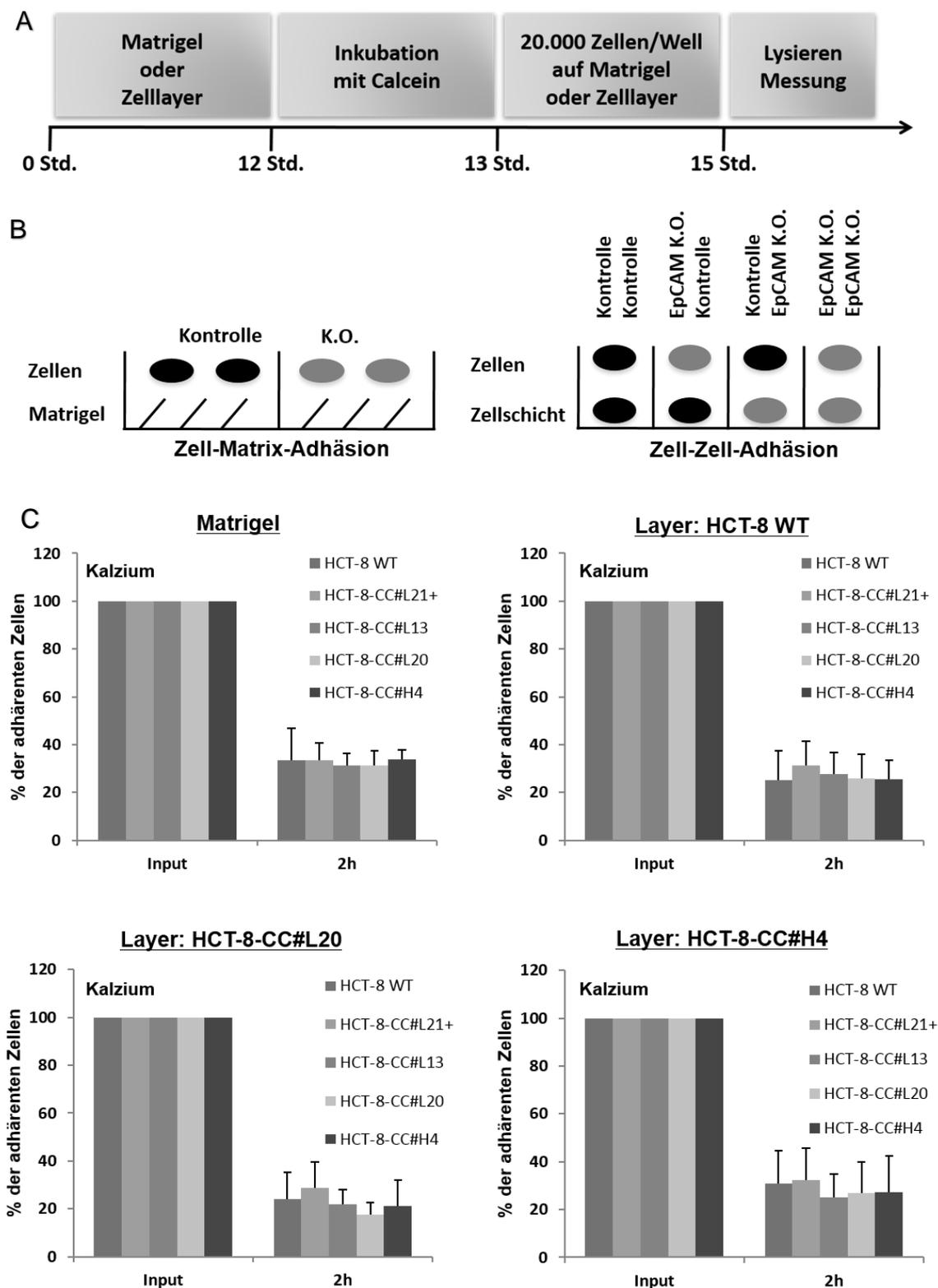
Experimenten). **(B)** Statistische Analyse der hEpCAM Expression in HCT-8 WT, des positiven hEpCAM Klons HCT-8-CC#L21+ und den drei hEpCAM negativen Klonen HCT-8-CC#L13, -CC#L20, -CC#H4, dargestellt ist der Mittelwert jeder der untersuchten Zelllinien, sowie die Standardabweichungen von drei voneinander unabhängigen Experimenten. **(C)** Expression von hEpCAM im Zellysat der generierten HCT-8 Zelllinien (A). GAPDH diene als Ladekontrolle. **(D)** qRT-PCR Analyse der hEpCAM mRNA Expression der generierten HCT-8 Zelllinien (A). Dargestellt ist der Mittelwert der relativen mRNA Expression und der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Alle mRNA Expressionswerte wurden zum Verhältnis der mRNA Expression von HCT-8 WT gesetzt.

### 5.6 Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Zelladhäsion

Zur Charakterisierung des Einflusses EpCAMs auf die Zelladhäsion wurden Adhäsionsassays mit Knockoutzellen bzw. EpCAM-positiven Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die Zell-Matrix-Adhäsion untersucht. Jeder Klon wurde auf eine mit Matrigel beschichtete 96-Well Platte ausplattiert. Die Messung der Adhäsion erfolgte wie in 5.4. beschrieben und ist schematisch in Abbildung 23 A und B dargestellt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den EpCAM Knockouts und den EpCAM-positiven Zellen, bezüglich der Zell-Matrix-Adhäsion (Abbildung 23 C, oben links).

Um die Zell-Zell-Adhäsion zu bestimmen, wurden HCT-8 Wildtyp bzw. HCT-8 Knockout Zellen in 96-Well Platten ausplattiert. Auf diese Zellschicht wurde entsprechend dem Schema in Abbildung 23 B 20.000 Zellen/Well ausplattiert, welche zuvor mit Calcein AM inkubiert wurden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den EpCAM Knockouts und den EpCAM positiven Zellen bezüglich der Zell-Zell-Adhäsion (Abbildung 23 C, oben rechts und unten).

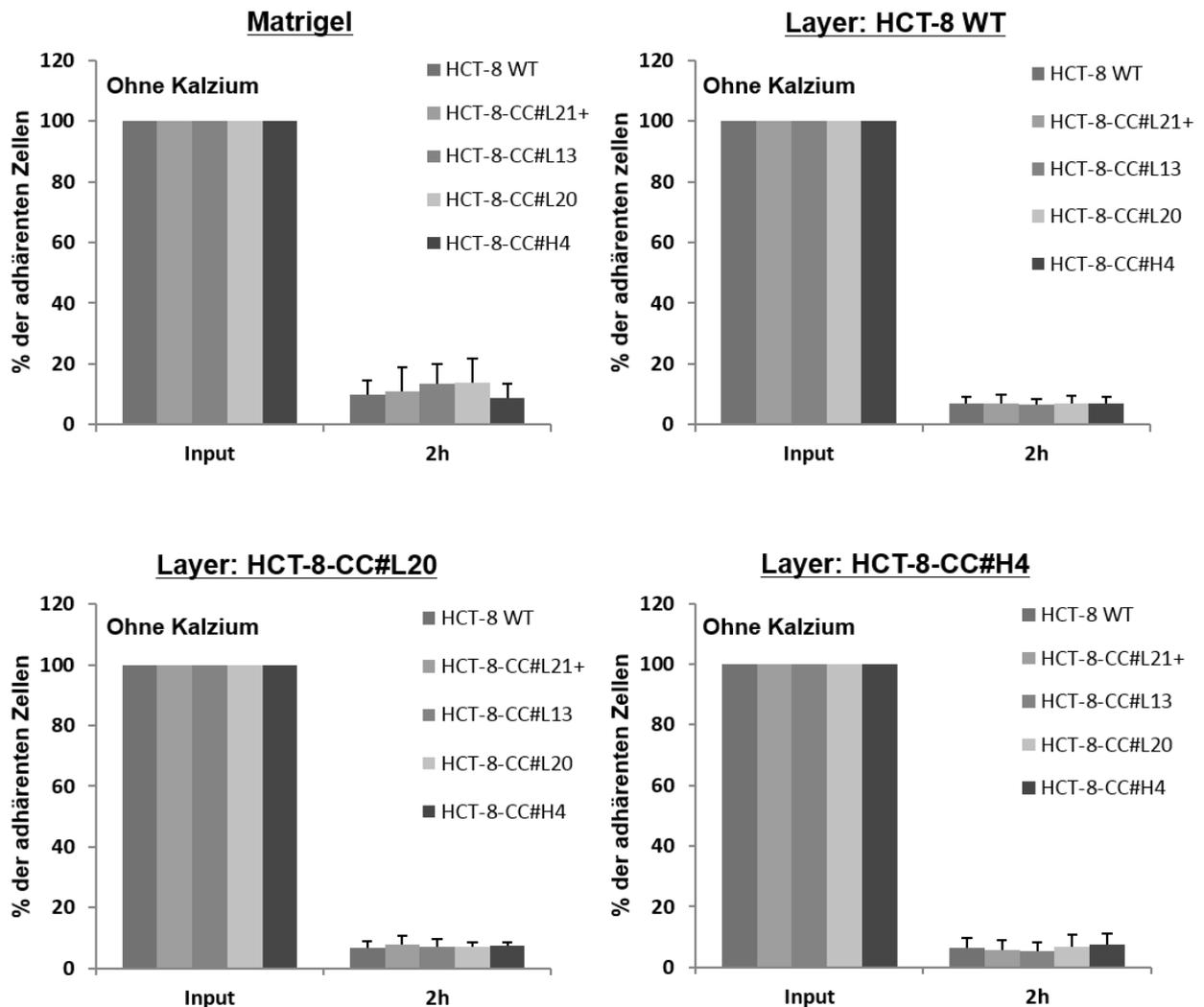
Es muss daher festgestellt werden, dass weder die Zell-Matrix-, noch die Zell-Zell-Adhäsion durch den hEpCAM Knockout in HCT-8 Zellen unter normokalziämischen Bedingungen beeinflusst wurde.



**Abbildung 23: Einfluss eines hEpCAM Knockouts auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion in Kalziumumgebung**

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Schematische Darstellung des Zell-Matrix- (links) und des Zell-Zell-Adhäsionsassays (rechts) (C) HCT-8 WT, hEpCAM positiver Klon HCT-8-CC#L21+ und hEpCAM negative Klone HCT-8-CC#L12, -CC#L20 und -CC#H4 wurden bezüglich der Zell-Matrix- bzw. des Zell-Zell-Adhäsionsassays mit unterschiedlichen Zellschichten HCT-8 WT, HCT-8-CC#L20 bzw. HCT-8-CC#H4 unter normokalziämischen Bedingungen untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, welche jeweils aus acht Messpunkten generiert wurden.

Im folgenden Experiment wurde die Adhäsion von HCT-8 Zellen unter Kalziumentzug untersucht. Unter Kalziumentzug ergab sich eine Gesamtreduktion der Adhäsion von den HCT-8 Zellen von 25-35% auf 5-13%. Dies zeigte den generellen Verlust der E-Cadherin vermittelten Adhäsion. Jedoch hatte der zelluläre hEpCAM Knockout keinen messbaren Effekt auf die Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Adhäsion unter Kalziumentzug (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Einfluss eines hEpCAM Knockouts auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion unter Kalziumentzug**

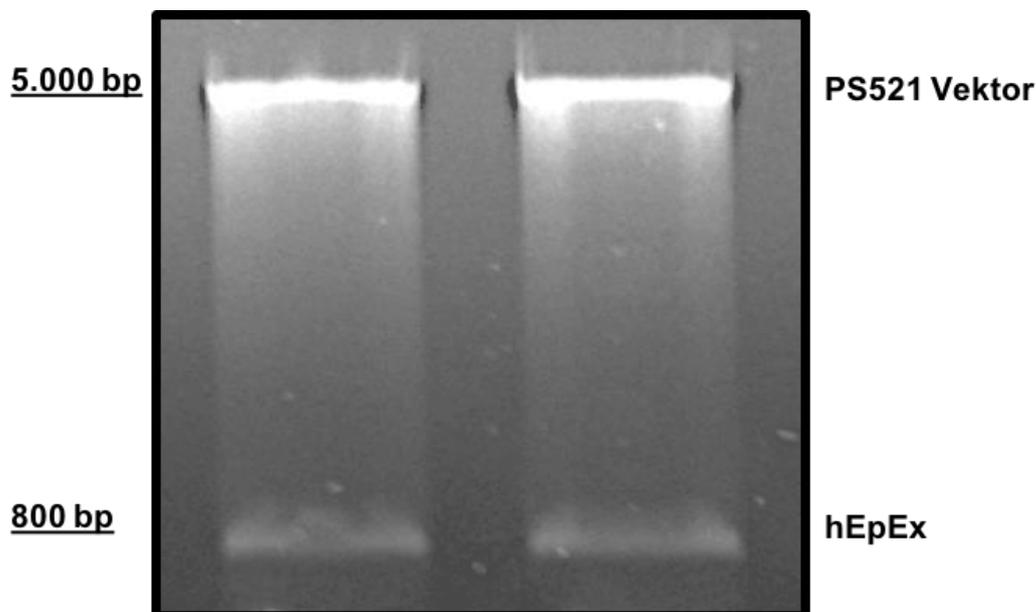
Unter Kalziumentzug (Beschriftung wie in Abbildung 23 C)

### 5.7 Generierung und Aufreinigung eines humanen EpEx-Fc Proteins

Bislang wurden die möglichen Effekte von EpCAM auf die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion im Kontext von Karzinomzellen untersucht. Hier spielt neben EpCAM eine Vielzahl von Membranproteinen eine wichtige Rolle, so dass EpCAM-assoziierte Effekte ausgeglichen werden können. Insbesondere, weil unerwarteterweise keine Effekte der

EpCAM Hemmung und des Knockouts auf die Adhäsion im zellulären System nachgewiesen werden konnte, war es essentiell die Wechselwirkung von EpCAM Molekülen zu untersuchen. Daher sollte die reine Protein-Protein Interaktion zwischen den EpCAM Molekülen mittels *atomic force microscopy* (AFM) untersucht werden. Hierzu musste ein rekombinantes hEpEx-Fc Protein generiert, exprimiert und aufgereinigt werden. Auf diese Weise kann der extrazelluläre Anteil von EpCAM über den konstanten Fc-Teil humaner Immunglobuline immobilisiert und analysiert werden.

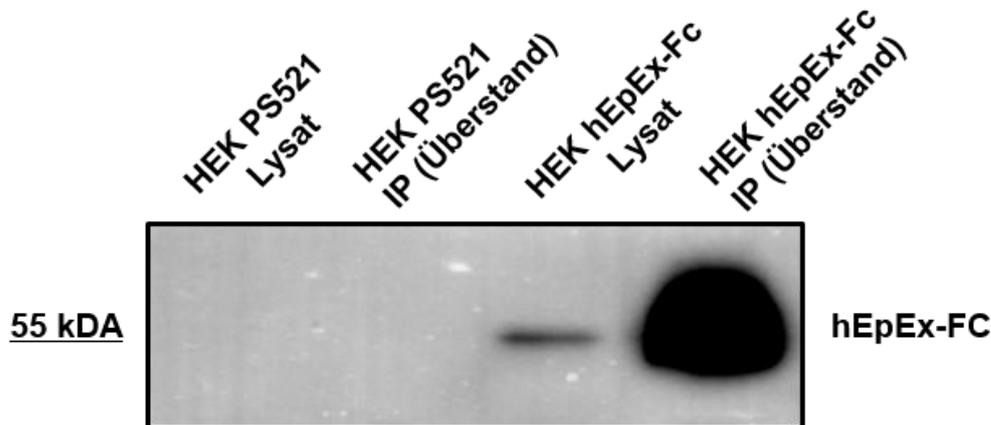
Zur Generierung eines hEpEx-Fc Protein wurden HEK293 Zellen mit dem Vektor PS521 hEpEx-Fc transfiziert. Dazu wurde zunächst der Teil der DNA amplifiziert, der für die extrazelluläre Domäne kodiert und mit entsprechend zu dem Vektor passenden Restriktionselementen versehen. Nach Schneiden der generierten DNA Fragmente und des Vektors wurden die beiden Komponenten miteinander ligiert (Abbildung 25). Der Vektor enthält die cDNA zur Expression der extrazellulären Domäne EpCAMs (EpEX), sowie ein daran anschließenden, konstanten Anteil des humanen Immunoglobulins Fc-Teils (CH2-CH3 Domänen)



**Abbildung 25: Generierung des hEpEx-Fc PS521 Plasmids**

Restriktionsverdau von zwei hEpEx-Fc PS521 Plasmiden mit den Restriktionsenzymen Hind I und Sal I, mit nachfolgender Auftrennung der DNA Fragmente mittels Agarose Gelelektrophorese. Darstellung des PS521 Plasmids und des hEpEx Inserts.

Die transfizierten HEK293 Zellen wurden selektioniert und in Ultra low IgA FKS-haltigem Medium kultiviert. Nach fünf Tagen wurde aus dem Überstand das Protein mittels Agarose A aufgereinigt und mit einem anti-hEpEx Antikörper im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 26).



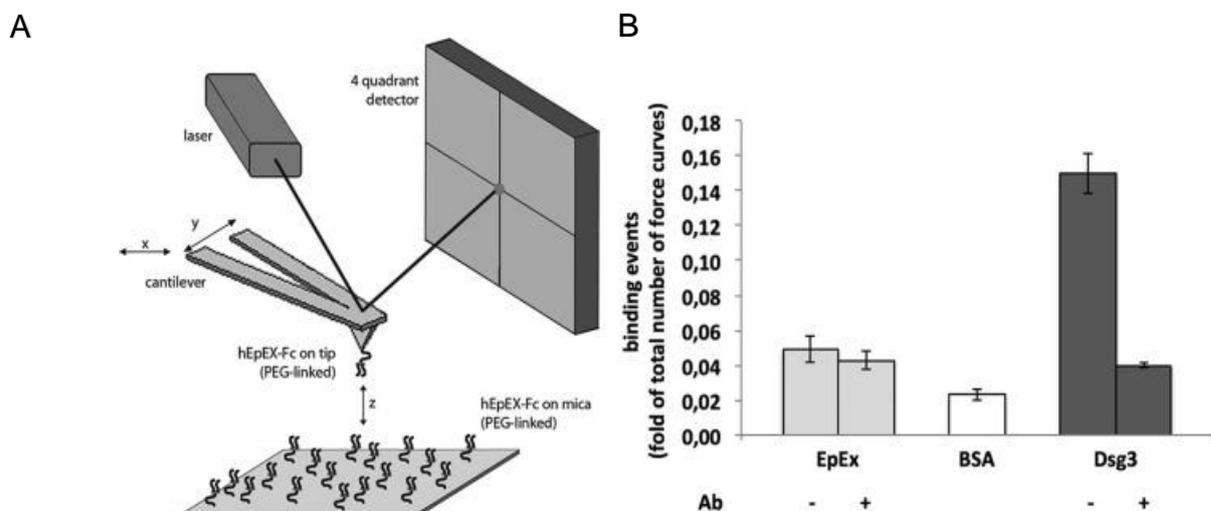
**Abbildung 26: Nachweis der Aufreinigung von hEpEx-Fc aus HEK293 Zellen**

Western Blot aus dem Zelllysats, sowie nach Immunpräzipitation (IP) aus dem Zellkulturüberstand von HEK293 PS521 (Kontrollvektor) und HEK293 hEpEx-FC Zellen mittels hEpCAM Antikörper.

### 5.8 Bestimmung der Protein-Protein Interaktion von hEpEx mittels *atomic force microscopy* (AFM)

Bisher wurde die Eigenschaft EpCAMs bei der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion in einem Calcein AM Adhäsionsassay mit HCT-8 Zellen durchgeführt. Im folgenden Ansatz wurde die Fähigkeit der extrazellulären Domäne von EpCAM untersucht, in einem zellfreien System Interaktionen in trans einzugehen. Hierzu wurden Interaktionen der extrazellulären Domänen mit Hilfe der AFM gemessen. Die AFM Experimente führte die AG um Prof. Volker Spindler (Anatomie der LMU) durch. Das AFM besteht aus einem elastischen Hebelarm, an dem eine Messspitze befestigt ist. An dieser ist über einen Polyethylen Spacer das rekombinante Protein über den Fc-Teil fixiert. Ebenso wurde eine mit Polyethylen beschichtete Mica Oberfläche mit hEpEx-Fc Proteinen inkubiert (Abbildung 27 A). Die Mica Oberfläche besteht aus einer hydrophilen, negativ in Wasser geladenen planaren Aluminium-Silizium Schicht (Schichtsilikaten). Es bietet hohe Temperaturbeständigkeit, sowie den Vorteil, dass es gute mechanische, elektrisch isolierende Eigenschaften und eine Rauigkeit von  $< 6\text{\AA}$  besitzt. Um die Adhäsion zu messen wurde die Messspitze mit dem kovalent gebundenen EpEx-Fc auf die mit EpEx-Fc beschichtete Oberfläche mehrmals auf und abgefahren. Bindungsereignisse wurden durch

Auslenkung des Hebelarms mittels eines Lasers registriert. Dabei wurde eine Kraft-Abstands-Kurve erstellt, welche aus der auf den Hebelarm wirkende Kraft in Abhängigkeit der Spitzenposition besteht. Dadurch wurde die Interaktion von hEpEx Proteinen in trans mit Hilfe der *atomic force microscopy* untersucht. Die Hebelarmgeschwindigkeit betrug 0,1m/s und die Kontaktzeit 0,1s, dabei wurden weniger als 5% Bindungsereignisse registriert. Als Negativkontrolle wurden die Versuche mit BSA beschichteter Messspitze und Mica Schicht durchgeführt, wobei leicht weniger Bindungsereignisse als bei hEpEx-Fc detektiert wurden. Ein gegen den N-Terminus von hEpEx gerichteter Antikörper führte zu keiner Reduktion der Bindungsereignisse (Abbildung 27 B). In der Postivkontrolle wurde das Desmoglein3 (Dsg3) Protein verwendet, ein Adhäsionsprotein vom Cadherintyp, welches wichtig für den Zusammenhalt von Keratinozyten ist. Es wurden dabei 15% Bindungsereignisse registriert, welche durch einen gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper stark reduziert wurde (Abbildung 27 B).



**Abbildung 27: Atomic force microscopy Messung der hEpEx-hEpEx-Interaktion**

(A) Schematische Darstellung der AFM unter Verwendung von hEpEx-Fc. (B) Bindungsereignisse wurden mittels Kraft-Abstands Kurve ermittelt. Der Mittelwert wurde aus 4-6 Messungen pro Sample errechnet und einschließlich der Standardfehler in einem Diagramm dargestellt. Bei + wurde mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern inkubiert.

AFM Messungen der postulierten Wechselwirkung von EpCAM Dimeren in trans widersprechen publizierten Daten (Balzar, Prins, et al., 1999) und zeigen keine signifikante Wechselwirkung im Vergleich zur Negativkontrolle. Zudem ist die postulierte Wechselwirkung nicht durch EpCAM-spezifische Antikörper blockierbar. Somit erscheint eine direkte Wechselwirkung von EpCAM Molekülen in trans zur Vermittlung von Zelladhäsion in Karzinomzellen als unwahrscheinlich.

## 6. Diskussion

Das *Epitheliale Cell Adhesion Molecule* EpCAM wurde als eines der ersten Tumor-assoziierten Antigene beschrieben. Es ist ein transmembranes Protein, welches in einer Vielzahl von Karzinomen und teilweise in gesundem Epithel exprimiert wird. Aufgrund der starken Expression in Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe ist EpCAM ein interessantes Zielmolekül für immuntherapeutische Ansätze (Baeuerle & Gires, 2007; Mosolits et al., 2004; Riesenber, Buchner, Pohla, & Lindhofer, 2001). Zusätzlich wird es als prognostischer Marker für eine Vielzahl von Karzinomen verwendet (Chai, Song, & Xu, 2015; Spizzo et al., 2004). Aber EpCAM spielt nicht nur in Karzinomen eine Rolle, sondern ist auch für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in murinen und humanen embryonalen Stammzellen von Bedeutung (Gonzalez et al., 2009; Ng et al., 2010). EpCAM wird durch eine regulatorische intramembrane Proteolyse (RIP) prozessiert, was zur Generierung der intrazellulären, Signal-transduzierenden Domäne EpICD führt. EpICD wechselwirkt mit den Interaktionspartnern FHL2 und  $\beta$ -Catenin, transloziert in den Zellkern und reguliert, zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Lef1, die Transkription von Zielgenen, die Zellproliferation (Chaves-Perez et al., 2013; Maetzel et al., 2009) und die Pluripotenz (H. P. Huang et al., 2011; Lu et al., 2010).

### 6.1 Spaltung des humanen EpCAMs

Die Spaltung EpCAMs führt zur Induktion der Proliferation vermittelt durch Proteine wie Cyclin D1 und c-Myc (Chaves-Perez et al., 2013; Munz et al., 2004). HEpCAM wird dabei durch eine regulative intramembrane Proteolyse (RIP) prozessiert. Diese gliedert sich in eine geschwindigkeitsbestimmende erste extrazelluläre Spaltung, gefolgt von weiteren transmembranen Spaltungen (Maetzel et al., 2009). Die Spaltung EpCAMs und die Akkumulation von EpICD ließ sich bislang in Tumoren und Stammzellen beobachten und geht mit einer schlechten Prognose von Tumorpatienten einher (Fong et al., 2014; H. P. Huang et al., 2011; Lu et al., 2010; Ralhan, Cao, et al., 2010). Um EpCAM-positive Tumore zu behandeln, wurden EpCAM-spezifische Antikörper verwendet (Brischwein et al., 2006; Jager et al., 2012). Doch EpCAM wird auch in gesundem Gewebe exprimiert (Moldenhauer et al., 1987). Zur zielgerichteten Therapie gegen Tumorzellen könnte es von Bedeutung sein die Spaltung zu inhibieren (Gosens, van Kempen, van de Velde, van Krieken, & Nagtegaal, 2007; Ralhan, Cao, et al., 2010). Auf diese Weise könnte man einen dualen Effekt erreichen: die Hemmung der EpCAM-vermittelten Proliferation und eine Erhöhung der Anzahl intakter EpCAM Moleküle an der Zelloberfläche. Jedoch waren die genauen Spaltsequenzen auf Ebene der Amino-

säuren, sowie die damit einhergehenden unterschiedlichen Fragmente, bisher nur für murines jedoch nicht für humanes EpCAM beschrieben (Hachmeister et al., 2013). Es stellte sich desweiteren die Frage ob hEpCAM genau wie mEpCAM durch die Spaltung degradiert wird (Hachmeister et al., 2013) und ob die Degradierung einen Einfluss auf die Zelladhäsionsfähigkeit EpCAMs hat.

Um die noch nicht bekannten extrazellulären Schnittstellensequenzen in humanem EpCAM zu identifizieren, wurde zunächst ein rekombinantes hEpCAM-TF Protein hergestellt. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analyse konnten drei extrazelluläre Hauptschnittstellen identifizieren werden (Abbildung 11). Durch zielgerichtete Inhibierung der Proteasen, konnten die Schnittstellen spezifischen Proteasen zugeordnet werden. Die extrazelluläre Spaltung erfolgte an zwei  $\alpha$ -Seiten durch ADAM Proteasen und an einer  $\beta$ -Seite durch BACE1 (Abbildung 12).

Zu der Familie der Metalloproteasen gehören unter anderem TACE/ADAM17 und ADAM10 (Stone, Kroeger, & Sang, 1999). Der verwendete Inhibitor GI254023X blockiert dabei beide Matrix Metalloproteasen, wobei ADAM10 um ein 100-faches effektiver blockiert werden kann (Ludwig et al., 2005). Eine Blockierung von TACE/ADAM17 mittels TAPI-II hatte, anders als in mEpCAM (Hachmeister et al., 2013), alleine keinen Einfluss auf die Spaltung hEpCAMs (unveröffentlichte Daten). Es konnte somit eine Beteiligung von ADAM10, neben ADAM17, an der Spaltung gezeigt werden.

Somit gibt es, neben dem strukturellen Zusammenhang zwischen hEpCAM und der ADAM10 Protease, die in Tetraspanin-reichen Mikrodomänen (TEM) kolokalisiert sind (Le Naour et al., 2006), auch einen funktionellen Zusammenhang. Neben EpCAM processieren ADAM Proteasen eine große Anzahl weiterer Transmembranproteine, wie den Notch Rezeptor, APP, EGF Rezeptor und E-Cadherin, und regulieren dadurch zahlreiche Signalwege und Zelleigenschaften (Edwards et al., 2008). Zudem konnte bestätigt werden, dass die hochkonservierte BACE1 Schnittstelle in mEpCAM zwischen Tyrosin<sup>251</sup> und Tyrosin<sup>252</sup> auch in hEpCAM identifiziert werden konnte (Hachmeister et al., 2013).

Nach der extrazellulären Spaltung erfolgt die Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase. Zur Identifizierung der transmembranen Schnittstellen wurde ein rekombinantes membranständiges C-terminale Fragment hergestellt, um die  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Spaltungen zu charakterisieren. Es wurden dabei drei  $\gamma$ -Schnittstellen und zwei  $\epsilon$ -Schnittstellen identifiziert (Abbildung 16). Der  $\gamma$ -Schnitt führt dabei zur Freisetzung eines A $\beta$ -ähnlichen Fragmentes bislang unbekannter Funktion. Es konnte hiermit das erste Mal A $\beta$ -ähnliche Frag-

mente in hEpCAM beschrieben werden. A $\beta$  Fragmente werden, unter anderem bei der Spaltung von Substraten wie bei dem Amyloid Precursor Protein (APP), durch die  $\gamma$ -Sekretase und BACE1 generiert (Haass, Kaether, Thinakaran, & Sisodia, 2012). Bei der Alzheimer Erkrankung kommt es nach Spaltung von APP durch BACE1 und  $\gamma$ -Sekretase zur Generierung unterschiedlich langer A $\beta$ -Fragmente. Die Generierung eines A $\beta_{1-42}$ -Fragmentes führt bei Akkumulation zu  $\beta$ -Plaques und ist mit verantwortlich für die Entstehung der Alzheimer Erkrankung (Haass et al., 2012). Zur Diagnose von Alzheimer wird der Nachweis von A $\beta_{1-42}$ -Fragmenten hinzugezogen (Blennow, Mattsson, Scholl, Hansson, & Zetterberg, 2015). Im Falle EpCAMs ist noch keine Funktion bezüglich der A $\beta$ -Fragmente beschrieben worden, doch könnte es in Zukunft als Nachweis für die Spaltung diagnostisch hinzugezogen werden. Bei Trop2 (*Tumor-associated calcium signal transducer 2*) lässt sich vermuten, dass es auch durch BACE1 gespalten wird (Hachmeister et al., 2013). Jedoch wurde bisher nur eine Spaltung von TACE/ADAM17 und der  $\gamma$ -Sekretase beschrieben (Stoyanova et al., 2012). Mutationen von hTrop2 sind assoziiert mit der familiären subepithelialen Amyloidose der Kornea. Dabei kommt es zu Amyloidablagerungen in der Hornhaut des Auges (Tsuji-kawa et al., 1999). Jedoch konnte man bis dato keine hTrop2 A $\beta$ -Fragmente nachweisen, welche mit dieser Pathologie in Verbindung gebracht werden könnte.

Der  $\epsilon$ -Schnitt führt zur Freisetzung von zwei intrazellulären Fragmenten (EpICD) in das Zytosol. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\epsilon_1$  und  $\epsilon_2$  Schnittstellen in hEpCAM und mEpCAM konserviert sind (Abbildung 18).

Um die Erreichbarkeit der Schnittstellen darzustellen wurden sie von der Gruppe um Brigita Lenarčič in das 3D Modell von hEpCAM implementiert (Pavsic et al., 2014; Tsaktanis et al., 2015). Dabei kommt hEpCAM als Homodimer vor. Hinweise auf die Dimerform gehen bereits aus den Analysen der Tetraspanindomänen hervor. Bei der Immunpräzipitation von EpCAM aus dem Tetraspaninkomplex wurden im Western Blot unter nicht reduzierten Bedingungen ein Produkt mit der Masse von ~80kDA detektiert, welches dem Molekulargewicht eines EpCAM-Dimers entspricht (Le Naour et al., 2006). Die Implementierung der Spaltsequenzen von hEpCAM in die Kristallstruktur helfen strukturbiologisch zu verstehen, wie gut die Schnittstellen erreichbar sind (Abbildung 19).

Einen Einfluss der eingefügten FLAG und TEV Epitope auf die Spaltung kann nicht formal ausgeschlossen werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass mit Implementierung der zusätzlichen FLAG und TEV Epitope, in das hEpCAM Modell, es zu keiner schwerwiegenden Konformationsänderung kommt (Tsaktanis et al., 2015, 2016).

Die transmembrane Domäne (TMD) von EpCAM wurde mittels MD (Molekulardynamik)-Simulation simuliert. Die Darstellung erfolgte in einer *coarse-grained* Darstellung. Dabei kann die Transmembrandomäne unter Verwendung der beteiligten Atomgruppen zu einem Molekülmodell angeordnet werden. Es zeigte sich, dass EpCAMs TMD ebenfalls Dimere in der Zellmembran bilden (Abbildung 20).

Die transmembranen Schnittstellen sind für die  $\gamma$ -Sekretase in Monomer- und in Dimerform nach extrazellulärer Spaltung frei zugänglich. Dies erklärt die hohe Effizienz der  $\gamma$ -Sekretase, was sowohl im Western Blot (Abbildung 15), als auch in den massenspektrometrischen Analysen (Abbildung 16) ersichtlich war.

In Kolonkarzinomen wurde, im Gegensatz zu normalen Zellen, eine hohe Anzahl an EpiCD im Nukleus nachgewiesen (Gosens et al., 2007; Maetzel et al., 2009). Folglich wäre ein weiterer Angriffspunkt die spezifische Blockierung der identifizierten Schnittstellen durch Antikörper bzw. *small molecule inhibitors*, indem sie zielgerichtet die Spaltung EpCAMs inhibieren.

Es wurden schon  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren in klinischen Studien eingesetzt jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen, da die  $\gamma$ -Sekretase auch für die Regulierung anderer Proteine verantwortlich ist (Suresh & Irvine, 2015). Bei behandelten Patienten traten vermehrt Infektionen und Hautkrebs auf, im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Doody et al., 2013). Aus diesem Grund ist eine spezifische Therapie, die die Spaltung von EpCAM gezielt hemmt, von enormer Wichtigkeit. Sie bietet neben der Antikörper Therapie einen weiteren Angriffspunkt für EpCAM-positive Tumore.

Ob und wie genau die Aktivierung der Spaltung bei EpCAM funktioniert, ist noch nicht hinreichend untersucht. Wie schon beschrieben, sind die extrazellulären Schnittstellen in der nativen Form nicht frei zugänglich. Beide  $\alpha$ -Schnittstellen befinden sich in der Furche, welche durch die Carboxy-terminale Domäne (CD) zweier EpCAM Monomere gebildet werden und zusammen ein cis-Dimer bilden. In Dimerform sind diese Schnittstellen kaum zugänglich, doch in der monomeren Form EpCAMs befinden sich die Schnittstellen an der Oberfläche des Proteins und sind frei zugänglich (Abbildung 19). Die Spaltung von hEpCAM durch Cathepsin L war jedoch möglich, obwohl die Schnittstelle in Dimerform nicht zugänglich sind (Pavsic et al., 2014). Folglich weist dies auf eine Dissoziation von EpCAM Dimeren hin, so dass die Konformation nativer EpCAM Moleküle heterogen sein kann und aus Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren bestehen könnte.

Für diesen Übergang der Konformationsänderung könnte ein externer Ligand bzw. die Proteasen selbst verantwortlich sein (Abbildung 28 A). Als Beispiel dient der Notch Re-

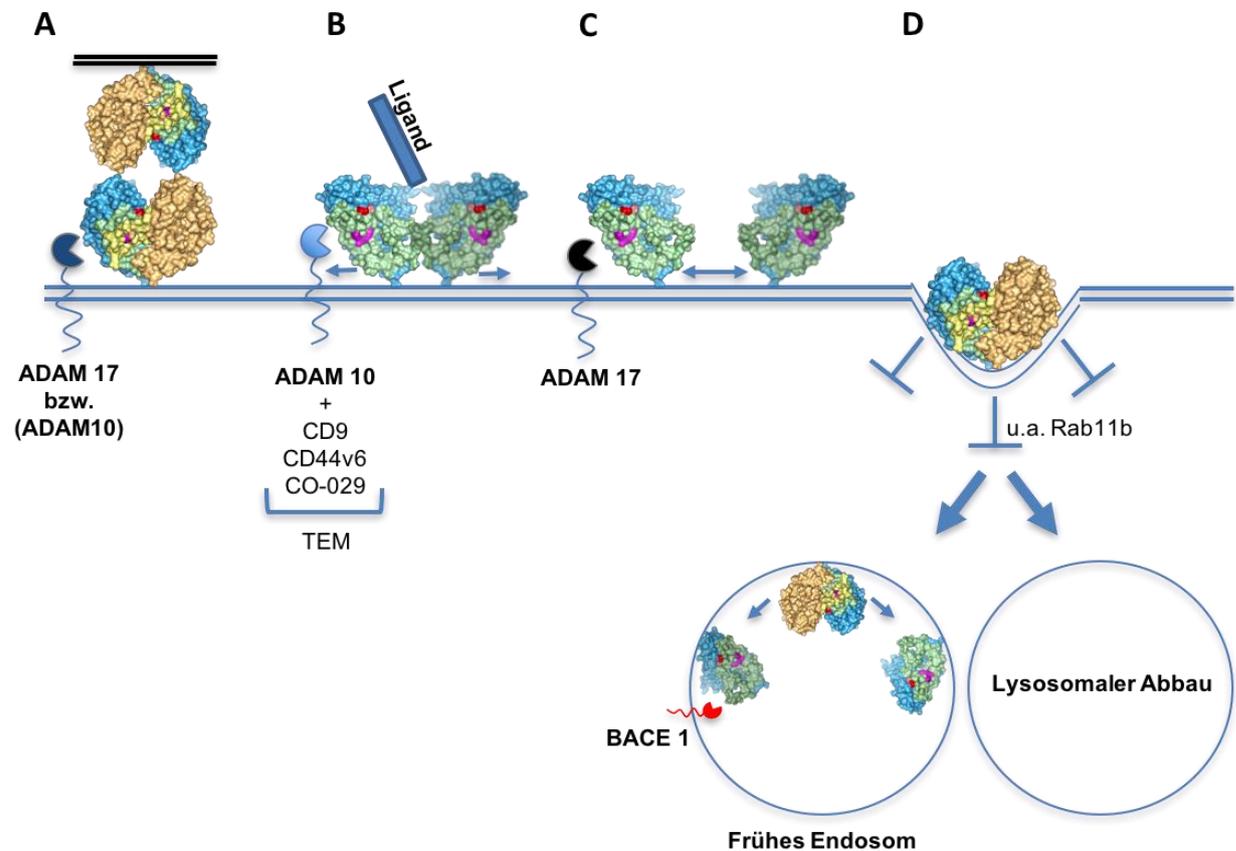
zeptor, welcher ebenfalls ein Typ-I Transmembranprotein ist. Notch 2 autoinhibiert seine Spaltung durch Überlagerung der S2 Schnittstelle durch die 3 LNR (Lin12/Notch repeats) Domäne. Diese bilden eine sogenannte negative regulatorische Region (NRR). Die Bindung von Liganden der DSL-Familie (Delta/Serrate/LAG-2) an die EGF-Wiederholungssequenz der Ektodomäne von Notch initiiert die RIP. Durch die Liganden-induzierte Konformationsänderung wird die negative regulatorische Region (NRR) zugänglich, dadurch wird die S2 Schnittstelle für die ADAM Protease erreichbar und ermöglicht es der Metalloprotease zu spalten. Die zweite Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase an der S3 Schnittstelle führt zur Freisetzung von NICD (Gordon et al., 2007). Ein Anhaltspunkt für die Liganden-induzierte Spaltung bei EpCAM ist (Abbildung 28 A), dass ADAM10 normalerweise durch Liganden aktiviert wird (Bozkulak & Weinmaster, 2009). In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass EpCAM neben der Spaltung durch TACE/ADAM17, auch durch ADAM10 gespalten wird (Abbildung 12).

Im Gegensatz zu der vermutlich Liganden-induzierten Spaltung durch ADAM10, kann TACE/ADAM17 Typ-I Transmembranproteine Liganden-unabhängig spalten (Christian, 2012). Diese Liganden-unabhängige Spaltung (Abbildung 28 C) kann theoretisch auch in Tumoren auftreten, denn in Tumoren herrscht meist ein saurer pH (van Sluis et al., 1999), was zur Dissoziation des hEpCAM Dimers an der Oberfläche führen kann (Pavsic & Lenarcic, 2011).

Es wurde bereits beobachtet, dass durch direkten Zell-Zell-Kontakt die Spaltung von hEpCAM initiiert wird (Abbildung 28 A). Die abgespaltene extrazelluläre Domäne verstärkt dabei die Spaltung (Denzel et al., 2009; Maetzel et al., 2009). Die abgespaltenen extrazellulären Domänen könnten ähnlich wie bei Notch zur Konformationsänderung des cis-Dimers führen und die Schnittstellen für Proteasen zugänglich machen.

Die Spaltung könnte auch durch Endozytose ermöglicht werden, wie es bereits bei mEpCAM gezeigt worden ist (Hachmeister et al., 2013). Durch das saure Milieu in den Endosomen/Lysosomen kann das EpCAM Dimer dissoziieren und die Schnittstellen werden frei zugänglich (Abbildung 28 D). Bei Notch wurde ebenfalls eine Freisetzung von NICD nach Endozytose beschrieben (Le Borgne, Bardin, & Schweisguth, 2005). An der Spaltung von Notch nach Endozytose ist unter anderem das Protein Rab11b beteiligt (Vaccari, Lu, Kanwar, Fortini, & Bilder, 2008), welches auch als Interaktionspartner von mEpCAM identifiziert wurde (M. Hachmeister, persönliche Mitteilung). Nach der Endozytose kommt es zur Spaltung von Notch und Freisetzung der intrazellulären Domäne (NICD) in das Zytosol. Die abgespaltene Domäne (NICD) wird entweder abgebaut oder

durch einen Recycling Mechanismus sezerniert (Le Borgne et al., 2005; Vaccari et al., 2008).



### Abbildung 28: Möglichkeiten der Spaltung von hEpCAM

**(A)** Darstellung der Induktion der Spaltung durch direkten Zell-Zell-Kontakt. (Denzel et al., 2009)  
**(B)** Die Bindung eines Liganden an Tetraspanin-reichen Domänen (TEM) führt zur Dissoziation des EpCAM Dimers, woraufhin die RIP induziert wird, die durch ADAM10 vermittelt wird (Bozkulak & Weinmaster, 2009; Le Naour et al., 2006). **(C)** Spontane bzw. durch saures Tumormilieu vermittelte Dissoziation des EpCAM Dimers führt zur Induktion der RIP, vermittelt durch ADAM17 (Christian, 2012; Maetzel et al., 2009). **(D)** Spaltung nach Endozytose vermittelt unter anderem durch Rab11b. In den Endosomen kommt es aufgrund des niedrigen pHs zur Dissoziation des EpCAM Dimers, mit nachfolgender Spaltung durch BACE1. EpCAM kann nach Endozytose auch lysosomal abgebaut werden (Hachmeister, 2014).

Nach Betrachten der Möglichkeiten, wie die Spaltung initiiert werden kann, soll auf die Auswirkung der Spaltung näher eingegangen werden. Es ist bekannt, dass die regulative intramembrane Proteolyse von EpCAM Proliferation induziert (Maetzel et al., 2009). Welche anderen Effekte können mit einer Spaltung EpCAMs einhergehen?

### 6.2 Degradation von hEpCAM

HEpCAM wird extrazellulär durch Matrix Metalloproteasen und BACE1 gespalten (Hachmeister et al., 2013). Der Unterschied zwischen den Proteasen ist der unterschiedliche pH-Wert, bei welchem sie ihre optimale enzymatische Aktivität erreichen.

BACE1 ist bei einem pH-Wert von 4,5 (Cole & Vassar, 2007) und ADAM bei einem pH-Wert von 7 (Edwards et al., 2008) vollständig aktiv. Aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte kann man schlussfolgern, dass BACE1 hauptsächlich in sauren Milieus, wie den Endosomen/Lysosomen lokalisiert ist (Cole & Vassar, 2007). Die Typ-I Transmembranprotease ADAM ist hingegen hauptsächlich an der Zellmembran funktionsfähig (Edwards et al., 2008). Die Lokalisation von BACE1 in Endosomen legt nahe, dass hEpCAM einem Endozytoseprozess unterworfen ist. Der Endozytosevorgang ist dabei Clathrin-abhängig, woran sich eine Spaltung durch BACE1 (Tsaktanis et al., 2015) bzw. ein lysosomaler Abbau anschließen können (Abbildung 28). Auch bei mEpCAM kommt es zur Endozytose und anschließender Spaltung bzw. lysosomalen Abbau. Mit Hilfe der SILAC Methode (*stable isotope labeling by/with acids in cell culture*) konnten dabei Clathrin-abhängige Proteine identifiziert werden (Hachmeister, 2014). Wie schon beschrieben sind die Spaltstellen nur erreichbar, wenn das EpCAM Dimer in Monomere dissoziiert. Wenn EpCAM in Dimerform vorliegt, ist die BACE1 Schnittstelle für die  $\beta$ -Sekretase nicht zugänglich. Doch bei saurem pH dissoziiert das cis-Dimer in zwei EpCAM Monomere und die Schnittstellen sind frei zugänglich für BACE1. Das zeigen auch die Spaltungsraten von mEpCAM bei unterschiedlichen pH-Werten. In mEpCAM konnte man bei einem pH-Wert von 7 nur eine Spaltungsrate von ca. 20% beobachten. Im Gegensatz bei einem pH-Wert von 4,5 ergab sich eine Spaltungsrate von ca. 100% (Hachmeister et al., 2013).

Hinsichtlich der Degradation EpCAMs stehen zwei Wege zur Verfügung: Der Proteasen-abhängige proteasomale Abbau und der lysosomale Abbau. Beim Proteasen-abhängigen proteasomalen Abbauvorgang wird das Protein zunächst proteolytisch gespalten und anschließend wird das freigewordene EpICD im Zytosol ubiquitiniert, bevor es im Proteasom abgebaut werden kann (Abbildung 15).

Es ist anzunehmen, dass hEpCAM nach Clathrin-abhängiger Endozytose (Tsaktanis et al., 2015) auch lysosomal abgebaut wird. Hinweise dafür sind bei mEpCAM zu sehen. Es konnte der lysosomale Abbau mEpCAMs in Teratokarzinomzellen durch Bafilomycin spezifisch gehemmt werden (Hachmeister, 2014).

Die Degradierung EpCAMs durch Endozytose bzw. Protease-abhängig, ermöglicht es Zellen EpCAM in kurzer Zeit herunterzuregulieren. Eine Herunterregulation von EpCAM wurde bei der EMT beobachtet (Ye et al., 2015), doch ist nicht bekannt welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Abbauweg über Endozytose und anschließender BACE1 Spaltung bzw. lysosomalen Abbaus mögliche Mechanismen für die Herunterregulation von EpCAM sein könnte. Ein anderer

schon beschriebener Mechanismus ist der proteasomale Abbauweg nach der regulierten intramembranen Proteolyse durch die ADAM und  $\gamma$ -Sekretase. Doch welche Auswirkung könnte diese posttranslationale Herunterregulierung für die Zellen bedeuten?

### 6.3 Einfluss der Spaltung auf die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Durch die posttranslationale Herunterregulierung mittels RIP bzw. durch Endozytose kann EpCAM von der Zellmembran entfernt und abgebaut werden. Es wurde gezeigt, dass ein mesenchymaler Phänotyp mit einer reduzierten EpCAM Expression einhergeht (Driemel et al., 2014; Gires & Stoecklein, 2014; Massoner et al., 2014). Es ist anzunehmen, dass durch äußere Ligandenbindung bzw. einem niedrigen pH es zum Abbau von EpCAM kommt und dadurch die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) induziert werden könnte.

In Kolorektalenkarzinomen wurden Tetraspanin-reiche Komplexe (TEM) beschrieben, welche die Tumorprogression unterstützen. Zu dem Tetraspanin-reichen Komplex gehört unter anderem EpCAM (Le Naour et al., 2006), aber auch ADAM10 ist eine Komponente des Tetraspaninnetzwerkes (Kuhn et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass ADAM10 an der Initiierung der RIP beteiligt ist (Abbildung 12), wodurch die Degradierung von EpCAM initiiert werden kann. Der Abbau EpCAMs könnte in den Zellen einen mesenchymalen Phänotyp hervorrufen. Weitere Hinweise Richtung Initiierung eines mesenchymalen Phänotyps in Karzinomzellen durch eine EpCAM Degradation liefern Ye *et al.* Die Arbeitsgruppe beobachtete in metastasierenden Mammakarzinomen eine hohe Snail und eine niedrige EpCAM Expression (Ye et al., 2015).

Folglich haben die verwendeten Karzinomzellen mit mesenchymalem Phänotyp eine starke Snail Expression. Dieser mesenchymale Phänotyp geht jedoch verloren, wenn die ADAM10 Protease ausgeknockt wurde. Parallel dazu wurde eine Reduktion der Snail Expression um 60% beobachtet (C. Zhang et al., 2010). Man könnte vermuten, dass Zellen die den Prozess der EMT durchlaufen in hohem Maße ADAM10 Proteasen exprimieren und dadurch die RIP bei EpCAM induzieren. Das lässt schlussfolgern, dass CTCs (*circulating tumor cells*) (siehe 1.1.2 Metastasierung) EpCAM negativ, jedoch ADAM10 und Snail positiv sind (Ye et al., 2015; C. Zhang et al., 2010). Ob diese Zusammenhänge kausaler Natur sind oder nur Korrelate, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Der proteaseabhängige Abbauvorgang EpCAMs durch extrazelluläre Sekretasen und der  $\gamma$ -Sekretase führt zur Freisetzung von EpICD im Zytosol. In Cholangiokarzinomen bilden unter anderem  $\beta$ -Catenin und EpICD einen nukleären Komplex, in den Zellen

welche die invasive, migrierende Front bilden. Der nukleäre Komplex fördert dabei das Migrationsverhalten von den Tumorzellen (Jachin et al., 2014). Man muss jedoch anmerken, dass die Arbeitsgruppe um Jachin *et al.* sich dabei keine CTCs angeschaut haben. Zusammenfassend kann man sagen, dass EpCAM durch die Prozessierung mittels RIP Einfluss auf das Migrationsverhalten von Karzinomzellen haben könnte und eine Degradierung EpCAMs das Metastasierungsverhalten begünstigen würde.

#### 6.4 Einfluss der Spaltung auf die Zelladhäsion hEpCAMs

Ursprünglich wurde EpCAM als homophiles Zelladhäsionsmolekül beschrieben. Diese Erkenntnis wurde durch Überexpression von EpCAM in Fibroblasten und Brustkrebszellen, welche keinerlei Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin besitzen, gewonnen. Dabei wurde eine erhöhte Aggregationsfähigkeit der Zellen beobachtet (Litvinov, Velders, et al., 1994). Andererseits wurde eine verminderte Aggregation bei Überexpression von EpCAM in Karzinomzellen festgestellt (Litvinov et al., 1997).

Die adhäsive Funktion von den klassischen Zelladhäsionsproteinen (CAMs) wie z.B. E-Cadherin lässt sich durch die regulatorische intramembrane Proteolyse (RIP) modulieren (Craig & Brady-Kalnay, 2011; Maretzky et al., 2005). Aus diesem Grund sollte der Einfluss von RIP auf EpCAM bezüglich der Beeinflussung der adhäsiven Funktion untersucht werden.

Die funktionellen Eigenschaften von EpCAM wurden bereits in drei Knockout Mausmodellen untersucht, jedoch kamen die Gruppen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen. (Guerra et al., 2012; Lei et al., 2012; Nagao et al., 2009).

Der erste Knockout war embryonal letal (Nagao et al., 2009). Bei den anderen beiden Knockout Mausstämmen wurde eine gestörte Darmentwicklung beobachtet, vergleichbar mit der beim Menschen vorkommenden CTE (*congenital tufting enteropathy*) (Guerra et al., 2012; Lei et al., 2012).

Die Gruppe um Guerra *et al.* führten die gestörte Darmentwicklung auf eine Störung der *adherens junctions* in der Mukosa zurück, aufgrund der fehlenden Rekrutierung von E-Cadherin durch EpCAM (Guerra et al., 2012). In Zebrafisch- und Krallenfroschmodellen wurde ebenfalls eine Störung der *adherens junctions* beschrieben (Maghzal et al., 2013; Slanchev et al., 2009).

Lei *et al.* konnten keine Fehllokalisierung von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin beobachten. Die Gruppe sah die Ursache der gestörten Darmarchitektur in einer Störung der *tight junctions*, aufgrund fehlender Expression von Claudinen, allen voran Claudin 7 (Lei et al., 2012).

Zusammenfassend gibt es unterschiedliche Beschreibungen im Zellmodell, was die adhäsiven Eigenschaften EpCAMs betreffen. Einerseits wurde durch die EpCAM Überexpression in murinen Fibroblasten und in Brustkrebszelllinien eine vermehrte Zelladhäsion beschrieben (Litvinov, Velders, et al., 1994), wohingegen in epithelialen E-Cadherin exprimierenden Zellen die Überexpression EpCAMs eine Verminderung der Zelladhäsion zur Folge hatte (Litvinov et al., 1997).

*In vivo* konnte man bei den EpCAM Knockout Mäusen einen gestörten Zellzusammenhalt beobachten, doch welche molekularen Ursachen dafür verantwortlich sind konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es kommt hinzu, dass EpCAM strukturell gesehen keine Ähnlichkeit mit den klassischen CAM-Proteinen hat (Schnell et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde EpCAM durch Inhibierung der Spaltung stabilisiert. Anders als bei E-Cadherin (Maretzky et al., 2005) hatte die regulative intramembrane Proteolyse keinen Einfluss auf die Adhäsionseigenschaften EpCAMs. Die Stabilisierung EpCAMs durch Hemmung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase hatte keinen Effekt auf die Zell-Matrigel- noch auf die Zell-Zell-Adhäsion. Aus diesem Grund sollte nun die Eigenschaft EpCAMs auf die Zelladhäsion in hEpCAM Knockout Zellen näher untersucht werden.

### **6.5 Einfluss eines zellulären hEpCAM Knockouts auf die Zelladhäsion**

In mesenchymalen Zellen wurde gezeigt, dass EpCAM ein homophiles kalziumunabhängiges Zelladhäsionsprotein ist. Diese Zellen exprimieren normalerweise weder CAMs, noch EpCAM Proteine (Litvinov, Velders, et al., 1994). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen in Karzinomzellen durchgeführt, welche klassische Zelladhäsionsmoleküle und EpCAM Proteine exprimieren.

Es wurden zelluläre HCT-8 Knockout Klone generiert mittels CRISPR-Cas9 Technologie (Abbildung 22). Die Klone hatten zudem die selbe E-Cadherin Expression, außer in den CC#L20 Zellen, in denen E-Cadherin sogar vermehrt exprimiert wurde (Tsaktanis et al., 2015). Im Calcein AM Adhäsionsassay konnte kein signifikanter Unterschied zwischen hEpCAM Knockout und hEpCAM-positiven HCT-8 Zellen im Zell-Matrix-Adhäsionsassay festgestellt werden (Abbildung 23 C, Abbildung 24). Dies geht mit den bereits beschriebenen Beobachtungen einher, dass EpCAM keinen Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsion hat (Litvinov, Bakker, Gourevitch, Velders, & Warnaar, 1994).

Jedoch konnte auch kein signifikanter Unterschied bei Betrachten der Zell-Zell-Adhäsion zwischen EpCAM Knockout Zellen und EpCAM positiven HCT-8 Zellen beobachtet werden (Abbildung 23 C, Abbildung 24). Der Adhäsionsassay wurde sowohl unter normokalziämischen, als auch unter kalziumfreien Bedingungen durchgeführt.

Unter Kalziumentzug zeigte sich eine klare Reduktion der Zelladhäsion. Der Grund dafür liegt in der kalziumabhängigen vermittelten Adhäsion von E-Cadherin (Kim, Tai, Mok, Mosser, & Schuman, 2011). Jedoch hatte es keinen Einfluss auf das kalziumunabhängige Adhäsionsmolekül EpCAM. Ebenso zeigte ein stabiler hEpCAM Knockdown mittels *short-hairpin* RNA (shRNA) bzw. ein transienter hEpCAM Knockdown mittels *small interfering* (siRNA) in Kyse30 Ösophaguskarzinomzellen keinen Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion im Calcein AM Adhäsionsassay (Tsaktanis et al., 2015).

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Zelladhäsionsassays mit den verwendeten Karzinomzellen kein Anhalt gefunden werden, dass EpCAM einen Einfluss auf die Zelladhäsion hat (Tsaktanis et al., 2015, 2016). Doch stellt sich die Frage, ob die beobachteten Effekte *in vitro* nur für diese Karzinomzelltypen gelten? Um eine generelle Aussage bezüglich der Adhäsionsfähigkeit EpCAMs zu formulieren, wurde die direkte homophile Protein-Protein Interaktion zwischen zwei EpCAM Proteinen mittels AFM untersucht.

### **6.6 Adhäsionsfunktionstest von hEpCAM mittels AFM**

Um zellunabhängig die Adhäsion von EpCAM zu charakterisieren wurde die Interaktion der extrazellulären Protein-Protein Interaktion mittels AFM untersucht. Dies ermöglicht eine zellunabhängige und strukturell bezogene Analyse der Bindungseigenschaften der extrazellulären Anteile EpCAMs miteinander. Pavsic *et al.* und Balzar *et al.* erklärten die adhäsionsvermittelte Eigenschaft von EpCAM durch eine direkte trans-Verbindung zweier EpCAM Moleküle (Balzar et al., 2001; Pavsic et al., 2014). Um ein ähnliches Modell zu erzeugen, wurde ein hEpEx-Fc Konstrukt erstellt. Dieses Konstrukt bildet in nicht reduzierter Form Di-, Tri- und Tetramere aus und entspricht somit dem nativen Modell von hEpCAM. Das Konstrukt wurde in HEK293 Zellen transfiziert, um aus dem Überstand das rekombinante glykosylierte hEpEx-Fc Protein aufzureinigen (Abbildung 26).

Mit Hilfe des AFM wurden bereits typische CAM Proteine untersucht und ihre Adhäsionsfähigkeit bestimmt. Aus diesem Grund diente das Desmoglein3 (Dsg3) als positive Kontrolle (Vielmuth, Hartlieb, Kugelmann, Waschke, & Spindler, 2015). Zum Ausschluss unspezifischer Proteinbindungsereignissen und als Negativkontrolle wurde BSA verwendet. Während das Adhäsionsprotein Desmoglein3 (Dsg3) klare Bindungseigenschaften zeigte, war die hEpEx Interaktion nur leicht höher als bei der Negativkontrolle mit BSA (Abbildung 27).

Zusammenfassend scheint EpCAM in Karzinomzelllinien, insbesondere bei HCT-8 Zellen und Kyse Zellen einen geringen oder keinen Einfluss auf die Zelladhäsion zu haben. Die Diskrepanz zwischen den Untersuchungen von Litvinov *et al.* und den hier durchgeführten Experimenten kann, wie schon beschrieben, an den unterschiedlichen Zelllinien liegen (siehe 6.5 Einfluss eines zellulären hEpCAM Knockouts auf die Zelladhäsion), aber auch an der unterschiedlichen Versuchsanordnung. Litvinov *et al.* ermittelten die Adhäsionsfähigkeit der Zellen, indem sie die Aggregation der Zellen beobachteten. D.h. die Zellen konnten sich im Medium frei anordnen und zusammenlagern (Litvinov *et al.*, 1997; Litvinov, Velders, *et al.*, 1994). Durch das Loslösen von epithelialen Zellen setzt bereits der Prozess der EMT (siehe 1.1.2 Metastasierung) ein, welcher unter anderem zur Herunterregulierung bzw. Destabilisierung von Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin führt (Tang *et al.*, 2010). Die Destabilisierung von E-Cadherin wird dabei wahrscheinlich durch EpCAM ausgelöst, was zu einer verminderten Adhäsionsfähigkeit der Zellen führt (Litvinov *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 2007).

Anders ist es bei dem Calcein AM Adhäsionsassay, bei dem Zellen vorab adhären (Abbildung 23 A; B). Die mechanische Umwelt d.h. der Boden der Zellkulturflasche führt zur Expressierung von Adhäsionsproteinen und zu einer starken Verankerung der Zellen (Tang *et al.*, 2010). Die nun ausplattierten Zellen, im Rahmen des Calcein AM Adhäsionsassay, haben eine optimale Voraussetzung um einen Zell-Zell-Kontakt eingehen zu können. Doch warum hatte EpCAM keinen messbaren Einfluss auf die Adhäsion? Im Kontext des Versuchsaufbaus könnte ein Effekt EpCAMs, falls vorhanden, mit dem Calcein AM Adhäsionsassay nicht suffizient messbar sein. Doch warum konnte kein Effekt EpCAMs in einer kalziumfreien Umgebung, *i.e.* unter Ausschaltung von E-Cadherin Effekten, gemessen werden? Das mag einerseits daran liegen, dass der Effekt von EpCAM immernoch vergleichbar gering bzw. zelltypabhängig (HCT-8, Kyse30) ist, oder die Effekte EpCAMs nur in einem dreidimensionalen Modell vollständig ausgebildet werden können. Balzar *et al.* beobachteten in bereits adhären Zellen, dass sich EpCAM vor allem basolateral anordnet (Balzar, Prins, *et al.*, 1999). Folglich könnte es auf der apikalen Seite, der bereits ausgesäten Zellen, zu keiner ausreichenden EpCAM-EpCAM-Interaktion gekommen sein. Es muss jedoch hierbei berücksichtigt werden, dass EpCAM in Karzinomzellen üblicherweise von einer basolateralen zu einer homogenen Expression wechselt (Xie *et al.*, 2005). Neben der reinen mechanistischen Betrachtung der intermolekularen Protein-Protein-Interaktion, spielt auch der durch EpCAM vermittelte Einfluss auf Adhäsionsmoleküle eine Rolle (Winter *et al.*, 2007). Denn EpCAM ist nicht als klassisches CAM beschrieben (1.2.3.1 Zelladhäsion). Folglich

wird die Adhäsion höchst wahrscheinlich nicht rein durch intermolekulare Kräfte vermittelt, wie es bei Desmoglein3 (Dsg3) der Fall ist (Vielmuth et al., 2015). EpCAM hingegen, beeinflusst höchst wahrscheinlich die Zelladhäsion vor allem indirekt, indem es zur Expression/Stabilisierung (Guerra et al., 2012; Lei et al., 2012) bzw. Verlust/Destabilisierung (Litvinov et al., 1997; Winter et al., 2007; Winter et al., 2003) von Zelladhäsionsproteinen kommt. Deshalb wäre es sinnvoll im Rahmen des Adhäsionsexperimentes die Phase der Zell-Zell-Anlagerung zu verlängern, um etwaige Proteinexpressionen und –verknüpfungen beobachten zu können. Wie schon untersucht wurde, ist der Einfluss EpCAMs auf die Adhäsion paradox. Dabei ist EpCAM dynamischen Prozessen und individuellen Zelleigenschaften unterworfen, je nachdem ob es sich um Karzinomzellen oder Zellen in physiologischen Umfeld handelt (Bryan, 2015; van der Gun et al., 2010). Die dynamische Komponente wird dabei unter anderem von der Umgebung beeinflusst, weshalb man bei Betrachtung der Eigenschaften EpCAMs auf die Zelladhäsion, je nach Zelllinie und Untersuchungskontext unterschiedliche Ergebnisse erhalten kann. Deshalb sollte man die Funktion EpCAMs auf die Adhäsion funktionell einteilen: in eine physikalisch, intermolekulare Komponente und eine biologisch, durch Signalkaskaden vermittelte Komponente. Mittels AFM war es möglich die intermolekularen Kräfte von EpCAM-Proteinen zu bestimmen. Dabei konnten keine signifikanten Bindungsereignisse gemessen werden (Abbildung 27). Doch um das Bild zu komplementieren, ist es notwendig die Eigenschaften EpCAMs in einem biologisch, dynamischen System zu untersuchen. Anfangen sollte man dennoch auf physikalischer Ebene, indem man zunächst die Interaktionen zwischen zwei einzelnen Zellen mittels AFM und Elektronenmikroskopie betrachtet und dabei unterschiedliche Zelllinien charakterisiert. Weiterhin muss bedacht werden, dass EpCAM über eine interne Sequenz mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist (Balzar et al., 1998). In der AFM Anordnung fehlt jedoch der intrazelluläre Anteil, welcher vermutlich mit dem Aktinzytoskelett verankert ist und die nötige Stabilität verleihen könnte. In weiteren Arbeiten sollte darauf eingegangen werden und der Effekt der Interaktion zwischen EpCAM und dem Aktinzytoskelett zusätzlich näher untersucht werden. Was man aber sagen kann ist, dass die adhäsive Eigenschaft EpCAMs, im Rahmen der durchgeführten AFM-Messungen, nicht ausschließlich durch die extrazellulären Anteile vermittelt wird.

## 7. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Schnittstellen EpCAMs auf Ebene der Aminosäuren nach der regulativen intramembranen Proteolyse (RIP) identifiziert. Zusätzlich wurde der Einfluss der RIP auf die Zelladhäsion, sowie später von hEpCAM selbst auf die Zelladhäsion untersucht.

Weitere Experimente sollen zeigen, welche Proteine verantwortlich sind für die Initiierung der Spaltung von EpCAM. Bei der Annahme, dass die Spaltung ausgelöst wird durch Proteine, welche sich an den extrazellulären Anteil anlagern, kann man EpCAM-positive Zellen mit dem rekombinanten EpEx-Konstrukt inkubieren. Anschließend soll mittels Co-IP das EpEx-Konstrukt aufgereinigt werden, womit man die an ihm gebundenen Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert könnte. Die identifizierten Proteine können wiederum rekombinant hergestellt werden. Anschließend können EpCAM-positive Zellen mit den aufgereinigten Proteinen inkubiert werden und die Spaltungsraten bestimmt werden.

Außerdem kann untersucht werden, ob die Produkte welche bei der Spaltung durch ADAM bzw. BACE1 und der  $\gamma$ -Sekretase entstehen in der Lage sind die Spaltung auch zu initiieren. Dabei können die entsprechenden Proteine ebenfalls rekombinant hergestellt werden und anschließend EpCAM-positive Zellen inkubiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EpCAM in der Karzinomzelllinie HCT-8 und im AFM keinen signifikanten Einfluss auf die Zelladhäsion hat. In weiteren Arbeiten, wäre es von Interesse die Zell-Zell-Adhäsion in weiteren Karzinomzellen, als auch in physiologisch EpCAM-exprimierenden Zellen mittels AFM zu bestimmen.

## 8. Zusammenfassung

EpCAM ist ein Transmembranprotein und wird auf verschiedenen Tumorentitäten *de novo* oder stark überexprimiert. Es wird durch eine regulatorische intramembrane Proteolyse (RIP) prozessiert. Dabei wird es zunächst extrazellulär durch ADAM Proteasen bzw. durch die BACE1 Protease gespalten. Die erste Spaltung ist somit gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Das dabei entstehende Produkt (CTF-EpCAM) wird durch die  $\gamma$ -Sekretase mit hoher Effizienz weiter prozessiert und führt zur Freisetzung von A $\beta$ -Fragmenten und intrazellulären Produkten (EpICD). EpICD vermittelt Proliferation durch Aktivierung von Zielgenen (Myc, FABP5).

Um die extrazellulären Spaltsequenzen zu identifizieren, wurde ein EpCAM Konstrukt mit einem FLAG und TEV Epitop, welche sich 42 Aminosäuren vor der Transmembrandomäne befinden, generiert und in Karzinomzellen (HEK293, FaDu, HCT-8) stabil exprimiert. Nach Inkubation von den Karzinomzellen, mit dem EpCAM-TF Konstrukt wurden entstehende Spaltprodukte aus dem Zellkulturüberstand immunpräzipitiert und massenspektrometrisch analysiert. Bei dem Vergleich von massenspektrometrisch gemessenen und theoretisch berechneten Fragmenten, ergaben sich zwei ADAM-Schnittstellen (Aspartat<sup>243</sup>/Prolin<sup>244</sup>, Prolin<sup>244</sup>/Glycin<sup>245</sup>) und eine BACE1-Schnittstelle (Tyrosin<sup>250</sup>/Tyrosin<sup>251</sup>).

Zur Identifizierung der transmembranen Schnittstellen wurde ein Myc-CTF(EpCAM)-FLAG-TEV-YFP Konstrukt in Karzinomzellen (HEK293, FaDu, HCT-8) stabil exprimiert. Die Analyse der Schnittstellen erfolgte auf ähnliche Weise, wie bei den extrazellulären Schnittstellen. Fünf Schnittstellen konnten auf diese Weise identifiziert werden, wobei der  $\gamma$ -Schnitt zu den Schnittstellen Valin<sup>273</sup>/Valin<sup>274</sup>, Valin<sup>274</sup>/Valin<sup>275</sup>, Valin<sup>275</sup>/Valin<sup>276</sup> führte und der  $\epsilon$ -Schnitt zu den Schnittstellen Valin<sup>284</sup>/Valin<sup>285</sup> und Valin<sup>285</sup>/Leucin<sup>286</sup> führte.

EpCAM wurde zudem als Zelladhäsions-regulierendes Protein beschrieben. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit, war es den Einfluss der regulativen intramembranen Proteolyse EpCAMs auf die Zelladhäsion zu untersuchen. Die Inhibierung der Spaltung durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen hatte keinen Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion, sowie auf die Zell-Matrix-Adhäsion. Auch ein zellulärer Knockout hEpCAMs mittels CRISPR-Cas9 Technologie in HCT-8 Zellen hatte im Vergleich mit EpCAM-positiven HCT-8 WT Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Zelladhäsion. Um zellunabhängig das Adhäsionspotential von EpCAM zu bestimmen wurde die direkte Protein-Protein Interaktion von rekombinaten hergestellten extrazellulären EpCAM (EpEx) mittels *atomic force microscopy* (AFM) bestimmt. Dafür wurde zunächst ein rekombinantes hEpEx-Fc Protein aufge-

reingt. Es wurde die Protein-Protein Interaktion von EpCAM bestimmt und mit den Werten von BSA (negativ Kontrolle) und dem Zelladhäsionsmolekül Desmoglein3 (positiv Kontrolle) verglichen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zur negativ Kontrolle BSA. Die Untersuchung der Zelladhäsion EpCAMs auf zellulärer Basis und mittels AFM zeigte in den hier aufgeführten Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die Zelladhäsion.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die proteolytische Spaltung EpCAMs auf Ebene der Aminosäuren charakterisiert werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Funktion EpCAMs, im Rahmen der hier durchgeführten Experimente, keinen Einfluss auf die Zelladhäsion hat.

## 9. Summary

EpCAM is a transmembrane protein which is over or de-novo expressed in different tumor entities. It is processed by the regulated intramembrane proteolysis (RIP). The first shedding is made by the protease ADAM or BACE1. The generated product CTF (C-terminal fragment) is highly efficiently cleaved by the  $\gamma$ -secretase. The generated products are A $\beta$  fragments and EpICD fragments. EpICD induces genes like myc and cyclins.

A human EpCAM-TEV-FLAG construct was cloned and expressed in carcinoma cells (HEK293, FaDu, HCT-8) to identify the extracellular cleavage sites. Extracellular shedding leads to fragments. The fragments were purified and analyzed by mass spectrometry. Comparison of theoretical mass and measured mass of the cleaved fragments lead to two ADAM cleavage sites (Aspartic Acid<sup>243</sup>/Proline<sup>244</sup>, Proline<sup>244</sup>/Glycine<sup>245</sup>) and one BACE1 cleavage site (Tyrosine<sup>250</sup>/Tyrosine<sup>251</sup>).

A CTF construct (Myc-CTF-FLAG-TEV-YFP) was cloned and stable expressed in carcinoma cells (HEK293, FaDu, HCT-8).  $\gamma$ -secretase cleaves the CTF construct on  $\gamma$ -sites and  $\epsilon$ -sites. The generated fragments were purified and analyzed by mass spectrometry. Comparison of theoretical mass and measured mass of the cleaved fragments lead to the  $\gamma$  cleavage sites Valine<sup>273</sup>/Valine<sup>274</sup>, Valine<sup>274</sup>/Valine<sup>275</sup>, Valine<sup>275</sup>/Valine<sup>276</sup> and the  $\epsilon$  cleavage sites Valine<sup>284</sup>/Valine<sup>285</sup> and Valine<sup>285</sup>/Leucine<sup>286</sup>.

EpCAM was further described as a cell adhesion molecule. That's why the influence of RIP on cell adhesion was evaluated. Inhibition of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -secretases had no effect on cell adhesion. Also, a cellular EpCAM knockout in HCT-8 cells with CRISPR-Cas9 technology had no effect on cell adhesion compared to EpCAM positive tumor cells.

The atomic force microscopy (AFM) was used to investigate the EpCAM-EpCAM interaction in a cell-free environment. Therefore, a recombinant hEpEx-Fc protein was purified. The EpCAM protein interactions were measured and compared to the measurement of BSA (negative control) and the cell adhesion molecule Desmoglein3 (Dsg3). There was not any significant difference between the binding power of BSA-BSA and EpCAM-EpCAM. Therefore, in my hands EpCAM seems to have no or no significant effect on cell adhesion in the used carcinoma cells.

In conclusion, the EpCAM cleavage sites on amino acid level were identified. Furthermore, EpCAM seems to have no significant influence on cell adhesion.

## 10. Literaturverzeichnis

- Akeson, A. L., & Woods, C. W. (1993). A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J Immunol Methods*, *163*(2), 181-185.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Alberti, S., Nutini, M., & Herzenberg, L. A. (1994). DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(13), 5833-5837.
- Ali, S. R., Humphreys, K. J., McKinnon, R. A., & Michael, M. Z. (2015). Impact of Histone Deacetylase Inhibitors on microRNA Expression and Cancer Therapy: A Review. *Drug Dev Res*. doi:10.1002/ddr.21268
- Artandi, S. E., Chang, S., Lee, S. L., Alson, S., Gottlieb, G. J., Chin, L., & DePinho, R. A. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, *406*(6796), 641-645. doi:10.1038/35020592
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 9-18. doi:10.1093/carcin/bgp268
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, *96*(3), 417-423. doi:10.1038/sj.bjc.6603494
- Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., & Litvinov, S. V. (1998). Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, *18*(8), 4833-4843.
- Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I. H., Rees-Bakker, H. A., Prins, F. A., Helfrich, W., de Leij, L., . . . Litvinov, S. V. (2001). Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol*, *21*(7), 2570-2580. doi:10.1128/mcb.21.7.2570-2580.2001
- Balzar, M., Prins, F. A., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., & Litvinov, S. V. (1999). The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res*, *246*(1), 108-121. doi:10.1006/excr.1998.4263
- Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., & Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)*, *77*(10), 699-712.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., . . . Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760. doi:10.1038/nature05236
- Bax, N. A., van Oorschot, A. A., Maas, S., Braun, J., van Tuyn, J., de Vries, A. A., . . . Goumans, M. J. (2011). In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGFbeta-signaling and WT1. *Basic Res Cardiol*, *106*(5), 829-847. doi:10.1007/s00395-011-0181-0
- Benton, G., Kleinman, H. K., George, J., & Arnaoutova, I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer*, *128*(8), 1751-1757. doi:10.1002/ijc.25781
- Bernards, R., & Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle. *Nature*, *418*(6900), 823. doi:10.1038/418823a
- Blennow, K., Mattsson, N., Scholl, M., Hansson, O., & Zetterberg, H. (2015). Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, *36*(5), 297-309. doi:10.1016/j.tips.2015.03.002
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, *411*(6835), 355-365. doi:10.1038/35077225
- Boveri, T. (1912). ANTON DOHBN. *Science*, *36*(928), 453-468. doi:10.1126/science.36.928.453
- Bozkulak, E. C., & Weinmaster, G. (2009). Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol*, *29*(21), 5679-5695. doi:10.1128/mcb.00406-09
- Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., . . . Baeuerle, P. A. (2006). MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol*, *43*(8), 1129-1143. doi:10.1016/j.molimm.2005.07.034

- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, *100*(4), 391-398.
- Bryan, R. T. (2015). Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *370*(1661), 20140042. doi:10.1098/rstb.2014.0042
- Calabrese, G., Crescenzi, C., Morizio, E., Palka, G., Guerra, E., & Alberti, S. (2001). Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, *92*(1-2), 164-165. doi:56891
- Carnero, A., Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Lorente, J., Rubio, I. T., & ME, L. L. (2016). The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer Treat Rev*, *49*, 25-36. doi:10.1016/j.ctrv.2016.07.001
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*, *1014*, 58-66.
- Cavallaro, U., & Dejana, E. (2011). Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(3), 189-197. doi:10.1038/nrm3068
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, *331*(6024), 1559-1564. doi:10.1126/science.1203543
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*, *5*(1), 22-24. doi:10.1158/2159-8290.cd-14-0788
- Chai, X. B., Song, R. F., & Xu, F. (2015). Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis. *Genet Mol Res*, *14*(3), 7624-7629. doi:10.4238/2015.July.13.6
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2015). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J Mol Biol*. doi:10.1016/j.jmb.2015.10.014
- Chaves-Perez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harreus, U., & Gires, O. (2013). EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene*, *32*(5), 641-650. doi:10.1038/onc.2012.75
- Christian, L. M. (2012). The ADAM family: Insights into Notch proteolysis. *Fly (Austin)*, *6*(1), 30-34. doi:10.4161/fly.18823
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Curr Genomics*, *8*(8), 509-530. doi:10.2174/138920207783769512
- Craig, S. E., & Brady-Kalnay, S. M. (2011). Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Res*, *71*(2), 303-309. doi:10.1158/0008-5472.can-10-2301
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., . . . Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(24), 10158-10163. doi:10.1073/pnas.0703478104
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, *13*(2), 97-110. doi:10.1038/nrc3447
- Denzel, S., Maetzel, D., Mack, B., Eggert, C., Barr, G., & Gires, O. (2009). Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer*, *9*, 402. doi:10.1186/1471-2407-9-402
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., . . . Mohs, R. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, *369*(4), 341-350. doi:10.1056/NEJMoa1210951
- Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., . . . Gires, O. (2014). Context-dependent adaptation of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*, *33*(41), 4904-4915. doi:10.1038/onc.2013.441
- Ebber, J. D., Treisman, D. M., Zorniak, M., Kutty, R. G., Clark, P. A., & Kuo, J. S. (2010). The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets*, *14*(6), 621-632. doi:10.1517/14712598.2010.485186
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, *29*(5), 258-289. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001
- Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., . . . Dick, J. E. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*, *17*(9), 1086-1093. doi:10.1038/nm.2415

- Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., . . . Saur, D. (2013). Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*, 23(3), 406-420. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.023
- Evans, W. H., & Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol*, 19(2), 121-136. doi:10.1080/09687680210139839
- Fong, D., Moser, P., Kasal, A., Seeber, A., Gastl, G., Martowicz, A., . . . Spizzo, G. (2014). Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology*, 64(5), 683-692. doi:10.1111/his.12307
- Fong, D., Steurer, M., Obrist, P., Barbieri, V., Margreiter, R., Amberger, A., . . . Spizzo, G. (2008). Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol*, 61(1), 31-35. doi:10.1136/jcp.2006.037333
- Ghosh, A. K., Brindisi, M., & Tang, J. (2012). Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 120 Suppl 1, 71-83. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07476.x
- Gires, O. (2011). Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci*, 68(24), 4009-4022. doi:10.1007/s00018-011-0772-9
- Gires, O., Eskofier, S., Lang, S., Zeidler, R., & Munz, M. (2003). Cloning and characterisation of a 1.1 kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter. *Anticancer Res*, 23(4), 3255-3261.
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Munz, M., Wollenberg, B., & Zeidler, R. (2001). Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer*, 92(3), 620-628.
- Gires, O., & Stoecklein, N. H. (2014). Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci*, 71(22), 4393-4402. doi:10.1007/s00018-014-1693-1
- Gonzalez, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M., & Gires, O. (2009). EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells*, 27(8), 1782-1791. doi:10.1002/stem.97
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(1), 1-44.
- Gordon, W. R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol*, 14(4), 295-300. doi:10.1038/nsmb1227
- Gosens, M. J., van Kempen, L. C., van de Velde, C. J., van Krieken, J. H., & Nagtegaal, I. D. (2007). Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol*, 20(2), 221-232. doi:10.1038/modpathol.3800733
- Gottlinger, H., Johnson, J., & Riethmuller, G. (1986). Biochemical and epitope analysis of the 17-1A membrane antigen. *Hybridoma*, 5 Suppl 1, S29-37.
- Gottlinger, H. G., Funke, I., Johnson, J. P., Gokel, J. M., & Riethmuller, G. (1986). The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer*, 38(1), 47-53.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), 59-74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- Greaves, M. (2015). Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer Discov*, 5(8), 806-820. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-0439
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. doi:10.1038/nature10762
- Guerra, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Dini, F., Tiboni, G. M., Piantelli, M., & Alberti, S. (2012). mTrop1/Epcam knockout mice develop congenital tufting enteropathy through dysregulation of intestinal E-cadherin/beta-catenin. *PLoS One*, 7(11), e49302. doi:10.1371/journal.pone.0049302
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006270. doi:10.1101/cshperspect.a006270

- Hachmeister, M. (2014). *Proteolytische Spaltung und Signaltransduktion des tumorassoziierten Antigens EpCAM in murinen Teratom- und embryonalen Stammzellen*. LMU München. Retrieved from <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-175441>
- Hachmeister, M., Bobowski, K. D., Hognl, S., Dislich, B., Fukumori, A., Eggert, C., . . . Gires, O. (2013). Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PLoS One*, *8*(8), e71836. doi:10.1371/journal.pone.0071836
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, *166*(4), 557-580.
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, *21*(3), 309-322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hartung, G., Hofheinz, R. D., Dencausse, Y., Sturm, J., Kopp-Schneider, A., Dietrich, G., . . . Queisser, W. (2005). Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study. *Onkologie*, *28*(6-7), 347-350. doi:10.1159/000084595
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T., & Barber, D. L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell*, *22*(24), 4750-4764. doi:10.1091/mbc.E11-02-0119
- Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z., & Koprowski, H. (1979). Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol*, *9*(8), 657-659. doi:10.1002/eji.1830090817
- Hope, K. J., Jin, L., & Dick, J. E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*, *5*(7), 738-743. doi:10.1038/ni1080
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Pat Cerretti, D., . . . Conlon, P. J. (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotech*, *6*(10), 1204-1210.
- Huang, H. P., Chen, P. H., Yu, C. Y., Chuang, C. Y., Stone, L., Hsiao, W. C., . . . Kuo, H. C. (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem*, *286*(38), 33520-33532. doi:10.1074/jbc.M111.256164
- Huang, R. Y., Guilford, P., & Thiery, J. P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, *125*(Pt 19), 4417-4422. doi:10.1242/jcs.099697
- Imrich, S., Hachmeister, M., & Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr*, *6*(1), 30-38. doi:10.4161/cam.18953
- Jachin, S., Bae, J. S., Sung, J. J., Park, H. S., Jang, K. Y., Chung, M. J., . . . Moon, W. S. (2014). The role of nuclear EpICD in extrahepatic cholangiocarcinoma: association with beta-catenin. *Int J Oncol*, *45*(2), 691-698. doi:10.3892/ijo.2014.2472
- Jager, M., Schoberth, A., Ruf, P., Hess, J., Hennig, M., Schmalfeldt, B., . . . Lindhofer, H. (2012). Immunomonitoring results of a phase II/III study of malignant ascites patients treated with the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3). *Cancer Res*, *72*(1), 24-32. doi:10.1158/0008-5472.can-11-2235
- Jiang, W. G. (1996). E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg*, *83*(4), 437-446.
- Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., . . . Levine, H. (2015). Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol*, *5*, 155. doi:10.3389/fonc.2015.00155
- Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., & Meeker, A. K. (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol*, *127*(2), 254-262. doi:10.1309/91py0rbd9w8y5gnx
- Kidane, D., Chae, W. J., Czochor, J., Eckert, K. A., Glazer, P. M., Bothwell, A. L., & Sweasy, J. B. (2014). Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *49*(2), 116-139. doi:10.3109/10409238.2013.875514

- Kim, S. A., Tai, C. Y., Mok, L. P., Mosser, E. A., & Schuman, E. M. (2011). Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(24), 9857-9862. doi:10.1073/pnas.1019003108
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(6), 499-504. doi:10.1038/nrm1406
- Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *116*, 409-432. doi:10.1016/b978-0-12-394311-8.00018-2
- Kozan, P. A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Mueller, J. L., Barrett, K. E., Marchelletta, R. R., & Sivagnanam, M. (2015). Mutation of EpCAM leads to intestinal barrier and ion transport dysfunction. *J Mol Med (Berl)*, *93*(5), 535-545. doi:10.1007/s00109-014-1239-x
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 275-291. doi:10.1016/j.stem.2014.02.006
- Kuhn, S., Koch, M., Nubel, T., Ladwein, M., Antolovic, D., Klingbeil, P., . . . Zoller, M. (2007). A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*, *5*(6), 553-567. doi:10.1158/1541-7786.mcr-06-0384
- Kuhnle, M., Egger, M., Muller, C., Mahringer, A., Bernhardt, G., Fricker, G., . . . Buschauer, A. (2009). Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J Med Chem*, *52*(4), 1190-1197. doi:10.1021/jm8013822
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648. doi:10.1038/367645a0
- Le Borgne, R., Bardin, A., & Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*, *132*(8), 1751-1762. doi:10.1242/dev.01789
- Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J. F., . . . Rubinstein, E. (2006). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, *5*(5), 845-857. doi:10.1074/mcp.M500330-MCP200
- Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., . . . Christofori, G. (2008). NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *Embo j*, *27*(19), 2603-2615. doi:10.1038/emboj.2008.178
- Lei, Z., Maeda, T., Tamura, A., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Shiratori, H., . . . Hamada, H. (2012). EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol*, *371*(2), 136-145. doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.005
- Li, C., Lee, C. J., & Simeone, D. M. (2009). Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol*, *568*, 161-173. doi:10.1007/978-1-59745-280-9\_10
- Li, J., & Zhu, Z. (2010). Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacol Sin*, *31*(9), 1198-1207. doi:10.1038/aps.2010.120
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., . . . Chang, J. C. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, *100*(9), 672-679. doi:10.1093/jnci/djn123
- Lichtenthaler, S. F., Haass, C., & Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*, *117*(5), 779-796. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07248.x
- Lin, C. W., Liao, M. Y., Lin, W. W., Wang, Y. P., Lu, T. Y., & Wu, H. C. (2012). Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *J Biol Chem*, *287*(47), 39449-39459. doi:10.1074/jbc.M112.386235

- Linnenbach, A. J., Seng, B. A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyrc, J. J., . . . Huebner, K. (1993). Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol*, 13(3), 1507-1515.
- Litvinov, S. V., Bakker, H. A., Gourevitch, M. M., Velders, M. P., & Warnaar, S. O. (1994). Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun*, 2(5), 417-428.
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., . . . Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*, 139(5), 1337-1348.
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., 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(3), 865-875.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 125(2), 437-446.
- Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 675-699. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
- Lu, T. Y., Lu, R. M., Liao, M. Y., Yu, J., Chung, C. H., Kao, C. F., & Wu, H. C. (2010). Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 285(12), 8719-8732. doi:10.1074/jbc.M109.077081
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M. H., Broadway, N., Andrews, R. C., Bickett, D. M., . . . Becherer, J. D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*, 8(2), 161-171.
- Machado-Silva, A., Perrier, S., & Bourdon, J. C. (2010). p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol*, 20(1), 57-62. doi:10.1016/j.semcancer.2010.02.005
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., . . . Gires, O. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, 11(2), 162-171. doi:10.1038/ncb1824
- Maghzal, N., Kayali, H. A., Rohani, N., Kajava, A. V., & Fagotto, F. (2013). EpCAM controls actomyosin contractility and cell adhesion by direct inhibition of PKC. *Dev Cell*, 27(3), 263-277. doi:10.1016/j.devcel.2013.10.003
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., . . . Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9182-9187. doi:10.1073/pnas.0500918102
- Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A., & Chaffer, C. L. (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*, 59(1), 168-179. doi:10.1373/clinchem.2012.184655
- Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*, 12(5), 323-334. doi:10.1038/nrc3261
- Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), 105-117. doi:10.1016/j.bbcan.2009.11.002
- Massoner, P., Thomm, T., Mack, B., Untergasser, G., Martowicz, A., Bobowski, K., . . . Puhr, M. (2014). EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *Br J Cancer*, 111(5), 955-964. doi:10.1038/bjc.2014.366
- Merlos-Suarez, A., Barriga, F. M., Jung, P., Iglesias, M., Cespedes, M. V., Rossell, D., . . . Batlle, E. (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*, 8(5), 511-524. doi:10.1016/j.stem.2011.02.020
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R., & Hammerling, G. J. (1987). Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer*, 56(6), 714-721.

- Mosolits, S., Markovic, K., Frodin, J. E., Virving, L., Magnusson, C. G., Steinitz, M., . . . Mellstedt, H. (2004). Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, *10*(16), 5391-5402. doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-0425
- Mueller, J. L., McGeough, M. D., Pena, C. A., & Sivagnanam, M. (2014). Functional consequences of EpCam mutation in mice and men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *306*(4), G278-288. doi:10.1152/ajpgi.00286.2013
- Mumm, J. S., & Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*, *228*(2), 151-165. doi:10.1006/dbio.2000.9960
- Munz, M., Fellinger, K., Hofmann, T., Schmitt, B., & Gires, O. (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci*, *13*, 5195-5201.
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., & Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, *23*(34), 5748-5758. doi:10.1038/sj.onc.1207610
- Munz, M., Zeidler, R., & Gires, O. (2005). The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Lett*, *225*(1), 151-157. doi:10.1016/j.canlet.2004.11.048
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M. B., Hanson, J. C., Morasso, M. I., Tessarollo, L., . . . Udey, M. C. (2009). Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLoS One*, *4*(12), e8543. doi:10.1371/journal.pone.0008543
- Ng, V. Y., Ang, S. N., Chan, J. X., & Choo, A. B. (2010). Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, *28*(1), 29-35. doi:10.1002/stem.221
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23-28.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., . . . Gires, O. (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, *193*(1), 25-32.
- Pavsic, M., Guncar, G., Djinic-Carugo, K., & Lenarcic, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nat Commun*, *5*, 4764. doi:10.1038/ncomms5764
- Pavsic, M., & Lenarcic, B. (2011). Expression, crystallization and preliminary X-ray characterization of the human epithelial cell-adhesion molecule ectodomain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *67*(Pt 11), 1363-1366. doi:10.1107/s1744309111031897
- Pepper, J. W., Scott Findlay, C., Kassen, R., Spencer, S. L., & Maley, C. C. (2009). Cancer research meets evolutionary biology. *Evol Appl*, *2*(1), 62-70. doi:10.1111/j.1752-4571.2008.00063.x
- Punt, C. J., Nagy, A., Douillard, J. Y., Figer, A., Skovsgaard, T., Monson, J., . . . MacGregor, S. (2002). Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet*, *360*(9334), 671-677. doi:10.1016/s0140-6736(02)09836-7
- Ralhan, R., Cao, J., Lim, T., Macmillan, C., Freeman, J. L., & Walfish, P. G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*, *10*, 331. doi:10.1186/1471-2407-10-331
- Ralhan, R., He, H. C., So, A. K., Tripathi, S. C., Kumar, M., Hasan, M. R., . . . Walfish, P. G. (2010). Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One*, *5*(11), e14130. doi:10.1371/journal.pone.0014130
- Ramalingam, S., Annaluru, N., & Chandrasegaran, S. (2013). A CRISPR way to engineer the human genome. *Genome Biol*, *14*(2), 107. doi:10.1186/gb-2013-14-2-107
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, *145*(7), 1012-1022. doi:10.1016/j.cell.2011.06.010

- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H., & Lindhofer, H. (2001). Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J Histochem Cytochem*, 49(7), 911-917.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., . . . Pichlmayr, R. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*, 16(5), 1788-1794.
- Riethmuller, G., Schneider-Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., . . . et al. (1994). Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet*, 343(8907), 1177-1183.
- Ruf, P., Gires, O., Jager, M., Fellingner, K., Atz, J., & Lindhofer, H. (2007). Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer*, 97(3), 315-321. doi:10.1038/sj.bjc.6603881
- Schmidt, M., Scheulen, M. E., Dittrich, C., Obrist, P., Marschner, N., Dirix, L., . . . Awada, A. (2010). An open-label, randomized phase II study of adegatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 21(2), 275-282. doi:10.1093/annonc/mdp314
- Schnekenburger, M., Florean, C., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Epigenetic alterations as a universal feature of cancer hallmarks and a promising target for personalized treatments. *Curr Top Med Chem*.
- Schnell, U., Cirulli, V., & Giepmans, B. N. (2013). EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1828(8), 1989-2001. doi:10.1016/j.bbamem.2013.04.018
- Schon, M. P., Schon, M., Klein, C. E., Blume, U., Bisson, S., & Orfanos, C. E. (1994). Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol*, 102(6), 987-991.
- Schon, M. P., Schon, M., Mattes, M. J., Stein, R., Weber, L., Alberti, S., & Klein, C. E. (1993). Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4. *Int J Cancer*, 55(6), 988-995.
- Sears, H. F., Herlyn, D., Steplewski, Z., & Koprowski, H. (1984). Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. *J Biol Response Mod*, 3(2), 138-150.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), 822-829. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741-4751. doi:10.1038/onc.2010.215
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., . . . Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401. doi:10.1038/nature03128
- Slanchev, K., Carney, T. J., Stemmler, M. P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., & Hammerschmidt, M. (2009). The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genet*, 5(7), e1000563. doi:10.1371/journal.pgen.1000563
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P. A., . . . Zeimet, A. G. (2006). Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 103(2), 483-488. doi:10.1016/j.ygyno.2006.03.035
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., . . . Gastl, G. (2004). High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 86(3), 207-213. doi:10.1023/b:brea.0000036787.59816.01
- Stoecklein, N. H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A. M., Erbersdobler, A., Verde, P. E., . . . Hosch, S. B. (2006). Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*, 6, 165. doi:10.1186/1471-2407-6-165

- Stone, A. L., Kroeger, M., & Sang, Q. X. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem*, 18(4), 447-465.
- Stoyanova, T., Goldstein, A. S., Cai, H., Drake, J. M., Huang, J., & Witte, O. N. (2012). Regulated proteolysis of Trop2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via beta-catenin signaling. *Genes Dev*, 26(20), 2271-2285. doi:10.1101/gad.196451.112
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2
- Suresh, S., & Irvine, A. E. (2015). The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production. *J Cell Commun Signal*, 9(1), 5-13. doi:10.1007/s12079-015-0271-0
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., & Linnenbach, A. J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(9), 3542-3546.
- Tang, X., Kuhlenschmidt, T. B., Zhou, J., Bell, P., Wang, F., Kuhlenschmidt, M. S., & Saif, T. A. (2010). Mechanical force affects expression of an in vitro metastasis-like phenotype in HCT-8 cells. *Biophys J*, 99(8), 2460-2469. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.034
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thiery, J. P., & Lim, C. T. (2013). Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell*, 23(3), 272-273. doi:10.1016/j.ccr.2013.03.004
- Thuma, F., & Zoller, M. (2013). EpCAM-associated claudin-7 supports lymphatic spread and drug resistance in rat pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 133(4), 855-866. doi:10.1002/ijc.28085
- To, K. K., Poon, D. C., Wei, Y., Wang, F., Lin, G., & Fu, L. W. (2015). Vatalanib sensitizes ABCB1 and ABCG2-overexpressing multidrug resistant colon cancer cells to chemotherapy under hypoxia. *Biochem Pharmacol*, 97(1), 27-37. doi:10.1016/j.bcp.2015.06.034
- Trebak, M., Begg, G. E., Chong, J. M., Kanazireva, E. V., Herlyn, D., & Speicher, D. W. (2001). Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (EpCAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 276(3), 2299-2309. doi:10.1074/jbc.M004770200
- Trzpis, M., McLaughlin, P. M., de Leij, L. M., & Harmsen, M. C. (2007). Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol*, 171(2), 386-395. doi:10.2353/ajpath.2007.070152
- Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavsic, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., . . . Gires, O. (2015). Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). *J Biol Chem*, 290(40), 24574-24591. doi:10.1074/jbc.M115.662700
- Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavsic, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., . . . Gires, O. (2016). Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). *J Biol Chem*, 291(1), 425. doi:10.1074/jbc.A115.662700
- Tsujikawa, M., Kurahashi, H., Tanaka, T., Nishida, K., Shimomura, Y., Tano, Y., & Nakamura, Y. (1999). Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet*, 21(4), 420-423. doi:10.1038/7759
- Urban, S., & Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev*, 12(5), 512-518.
- Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E., & Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, 180(4), 755-762. doi:10.1083/jcb.200708127
- van der Gun, B. T., Melchers, L. J., Ruiters, M. H., de Leij, L. F., McLaughlin, P. M., & Rots, M. G. (2010). EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*, 31(11), 1913-1921. doi:10.1093/carcin/bgq187

- van Sluis, R., Bhujwala, Z. M., Raghunand, N., Ballesteros, P., Alvarez, J., Cerdan, S., . . . Gillies, R. J. (1999). In vivo imaging of extracellular pH using  $^1\text{H}$  MRSI. *Magn Reson Med*, 41(4), 743-750.
- Varga, M., Obrist, P., Schneeberger, S., Muhlmann, G., Felgel-Farnholz, C., Fong, D., . . . Spizzo, G. (2004). Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res*, 10(9), 3131-3136.
- Vermeulen, L., De Sousa, E. M. F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., . . . Medema, J. P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 12(5), 468-476. doi:10.1038/ncb2048
- Vielmuth, F., Hartlieb, E., Kugelmann, D., Waschke, J., & Spindler, V. (2015). Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine*, 11(3), 511-520. doi:10.1016/j.nano.2014.10.006
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314-322. doi:10.1038/nature09781
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8(10), 755-768. doi:10.1038/nrc2499
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
- Waldron, N. N., Barsky, S. H., Dougherty, P. R., & Vallera, D. A. (2014). A bispecific EpCAM/CD133-targeted toxin is effective against carcinoma. *Target Oncol*, 9(3), 239-249. doi:10.1007/s11523-013-0290-9
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323-330.
- Weiner, L. M., Steplewski, Z., Koprowski, H., Sears, H. F., Litwin, S., & Comis, R. L. (1986). Biologic effects of gamma interferon pre-treatment followed by monoclonal antibody 17-1A administration in patients with gastrointestinal carcinoma. *Hybridoma*, 5 Suppl 1, S65-77.
- Wenqi, D., Li, W., Shanshan, C., Bei, C., Yafei, Z., Feihu, B., . . . Daiming, F. (2009). EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135(9), 1277-1285. doi:10.1007/s00432-009-0569-5
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-552.
- Winter, M. J., Cirulli, V., Briaire-de Bruijn, I. H., & Litvinov, S. V. (2007). Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem*, 302(1-2), 19-26. doi:10.1007/s11010-007-9420-y
- Winter, M. J., Nagelkerken, B., Mertens, A. E., Rees-Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., & Litvinov, S. V. (2003). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*, 285(1), 50-58.
- Xie, X., Wang, C. Y., Cao, Y. X., Wang, W., Zhuang, R., Chen, L. H., . . . Jin, B. Q. (2005). Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World J Gastroenterol*, 11(3), 344-347.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., . . . Iacobuzio-Donahue, C. A. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467(7319), 1114-1117. doi:10.1038/nature09515
- Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., & Wang, X. W. (2007). Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 67(22), 10831-10839. doi:10.1158/0008-5472.can-07-0908
- Ye, X., Tam, W. L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E., & Weinberg, R. A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*, 525(7568), 256-260. doi:10.1038/nature14897
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 15-33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0

- 
- Zhang, C., Tian, L., Chi, C., Wu, X., Yang, X., Han, M., . . . Deng, K. (2010). Adam10 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Dev Dyn*, 239(10), 2594-2602. doi:10.1002/dvdy.22391
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H. C., Matei, D., Schilder, J. M., . . . Nephew, K. P. (2008). Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*, 68(11), 4311-4320. doi:10.1158/0008-5472.can-08-0364

## 11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinheitlichtes Modell der klonalen Evolutions- und der Tumorstammzell-Theorie.....	12
Abbildung 2: Das EpCAM-Gen.....	15
Abbildung 3: 3D-Struktur des humanen EpCAM Proteins .....	17
Abbildung 4: Zelladhäsion .....	19
Abbildung 5: Spaltungsabhängige Induktion der Proliferation .....	24
Abbildung 6: CRISPR-Cas9 Konstrukt von Sigma-Aldrich GmbH.....	35
Abbildung 7: Genome-Engineering im Überblick.....	42
Abbildung 8: Spaltung von EpCAM .....	53
Abbildung 9: Schematische Darstellung des hEpCAM-TF Konstrukts .....	54
Abbildung 10: Expressionsnachweis des hEpCAM-TEV-FLAG Konstrukts .....	55
Abbildung 11: Bestimmung der extrazellulären Schnittstellen von hEpCAM auf Ebene der Aminosäuren. ....	57
Abbildung 12: Charakterisierung der Proteasen, welche an der Spaltung von hEpCAM beteiligt sind. ....	58
Abbildung 13: Zuordnung der extrazellulären Spaltsequenzen von humanen und murinen EpCAM .....	58
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Myc-CTF-Flag-Tev-YFP Konstrukts .....	59
Abbildung 15: Proteosomaler Abbau von hEpICD nach Spaltung durch die $\gamma$ -Sekretase .....	60
Abbildung 16: Charakterisierung der Proteasen, welche an der Spaltung von hEpCAM beteiligt sind .....	62
Abbildung 17: Charakterisierung der $\gamma$ -Protease, welche an der Spaltung von hEpCAM beteiligt ist. ....	63
Abbildung 18: Zuordnung der transmembranen Spaltsequenzen von humanen und murinen EpCAM .....	64
Abbildung 19: Implementierung der extrazellulären Schnittstellen in das 3D-Modell von hEpCAM.....	65
Abbildung 20: Implementierung der transmembranen Schnittstellen in das 3D-Modell von hEpCAM .....	66
Abbildung 21: Einfluss der Inhibierung der Spaltung auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion .....	69
Abbildung 22: Zellulärer hEpCAM Knockout mittels CRISPR-Cas9 .....	71

Abbildung 23: Einfluss eines hEpCAM Knockouts auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion in Kalziumumgebung .....	73
Abbildung 24: Einfluss eines hEpCAM Knockouts auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion unter Kalziumentzug .....	74
Abbildung 25: Generierung des hEpEx-Fc PS521 Plasmids .....	75
Abbildung 26: Nachweis der Aufreinigung von hEpEX-Fc aus HEK293 Zellen .....	76
Abbildung 27: <i>Atomic force microscopy</i> Messung der hEpEx-hEpEx-Interaktion .....	77
Abbildung 28: Möglichkeiten der Spaltung von hEpCAM .....	83

## 12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	26
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	29
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	29
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	30
Tabelle 5: Verwendete Computerprogramme.....	32
Tabelle 6: Verwendete Dienstleistungen .....	32
Tabelle 7: Verwendete Antikörper .....	32
Tabelle 8: Verwendete Primer .....	33
Tabelle 9: Verwendete qRT-PCR Primer .....	34
Tabelle 10: Verwendete Plasmide.....	34
Tabelle 11: Verwendete Bakterien .....	35
Tabelle 12: Verwendete Zelllinien .....	35
Tabelle 13: Reaktionsansatz qPCR.....	38
Tabelle 14: qPCR Protokoll .....	38
Tabelle 15: Reaktionsansatz PCR.....	39
Tabelle 16: PCR Protokoll .....	39

## 13. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensionale Gelelektrophorese
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
AML	akute myeloische Leukämie
APP	amyloid precursor protein
Aqua dest.	Aminosäure
AS	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
AVC	angiogenetic vascular cells
bp	Basenpaar
BiTe	bispecific T-cell engager
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAFs	cancer associated fibroblasts
CCL5	CC-chemokine ligand 5
CD	cluster of differentiation
CD44	cell surface glycoprotein
CD133	Prominin 1
cDNA	komplementäre DNA
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CSC	cancer stem cell
CTCs	circulating tumor cells
CTE	congenital tufting enteropathy
CTF	C-terminales Fragment
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton
	N-[(3,5-Difluorophenyl) acetat]-L-alanyl-2-phenyl] glycine-
DAPT	1,1-dimethylethyl ester
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
EpEx	extrazellulärer Domäne von EpCAM
EpICD	intrazelluläre Domäne von EpCAM
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
ERM	ezrin, radixin and moesin
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence activated cell sorter

Fc	fragment crystallisable
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gRNA	guided RNA
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
H <sub>2</sub> O	Wasser
hEpCAM	humanes EpCAM
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IGF	insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IIC	infiltrating immunocells
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
kb	Kilobasen
kras	Kirsten Rat Sarcoma
l	Liter
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight
MAPK	mitogen-activated protein-kinase
MD	molecular dynamics
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase
mEpCAM	murines EpCAM
$\mu$	Mikro
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten Ribonukleinsäure)
miRNA	mikroRNA
MS	Massenspektrometer
ND	N-Domäne
ErbB2	avian erythroblastosis oncogene B 2
NF $\kappa$ B	nuclear factor of kappa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	partitioning-defective
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
pRb	Retinoblastomprotein
rcf	relative centrifugal force
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse
RNA	Ribonukleinsäure

---

ROS	reactive oxygen species
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
	small body size (SMA) mothers against decapentaplegic (MAD)
SMAD	
Taq	Thermus aquaticus
TEM	Tetraspanin rich microdomane
TF	TEV-FLAG
TIC	Tumor initiating cell (Tumor initiierende Zelle)
TGF $\beta$	trasnforming growth protein
TM	Transmembrandomäne
TME	tumor microenvironment
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53	Tumorsuppressor Protein 53
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Thyroglobulindomäne
u	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wingless und Int-1
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

## 14. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Olivier Gires für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Forschungsgruppe mit einem für mich vielseitigen und spannenden Thema durchzuführen. Ich möchte mich bedanken für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, Diskussionen und auch dafür, dass das menschliche nicht zu kurz gekommen ist und ich mich sehr gut betreut fühlte. Insbesondere bedanke ich mich für die Unterstützung und Chance meine eigenen Ideen und Vorstellungen bei der Planung der weiteren Vorgehensweise mit einfließen zu lassen.

Vielen Dank an Gabriele Bähr, Matthias Hachmeister, Zhe Huang, Jasmine Jakubowski, Gisela Kranz, Heidi Kremling, Darko Libl, Elke Luxenburger, Brigitte Mack, Elisabeth Pfrogner, Lars Prange, Sannia Sarrach und dem Rest der HNO-Forschung für eure Hilfsbereitschaft, euren wissenschaftlichen Rat und das gute Arbeitsklima. Ich möchte mich bei Laura Fischer für die schöne Zeit im Labor und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler, Prof. Dr. Harald Steiner und Dr. Akio Fukumori für die MALDI-ToF-Messungen zur Bestimmung der Spaltstellen von EpCAM.

Außerdem möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Jens Waschke, Prof. Dr. Volker Spindler und Dr. Franziska Vielmuth bedanken für die Unterstützung und die Messungen mittels AFM.

Für die Implementierung der Schnittstellen in das 3D EpCAM Modell möchte ich mich bei Prof. Dr. Brigita Lenarčič und Dr. Miha Pavšič bedanken.

Dank gilt auch an das FöFoLe (Förderprogramm für Forschung und Lehre) Programm, dass es mir ermöglicht hat eine passende Doktorarbeit zu finden und mir einen breiten Einblick in wissenschaftliche Methodik und Thematik durch zahlreiche Seminare geboten hatte.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken für die liebevolle Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

## 15. Publikation

**Thanos Tsaktanis**, Heidi Kremling, Miha Pavšič, Ricarda von Stackelberg, Brigitte Mack, Akio Fukumori, Harald Steiner, Franziska Vielmuth, Volker Spindler, Zhe Huang, Jasmine Jakubowski, Nikolas H. Stoecklein, Elke Luxenburger, Kirsten Lauber, Brigita Lenarčič, Olivier Gires

Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM).

*J Biol Chem*, 290(40), 24574-24591. doi:10.1074/jbc.M115.662700;

October 2, 2015;

Erratum *J Biol Chem*, 291(1), 425. doi:10.1074/jbc.A115.662700

January 1, 2016