

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

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**"Aktivierung und Funktion von murinem EpCAM in
embryonalen Stammzellen"**

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

vorgelegt von

Laura Fischer

aus München

2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph A. W. Rupp
Prof. Dr. Roland Kappler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2019

Eidesstattliche Versicherung

Laura Fischer

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

"Aktivierung und Funktion von murinem EpCAM in embryonalen Stammzellen"

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 10.09.2019

Ort, Datum

Laura Fischer

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen).....	1
1.2 EpCAM- epitheliales Zelladhäsionsmolekül.....	5
1.2.1 Struktur und Funktion von EpCAM.....	5
1.2.2 Bedeutung von EpCAM für die murine Embryonalentwicklung und den Phänotyp von ES-Zellen.....	9
1.2.3 Interaktionspartner von EpCAM in murinen Teratokarzinomzellen.....	11
1.3 Grundlagen des Genome-Engineering-Systems CRISPR/Cas.....	12
1.4 Teratome und Teratokarzinome	15
1.5 Zielsetzung.....	17
2. Material.....	18
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	18
2.1.1 Chemikalien und Kits	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Geräte	20
2.2 Antikörper	21
2.3 Oligonukleotide	22
2.3.1 Primer.....	22
2.3.2 Plasmide.....	23
2.4 Inhibitoren	23
2.5 Bakterienstamm	23
2.6 Zelllinien.....	24
2.7 Medien und Puffer	24
2.7.1 Zellkultur.....	24
2.7.2 Bakterienkultur.....	24
2.7.3 Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.7.3.1 Western Blot	25
2.7.3.2 Durchflusszytometrie.....	25
3. Methoden	26
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	26
3.1.1 Bakterienkultivierung und- konservierung	26

3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	26
3.1.3	Transformation der Bakterien nach der Hitzeschockmethode	26
3.2	Methoden der Zellkultur.....	27
3.2.1	Kultivierung und Konservierung der Zellen	27
3.2.2	Transfektion durch Nukleofektion.....	27
3.2.3	Cell Titer Blue Viability Assay zur indirekten Proliferationsmessung	28
3.2.4	<i>In vitro</i> -Differenzierung durch die Generierung von Embryoid Bodies	28
3.3	Molekularbiologische Methoden	29
3.3.1	Ribonukleinsäure (RNA) Isolation und komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Synthese.....	29
3.3.2	Real time quantitative Polymerase Ketten Reaktion (qPCR).....	30
3.4	Proteinbiochemische Methoden	30
3.4.1	Analyse von intra- und extrazellulären Proteinen mittels Western Blot.....	30
3.4.2	Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie	32
3.5	Immunhistochemie	32
3.6	Immunfluoreszenz	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Untersuchung der Interaktion von EpCAM und der GTPase ERas.....	34
4.1.1	AKT-Phosphorylierung in pluripotenten ES-Zellen	34
4.1.2	Auswirkung einer ERas-Überexpression auf die kardiomyozytäre Differenzierung von Embryoid Bodies.....	35
4.1.3	Auswirkung einer hyperaktiven AKT Mutante auf die kardiomyozytäre Differenzierung von Embryoid Bodies.....	36
4.1.4	Kardiomyozytäre Differenzierung unter dem Einfluss von PI3-Kinase Inhibitoren	37
4.2	Auswirkung eines zellulären EpCAM-Knockouts auf embryonale Stammzellen	38
4.2.1	Generierung eines zellulären EpCAM-Knockouts mithilfe des CRISPR/Cas 9 Systems	38
4.2.2	Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Pluripotenz, die Regulation des Zellzyklus, die Proliferation von undifferenzierten embryonalen Stammzellen und die AKT-Phosphorylierung.....	43
4.2.2.1	Pluripotenzmarker	43
4.2.2.2	Proliferations- und Zellzyklusmarker.....	44
4.2.2.3	Differenzierungsmarker	45
4.2.2.4	Einfluss auf die Proliferation in An- und Abwesenheit von LIF	46
4.2.2.5	Effekt auf die AKT-Phosphorylierung.....	47
4.2.3	Effekt des zellulären EpCAM-Knockouts auf die <i>in vitro</i> Differenzierung.....	48
4.2.3.1	Auswirkung des Knockouts auf die Bildung von Kardiomyozyten	48

4.2.3.2 Transkriptionelle Regulation von Pluripotenz- und Zellzyklusmarkern in Abhängigkeit der Kontraktion und dem EpCAM-Status	49
4.2.3.3 Transkriptionelle Regulation von Differenzierungsmarkern der Keimblätter in Abhängigkeit der Kontraktion von Embryoid Bodies.....	53
4.2.3.4 Immunhistochemische Untersuchung der EpCAM Expression der Knockout-Embryoid Bodies.....	54
4.2.3.5 Immunhistochemische Untersuchung von Differenzierungsmarkern in Embryoid Bodies.....	55
4.2.3.6 Immunhistochemische Untersuchung von epithelialen Markern in Embryoid Bodies.....	60
4.3 Rekonstitution einer vollständigen Differenzierung von EpCAM-Knockout ES-Zellen zu Kardiomyozyten unter dem Einfluss von EpCAM-positiven ES-Zellen.....	64
4.3.1 Rekonstitution mit löslichen Faktoren aus dem Überstand von EpCAM-positiver Kultur.....	65
4.3.2 Rekonstitution durch Zell-Zell-Kontakt	66
4.4 Teratom und Teratokarzinombildung <i>in vivo</i>	72
4.4.1 Einfluss einer Überexpression von ERas und EpCAM auf die Teratom- oder Teratokarzinombildung	75
4.4.2 Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Teratombildung	77
4.4.3 Immunhistochemische Analyse der Teratome	79
5. Diskussion und Ausblick.....	84
5.1 EpCAM, der PI3-Kinase/AKT Signalweg, Pluripotenz und Selbsterneuerung.....	85
5.2 Auswirkungen des PI3-Kinase/AKT Signalwegs und eines EpCAM-Knockouts auf die <i>in vitro</i> Differenzierung	91
5.3 Auswirkung der EpCAM Überexpression, des EpCAM-Knockouts und der ERas Überexpression auf die Teratombildung <i>in vivo</i>	100
6. Zusammenfassung	106
7. Summary	108
8. Literaturverzeichnis	110
9. Publikation.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekularbiologische Funktionsweise von <i>genome editing</i> Technologien modifiziert nach Hsu <i>et al.</i> (2014).	13
Abbildung 2: Induktion der AKT-Phosphorylierung durch EpCAM Überexpression.	34
Abbildung 3: Induktion der AKT-Phosphorylierung durch EpCAM Überexpression und IGF Behandlung, Inhibition durch LY294002 Behandlung.	35
Abbildung 4: Kontrahierende Embryoid Bodies bei exogener Expression von ERas.....	36
Abbildung 5: Kontrahierende Embryoid Bodies bei permanenter Phosphorylierung der AKT....	37
Abbildung 6: Embryoid Bodies Tag 10 behandelt mit DMSO, Rapamycin und LY294002.....	38
Abbildung 7: Expression EpCAM im FACS zur Selektion ausgewählter Klone.	39
Abbildung 8: EpCAM Protein Expression ausgewählter CrispR/Cas9 Klone.....	41
Abbildung 9: Ausgewählte Durchflusszytometrie-Profile von CrispR/Cas9 EpCAM-Knockout-Klone.	41
Abbildung 10: Quantifizierung der EpCAM-Knockout-Klone mittels Durchflusszytometrie aus 3 unabhängigen Experimenten.	42
Abbildung 11: Keine Auswirkungen des EpCAM-Knockouts auf die mRNA von Trop 2.	42
Abbildung 12: Expression von Pluripotenzmarker Oct3/4, Nanog, Sox2, ERas, Klf4 und myc in EpCAM Knockout E14TG2 α ES-Zell-Klonen.	43
Abbildung 13: Kein Einfluss des EpCAM-Knockouts auf die Transkription von Ki67 und p53 Gene.	44
Abbildung 14: Einfluss des EpCAM-Knockouts auf die Transkription von Cyclin D1 und Cyclin E-Gene.	45
Abbildung 15: Keine Auswirkungen des EpCAM-Knockouts auf die Differenzierungs-marker Afp, Foxa2 (endodermal), Nestin, Pax6 (ektodermal), Col1a1, Wt1 (mesodermal).	46
Abbildung 16: Bestimmung der Zellproliferation in E14TG2a wildtypischen Zellen und EpCAM-Knockout Klonen #114 und #149.	47
Abbildung 17: AKT-Phosphorylierung in zellulären EpCAM-Knockout Zelllinien.	48
Abbildung 18: Bestimmung der Kontraktion von Embryoid Bodies in E14TG2 α ESC und EpCAM-Knockout-Zelllinien #114, #134, #149.	49
Abbildung 19: Oct3/4 und ERas Expression in Embryoid Bodies an Tag 10 in Abhängigkeit vom EpCAM Level.	51
Abbildung 20: Unterschiede im Ki67 und Cyclin D Level in den Embryoid Bodies an Tag 10. ..	52
Abbildung 21: Expressionsmuster von endo-, meso- und ektodermalen Markern in Embryoid Bodies an Tag 10.	53
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung des EpCAM Proteins in Embryoid Bodies verschiedener Differenzierungsstadien.	55
Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin in der Kultur pluripotenter embryonaler Stammzellen und in Embryoid Bodies an Tag 3	56
Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin in Embryoid Bodies an Tag 7 und 21 der Differenzierung.....	57
Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Foxa2 in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.....	58
Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Nestin in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.....	59
Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von Differenzierungsmarkern in Knockout Embryoid Bodies am Tag 21.....	60

Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und CK8/18 in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.....	61
Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von CK 8/18 in EpCAM positiven und negativen Embryoid Bodies an Tag 21.	62
Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Pan-CK in EpCAM- positiven und negativen Embryoid Bodies an Tag 21.	63
Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von PanCK in EpCAM-positiven und -negativen Embryoid Bodies an Tag 21.	63
Abbildung 32: Konzept der EpCAM Expressions-Balance während der Differenzierung.....	64
Abbildung 33: Kardiomyozytäre Differenzierung von EpCAM-negativen ESC Klonen nach Kultivierung in konditionierten Kulturüberständen von EpCAM-positiven ESC Klonen.	66
Abbildung 34: Embryoid Bodies aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen im Verhältnis 1:1, 4:1 und 1:4.....	67
Abbildung 35: Embryoid Bodies aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen im Verhältnis 1:1 und 4:1.....	68
Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kontroll Embryoid Bodies kontrahierend #9 mCherry (A) und nicht kontrahierend #149 GFP (B) des Mischversuchs.....	69
Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Einstellungskontrollen anhand des kontrahierenden Embryoid Body #9 mCherry (A) und einem kontrahierender WT Embryoid Body Tag 8 (B).	70
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der gemischten Embryoid Bodies aus #149 GFP und #9 mCherry.....	71
Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Einstellungskontrollen der gemischten Embryoid Bodies #149 GFP und #9 mCherry: (A) und (B).....	72
Abbildung 40: Gewicht der Δ pCAG, EpCAM, ERas, #114 und #149 Teratome dargestellt im Punktdiagramm (Experiment 1).	73
Abbildung 41: Gewicht der Teratome gebildet aus der Kontrollzelllinie Δ pCAG, WT und #9, sowie den Überexpressions-Zelllinien EpCAM und ERas und den Knockout Zelllinien #114 und #149 dargestellt im Punktdiagramm (Experiment 2).....	74
Abbildung 42: Makroskopischer Aspekt der Teratome von Maus 3 bis 8 auf Millimeterpapier (Experiment 1).....	75
Abbildung 43: Gemittelte Gewichte der Teratome der Zelllinien Δ pCAG, EpCAMTF und FlagERas (Experiment 1).	76
Abbildung 44: Teratome von Maus 1,2, 9 und 10 auf Millimeterpapier (Experiment 2).....	76
Abbildung 45: Gemittelte Gewichte der Teratome aus WT, Δ pCAG, EpCAM TF und Flag ERas Zellen (Experiment 2).....	77
Abbildung 46: Teratomgröße der EpCAM-Knockout Zelllinien auf Millimeterpapier (Experiment 1).....	77
Abbildung 47: Gemitteltes Teratombgewicht von Δ pCAG, #114, #149 (Experiment 1).	78
Abbildung 48: Teratomgröße der EpCAM-Knockout Zelllinien auf Millimeterpapier (Experiment 2).....	78
Abbildung 49: Gemitteltes Gewicht der Teratome der Zelllinien WT, #9, #114 und #149 (Experiment 2).....	79
Abbildung 50: Immunhistochemische Färbung der Teratome von FlagERas und EpCAM TF auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1).	80
Abbildung 51: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #114 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, zweifache Vergrößerung).....	81
Abbildung 52: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #114 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, 10x und 20x Vergrößerung).	82

Abbildung 53: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #149 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, Vergrößerung x2).....	82
Abbildung 54: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #149 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, 10x und 20x Vergrößerung).	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Kits	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3: Geräte.....	20
Tabelle 4: Primärantikörper	21
Tabelle 5: Sekundärantikörper.....	21
Tabelle 6: Primer der qPCR.....	22
Tabelle 7: Plasmide	23
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 9: Reaktionsansatz der quantitativen PCR.....	29
Tabelle 10: Protokoll der quantitativen PCR	30
Tabelle 11: Aufführung der weiterverwendeten Klone nach erster FACS-Selektion.....	40

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Basen
BMP	Bone Morphogenic Protein
CAA	cardiac actin
cDNA	Komplementäre DNA
CK	Cytokeratin
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
CTCs	zirkulierende Tumorzellen
DTCs	disseminierte Tumorzellen
d	Tag
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EB	Embryoid Bodies
EC-Zellen	Embryonale Karzinomzellen
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMT	Epitheliale zu mesenchymaler Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ESC	Embryonic stem cells
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
Gusb	Glucoronidase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	Horse Radish Peroxidase
IB	Immunoblot/ Western Blot
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
μ	Mikro
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten Ribonukleinsäure)
Oct3/4	octamer binding protein
Pan CK	Pan Zytokeratin

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSEA-1	Stage-specific embryonic antigen-1
T	Brachyury
Taq	Thermus aquaticus
TF	Tev-Flag
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

Der deutsche Biologe Ernst Haeckel erwähnte erstmals im späten 19. Jahrhundert den Begriff Stammzelle, um zu erklären, wie aus einem unizellulären Organismus ein vielzelliger entsteht. Er ließ sich in seiner Begriffswahl von der Darstellung von Familienverhältnissen durch Stammbäume inspirieren (Ramalho-Santos et al. 2007). Damals wurden fundamentale Fragen zur Entstehung der Blutzellen oder der Unterscheidung von Keimzellen und somatischen Zellen aufgeworfen, die auch heute Gegenstand vielgestalteter Forschung sind. Die Kultivierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen *in vitro* ermöglicht eine vereinfachte Erforschung an Embryogenese (Nishikawa et al. 2007). Durch Variation der Kulturbedingungen und der genetischen Eigenschaften der Stammzellen kann der Prozess der frühen Entwicklung beeinflusst werden (Dushnik-Levinson und Benvenisty 1995). Stammzellen sind fähig, durch Differenzierung zu Zellen eines bestimmten Gewebes zu reifen. Dadurch würden sich Stammzellen als Mittel zur therapeutischen Behandlung von bisher irreversiblen Schäden wie zum Beispiel zur Regeneration von Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt (Addis und Epstein 2013) eignen. Auch der Ersatz von dopaminergen Neuronen durch in Kultur aus Stammzellen entstandenen Zellen bei Parkinson-Patienten wären eine mögliche Anwendung (Freed 2002). Wenn embryonale Stammzellen (ES-Zellen) jedoch subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert werden, bilden sie Teratome, Tumore, die aus Zellen der drei Differenzierungskeimblätter bestehen (Takahashi et al. 2007). In ihrer Tumorigenität *in vivo* weisen sie Gemeinsamkeiten mit Tumorzellen auf (Reya et al. 2001). Wieso sich ES-Zellen ohne Chromosomenfehler tumorähnlich verhalten, ist unklar. Ihre Tumorigenität stellt jedoch ein Risiko bei einem möglichen Stammzelleinsatz im Menschen dar (Lee et al. 2013). Um also Stammzelltherapien zu entwickeln, ist es essentiell, die Vorgänge der Selbsterneuerungseigenschaft und Differenzierung von Stammzellen in ihrem Kern zu verstehen und ihre transkriptionellen Programme zu erforschen (Wong et al. 2008).

1.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen weisen obligatorische Eigenschaften auf, die sie als wenige undifferenzierte Vorläuferzellen befähigen, sich zu spezialisierten Gewebeverbände zu entwickeln. Aus

diesen entstehen anschließend hochdifferenzierte Organe, die ideal an ihre Aufgaben und Umgebungen angepasst sind.

Als undifferenzierte Zellen sind ES-Zellen unter bestimmten Bedingungen *in vivo* und in Zellkultur fähig, sich unbegrenzt zu teilen und zu vermehren (Wobus et al. 2005). Ihre Teilung kann *in vivo* asymmetrisch verlaufen, was bedeutet, dass eine Zelle zu zwei morphologisch unterschiedlichen Zellen wird, eine, die für die weitere Aufrechterhaltung eines Pools an ES-Zellen verantwortlich ist und eine andere, die zu differenzieren beginnt (Stevens und Little 1954). In Kultur teilen sich ES-Zellen symmetrisch, sie sind fähig, sich in zwei identische ES-Zellen zu teilen, ohne dass sich eine der beiden verändert und differenziert (Chambers und Smith 2004). Diese Eigenschaft wird Selbsterneuerung genannt.

Neben diesem Merkmal besitzen sie die Fähigkeit, in die drei verschiedenen Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm und zu Zellen der Keimbahn zu differenzieren, abhängig davon, an welcher Stelle sie sich im ausdifferenzierenden Embryo befinden (Wobus et al. 2005). Die Eigenschaft, in jede beliebige Körperzelle differenzieren zu können, wird Pluripotenz genannt. Dieser Begriff ist von der Totipotenz abzugrenzen, welche die Fähigkeit bezeichnet, sowohl zu den drei Keimblättern und damit zum Embryo als auch zum zur vollständigen Embryogenese benötigten extraembryonalen Gewebe zu werden (Condic 2014).

Neben ES-Zellen gibt es auch gewebsspezifische adulte somatische Stammzellen, die in den Organen zu finden sind, die bis zu einem gewissen Grad zu einer Selbsterneuerung fähig sind. Solche Zellen werden als multipotent bezeichnet (Chambers und Smith 2004). Die Unterscheidung von Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind insofern interessant, wenn man sich bewusstmacht, wie sie zusammenhängen. Pluripotenz bedeutet, dass die Zellen zu allen drei Keimblättern differenzieren können. Die Fähigkeit der Selbsterneuerung beinhaltet, dass es molekulare Mechanismen gibt, die verhindern, dass die Zellen differenzieren. Wenn Zellen nicht pluripotent sind, benötigen sie die Fähigkeit der Selbsterneuerung nicht. Wenn Zellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren haben, sind sie nicht mehr pluripotent.

In den 80er Jahren war es erstmals möglich, murine embryonale Stammzellen *in vitro* zu isolieren und zu kultivieren (Evans und Kaufmann 1981, Martin 1981). Für das Verständnis ihrer Herkunft ist die Kenntnis über die frühe Embryonalentwicklung der Maus erforderlich. Der Weg von einer befruchteten Eizelle zum Embryo ist

gekennzeichnet von einer fein regulierten Spezifizierung in die Keimblätter und die gleichzeitige Entstehung von embryonalen Achsen (Takaoka und Hamada 2012).

Nach der Verschmelzung der Samen- und Eizelle beginnt die befruchtete Eizelle, auch Zygote genannt, sich zu teilen. Über das Zwei-, Vier- und Achtzellstadium erreicht die Zygote letztendlich das Morulastadium, in dem die 16 entstandenen Zellen noch totipotent sind (Wobus und Boheler 2005). Nach circa 3,5 Tagen ist das Blastozystenstadium erreicht, Zellen im Inneren der Morula werden zur Inneren Zellmasse und die polarisierten äußeren Zellen zum Trophoektoderm (Jedrusik et al. 2005). Durch den Einstrom von Flüssigkeit bildet sich eine Kavität, es kommt zur Asymmetrie innerhalb der Blastozyste, da die Innere Zellmasse an nur einer Seite des Trophoektoderms anliegt. Dieser Prozess wird Kavitation genannt und führt zur Bildung einer der essentiellen Achsen im Embryo (Saiz and Plusa 2013). Die Expression der Gene und Transkriptionsfaktoren *Octamer binding protein 3/4* (Oct3/4) und Nanog ist mit der Differenzierung zur Inneren Zellmasse verbunden. Genexpressionsänderungen werden häufig durch Histonmodifikationen erreicht, wie zum Beispiel *H4K8ac* (Acetylierung von Lysin 8 des Histons H4) oder *H3K4me3* (Trimethylierung von Lysin 4 des Histons H3), die mit aktivem Chromatin verbunden sind und die in den Zellen der Inneren Zellmasse an der Promoter Region von Oct3/4 stattfinden (Takaoka und Hamada 2012).

Embryonale Stammzellen wurden aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert (Evans und Kaufmann 1981). Sobald diese Zellen in die Blastozyste im Uterus einer Maus injiziert werden, beteiligen sich die Stammzellen mit ihrem Erbgut am Embryo, wodurch eine chimäre Maus entsteht (Bradley et al. 1984).

Aus der Inneren Zellmasse entstehen der Epiblast und das primitive Endoderm. Zu Beginn überlappen sich die Expression von Genen wie GATA6, Sox17, Nanog, Sox2 und Oct3/4, im Übergang von der frühen zur späten Blastozyste kommt es zu einer strikten Trennung von Epiblast Zellen, die Nanog exprimieren und primitiven Endodermzellen, die Gata6 und Sox17 exprimieren (Saiz and Plusa 2013). Sie sind anfänglich „wie Salz und Pfeffer“ in der Inneren Zellmasse verstreut und sortieren sich anschließend in zwei Kompartimente (Saiz and Plusa 2013). Der darauffolgende Umstrukturierungsprozess wird Gastrulation genannt und ist die Grundlage für die Bildung der drei Keimblätter: dem Ekto-, dem Endo- und dem Mesoderm. Aus dem Trophoektoderm entsteht unter anderem extraembryonales Ektoderm, aus dem primitiven Endoderm das viszerale und parietale Endoderm. Extraembryonales Ektoderm und viszerales Endoderm umgeben den Epiblasten, vor allem das viszerale Endoderm dient als Quelle für

Kommunikationssignale, die zur Strukturierung des Embryos führen, wie die anterior-posteriore Ausrichtung. Dieser Einfluss von extraembryonalem Gewebe auf die Embryogenese ist von besonderer Wichtigkeit in der Entwicklung der Säugetiere (Tam und Loebel 2007). Ungefähr an Tag 6 wandern Zellen des Epiblasten zum posterioren proximalen Pol des Embryos und formen den Primitivstreifen. Durch epitheliale-mesenchymale Transition entsteht aus diesen eingewanderten Zellen unter anderem frühes Mesoderm unter Einfluss von *Bone Morphogenic Protein* (BMP) Signalen des extraembryonalen Endoderms, Nodal–SMAD2 and SMAD3 und kanonischen Wnt Signalen aus dem Epiblast (Arnold und Robertson 2009). Verschiedene interdependente Signalwege sind an diesen Strukturierungen und Aufteilungen in verschiedene Zelltypen während der Gastrulation beteiligt. Es ist daher eine besondere Herausforderung, ein ganzheitliches Verständnis der Wege der Regulation der Embryogenese zu erhalten (Tam und Loebel 2007).

Darüber hinaus weisen embryonale Stammzellen, wie bereits erwähnt, teratogenes Potential auf. Wenn sie zum Beispiel in die Nierenkapsel oder Unterhaut einer immunsupprimierten Maus eingebracht werden, bilden sie sogenannte benigne Teratome oder maligne Teratokarzinome (siehe Punkt 1.4). Zelllinien aus diesen Tumoren waren vor allem vor der möglichen Kultivierung von ES-Zellen für die Erforschung von Embryogenese und Differenzierung bedeutsam. Doch murine ES-Zellen weisen einen normalen und stabilen Karyotyp auf, der auch nach längeren Generationszeiten stabil bleibt. Charakteristisch ist auch die kurze Generationszeit von 12-15 Stunden mit einer verkürzten G1-Zellzyklus Phase (Coronado et al. 2012).

Zur Kultivierung von ES-Zellen werden diese auf mitotisch inaktiven Fibroblasten gezüchtet. Dieser sogenannte Feederlayer gibt den für die Pluripotenz von murinen Stammzellen essentiellen *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) ab (Smith et. al 1991, Williams et al. 1988), den man auch dem Medium zugeben kann, um auf die Fibroblasten zu verzichten. LIF als Mitglied der Interleukin-6-Familie bindet an den LIF-Rezeptor an der Zellmembran und aktiviert dadurch den *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT-3), der nach Dimerisierung und Phosphorylierung als Transkriptionsfaktor in den Zellkern translokiert und an der Aktivierung und Regulierung von Pluripotenz-spezifischen Genen beteiligt ist. Unter serumfreien Bedingungen ist der LIF-Signalweg nicht funktionell (Wobus und Boheler 2005), doch die Zugabe von BMP4, zugehörig zur *transforming growth factor β* (TGF β) Superfamilie, ermöglicht LIF die Aufrechterhaltung

der Pluripotenz *in vitro*, indem es die Expression von *inhibitor of differentiation* (Id)-Genen via dem Smad Signalweg reguliert (Ying et al. 2003).

Am undifferenzierten Phänotyp der Stammzellen sind noch weitere Signalwege beteiligt wie der Wnt/ β catenin/TCF, der exogen aktiviert die Pluripotenz aufrechterhält (Okita und Yamanaka 2006). Die charakteristischen Proteine solcher Signalwege dienen auch als Marker für embryonale Stammzellen, wie zum Beispiel das *Stage-specific embryonic antigen-1* (SSEA-1) als spezifisches Oberflächenglykoprotein (Solter und Knowles 1978) oder die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Telomerase (Wobus et al. 1984, Boiani and Scholer 2005).

Neben diesen extrinsischen Faktoren gibt es verschiedene transkriptionelle Faktoren wie Oct3/4 (Schöler et al. 1989), STAT-3 (Matsuda et al. 1999), Klf4 (Li et al. 2005), c-myc (Cartwright et al. 2005) und Nanog (Chamber et al. 2003), die eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz spielen. Dies konnte 2006 von Takahashi und Yamanaka auf ungewöhnliche Art bekräftigt werden, indem sie murine Fibroblasten durch Reprogrammierung von Oct3/4, Sox2, c-myc und Klf4 in induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) umwandelten (Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi et al. 2007a, Takahashi et al. 2007b). iPSC schufen neue Möglichkeiten für die regenerative Medizin, ohne die ethischen Bedenken, die die Verwendung von humanen ES-Zellen mit sich bringt. Problematisch dabei ist die onkogene Wirkung von Reprogrammierungsfaktoren wie c-myc oder Klf4. Auch Oct3/4 hat, in somatischen Zellen exprimiert, onkogenes Potential (Jaenisch and Young 2008). Deswegen ist es von besonderer Bedeutung, die molekularen Ähnlichkeiten zwischen Tumor- und ES-Zellen aufzudecken. Auch dem murinen epithelialen Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) konnte eine Rolle bei der Effizienz der iPSC Generierung und in der Tumorbilogie nachgewiesen werden (Huang et al. 2011, Munz et al. 2004).

1.2 EpCAM- epitheliales Zelladhäsionsmolekül

1.2.1 Struktur und Funktion von EpCAM

Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM konnte als eines der ersten tumorassoziierten Antigene identifiziert werden. Humane kolorektale Karzinomzellen wurden in Mäuse injiziert, diesen wurden Splenozyten entnommen, welche mit Myelomzellen fusioniert wurden. Die entstandenen Hybridomazellen sezernierten Antikörper gegen EpCAM (Herlyn et al. 1979).

Später wurde die Glykosylierung von EpCAM, dessen Anwesenheit auf gesundem Epithel und sein Molekulargewicht von 37 kDa nachgewiesen (Göttlinger et al. 1987). Unter dem Namen Edrecolomab wurde in einer klinischen Studie ein Antikörper gegen EpCAM zur adjuvanten Therapie von metastasierten colorektalen Karzinomen eingesetzt und daraufhin als Panorex in den Markt eingeführt (Riethmueller et al. 1994), jedoch ein Jahr später wieder vom Markt genommen, da sich die Wirksamkeit auch in Kombination mit Chemotherapie als nicht erwiesen herausstellte (Gires und Bäuerle 2010; Schmoll und Arnold 2009).

Murines und humanes EpCAM weisen dieselbe Exonstruktur auf, unterscheiden sich aber in ihrem Genlokus. Das murine EpCAM-kodierende Gen *TACSTD1* ist Mitglied der Genfamilie GA-733 und befindet sich auf dem Chromosom 17, wohingegen das humane Gen auf Chromosom 2p21 lokalisiert ist. Insgesamt neun Exons kodieren für die extrazelluläre (EpEx; Exon 2-6), die Transmembran (TMD; Exon 7) und die intrazelluläre (EpICD; Exon 8-9) Domäne. Die Extrazellulärdomäne enthält eine „Epidermal growth factor“ (EGF) -ähnliche Domäne, eine Thyroglobulin- Domäne und eine Cystein-arme Region (CAR). EpCAM ist ein Typ I-Transmembranprotein und besteht aus 314 Aminosäuren (Baeuerle und Gires 2007). Die extrazelluläre Domäne von EpCAM bildet in der natürlichen Konformation ein herzförmiges cis- Dimer (Pavšič et al. 2014).

Litvinov bezeichnete humanes EpCAM als homophiles Ca^{2+} -unabhängiges Zell-Zell-Adhäsionsmolekül. Die Adhäsionseffekte von intrazellulären Kontakten wurden in mit EpCAM transfizierten murinen Zellen, die physiologisch kaum Zell-Zell-Adhäsion aufweisen, gesehen (Litvinov et al. 1994). Unter den zahllosen Bezeichnungen für EpCAM gibt es unter anderem die „cluster of differentiation“ Nomenklatur CD 326, eine einheitliche Bezeichnung und Abkürzung als „EpCAM“ wurde zur Vermeidung von Verwechslungen angenommen (Baeuerle und Gires 2007).

Ob es eine einheitliche Funktion von EpCAM in allen Geweben, in denen es exprimiert wird, gibt, ist fraglich. In den verschiedenen Zellgeweben an verschiedenen subzellulären Kompartimenten wird EpCAM in unterschiedlicher Menge und zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. Außerdem unterliegt EpCAM komplexen posttranslationalen Modifikationen (Schnell et al. 2013). Da EpCAM mit Zellen in der Umgebung interagiert, wäre es naheliegend, dass seine Funktion abhängig vom umgebenden Zellmilieu ist (Gaiser et al. 2013).

EpCAM ist auf der basolateralen Membran von humanem und murinem Epithel (Balzar et al. 1999), endodermalen Vorläuferzellen unter anderem von Leber und Pankreas

(Schmelzer et al. 2007), humanen und murinen Stammzellen (Lu et al. 2010; Ng et al. 2009; Gonzalez et al. 2009), sowie murinen Thymozyten, antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen in unterschiedlicher Stärke exprimiert (Trzips et al. 2007). Darüberhinaus sind von inflammatorischen Prozessen betroffene Hepatozyten stark EpCAM-positiv (Breuhahn et al. 2006), sowie die Mehrheit der Karzinome (van der Gun et al. 2010) und Tumorstammzellen (Gires et al. 2009). EpCAM kann zur Isolation von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen (DTCs) verwendet werden (Gires und Stöcklein 2014; Imrich und Hachmeister et al. 2012).

Intensiv wurde die Funktion von EpCAM in Karzinomzellen erforscht. EpCAM unterliegt einer regulierten intramembranen Proteolyse (RIP), wird also ähnlich dem Notch-Rezeptor von Proteasen gespalten, wodurch das intrazelluläre EpCAM Fragment EpiCD gebildet und freigesetzt wird, welches in humanen Krebszellen über Signaltransduktion im Nukleus Proliferation anregt (Chaves-Perez et al. 2013; Maetzel et al. 2009). Darüber hinaus greift EpCAM in den Zellzyklus ein, indem es das Protoonkogen c-myc und die Cycline A und E reguliert (Münz et al. 2004).

Erstbeschriebene homophile Zell-Zell-Adhäsion wurde durch molekularbiologische Erkenntnisse über eine hemmende Modulation von E-Cadherin vermittelter Adhäsion (Litvinov et al. 1997) und eine Interaktion mit dem tight junction Protein Claudin-7 α (Ladwein et al. 2005) ergänzt. In intestinalen Epithelien rekrutiert EpCAM Claudin-7 zur Formation von funktionsfähigen tight junctions (Lei et al. 2012).

Homophile Zell-Zell-Adhäsion ist erstaunlicherweise erniedrigt, wenn EpCAM mit Claudin 7 komplexiert ist, die Zellmotilität aber- eventuell aufgrund von vermehrter Assoziation mit Aktinbündeln- erhöht (Nubel et al. 2009). Der Tumorsuppressor p53, der Wächter des Genoms, bindet an das EpCAM Gen und vermittelt invasionsfördernde Signale (Sankpal et al. 2009). EpCAM führt in Langerhans Zellen zu Migration, indem es die Adhäsion zwischen Langerhanszellen und der Epidermis verringert (Gaiser et al. 2013). Doch in Brustkrebs-Zelllinien wurde die Zellmigration betreffend gezeigt, dass ein EpCAM Knockdown mittels siRNA die Migrationsrate um 90% verringert. Zusätzlich wurde dadurch die Proliferationsrate vermindert (Osta et al. 2004). Es konnte kein Einfluss auf die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion in Karzinomzellen durch den Knockdown oder den Knockout von humanem EpCAM nachgewiesen werden (Tsaktanis et al. 2015).

Neuere Daten zeigen, dass eine niedrige EpCAM Expression mit epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) einhergeht und es wurden CTC und DTC ohne EpCAM Expression nachgewiesen (Gorges et al. 2012; Driemel et al. 2013).

Um diese kontradiktorischen Ergebnisse in Tumorzellen in Einklang zu bringen, kann das Modell von Gires und Stöcklein 2014 herangezogen werden, das ein dynamisches EpCAM Expressionslevel postuliert. Solide epitheliale Tumore sind zur Proliferationssteigerung stark EpCAM-positiv, bei Beginn der Metastasierung wird das EpCAM Level zugunsten lokaler Invasion und vasaler Migration reduziert. Um Metastasen anschließend im Gewebe zu verankern, erhöht sich die EpCAM Expression wieder (Gires und Stoecklein 2014).

Zusammenfassend lässt sich Gaber et al. heranziehen, die EpCAM keine Bedeutung als homophiles Zelladhäsionsmolekül, jedoch eine indirekte adhäsionsmodulierende Mediatorrolle zusprechen (Gaber et al. 2018). Die Art der Modulation sollte in Tumorzellen im Vergleich zur physiologischen Morpho und Organogenese unterschieden werden.

Schon 1990 wurde EpCAM eine fundamentale Bedeutung in der Entwicklung von frühem Endoderm zugewiesen (Stephan et al. 1990).

Hinsichtlich der Organogenese konnte EpCAM eine Rolle in der Pankreas Entwicklung und bei der Leber Regeneration durch Leber-Stammzellen (Cirulli et al. 1998, de Boer et al. 1999) zugewiesen werden. Da morphogenetische Veränderungen mit einer Neustrukturierung von Zellverbänden und einer folgenden Neuadhäsion einhergehen, ist es nicht überraschend, dass EpCAM eine bedeutende Funktion in der Differenzierung einnimmt. Meist findet diese Bewegung in Zellverbänden statt (Lecuit 2005).

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein morphogenetisches Programm, das ermöglicht, dass aus streng lokalisierten epithelialen Zellen individuell wandernde mesenchymale Zellen werden (Montell 2008). So spielt EpCAM auch bei der Migration, die die Neustrukturierung von Zellverbänden während der Entwicklung ermöglicht, eine Rolle. Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* reguliert EpCAM die morphogenetische Wanderung durch die Repression einer Subgruppe der Proteinkinase C Familie (Maghzal et al. 2013). Während der endodermalen Entwicklung der Leber des Zebrafischs wird das kanonische Wnt2bb-Signaling von der extrazellulären Domäne von EpCAM aktiviert, indem es Lrp6 an der Zellmembran stabilisiert, was über beta-catenin den Wnt2bb Weg mitinduziert (Lu et al. 2013). Über die Bedeutung von EpCAM in Stammzellen von Säugetieren ist bisher wenig publiziert.

Schon in der frühesten Entwicklungsphase, wie der fertilisierten Oozyte und den darauffolgenden frühen Teilungsphasen, wird EpCAM im embryonalen Rattengewebe exprimiert. Jedoch sind nicht alle Zellen der Morula EpCAM-positiv und die

Expressionsstärke der EpCAM-positiven Zellen variiert stark (Tarmann et al. 1990). Wieso es diese Unterschiede in der EpCAM Expression an sich und der Expressionsstärke in den ersten Tagen der Säugetierentwicklung gibt, ist nicht klar. Keimzellen, murine als auch humane embryonale Stammzellen exprimieren EpCAM an ihrer Zellmembran (Andersson 1999; Gonzalez et al. 2009; Lu et al. 2010). Lu *et al.*, Ng *et al.* und Gonzalez *et al.* postulieren, dass EpCAM eine Aufgabe bei der Aufrechterhaltung des pluripotenten Phänotyps durch epigenetische Modifikationen erfüllt. Im Hinblick weiterer zugrundeliegender zellulärer Mechanismen ist jedoch wenig bekannt.

1.2.2 Bedeutung von EpCAM für die murine Embryonalentwicklung und den Phänotyp von ES-Zellen

Zur Untersuchung der Bedeutung von EpCAM während der Embryonalentwicklung *in vivo* sind bis dato drei EpCAM-Knockout Maus Modelle publiziert. Diese präsentieren kontradiktorische Ergebnisse. Das homozygote EpCAM-Knockout Mausmodell von Nagao *et al.* ergab einen embryonal letalen Phänotyp zwischen Tag 10.5 und 11.5. Ein Grund hierfür könnte die Fehlfunktion der Plazenta sein, welche Störungen wie zum Beispiel eine verminderte Menge an parietalen Trophoblastriesenzellen aufwies (Nagao et al. 2009). Dies konnte durch Lei *et al.* nicht beobachtet werden. Die EpCAM-Knockoutmäuse waren bis zu 10 Tage überlebensfähig, wiesen jedoch eine intestinale Fehlfunktion auf. Unter anderem war das für tight junctions wichtige Claudin 7 in den intestinalen Epithelien kaum nachweisbar. Die E-Cadherin Expression jedoch war vom EpCAM-Knockout unbeeinflusst (Lei et al. 2012). Auch die Knockoutmäuse von Guerra *et al.* waren vier Tage überlebensfähig, starben aber daraufhin an der *congenital tufting enteropathy* CTF (Guerra et al. 2012), deren Entstehung auch bei Menschen auf fehlendes humanes EpCAM zurückgeführt wird (Sivagnanam et al. 2008). Als molekularen Hintergrund führten die Autoren die Fehlexpression von E-Cadherin an, das anstatt basolateral zytoplasmatisch exprimiert wurde. Diese Knockoutmodelle sprechen für eine Rolle von EpCAM während der Embryonalentwicklung, die nicht als essentiell, doch als modulierend angesehen werden kann. Da die homozygoten Knockoutmutanten jedoch aus heterozygoten Elterntieren entstanden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine maternale Übergabe von EpCAM einen embryonal letalen Phänotyp verhindert. Diese Möglichkeit wurde jedoch von Nagao *et al.* nicht experimentell untersucht.

Das Expressionsmuster und die Bedeutung von EpCAM für den pluripotenten Phänotyp von murinen embryonalen Stammzellen konnte von Gonzalez *et al.* gezeigt werden. Doch im Laufe der Entwicklung wird EpCAM herunterreguliert (Gonzalez *et al.* 2009), wie schon in den Beispielen der Organogenese aufgezeigt: In Pankreasvorläuferzellen wird EpCAM am stärksten in den sich entwickelnden Pankreasinselzellen exprimiert, im ausgereiften Pankreas jedoch in den dukталen Gängen (Cirulli *et al.* 1998). Außerdem ist eine partielle Expression auf bestimmten Zellverbänden auch immunhistochemisch durch die Expression von EpCAM in sich entwickelnden Nieren sichtbar (Trzpis *et al.* 2007). EpCAMs Expression in der Morphogenese unterliegt also dynamischen Änderungen. Daraus ergibt sich die Frage, wieso und auf welche Weise EpCAM auf gewissen Zellen herunterreguliert wird, doch in anderen noch weiter exprimiert wird.

In vorangegangenen Arbeiten konnte eine vor allem an Tag 5 der dreidimensionalen Differenzierung in Sphäroid-ähnlichen Embryoid Bodies stattfindende Reduktion der EpCAM Expression in murinen ES-Zellen nachgewiesen werden (Unv. Diss. Sarrach 2013). Ähnlich wie bei der Entwicklung von EpCAM-positiven humanen hepatischen Stammzellen zu EpCAM-negativen Hepatozyten (Schmelzer *et al.* 2007) wird EpCAM im Laufe der Differenzierung herunterreguliert.

An Tag 10 war die Membranexpression von EpCAM auf die Oberfläche von Embryoid Bodies begrenzt. Als Ursache dieser Reduktion konnten epigenetische Modifikationen des Histons 3 und eine verminderte Bindung der Polymerase II an den EpCAM Promotor ausgemacht werden. Dieses Expressionsmuster zeigte sich auch in murinen Embryonen. Auch Oct3, SSEA-1, Cyclin D1 und p53 wurde im Laufe der Differenzierung herunterreguliert (Unv. Diss. Sarrach 2013). Die Expression von dem mesodermalen Marker Vimentin und EpCAM schlossen sich in den gefärbten Embryoid Bodies an (Sarrach *et al.* 2018).

Um einen Einfluss einer ektopischen Expression von EpCAM auf die Differenzierung zu analysieren, wurde EpCAM in E14TG2 α ES-Zellen überexprimiert und Effekte auf die Morphologie und die Differenzierung untersucht. Diese Überexpression hatte keinen Effekt auf die Morphologie der Embryoid Bodies. Auch Cyclin D1, p53 und Ki67 Expression zeigte keine Veränderung zum Wildtyp. Doch die Überexpression von EpCAM bewirkte eine deutlich verzögerte Induktion von kontraktile Bereiche. Diese kontraktile Bereiche entstehen durch die mesodermale Differenzierung von ES-Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten. Im Einklang mit diesem Ergebnis wies das fötale murine Herz keine EpCAM Expression auf (Unv. Diss. Sarrach 2013).

Die Differenzierung in die drei Keimblätter betreffend konnte eine Erhöhung der endodermalen Marker Afp, Foxa2 und Gata4 nachgewiesen werden, weshalb von einer induzierenden Wirkung von EpCAM auf die endodermal-gerichtete Entwicklung der Zellen ausgegangen werden kann (Unv. Diss. Sarrach 2013).

Eine nukleäre Translokation von EpICD wurde in murinen Stammzellen nicht abschließend nachgewiesen, es wurde schnell und effektiv durch das Proteasom abgebaut, weswegen sich weitere ES-Zell-Untersuchungen auf die Rolle von ungespaltenem EpCAM fokussierten (Unv. Diss. Hachmeister 2014).

1.2.3 Interaktionspartner von EpCAM in murinen Teratokarzinomzellen

In vorherigen Arbeiten wurde in der Arbeitsgruppe das embryonale G-Protein ERas in einem SILAC-Screen von murinen F9-Zellen als Interaktionspartner von EpCAM identifiziert. Dies wurde durch eine Co-Immunopräzipitation bestätigt (Unv. Diss. Hachmeister 2014).

Kleine monomere G-Proteine befinden sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran und enthalten Guanosindiphosphat (GDP), wenn sie inaktiv sind. Nach einer Aktivierung, meist durch einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, löst sich GDP und Guanosintriphosphat (GTP) kann binden. Durch seine intrinsische GTPase-Aktivität kann das G-Protein GTP dephosphorylieren, wodurch die energiereiche Phosphatbindung gespalten wird. Somit erfüllen G-Proteine in der Zelle die Funktion eines molekularen Schalters, der im Rahmen der Signaltransduktion exogene Signale in die Zelle weiterleiten kann (Takai et al. 2001).

ERas wurde 2003 von Takahashi in murinen embryonalen Stammzellen entdeckt, wie sein humanes Ortholog HRas, das aber aufgrund einer vorzeitigen Polyadenylierung nur eine verkürzte Version des Proteins transkribiert (Kameda und Thomson 2005). Murines ERas besteht aus 227 Aminosäuren, ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und hat eine 43% Homologie zum „Harvey rat sarcoma viral oncogene“ Homolog HRas, 46% zu „Kirsten rat sarcoma viral oncogene“ Homolog KRas und eine 47% Übereinstimmung zum „Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene“ Homolog NRas. ERas Knockout Mäuse sind überlebensfähig und fertil. Das Protein ist nicht in differenzierten Geweben exprimiert (Takahashi et al. 2003), jedoch in humanen Karzinomen. Es konnte in Kolon, Pankreas-, und Brustkarzinomen nachgewiesen werden (Yasuda et al. 2007). Ein möglicher Mechanismus, das epigenetische „silencing“ des humanen ERas Proteins zu überwinden, ist die Histonacetylierung (Yasuda et al. 2007). Kaizaki *et al.* fand ERas in Magenkarzinomen, von den untersuchten Tumoren waren 44% ERas positiv und ERas

spielte eine Rolle in der Onkogenese (Kaizaki et al. 2009). Dies konnte von Liu und Kollegen bestätigt werden. Indem ein ERas Knockout in verschiedenen Zelllinien aus Magenkarzinomen erzeugt wurde, ergab sich eine verringerte Proliferation (Liu et al. 2013). ERas ist außerdem mit der Bildung von Lebermetastasen assoziiert. Dies wurde auf eine Unterdrückung der E-Cadherin Expression zurückgeführt (Kubota et al. 2010). ERas ist eine konstitutiv aktive GTPase ohne „gain of function“ Mutation, die bei exogener Überexpression die Proliferation von ES-Zellen anregt (Takahashi et al. 2003). Jedoch konnte dies in ES-Zellen von Javaneraffen nicht nachgewiesen werden (Tanaka et al. 2009). ERas wird in der Plazenta von Kühen exprimiert. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten die Expression an der Plasmamembran und dem Zytoplasma von Epithelzellen des Trophoblasten (Roperto et al. 2017).

ERas interagiert nicht mit Raf oder der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskade, bindet aber an die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) (Takahashi et al. 2003). PI3-Kinasen sind Enzyme, die Phospholipide an der Plasmamembran phosphorylieren. Reguliert werden sie ähnlich wie Ras-Proteine über Wachstumsfaktoren, die an Rezeptortyrosinkinasen binden. Aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphat (PIP₃), welches als Substrat für Proteine mit Pleckstrin-homologen (PH)-Domänen wie die *Phosphoinositide-dependent* Kinasen 1 und 2 (PDK1, PDK2) und als „second messenger“ dient. Die PDK1 phosphoryliert die AKT (auch Proteinkinase B (PKB) genannt), eine Serin-Threonin-Protein Kinase, was für deren Aktivität vonnöten ist. AKT phosphoryliert und inaktiviert zum Beispiel die proapoptotischen FOXO Proteine, BAD und die Caspase 9 (Hemmings und Restuccia 2014; Armstrong et al. 2006). Der direkte Gegenspieler der PI(3)Kinase ist das Tumorsuppressorgen Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), da es PIP₃ dephosphoryliert (Stiles et al. 2002). Auf die Funktion des PI3-Kinase/AKT Signalwegs und der PTEN in ES-Zellen wird in 5.1 und 5.2 eingegangen.

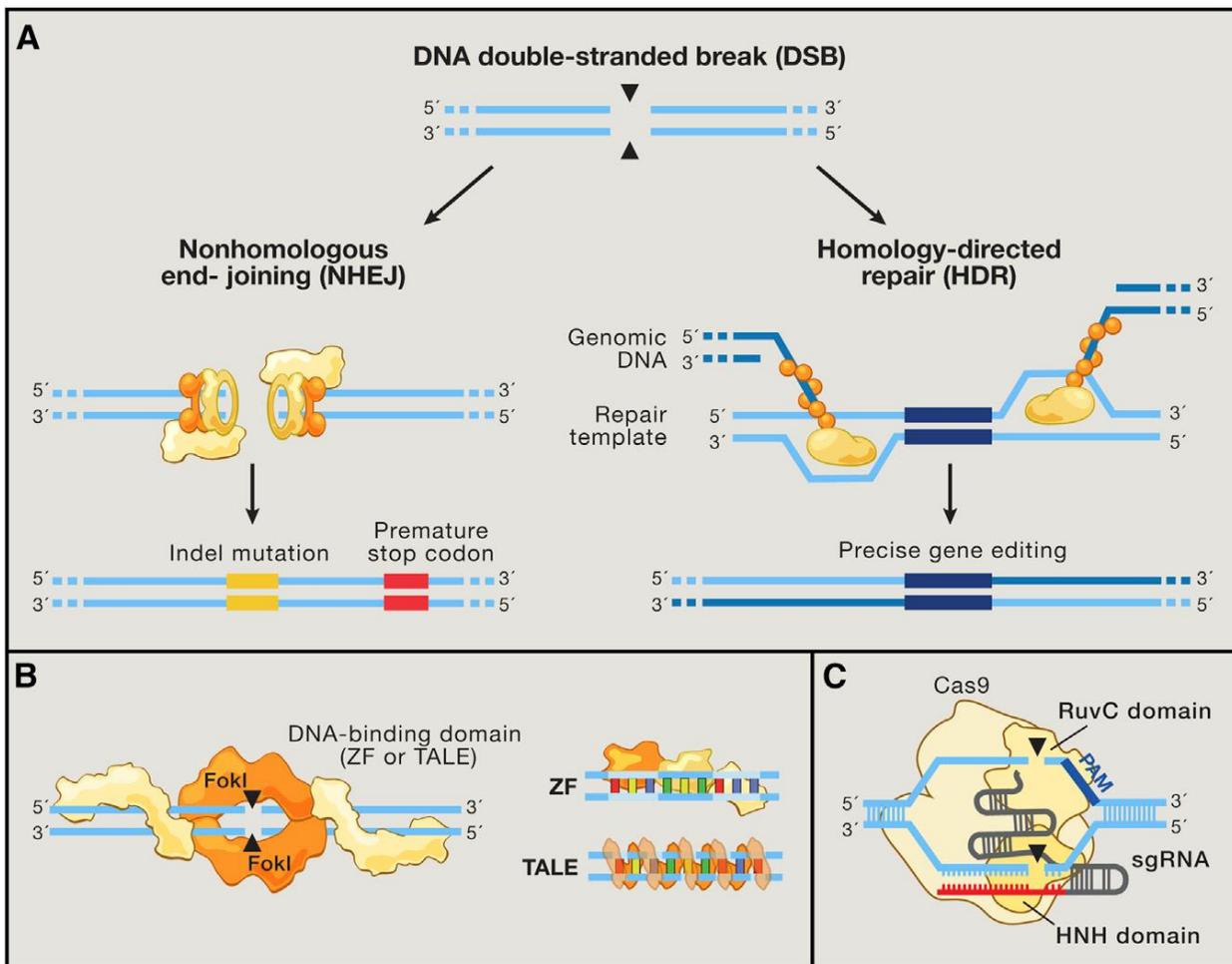
1.3 Grundlagen des Genome-Engineering-Systems CRISPR/Cas

Um die Funktion eines Gens zu entschlüsseln, ist es möglich, das Gen in Zellen oder Organismen gezielt auszuschalten. Damit lässt sich leichter entschlüsseln, welche Aufgaben diese Gene und deren Proteinprodukte in der Zelle erfüllen. Verschiedene Systeme sind anwendbar, die entweder zu einem transienten Knock-down oder zu einem

zellulären knock-out führen, je nachdem, ob die Veränderung auf mRNA- oder DNA-Ebene vorgenommen wurde.

Erste Anwendungen ermöglichten die Zinkfinger-nukleasen *ZNF* (Miller et al. 2007, Wood et al. 2011) und *transcription activator-like effector nucleases TALENs* (Christian et al. 2010). 1987 wurden repetitive Sequenzen im bakteriellen und archaellen Genom entdeckt (Ishino et al. 2018), die als ein adaptives bakterielles Immunabwehrsystem in *Streptococcus thermophilus*, das dem Prokaryoten als Phagenabwehr dient, identifiziert wurden (Barrangou et al. 2007). Nach seinem auffälligen DNA Aufbau wurde es *CRISPR-clustered regularly interspaced short palindromic repeat* genannt (Jansen et al. 2002). Im Gegensatz zu den vorherigen programmierbaren Nukleasen basiert CRISPR auf einer kurzen RNA-Sequenz, welche die Ziel-DNA durch komplementäre Basenpaarung nach Watson-Crick erkennt (Hsu et al. 2014). Diese Immunabwehr kann in drei unterschiedliche Typen I-III eingeteilt werden (Haft et al. 2005), wobei jede aus CRISPR-assoziierten (Cas) Genen, nichtkodierender transaktivierender RNA (tracrRNA) und repetitiven Sequenzen besteht. Die repetitiven Sequenzen werden von kurzen variablen

Abbildung 1: Molekularbiologische Funktionsweise von *genome editing* Technologien modifiziert nach Hsu et al. (2014).



(A) Die fehleranfälligeren *Non homologous end-joining* (NHEJ) Reparatur oder die homologe Reparatur (HDR) können eingefügte DNA Doppelstrangbrüche (DSBs) reparieren. Während der NHEJ binden Ku Heterodimere an die DSB-Enden und dienen als Lückenfüller für Reparaturproteine. Das kann zu Indel Mutationen (Insertionen und Deletionen) oder einem vorzeitigen Stopcodon führen, was wiederum Leserasterverschiebung oder den Gen-Knockout verursachen kann. Die alternative homologe Reparatur arbeitet mit genomischer Rekombination anhand des homologen Schwester-Chromatids. Durch Umgehung des homologen Chromosoms können präzise Gen Veränderungen vorgenommen werden. (B) Zink Finger (ZF) Proteine und *transcription activator-like effectors* (TALEs) sind von Natur aus nukleinsäurebindend und können so modifiziert werden, dass sie fusioniert mit Endonukleasen an bestimmte Genabschnitte binden und DNA spezifisch verändern. (C) Die Cas9 Nuklease aus dem adaptiven Immunsystem von Bakterien wird mithilfe ihrer guide RNA (rot) an spezifische DNA Abschnitte gebunden, das Protospacer-adjacent motif (PAM, blau) downstream vom Zielgen gewährleistet den korrekten Ansatz des von der Cas9 Nuklease durchgeführten DSB.

Sequenzen, sogenannte *protospacer*, unterbrochen und wiederholen sich nach diesen palindromisch aufgebaut. Protospacer tragen ein CRISPR-System spezifisches *protospacer adjacent motif* (PAM). Dies hat eine Bedeutung für die Generierung der Ziel-DNA, im Falle des aus *Streptococcus pyogenes* gewonnenen Cas9 Systems muss der Ziel-DNA ein 5'-NGG vorausgehen (Ran et al. 2013). Außerdem wird endogene RNase III benötigt (Deltcheva et al. 2011). Als einfach und effektiv kristallisierte sich ein auf die sequenzspezifische Nuklease Cas9 basierendes CRISPR System von Typ II heraus (Pennisi 2013).

Wenn ein Bakteriophage das Bakterium infiziert, werden seine Protospacer in die repetitiven Sequenzen des CRISPR-Lokus integriert und später samt ihren Unterbrechungen abgelesen. Das dabei entstehende RNA-Molekül hybridisiert mit der *tracrRNA* und wird anschließend von der RNase III und anderen Nukleasen in kürzere RNA-Fragmente gespalten. Die entstehenden *crRNA-tracrRNA*-Hybride interferieren komplexiert mit der Cas9-Nuklease mit der Ziel-DNA, wodurch die Nuklease die DNA in ihren zwei aktiven Zentren schneidet. Daraufhin folgt ein DNA-Doppelstrangbruch, der auf zwei verschiedene Arten repariert werden kann. Zum einen kann die fehleranfällige nichthomologe Rekombination (nichthomologes Endjoining) die beiden Enden wieder zusammenfügen. Dabei kann es durch Insertion oder Deletion (Indel-Mutation) zu einem vorzeitigen STOP-Codon oder einer Leserasterverschiebung kommen. Die dabei entstehende verkürzte mRNA wird durch Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) abgebaut. Zum anderen kann eine homologe Rekombination stattfinden, die das homologe Chromosom als Matrize benötigt, in Eukaryoten jedoch seltener (Pennisi 2013). Erstmals wurde das CRISPR System mit der Nuklease Cas9 von *Streptococcus pyogenes* SF370 mit dem Protospacer im humanen EMX1 Locus in eukaryotischen Zellen von Cong *et al.* durchgeführt (Cong et al. 2013). CRISPR/Cas9 wurde in der

vorliegenden Arbeit dazu verwendet, einen zellulären EpCAM-Knockout in murinen embryonalen Stammzellen zu generieren.

1.4 Teratome und Teratokarzinome

Keimzelltumore entstehen meist in den Gonaden (Eierstöcke und Hoden) und kommen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen vor. Bei extragonadaler Lage der Keimzelltumore geht man davon aus, dass ihr Ursprung auf versprengtes Embryonalgewebe zurückgeht (Ulbright 2005). Die größte Untergruppe dieser Tumore sind die Teratome, die Zellen aus allen drei Keimblättern enthalten. Ihr Name stammt aus dem Griechischen 'teras', = Monster, das ihre teilweise bizarre Beschaffenheit aus reifzelligem Gewebe wie Zähnen oder Haaren und unreifzelligem Gewebe anschaulich beschreibt. Teratome sind gutartige Geschwulste und werden von bösartigen Teratokarzinomen abgegrenzt (Solter 2006). Unreifzellige Teratome als Erkrankung von Menschen wurden von Norris *et al.* in ein 4-stufiges Grading System von 0-III eingeteilt, je nach Menge von primitivem Neuroepithelium im Teratom. Diese Einteilung ging mit der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung einher und hatte somit prognostische Relevanz. Ein Teratom der Stufe 0 ist benigne und geht mit einer Überlebensrate von 100% einher, ein Teratom der Stufe III besteht beinahe ausschließlich aus primitiven Gewebe und reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 33% (Norris *et al.* 1976). Teratome, die in Menschen entstehen, tragen Gendefekte in sich (Lensch *et al.* 2007). In Tieren sind Teratome äußerst selten, was ihre Erforschung schwierig gestaltete (Solter 2006). Jedoch beschrieben Stevens und Little 1954 eine Mauslinie, in der sich bei circa 1% der männlichen Mäuse im Hoden spontan Teratomen bildeten (Stevens und Little 1954). Diese spontan gebildeten Teratomzellen konnten in andere Körperstellen transplantiert werden, zeigten jedoch fast alle kein übermäßiges Wachstum. Von Teratomen aus Ovarien war bekannt, dass gewisse Teratomzellen bei Injektion subkutan oder intraperitoneal ein starkes Wachstum aufwiesen, was Stevens und Little auf eine große undifferenzierte, sich stark teilende Zellpopulation zurückführten, die in den spontan entstandenen Hodenteratomen der Mauslinie nur in einem einzigen Fall vorhanden war. In allen Teratomen befanden sich außerdem differenzierte Zellen der drei Keimblätter. Stevens und Little unterstützten die damals aufgekommene Theorie, dass in den Teratomen sogenannte pluripotente embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen) vorhanden sind, die die Vorläufer für die Teratogenese sind. Durch die Etablierung von EC-Zelllinien,

die *in vitro* kultiviert werden konnten, wurde der Grundstein für die *in vitro* Forschung von pluripotenten Zellen gelegt.

EC-Zellen zeigen starke Ähnlichkeiten zu ES-Zellen. Erstaunlicherweise können EC-Zellen ihre Malignität durch *in vivo* Differenzierung verlieren. Stevens ging davon aus, dass EC-Zellen aus Keimzelllinien entstehen, die dann wiederum zu Teratomen werden. Im Verlauf bilden sich aus den EC-Zellen entweder hauptsächlich differenzierte Zellen, was zu benignen Teratomen führt, oder es bilden sich Teratokarzinome, die sowohl aus differenzierten Zellen als auch aus einer großen Menge an EC-Zellen mit hoher Proliferationsrate bestehen. Wenn EC-Zellen reimplantiert werden, können sich wieder Teratome oder Teratokarzinome bilden. Die EC-Zellen formieren sich als in der Literatur verwirrenderweise auch als Embryoid Bodies bezeichnete Zellstrukturen und sind von einer Schicht endodermaler Zellen umgeben (Martin 1975). So wurde erkannt, dass sich EC-Zellen aus ES-Zellen entwickeln (Solter 2006). Die Erforschung der EC-Zellen gipfelte in den Versuchen, aus EC-Zellen chimäre Mäuse zu entwickeln, was ein Beweis für die Umkehrbarkeit ihrer Malignität gewesen wäre. Aus diesen Versuchen ergaben sich kontradiktorische Ergebnisse, auch hinsichtlich der Frage, ob alle EC-Zellen Veränderungen in ihrem Karyotyp aufweisen. Mit der Etablierung von ES-Zelllinien (Dushnik-Levinson und Benvenisty 1995) verlor die Arbeit mit EC-Zellen an Stellenwert (Solter 2006).

Die Bildung von Teratomen oder Teratokarzinomen durch Implantation von ES-Zellen in immunsupprimierte Mäuse bewirkt eine Differenzierung in die drei Keimblätter, dies wird als Beweis für die Pluripotenz der implantierten Zellen verwendet (Aleckovic 2008). Durch die genauere Analyse der entstandenen Teratome erhofft man sich einen Einblick in die Differenzierung von ES-Zellen und die Entstehung von Geweben *in vivo* zu bekommen, um neue Erkenntnisse bezüglich Tumorentstehung oder der Züchtung spezifischer Gewebe zu erhalten. Da EpCAM in Karzinomzellen onkogenes Potential aufweist (Maetzel et al. 2009), wäre es interessant zu wissen, ob EpCAM auch eine Rolle bei der Teratogenität von ES-Zellen erfüllt. Im Folgenden werden die durch Injektion von murinen ES-Zellen gebildeten Tumore Teratokarzinome genannt.

1.5 Zielsetzung

Für die ES-Zellforschung und die regenerative Forschung ist EpCAM aufgrund der starken Expression auf embryonalen Stammzellen, der Herunterregulierung während der frühen Embryonalentwicklung und dessen Funktion für die Regeneration von adultem Gewebe von entscheidender Bedeutung. Im Hinblick auf den möglichen zukünftigen Einsatz von Stammzelltherapien zum Beispiel durch induzierte pluripotente Stammzellen, die aus patienteneigenen Körperzellen gewonnen werden, ist es essentiell, alle beteiligten Faktoren der Differenzierung und Reprogrammierung zu erforschen.

Daraus ergaben sich die Ziele dieser Arbeit:

- Untersuchung des Einflusses des EpCAM-ERas-AKT Signalwegs auf Pluripotenz und Differenzierung
- Molekulare Analyse eines potentiellen Einflusses von zellulärem EpCAM-Knockout auf Proliferation, Pluripotenz und Differenzierung
- Analyse des Einflusses von EpCAM und ERas auf die Teratombildung in Mäusen

2. Material

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 1: Chemikalien und Kits

Artikel	Hersteller
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche Mannheim
Amaya Mouse ES Cell Nucleofector Kit	Lonza, Basel (Schweiz)
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Kalifornien (USA)
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck KGaA, Darmstadt
Antikörperverdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG, Hamburg
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma (Taufkirchen)
Aqua dest.	Braun, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg
Cryomold Intermediate 4566	Sakura Finetek, Staufen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DNA Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Eosinlösung 0,5%	Apotheke Klinikum Großhadern
ESGRO® LIF	Millipore, Schwalbach
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSafe	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gelatine (Zellkultur)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycin	Serva GmbH, Heidelberg
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Hematoxylin Gill`s Formula H- 3401	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Immobilion HRP Western Substrate	Millipore, Bedford (USA)
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
Mayer`s Hämalaun Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Oligonukleotide	Metabion, International AG, Planegg

Artikel	Hersteller
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PBS Lösung	Apotheke Klinikum Großhadern
PBS-Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin Streptomycin	Biochrom, AG, Berlin
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteingrößenstandard V	Peqlab, Erlangen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Puromyzin	AppliChem GmbH, Darmstadt
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Stempan E14 GMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
TissueTek® O.C.T Compound	Sakura Finetek, Staufen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/ EDTA	Biochrom AG, Berlin
Tween	Serva GmbH, Heidelberg
Vectashield® with DAPI	Biozol GmbH, Eching
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Corning® Costar® Stripette	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Einmalglaspipetten	Costar, New York (USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Handschuhe Peha-Soft Latex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Immobilion-P Membran (0,45 µm)	Millipore, Bedford (USA)
Kryogefäße	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger „Super Frost“	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Quadriperm	Sarstedt, Nürnberg
Safe Seal Tips Professional	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reagenzreservoir	Costar, New York (USA)
Sterilfilter	Millipore, Wiesbaden
Whatman Paper 3MM	Millipore, Wiesbaden
Zellkulturflaschen und –schalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Artikel	Hersteller
Zellkulturröhrchen, steril	Falcon/BD Le Pont de Claix (F)
Zentrifugengefäße 15mL/ 50mL	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 mL/ 2mL	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße 1,5mL (Nukleasefrei)	Nunc, Wiesbaden
6-well Zellkulturplatten flach	Costar, New York (USA)
96-well Zellkulturplatten flach	Nunc, Wiesbaden
96-well Zellkulturplatten ultra-low attachment	Corning Incorporated Costar, Amsterdam

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklave-System Systec 95	Systec GmbH, Wetzlar
Gel und Western Blot Dokumentation „Chemi-Doc“ XRS	BioRad, Kalifornien (USA)
Blotting Kammer	BioRad, Richmond (USA)
Branson Sonifier W-250 D	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Durchflusszytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipette „Transferpette“	Brand GmbH, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“	Carl Zeiss AG, Jena
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kryostat Modell CM 1900	Leica, Bensheim
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Microplate Reader „MRX“	Dynatech Laboratories, Bad Nauheim
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy Comfort	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrophotometer „GeneQuantPro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Kühlsystem Flüssigstickstoff	Messer Cryotherm, Kirchen/ Sieg
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektionssystem „Nucleofector“	Amaxa, Köln
Vortex Mixer	IKA Works Inc., Wilmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 46 R	Hettich Lab technology, Tuttlingen

2.2 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
α -AKT1	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, USA
α -Aktin	Ziege polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -alpha CAA	Maus IgG1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α -Cytokeratin	polyklonal	Progen Immunodiagnostics, Deutschland
α -EpCAM	Ratte IgG2a, κ	Becton Dickinson, Heidelberg
α -ERas	Ziege polyklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -Foxa2	Kaninchen polyklonal	Novus Biologicals
α -GAPDH	Kaninchen polyklonal	Bethyl Laboratories, Montgomery (USA)
α -GFP	Maus monoklonal	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -mCherry	Maus monoklonal	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α -Nestin	Kaninchen polyklonal	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α -Pan-Keratin	Maus monoklonal	Novus Biologicals
α -phospho AKT	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, USA
α -SSEA1	Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -Vimentin	Kaninchen IgG1	Abcam, Cambridge (USA)

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Alexa 488 Ziege- α -Maus	Santa Cruz
Alexa 594 Ziege- α -Maus	Abcam
Alexa 647 Maus	Santa Cruz
Biotinylated Kaninchen- α -Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Pferd- α -Maus IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinylated Ziege- α -Kaninchen IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
FITC Ziege- α -Maus IgM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FITC-Kaninchen- α -Ratte IgG (H&L)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Isotyp Kontrolle α -Ratte IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PO Kaninchen- α -Meerschweinchen IgG	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
PO Kaninchen- α -Ziege IgG	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
PO Ziege- α -Kaninchen IgG (H&L)	Jackson Immuno Research, Newmarket (UK)

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Primer

Die Sequenzen der qPCR Primer wurden über die „Harvard PrimerBank“ erstellt und von der Firma Metabion International AD (Planegg) hergestellt.

Tabelle 6: Primer der qPCR

qPCR Primer Gen	Sequenz (5' - 3') FW/BW
AFP (Alpha-1-Fetoprotein)	CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG
AKT1	ATGAACGACGTAGCCATTGTG TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
α CAA	CTGGATTCTGGCGATGGTGTGTA CGGACAATTTACGTTTCAGCA
Col1a1 (Collagen, Typ I, alpha 1)	GCTCCTCTTAGGGGCCACT CCACGTCTCACCATTGGGG
Cyclin D1	CAGAAGTGCGAAGAGGAGGTC TCATCTTAGAGGCCACGAACAT
E- Cadherin (epitheliales Cadherin)	CAGGTCTCCTCATGGCTTTGC CTTCCGAAAAGAAGGCTGTCC
EpCAM	CAGTGTACTTCCTATGGTACACAGAATACT CTAGGCATTAAGCTCTCTGTGGATCTCACC
ERas (embryonales Ras)	TGCCTACAAAGTCTAGCATCTTG CTTTTACCAACACCACTTGAC
Foxa2 (Forkhead-Box-Protein A 2)	CCCTACGCCAACATGAACTCG GTTCTGCCGGTAGAAAGGGA
Gusb (β -Glucuronidase)	CAACCTCTGGTGGCCTTACC GGGTGTAGTAGTCAGTCACAGAC
Ki-67 (Ki = Kiel)	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT GCTCGCCTTGATGGTTCCT
Klf4	GTGCCCCGACTAACCGTTG GTCGTTGAACTCCTCGGTCT
Myc (cellular myelocytomatosis oncogene)	TGTGCTCGTCTGCTTGAATGG TCTGTGGAGAAGAGGCAAACCC
Nanog	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Nestin	GGAGAGTCGCTTAGAGGTGC GGTGGGGGTTCTGGCCTTAA
Oct3/4 (Octamer binding transcription factor 3/4)	ATCGGACCAGGCTCAGAGGTATTG GTTCTCATTGTTGTCGGCTTCC
Sox2 (sex determining region Y- box 2)	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTAACC GGAGTGGAACTTTTGTCCGAGAC
p53	CTCTCCCCCGAAAAGAAAA CGGAACATCTCGAAGCGTTTA

Pax 6 (Paired box protein 6)	ACGTATCCAACGGTTGTGTGA GGAGCCAGTCTCGTAATACCT
Trop2 (Tumor-associated calcium signal transducer 2)	AGGGGCTTGGATCTAGCAC TTGCCCGACATTGGCAGAC
Vimentin	ACCGGAGCTATGTGACCACG CAAGGATTCCACTTTCCGTTCA
WT-1 (Wilms-Tumor-Protein 1)	GAGAGCCAGCCTACCATCC GGTCCTCGTGTTTGAAGGAA

2.3.2 Plasmide

Tabelle 7: Plasmide

Plasmide	Kurzbeschreibung	Referenz
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycinresistenz	Prof. Bornkamm
141pCAG::YFP	YFP in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister
141pCAG::mCherry	mCherry in 141pCAG-3SIP	S. Sarrach
141pCAG::GFP	GFP in 141pCAG-3SIP	S. Sarrach
141pCAG::EpCAM-TF	EpCAM, Tev-Flag getagt, in 141pCAG-3SIP	M. Hachmeister
141pCAG::Flag-ERas	ERas, Flag getagt, in 141pCAG-3SIP	S. Sarrach
141pCAG::ERas-Flag	ERas, Flag getagt, in 141pCAG-3SIP	S. Sarrach
141pCAG::myrAKT1	pAKT1 myristiliert in 141pCAG-3SIP	Prof. Dieter Saur, S. Sarrach
U6gRNA-Cas9-2A-GFP 1	CrispRCas9 1: Exon 2 mit der target site GTCCCCAGGCCCTCGCGTTCCGG	Sigma Aldrich, München
U6gRNA-Cas9-2A-GFP 2	CrispRCas9 2: Exon 4 mit der target site TTGTTCTGGATCGCCCCTTCCGG	

2.4 Inhibitoren

- LY294002 von Sigma Aldrich
- Rapamycin von Sigma Aldrich
- BKM 120 von ApexBIO

2.5 Bakterienstamm

E.coli DH10B (Plasmidamplifikation)

F-, endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, ΔlacX74, Φ80lacZΔM15, araD139, Δ(ara,leu) 7697, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), λ- rpsL nupG/bMON14272/ pMON7124 von der Firma Invitrogen bezogen

2.6 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bemerkungen
E14TG2α	Wildtyp-Zelllinie murine ES-Zellen
E14TG2α-ΔpCAG*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG-3SIP
E14TG2α-EpCAM-TF*	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::EpCAM-TF
E14TG2α-ERas-Flag**	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::ERas-Flag
E14TG2α-Flag-ERas**	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::Flag-ERas
E14TG2α-myr AKT1**	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::myrAKT1
E14TG2α-CC #1-103	Transfiziert mit Vektor U6gRNA-Cas9-2A-GFP 1
E14TG2α-CC #131-153	Transfiziert mit Vektor U6gRNA-Cas9-2A-GFP 2
E14TG2α-CC#9 GFP	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::YFP
E14TG2α-CC#9 mCherry	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::mCherry
E14TG2α-CC#114 GFP	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::YFP
E14TG2α-CC#114 mCherry	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::mCherry
E14TG2α-CC #149 GFP	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::YFP
E14TG2α-CC #149 mCherry	Transfiziert mit Vektor 141pCAG::mCherry

Die Wildtyp-Zelllinie E14TG2α wurde von Dr. Markus Conrad zur Verfügung gestellt. Alle anderen Zelllinien wurden von Matthias Hachmeister (mit * gekennzeichnet) und Sannia Sarrach (mit ** gekennzeichnet) etabliert.

2.7 Medien und Puffer

2.7.1 Zellkultur

PBS: 8,0g NaCl; 0,2g KCl; 1,15g Na₂HPO₄; 0,2g KH₂PO₄ in 1l H₂O

Stempan E14 GMEM: 60000 U/mL ESGRO® LIF; FCS, L-Glutamin, 2,75g/l NaHCO₃

Einfriermedium E14: Stempan E14 GMEM; 10% DMSO

2.7.2 Bakterienkultur

LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,2

Agar-Platten: 1,5% Agar/Liter LB Medium

Antibiotikakonzentrationen: Ampicillin 50µg/mL, Kandamycin 30 µg/mL

Herstellung kompetenter Bakterien nach Hannahah (1987)

TfB I-Puffer 100mM KCl; 50mM MnCl₂; 30mM KAc; 10mM CaCl₂, 15% Glycerin; pH = 5,8

TfB II-Puffer 10mM MOPS; 10mM KCl; 75mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH 7,0

2.7.3 Proteinbiochemische Methoden

2.7.3.1 Western Blot

Lyse-Puffer:	PBS; 1% DDM; Roche Proteinase Inhibitor Cocktail Complete
Sammelgel (4%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH = 6,8; 0,5M EDTA
Trenngel (10-17%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH = 8,9; 0,5M EDTA
Lauf-Puffer:	250mM Tris, 2M Glycin, 1% SDS
Lade-Puffer (LaemmLi):	140mM Tris-HCl pH = 7,0; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% β -Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau

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

2.7.3.2 Durchflusszytometrie

Puffer:	PBS mit 5% FKS
Propidiumiodid (PI)-Färbelösung:	PBS mit 5% FKS; 1 μ g/mL Propidiumiodid

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkultivierung und- konservierung

DH10 β Bakterien wurden in Suspension in Luria Broth Medium (LB) unter Antibiotikazugabe im Schüttler (225 Upm) über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde für die Plasmidamplifikation 500 mL LB-Medium mit 1 mL der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur angeimpft. Nach erfolgter Transformation wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die Kulturen in Suspension wurden zur weiteren Konservierung mit 15% Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme wurde nach der Methode von Hanahan (1983) 200mL LB-Medium mit 5 mL der über Nacht gewachsenen Kultur angeimpft. Diese wurde circa 2 h bei 37°C geschüttelt, bis die Kultur eine optische Dichte (OD 600nm) von 0,3-0,6 erreicht hatte. Die Zellsuspension kühlte man auf Eis, um diese dann nacheinander in den Puffern TfBI und TfBII zu resuspendieren. Nach der Schockfrierung in flüssigem Stickstoff wurden die Bakterien als 200 μ L Aliquots bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation der Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Zur Einschleusung von Fremd-DNA in die Bakterien wurden 50 μ L auf Eis aufgetaute kompetente *E.coli* Bakterien mit 10 μ L Ligationsansatz (8 μ L Insert und 2 μ L Vektor) vermischt und für 30min auf Eis gekühlt. Der anschließende Hitzeschock der *E.coli* wurde für 30s bei 42°C durchgeführt und diese daraufhin wieder für 2 min auf Eis gesetzt. Nach der Aufnahme der Bakterien in 1 mL LB-Medium wurden sie für 45 min bei 37°C geschüttelt (400rpm). In den letzten 2-3 Minuten wurden die Bakterien bei RT bei 2000-3000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und im restlichen Medium resuspendiert. Die *E. coli* Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Methoden der Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Lösungen und Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Im Zellinkubator herrschte eine Temperatur von 37°C, ein CO₂-Gehalt von 5% und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT) und 500 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute; rpm) für 5 min.

3.2.1 Kultivierung und Konservierung der Zellen

Die murinen embryonalen Stammzellen wurden auf gelatinierter Oberfläche zur besseren Haftung unter Zugabe des *leukemia inhibitory factor* (LIF) zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz kultiviert (Smith 1991; Williams 1988). Zur Passagierung wurden die Zellen im subkonfluenten Stadium (ca. 80%) mit PBS gewaschen, um das verbliebene *fetal calf serum* (FCS) zu entfernen und 6-8 Minuten mit Trypsin/EDTA Lösung inkubiert, um sie von der Zellkulturflasche zu lösen. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen wurden geerntet und die in 1:5-1:20 gesplittete verbliebene Zellmenge pelletiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren in frischem Medium vereinzelt und die Stammzellen in eine mit einer 0,1%iger Gelatinelösung behandelte Zellkulturflasche überführt.

Zur Konservierung wurden die Zellen geerntet und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 500g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1mL Einfriermedium in Kryogefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Um das DMSO nach dem zügigen Auftauen bei 37°C zu verdünnen, wurden die Zellen im fünffachen Volumen des Kulturmediums gelöst und pelletiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt, um nicht adherierte Zellen zu entfernen.

3.2.2 Transfektion durch Nukleofektion

Um in die murinen ES-Zellen DNA in Form von Plasmiden einzuführen, wurden diese mit dem Nukleofektionssystem von AMAXA transfiziert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Zellsuspension gebracht, in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau gemischt und mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter einem Mikroskop gezählt. Der tiefblaue Diazofarbstoff Trypanblau dringt in abgestorbene Zellen ein, welche bei der Zellzahl nicht berücksichtigt wurden. Anschließend wurde die Zellzahl nach Angaben des Herstellers berechnet.

4-12 h vor der Nukleofektion erfolgte ein Wechsel des Mediums. 2×10^6 Zellen wurden zentrifugiert, das Pellet in 100 μ l Nukleofektionsreagenz gelöst und mit 2-20 μ g Plasmid DNA in die Nukleofektionsküvette überführt. Mit dem Programm A-24 des Nukleofector® Gerätes erfolgte die Transfektion. Die Zellsuspension wurde auf gelatinisierte Zellkulturschalen mit 10 mL Medium ausgesät und am darauffolgenden Tag selektioniert.

3.2.3 Cell Titer Blue Viability Assay zur indirekten Proliferationsmessung

Zur Bestimmung der Proliferation fand das *Cell Titer Blue Viability Assay* von Promega Anwendung, um indirekt über diese fluometrische Methode eine Aussage über die Proliferation der Zellen treffen zu können. Dabei wird der Indikator Resazurin verwendet, um die metabolische Kapazität der Zellen zu messen. Lebende Zellen besitzen die Fähigkeit, Resazurin in Resorufin zu reduzieren, welches fluoreszierend ist. Wenn es zu Resorufin reduziert wird, erscheint die Farbe pink und ist fluoreszierend (579Ex/584Em). ES-Zellen wurden in 96-well-Platten ausplattiert, es wurde nach 24 h oder 48 h 20 μ l CellTiter-Blue Reagent pro 100 μ l Kulturmedium in jedes Well gegeben und nach 3 h Inkubation vermessen. Das Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und Messzeitpunkte waren 24 h und 48 h.

3.2.4 *In vitro*-Differenzierung durch die Generierung von Embryoid Bodies

Um murine Stammzellen kontrolliert differenzieren zu lassen, kam die *hanging drop*-Methode zur Anwendung (Martin und Evans 1975, Wang und Yang 2008). Die Generierung von Embryoid Bodies bewirkt eine Differenzierung in die drei Keimblätter der frühen embryonalen Entwicklung (Itskovitz-Eldor et al. 2000) und stellt ein dreidimensionales Modell zur Rekapitulierung der Embryogenese dar (Nishikawa et al. 2007).

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um das LIF vollständig zu entfernen und nach der Zellzahlbestimmung zu einer Endkonzentration von 500-1000 Zellen pro 20 μ l verdünnt. Diese Einzelzellsuspension bestehend aus $2,5 \times 10^3$ Zellen/mL wurde in Differenzierungsmedium gelöst. Eine 20 cm Zellkulturschale wurde mit PBS befüllt, sodass der Boden bedeckt war. Mit einer Multikanalpipette wurden 20 μ l-Tropfen auf die Innenseite des Deckels der Schale pipettiert, anschließend wurde die Zellkulturschale mit einer vorsichtigen Drehbewegung des Deckels verschlossen. In den freihängenden Tropfen lagerten sich die Stammzellen zu Zellaggregaten zusammen. Nach der 72h Inkubation wurden die Tropfen in eine *ultra-low-attachment*-Multiwellplatte mit einer Beschichtung, die Adhäsion an der Vertiefung vermeiden soll, mit frischem

Differenzierungsmedium überführt und für weitere 96 Stunden bei 37°C inkubiert. Je nach weiterer Verwendungsweise verblieben die Embryoid Bodies entweder in den Platten oder wurden in Gelatine-beschichtete 96-well-Platten übertragen. Bei Versuchen mit längeren Differenzierungszeiträumen wurde das Differenzierungsmedium bei Bedarf ausgetauscht. Die lichtmikroskopische Auswertung der kardiomyozytären Differenzierung erfolgte an Tag 10-11. Jede Einbuchtung (*well*) der 96-well-Platte wurde nach kontrahierenden Arealen untersucht und entsprechend gekennzeichnet. Die Größe der Areale und die Stärke der Kontraktion wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Anzahl der Embryoid Bodies mit Kardiomyozyten im Verhältnis zur Anzahl vorhandener Embryoid Bodies stellte das Ergebnis einer 96-Well-Platte dar. Im Folgenden wird diese Methode aus Simplifizierungsgründen Differenzierungsassay genannt. Dies ist eine Vereinfachung auf Kosten der Genauigkeit der Bezeichnung, da die Generierung von embryoid bodies im Vergleich zu ursprünglichen zweidimensionalen Differenzierungsmethoden eine Verbesserung darstellt, die ein präziseres Modell der embryonalen Entwicklung darstellt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Ribonukleinsäure (RNA) Isolation und komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Synthese

Zur Isolation der RNA aus Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet, indem die Zellen zuerst homogenisiert, dann mit Ethanol vermischt über die RNeasy Spin Säule aufgetrennt und nach mehreren Waschschritten die RNA eluiert werden kann. Die gewonnene RNA wurde in 30 µL RNase-freiem Wasser gelöst, ihre Konzentration mit dem Spektrophotometer „GeneQuantPro“ mit Quarz-Küvetten bestimmt und 1 µg der RNA mit dem Kit *QuantiTect Reverse Transcription* in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung aller Schritte erfolgte auf Eis. Um sicherzugehen, dass die Reste genomischer DNA vollständig verdaut wurden, wurde diese RNA bei der folgenden qPCR als Template als RNA-Kontrolle eingesetzt.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der quantitativen PCR.

Volumen	Reagenz
5 µL	SYBR Green I Master
1 µL	cDNA (Verdünnung 1:10)
1 µL	Primer sense (10 µM)

2 µL Primer antisense (10 µM)

Σ 10µl

3.3.2 Real time quantitative Polymerase Ketten Reaktion (qPCR)

Die hergestellte cDNA wurde mittels qPCR im Plattencycler LightCycler® 480 mit dem Mastermix „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“, der den asymmetrischen Cyanin-Farbstoff enthält, analysiert (siehe Tabelle 9). Die Abkürzung SYBR kommt von 2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1*H*-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation. SYBR Green I bindet doppelsträngige DNA. Der sich daraus ergebende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm (Zipper et. al 2004). Durch die Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der gemessenen Signale überprüft werden. Folgende Zusammensetzung diente als Reaktionsansatz. Als Protokoll wurden folgende Temperaturen und Zeitdauern gewählt.

Tabelle 10: Protokoll der quantitativen PCR

Temperatur	Zeit	Ramp rate	Zyklen	Detektionsmodus	Reaktion
95°C	10 min		1		Vorinkubation
95°C	10 s	4,4	45	single	Amplifikation
65°C	10 s	2,2			
72°C	15 s	4,4			
95°C	5 s	4,4	1	kontinuierlich	Schmelzkurve
65°C	1 min	2,2			
97°C		1,1			
40°C	30 s				Kühlung

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Analyse von intra- und extrazellulären Proteinen mittels Western Blot

Herstellung des Zelllysats

Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert und in 30- 50 µl Lysepuffer gelöst. In einem Rotor wurde das Gemisch bei 4°C für 10 Minuten inkubiert und hierauf bei 13200 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt

und auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce nach Angaben des Herstellers und einem ELISA-Reader gemessen.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-Gelelektrophorese und Immunoblotting

Zwischen 20 und 30 µg Protein wurde mit LaemmLi-Puffer bei 95°C für 5 min im Heizblock denaturiert. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit vertikaler Plattenelektrophorese in 12 %-igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen. Zur Herstellung der Gele wurden 10 mL der Acrylamidlösung für Trenngele (Bestandteile siehe 3.6.3.1) mit 25 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 75 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) vermischt und zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasscheiben, die in einer Gelelektrophoresekammer eingespannt waren, gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und ein großporiges Sammelgel (5 mL Acrylamidlösung mit 30 µl TEMED und 50 µl APS) auf das Trenngel gegeben. Durch das vorherige Einsetzen eines Kamms wurden Taschen geschaffen. Im Anschluss erfolgten die Füllung der Kammer mit Laufpuffer, die Entfernung des Kamms und die Befüllung der entstandenen Taschen mit der Standardgröße des Proteinmarker V und den vorbereiteten Proben. Die Fokussierung dauerte 15 Minuten bei 15 milliAmpere/Gel und 180 Volt, wohingegen die Auftrennung bei 30 mA/Gel und 180 V für circa 2 h erfolgte. Nach der Auftrennung konnten die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung aus dem Gel auf eine durch Methanol aktivierte Nitrocellulosemembran in eiskaltem Blottingpuffer bei 100 V und 500 mA für 50 Minuten übertragen werden. Zur Fixierung der Proteine wurde die Membran erneut in Methanol getaucht und daraufhin zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen in Blockpuffer 30 Minuten lang leicht geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten in Waschpuffer wurden die Membrane in primärer Antikörperlösung (zwischen 1:1000 und 1:5000) entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran in Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (1:5.000) gegeben. Nach der abgeschlossenen Antikörper-Inkubation erfolgte ein erneutes Waschen der Membran. Durch die Peroxidasereaktion mit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) konnten die Proteine in einem ChemiDoc-Gerät mittels CCD-Kamera visualisiert werden. Die quantitative Auswertung der Proteinmenge wurde mit der Image Lab Software (Biorad) durchgeführt.

3.4.2 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie

Zur Darstellung der Expression von oberflächlichen Membranproteinen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abpipettiert. Die erste Inkubation erfolgte mit dem ersten Membranprotein-spezifischen Antikörper in einer Verdünnung 1:50 für 15-30 Minuten. Einem Waschschrift mit FACS-Puffer folgend wurden die Zellen mit einem Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung 1:50 resuspendiert und wiederum 15-30 Minuten inkubiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer und 2 µl Propidiumiodid, das zur Markierung der toten Zellen an die dsDNA bindet (Sasaki et al. 1987), gelöst. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert worden waren, um bei mehrmaliger Messung eine Vergleichbarkeit zu erreichen und unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu erkennen. Um die Größe der Zellen und ihre Granulität zu erfassen, wurden sie im Vorwärts (forward scatter)- und im Seitwärtsstreulicht (side scatter) erfasst. Die Darstellung der PI-Intensität hilft, die Fraktion lebender Zellen zu selektionieren, was auch unter dem Begriff „Gaten“ fällt. Die Auswertung erfolgte mit der „CellQuest™“ oder „FlowJo“ Software. Die Messdaten wurden mittels Division durch die Isotyp-Kontrolle normalisiert.

3.5 Immunohistochemie

Zur weiteren Analyse des Zellmaterials wurden Teratome, Zellpellets und Embryoid Bodies in Kryomolds mittig ausgerichtet und gleichmäßig mit dem Einbettmedium „TissueTek“ bedeckt. Nachdem die Kryomolds kurz in flüssigen Stickstoff getaucht wurden, konnten sie anschließend bei -20°C gelagert werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden die entstandenen Blöcke in konsekutive Schnitte 4µm dick mit dem Gefriermikrotom CM 1900 (Leica) geschnitten, auf Super Frost Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Eine Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Zur Färbung der Präparate erfolgte eine Rehydrierung in PBS für fünf Minuten, anschließend eine 10-minütige Lagerung in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung, die die endogene Peroxidaseaktivität hemmt. Die Schnitte wurden zweimal in PBS gewaschen und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers für 25 Minuten mit Normalserum in PBS-Verdünnung von 1:20-1:200 bedeckt. Primärantikörperbindung fand bei einer Stunde Raumtemperatur in einer für jeden Antikörper individuell ausgetesteten Verdünnung zwischen 1:50 und 1:1000 in 200 µL tris Puffer statt. Als

Negativkontrolle diente ein Schnitt, welcher nur mit PBS behandelt wurde. Nach einem Waschen mit PBS und Brij Lösung (50% Brij in PBS) standen als Zweitantikörper ein Fluorochrom-konjugierter oder ein biotinylierter Brückenantikörper zur Verfügung, wobei bei biotinylierter Brücke mit einem Avidin-Biotin-PO-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden musste. Als Peroxidase Substrat diente 3-Amino-9-ethylcarbazol, das eine rötliche Färbung der Antigen-Antikörper Reaktion hervorruft. Zellkerne wurden mit der Mayer`s Hämalaun Lösung angefärbt. Die Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine überschichtet und unter dem Mikroskop untersucht.

3.6 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden die Embryoid Bodies am Tag 3 des Differenzierungsassays auf gelatinieren Glas-Objektträgern ausplattiert, die in mit PBS gefüllten rechteckigen quadriperm Zellkulturschalen gelegt wurden. Am Tag 9 wurden die Objektträger für 5 min mit PBS gewaschen und in 3,5 % Paraformaldehyd in Dunkelheit für 10 min bei 4°C und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach ausgiebigem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit kaltem Methanol permeabilisiert und mit 200µl Normalserum in einer 1:200 Verdünnung mit TRIS Puffer für 20 min bei RT belassen, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Daraufhin wirkte der erste Antikörper in spezieller Verdünnung für 1 h bei RT ein. Bevor mit dem passenden ALEXA-gekoppelte Antikörper gefärbt werden konnte, wurde erneut mit PBS gewaschen. Um die ideale Färbestärke zu erreichen, wurde die Färbung dabei regelmäßig unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Um die Fluoreszenz zu erhalten und die Zellkerne zu färben, wurden die Embryoid Bodies am Ende mit „Vecta Shield“, das DAPI enthält, gefärbt. Die anschließende Analyse wurde mit dem „True Confokal Scanner SP2“ (Auflösung: Messfläche 1µm x 1µm bis 70µm x 70µm; Laterale Auflösung 1µm; Höhengauflösung >50nm) durchgeführt und der „LAS AF“ Software von Leica ausgewertet.

Die statistische Signifikanz aller Experimente wurde mit dem zweiseitigen t-Test berechnet. Dies gilt auch für die nachfolgenden Angaben von Signifikanzniveaus. Die Signifikanzen wurden nach folgendem Schema kategorisiert: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***. Ergebnisse mit einem p-Wert von $> 0,05$ wurden als nicht signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

EpCAM und seine Funktion während der Differenzierung von murinen ES-Zellen lassen sich mithilfe der 3D-Differenzierung als Widerspiegelung der *in vitro*- Embryogenese untersuchen. Dafür wurde die hanging drop Methode von Wang und Yang (2008) modifiziert und verwendet (siehe 3.2.4). Die aus einer definierten Zellzahl entstehenden Embryoid Bodies gewährleisten durch ihre Dreidimensionalität eine Interaktion zwischen den Zellen und können für einen längeren Differenzierungszeitraum von bis zu 21 Tagen untersucht werden. E14TG2 α -EpCAM-TF und die dazugehörige Kontrollzelllinie E14TG2 α - Δ pCAG sowie alle im Folgenden genannten Zelllinien wurden von Matthias Hachmeister und die E14TG2 α -ERas-Flag, Flag-ERas und myrAKT1 von Sannia Sarrach etabliert, validiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.1 Untersuchung der Interaktion von EpCAM und der GTPase ERas

4.1.1 AKT-Phosphorylierung in pluripotenten ES-Zellen

In einem *stable isotope labeling with amino acids in cell culture* (SILAC)-basierten Interaktionsscreen wurde ERas als Interaktionspartner von EpCAM in murinen Teratoma-Zellen (mF9-Zellen) identifiziert. Im Folgenden wurde deshalb überprüft, ob eine Überexpression von EpCAM zu einer vermehrten Phosphorylierung des Proteins AKT in E14TG2 α ES-Zellen führt. Dabei konnte eine signifikante 1,8fache erhöhte AKT-Phosphorylierung in der Zelllinie EpCAM Tev Flag im Gegensatz zur Kontrollzelllinie Δ pCAG, die nur mit dem Leervektor transfiziert wurde, nachgewiesen werden (Abbildung 2).

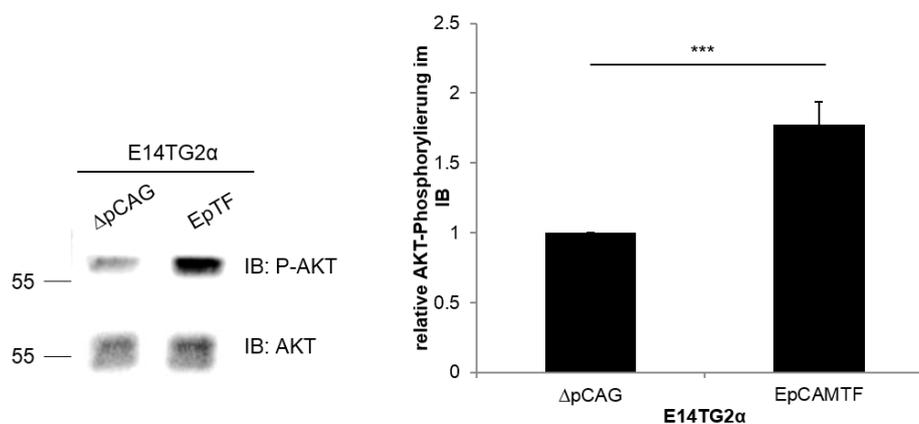


Abbildung 2: Induktion der AKT-Phosphorylierung durch EpCAM Überexpression.

Linke Seite: Ein exemplarischer Immunoblot der induzierten AKT-Phosphorylierung bei EpCAM Überexpression in E14TG2 α ES-Zellen. **Rechte Seite:** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Akt-Phosphorylierung aus 5 unabhängigen Experimenten (p-Wert 0.000071, n=5). Die p-AKT Werte wurden auf die AKT Expression normiert.

In einem weiteren Experiment wurden E14TG2 α als Positivkontrolle der AKT-Phosphorylierung 15 Minuten FCS-frei mit dem Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor (IGF) behandelt. Um sicherzugehen, dass die AKT-Phosphorylierung über den PI3-Kinase/AKT-Signalweg vermittelt wird, wurde außerdem 15 Minuten mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 behandelt. Für die Kontrolle wurde dem Medium Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Zur Vermeidung einer Dephosphorylierung wurde dem Lysepuffer Phosphatasen-Inhibitoren hinzugefügt. Die Behandlung mit IGF führte in der Kontrolllinie Δ pCAG zu einer Verdopplung der Phosphorylierung, in der EpCAM-Überexpressionszelllinie zu einer 6fachen Steigerung. LY294002 als spezifischer PI3-Kinase-Inhibitor hemmte die AKT-Phosphorylierung sowohl in der Kontrolllinie als auch in der EpCAM-Überexpressionszelllinie (Abbildung 3).

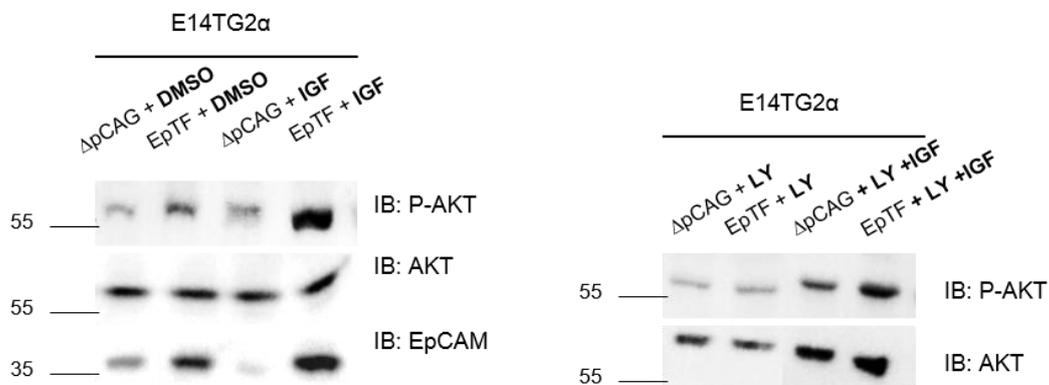


Abbildung 3: Induktion der AKT-Phosphorylierung durch EpCAM Überexpression und IGF Behandlung, Inhibition durch LY294002 Behandlung.

Linke Seite: Als Kontrolle für die Spezifität der Akt-Phosphorylierung wurden die EpCAM-TF- bzw. Δ pCAG-Zelllinie mit IGF stimuliert, was zu einer 6fachen Phosphorylierung von AKT in E14TG2 α - EpCAM-TF und zu einer Verdopplung in E14TG2 α - Δ pCAG führte (n=3). **Rechte Seite:** Als Kontrolle für den Signalweg über die PI3-Kinase wurden die EpCAM-TF- bzw. Δ pCAG-Überexpressionszelllinien mit LY294002, einem PI3-Kinase Inhibitor, behandelt. Für diesen Versuch wurde die embryonale Stammzelllinie E14TG2 α verwendet (n=3).

Da eine Regulation des ERas-downstream Moleküls AKT durch EpCAM nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes eine Überexpressionszelllinie von ERas generiert, um weitere Untersuchungen über diesen potentiellen Signalweg in ES-Zellen durchzuführen.

4.1.2 Auswirkung einer ERas-Überexpression auf die kardiomyozytäre Differenzierung von Embryoid Bodies

Da die Überexpression von ungespaltenem EpCAM die kardiomyozytäre Differenzierung transient hemmte (Unv. Diss. Sarrach 2013), wurde mithilfe der hanging-drop Methode auch das Differenzierungsverhalten der ERas Überexpressionslinie untersucht. Die Versuche wurden sowohl mit einer Zelllinie E14TG2 α FlagEras, die den Flag-Tag vor

ERas trägt und einer Zelllinie ERasFlag, die den Tag nach ERas trägt, durchgeführt, um einen Einfluss des Tags auszuschließen.

Im 3D hanging-drop Modell ausplattierte ERas-Überexpressionszellen zeigten eine hochsignifikante Reduktion der kardiomyozytärer Differenzierung auf 28 % (ERas Flag) und auf 7% (Flag ERas) bezogen auf Δ pCAG (Abbildung 4).

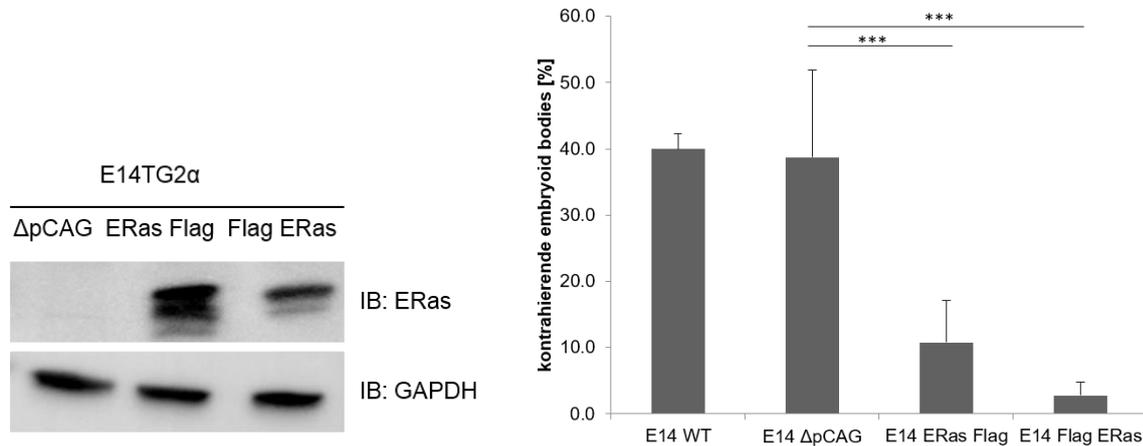


Abbildung 4: Kontrahierende Embryoid Bodies bei exogener Expression von ERas.

Linke Seite: Immunoblot zum Nachweis der ERas Überexpression in den Zelllinien ERas Flag und Flag ERas. **Rechte Seite:** Pluripotente Zellen wurden wie in 3.2.4 erläutert *in vitro* differenziert. Nach sieben-tägiger Differenzierung ohne Adhäsion wurden die Embryoid Bodies auf Gelatine-beschichtete Platten transferiert und an den folgenden Tagen auf kontrahierende Embryoid Bodies untersucht. Es ist eine hochsignifikante Reduktion auf 27,9 % an kontrahierenden Embryoid Bodies in der Zelllinie ERas Flag und auf 7 % von Flag ERas im Vergleich zu Δ pCAG zu verzeichnen, die das modifizierte exogene ERas Molekül in voller Länge exprimieren, unabhängig davon, wo sich der Flag-Tag in Beziehung zum ERas-Molekül befindet (p-Werte 0,009 und 0,00013). WT Zellen kontrahierten zu 40 % ($\pm 2,3\%$), Δ pCAG Zellen zu 38,7 % ($\pm 13,1\%$), ERas Flag zu 10,8 % ($\pm 6,3\%$) und Flag ERas zu 2,8 % ($\pm 1,9\%$). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (n=3).

4.1.3 Auswirkung einer hyperaktiven AKT Mutante auf die kardiomyozytäre Differenzierung von Embryoid Bodies

Da das Ras-Protein ERas im AKT-Signalweg aktiv ist, wurde eine Zelllinie generiert, die eine Hyperphosphorylierung der AKT aufweist. Eine Hyperphosphorylierung und somit eine Überaktivierung der AKT wird durch eine Myristylierung erreicht, wodurch das Molekül permanent an der Zellmembran verankert ist und einer andauernden Phosphorylierung ausgesetzt ist. Die Überexpression der AKT wurde auf mRNA- und Proteinebene überprüft (Abbildung 5 A und B). Die hyperaktive AKT Kinase induzierte eine partielle Inhibition der kardiomyozytären Differenzierung auf 33,4% bezogen auf die Kontraktion der Kontrollzelllinie Δ pCAG (Abbildung 5 C).

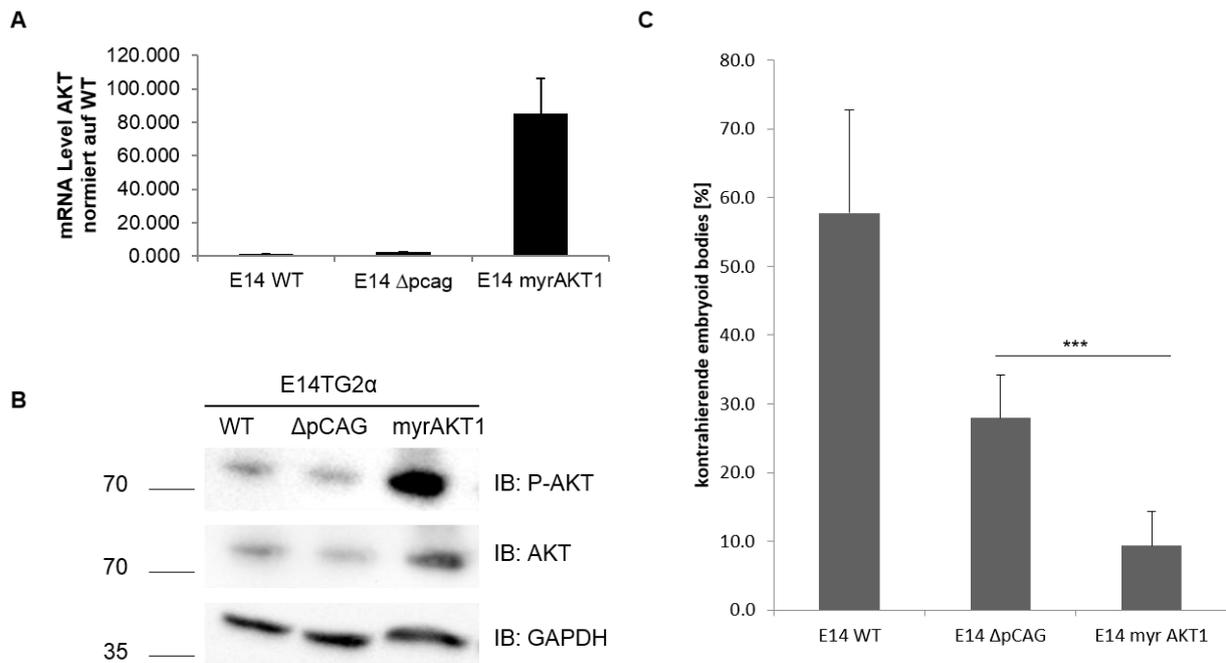


Abbildung 5: Kontrahierende Embryoid Bodies bei permanenter Phosphorylierung der AKT.

(A) AKT-mRNA Level in der Zelllinie E14 myrAKT1. (B) Immunoblot zum Nachweis der AKT Hyperphosphorylierung in der Zelllinie E14 myrAKT1. (C) Pluripotente Zellen wurden wie in 3.2.4 erläutert *in vitro* differenziert. Nach siebentägiger Differenzierung ohne Adhäsion wurden die Embryoid Bodies auf Gelatine-beschichtete Platten transferiert und an den folgenden Tagen auf kontrahierende Embryoid Bodies untersucht. Bei hyperphosphorylierter AKT ist eine hochsignifikante Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung auf 33,4 % zu verzeichnen (p-Wert 0,0012). E14 WT Embryoid Bodies kontrahierten in 57,8 % ($\pm 14,9\%$), $\Delta pCAG$ Zellen zu 27,9 % ($\pm 6,2\%$) und myrAKT1 Embryoid Bodies zu 9,3 % ($\pm 5,1\%$). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten (n=5).

4.1.4 Kardiomyozytäre Differenzierung unter dem Einfluss von PI3-Kinase Inhibitoren

Um den potentiellen Signalweg zwischen EpCAM, ERas und AKT spezifisch zu inhibieren, wurden ES-Zellen in 2D Kultur zwei Tage lang mit PI3-Kinase Inhibitoren behandelt, um anschließend mit den vorbehandelten Zellen ein Differenzierungsassay durchzuführen. Während dem Assay wurde alle zwei Tage frische Inhibitoren zum Medium hinzugegeben, angepasst an das jeweilige neue Well-Volumen, um die Konzentration konstant zu halten. Als Kontrolle wurden Embryoid Bodies mit DMSO behandelt. LY294002 wurde sowohl in der Konzentration 25 μ M als auch 50 μ M angewendet. Beide Konzentrationen liesen die Embryoid Bodies unvollständig differenzieren und an Tag 8 fand eine Desintegration der Embryoid Bodies statt, die dazu führte, dass es in keiner der Zelllinien zu Kontraktionen kam. Eine Proliferationsminderung wurde bei Paling *et al.* (2004) bei Konzentration von 10 und 25

μM nach 4 Tagen beschrieben. Auch 10 nM Rapamycin (Abbildung 6) und 100nM BK120 wirkten toxisch auf differenzierende ES-Zellen. Es könnten durch die Anwesenheit von Rapamycin und BK120 für die Differenzierung essentielle Signalwege gehemmt werden, sodass es unter LIF- Entzug zur Zellnekrose kommt.

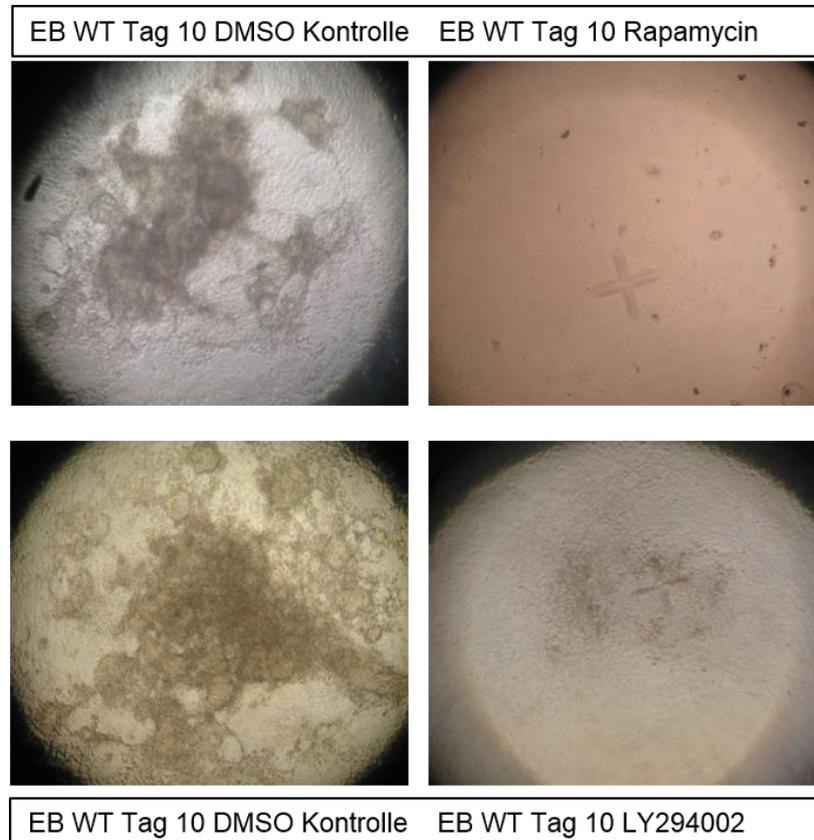


Abbildung 6: Embryoid Bodies Tag 10 behandelt mit DMSO, Rapamycin und LY294002.

ES-Zellen wurden 48 h mit Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde unter Zugabe der Inhibitoren ein Differenzierungsassay durchgeführt. Dargestellt sind Photographien der Embryoid Bodies an Tag 10, die durch die Behandlung mit Rapamycin lytisch wurden und durch die Behandlung mit LY294002 desintegrierten und vermindert proliferierten. Als Kontrolle wurden die Zellen und Embryoid Bodies mit DMSO behandelt (n=5).

4.2 Auswirkung eines zellulären EpCAM-Knockouts auf embryonale Stammzellen

Um die Funktion und den Einfluss EpCAMs auf die kardiomyozytäre Differenzierung eingehend zu untersuchen, wurde ein zellulärer EpCAM-Knockout in ES-Zellen generiert.

4.2.1 Generierung eines zellulären EpCAM-Knockouts mithilfe des CRISPR/Cas 9 Systems

Zur gezielten Ausschaltung des EpCAM-Gens in murinen ES-Zellen wurden von Sigma-Aldrich zwei CRISPR Plasmide hergestellt, die Exon 2 mit der Zielsequenz

GTCCCCAGGCCCTCGCGTTCGG (mCC1) und Exon 4 mit der Zielsequenz TTGTTCTGGATCGCCCCTTCGG (mCC2) adressieren. Als Vektor diente das Plasmid U6gRNA-Cas9-2A-GFP (8,229 bp + 22 bp), welches zudem das grüne Fluoreszenzprotein GFP als Selektionsmarker kodiert.

Nach dem Protokoll von Ran *et al.* (2013) wurden an Tag 0 murine ES-Zellen mittels Nucleofektion mit jeweils 20 µg Plasmid mCC1 oder mCC2 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen auf die hohe und niedrige Expression von GFP gesortet und anschließend in 96-well-Platten als Einzellzellen ausplattiert. Dabei wird die Zellzahl bestimmt und anschließend so verdünnt, dass 0,5 Zellen in 100 µL enthalten sind (meist 60 Zellen pro 12 mL pro 96-well-Platte). Somit ist gewährleistet, dass in mindestens 30 % der wells höchstens eine Zelle vorhanden ist. Ab Tag 5 wurden die 96-well-Platten nach Einzellzellexpansion untersucht, es wurde also nach radialer Proliferation ausgehend von einem Zellklon in den wells gesucht. Diese Einzelzellklone wurden markiert und expandiert, in 24-well-Platten umplattiert und nach Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht. An Tag 15 wurden von den 153 entstandenen Einzellzellklonen die Hälfte der entstandenen Klone eingefroren und ausgesuchte Klone, die eine klassische ES-Zellmorphologie aufwiesen, weiterkultiviert und im FACS nach EpCAM Expression untersucht.

- Klon 1-45: mCC1 Plasmid und niedrige GFP-Expression
- Klon 46-103: mCC1 Plasmid und hohe GFP-Expression
- Klon 104- 130: mCC2 Plasmid und niedrige GFP-Expression
- Klon 131- 153: mCC2 Plasmid und hohe GFP-Expression

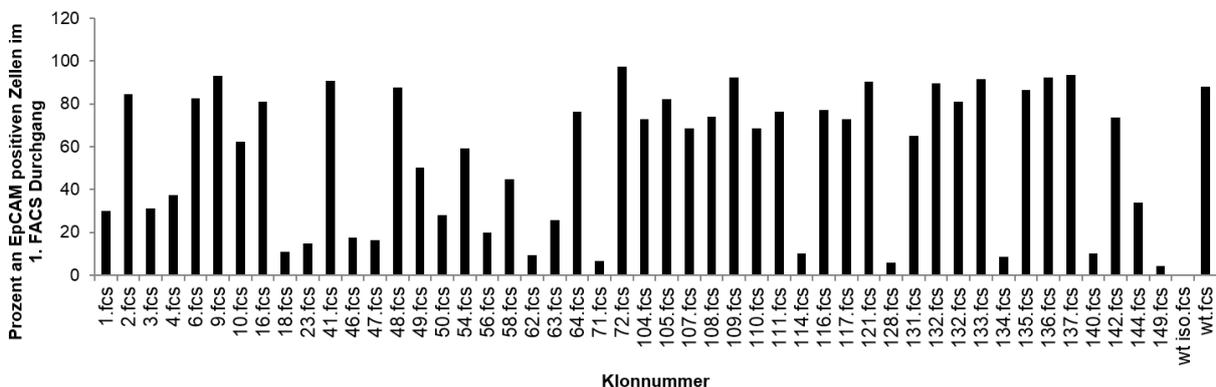


Abbildung 7: Expression EpCAM im FACS zur Selektion ausgewählter Klone.

Dargestellt ist der Prozentsatz an EpCAM-positiven Zellen in der Probe, die letzten beiden Proben waren die negative Isotyp-Kontrolle (wt iso), die nur mit Zweitantikörper inkubiert wurde und positive Wildtyp-Zellen (wt).

Tabelle 11: Aufführung der weiterverwendeten Klone nach erster FACS-Selektion.

Aufgeführt ist das verwendete Plasmid, die Stärke der GFP Expression, die visuelle Beurteilung der Kultur des 6-wells, die Dichte im 6-well und der Prozentsatz EpCAM-negativ und positiv im ersten FACS-Durchgang.

Klonnummer	CRISPR Plasmid	Morphologie	Dichte	EpCAM-negativ (%)	EpCAM-positiv (%)
149	CC2 GFP high	differenziert	dicht	95.8	4.2
134	CC2 GFP high	pluripotent	sehr dicht	91.6	8.41
128	CC2 GFP low	pluripotent	sehr dicht	94.1	5.89
121	CC2 GFP low	pluripotent	sehr dicht	9.67	90.3
114	CC2 GFP low	pluripotent	sehr dicht	90	10
71	CC1 GFP high	pluripotent		93.4	6.59
63	CC1 GFP high	eher differenziert	sehr dicht	74.5	25.5
62	CC1 GFP high	pluripotent	sehr dicht	90.8	9.18
58	CC1 GFP high	pluripotent	dicht	55.1	44.9
56	CC1 GFP high	pluripotent	dicht	80.2	19.8
50	CC1 GFP high	differenziert	sehr dicht	72	28
49	CC1 GFP high	eher differenziert	sehr dicht	49.6	50.4
48	CC1 GFP high	eher differenziert	sehr dicht	12.3	87.7
47	CC1 GFP high	eher differenziert	sehr dicht	83.6	16.4
46	CC1 GFP high	pluripotent	sehr dicht	82.4	17.6
23	CC1 GFP low	eher differenziert	dicht	85.1	14.9
18	CC1 GFP low	eher differenziert	dicht	89.1	10.9
16	CC1 GFP low	differenziert	sehr dicht	19	81
9	CC1 GFP low	eher differenziert	dicht	6.93	93.1
4	CC1 GFP low	pluripotent	sehr dicht	62.8	37.2
2	CC1 GFP low	pluripotent	dicht	15.4	84.6

Anschließend wurden negative und positive Klone zur weiteren Kultivierung ausgesucht. Untersuchungen folgten der ersten FACS-Analyse, die Ergebnisse wurden mehrere Male überprüft, um auszuschließen, dass ein Restanteil an EpCAM-positiven Zellen die negativen aufgrund eines Proliferationsvorteils überwachsen. Es wurde ein Immunoblot auf die Proteinexpression von EpCAM angefertigt (Abbildung 8), dabei konnte in den Klonen 56, 58, 62, 134, 149, 18, 46, 47, 23, 50, 63 und 71 keine Proteinexpression nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente der Nachweis in Wildtyp ES-Zellen und der Nachweis von EpCAM in der Überexpressionszelllinie EpCAM TF.

Neben der Morphologie wurde in den E14TG2 α Knockout-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression von EpCAM untersucht. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und unter Verwendung von Fluorescein-markierten Zweitantikörpern im FACS-Calibur analysiert. Kontrollfärbungen wurden jeweils ohne die Behandlung mit dem ersten Antikörper durchgeführt und sind als hellgraue Kurven in den Histogrammen zu sehen. Sechs repräsentative Histogramme

aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 9 (A und B) visualisiert. Dabei weist der Klon #49 EpCAM-positive und EpCAM-negative Zellen auf. Die Klone #114, #134 und #149 weisen keine EpCAM Oberflächenexpression auf. Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 10 dargestellt.

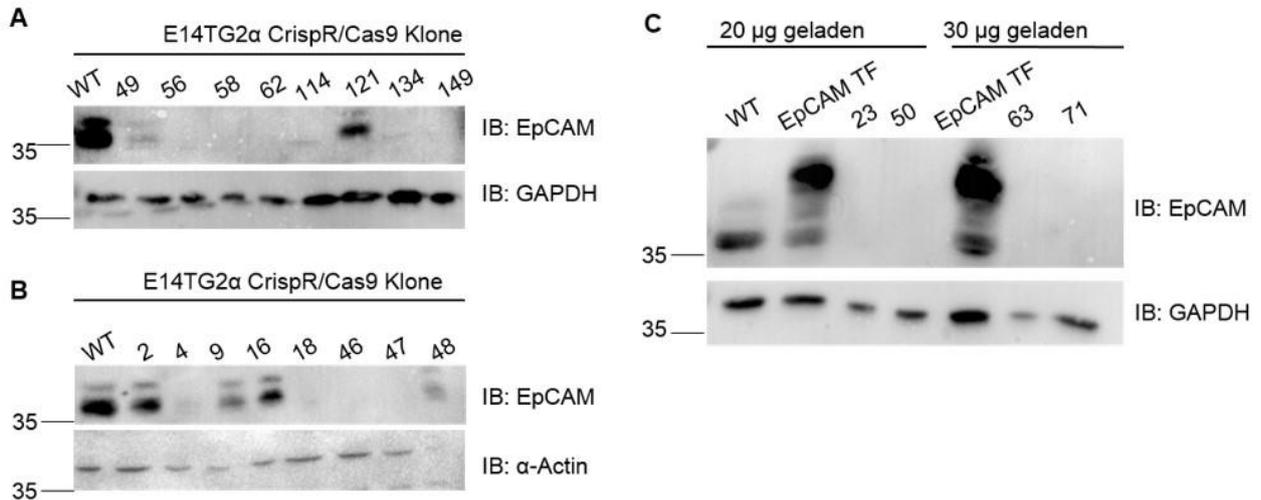


Abbildung 8: EpCAM Protein Expression ausgewählter CrispR/Cas9 Klone.

WT-Kontrolle mit den Klonen #49-149 (A), WT- Kontrolle mit den Klonen #2-48 (B), WT-Kontrolle und EpCAM Überexpression und die Klone 23, 50, 63 und 71 (C).

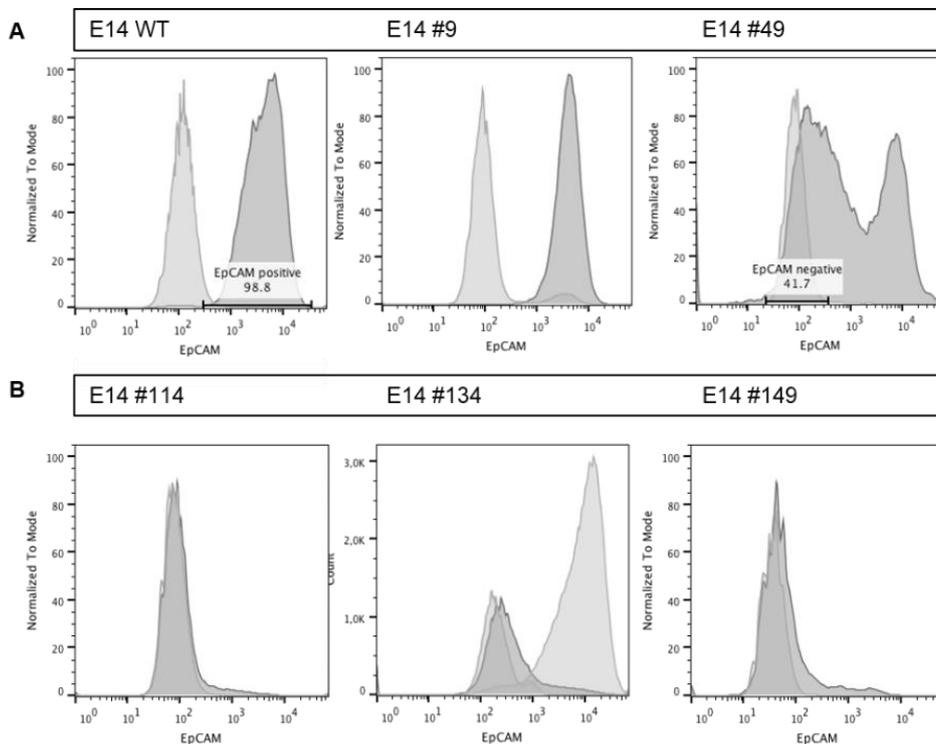


Abbildung 9: Ausgewählte Durchflusszytometrie-Profile von CrispR/Cas9 EpCAM-Knockout-Klone.

Hellgrau unterlegt erscheint die Isotyp Kontrolle, dunkelgrau die untersuchte Probe. (A) Als Referenz ist die WT-Kontrolle zu 98,8 % EpCAM-positiv, dies entspricht der internen CrispR/Cas9 Kontrolle #9. Klon #49 beinhaltet 41,7 % EpCAM-negative Zellen. (B) Mit den Klonen #114, #134 und #149 wurden die

weiteren Versuche durchgeführt. Im FACS Profil #134 ist in hellgrau zusätzlich ein WT FACS Profil zum Vergleich enthalten.

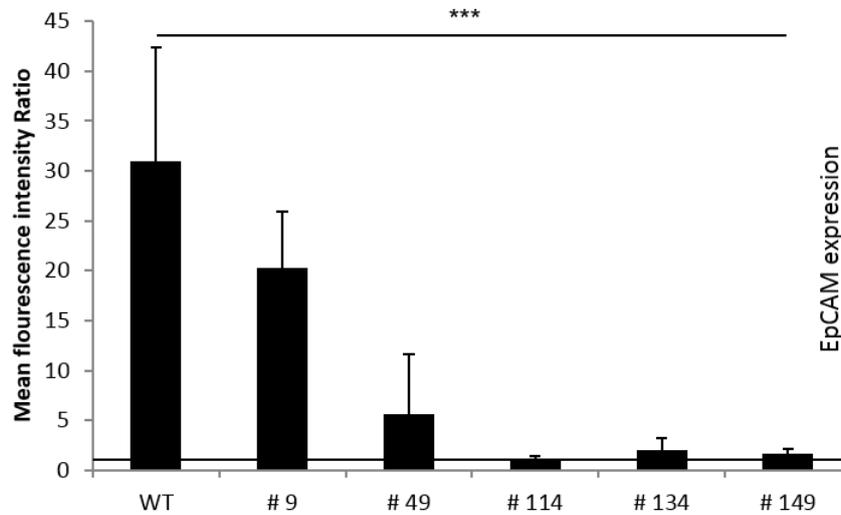


Abbildung 10: Quantifizierung der EpCAM-Knockout-Klone mittels Durchflusszytometrie aus 3 unabhängigen Experimenten.

Als Mean fluorescence intensity Ratio sind die Ergebnisse durch die Isotypkontrolle dividiert worden. Aufgeführt ist die Wildtyp Kontrolle, der Klon #9 als positiver EpCAM Klon und die EpCAM-Expression reduzierten Klone #49, #114 (signifikante Reduktion p-Wert 0,00082), #134(p-Wert 0,00534), und #149 (p-Wert 0,00378). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt (n=3).

Um sicherzugehen, dass der EpCAM-Knockout nicht durch das Protein Trop2 kompensiert wird, wurde die mRNA von Trop 2 gemessen. Murines Trop2 ist ein Retroposon von EpCAM und weist eine Homologie von ca. 50% in der Aminosäuresequenz auf (Okabe et al. 2009).

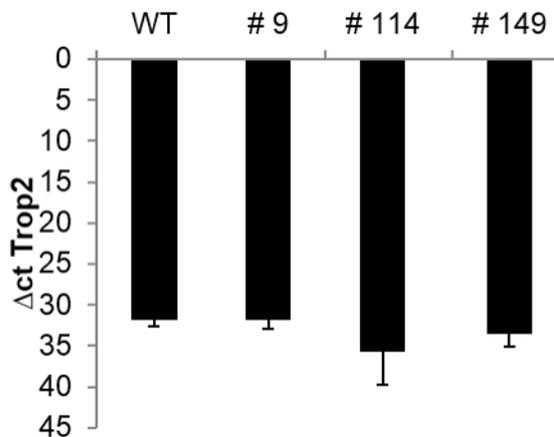


Abbildung 11: Keine Auswirkungen des EpCAM-Knockouts auf die mRNA von Trop 2.

Pluripotente Zellen wurden geerntet, ihre RNA zu cDNA umgeschrieben (siehe 3.3.1) und die Transkriptmenge mittels qPCR analysiert (siehe 3.3.2). Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Δct Werte angegeben. Der ct-Wert von Gusb lag zwischen 26,47-27,95. Die ct-Werte von Trop2 waren ausnahmslos über 40. Die Expression von Trop2 weist keine Unterschiede in den Kontrollzelllinien und in den Knockoutlinien auf. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (n=3).

Aus den hohen Δ ct Werten der Trop2 Messung geht hervor, dass das Protein Trop2 in E14TG2 α ES-Zellen sehr schwach oder nicht exprimiert wird. Es ergab sich kein relevanter Unterschied zwischen WT ES-Zellen und den CrispR Cas9 EpCAM-Knockout-Klonen, so dass ein Knockout von EpCAM nicht zu einer de novo Expression von Trop2 führt (Abbildung 11).

4.2.2 Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Pluripotenz, die Regulation des Zellzyklus, die Proliferation von undifferenzierten embryonalen Stammzellen und die AKT- Phosphorylierung

4.2.2.1 Pluripotenzmarker

Als erstes sollte analysiert werden, inwiefern der EpCAM-Knockout die Pluripotenz von E14TG2 α ES-Zellen beeinflusst. Dafür wurden die Pluripotenzmarker Oct4, Nanog, Sox2, myc, Klf4 und die Expression von ERas untersucht. Im Vergleich von WT, Kontrollklon #9, EpCAM-Knockout Klon #114, #134 und #149 konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden (Abbildung 12).

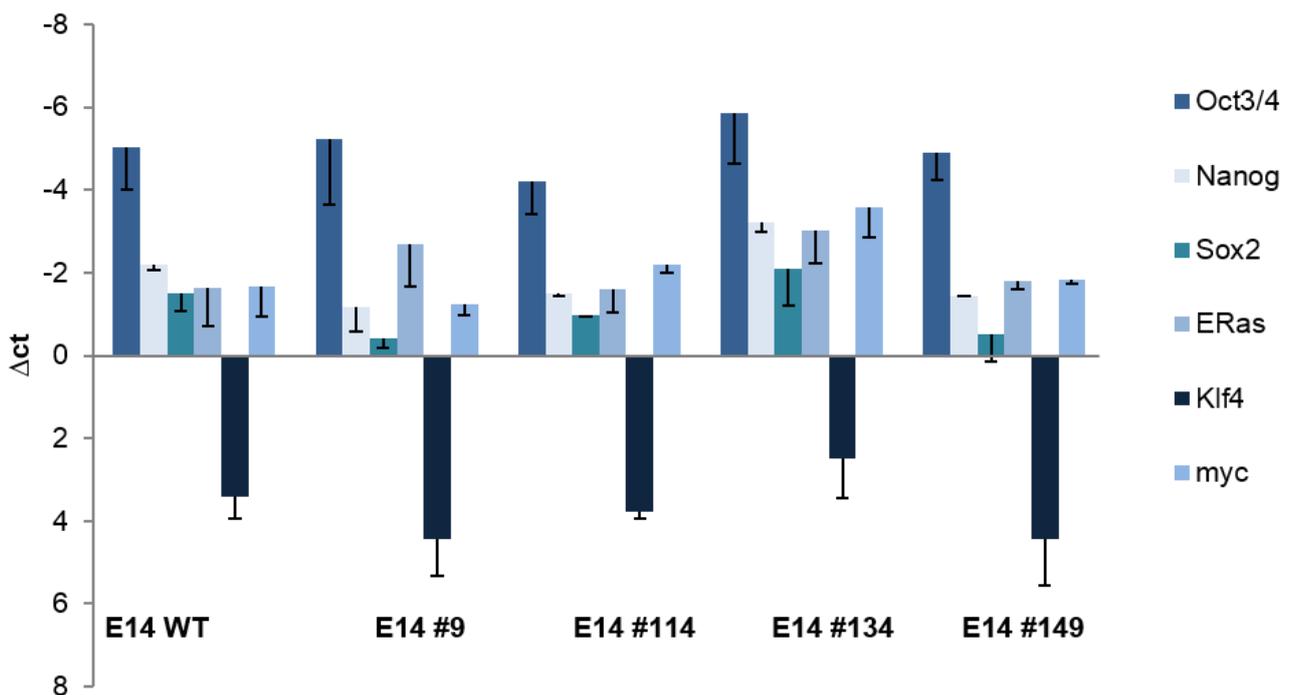


Abbildung 12: Expression von Pluripotenzmarker Oct3/4, Nanog, Sox2, ERas, Klf4 und myc in EpCAM Knockout E14TG2 α ES-Zell-Klonen.

Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Δ ct Werte angegeben. Ein Vergleich der Zelllinien mit den Kontrollzelllinien E14TG2 α -WT und E14TG2 α -#9 zeigt, dass die Expression der einzelnen Marker sich nicht signifikant unterscheidet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (n=3).

4.2.2.2 Proliferations- und Zellzyklusmarker

Ein Differenzierungsprozess geht meist mit einer Verringerung der Proliferation einher und da EpCAM einen Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus in Krebszellen hat (Munz et al. 2004, Maaser and Borlak 2008, Chaves-Perez et al. 2013), wurden auch in den EpCAM-Knockout-Zelllinien die transkriptionelle Expression des Proliferationsmarkers Ki67 und von drei Zellzyklusmarkern, Cyclin D1, Cyclin E und p53, überprüft (Abbildung 4.14 und 4.15). Dazu wurden die bereits für die Pluripotenzmarker-Untersuchung verwendeten cDNAs mit speziellen Primern in der quantitativen PCR vermessen.

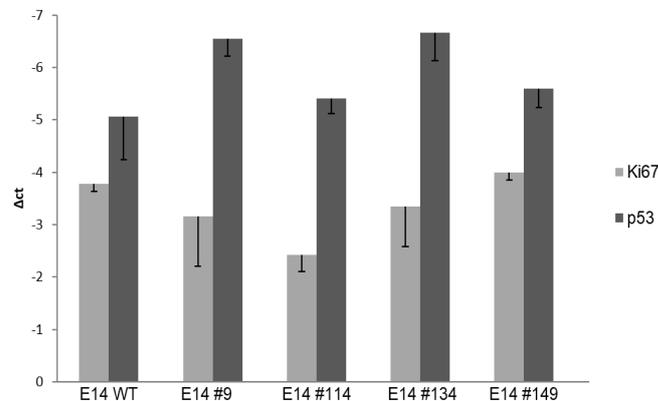


Abbildung 13: Kein Einfluss des EpCAM-Knockouts auf die Transkription von Ki67 und p53 Gene.

E14TG2 α ES-Zellen wurden, wie in 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, geerntet, aus der RNA wurde cDNA hergestellt und mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion vermessen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen EpCAM-positiven Zellen (WT und #9) und EpCAM-negativen Zellen (#114, #134, #149) festgestellt werden. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Verglichen mit der Expression in EpCAM-positiven Zellen war bei der Expression der mRNA von Ki67 und p53 in EpCAM-negativen Zellen kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 14).

Bei der Untersuchung der Zellzyklusmarker Cyclin D1 und Cyclin E konnte bei Cyclin D1 ein verringerter Wert gemessen werden. Im Gegensatz zum gemittelten Wert von E14TG2 α WT-Zellen $-2,45 (\pm 0,14)$ und E14TG2 α #9-Zellen $-2,45 (\pm 0,37)$ waren die Werte von E14TG2 α #114 und #149-Zellen auf $-0,38 (\pm 0,83)$ und $-0,38 (\pm 0,36)$ signifikant verringert (p-Wert vs WT 0,013 (#114) und 0,001 (#149)). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression von Cyclin E nicht (Abbildung 15).

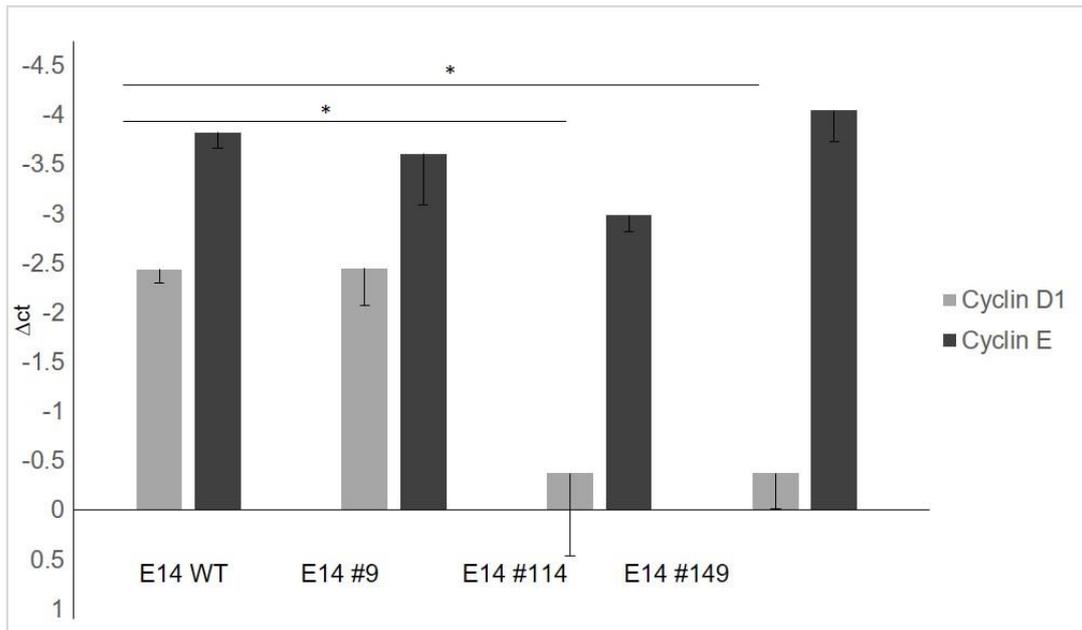


Abbildung 14: Einfluss des EpCAM-Knockouts auf die Transkription von Cyclin D1 und Cyclin E-Gene.

E14TG2 α ES-Zellen wurden, wie in 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, geerntet, aus der RNA wurde cDNA hergestellt und mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion vermessen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen EpCAM-positiven Zellen (WT und #9) und EpCAM-negativen Zellen (#114, #149) in Bezug auf das mRNA Level von Cyclin D1 festgestellt werden. EpCAM-negative Zellen exprimieren weniger Cyclin D1 im pluripotenten Zustand. Für Cyclin E trifft das nicht zu. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (n=3).

4.2.2.3 Differenzierungsmarker

Desweiteren wurden die Knockout-Klone auf Differenzierungsmarker der drei Keimblätter untersucht, um auszuschließen, dass die Knockout-Zellen durch den Verlust von EpCAM beginnen, sich zu Zellen eines Keimblatts zu entwickeln. Als endodermale Marker wurden Afp und Foxa2 vermessen, als ektodermale Marker Nestin und Pax6, sowie als mesodermale Marker Col1a1 und WT1. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen im Vergleich mit den Kontrollzelllinien E14TG2 α -WT und E14TG2 α -#9 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Keimzellmarkern des Endo-, Meso- und Ektoderms.

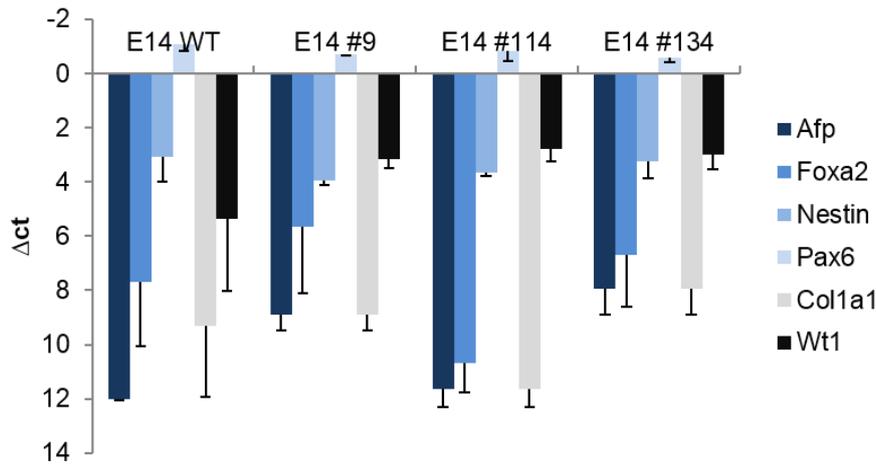


Abbildung 15: Keine Auswirkungen des EpCAM-Knockouts auf die Differenzierungsmarker Afp, Foxa2 (endodermal), Nestin, Pax6 (ektodermal), Col1a1, Wt1 (mesodermal).

Die Zelllinien E14TG2α-WT und E14TG2α-#9, #114, #134 wurden an Tag 0 geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der RNA und Synthese der cDNA wurde die Menge an Transkript mittels qPCR analysiert (3.3.2). Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Δct Werte angegeben. Als mesodermale Marker wurden Afp und Foxa2 betrachtet, als ektodermale Nestin und Pax6 sowie als endodermale die Marker Col1a1 und Wt1. Ein Vergleich der Zelllinien mit den Kontrollzelllinien E14TG2α-WT und E14TG2α-#9 zeigt, dass die Expression der einzelnen Marker sich nicht signifikant unterscheidet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (n=3).

4.2.2.4 Einfluss auf die Proliferation in An- und Abwesenheit von LIF

Humanes EpCAM ist in Krebszellen an der Proliferation durch die Regulation von Genen wie c-Myc und Cyclin D1 beteiligt (Chaves-Perez et al. 2013; Maetzel et al. 2009). Hierfür ist die Überexpression von EpICD ausreichend. Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss eines murinen EpCAM-Knockouts in ES-Zellen auf die Proliferation untersucht. In Abbildung 16 A und B sind die Ergebnisse der konventionellen Zellzahlbestimmung mittels Zählen in Fuchs-Rosenthal-Zählkammern nach 42 und 75 h aufgeführt. Es ergab sich kein Proliferationsunterschied in den Zelllinien #9, #114 und #149. Außerdem wurde das „Cell Titer Blue Viability Assay“ von Promega verwendet, um indirekt über diese fluometrische Methode eine Aussage über die Viabilität der Zellen treffen zu können. Endpunkte der Messungen waren 24 h und 48 h. Weder unter pluripotenten Bedingungen noch unter LIF Entzug wurde die Proliferation vom EpCAM-Knockout beeinflusst (Abbildung 17 C und D). Beide Versuchsansätze zeigten übereinstimmende Ergebnisse.

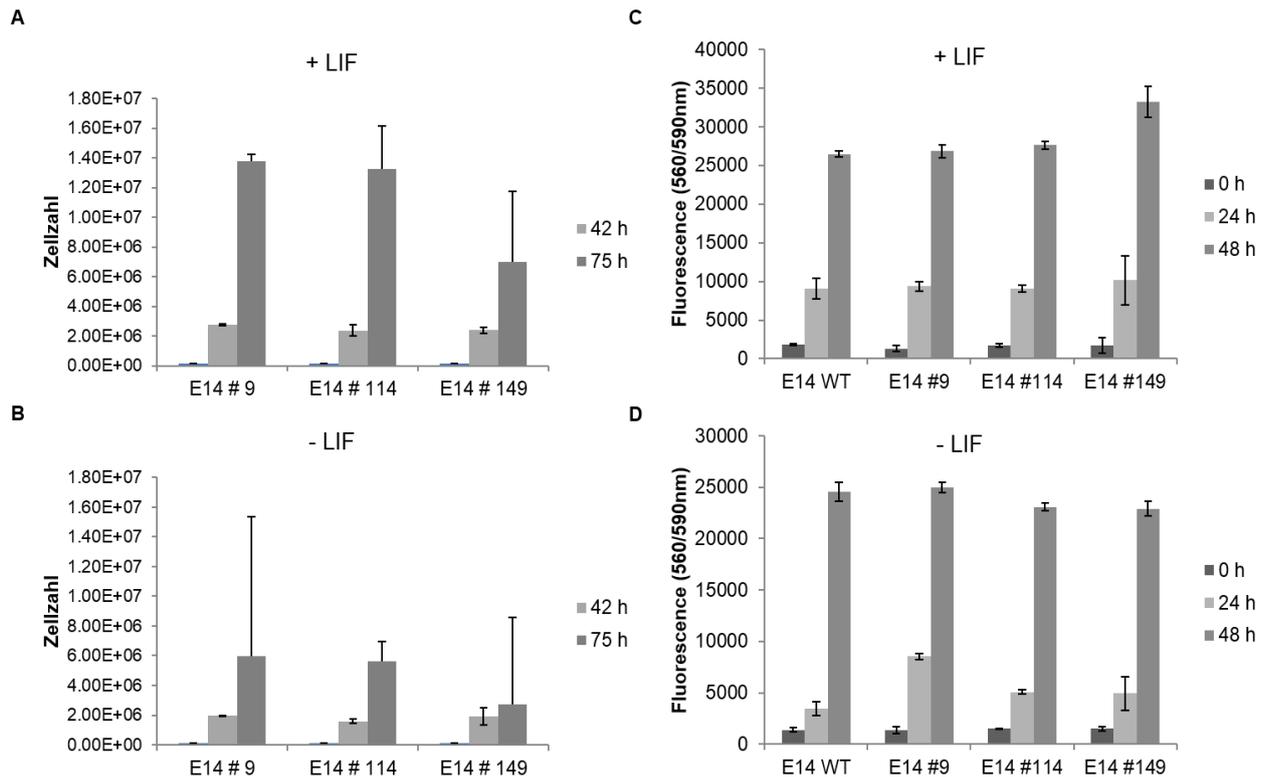


Abbildung 16: Bestimmung der Zellproliferation in E14TG2a wildtypischen Zellen und EpCAM-Knockout Klonen #114 und #149.

E14TG2 α ES-Zellen und CRISPR-Cas9 Derivate wurden mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (**A und B**). Mithilfe des Cell Titer Blue Assays wurde die Vitalität der E14TG2 α ES-Zellen indirekt untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Proliferation ausgemacht werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (**C und D**).

4.2.2.5 Effekt auf die AKT-Phosphorylierung

Da gezeigt werden konnte, dass eine EpCAM-Überexpression mit einer gesteigerten AKT-Phosphorylierung einhergeht, wurde die AKT-Phosphorylierung auch für die EpCAM-Knockout-Zelllinien #114 und #149 untersucht. Der EpCAM-Knockout verringerte die AKT-Phosphorylierung im Zellklon #114 auf 27,5 % und im Zellklon #149 auf 26,5 % des Ausgangswertes der EpCAM-positiven Kontrolle #9 (Abbildung 18).

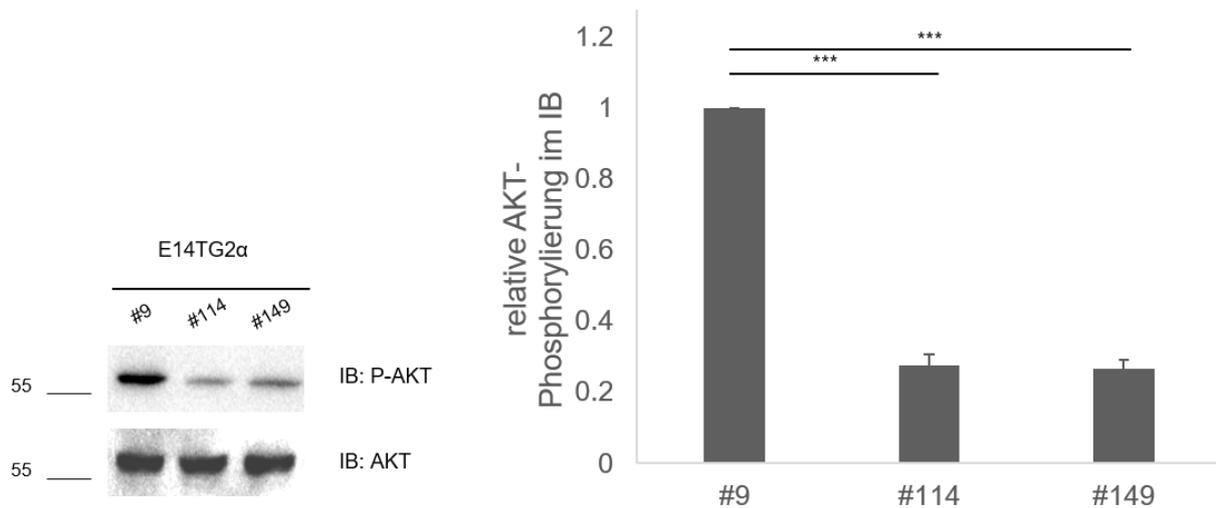


Abbildung 17: AKT-Phosphorylierung in zellulären EpCAM-Knockout Zelllinien.

Linke Seite: Ein exemplarischer Immunoblot der verringerten AKT-Phosphorylierung bei EpCAM-Knockout Zelllinien #114 und #149. **Rechte Seite:** Bei Zelllinie #114 ergab sich eine Reduktion der Phosphorylierung auf 27,5 % ($\pm 0,03\%$) und bei der Zelllinie #149 auf 26,5 % ($\pm 0,02\%$). Die in drei unterschiedlichen Experimenten gemessenen Werte ($n=3$) wurden gemittelt und mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Die p-AKT Werte wurden auf die AKT Expression normiert. Für diesen Versuch wurden die embryonale Stammzelllinien E14TG2 α -#9, #114 und #149 verwendet.

4.2.3 Effekt des zellulären EpCAM-Knockouts auf die *in vitro* Differenzierung

Nachdem die EpCAM-Knockout-Zelllinien im pluripotenten Zustand untersucht worden waren, wurden die ES-Zellen mithilfe der *hanging drop*-Methode *in vitro* differenziert, um eine mögliche Auswirkung des EpCAM-Knockouts auf die Differenzierung von ESC in die drei Keimblätter zu untersuchen. Dabei zog man sowohl die Kontraktion an Tag 10 als ein Hinweis auf die mesodermale Differenzierung heran, als auch die transkriptionelle und immunhistochemische Analyse der gebildeten Embryoid Bodies.

4.2.3.1 Auswirkung des Knockouts auf die Bildung von Kardiomyozyten

Im Folgenden wurden aus pluripotenten Zellen der Knockoutlinien #49, #114, #134, #149 Embryoid Bodies generiert (siehe 3.1.5) und zwischen Tag acht und zehn mikroskopisch auf kontraktile Zellen untersucht. Wildtyp und die interne Kontrolle E14TG2 α -#9 wurden stets am selben Tag wie die entsprechenden EpCAM-Knockout-Zelllinien überprüft. Dabei konnte eine Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung in den Knockout-Zelllinien verzeichnet werden. Die WT-Kontrollzelllinie kontrahierte zu 57,8 % ($\pm 13,72\%$). Die Klonnummer #9, die eine starke EpCAM-Oberflächenexpression auszeichnet, wies eine Kontraktion von 34,0 % ($\pm 16,32\%$) auf, Klon #49 kontrahierte zu 26% ($\pm 27,58$) und die Knockout-Klone #114, #134 und #149 zu 0,4 ($\pm 0\%$), 0,0 ($\pm 0\%$) und 4,9 % ($\pm 4,28\%$) (Abbildung 19).

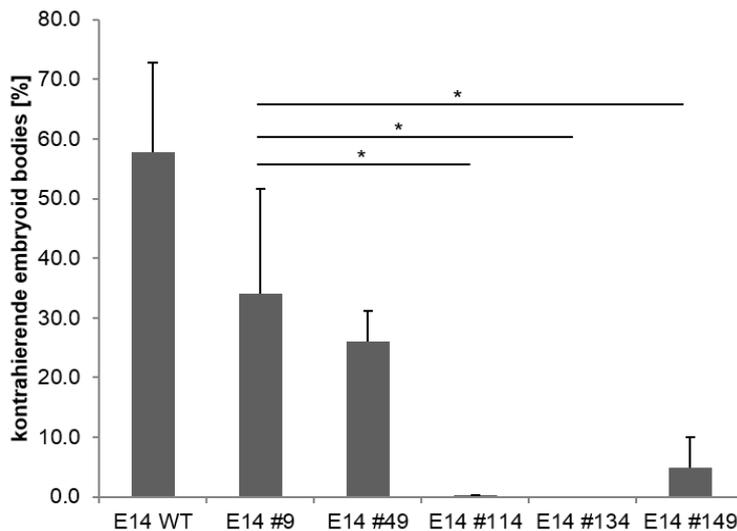


Abbildung 18: Bestimmung der Kontraktion von Embryoid Bodies in E14TG2 α ESC und EpCAM-Knockout-Zelllinien #114, #134, #149.

Pluripotente E14TG2 α Zellen wurden wie in 3.2.4 erläutert *in vitro* differenziert. Nach siebentägiger Differenzierung ohne Adhäsion wurden die Embryoid Bodies auf Gelatine-beschichtete Platten transferiert und an den Tagen d8-10 auf kontrahierende Embryoid Bodies untersucht. Dabei wurden die Kontrollen WT und #9 mit EpCAM-Oberflächenexpression von ca. 98 % verwendet, der CRISPR-Klon #49 mit EpCAM-Oberflächenexpression von 50 % und die Knockoutlinien #114, #134 und #149. In allen Knockoutlinien ist eine Reduktion der Zahl an kontrahierenden Embryoid Bodies zu verzeichnen. Diese Reduktion ist signifikant (p-Wert vs #9: #114/0,014; #134/0,004; #149/0,010). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

4.2.3.2 Transkriptionelle Regulation von Pluripotenz- und Zellzyklusmarkern in Abhängigkeit der Kontraktion und dem EpCAM-Status

Um zu überprüfen, ob die ES-Zellen trotz EpCAM-Knockout vollständig differenzieren, wurde eine Transkript-Analyse an Differenzierungstag 10 durchgeführt. Die Embryoid Bodies wurden an Tag 10 getrennt nach kontrahierend und nicht-kontrahierend geerntet. Die Differenzierungsmarker wurden auf transkriptioneller Ebene mithilfe von qPCR ermittelt. Um einen klaren Vergleich zwischen der am häufigsten eintreffenden Differenzierungsform anstellen zu können, sind in den Abbildungen 19 A und 20 A EpCAM-positive kontrahierende Embryoid Bodies den EpCAM-negativen nicht-kontrahierenden Embryoid Bodies gegenübergestellt. Um beurteilen zu können, ob der Unterschied in der Expression von bestimmten Markern nur an der Fähigkeit hängt, ob die Embryoid Bodies kontrahieren oder nicht, wurden auch kontrahierende EpCAM-positive und kontrahierende EpCAM-negative Embryoid Bodies verglichen (Abbildung 19 B und 20 B). Unter Abbildungspunkt C wird auf die nichtkontrahierenden Embryoid Bodies eingegangen. Als interne Kontrolle einer korrekten Selektion nach kontrahierenden und nicht kontrahierenden Embryoid Bodies wurde die mRNA-Menge an α CAA, einem kardiomyozytären Protein, gemessen. Es wurde ein Unterschied zwischen den EpCAM-positiven und -negativen Embryoid Bodies hinsichtlich Oct3/4 und

ERas festgestellt. Dies war unabhängig davon, ob sie kontrahierten oder nicht (Abbildung 19 C, 20 C). EpCAM-negative Embryoid Bodies wiesen an Tag 10 der Differenzierung eine im Gegensatz zu EpCAM-positiven Embryoid Bodies erhöhte mRNA Menge an den Pluripotenzmarkern Oct3/4 und ERas auf. Normiert auf Wildtyp Embryoid Bodies war die mRNA Menge von Oct3/4 in der Zelllinie #114 10 mal höher sowie in der Zelllinie #134 6,75 mal höher exprimiert. Die mRNA Menge von ERas war in der Zelllinie #114 11mal höher und in der Zelllinie #134 8 mal höher häufiger vorhanden als im WT. Abbildung 20 A ist repräsentativ, da die meisten EpCAM-positiven Embryoid Bodies an Tag 10 kontrahieren und fast alle EpCAM-negativen Embryoid Bodies nicht kontrahieren. Der Unterschied in der Oct3/4 mRNA Expression war bei einem p-Wert von 0,01 bei #114 Embryoid Bodies und 0,03 bei #134 Embryoid Bodies im Vergleich zu WT Embryoid Bodies signifikant. Der Unterschied in der ERas mRNA Expression war bei einem p-Wert von 0,02 bei #114 Embryoid Bodies und 0,03 bei #134 Embryoid Bodies im Vergleich zu WT Embryoid Bodies signifikant (Abbildung 19 A). Desweiteren wurde die Expression von Ki67 als Proliferationsmarker und von Cyclin D als Zellzyklusmarker bestimmt. Bei einem Vergleich der am häufigsten vorkommenden Differenzierung, EpCAM-positive Embryoid Bodies kontrahierend, EpCAM-negative Embryoid Bodies nicht kontrahierend, proliferierten EpCAM-negative, nicht kontrahierende Embryoid Bodies mehr (Abbildung 20 A). Im Vergleich mit EpCAM positiven Wildtyp Embryoid Bodies wiesen die nicht-kontrahierenden Embryoid Bodies der Zelllinie #114 die 2,2 fache Menge des Proliferationsmarkers Ki67 und die der Zelllinie #134 die 2 fache Menge des Markers auf. Im Vergleich konnte das Cyclin D mRNA Transkript in den Embryoid Bodies der Zelllinie #114 4,5 fach erhöht und in den Embryoid Bodies der Zelllinie #134 2,6 fach erhöht nachgewiesen werden. Die Menge an mRNA von Cyclin D war in den Embryoid Bodies der Zelllinie #114 4,5 fach erhöht und in den Embryoid Bodies der Zelllinie #134 2,6 fach erhöht. Der Unterschied in der Ki67 mRNA Expression war bei einem p-Wert von 0,03 bei #114 Embryoid Bodies und 0,05 bei #134 Embryoid Bodies im Vergleich zu WT Embryoid Bodies signifikant. Der Unterschied in der Cyclin D mRNA Expression war bei einem p-Wert von 0,002 bei #114 Embryoid Bodies und 0,01 bei #134 Embryoid Bodies im Vergleich zu WT Embryoid Bodies signifikant (Abbildung 21 A). Kontrahierende, EpCAM-negative Embryoid Bodies der Zelllinien #114 und #134 wiesen keine signifikant erhöhte Ki67 oder Cyclin D Expression auf (Abbildung 21 B). Bei dem Vergleich von nicht kontrahierenden, EpCAM-positiven Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit nicht

kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) ließ sich ein Unterschied der Ki67 und Cyclin D Expression nachweisen (Abbildung 21 C).

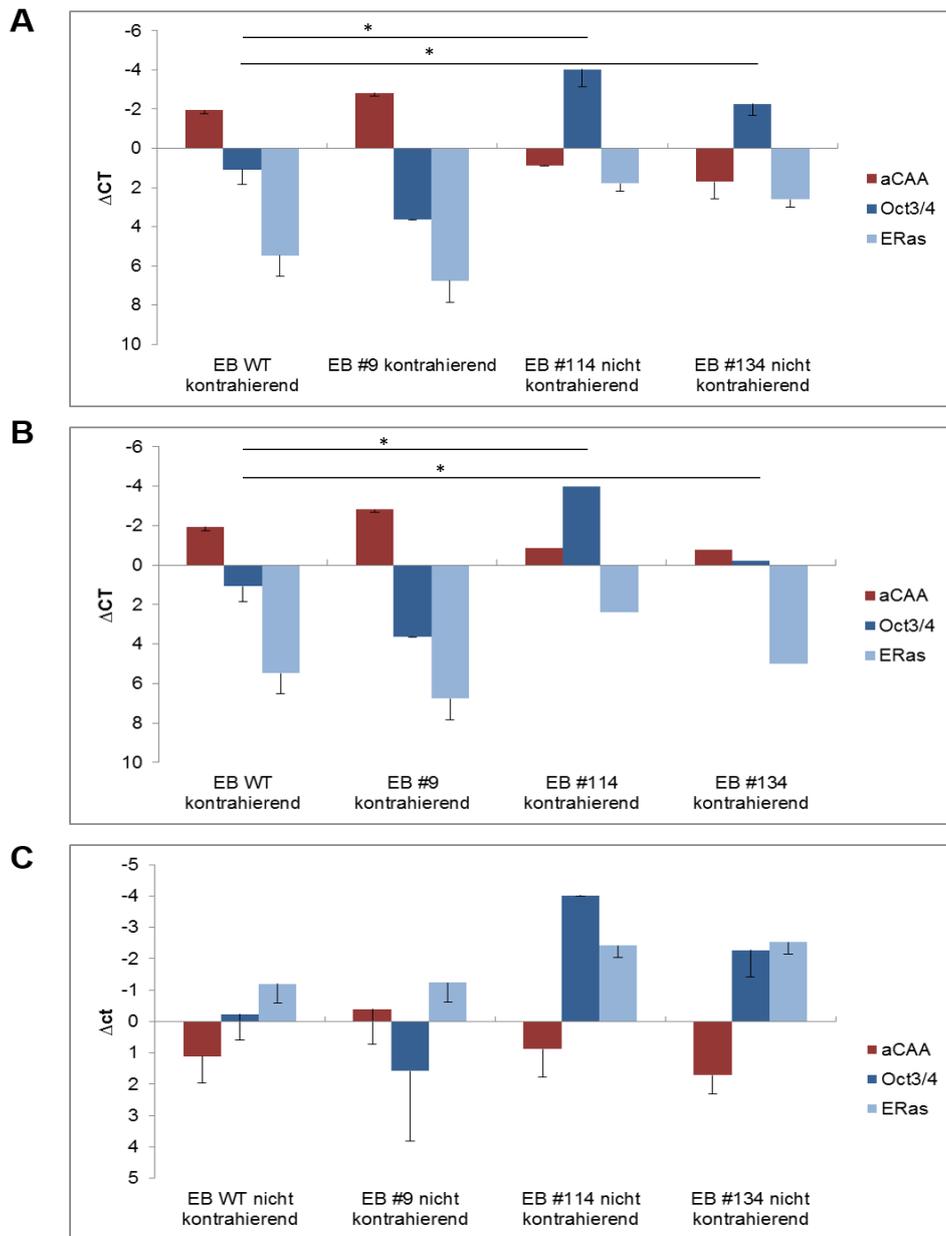


Abbildung 19: Oct3/4 und ERas Expression in Embryoid Bodies an Tag 10 in Abhängigkeit vom EpCAM Level.

(A) Es wurden kontrahierende EpCAM-positive Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit nicht kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) verglichen. Nicht kontrahierende, EpCAM-negative Embryoid Bodies wiesen signifikant mehr Oct3/4 und ERas auf (Oct3/4 p-Wert für #114 vs WT 0,01; für #134 vs WT 0,03; ERas p-Wert #114 0,02; für #134 vs WT 0,03). (B) Es wurden kontrahierende, EpCAM-positive Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) verglichen. Da es bei den EpCAM-negativen Embryoid Bodies meist nur einen kontrahierenden Embryoid Body und das nicht in allen drei Versuchen gab, sind die EpCAM-negativen Diagrammbalken ohne Standardabweichung aufgetragen. Kontrahierende, EpCAM-negative Embryoid Bodies wiesen mehr Oct3/4 und ERas auf. (C) Der Unterschied in der Expression von Oct3/4 und ERas besteht auch im Vergleich von nicht kontrahierenden, EpCAM-positiven Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit nicht kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

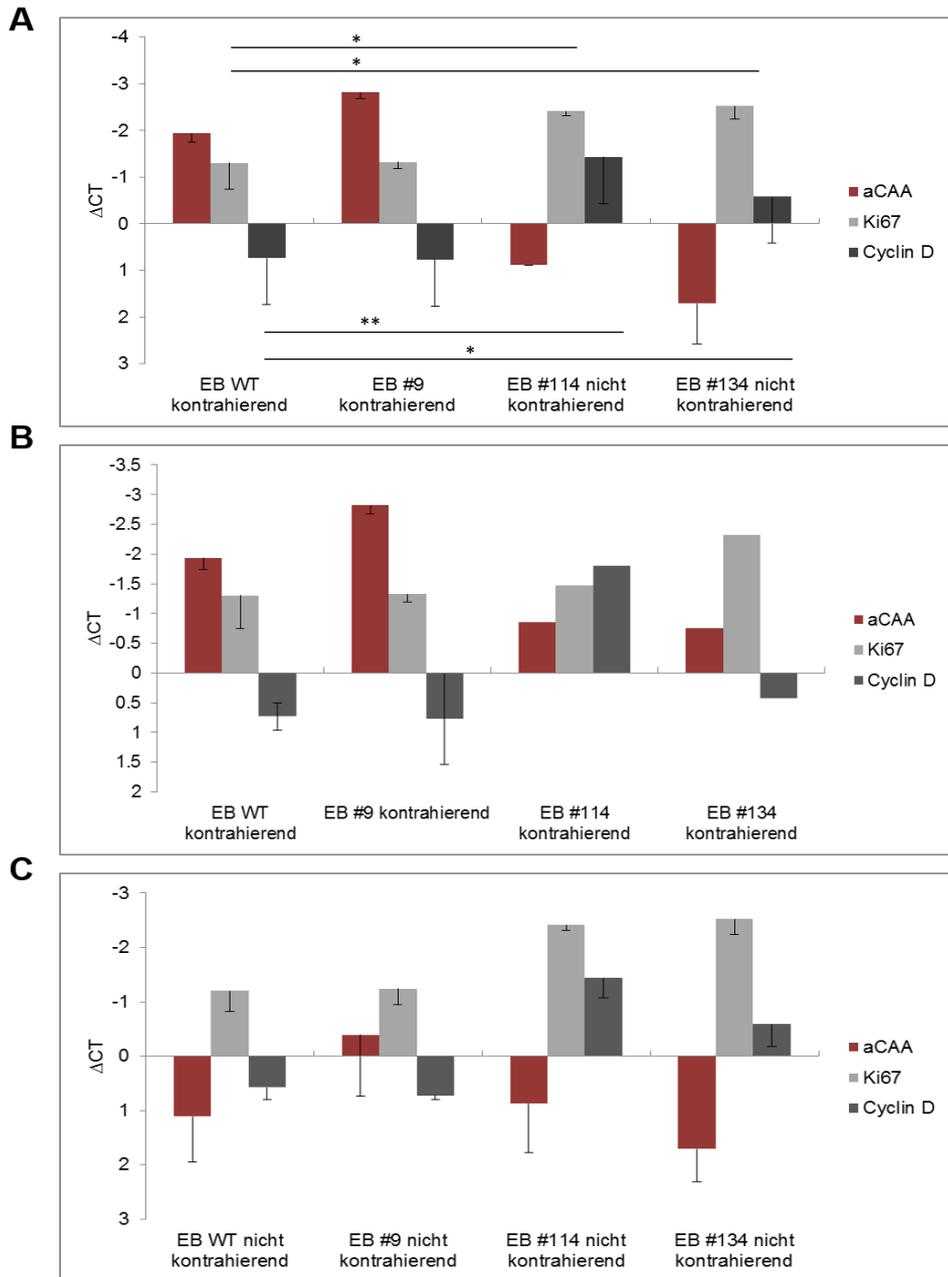


Abbildung 20: Unterschiede im Ki67 und Cyclin D Level in den Embryoid Bodies an Tag 10.

(A) Es wurden kontrahierende, EpCAM-positive Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit nicht kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) verglichen. Die nicht kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies wiesen signifikant mehr Proliferationsmarker Ki67 und Zellzyklusmarker Cyclin D auf (Ki67 p-Wert für #114 vs WT 0,03; für #134 vs WT 0,05; Cyclin D p-Wert #114 0,002; für #134 vs WT 0,01). (B) Es wurden kontrahierende, EpCAM-positive Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) verglichen. Ki67 und Cyclin D war dabei nicht signifikant verändert. (C) Bei dem Vergleich von nicht kontrahierenden, EpCAM-positiven Embryoid Bodies (EB WT und EB #9) mit nicht kontrahierenden, EpCAM-negativen Embryoid Bodies (EB #114 und EB #134) ergab sich ein Unterschied von Ki67 und Cyclin D Expression. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

4.2.3.3 Transkriptionelle Regulation von Differenzierungsmarkern der unterschiedlichen Keimblätter in Abhängigkeit der Kontraktion von Embryoid Bodies

Um herauszufinden, ob durch den Knockout von EpCAM auch andere Keimzellendifferenzierung neben der kardiomyozytären Differenzierung inhibiert sind oder ob der EpCAM-Knockout die embryonalen Stammzellen Richtung endodermale Differenzierung lenkt, wurde das Transkript der Embryoid Bodies an Tag 10 auf die Keimblattmarker AFP und Foxa2 (Abbildung 21 A), Nestin und Pax6 (Abbildung 21 B) und auf die mesodermalen Marker Col1a1 und Wt1 (Abbildung 21 C) untersucht.

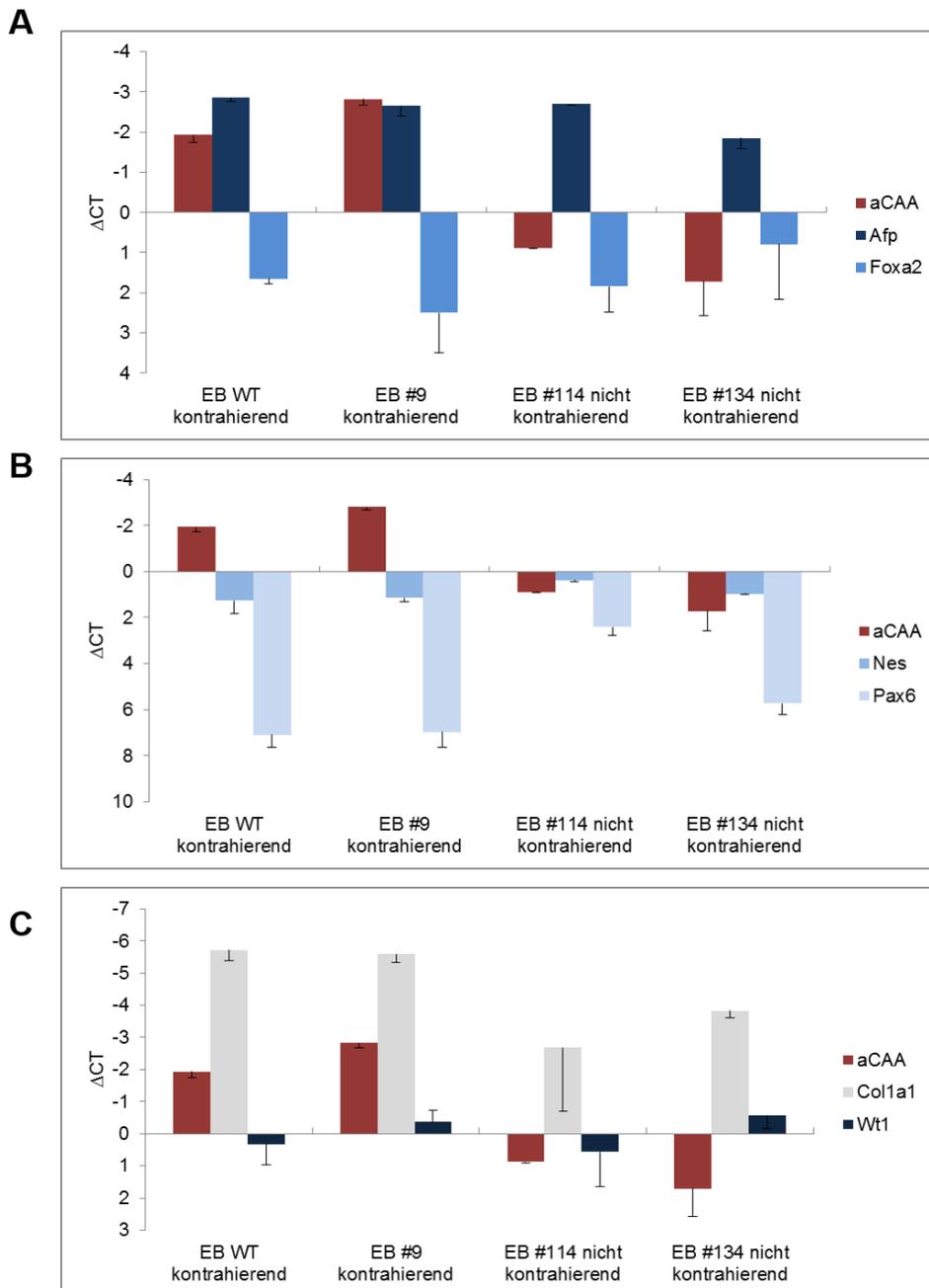


Abbildung 21: Expressionsmuster von endo-, meso- und ektodermalen Markern in Embryoid Bodies an Tag 10.

Die #114 und #134 Embryoid Bodies (im Diagramm EB #114 und EB #134) und deren Kontrollen #9 und WT Embryoid Bodies (im Diagramm EB #9 und EB WT) wurden in *hanging drops* ausplattiert. Die

entstandenen Embryoid Bodies wurden in *ultra-low attachment*- und später in Gelatine-beschichtete Multiwellplatten transferiert und darin inkubiert (siehe 3.2.4). Die Embryoid Bodies wurden nach 10 Tagen geerntet. Isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe 3.3.1), welche für die quantitative RealTime PCR verwendet wurde (siehe 3.3.2). Es wurden Marker des endodermalen Keimblatts: Afp und Foxa2 (**A**), des mesodermalen Keimblatts: Col1a1 und Wt1 (**B**) und ektodermalen Keimblatts: Nestin und Pax6 (**C**) analysiert. Zur Validierung der Einteilung in kontrahierend und nicht kontrahierend wurde der kardiomyozytäre Marker α CAA mitaufgetragen. Es konnten keine Unterschiede in den EpCAM-positiven und negativen Embryoid Bodies ermittelt werden. Die gemittelten Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche wurden mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen.

Die Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied. Dies gilt auch für den Vergleich von kontrahierenden und nicht kontrahierenden Embryoid Bodies. Es konnte daher kein Unterschied in der Differenzierung in Keimblätter in Abhängigkeit von der Expression EpCAM beobachtet werden.

4.2.3.4 Immunhistochemische Untersuchung der EpCAM Expression der Knockout- Embryoid Bodies

Murine embryonale Stammzellen weisen eine hohe EpCAM Expression auf. Diese Expression verringert sich im Laufe der Differenzierung und beschränkt sich an Tag 21 auf Zellen an der Oberfläche der Embryoid Bodies (Unv. Diss. Sarrach 2013).

Um den EpCAM-Knockout mit einer weiteren Methode zu bestätigen und die Differenzierung von Embryoid Bodies in An- und Abwesenheit von EpCAM zu bestimmen, wurden die Embryoid Bodies immunhistochemisch untersucht.

Ins Besondere mit der Fragestellung, ob sich durch den Verlust von EpCAM die Struktur der Embryoid Bodies verändert, wurden Schnitte von differenzierenden Embryoid Bodies an den Zeitpunkten Tag 0, 3, 7 und 21 angefertigt und immunhistochemisch auf EpCAM gefärbt.

Die EpCAM-Knockout Zelllinien E14 #114, #134 und #149 wiesen zu keinem Differenzierungszeitpunkt EpCAM Färbung auf, der EpCAM-Knockout konnte also bestätigt werden. Es bildeten sich an Tag 3 Embryoid Bodies in WT ähnlicher Form und Struktur, in der weiteren Entwicklung der Embryoid Bodies wiesen die EpCAM-negativen Embryoid Bodies hinsichtlich Morphologie oder Struktur Im Vergleich zu den EpCAM-positiven Embryoid Bodies eine aufgelockerte und weniger strukturierte Erscheinung auf (Abbildung 23).

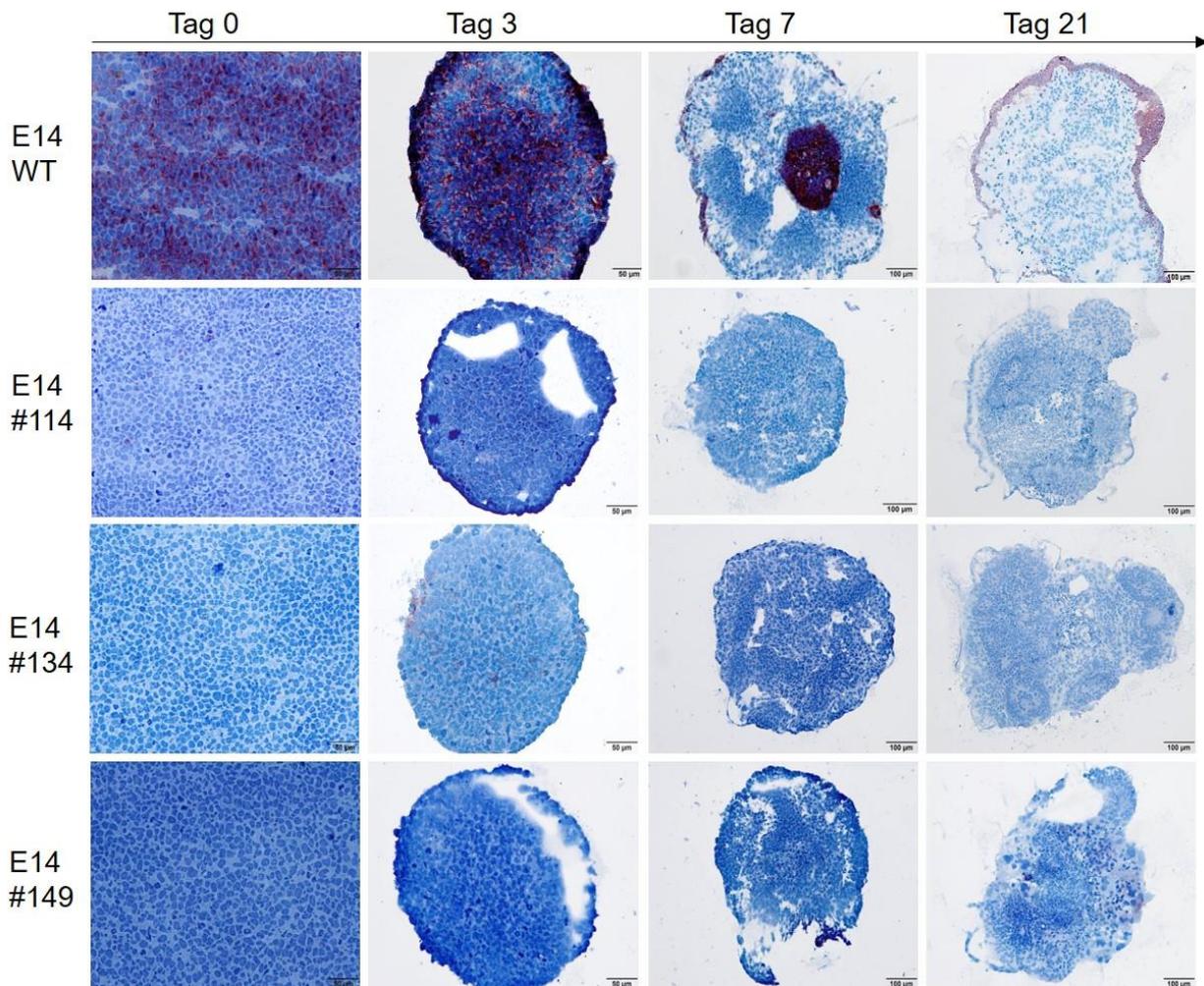


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung des EpCAM Proteins in Embryoid Bodies verschiedener Differenzierungsstadien.

E14TG2 α -WT Zellen und die EpCAM-Knockoutzelllinien #114, #134 und #149 wurden als Embryoid Bodies schockgefroren, im Mikrotom geschnitten und mit EpCAM-spezifischen Antikörpern gefärbt (siehe 3.5). Mit den pluripotenten Ausgangszellen wurde in gleicher Weise verfahren. Die gefärbten Präparate wurden darauffolgend unter dem Mikroskop analysiert und digitale Bilder aufgenommen. Der Maßstab ist in der Abbildung angegeben (50-100 μ m). Im Differenzierungsverlauf der WT-Zellen kann man die starke Abnahme der EpCAM-Expression sehen, von der an Tag 21 nur noch ein äußerer Rand bestehen bleibt. Die Kultur an Tag 0 der EpCAM-Knockout-Zelllinien ist EpCAM-negativ. Die Embryoid Bodies weisen keinen offensichtlichen Unterschied zu den WT Embryoid Bodies auf. Es sind repräsentative Schnitte aus mindestens n= 3 unabhängigen Experimenten jeder Differenzierungsstufe dargestellt.

4.2.3.5 Immunhistochemische Untersuchung von Differenzierungsmarkern in Embryoid Bodies

Um einen tieferen Einblick in die Differenzierung der EpCAM-Knockout Embryoid Bodies zu erlangen, wurden unterschiedliche Keimblattmarker in den oben gezeigten Embryoid Bodies in konsekutiven Schnitten gefärbt. Damit ist es außerdem möglich, einen Vergleich zur Differenzierung von EpCAM-positiven Embryoid Bodies zu ziehen. Embryoid Bodies aller drei Knockoutzelllinien (E14 TG2 α -#114, #134, #149) wurden gefärbt, als Beispiel wird in der Abbildung 24 nur die Färbungen der Zelllinie #149 gezeigt, die Expressionsstärke und -lokalisierung war in den drei Zelllinien #114, #134 und #149

vergleichbar. Da eine sich gegenseitig ausschließende Expression von EpCAM und dem mesodermalen Marker Vimentin nachgewiesen wurde, wurden die Knockout Embryoid Bodies zunächst auf Vimentin gefärbt. Abbildung 23 stellt beispielhafte Embryoid Bodies aus WT-Zellen und Knockoutzellen der Linie #149 dar, die an Tag 0 und an Tag 3 geerntet und gefärbt wurden. Konsekutive Serienschritte der Embryoid Bodies (ca. 4µm Abstand) wurden mit EpCAM- (oberer Abschnitt der Abbildung 24) und Vimentin-spezifischen Antikörpern (unterer Abschnitt der Abbildung 24) angefärbt. Bei einem Vergleich der Färbungen von EpCAM und Vimentin in Serienschritten eines Embryoid Bodies konnte erneut eine sich gegenseitig ausschließende Expression beider Proteine in den WT Embryoid Bodies festgestellt werden.

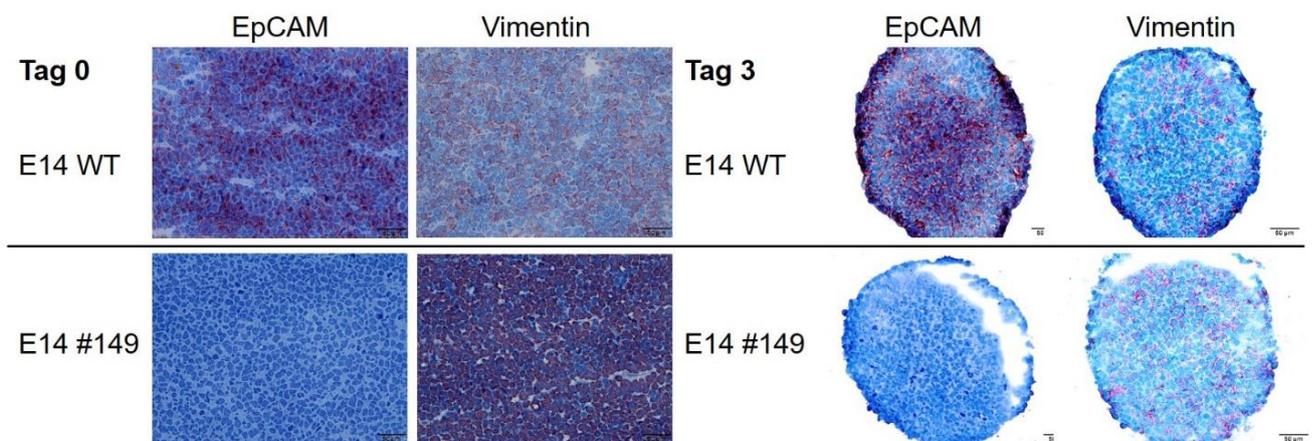


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin in der Kultur pluripotenter embryonaler Stammzellen und in Embryoid Bodies an Tag 3

Nach dem Schockfrieren und Schneiden der Sphäroid-ähnlichen Strukturen wurden die Präparate mit EpCAM- und Vimentin-spezifischen Antikörpern behandelt. Die Abbildung zeigt repräsentative Embryoid Bodies, die jeweils mit den zwei Antikörpern für EpCAM und Vimentin behandelt wurden. Der Maßstab beträgt 50 µm (siehe Abbildung Embryoid Bodies unten rechts). Die Färbung der beiden Proteine ist alternierend. An Tag 0 sind beinahe alle WT-Zellen EpCAM-positiv, es ist eine erhöhte Vimentin-Expression in den Knockoutzelllinien zu erkennen, die sich aber an Tag 3 der Differenzierung der Expression in den WT Zellen angeglichen hat. An Tag 3 bestehen WT Embryoid Bodies aus stark vermischten EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen, #149 Embryoid Bodies sind durchgezogen von kleinen Vimentin-positiven Zellverbänden.

An Tag 7 gruppierten sich EpCAM-positive und Vimentin-positiven Zellen in unterschiedlichen Arealen. Die Expression der beiden Marker schloss sich gegenseitig aus. In den EpCAM-negativen Embryoid Bodies ist dies nur an stark Vimentin-positiven Arealen sichtbar. Große Teile des E14 #149 Embryoid Bodies sind Vimentin-negativ (Abbildung 25).

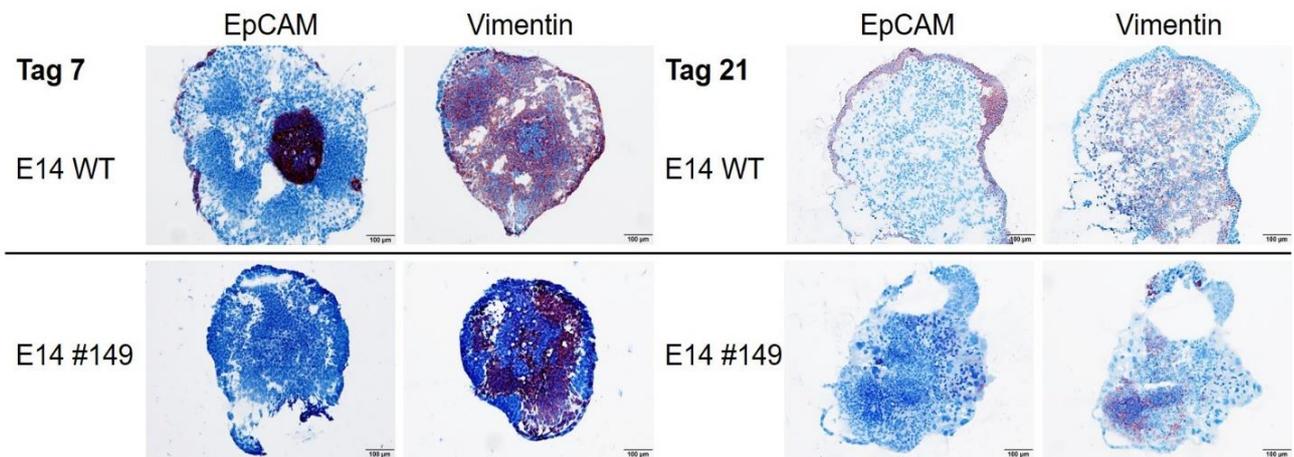


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Vimentin in Embryoid Bodies an Tag 7 und 21 der Differenzierung.

An Tag 7 ist in den WT Embryoid Bodies eine Auftrennung in stark EpCAM-positive Zellen und große Areale an Vimentin-positiven Zellen zu erkennen. In den Knockout Embryoid Bodies tritt diese Separierung durch die stark Vimentin-positiven Areale hervor. Die alternierende Färbung der beiden Proteine ist gut an Tag 21 in den WT Embryoid Bodies zu erkennen. Der EpCAM-positive Saum ist Vimentin-negativ. Die Knockout Embryoid Bodies erscheinen aufgelockert und wenig strukturiert (Maßstab 100 µm).

An Tag 21 hat sich in den WT Embryoid Bodies ein EpCAM-positiver Rand gebildet, dessen Abgrenzung in den EpCAM-Knockout Embryoid Bodies nicht zu erkennen ist. Insgesamt ist in den EpCAM-negativen Embryoid Bodies eine Auflockerung der Zellstruktur im Embryoid Body zu erkennen (Abbildung 25).

Da in der Literatur Zusammenhänge zwischen EpCAM und der endodermalen Entwicklung angegeben sind, wurde der endodermale Marker Foxa2 immunohistochemisch gefärbt.

EpCAM- und Foxa2-positive Zellen kongruieren in ihrer Expressionslokalisation in WT Embryoid Bodies, doch auch die EpCAM-Knockout Embryoid Bodies exprimieren den endodermalen Marker Foxa2 (Abbildung 26).

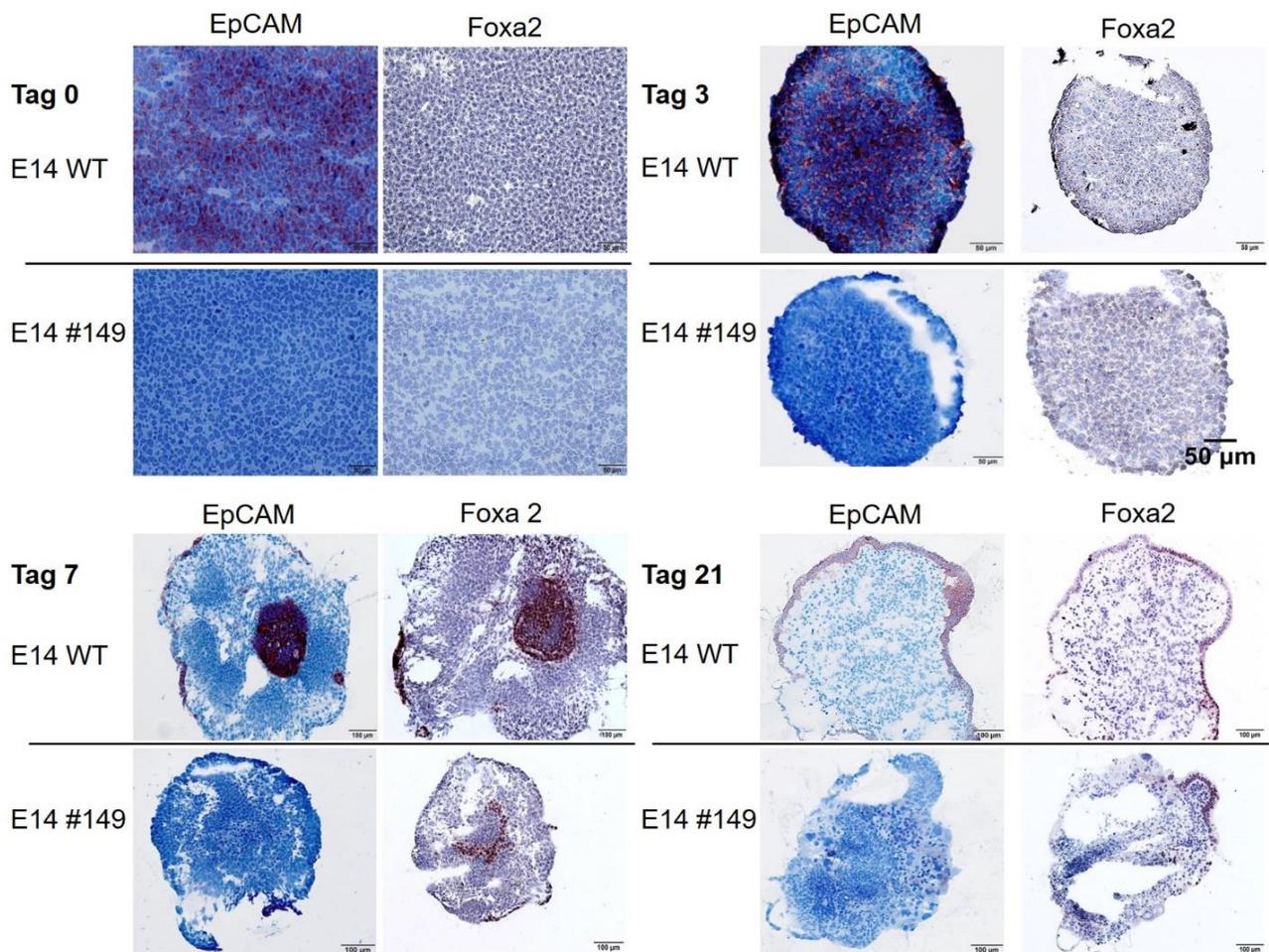


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Foxa2 in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.

In den WT Embryoid Bodies ist eine Überlappung von EpCAM und Foxa 2 zu erkennen, besonders ersichtlich an Tag 7. Auch an Tag 21 ist am Rand des Embryoid Bodies eine Foxa2 Expression ersichtlich, der den EpCAM-positiven Zellen entspricht. Obwohl in den Knockout Embryoid Bodies kein EpCAM vorhanden ist, gibt es Zellareale, die Foxa2 positiv sind (siehe Tag 7 und 21).

Um einen Zusammenhang zwischen EpCAM-Expression und der ektodermalen Differenzierung zu explorieren, wurde der ektodermale Marker Nestin verwendet. Die leichte Expression von Nestin an Tag 0 in der pluripotenten Stammzellkultur unterscheidet sich durch An- oder Abwesenheit von EpCAM nicht. Auch die weitere Entwicklung der Expression im Lauf der Differenzierung ist nicht nachweisbar mit EpCAM Expression verbunden (Abbildung 27).

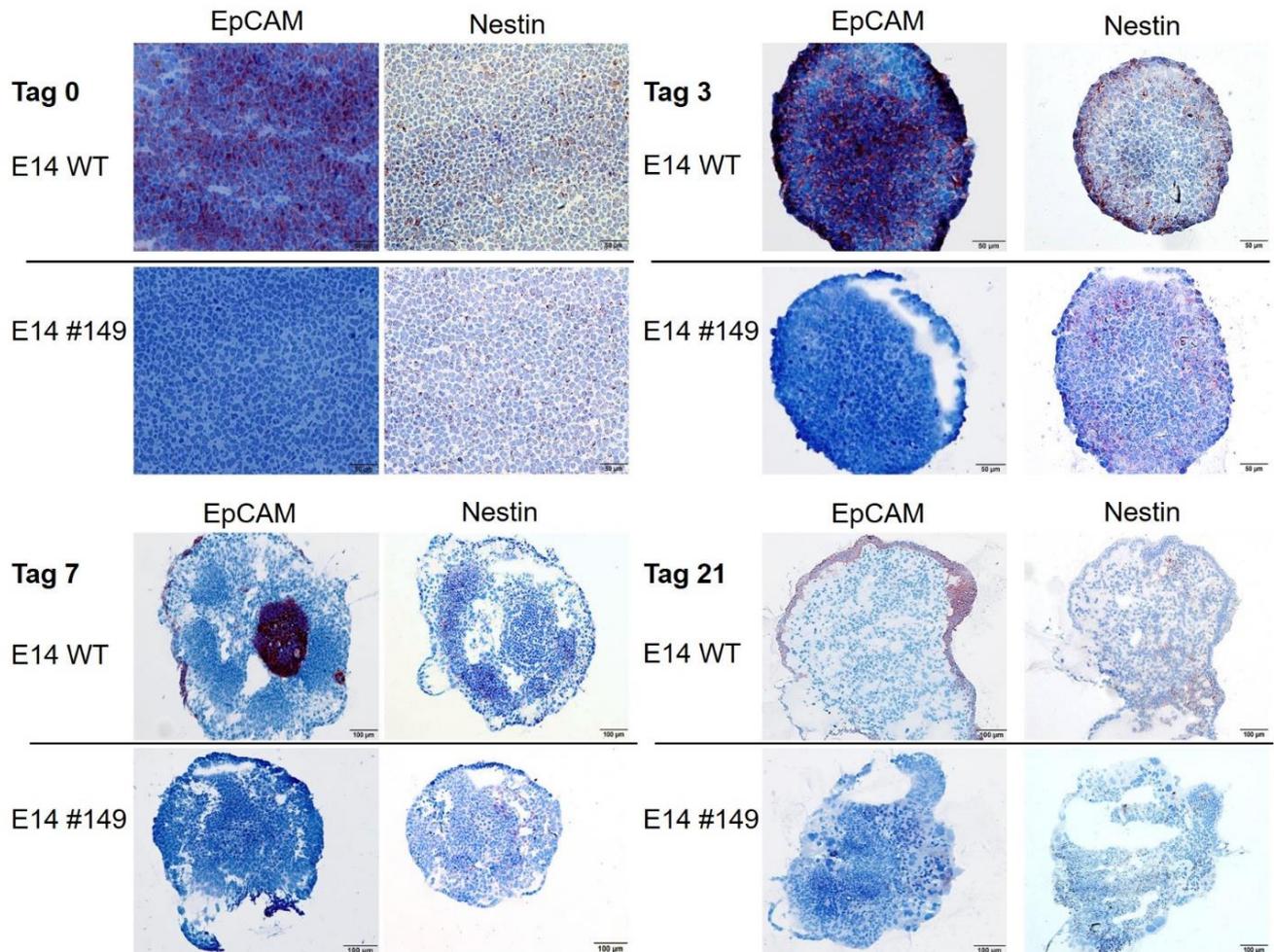


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Nestin in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.

Die Nestin Expression unterscheidet sich in den WT Embryoid Bodies und EpCAM-Knockout Embryoid Bodies nicht.

Als Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung von Differenzierungsmarkern in Embryoid Bodies wird eine Übersicht an Tag 21 der Differenzierung in allen drei Knockoutlinien dargestellt (Abbildung 28). Die Vimentin Expression ist im Vergleich zu WT Embryoid Bodies an Tag 21 erhöht, die Foxa 2 Expression unterscheidet sich nicht, Nestin betreffend kann aufgrund hoher Variabilität in EpCAM-Knockout Zelllinien Embryoid Bodies keine Aussage getroffen werden.

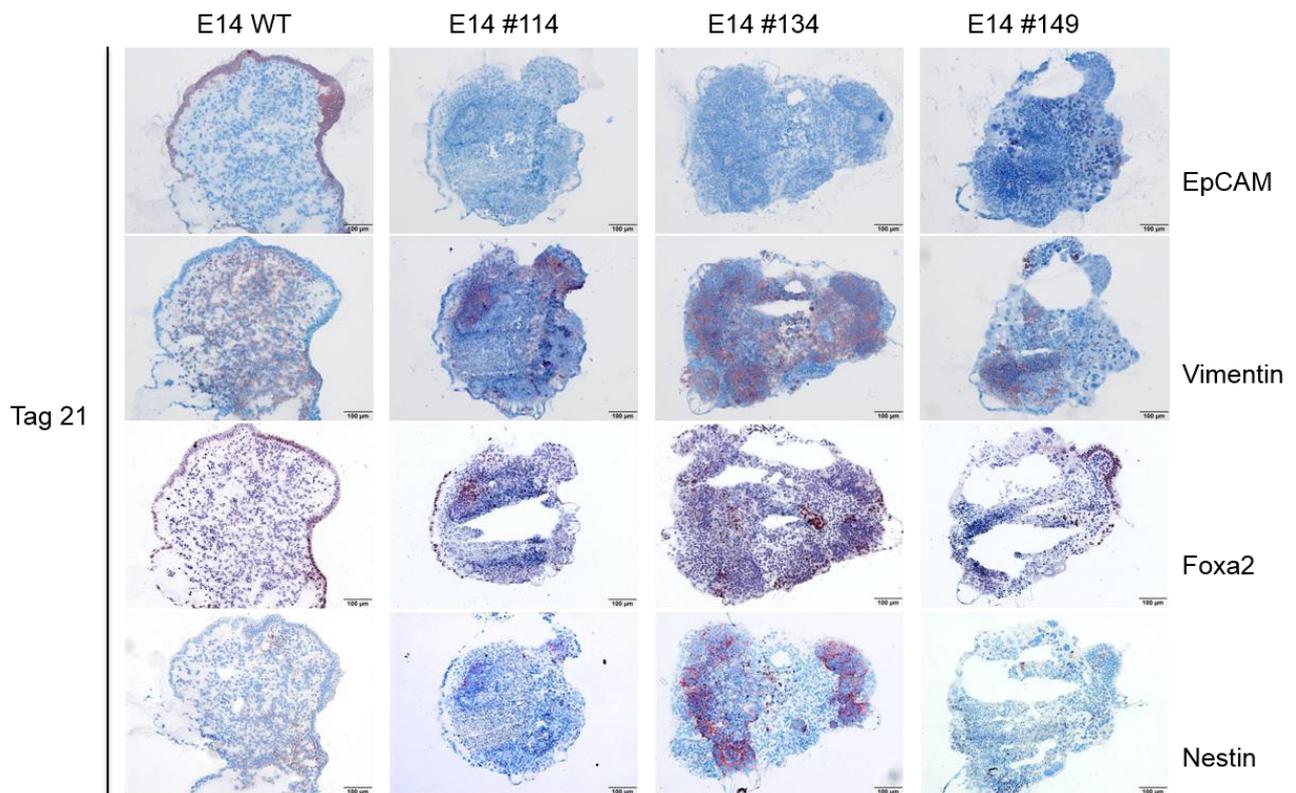


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von Differenzierungsmarkern in Knockout Embryoid Bodies am Tag 21.

In EpCAM-Knockout Embryoid Bodies ist an Tag 21 eine intensivere Vimentin Färbung nachweisbar. Bei einem zellulären Knockout von EpCAM unterscheidet sich die Foxa2 Expression an Tag 21 der Differenzierung nicht. Die Nestin Expression ist in An- und Abwesenheit von EpCAM äußerst variabel, weswegen keine Aussage über ektodermale Differenzierung gemacht werden kann.

4.2.3.6 Immunhistochemische Untersuchung von epithelialen Markern in Embryoid Bodies

EpCAM ist ein epitheliales Transmembranprotein und wird als epithelialer Oberflächenmarker verwendet. Ob sich bei einem EpCAM-Knockout ausgereifte Epithelien entwickeln, wurde durch eine Färbung mit Zytokeratin 8 und 18 (CK8/18) im Zeitverlauf nach Tag 3, 7 und 21 im Differenzierungsassay überprüft. CK 8 und 18, obligat gemeinsam exprimiert, sind Marker für viele einfache Epithelien (Karantza 2011). In Abbildung 29 sind die Färbungen eines repräsentativen Embryoid Body der Zelllinie #114 im Vergleich zu gefärbten WT Embryoid Bodies dargestellt. Es wurde auf EpCAM und auf CK8/18 gefärbt. Eine klar erkennbare CK8/18 Färbung ließ sich erst ab Tag 21 nachweisen (Abbildung 29). Diese entspricht in den EpCAM-positiven WT-Zellen der EpCAM-Expression. Da auch wenige Zellen in den Knockout Embryoid Bodies CK8/18 positiv waren, ist davon auszugehen, dass trotz fehlendem EpCAM ES-Zellen zu Epithel differenzieren können.

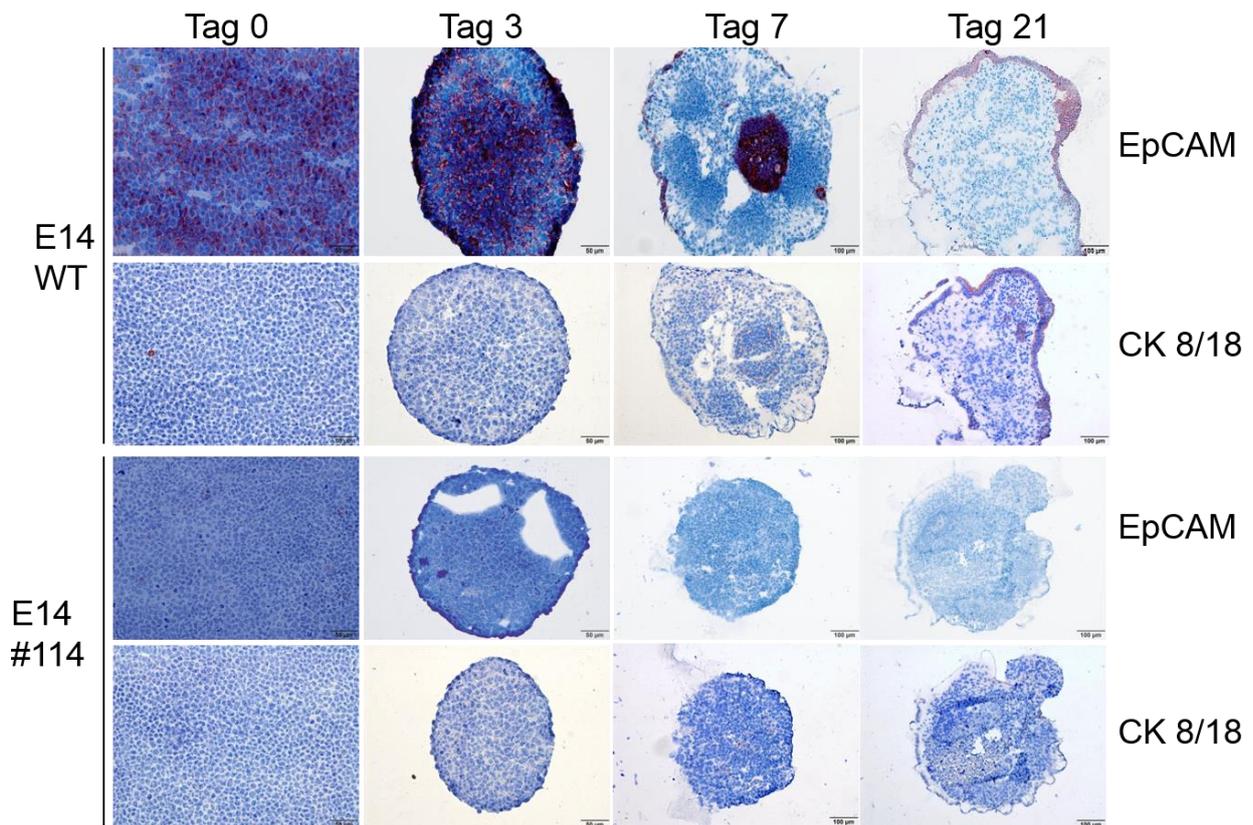


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und CK8/18 in Embryoid Bodies an den Tagen 0, 3, 7 und 21 der Differenzierung.

Erst an Tag 21 ist eine CK 8/18-Expression ersichtlich. In den WT Embryoid Bodies entspricht sie den Zellen, die auch EpCAM-positiv sind. In den Embryoid Bodies der Zelllinie #114 ist das entstandene Epithel weniger komplex.

In Abbildung 30 A ist die Expression von CK8/18 in EpCAM-positiven WT Embryoid Bodies und in #9 Embryoid Bodies als Kontrolle dargestellt. Die Embryoid Bodies der Zelllinien E14TG2α #114 und #134 können so im direkten Vergleich zu EpCAM-positiven Zellen gesehen werden. In der Vergrößerung bestimmter Epithelausschnitte (siehe Abbildung 30 B) ist die Lokalisation der CK8/18 Expression gut ersichtlich. In den EpCAM-positiven Embryoid Bodies ist das Epithel mehrreihig. In den Knockout Embryoid Bodies ist die CK8/18 Expression weniger stark nachweisbar, das Epithel hat einen flacheren, weniger komplexen Aufbau (Abbildung 30 B).

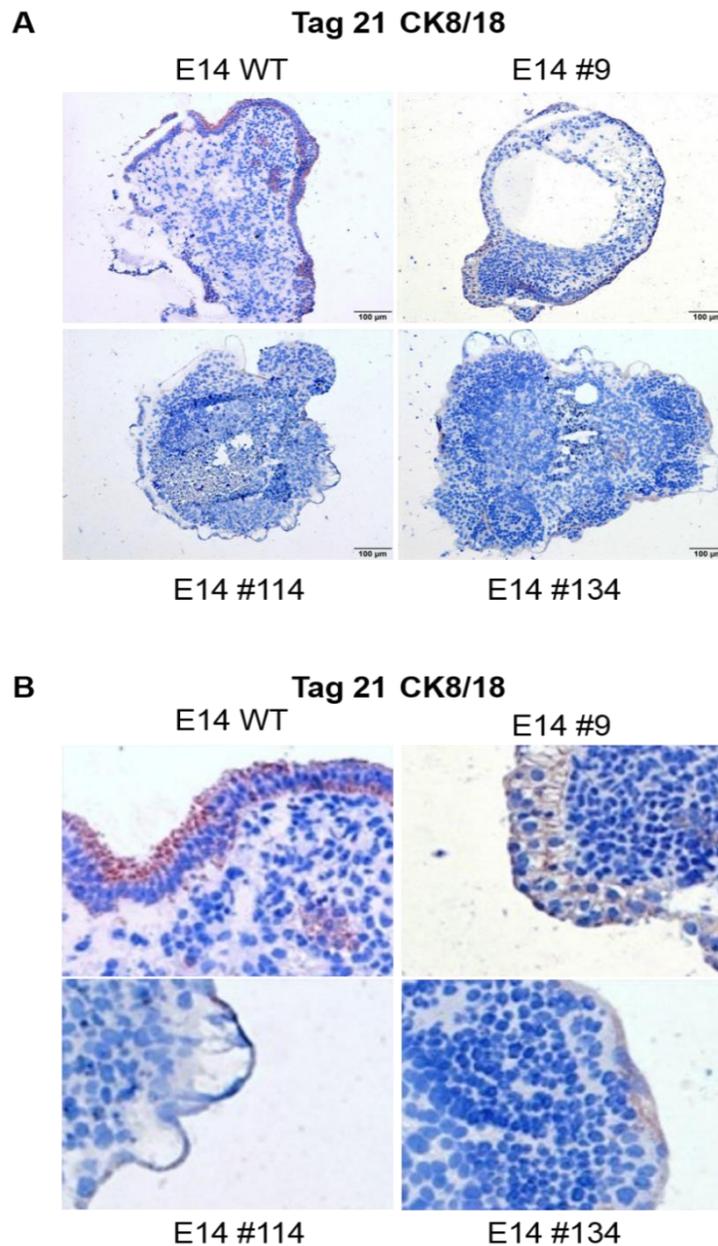


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von CK 8/18 in EpCAM positiven und negativen Embryoid Bodies an Tag 21.

Abgebildet sind EpCAM-positive WT Embryoid Bodies, #9 Embryoid Bodies dienen als CRISPR Cas9 interne Kontrollen und Embryoid Bodies der Zelllinien E14TG2 α #114 und #134 gefärbt auf CK 8/18 (A). In der Vergrößerung bestimmter Epithelausschnitte aus den Bildern von (A) ist die Lokalisation der CK 8/18 Expression gut ersichtlich. In den EpCAM-positiven Embryoid Bodies ist das Epithel mehrreihig. In den Knockout Embryoid Bodies ist sie nur sehr schwach nachweisbar, es bildet sich kein hochprismatisches Epithel aus (B).

Die Epithelentstehung wurde zusätzlich mit einer Pan Zytokeratin (Pan CK) Färbung überprüft. In Abbildung 31 sind Embryoid Bodies der WT Zelllinie, der #9 Zelllinie und der EpCAM-Knockout Zelllinien #114 und #134 auf EpCAM und PanCK gefärbt dargestellt. Wie zu erwarten, kann in den Zelllinien #114 und #134 keine EpCAM Expression nachgewiesen werden.

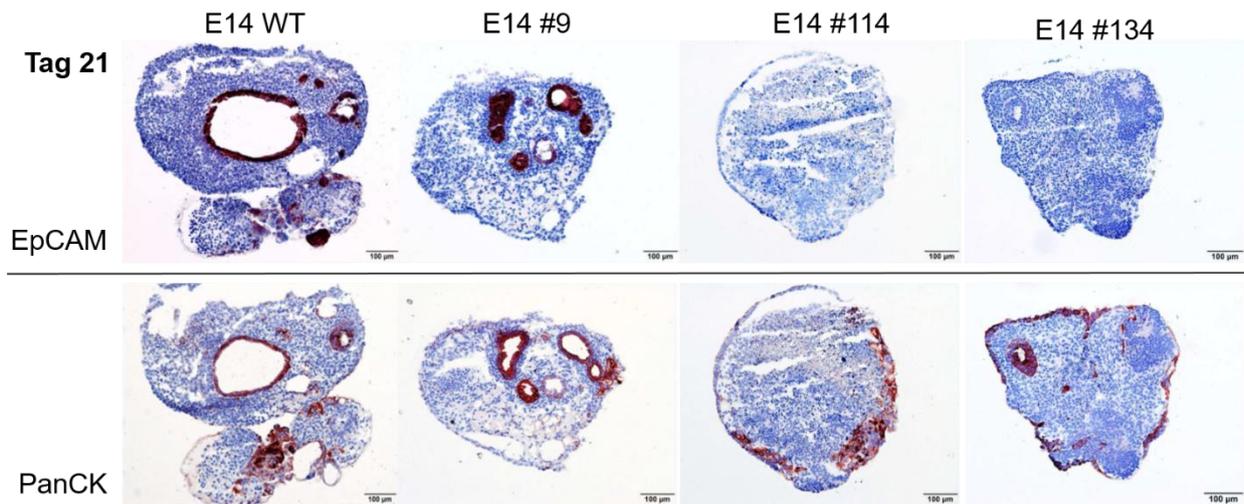


Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von EpCAM und Pan-CK in EpCAM-positiven und -negativen Embryoid Bodies an Tag 21.

Die PanCK Expression überlappt mit der EpCAM Expression. In den EpCAM-negativen Embryoid Bodies der Zelllinien #114 und #134 lässt sich auch eine PanCK Expression nachweisen.

Die PanCK Expression konnte in den EpCAM-positiven Embryoid Bodies besonders gut an Vakuolen nachgewiesen werden, die sich im Embryoid Body ausgebildet hatten (siehe Abbildung 30). Diese Expression überlappt mit der EpCAM Expression. In den EpCAM-negativen Embryoid Bodies konnten PanCK-positive Zellen bestätigt werden, die Strukturierung dieser Zellen erschien jedoch weniger geordnet. Dies lässt sich in der Vergrößerung von Abbildung 31 B deutlicher erkennen.

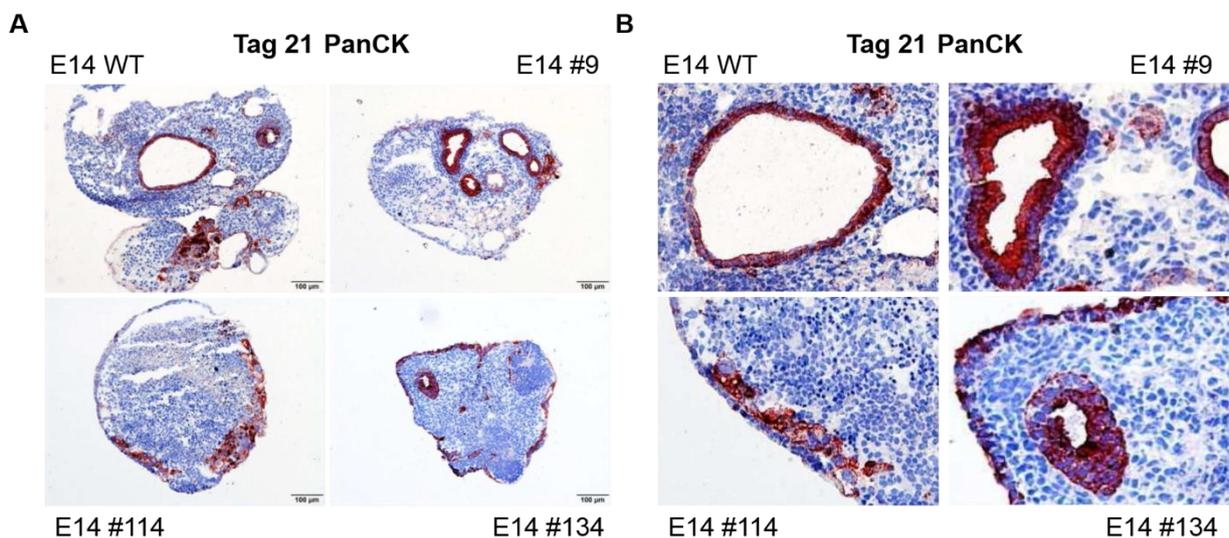


Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von PanCK in EpCAM-positiven und -negativen Embryoid Bodies an Tag 21.

(A) Abgebildet sind EpCAM-positive WT Embryoid Bodies, #9 Embryoid Bodies als Kontrollen und Embryoid Bodies der Zelllinien E14TG2α -#114 und #134 gefärbt auf PanCK. (B) In der Vergrößerung bestimmter Epithelausschnitte aus den Bildern von (A) ist die Lokalisation der PanCK Expression um Vakuolen gut ersichtlich. Vor allem im #9 Embryoid Body erkennt man hochprismatisches, strukturiertes Epithel. Im Vergleich dazu ist das Epithel der Vakuole im #134 Embryoid Body weniger strukturiert. Gezeigt sind ausgewählte repräsentative Embryoid Bodies.

4.3 Rekonstitution einer vollständigen Differenzierung von EpCAM-Knockout ES-Zellen zu Kardiomyozyten unter dem Einfluss von EpCAM-positiven ES-Zellen

Da sowohl eine exogene EpCAM Überexpression als auch ein zellulärer EpCAM-Knockout mit der kardiomyozytären Differenzierung interferiert, entwarfen wir ein Modell des Zusammenhangs der EpCAM Expression und der kardiomyozytären Differenzierung. Zellen, die zu mesodermalen Kardiomyozyten differenzieren, verringern ihre EpCAM Expression innerhalb von wenigen Tagen und weisen schlussendlich ein komplettes Fehlen von EpCAM auf. Diesen Ablauf stört sowohl die exogene Überexpression von EpCAM als auch das komplette Fehlen dieses Proteins durch den CRISPR Knockout (siehe Abbildung 33). Erklärbar wäre dies durch eine nötige Zellkommunikation auf zellulärer oder parakriner Ebene, bei der EpCAM-positive endodermale Zellen mit EpCAM negativen mesodermalen Zellen kommunizieren, damit eine Differenzierung von mesodermalen Zellen zu Kardiomyozyten möglich ist. Diese Kommunikation wäre damit fehlerhaft, wenn EpCAM-positiven Zellen in der Zellkultur fehlen. Um eine erste Bestätigung dieser These zu bekommen, wurden Versuche durchgeführt, um herauszufinden, ob es möglich ist, EpCAM-negative Zellen durch lösliche Faktoren von EpCAM-positiven Zellen zu stimulieren, Kardiomyozyten zu bilden.

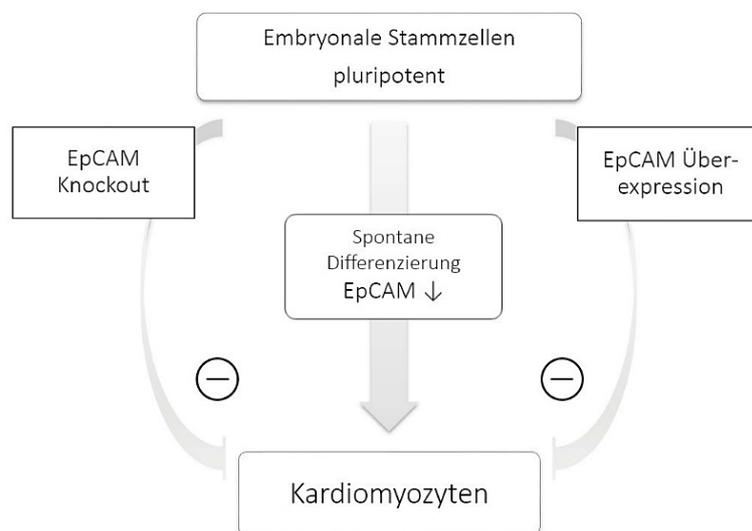


Abbildung 32: Konzept der EpCAM Expressions-Balance während der Differenzierung.

Während der spontanen Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen wird EpCAM herunterreguliert und es bilden sich kontrahierende Kardiomyozyten. Bei einer forcierten EpCAM Überexpression wird die kardiomyozytäre Differenzierung partial gehemmt. Auch bei einem zellulären EpCAM-Knockout ist die Bildung von kontrahierenden Kardiomyozyten gestört. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass eine balancierte Mischung EpCAM-negativer und -positiver Zellen im Verlauf der ESC Differenzierung notwendig ist, um eine spontane Differenzierung zu gewährleisten.

4.3.1 Rekonstitution mit löslichen Faktoren aus dem Überstand von EpCAM-positiver Kultur

Erster Ansatz war der Versuch der Rekonstitution durch lösliche Faktoren, die als Kommunikationsmittel zwischen EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen ausgetauscht werden. Hierfür wurden die Kulturüberstände von differenzierenden EpCAM-positiven Zellen gesammelt und den Differenzierungsassays von EpCAM-Knockout Zellen hinzugefügt. Überstände der Zellkulturen und von Differenzierungsassays von WT und Zelllinie #9 wurden gesammelt und weniger als 3 Tage gekühlt aufbewahrt.

An Tag 3 wurde der Überstand der hanging drops des Differenzierungsassays von EpCAM-positiven Zellen gesammelt und die entstandenen Embryoid Bodies abzentrifugiert. Anschließend wurden mit diesem im folgenden EpCAM-positiv genannten Überstand EpCAM-negative hanging drops aus den Kulturen #114 und #134 an Tag 0 ausplattiert. Diese EpCAM-negativen Embryoid Bodies wurden an Tag 3 in ultra-low-adherent plates übertragen, in dem sich wiederum EpCAM-positiver Überstand befand, also das Medium von EpCAM-positiven Embryoid Bodies am Zeitpunkt Tag 7. Bei der folgenden Übertragung in 96-well-Platten an Tag 7 wurde Medium verwendet, in welchem kontrahierende und ursprünglich EpCAM-positiv WT und #9 Embryoid Bodies kultiviert waren und das an Tag 10 gesammelt wurde. Als Kontrolle wurden WT, #9, #114 und #134 Differenzierungsassays durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 34 von den ersten vier Balken repräsentiert werden. Um auszuschließen, dass die Methode einen Einfluss auf die Kontraktion der Embryoid Bodies hat, wurde das Experiment auch mit EpCAM-negativem Überstand durchgeführt.

Weder mit dem Überstand von EpCAM-positiven WT-Zellen noch dem von #9 konnte eine Rekonstitution der kardiomyozytären Differenzierung von EpCAM-Knockout Embryoid Bodies erreicht werden.

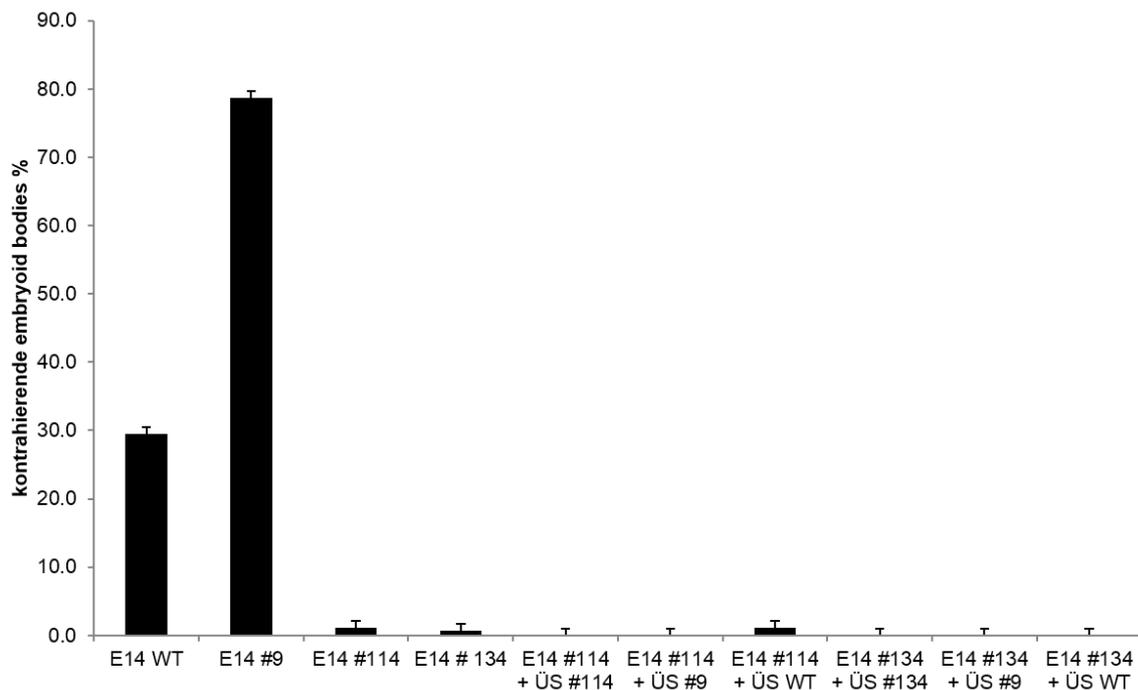


Abbildung 33: Kardiomyozytäre Differenzierung von EpCAM-negativen ESC Klonen nach Kultivierung in konditionierten Kulturüberständen von EpCAM-positiven ESC Klonen.

Aufgetragen sind WT-Kontrolle, #9 Kontrolle und die nicht kontrahierenden EpCAM-negativen Kulturen von #114 und #134. Interne Kontrolle des Versuchs ist das Differenzierungsassay mit #114 kultiviert mit Überstand aus differenzierenden #114-Zellen. Anschließend aufgetragen ist der Versuch der Rekonstruktion der Kontraktion mit Überstand aus differenzierenden #9-Zellen und WT-Zellen. Derselbe Vorgang wurde mit der Zelllinie #134 durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Es konnte keine Rekonstitution der Kontraktion von EpCAM-negativen Embryoid Bodies erreicht werden.

4.3.2 Rekonstitution durch Zell-Zell-Kontakt

Als zweiten Ansatz wurden Embryoid Bodies bestehend aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen im Differenzierungsassay verwendet, um direkte Zell-Zell-Kommunikation zu ermöglichen.

Um in den entstehenden Embryoid Bodies EpCAM-positive und EpCAM-negative Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zelllinien #9, #114 und #149 mit den fluoreszierenden Proteinen *green fluorescent protein* GFP und dem rot fluoreszierenden monomeren Protein mCherry transfiziert, wodurch die Zelllinien #9 GFP, #9 mCherry, #114 GFP, #114 mCherry, #149 GFP und #149 mCherry entstanden.

Für den ersten Teil des Versuchs wurden die Zelllinien #9 GFP, #114 mCherry und #149 mCherry verwendet.

Die EpCAM-positiven #9-Zellen wurden für die hanging drops des Differenzierungsassays mit den EpCAM-negativen #114-Zellen und separat mit #149-Zellen in den Verhältnissen 1:1, 4:1 und 1:4 gemischt.

Da die Kontrolle von #149 mCherry wider Erwarten zu 33,67 % ($\pm 14,01$) kontrahierte, sind die weiteren Ergebnisse dieser Zelllinie nicht aussagekräftig ($n=3$).

Interessanterweise waren die EpCAM- und GFP-positiven Zellen nach zehn Tagen der Differenzierung nicht als Wall um die EpCAM-negativen, mCherry-positiven Zellen angeordnet, sondern vermischt überall im Embryoid Body aufzufinden.

Bei einem Mischverhältnis von vier Teilen EpCAM-negativer Zelllinie #114 mCherry und einem Teil EpCAM-positiver Zelllinie #9 GFP ergab sich eine Kontraktion von 27,67 % ($\pm 21,13$), bei einem 1:1 Verhältnis eine Menge an kontrahierenden Embryoid Bodies von 32,67 % ($\pm 17,21$) und bei vier Teilen #9 GFP und nur einem Teil 114 mCherry 65,00 % ($\pm 12,77$). Somit konnte durch die Mischung von einem relevant höheren Anteil von EpCAM-negativen Zellen zu EpCAM-positiven Zellen eine Steigerung der kardiomyozytären Differenzierung erreicht werden.

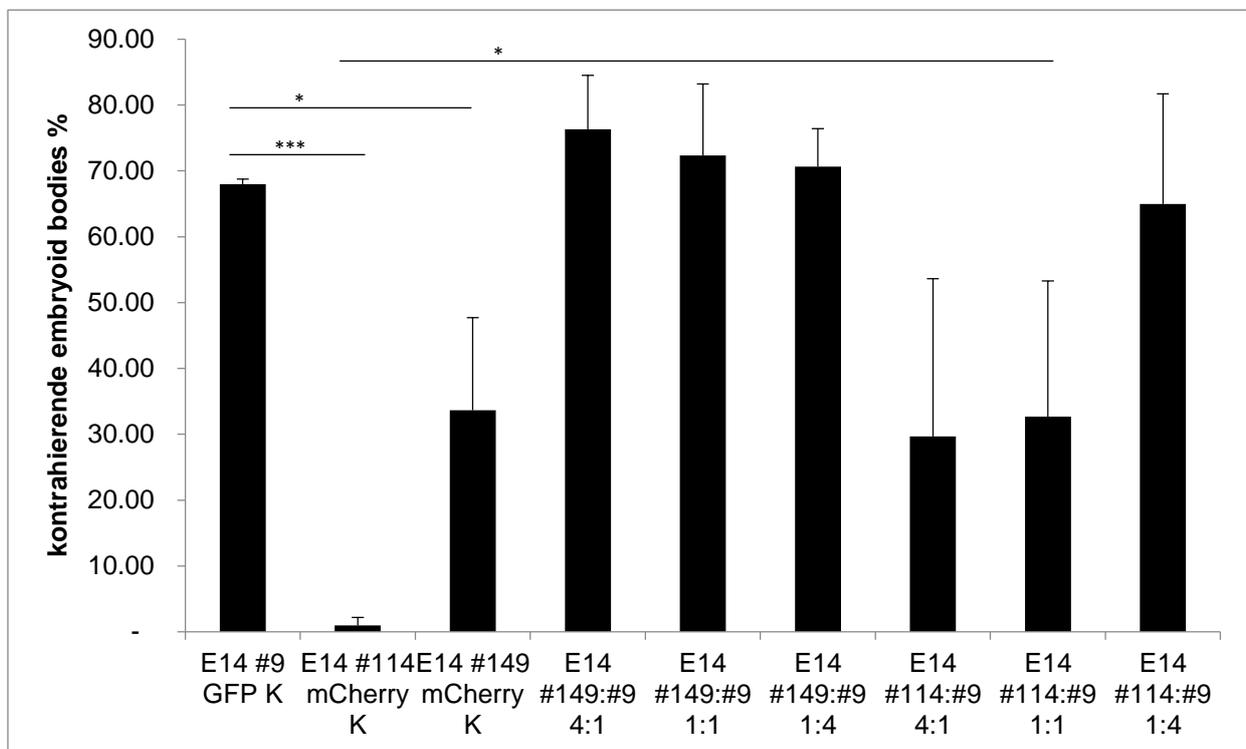


Abbildung 34: Embryoid Bodies aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen im Verhältnis 1:1, 4:1 und 1:4.

Als Kontrolle wurden die transfizierten Zelllinien #9 GFP und #114 mCherry und #149 mCherry ausplattiert. Die Kontrolle #9 GFP generierte 68 % ($\pm 3\%$) kontrahierende Embryoid Bodies, die Zelllinie #114 mCherry signifikant verringert 1 % ($\pm 1\%$) (p-Wert #114 vs #9 0,000003), doch Zelllinie #149 mCherry bildete 33,67 % ($\pm 14,01$) kontrahierende Embryoid Bodies (p-Wert #149 vs #9 0,01), im Gegensatz zu vorhergehenden Differenzierungsassays mit der Zelllinie #149 [4,9 % ($\pm 4,28\%$)]. Durch die Vermischung mit wenigen EpCAM-positiven #9 GFP Zellen begannen 27,67 % ($\pm 21,13$) der Embryoid Bodies bestehend aus einem 4:1 Verhältnis #114 mCherry:#9 GFP zu kontrahieren (p-Wert für 4:1 vs #114 K signifikant von 0,055; p-Wert für 1:1 vs #114 K 0,03). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Dies veranlasste eine weitere Untersuchung der Embryoid Bodies unter dem Fluoreszenzmikroskop, um herauszufinden, ob EpCAM-negative, mCherry positive #114 Zellen in den gemischten Embryoid Bodies kontrahieren, also um auf Einzelzelllevel nachzuweisen, dass durch die Stimulation durch EpCAM-positive Zellen die EpCAM-Knockout Zellen zu Kardiomyozyten differenziert sind.

Für diesen zweiten Teil des Versuchs wurden die Zelllinien #9 mCherry, #114 GFP und #149 GFP verwendet, da sich die Expression von mCherry in den Zelllinien #114 und #149 zu schwach für das Fluoreszenzmikroskop herausstellte. Als Bestätigung des oben gezeigten Experiments wurde dieses auch für die Zelllinien #9 mCherry, #114 GFP und #149 GFP im Rahmen des Fluoreszenzmikroskopversuchs wiederholt.

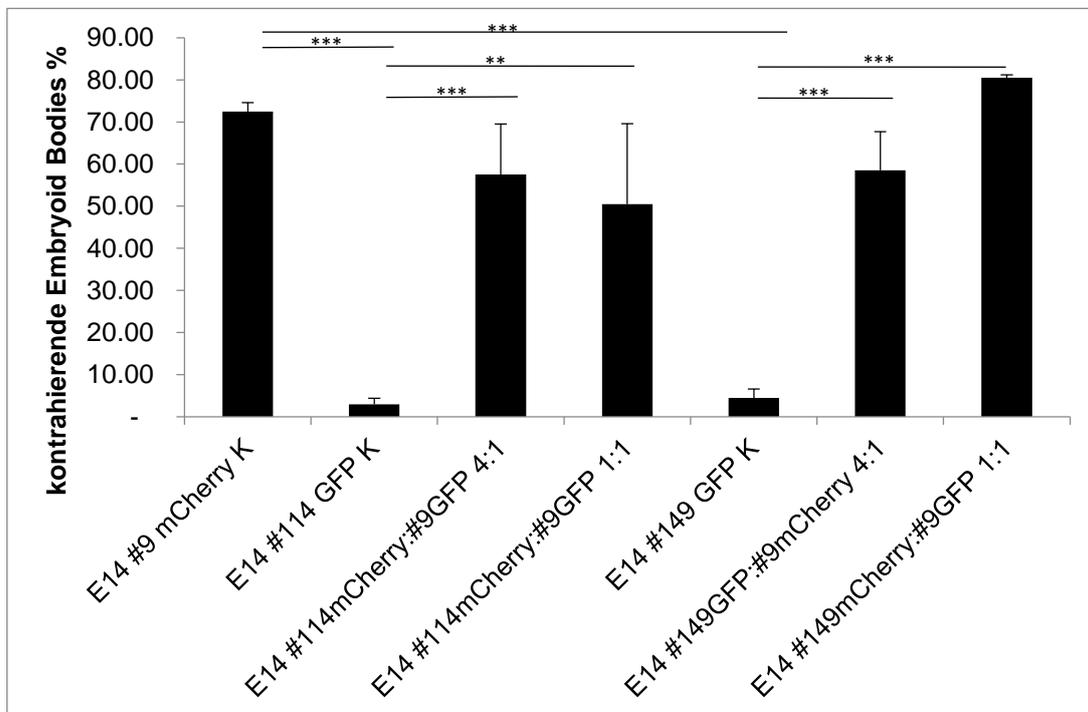


Abbildung 35: Embryoid Bodies aus EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Zellen im Verhältnis 1:1 und 4:1.

Als Kontrolle wurden die Zelllinien #9 mCherry, #114 GFP und #149 GFP ausplattiert. #9 mCherry bildete 72,5 % ($\pm 2,12\%$) kontrahierende Embryoid Bodies, die Zelllinie #114 GFP 3 % ($\pm 1,41\%$) (p-Wert #114 vs #9 0,000007) und die Zelllinie #149 GFP bildete 4,50 % ($\pm 2,12$) kontrahierende Embryoid Bodies (p-Wert #149 vs #9 0,000006). Durch die Vermischung mit wenigen EpCAM-negativen #9 mCherry Zellen begannen 57,50 % ($\pm 12,02$) der Embryoid Bodies bestehend aus einem 4:1 Verhältnis #114 GFP:#9 mCherry zu kontrahieren und 58,50 % ($\pm 9,19$) der Embryoid Bodies bestehend aus einem 4:1 Verhältnis #149 GFP:#9 mCherry (p-Wert für #114 4:1 vs #114 K 0,0004; für #114 1:1 vs #114 K 0,004; p-Wert für #149 4:1 vs #149 K 0,0002 für #149 1:1 vs #149 K 0,00001). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Im Rahmen dieses Versuchs wurde ein zweiter Ansatz Embryoid Bodies aus denselben Zellen an Tag 7 von den ultra low adherent plates auf Objektträger übertragen. Diese wurden fixiert und gefärbt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

In Abbildung 36 sind die Kontrollen des Versuchs dargestellt. In Abbildung 36 (A) wurde der Embryoid Body bestehend aus #9 mCherry Zellen auf mCherry und α CAA analysiert. Dieser kontrahierende Embryoid Body weist eine α CAA- Expression auf. In Abbildung 36 (B) sieht man die Kontrolle #149 GFP, die nicht kontrahiert und kein α CAA exprimiert.

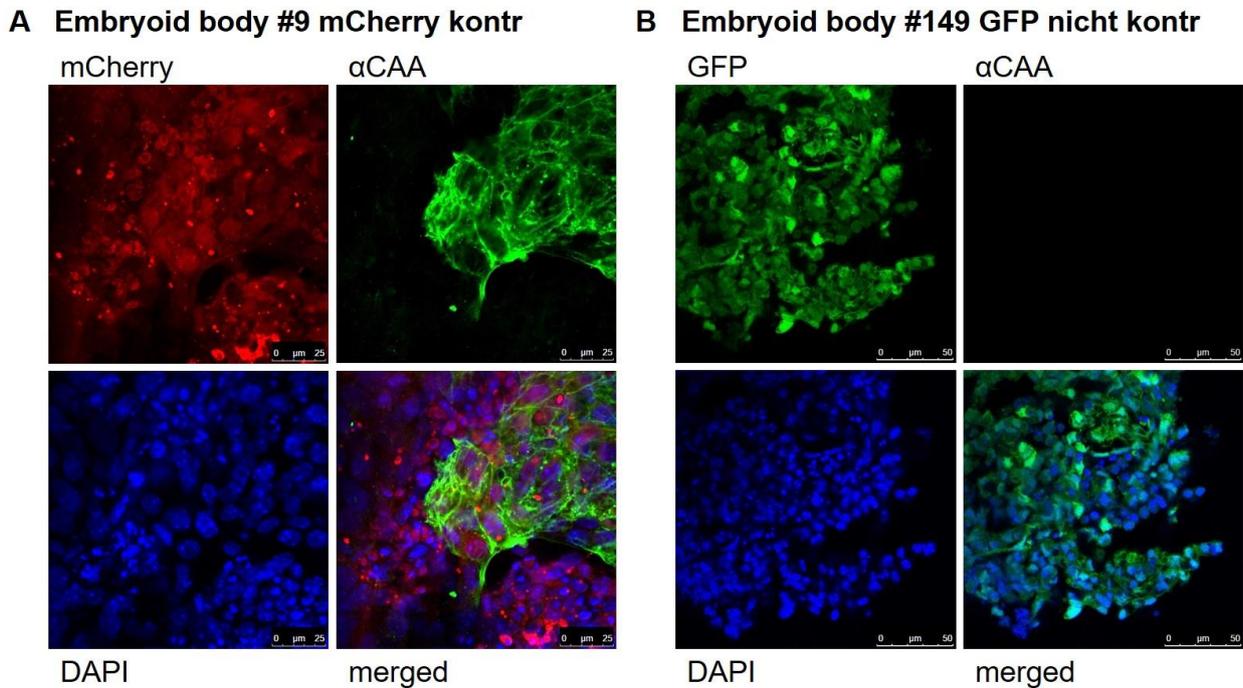


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kontroll Embryoid Bodies kontrahierend #9 mCherry (A) und nicht kontrahierend #149 GFP (B) des Mischversuchs.

A) Dargestellt sind Aufnahmen des kontrahierenden Embryoid Body #9 mCherry, gefärbt mit dem Erstantikörper gegen α CAA als kardiomyozytäres Protein und dem Zweitantikörper A488. Angeregt wurde die Aufnahme mit dem Laser He/Ne 594 (Intensität 35%) für mCherry in rot, dem Argon Laser 488 (Intensität 26%) gegen α CAA in grün und mit der Laser Diode 405 (Intensität 10%) gegen DAPI zur Darstellung der Zellkerne in blau. Man kann die kontrahierenden Areale durch die Überlappung von mCherry und α CAA im Bild unten rechts erkennen. **(B)** Als weitere Kontrolle ist ein nicht kontrahierender Embryoid Body bestehend aus #149 GFP, gefärbt mit dem Erstantikörper gegen α CAA und dem Zweitantikörper A647, gezeigt. Dieser Embryoid Body wurde mit dem Argon Laser 488 gegen GFP, dem Laser He/Ne 633 gegen α CAA (A647) und der Laser Diode 405 gegen DAPI angeregt. Aufgrund der verschiedenen Anregungsspektren von mCherry und GFP mussten unterschiedliche Zweitantikörper gegen den Erstantikörper von α CAA gewählt werden. Es wurde ein repräsentativer Embryoid Body von drei analysierten ausgewählt.

Es wurden interne Kontrollen der Einstellungen der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt, um zum Beispiel auszuschließen, dass das Hintergrundsignal fälschlicherweise eine α CAA Expression anzeigt oder dass das sichtbare α CAA Signal unspezifisch ist (Abbildung 37).

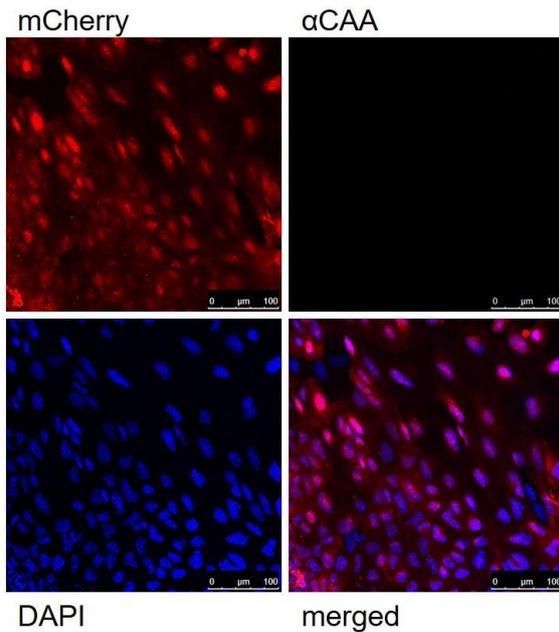
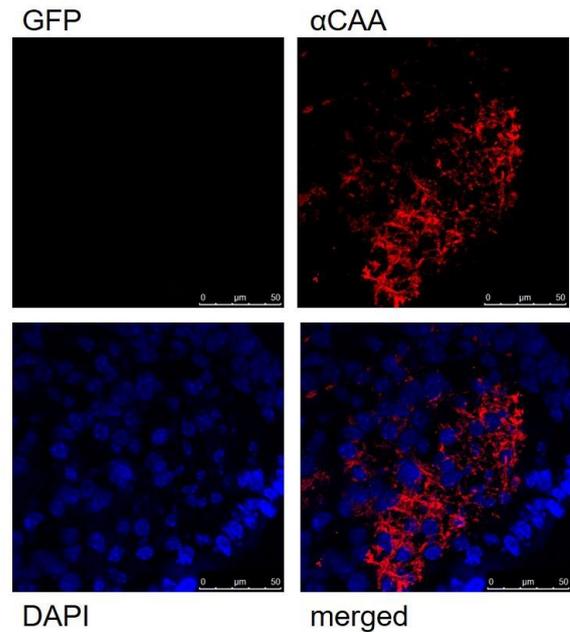
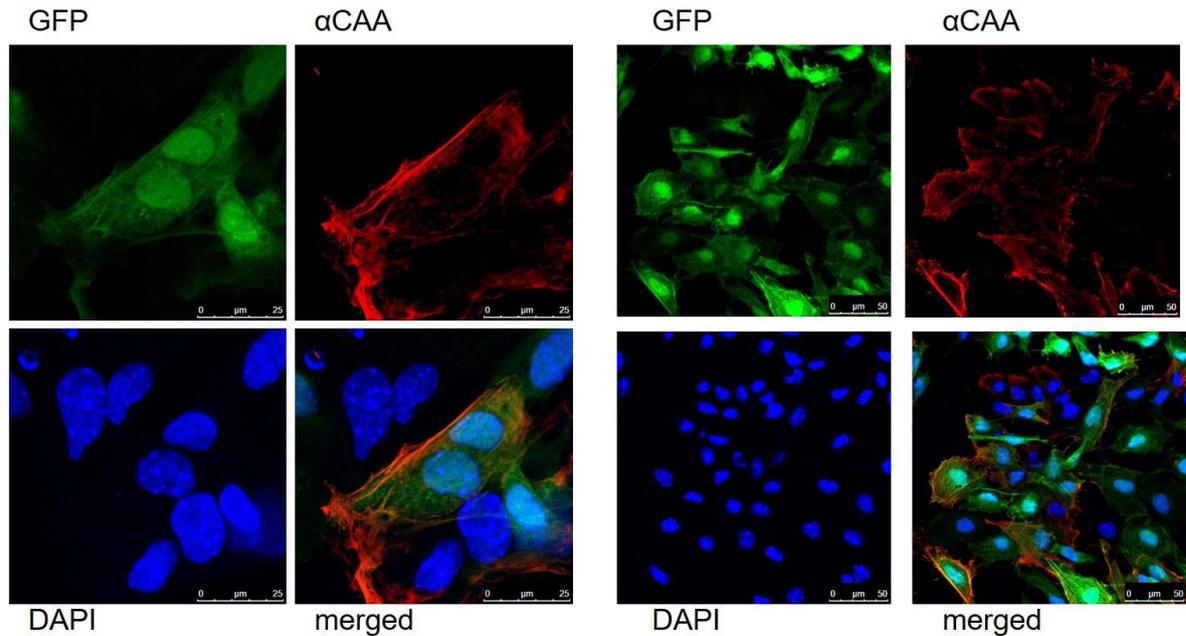
A Embryoid body #9 mCherry kontr**B Embryoid body WT kontr**

Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Einstellungskontrollen anhand des kontrahierenden Embryoid Body #9 mCherry (A) und einem kontrahierender WT Embryoid Body Tag 8 (B).

(A) Dargestellt sind Aufnahmen des kontrahierenden Embryoid Body #9 mCherry, nur mit dem Zweitantikörper A488 gefärbt. Angeregt wurde die Aufnahme mit denselben Einstellungen wie die Kontroll-Embryoid Bodies von Abbildung 37 und die Ergebnisse von Abbildung 39 und zwar mit dem Laser He/Ne 594 (Intensität 35%) für mCherry in rot, dem Argon Laser 488 (Intensität 26%) gegen α CAA in grün und mit der Laser Diode 405 (Intensität 10%) gegen DAPI zur Darstellung der Zellkerne in blau. Ohne α CAA-Erstantikörper ist mit den verwendeten Einstellungen kein Signal oben rechts erkennbar. (B) Als Kontrolle für die Einstellung von Abbildung 37 B ist ein kontrahierender WT Embryoid Body Tag 8 verwendet worden, gefärbt mit dem Erstantikörper gegen α CAA und dem Zweitantikörper A647, gezeigt. Dieser Embryoid Body wurde genauso wie der oben gezeigte mit dem Argon Laser 488 gegen GFP, dem Laser He/Ne 633 gegen α CAA (A647) und der Laser Diode 405 gegen DAPI angeregt. Dieser Embryoid Body ist GFP negativ, zeigt also kein Signal oben links. Oben rechts ist eine α CAA Expression erkennbar, die Positivkontrolle für α CAA- Erstantikörper und den Zweitantikörper A647 ist korrekt.

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt. Detektiert wurden nur die EpCAM-negativen Zellen, die in diesem Versuch GFP-positiv sind. In der Überlappungsaufnahme kann man auf Einzelzellniveau erkennen, dass EpCAM-negative Zellen α CAA exprimieren (in rot). Auch GFP-negative Zellen exprimieren α CAA (Abbildung 39 B). In Abbildung 39 C sieht man die Interaktion einer EpCAM-positiven (GFP-negativen) und einer EpCAM-negativen (GFP-positiven) Zelle via Zell-Zell-Kontakt. Beide exprimieren α CAA, sind also zu Kardiomyozyten differenziert.

A Embryoid body 4:1 #149 GFP:#9 mCherry B



C

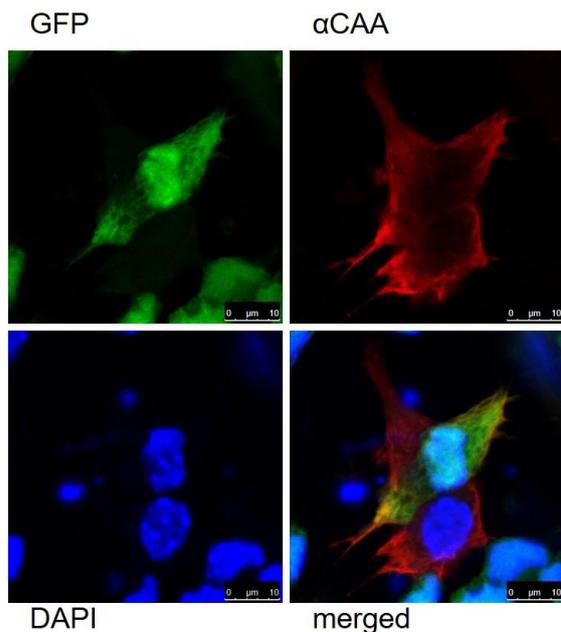


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der gemischten Embryoid Bodies aus #149 GFP und #9 mCherry.

Dargestellt sind Aufnahmen von Ausschnitten aus kontrahierenden Embryoid Bodies bestehend aus vier Teilen #149 GFP und einem Teil #9 mCherry. Gefärbt wurden diese Präparate mit dem Erstantikörper gegen α CAA und dem Zweitantikörper A594. Angeregt wurden die Zellen mit dem Argon Laser 488 (Intensität 26%) gegen GFP in grün, dem Laser He/Ne 594 (Intensität 7%) gegen α CAA (Alexa594) in rot, und mit der Laser Diode 405 (Intensität 10%) gegen DAPI in blau. Durch die GFP Markierung werden nur EpCAM-negative Zellen dargestellt. Die EpCAM- und mCherry-positiven Zellen wurden nicht angeregt, sind also auf den Abbildungen schwarz. In (A) lässt sich eine GFP-positive grüne Zelle erkennen, die zugleich α CAA-positiv und rot ist. In (B) gibt es Areale, die GFP-negativ sind (also EpCAM-positiv waren) und zugleich α CAA-positiv. Also haben sich auch ursprünglich EpCAM-positiven Zellen zu Kardiomyozyten entwickelt. In (C) ist eine EpCAM-negative, GFP-positive Zelle gezeigt, die Zell-Zell-Kontakt zu einer GFP-negativen Zelle hat (man kann davon ausgehen, dass diese Zelle mCherry-positiv ist und ursprünglich EpCAM-positiv war). Beide Zellen exprimieren α CAA (in rot). Es wurde drei repräsentative Auschnitte (A), (B) und (C) aus insgesamt 6 betrachteten Embryoid Bodies ausgewählt.

Auch für diese Einstellungen wurden Kontrollen angefertigt, um auszuschließen, dass mCherry angeregt wird oder der Zweitantikörper von α CAA unspezifisch reagiert (Abbildung 39).

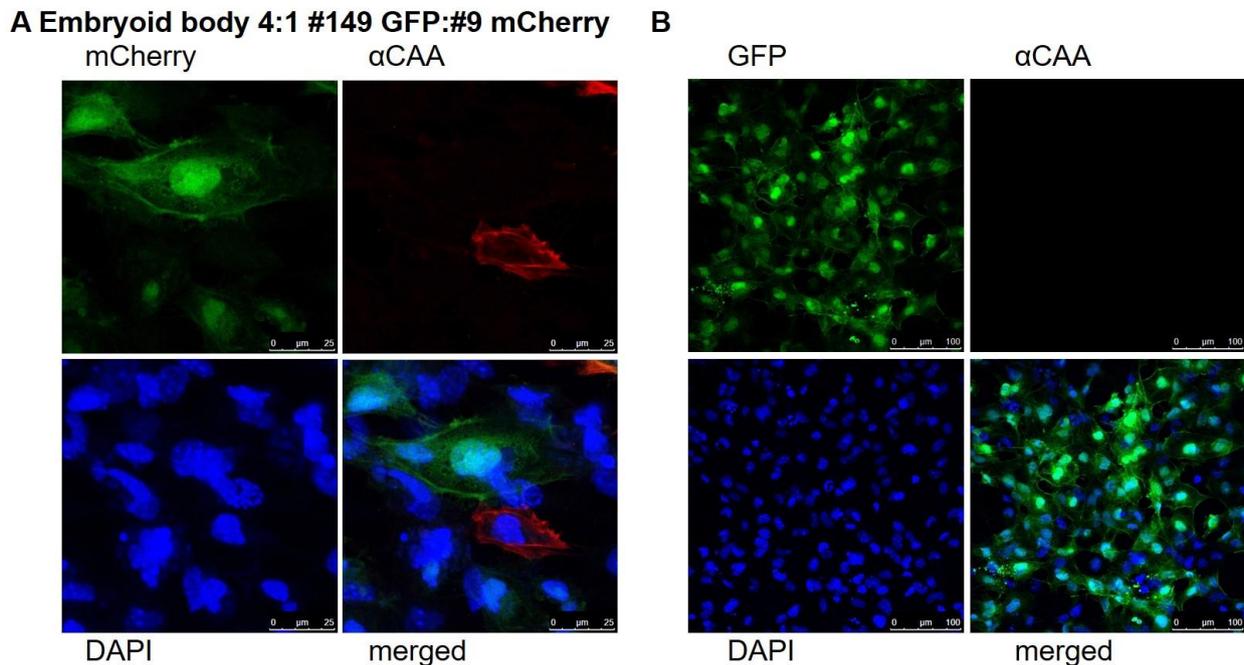


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Einstellungskontrollen der gemischten Embryoid Bodies #149 GFP und #9 mCherry: (A) und (B).

(A) Dargestellt ist eine Aufnahme eines gemischten Embryoid Body gefärbt mit α CAA und Zweitantikörper A594, angeregt mit denselben Lasereinstellungen wie in Abbildung 38. Die Anregung von A594 stellt nicht mCherry dar, denn sonst müssten die GFP-negativen Zellen von Bild oben links (Darstellung von GFP), deren Kerne man im DAPI Bild unten links identifizieren kann, auch rot sein. Es gibt keinen cross-talk zwischen den Lasern, sonst wäre die rote α CAA-positive Zelle im Bild oben rechts auch im GFP-Bild oben links erkennbar. (B) Dieses Präparat mit gemischten Embryoid Bodies wurde nur mit dem Zweitantikörper Alexa594 gefärbt. Ohne α CAA- Erstantikörper ist mit den verwendeten Einstellungen kein Signal oben rechts erkennbar. Außerdem ist kein mCherry Signal erkennbar, mCherry wird also mit den verwendeten Einstellungen nicht angeregt.

4.4 Teratom und Teratokarzinombildung *in vivo*

Pluripotente embryonale Stammzellen können bei Implantation in immunsupprimierte Mäuse Tumore bilden, sogenannte Teratome (Reya et al. 2001), bzw. Teratokarzinome. Um den möglichen Einfluss von EpCAM und ERas auf Tumorigenität und die Differenzierung in den Teratokarzinomen zu messen, wurde ein Teratom/Teratokarzinomassay durchgeführt. Dadurch lässt sich außerdem die Pluripotenz der Stammzellen überprüfen, da nur pluripotente Zellen Teratome bilden (Zhang et al. 2012).

Das Teratom/Teratokarzinomassay wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Roland Rad der II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische

Universität München, durchgeführt. Pluripotente embryonale Stammzellen wurden im Stadium von 70 % Konfluenz mit Trypsin gelöst und geerntet, dreimal in PBS gewaschen und in Medium ohne LIF gelöst. Diese Zellen wurden in einer 1:1 Suspension ($0,5-1 \times 10^6$ Zellen in 100 μL Volumen) mit Matrigel immuninkompetenten NOD (Non-Obese Diabetic)-SCID (Severe combined immunodeficient)-Gamma (NSG) Mäusen mit defektem angeborenem Immunsystem, ohne funktionelle T- oder B-Zellen und inhibierter Differenzierung von natürlichen Killerzellen (Shultz et al. 2005) in die Flanken injiziert. Im ersten Versuch waren die Mäuse zum Zeitpunkt der Injektion zwischen 18,4 und 26,1 Wochen alt, zwischen 19,6 g und 28,7 g schwer und weiblich. Es wurden 1×10^6 Zellen injiziert, die Tumore mussten nach 15 Tagen entnommen werden. Dabei wurde sich an das Vorgehen von Takahashi *et al.* (2003) gehalten. Da die Tumore mit einer Million Zellen sehr groß waren, wurde der Versuch mit verringerter Zellzahl wiederholt. Im zweiten Experiment waren die Mäuse zum Zeitpunkt der Injektion zwischen 80,3 und 90,3 Wochen alt und zwischen 14,1 g und 33,3 g schwer. Es wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen injiziert, die gebildeten Tumore wurden nach 17 Tagen freundlicherweise von Roman Maresch isoliert und zur Verfügung gestellt.

In Versuch 1 wurde die Zelllinie ΔpCAG als Kontrollzelllinie verwendet. Dabei fiel eine hohe Variabilität der Teratombewichte in der Kontrollgruppe ΔpCAG auf. Teratome der Zelllinie EpCAM und ERas unterschieden sich in ihrer Größe nicht signifikant, die Tumore der EpCAM-Knockout Zelllinien waren etwas größer im Vergleich zu EpCAM und ERas Überexpression Zelllinien, dies war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 41).

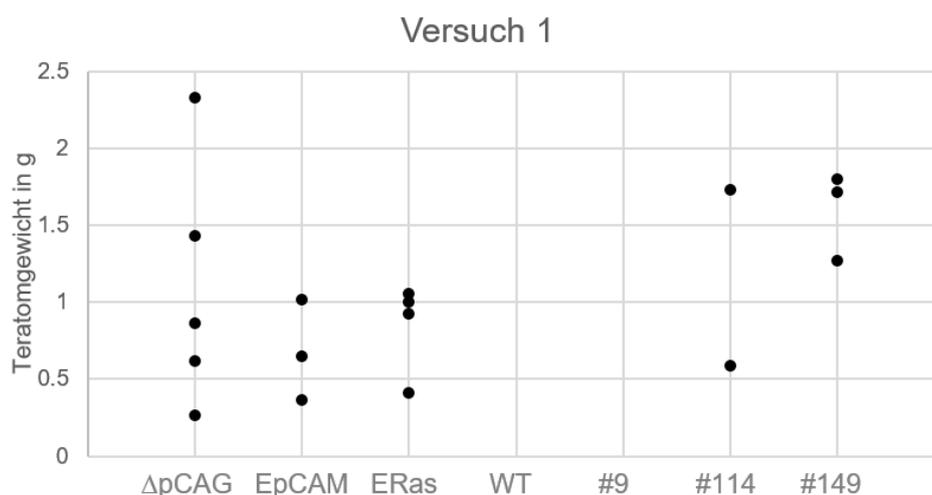


Abbildung 40: Gewicht der ΔpCAG , EpCAM, ERas, #114 und #149 Teratome dargestellt im Punktdiagramm (Experiment 1).

Die Teratome der Zelllinie ΔpCAG wurde als Kontrollzelllinie verwendet. Das Gewicht der Teratome der Kontrollgruppe ΔpCAG befand sich zwischen 0,26 g – 2,33 g. Die Teratome der Überexpressionszelllinien EpCAM und ERas und der EpCAM-Knockout-Zelllinien #114 und #149 unterschieden sich im Gewicht nicht signifikant. Eine Maus wurde an Tag 15 tot aufgefunden.

Im 2. Experiment wurde die injizierte Zellzahl halbiert. Es wurde die Anzahl an Kontrollzelllinien erhöht und durch Injektion von WT Zelllinie und #9 Zelllinie ergänzt. Deutlich lässt sich erkennen, dass sich durch EpCAM Überexpression und durch EpCAM-Knockout keine Veränderung am Gewicht der Tumore ergeben hat (Abbildung 42).

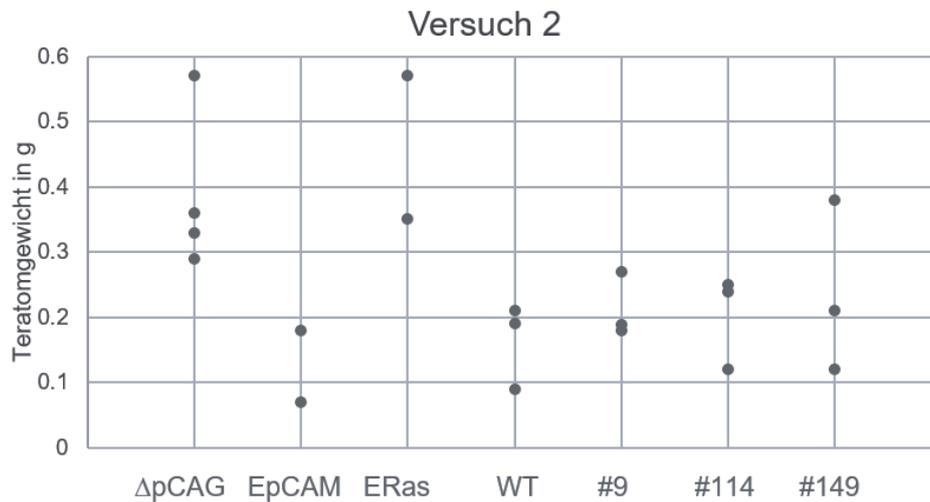


Abbildung 41: Gewicht der Teratome gebildet aus der Kontrollzelllinie Δ pCAG, WT und #9, sowie den Überexpressions-Zelllinien EpCAM und ERas und den Knockout Zelllinien #114 und #149 dargestellt im Punktdiagramm (Experiment 2).

In Versuch 2 waren die Tumore bei halbiertter Zellzahl leichter als in Versuch 1. Es wurde die Varianz an Kontrollzelllinien erhöht und durch WT und #9 ergänzt. ERas Teratome waren im Schnitt etwas größer als die restlichen Zelllinien, dies war jedoch nicht signifikant. Es konnten keine Unterschiede im Teratombgewicht beobachtet werden.

4.4.1 Einfluss einer Überexpression von ERas und EpCAM auf die Teratom- oder Teratokarzinombildung

Von Bedeutung zur Beurteilung der Tumorigenität eines Proteins ist die Analyse der Effizienz der Tumorbildung, wenn etwas an der Expression des Proteins verändert wird. Die Zelllinie EpCAM TF bildete Teratome in fünf von fünf Mäusen, die Zelllinie Flag ERas in vier von fünf Mäusen im Experiment 1. In Abbildung 43 sind die auf Millimeterpapier fotografierten Tumore dargestellt. ERas und EpCAM ES-Zellen wurden jeweils in gegenüberliegende Flanken derselben Maus injiziert. Die Kontrollzelllinie Δ pCAG wurde in dieselben Mäuse injiziert wie die Knockout Zelllinien, zum makroskopischen Vergleich sind diese jedoch auch in Abbildung 43 aufgenommen worden. ERas-Überexpressionstumore wiesen makroskopisch eine starke Vaskularisierung auf (Abbildung 43).

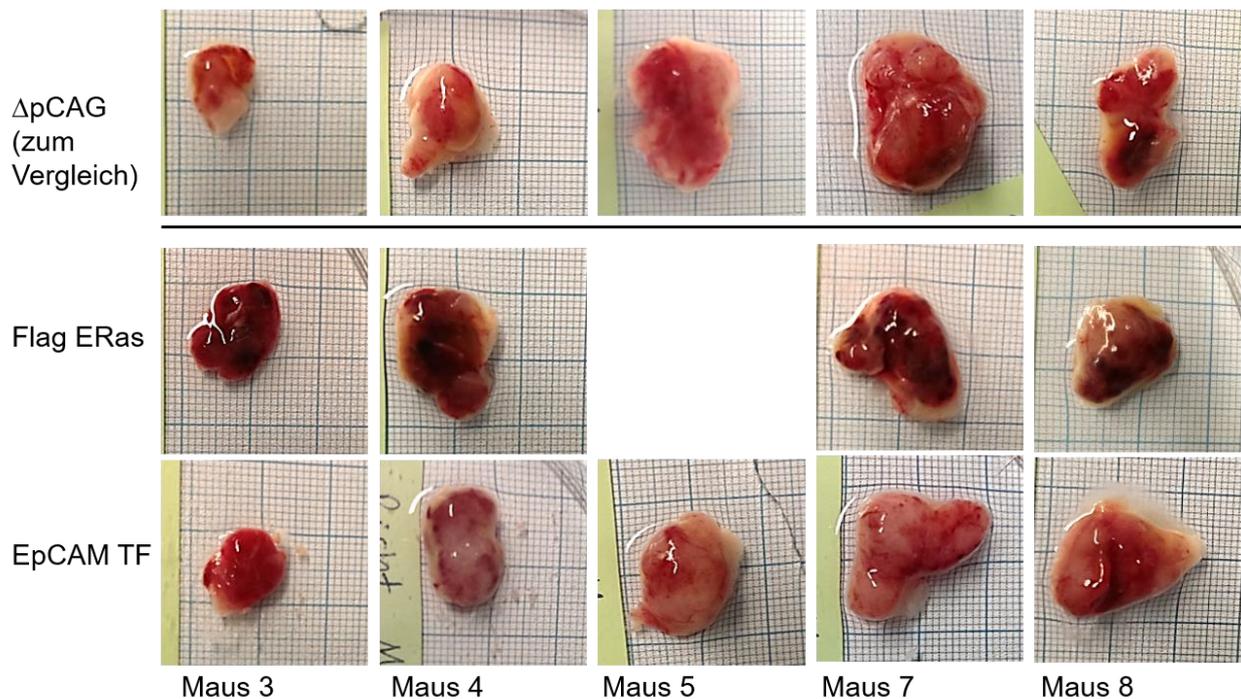


Abbildung 42: Makroskopischer Aspekt der Teratome von Maus 3 bis 8 auf Millimeterpapier (Experiment 1).

Die EpCAM Teratome waren im Mittel 0,96 g ($\pm 0,47$ g) schwer, die ERas Teratome 0,85 g ($\pm 0,30$ g). EpCAM und ERas Tumore weisen keinen statistisch signifikanten Größenunterschied auf (p-Wert für EpCAM vs ERas 0,68). Die ERas-Tumore sind stärker vaskularisiert.

Die Gewichte der gebildeten Tumore unterschieden sich nicht signifikant. EpCAM und ERas Tumore waren vergleichbar schwer (Abbildung 44).

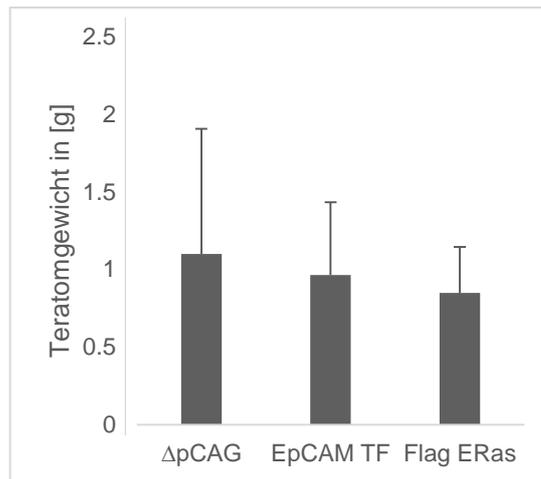


Abbildung 43: Gemittelte Gewichte der Teratome der Zelllinien ΔpCAG, EpCAMTF und FlagERas (Experiment 1).

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Tumorgewichte bei EpCAM oder ERas Überexpression. Die hohe Standardabweichung der Kontrollgruppe ΔpCAG erschwert einen aussagekräftigen Vergleich.

Im zweiten Experiment entstanden 4/4 Tumore aus der Kontrollzelllinie ΔpCAG, 2/2 aus der Zelllinie EpCAM TF und 2/2 aus der Zelllinie, die konstitutiv aktives ERas exprimiert. ERas Tumore waren wieder stark vaskularisiert. Die EpCAM Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Größe der Tumore (Abbildung 45).

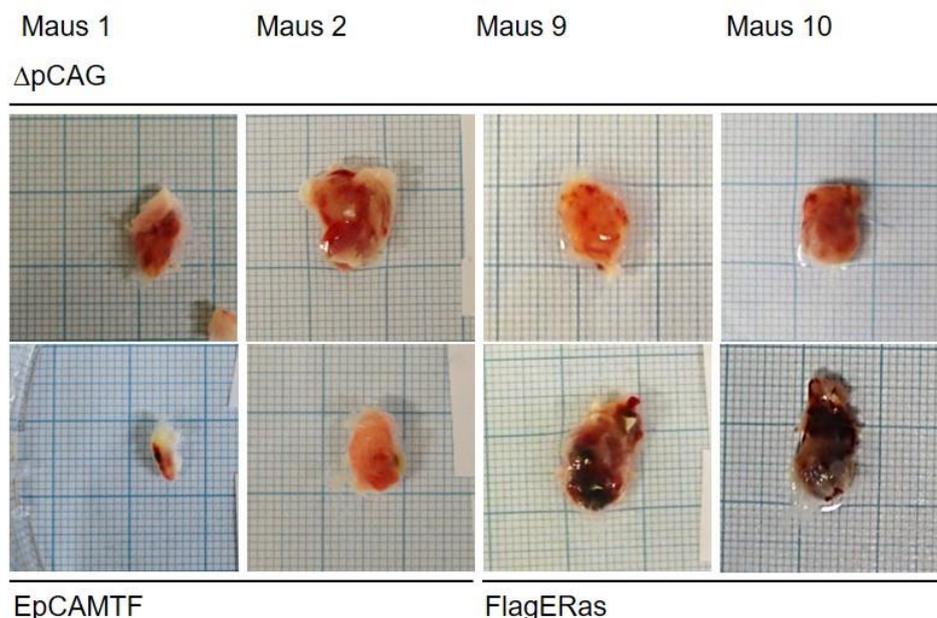


Abbildung 44: Teratome von Maus 1,2, 9 und 10 auf Millimeterpapier (Experiment 2).

Tumore entstanden aus ΔpCAG ES-Zellen sind größer als die Tumore, die sich aus EpCAM überexprimierenden ES-Zellen entwickelt haben. Tumore, die aus ERas konstitutiv exprimierenden ES-Zellen entstanden sind, sind deutlich stärker vaskularisiert und am größten.

Auch das Gewicht der WT und EpCAM Tumore war vergleichbar, das Gewicht der ERas Tumore war jedoch etwas höher (Abbildung 45).

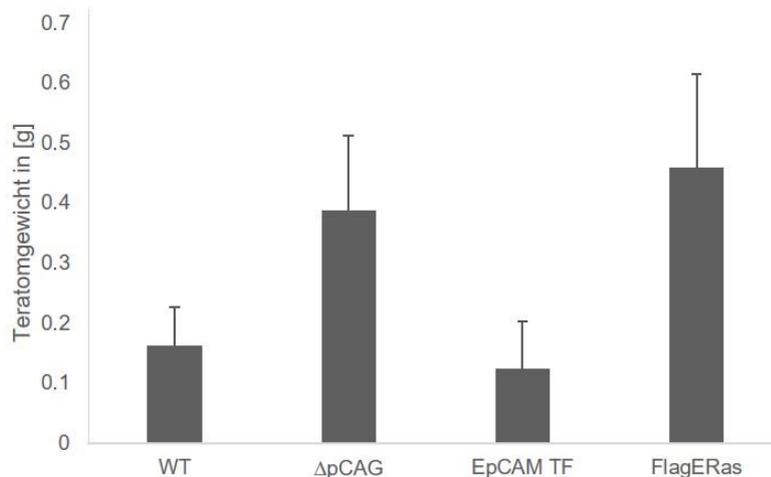


Abbildung 45: Gemittelte Gewichte der Teratome aus WT, ΔpCAG, EpCAM TF und Flag ERas Zellen (Experiment 2).

WT Tumore waren im Mittel 0,16 g (±0,06) schwer, ΔpCAG 0,39 g (±0,13), EpCAM TF 0,125 g (±0,08) und Flag ERas Tumore 0,46 g (±0,16). EpCAM und ERas Tumore wiesen keinen statistisch signifikanten Größenunterschied auf (p-Wert für EpCAM vs ERas 0,11).

4.4.2 Einfluss des zellulären EpCAM-Knockouts auf die Teratombildung

Im Experiment 1 gab es keinen Unterschied in der Effizienz der Tumorbildung, die Zelllinie ΔpCAG bildete 5/5 Tumore, die Zelllinie #114 2/2 und #149 3/3 Tumore. Die Tumore der EpCAM-Knockout ES-Zellen waren auf Millimeterpapier gemessen nicht kleiner (Abbildung 47).

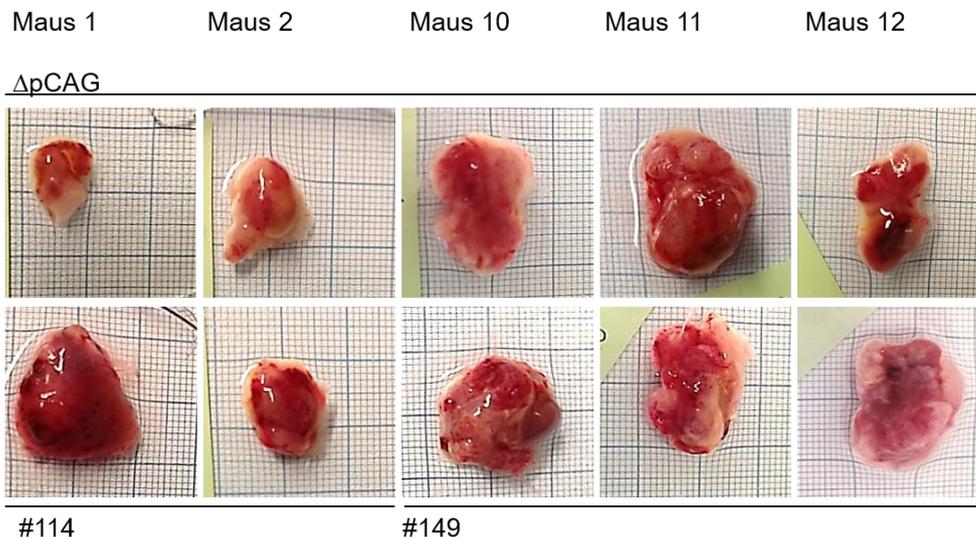


Abbildung 46: Teratomgröße der EpCAM-Knockout Zelllinien auf Millimeterpapier (Experiment 1).

Im ersten Experiment bildeten die EpCAM-Knockoutzelllinien #114 und #149 Teratome, die weder kleiner noch schwächer vaskularisiert waren.

Auch das Gewicht der Tumore unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 48).

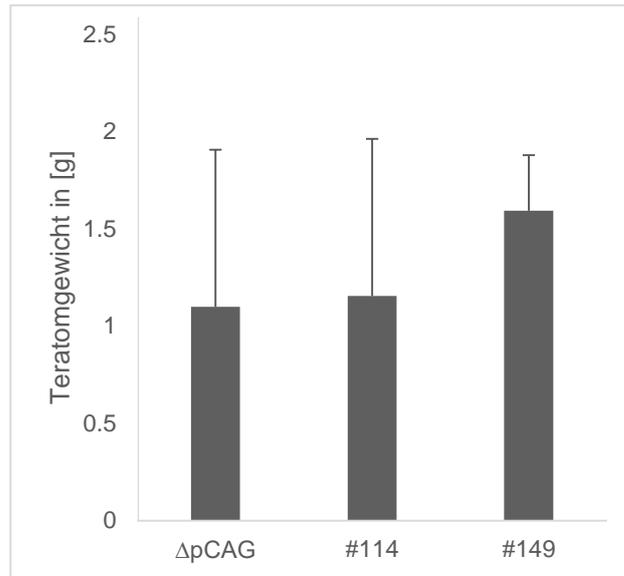


Abbildung 47: Gemitteltes Teratombgewicht von Δ pCAG, #114, #149 (Experiment 1).

Es ergab sich kein Unterschied im Tumorgewicht durch den EpCAM-Knockout (p-Wert für Δ pCAG vs #114 0,94, vs #149 0,36). Teratome von #114 und #149 wiesen ein aggressives infiltrierendes Wachstum auf, sie wuchsen oftmals auch in die Bauchhöhle hinein.

Im Experiment 2 gab es erneut keinen Unterschied in der Effizienz der Teratombildung. Auch in diesem zweiten Versuch waren EpCAM-Knockout Teratome ähnlich groß und schwer wie die der Kontrollgruppen (Abbildungen 49 und 50).

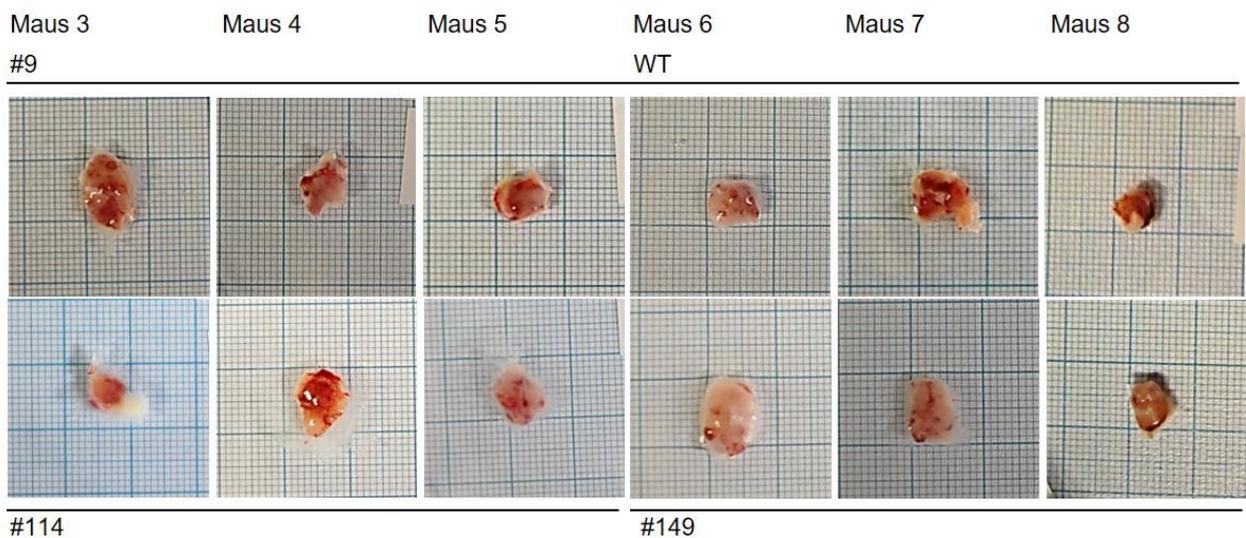


Abbildung 48: Teratomgröße der EpCAM-Knockout Zelllinien auf Millimeterpapier (Experiment 2).

Die EpCAM-Knockout Teratome aus ES-Zellen von #114 und #149 waren ähnlich groß wie die der Kontrollgruppen-Tumore aus WT und #9. #149-Tumor aus Maus 7 setzte eine Tropfmetastase ab.

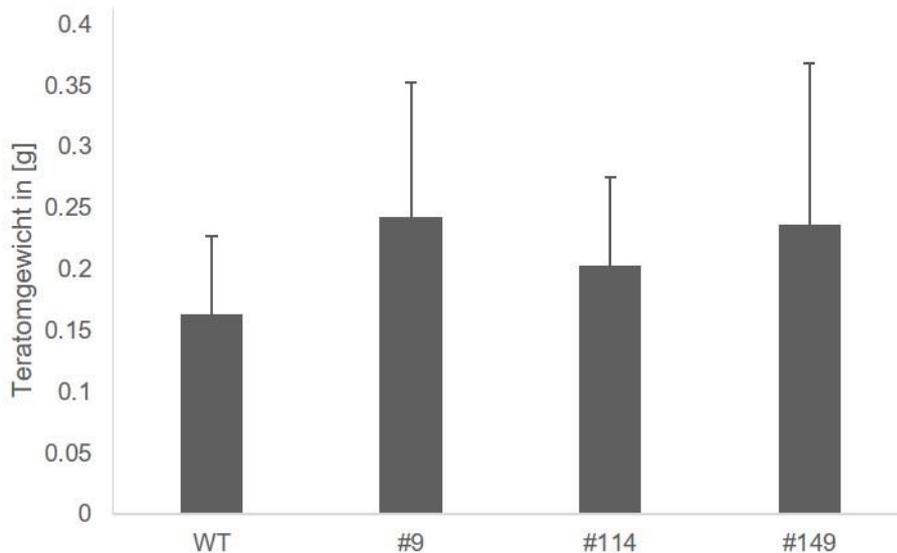


Abbildung 49: Gemittelttes Gewicht der Teratome der Zelllinien WT, #9, #114 und #149 (Experiment 2).

WT Teratome waren im Mittel 0,16 g ($\pm 0,06$) schwer, #9 Teratome 0,24 g ($\pm 0,11$), #114 Teratome 0,20 g ($\pm 0,07$) und #149 Teratome 0,24 g ($\pm 0,13$). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert für WT vs #114 0,51, WT vs #149 0,44, #9 vs #114 0,63, #9 vs #149 0,95).

4.4.3 Immunhistochemische Analyse der Teratome

Nachdem die Analyse der Größe und des Gewichts der Teratome keine Unterschiede erbracht hatte, wurden die in Experiment 1 entstandenen Tumore auf murines EpCAM und Vimentin, einen Marker des Mesoderms, immunhistochemisch gefärbt. Da EpCAM die kardiomyozytäre Differenzierung gehemmt hatte, war die Frage, ob bei einer Überexpression von EpCAM eine verringerte Anzahl von Zellen mesodermal differenzieren. Als erstes fiel auf, dass Tumore, die aus der EpCAM Überexpressions-Stammzelllinie entstanden sind, eine erstaunlich geringe EpCAM Expression trotz des starken pCAG Promotors aufwiesen (Abbildung 51). Die Vimentin Expression war in den EpCAM TF Tumoren nicht reduziert. Die FlagERas Tumore hatten eine vergleichbar starke EpCAM- und Vimentin Expression wie die EpCAM Überexpressions- Tumore (Abbildung 51).

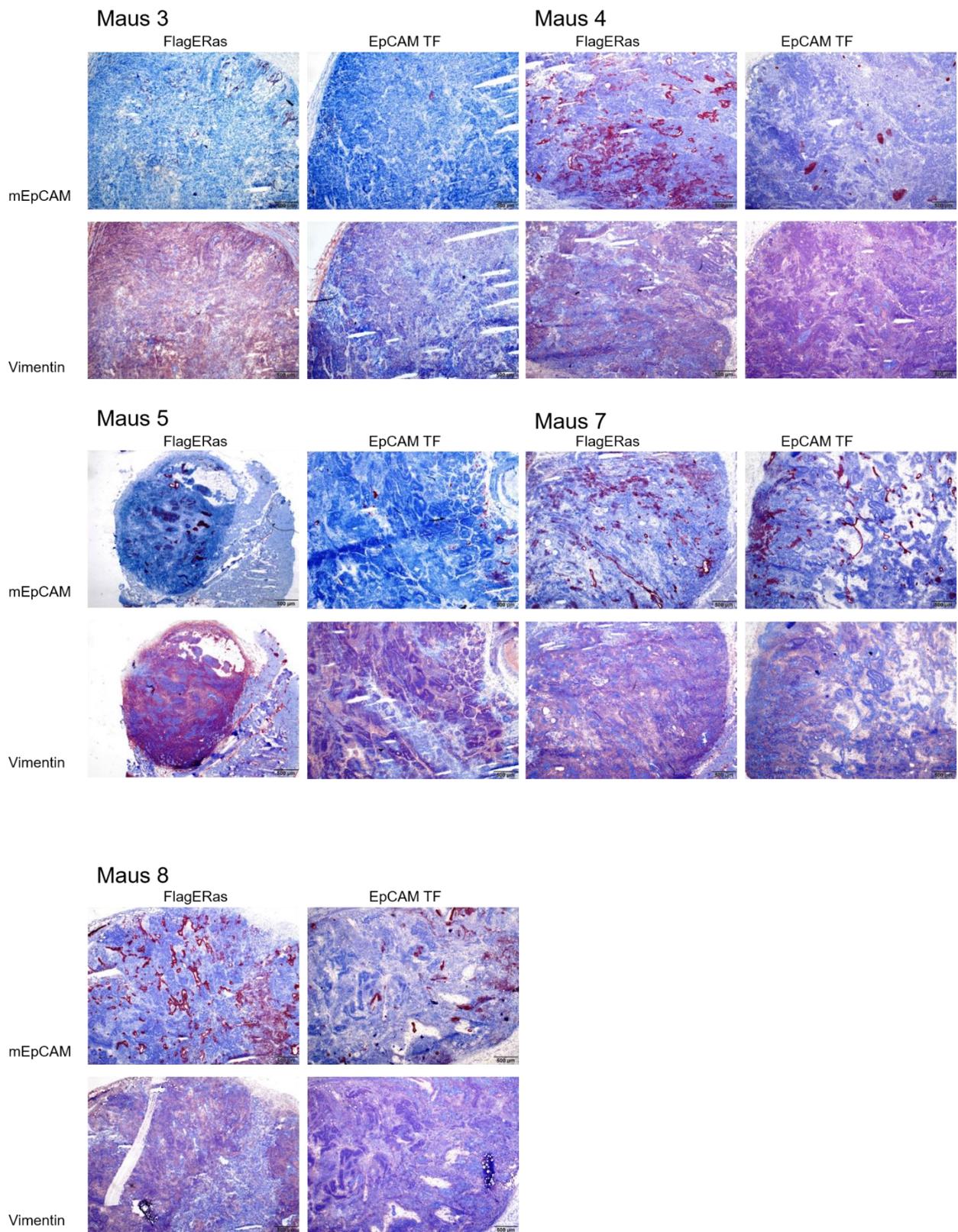


Abbildung 50: Immunhistochemische Färbung der Teratome von FlagERas und EpCAM TF auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1).

Die Tumore wurden in PBS gewaschen und gemäß 3.5 in „TissueTek“ schockgefroren. Die angefertigten Schnitte wurden mit EpCAM- und Vimentin spezifischen Antikörpern behandelt. Dafür wurden aufeinanderfolgende Schnitte verwendet. In den Tumoren lässt sich weder eine erhöhte EpCAM

Expression in den Tumoren bestehend aus EpCAM TF-ES-Zellen oder Flag ERas-ES-Zellen noch eine verminderte Vimentin Expression nachweisen. Es bildete sich Gewebe aus allen drei Keimblättern.

Die Teratome der Knockout-Zelllinien unterschieden sich unter dem Mikroskop in ihrer Zusammensetzung aus den Geweben der drei Keimblätter nicht von den Tumoren der Kontrollgruppe. In Abbildung 52, Maus 1 Δ pCAG Kontrollgruppe kann eine sich gegenseitig ausschließende Expression von EpCAM und Vimentin gesehen werden. Dies wird in der 10x und 20x fachen Vergrößerung in Abbildung 53 und 55 noch deutlicher. Dies war jedoch nicht in allen Schnitten der Fall. Wenn die Kontrollgruppen-Tumore stark EpCAM-positiv waren, waren sie oftmals zugleich auch schwächer Vimentin-positiv. Dies passt zu der starken Vimentin Expression von EpCAM-negativen Tumoren der Zelllinien #114 und #149 (Abbildung 52 und 53).

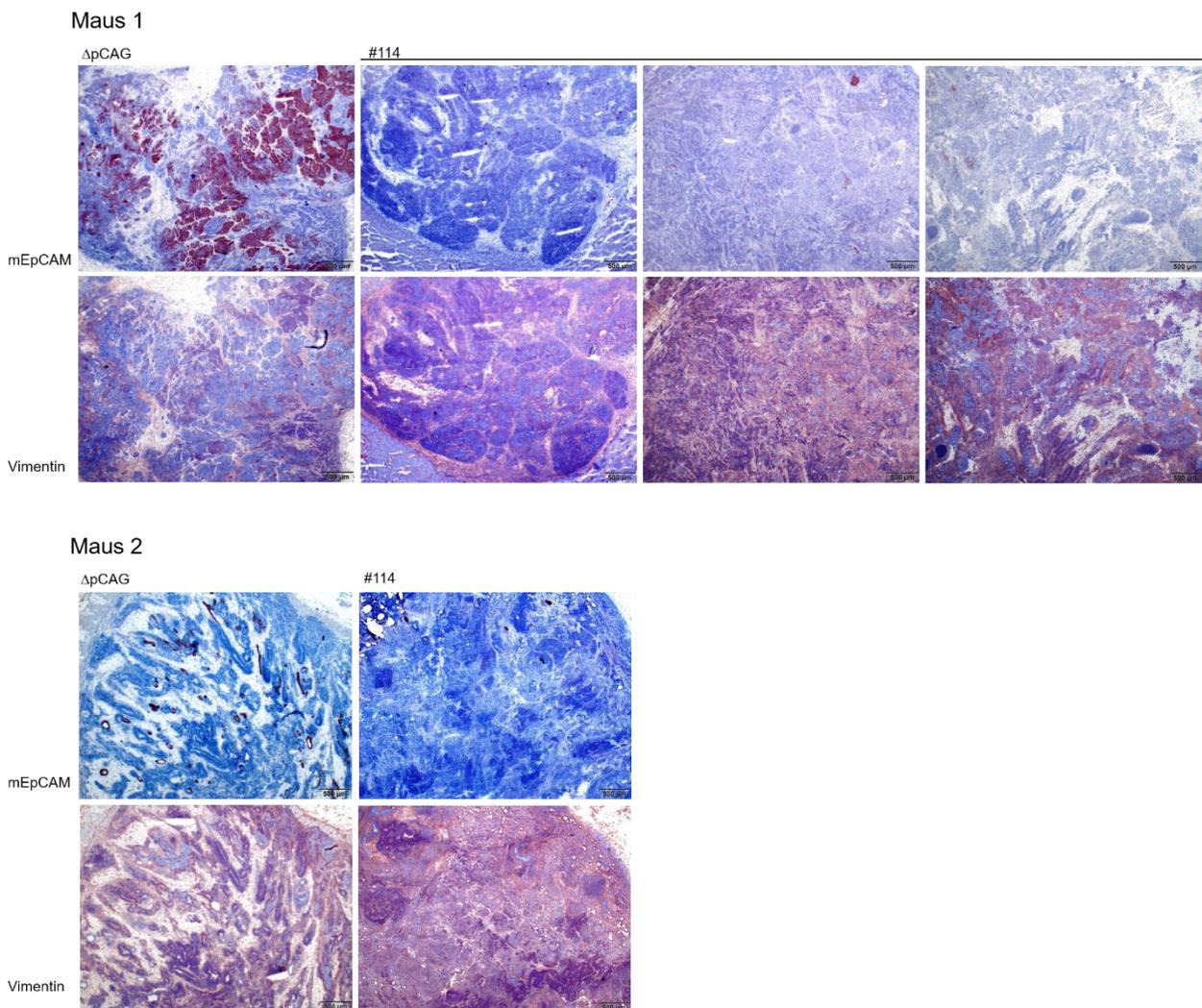


Abbildung 51: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #114 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, zweifache Vergrößerung).

EpCAM-positive Δ pCAG-Tumore sind sehr heterogen, ihr EpCAM-Level reicht von 5-50 %. Die EpCAM-Knockout Tumore aus #114 ES-Zellen sind stark Vimentin-positiv. Es wurden repräsentative Ausschnitte aus dem Gesamttumor und beispielhafte Schnitte ausgewählt.

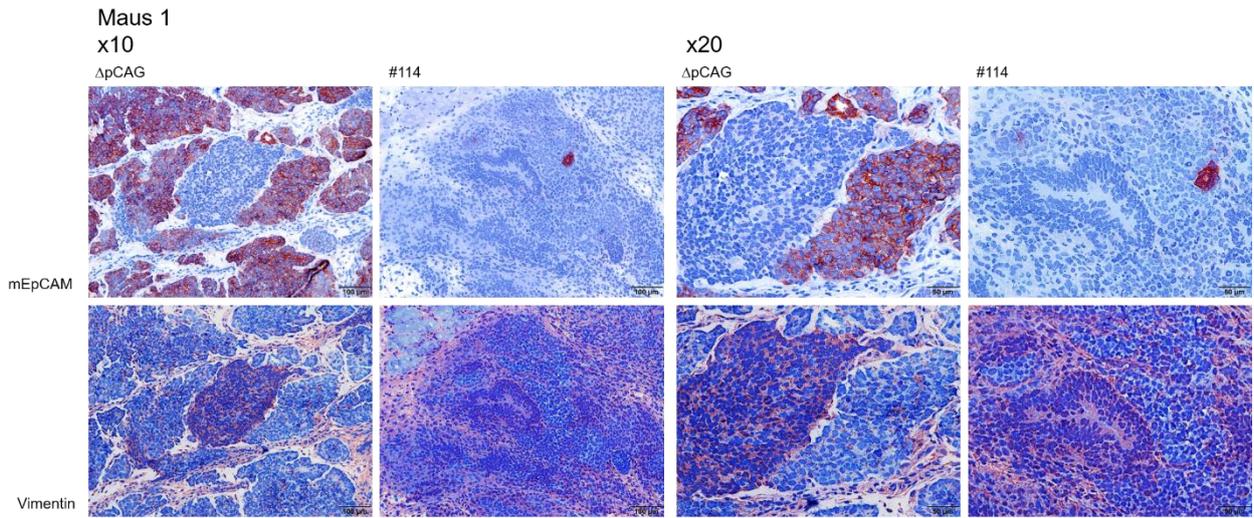


Abbildung 52: Immunhistochemische Färbung der Teratome von $\Delta pCAG$ und #114 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, 10x und 20x Vergrößerung).

Deutlich ist die sich ausschließende Expression von EpCAM und Vimentin in der 10fachen und 20fachen Vergrößerung auf Einzelzellniveau erkennbar. Dies war jedoch nicht immer der Fall.

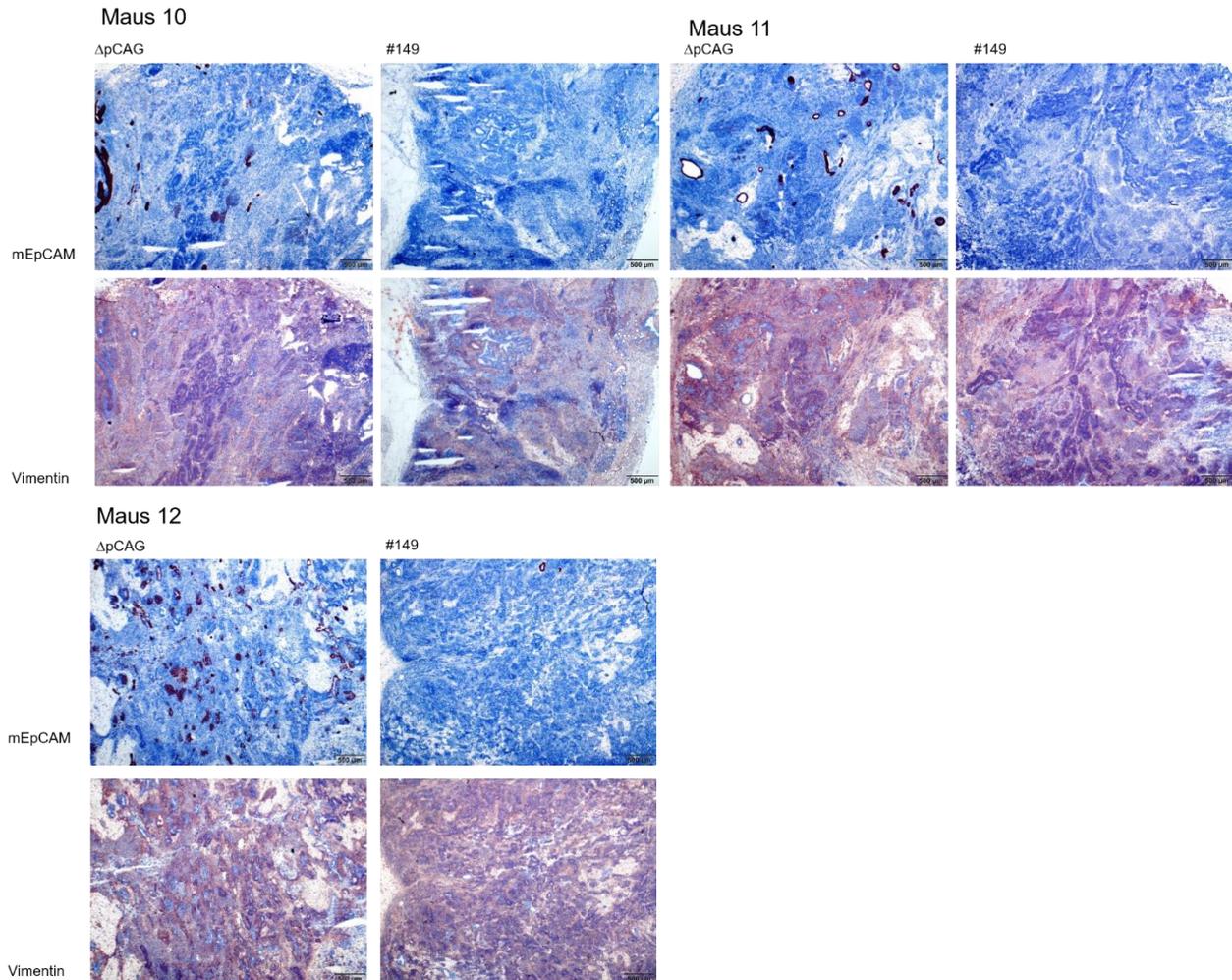


Abbildung 53: Immunhistochemische Färbung der Teratome von $\Delta pCAG$ und #149 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, Vergrößerung x2).

Die Expression von EpCAM und Vimentin in $\Delta pCAG$ Tumoren schloss sich oftmals gegenseitig aus. Areale, die EpCAM-positiv sind, sind Vimentin-negativ. Auch in den #149 Tumoren lässt sich eine starke Vimentin Expression erkennen.

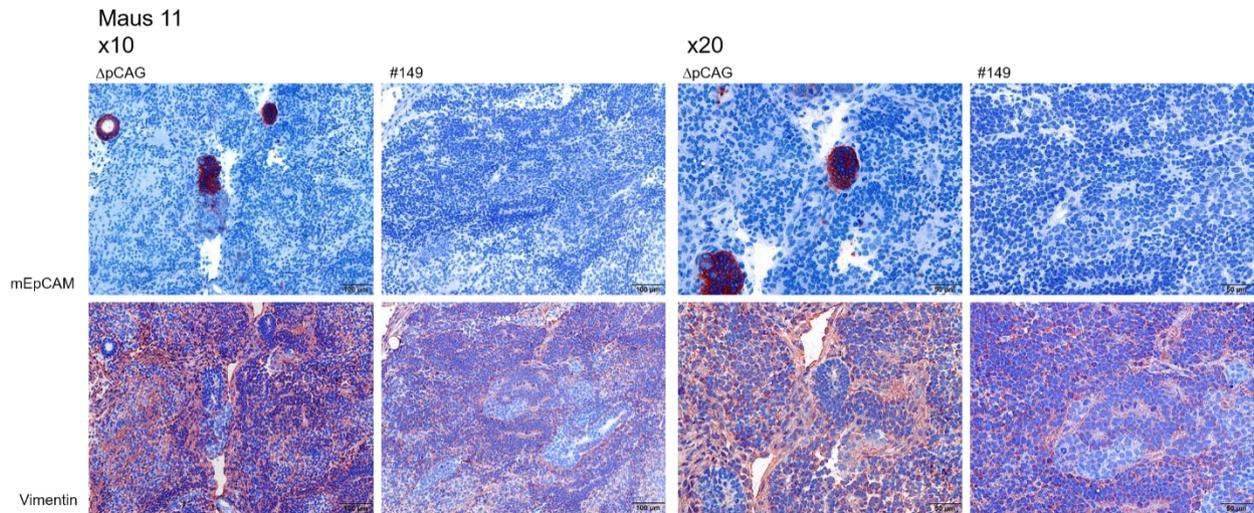


Abbildung 54: Immunhistochemische Färbung der Teratome von Δ pCAG und #149 auf mEpCAM und Vimentin (Experiment 1, 10x und 20x Vergrößerung).

EpCAM-positive Areale sind Vimentin-negativ, in der Vergrößerung eines Areals des #149 Tumors von Maus 11 erkennt man den geringen Anteil an Vimentin-negativen Zellen.

5. Diskussion und Ausblick

Die frühe Phase der Embryogenese wird bestimmt von den Prozessen der Proliferation, Differenzierung und Migration. Da aus zwei verschmolzenen Zellen ein vollständiger Embryo entsteht, ist es notwendig, die Zellzahl zu erhöhen, die Zellen in verschiedene Zelltypen zu entwickeln und eine Polarität der Zellen herzustellen (Takaoka und Hamada 2012). Während der Gastrulation formen sich die drei Keimblätter des Embryos und werden entsprechend ihrer Funktion in der Organogenese im Embryo lokalisiert. Die Entscheidung, welche Zelle welchem Keimblatt zugehörig wird, wird bestimmt von der Interaktion zwischen den Zellen, welche wiederum auf zeitlichen und räumlichen Expressionsmustern von entscheidenden regulatorischen Genen beruht (Pergament und Fidler 1998; Saiz and Plusa 2013). Vermittelt werden diese Signale unter anderem durch lösliche Faktoren und membranständige Oberflächenmoleküle, die als Liganden für Rezeptoren dienen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle EpCAMs im orchestrierten Zusammenspiel der Zellen in der frühen Phase der Embryogenese untersucht werden. EpCAM wird im pluripotenten Zustand von humanen und murinen embryonalen Stammzellen stark exprimiert (Anderson et al. 1999; Sundberg et al. 2008; Gonzalez et al. 2009; Ng et al. 2009). Doch im Verlauf der Differenzierung wird EpCAM herunterreguliert, sowie es von den Pluripotenzmarkern *c-myc*, *Sox2*, *Oct3/4* und *Stat3* bekannt ist. EpCAM jedoch bleibt zunächst auf Zellen der endodermalen Linie erhalten und ist letztendlich auf einfachen Epithelien exprimiert (Sarrach et al. 2018). Dieser Verlust der Expression EpCAMs geht nicht sofort zu einem bestimmten Zeitpunkt verloren (Sarrach et al. 2018), sondern gleicht anfänglich der „Salz und Pfeffer“ Verteilung von *Nanog* positiven Epiblast Zellen sowie *Gata 6* und *Sox17* positiven primitiven Endodermzellen der inneren Zellmasse (Saiz and Plusa 2013). Im Verlauf zeigt die EpCAM Expression eine Heterogenität in verschiedenen Bereichen innerhalb der Embryoid Bodies (Sarrach et al. 2018). Es ist nicht klar, welche Funktion EpCAM im pluripotenten Zustand erfüllt und wie und mit welchem Ziel der Prozess der selektiven Herunterregulation von EpCAM in der Differenzierung stattfindet.

Diese Arbeit fokussierte sich auf Interaktionen und Interaktionspartner von ungespaltenem EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen, da murines EpICD eine sehr geringe Stabilität aufweist und einem effizienten proteosomalem Abbau unterliegt (Hachmeister et al. 2013). Auch Lu *et al.* (2013) zeigten auf, dass in ihren Daten über die

Leberentwicklung des Zebrafischs die extrazelluläre Domäne von EpCAM Effekte hatte. In Karzinomzellen wird EpICD freigegeben, wanderte in den Zellkern und interagiert direkt mit FHL2. In physiologischen Biopsien konnte dies nicht beobachtet werden (Maetzel et al. 2009). Dies ist ein Hinweis, dass in murinen embryonalen Stammzellen ungespaltenes oder die extrazelluläre Domäne von EpCAM wirksam sein können.

In einem SILAC-basierten Interaktionsscreen identifizierte unsere Arbeitsgruppe Proteine des AKT-Signalwegs wie ERas (Takahashi et al. 2003) als Interaktionspartner von EpCAM. Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die möglichen Signalwege von EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen zu bekommen und die Rolle bei Pluripotenz, Proliferation und Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen zu entschlüsseln. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert.

5.1 EpCAM, der PI3-Kinase/AKT Signalweg, Pluripotenz und Selbsterneuerung

Um die Interaktion zwischen EpCAM und dem PI3-Kinase/AKT Signalweg näher zu analysieren, wurde der Einfluss von EpCAM auf die Phosphorylierung des downstream Moleküls AKT mittels Western Blot bestimmt. Es konnte nach Überexpression von EpCAM eine 1,8-fach erhöhte AKT Phosphorylierung nachgewiesen werden (siehe 4.1.1). Selbiges wurde von Takahashi *et al.* (2003) für ERas nachgewiesen. Die Hypothese, dass EpCAM als Bindungspartner von ERas in den PI3-Kinase/AKT Signalweg in murinen ES-Zellen involviert ist, soll im Weiteren geprüft werden. Viele Komponenten des PI3-Kinase/AKT Signalwegs wie phospho-GSK3b, phospho-c-RAF^{Serin259}, phospho-PDK1 und phospho-AKT^{Threonin308} befinden sich in humanen ES-Zellen im Zytoplasma nahe der Zellmembran (Armstrong et al. 2014), an der EpCAM als Transmembranprotein lokalisiert ist. Welche Rolle der PI3-Kinase/AKT Signalweg für die Pluripotenz und Selbsterneuerung spielt und ob darüberhinaus EpCAM-ERas-AKT entscheidend für den pluripotenten Zustand der Zellen und die Selbsterneuerung ist, soll im Folgenden erläutert werden.

Bei den Publikationen über die Rolle des PI3-Kinase/AKT Signalwegs in ES-Zellen sind die Ergebnisse von humanen und murinen Stammzellen zu unterscheiden, sowie dessen Bedeutung für den pluripotenten Zustand von ES-Zellen oder ihrer Differenzierung. Die für die Pluripotenz in ES-Zellen verantwortlichen Signalwege können sich je nach Säugetier-Spezies stark unterscheiden (Dutta 2013), wodurch sich das Forschungsfeld oftmals unübersichtlich und als schwer vergleichbar gestaltet.

Über die Verbindung des PI3-Kinase/AKT Signalwegs und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wiesen Jirmanova *et al.* (2004) nach, dass in murinen ES-Zellen leukemia inhibitory factor (LIF) den PI3-Kinase/AKT Signalweg schwach aktiviert. Eine viertägige Behandlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 in 25 μ M Konzentration blockierte die weitere Proliferation von ES-Zellen als Zeichen einer Beeinflussung der Fähigkeit der Selbsterneuerung. LY294002 Behandlung löste außerdem eine reversible Blockade der G1/S Transition in pluripotenten ES-Zellen aus, bei einer Hemmung der PI3-Kinase mit LY294002 erhöht sich die Anzahl an ES-Zellen in der G0/G1 Phase (Jirmanova *et al.* 2004). Paling *et al.* (2004) beschrieben die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 473 der AKT nach Behandlung der Zellen mit LIF. Bei Versuchen mit LY294002 wurde die LIF-induzierte AKT-Phosphorylierung gehemmt, die STAT5-Proteinmenge als Marker der frühen Differenzierung war erhöht, doch Oct3/4 unverändert. Die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung war also durch die Hemmung des PI3-Kinase/AKT Signalwegs eingeschränkt, jedoch nur unter Kultivierung der Zellen mit LIF. Effekte auf Proliferation und Apoptose waren in diesen Versuchen gering (Paling *et al.* 2004). Storm *et al.* (2007) konnte in weiteren Experimenten mit dem PI3-Kinase Inhibitor in murinen ES-Zellen zeigen, dass die PI3-Kinase die Menge an Nanog RNA und Protein direkt negativ reguliert. Oct4 blieb davon aber unbeeinflusst, wobei sich die Zellen also noch im pluripotenten Zustand befanden. Bei einer Blockade der Glykogen Synthase Kinase 3 GSK-3, ursprünglich aktiviert durch den PI3-Kinase/AKT Signalweg, war die Menge des Nanog Proteins wieder normalisiert. Die Interaktion zwischen der PI3-Kinase und Nanog könnte also über die GSK-3 vermittelt werden (Storm *et al.* 2007). Auch das Protein mammalian target of rapamycin (mTOR) wird von der PI(3)Kinase reguliert. Es ist essentiell für die ES-Zell-Proliferation und die Entwicklung der Maus. mTOR-Knockout-Mäuse sterben an Tag 6,5 dies post conceptionem (dpc) (Murakami *et al.* 2004). Bei Behandlung von ES-Zellen mit Rapamycin zeigten diese eine verminderte Proliferation (Takahashi *et al.* 2005). Überdies wurde auch der Gegenspieler der PI3-Kinase, PTEN, in murinen Stammzellen eingehend untersucht. Bei Sun *et al.* (1999) ergab sich durch ein zelluläres homozygotes Knockoutmodell der PTEN eine stärkere Proliferation der Zellen, mehr Zellen befanden sich in der S-Phase, der G1 Zellzyklus Inhibitor p27 (das normalerweise als Inhibitor der CDKs von G1 fungiert) wurde herunterreguliert und AKT wurde vermehrt phosphoryliert (Sun *et al.* 1999). Bei einem PTEN-Knockout in murinen ES-Zellen ist die Aktivität der PI(3)Kinase erhöht, genauso wie die der AKT und die Menge an Cyclin D1 und eine erhöhte Anzahl an Zellen tritt in die S-Phase ein. Somit

könnte PTEN ein Suppressor der ES-Zell-Proliferation sein (Stiles et al. 2002). Diese Ergebnisse wurden durch einen zellulären Doppelknockout von PTEN und AKT ergänzt. Der zusätzliche Knockout von AKT führte zu einer Umkehrung der durch den PTEN Knockout ausgelösten Effekte wie zum Beispiel zu einem schwächeren Wachstum der Zellen im Vergleich zu WT-ES-Zellen. Die Resistenz gegenüber Kultivierung in serumfreiem Medium und die gesteigerte Proliferation wurden verhindert. Der AKT-Knockout führte außerdem zur verringerten Phosphorylierung der GSK-3 α/β und der proapoptischen Faktoren Bad und FKHR, die von AKT phosphoryliert und inaktiviert werden (Stiles et al. 2002). Watanabe *et al.* (2006) zeigten, dass durch eine konstitutive Myristylierung der AKT und somit einer dauernden Phosphorylierung der undifferenzierte Phänotyp von murinen ES-Zellen ohne Zugabe von LIF aufrechterhalten werden konnte. In humanen Stammzellen kam es bei Armstrong *et al.* (2006) durch die LY294002 Behandlung (Konzentration von 10 μ M) und damit konsekutive PI3-Kinase Hemmung zu verringerter Expression von SSEA-4, Oct4, Nanog und Sox2. Mehr Zellen befanden sich in der G0/G1 Phase. Diese Ergebnisse würden dafürsprechen, dass es durch die Hemmung des PI3-Kinase Weg zur Einschränkung der Selbsterneuerung kommt. Tatsächlich entwickelte sich in den Kolonien der humanen ES-Zellen eine visuell erkennbare Differenzierung. Dies führte die Arbeitsgruppe auf die reduzierten Mengen von phosphorylierter AKT, phosphorylierter GSK3b und c-RAF zurück (Armstrong et al. 2006). Bei Mc Lean *et al.* (2007) ergaben sich bei Behandlung von humanen ES-Zellen mit LY294002 eine Verringerung der Oct3/4 Expression. Desweiteren wurden die beiden Proteine T und Sox17 stärker exprimiert, die Zellen begannen, zu differenzieren, ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung war eingeschränkt. Takahashi *et al.* (2005) widmeten sich in ihrem Übersichtsartikel den krebserzeugenden Eigenschaften und der Fähigkeit zur unbegrenzenden Selbsterneuerung des PI3-Kinase/AKT Signalweg in murinen ES-Zellen. Dabei kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die PI3-Kinase den undifferenzierten Zustand von ES-Zellen aufrechterhält. Als mögliche Mechanismen für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung nennen Takahashi *et al.* (2005) die Hemmung der Ras/MAPK (Paling et al. 2004) über die PI3K und die Hemmung der GSK-3 über die PI3K/AKT (Sato et al. 2004). Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass die PI3-Kinase im pluripotenten Zustand der ES-Zellen unter anderem über den Signalweg der AKT-Phosphorylierung mitverantwortlich ist für die Selbsterneuerung und Pluripotenz.

Doch wie greift das 2003 entdeckte ERas in den PI3-Kinase/AKT-Signalweg ein? ERas wird während der Differenzierung herunterreguliert und induziert bei Überexpression in murinen embryonalen Stammzellen eine erhöhte Proliferationsvermittlung. Bei einem Knockout von ERas zeigte sich eine verminderte AKT Phosphorylierung. Eine Beeinflussung des Oct4 Levels durch einen ERas Knockout konnte nicht nachgewiesen werden (Takahashi et al. 2003). Bei Zhao *et al.* (2015) hatte der ERas Knockdown einen negativen Einfluss und die Überexpression von ERas eine positive Auswirkung auf die Proliferation von ES-Zellen. Die genauen Daten hierzu sind in der Publikation nicht aufgeführt. Kongruent hierzu wurde eine verringerte AKT Phosphorylierung bei ERas Knockdown im Westernblot nachgewiesen und eine erhöhte AKT Phosphorylierung bei ERas Überexpression. Die Oct4 und Nanog Expression blieb dabei unverändert (Zhao et al. 2015). ERas ist kein Faktor, der für die Reprogrammierung zu iPSC essentiell ist, jedoch steigert ERas die Reprogrammierungseffizienz von MEF in iPSC (Takahashi et al. 2007a, Yu et al. 2013). Dies konnte auch für die AKT über die Inaktivierung von FoxO1 gezeigt werden (Yu et al. 2013). Selbiges ist bekannt für EpCAM, dessen Überexpression in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) eine erhöhte Reprogrammierungseffizienz bewirkt. Die Überexpression von EpCAM führte zu einer Suppression von p27 und p53 und EpCAM sowie EpICD aktivierten die Promotor Aktivität von Oct3/4 (Huang et al. 2011). Über EpCAM und seine mögliche Regulation der Pluripotenz ist bekannt, dass durch die konstitutive Expression von EpCAM eine konstante Oct4 Expression trotz LIF Entzug erreicht wurde. Außerdem wiesen EpCAM Überexpressionszellen eine 1,7-fach erhöhte Proliferationsrate im Gegensatz zur Kontrollzelllinie auf (Gonzalez et al. 2009). Es ist daher vorstellbar, dass EpCAM durch den PI3-Kinase/AKT Signalweg einen Einfluss auf die Fähigkeit der Selbsterneuerung hat. Viele der Erkenntnisse über den PI3-Kinase/AKT Signalweg konnten über einen zellulären Knockout gewonnen werden. In Analogie wurde in dieser Promotionsarbeit zum ersten Mal ein konstitutiver EpCAM-Knockout mit Hilfe der CRISPR-Cas9 Technologie in embryonalen Stammzellen durchgeführt.

In der Literatur sind drei verschiedene zelluläre EpCAM-Knockdown Modelle publiziert, die jedoch keinen vollständigen Knockout generierten und sich teilweise widersprechen. Gonzalez *et al.* konnten durch einen 50% siRNA Knockout von EpCAM eine Verringerung der SSEA-1 Expression erkennen und damit einhergehend eine Verringerung des Reprogrammierungsmarkers c-myc auf Proteinlevel, sowie einen Unterschied im Wachstum der Zellen ausmachen, gemessen an einer um 40 % geringeren Zellzahl im

Vergleich mit WT ES-Zellen nach zwei Tagen Kultivierung (Gonzalez et al. 2009). Bei Lu *et al.* verminderte sich durch eine Reduktion der EpCAM Expression auf 66 % in humanen ES-Zellen durch small hairpin RNA (shRNA) die Expression von Oct 3/4 auf ~68%, von Nanog ~76%, von Sox2 ~55% und von Klf4 auf ~36%. Die Autoren schlussfolgerten eine verringerte Pluripotenz der Zellen (Lu et al. 2010). In humanen Stammzellen ergaben sich bei Ng *et al.* (2010) bei einem transienten EpCAM Knockdown keine statistisch signifikanten Unterschiede im Oct4 und Nanog Level. Die nach 12 Tagen erfasste Proliferation der Zellen ergab eine Reduktion um 40 % durch den Knockdown von EpCAM mittels siRNA (Ng et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den zellulären EpCAM-Knockout eine verringerte Phosphorylierung der AKT auf circa 27% festgestellt (siehe 4.2.2.5 Effekt auf die AKT-Phosphorylierung), ähnlich der Verringerung der Phosphorylierung bei Behandlung von murinen embryonalen Stammzellen mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002. Unter Kultivierung mit LIF ergibt sich also durch den EpCAM-Knockout ein verringertes AKT Signal. Um einen Einfluss auf die Pluripotenz zu erfassen, wurde die Oct3/4, Nanog, Sox2, myc, Klf4 und ERas Expression mittels qPCR bestimmt (siehe 4.2.2.1). Die Oct3/4, myc, Klf4 und ERas Expression war durch den EpCAM-Knockout nicht beeinflusst. Bei einem Vergleich von WT-Zellen und den Zelllinien #114 und #149 konnte bei der Nanog Expression eine Verringerung auf 68 % bzw. 65% und bei Sox2 auf 65% bzw. auf 35% nachgewiesen werden. Diese Verringerung zeigte sich nicht im Vergleich mit der CRISPR-Cas9 internen Kontrolle Zellklon #9. Die Kontroll-Zelllinie E14-TG2 α -#9 hat den CRISPR-Selektions-Prozess mit durchlaufen, ist aber aus einem Einzelzellklon entstanden. Um auszuschließen, dass sich Veränderungen in diesem Einzelzellklon auch in der Pluripotenz getan haben, sollten mehrere EpCAM-positive, CRISPR selektierte Klone als Kontrollen verwenden, ähnlich, wie man es mit den EpCAM-negativen Klonen ausführt. So ist die Kontrolle E14-TG2 α -#9 ein Anhaltspunkt, die man jedoch erweitern sollte. Ob die Verringerung von Nanog und Sox2 biologisch relevant ist, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Da sich bei Ng *et al.* 2010 durch die isolierte Betrachtung von humanen pluripotenten EpCAM-negativen Zellen eine starke Erhöhung von endodermalen Markern (Foxa2, und AFP) und mesodermalen Markern (Col2A und ACTC) ergeben hatte, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich auch in murinen embryonalen Stammzellen durch den EpCAM-Knockout Hinweise auf eine beginnende Differenzierung durch die Messung von Differenzierungsmarkern finden lassen. Dies war nicht der Fall (siehe 4.2.2.3). Die

embryonalen Stammzellen exprimierten keine Differenzierungsmarker nach EpCAM Knockout.

Interessanterweise kam es in den EpCAM-Knockout Zellen in dieser Arbeit zu einer Reduktion von Cyclin D1 (siehe 4.2.2.2). In Karzinomzellen kontrolliert EpCAM die Transkription von Cyclin D1 und wirkt unter anderem über die Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (Rb) auf den Zellzyklus. Cyclin D1 wirkt als Kofaktor der Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases CDKs) 4 und 6, welche das Retinoblastoma Protein phosphorylieren und aktivieren. In der Folge wird der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert, welcher die Expression der Cycline A und E steuert und somit die Zellzyklusprogression reguliert. Bei einer verminderten Expression von EpCAM, akkumulierten FaDu Zellen (Hypopharynx Karzinom Zellen) in der G1 Phase und wiesen ein auf 25% reduziertes Cyclin D1 mRNA Level auf (Chaves-Perez et al. 2012). ES-Zellen weisen in ihrem Zellzyklus große Unterschiede zu somatischen Zellen auf. Nur 10% einer pluripotenten ES-Zell-Population befinden sich in der G1 Phase, der Hauptanteil der Zellen ist in der S-Phase (Savatier et al., 1995). Da nur niedrige mRNA Mengen an Cyclin D1 und D3 im pluripotenten ES-Zellen gefunden werden, ein Cyclin D/CDK4 Komplex nicht existiert und das Retinoblastoma Protein fast vollständig in phosphorylierter Form vorliegt, ist nicht völlig klar, wie die Transition von G1 zur S-Phase in ES-Zellen erfolgt. Dieser Regulierung könnte ein fein abgestimmter Prozess an nur geringen Mengen von Cyclin D zugrundeliegen (Savatier et al., 1995; Jirmanova et al., 2004). Durch den EpCAM-Knockout ergab sich eine stark verminderte mRNA-Expression an Cyclin D1, was bedeuten könnte, dass sich die Zellen vermehrt in der G1 Phase befinden und sich damit weniger teilen. Diese Beobachtung sollte anhand der Bestimmung der Proteinmenge von Cyclin D1 überprüft und durch Analysen der Zellzyklusverteilung ergänzt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt auf eine Veränderung der Zellzyklusverteilung anhand von Zellzahlbestimmung, Zellviabilität und Expression von Ki67 nicht gezeigt werden. Der EpCAM-Knockout hatte mit den verwendeten Nachweismethoden keine Auswirkung auf die Proliferation (siehe 4.2.2.2 und 4.2.2.4). Aufgrund der Beobachtung des verringerten Cyclin D und der Bedeutung von EpCAM bei der Proliferation von Tumorzellen (Maetzel et al. 2009), sollte trotz der schon erwähnten Unterschiede der EpCAM Expression und Funktion in ES-Zellen und Karzinomzellen der Einfluss auf die Proliferation mit anderen Methoden und in einem längeren Beobachtungszeitraum von mehr als drei Tagen untersucht werden. In Frage käme eine

Methode, in der EpCAM-positive Zellen mit GFP transfizierten fluoreszierenden, EpCAM-negativen Zellen in einem ausgeglichenen Verhältnis vermischt und für 12 Tage gemeinsam kultiviert werden, um anschließend die jeweiligen Zellanteile anhand der GFP-Fluoreszenz im FACS zu messen.

EpCAM interagiert mit ERas und der AKT (Sarrach et al. 2018). Der PI3-Kinase/AKT Signalweg trägt zur Aufrechterhaltung von Selbsterneuerung und Pluripotenz bei, aufgrund der Interaktion von EpCAM und dem PI3Kinase/AKT Signalweg wurde die Bedeutung von EpCAM für Selbsterneuerung und Pluripotenz im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die generierten EpCAM-Knockout Zellen wiesen verglichen mit WT ES-Zellen, eine Verringerung von Nanog und Sox2 und weniger Cyclin D1 auf. Einen direkten Proliferationsnachteil gemessen in einem relativ kurzen Beobachtungszeitraum hatten die Zellen nicht. In zukünftigen Versuchen wäre es möglich, PI3-Kinase Inhibitoren zur Untersuchung der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in EpCAM-Knockout Zelllinien und ERas Überexpressions- und Knockoutzelllinien zu verwenden. Die Behandlung mit PI3-Kinase Inhibitor unter Zugabe von LIF war in dieser Arbeit ohne Beeinträchtigung der ES-Zellen möglich. Damit könnte analysiert werden, ob es durch die Kombination aus PI3-Kinase Hemmung und EpCAM-Knockout zu einer stärkeren Reduktion der Pluripotenz kommt, sodass sich das Expressionslevel von weiteren Pluripotenzmarkern oder auch das Expressionslevel von Oct3/4 verringert oder es zu einem Effekt auf die Proliferation von murinen ES-Zellen kommt.

5.2 Auswirkungen des PI3-Kinase/AKT Signalwegs und eines EpCAM-Knockouts auf die *in vitro* Differenzierung

Um ein Protein in ES-Zellen zu untersuchen, ist neben der Betrachtung im pluripotenten Zustand die Analyse der Bedeutung während der Differenzierung von ES-Zellen essentiell. Der Prozess der Differenzierung von ES-Zellen ist durch Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren streng reguliert (Okita et al. 2006). Um Differenzierung in ES-Zellen anzuregen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Eine Addition von Retinsäure (RA) führt zur Differenzierung der Zellen. Eine spontane Differenzierung kann durch LIF Entzug und Embryoid Body Formation erreicht werden. Die Methode bringt den Vorteil einer Konfiguration der Zellen in 3D mit sich, in dem die gegenseitige Beeinflussung im dreidimensionalen Embryoid Body ermöglicht wird. Somit stellt das Modell eine wirklichkeitsgetreuere Nachahmung der frühen Embryogenese dar.

In vorangegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe war die Expression von EpCAM nach der Differenzierung in Embryoid Bodies nur in einer epithel-ähnlichen Schicht an der Außenseite der Embryoid Bodies nachweisbar. Alle weiteren Zellen regulierten EpCAM während der Differenzierung herunter. Bei einer konstitutiven Überexpression von EpCAM ergaben sich eine Steigerung von endodermalen Markern und eine Hemmung von mesodermalen Markern. Durch die EpCAM Überexpression konnte eine Erhöhung der endodermalen Marker Afp, Foxa2 und Gata4 nachgewiesen werden, die mesodermalen Marker Col1a1 und Wt1 waren an Tag 21 erniedrigt. Die kardiomyozytäre Differenzierung als Teil der mesodermalen Differenzierung war partiell gehemmt. Durch Induktion der endodermalen Differenzierung stieg die Expression von EpCAM stark an (Unv. Diss. Sarrach 2013). Wir konnten daraus schlussfolgern, dass die Expression von EpCAM selektiv in endodermal differenzierten Zellen aufrecht erhalten bleibt. In mesodermal differenzierten Zellen kommt es jedoch zu einer obligatorischen vollständigen Herunterregulation von EpCAM.

Um verantwortliche molekulare Mechanismen zu entschlüsseln, wurde in dieser Arbeit ERas und phosphorylierte AKT in ES-Zellen überexprimiert und der Einfluss auf die Differenzierung untersucht. Dabei ergab sich eine partielle Hemmung der kardiomyozytären Differenzierung nach ERas und myrAKT Überexpression. Bei einer Überexpression der Proteine ERas und einer Hyperphosphorylierung der AKT kam es zu einer verringerten Anzahl von kontrahierenden Embryoid Bodies. Dies spricht dafür, dass die mesodermale Differenzierung durch EpCAM-ERas-PI3-Kinase/AKT partiell gehemmt wird. Durch die Interaktion von ERas mit EpCAM könnten Signalwege unter anderem über die Phosphorylierung der AKT verstärkt werden, die zum Beispiel endodermale Differenzierung fördern und mesodermale Differenzierung inhibieren.

Die Auswirkung der PI3-Kinase und phosphorylierter AKT auf die Differenzierung von humanen und murinen ES-Zellen ist in der Literatur uneinheitlich beschrieben. Jirmanova wies in murinen Stammzellen nach RA-induzierter Differenzierung eine 2,5-fach gesteigerte PI3-Kinase Aktivität nach. Dies bewirkte eine Erhöhung an phosphorylierter AKT, es kam zu einer Erhöhung von Cyclin D1. Eine LY294002 Behandlung löste eine reversible Blockade der G1/S Transition in differenzierenden ES-Zellen aus (Jirmanova et al. 2004). Dies ist kontrovers zu den im Folgenden aufgeführten Arbeiten. Während der Differenzierung in Embryoid Bodies ergab sich in humanen Stammzellen bei Armstrong *et al.* (2006) an Tag 14 eine geringere Phosphorylierung der AKT an Serin 473 und Threonin 308 im Vergleich zu pluripotenten humanen Stammzellen. Somit

propagieren Armstrong *et al.* eine Inaktivierung des PI3-Kinase/AKT Signalweg bei der Differenzierung von humanen ES- Zellen.

McLean *et al.* (2007) untersuchten die Bedeutung des PI3-Kinase/AKT Signalwegs weiterführend. Die Autoren behandelten humane Stammzellen mit LY294002 in einer Konzentration zwischen 20 und 50 μM durchgehend über 5 Tage. Auf diese Weise hemmten sie die PI3-Kinase-Aktivität, wodurch sich die Zellmorphologie änderte und die Zellen vermehrt Brachyury und MIXL1 (Marker des Mesoendoderms) genauso wie Foxa2, gooseoid (GSC), GATA4, GATA6, und SOX17 (Marker des definitiven Endoderms) exprimierten. Die Zellen exprimierten <1% AFP (Marker des viszeralen Endoderms) und THBD (Marker des parietalen Endoderms), waren also nicht in extraembryonales Endoderm differenziert. Die Autoren postulierten, dass die Differenzierung in definitives Endoderm vonstatten geht, indem Activin/Nodal Signaling antagonisiert wird (McLean *et al.* 2007).

Es sollte also bei den Untersuchungen des PI3-Kinase/AKT Signalwegs unterschieden werden, zu welchem Differenzierungszeitpunkt die Untersuchung stattfindet und, ob der Signalweg bei der Differenzierung in viszerales oder parietales Endoderm aktiviert oder inhibiert ist. Versuche mit PI3-Kinase Inhibitoren während der Differenzierung und unter LIF Entzug in der vorliegenden Arbeit führten zu einer Desintegration der Embryoid Bodies. Es kam zu keiner makroskopisch sichtbaren Differenzierung der ES-Zellen unter PI3-Kinase Inhibitor Behandlung. Dies wurde jedoch nicht mit der Messung von spezifischen Keimzellmarkern untersucht. In weiteren Arbeiten wäre es möglich, EpCAM-Knockout Zellen und EpCAM Überexpressionszellen mit PI3-Kinase Inhibitoren mit einer von den Zellen tolerierbaren Konzentration zu behandeln und Marker des Mesendoderms wie Brachyury und Marker des primitiven und definitiven Endoderms zu messen.

Über die Rolle von ERas während der Differenzierung von ES-Zellen ist noch wenig bekannt. Zhao *et al.* (2015) untersuchten die Rolle von ERas in der keimblattspezifischen Entwicklung von murinen ES-Zellen. ERas mRNA war besonders hoch an Tag 7.5 im Endoderm und Epiblast exprimiert. Dies stimmt mit einer erhöhten Expression von EpCAM in endodermalem Gewebe überein (Unv. Diss. Sarrach 2013). Während der Differenzierung in Embryoid Bodies kam es durch den ERas Knockdown zu einer erhöhten Expression von Markern des Mesoderms (Flk1 und Foxf1) und Endoderms (Sox17 und Foxa2). Marker des Neuroektoderms (Sox1 und Pax6) waren vermindert. Die Überexpression von ERas führte zur verringerten Expression von mesodermalen

Markern, hatte aber keinen Einfluss auf das Neuroektoderm und das Endoderm (Zhao et al. 2015). Dies unterstützt die Ergebnisse der gehemmten kardiomyozytären Differenzierung durch eine Überexpression von ERas (siehe Punkt 4.1.2). Desweiteren wurde mittels forcierter mesodermaler Differenzierung der Einfluss von PI3-Kinase und ERas untersucht. Bei einer Aktivierung der mesodermalen Differenzierung durch WNT3A und Activin A ergab sich in ERas Knockdown Zellen eine starke Erhöhung von mesodermalen Markern, bei ERas Überexpression der umgekehrte Effekt. Auch bei WNT3a, Activin A und LY294002 Behandlung kam es zu einem Anstieg von mesodermalen Markern. Eine Hemmung des PI3-Kinase/AKT Signalwegs führt zur mesodermalen Differenzierung. Durch den ERas Knockdown kam es außerdem zu einer verminderten AKT Phosphorylierung (Zhao et al. 2015). Zhao *et al.* vertreten daher die Ansicht, dass ERas in murinen ES-Zellen die mesodermale Differenzierung hemmt und einer dynamischen Expression unterliegt. Bis zum Blastozystenstadium steigt die ERas Expression und regt via AKT Phosphorylierung die Proliferation an, doch an Tag 7.5 verringert sich die ERas Expression im Mesoderm. Die Phosphorylierung der AKT wird gehemmt (Zhao et al. 2015). Dies unterstützt die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass durch konstitutive Phosphorylierung der AKT die kardiomyozytäre Differenzierung von Embryoid Bodies gehemmt wird (siehe Punkt 4.1.3).

In weiteren Versuchen könnte die Proteinexpression der phosphorylierten AKT in Embryoid Bodies aus WT Zellen, aus EpCAM und ERas Überexpressionszellen und aus EpCAM-Knockout Zellen von Tag 7 und 10 gemessen werden. Damit könnte man erste Hinweise bekommen, ob die AKT während der Differenzierung von murinen ES-Zellen in Embryoid Bodies herunterreguliert wird, sowie es Armstrong *et al.* (2006) in humanen Stammzellen beobachten konnte, oder ob die Phosphorylierung der AKT für die meso- oder endodermale Entwicklung eine Rolle spielt. Durch die Überexpression von EpCAM und ERas und den Knockout von EpCAM könnten Effekte auf die Phosphorylierung der AKT während der Differenzierung verstärkt oder abgeschwächt werden. Da in der vorliegenden Arbeit eine Myristylierung der AKT die mesodermale Differenzierung gehemmt hat, ist davon auszugehen, dass bei forcierter mesodermaler Differenzierung ähnlich wie bei Zhao *et al.* (2015) eine erhöhte AKT-Phosphorylierung zu verzeichnen ist.

Auch durch den EpCAM-Knockout wurde in der vorliegenden Arbeit die kardiomyozytäre Differenzierung gehemmt. Dies erscheint zunächst kontraintuitiv.

Um die differenzierten ES-Zellen genauer zu analysieren, wurden die ES-Zellen nach dem Differenzierungsassay am Tag 10 mittels qPCR untersucht. Die mRNA wurde

jeweils in kontrahierenden und nicht-kontrahierenden Embryoid Bodies untersucht, um die stattgefundene mesodermale Differenzierung von den restlichen Zellen untersuchen zu können.

In den EpCAM-negativen Embryoid Bodies verblieb mehr Oct4 und ERas, unabhängig davon, ob diese kontrahierten oder nicht. Diese Embryoid Bodies verblieben also in einem weniger differenzierten Stadium wie die Embryoid Bodies, die sich aus EpCAM-positiven Zellen gebildet haben. Es wird daher geschlussfolgert, dass ES-Zellen durch Fehlen von EpCAM nicht mehr vollständig differenzieren. Auch wiesen die nicht kontrahierenden EpCAM-Knockout Embryoid Bodies im Vergleich zu nicht kontrahierenden WT Embryoid Bodies signifikant mehr Ki67 auf, proliferierten also mehr, was mit einem weniger differenzierten und stärker pluripotenten Stadium kongruent ist.

Darüberhinaus exprimierten die EpCAM-Knockout Embryoid Bodies im Vergleich zu EpCAM-positiven Embryoid Bodies mehr Cyclin D. Die Cyclin D Expression in ES-Zellen während der Differenzierung ist in der Literatur unterschiedlich dargestellt. Durch die Differenzierung, unabhängig davon, ob mittels RA oder Embryoid Bodies Formation, befanden sich bei Savatier *et al.* (1995) an Tag 4 die stark gestiegene Menge von 35% der murinen ES-Zellen in der G1-Phase, in der Zellen verstärkt differenzieren können (Coronado *et al.* 2012). Auf Proteinlevel stieg die Cyclin D1 Expression bis Tag 7 stark an. Bei der mRNA unterschied Savatier nach Matsushime *et al.* (1991) die Transkripte von 3.8 kb und 4.5 kb. Das 3.8 kb Transkript stieg bis Tag 2 und sank daraufhin wieder bis Tag 4. Die 4.5 kb Transkripte stiegen im gesamten Verlauf der Differenzierung an (Savatier *et al.* 1995). Als ES-Zellen bei Jirmanova *et al.* (2004) mit RA behandelt wurden, gab es an Tag 1 und 2 einen Rückgang der Cyclin D1 mRNA Expression um 50%, ab Tag 3 stieg das Cyclin D1 mRNA Level auf das Niveau von Tag 0 an (Jirmanova *et al.* 2004). Demnach beruht die starke Cyclin D1 Expression auf Proteinlevel während der Differenzierung nach Jirmanova auf eine posttranskriptionale Regulation. Diese Erhöhung des Cyclin D Levels zeigte die Unv. Diss Sarrach (2013) nicht. Auf transkriptioneller Ebene verhielt sich Cyclin D konkordant zu Oct 3/4, die bereits in den ersten zwei Tagen zu erkennende reduzierte Expression von Cyclin D gelangte gegen Ende des Versuchs auf einen Wert von 0,13. Wenn sich Cyclin D im Laufe der Differenzierung auf mRNA Level verringert, könnte das bei EpCAM-Knockout Embryoid Bodies mit erhöhtem Cyclin D1 Level für eine unvollständige Differenzierung sprechen.

Im Vergleich der Expression von endo- (AFP und Foxa2), meso- (Col1a1 und Wt1) und ektodermalen (Nestin und Pax6) Keimzellmarkern ergaben sich zwischen WT Embryoid Bodies und EpCAM-Knockout Embryoid Bodies in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede (siehe Punkt 4.2.3.3). Die in humanen Stammzellen beobachtete Erhöhung von endodermalen Markern (AFP, Foxa2 und GATA4) und mesodermalen Markern (IGF2, GATA6 und ACTC) in EpCAM-Knockout Embryoid Bodies nach achttägiger Differenzierung (Ng et al. 2010) konnte in murinen Stammzellen in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Auch ließ sich im Vergleich von WT Embryoid Bodies mit EpCAM-Knockout Embryoid Bodies in den immunhistochemischen Färbungen auf endo-, meso- und ektodermales Gewebe kein offensichtlicher Unterschied ausmachen. Ein EpCAM Überexpressionsmodell hatte in vorangegangenen Arbeiten Hinweise auf eine induzierende Wirkung von EpCAM auf die endodermal-gerichtete Entwicklung ergeben (Unv. Diss. Sarrach 2013). Es lässt sich feststellen, dass in den EpCAM-Knockout Embryoid Bodies endodermale Differenzierung stattgefunden hat, nachgewiesen durch die Färbung auf Foxa2 (siehe Abbildung 25). In der vorliegenden Arbeit konnten ES-Zellen trotz eines EpCAM-Knockouts endodermal differenzieren. Um den Zusammenhang zwischen EpCAM und der endodermalen Differenzierung weiter zu untersuchen, wäre es möglich, in EpCAM-Knockout Zellen eine forcierte endodermale Differenzierung (McKiernan et al. 2007) herbeizuführen und die Expression von endodermalen Markern mit WT ES-Zellen zu vergleichen.

Da EpCAM als ein epitheliales, zelladhäsionsmodulierendes Protein beschrieben wird (Schnell et al. 2013), wurden die EpCAM-Knockout Embryoid Bodies auf Integrität und Epithelbildung untersucht. Mikroskopisch waren die Embryoid Bodies in ihrer Beschaffenheit ähnlich strukturiert wie EpCAM-positive Embryoid Bodies (siehe Abbildung 23-27). Da EpCAMs Rolle in der Zelladhäsion mittlerweile als sehr vielfältig und auf verschiedene Art modulierend angegeben wird (Trzpis et al. 2007), könnte eine immunhistochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf E-Cadherin (Slanchev et al. 2009) und Claudin 7 (Lei et al. 2012) größeren Aufschluss geben, ob sich EpCAM-negative Embryoid Bodies und ihr Epithel in ihrer Integrität von EpCAM-positiven Embryoid Bodies unterscheiden. E-Cadherin ist ein Bestandteil der adherens junctions und damit fundamental für die Integrität der funktionsfähigen Architektur von Epithelien (Gumbiner 1996). Lei *et al.* (2007) untersuchten die intestinalen Epithelien von EpCAM-Knockout Mäusen. Duodenale und jejunale Epithelien zeigten Diskontinuitäten

in den mukosalen, subepithelialen Regionen. Es konnte eine verminderte Expression der Claudine 2, 3, und 15 sowie eine fehlende Expression von Claudin 7 in EpCAM-Knockout Darmepithelien gezeigt werden. Die Barrierefunktion des Epithels war funktionell gestört, wobei die Autoren EpCAM eine Rolle in der Rekrutierung der Claudine für die tight junctions, doch nicht für die adherens junctions zuwiesen. Im Intestinum enthaltende Vorläuferzellen und die Enterozyten wiesen keine Veränderung auf (Lei et al. 2012). Ähnliches konnte auch bei Wu *et al.* in zwei humanen EpCAM Knockdown Kolonkarzinom Zellenlinien gesehen werden (Wu et al. 2013).

Die in dieser Arbeit untersuchten Marker CK8/18 und Pan-Cytokeratin gaben Aufschluss darüber, dass trotz fehlendem EpCAM reifzelliges Epithel in den Embryoid Bodies entstanden ist (siehe Abbildung 28 A). Doch interessanterweise entwickelte sich in den Knockout Embryoid Bodies eher einfaches, flaches Epithel im Vergleich zu den WT Embryoid Bodies. Ob diese Erscheinung etwas mit der Interaktion von Epithelzellen mit darunterliegenden Zellen zu tun hat, müsste in weiteren Arbeiten untersucht werden. Einen ersten Anhaltspunkt gibt dafür die Arbeit von Slanchev *et al.* (2009) über die Entwicklung eines EpCAM-Knockout Zebrafischs. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass EpCAM als Partner von E-Cadherin während der Epibolie (eine Migration der äußeren Hüllschicht der Epidermis, ähnlich dem Periderm von Mäusen, über den Dotter während der Gastrulation) die Adhäsion, Integrität, Form und Morphogenese von einfachem Epithel steuert und unter anderem auch für die Interaktion von Epithel und Mukosa verantwortlich zeichnet (Slanchev et al. 2009).

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf die Notwendigkeit einer stark regulierten und differentiellen Expression von EpCAM im Verlauf der Differenzierung von embryonalen Stammzellen hin. Die geregelte Mischung aus EpCAM-positiven und –negativen embryonalen Stammzellen sorgt für eine vollständige, spontane Differenzierung zu funktionellen Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten. Obschon differenzierende Kardiomyozyten einen kompletten Verlust der Expression von EpCAM benötigen, sind sie offensichtlich auf die Anwesenheit von EpCAM-positiven endodermalen Zellen zur vollständigen Differenzierung angewiesen.

Um nachzuweisen, dass eine geringe Restmenge EpCAM-positiver Zellen vonnöten ist, um eine vollständige Wiederherstellung der kardiomyozytären Differenzierung zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Die Kommunikation zwischen EpCAM-positiven und negativen Zellen könnte auf parakriner Sekretion beruhen oder durch Zell-Zell-Kontakt vermittelt werden. Als Beispiel parakriner Kommunikation

zwischen endodermalen und mesodermalen Zellen kann Schmelzer *et al.* (2007) herangezogen werden. Die untersuchten humanen hepatischen Stammzellen bildeten eng aneinanderliegende Kolonien, die von mesenchymalen Zellen umgeben waren. In Videos wanderten die mesenchymalen Zellen bei Wachstum der endodermalen Kolonien in diese hinein und wieder zurück. Die Adhäsion an die Zellkulturschale konnte nur dort festgestellt werden, wo eine Interaktion zwischen den mesenchymalen und hepatischen Stammzellen stattfand.

In Rahmen dieser Arbeit konnte keine Rekonstitution der kardiomyozytären Differenzierung durch lösliche Faktoren erreicht werden (siehe Abbildung 33). Dies weist daraufhin, dass lösliche Faktoren nicht ausreichen, um den Verlust von EpCAM in der Differenzierung auszugleichen. Desweiteren weisen diese Ergebnisse auf eine Notwendigkeit für Zell-Zell Kontakt von EpCAM-positiven und -negativen Zellen für eine vollständige Differenzierung hin.

Es ist bekannt, dass in Entwicklungsprozessen unterschiedliche Arten der Kommunikation zwischen Zellen stattfinden (Fagotto und Gumbiner 1996). Vor allem der juxtakrine Signalweg würde im Falle von EpCAM und den ersten Tagen der Differenzierung sinnvoll erscheinen, denn je nach Verteilung der Zellen im Embryo oder im Embryoid Body werden Signale nur in der direkten Umgebung benötigt, um ein fein austariertes System an Signalweitergabe zu ermöglichen. Juxtakrine Kommunikation basiert auf präziser Zell-Zell-Induktion durch einen nichtlöslichen membrangebundenen Liganden an der Zelloberfläche, durch den nur Zellen mit direktem Zellkontakt aktiviert werden (Fagotto und Gumbiner 1996). Notch-signaling, bekannt durch die Steuerung von wichtigen Entwicklungsprozessen unter anderem in der Drosophila, übernimmt während der Nervenzellentwicklung die Selektion von wenigen neuronalen Vorläuferzellen, die durch direkten Zell-Zell-Kontakt die Entwicklung ihrer Nachbarzellen zu neuronalen Zellen hemmen, welche stattdessen zu epidermalen Zellen werden (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1995). Auch das an Zelladhäsion und Gentranskription beteiligte Protein- β -Catenin stellt ein interessantes Modell zur Zellkommunikation dar. Bei starker Adhäsion wird die Mehrheit der β -Catenin Moleküle von E-Cadherinen gebunden, wodurch wenig Zell-Kommunikation stattfindet. Bei schwacher Adhäsion sind die von β -Catenin adressierten Signalwege durch mehr freies β -Catenin aktiver. Die Kombination aus beidem ist vor allem während der Entwicklung nützlich, die mit morphogenetischen Umstrukturierungen einhergeht, um eine schnelle Neustrukturierung der Zellen in den ersten Entwicklungstagen zu ermöglichen. Dabei vermischen sich die Zellen stark. Zur

Ermöglichung der Entstehung von komplexen Zellverbänden wie Organen ist jedoch eine koordinierte Bewegung von Zellverbänden innerhalb des Embryos notwendig. Um gewisse Zellkonglomerate innerhalb des Embryos miteinander verbunden zu lassen, die denselben Differenzierungsweg gehen sollen, hilft β -Catenin durch die Induktion von denselben Signalwegen im Zellkonglomerat (Fagotto und Gumbiner 1996).

Durch die Vermischung von EpCAM-positiven und negativen ES-Zellen erreichte man in der vorliegenden Arbeit eine Steigerung der kardiomyozytären Differenzierung (siehe Abbildung 34 und 35). Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde untersucht, ob auch EpCAM-negative Zellen kardiomyozytär differenziert sind, indem eine Coexpression mit α CAA nachgewiesen wurde. Bei insgesamt 6 untersuchten EpCAM-Knockout Embryoid Bodies Zellen war dies der Fall (siehe Abbildung 38).

Somit ist es möglich, dass zur vollständigen Differenzierung zu Kardiomyozyten ein Kontakt von EpCAM-positiven und negativen Zellen notwendig ist.

Die Verbindung von endodermalen Zellen und der Kardiogenese wurde zum einen in der Entwicklung des Hühnervogels untersucht. Anteriorlaterales Endoderm scheint für die korrekte Kardiogenese Umgebungsreize via BMP oder Wnt Signalwege zu senden (Lough und Sugi 2000). Zum anderen untersuchten Holtzinger *et al.* die Kommunikation zwischen endo- und mesodermalen Zellen. Die Autoren überexprimierten den Transkriptionsfaktors Gata4 in ES-Zellen und beobachteten eine vermehrte Entwicklung zu kardiomyozytären Zellen. Die Autoren führten dies auf eine Gata4 gesteuerte Entwicklung von EpCAM-positiven viszeralem und definitiven Endoderm zurück, das wiederum Embryoid Bodies in Mischkulturen vermehrt kardiomyozytär differenzieren ließ (Holtzinger *et al.* 2010). Weitere Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung von Endoderm und Mesoderm gibt die Existenz von bi-potentem Mesendoderm in der Säugetierembryogenese, das sich zu anteriorem definitiven Endoderm und axialem Mesoderm weiterentwickelt (Tada *et al.* 2005).

Für die weitere Analyse der Interaktion zwischen kardiomyozytär differenzierenden Zellen und EpCAM-positiven Zellen wäre ein Charakterisierung in der Fluoreszenzmikroskopie der EpCAM-positiven Zellen im Embryoid Body an Tag 10 durch Marker des Mesendoderms wie zum Beispiel Gsc (Tada *et al.* 2010) oder des definitiven Endoderms sinnvoll, um zu erfahren, welche Vorstufe des Endoderms die kardiomyozytäre Differenzierung beeinflusst und um eine differenziertere Sicht auf die Interaktion dieser Zellen zu bekommen.

5.3 Auswirkung der EpCAM Überexpression, des EpCAM-Knockouts und der ERas Überexpression auf die Teratombildung *in vivo*

Die molekularen Funktionen EpCAMs wurden anfänglich in Karzinomen untersucht, in denen EpCAM Proliferation vermittelt (Chaves-Perez et al. 2013; Maetzel et al. 2009). Auch embryonale Stammzellen können Tumore bilden, die Teratome oder Teratokarzinome genannt werden. Aufgrund der ähnlich hohen Expression von EpCAM in Karzinomen wie in embryonalen Stammzellen wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung EpCAMs auf die Bildung von Teratome bzw. Teratokarzinome untersucht. Die Bildung von Teratomen oder Teratokarzinomen durch Implantation von ES-Zellen in immunsupprimierte Mäuse bewirkt eine Differenzierung in die drei Keimblätter, wobei die Zellen jedoch aufgrund fehlender Information über die weitere Strukturierung zueinander ungeordnet und willkürlich differenzieren. Dabei geht die korrekte Zell-Zell-Interaktion verloren (Aleckovic und Simon 2008, Przyborski 2005). Noch immer ist wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, die die Bildung von Teratomen steuern und die Differenzierung von murinen (Nussbaum et al. 2007) und humanen ES-Zellen in Teratomen leiten (Przyborski 2005).

Neben *in vitro* Experimenten wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Teratom/Teratokarzinomassays mit unterschiedlich großer injizierter Zellmenge durchgeführt. Die Effizienz der Tumor-Entwicklung nach Injektion der Stammzelllinien war in allen untersuchten Zelllinien (EpCAM Überexpression, ERas Überexpression, EpCAM-Knockout) bei beiden Experimenten annähernd identisch. Das Gewicht der Tumore der EpCAM-Überexpressionszelllinie, der EpCAM-Knockout Zelllinien und der Kontrollzelllinien unterschied sich in beiden Experimenten nicht signifikant. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass EpCAM keinen Einfluss auf die Effizienz der Teratom- bzw. Teratokarzinombildung hat. Da EpCAM keinen Einfluss auf das Gewicht oder die Ausmessung von Tumoren hatte, kann davon ausgegangen werden, dass EpCAM nicht tumorigen bei der Entwicklung von Teratomen bzw. Teratokarzinomen wirkt. Dies steht im Gegensatz zum onkogenen Potential von EpCAM in Karzinomzellen (Maetzel et al. 2009), ist jedoch konform mit der Beobachtung, dass EpCAM-Knockout Zellen in dieser Arbeit keinen offensichtlichen Proliferationsnachteil hatten (siehe 4.2.2.2 und 4.2.2.4). Es konnte kein Teratom/Teratokarzinomassay mit murinen EpCAM-Knockout oder Überexpression ES-Zellen in der Literatur gefunden werden, zum Vergleich murine ES-Zellen versus humane ES-Zellen kann Ng *et al.* (2010) herangezogen werden.

Die Autoren injizierten 4×10^6 humane ES-Zellen, die einen lentiviral eingebrachten shRNA EpCAM Knockdown aufwiesen, in 50 μ L Volumen, der Zeitpunkt der Entnahme und die Gewichte der vier Teratome wurden jedoch nicht angegeben. Die ES-Zellen mit EpCAM Knockdown bildeten Teratome mit Zellen aus allen Keimblättern, nachgewiesen durch mikroskopische Untersuchung der Gewebearten und ihrer Spezifika. Die analysierte RNA aus den Teratomen ergab eine starke AFP Erhöhung durch den EpCAM Knockdown (Ng et al. 2010). Die in dieser Arbeit entstandenen Teratome könnten auf AFP gefärbt werden, um zu sehen, ob eine erhöhte Menge an Zellen im Teratom endodermal differenziert sind oder eine verringerte Menge in den EpCAM-Knockout Teratomen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Tumore der ERas-Überexpressionszelllinie waren nicht signifikant größer verglichen mit der WT Kontrollgruppe. Auffällig war ihre starke Vaskularisierung. Teratome scheinen nach Zhang *et al.* ihre Umgebung zu modulieren, um ihr Wachstum zu ermöglichen und die Bildung von zuführenden Blutgefäßen anzuregen (Zhang et al. 2012).

ERas wurde erstmals von Takahashi *et al.* (2003) untersucht. Diese Arbeitsgruppe injizierte 1×10^6 NIH3T3 Zellen (murine embryonale Fibroblasten), die mittels pMX Vektor mit humanem und murinem ERas transfiziert wurden, subkutan und entnahm die Tumore nach 14-16 Tagen. ERas Tumore aus NIH3T3 Zellen waren um ein vielfaches größer als die der WT NIH3T3 Zellen, jedoch sind keine Gewichtsangaben gemacht worden. Takahashi et al (2003) kommen zu dem Schluss, dass das transfizierte ERas in den NIH3T3 Zellen onkogenes Potential hat. Takahashi *et al.* (2003) verwendeten außerdem WT ES-Zellen, die 4/4 Tumore bildeten, in ihrer Größe zwischen 0,02-0,17 g. ERas Knockout ES-Zellen bildeten Tumore bis 0,002 g. Der Knockout von ERas konnte durch eine Überexpression der p-AKT ausgeglichen werden, die Tumore waren zwischen 0,001-0,7 g schwer (Takahashi et al. 2003). Bei Takahashi *et al.* (2003) hatte ERas also eine essentielle Bedeutung für die Entstehung von Teratomen nach Injektion von ES-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Bedeutung für die Entstehung von Teratomen nicht auf die Proliferation der Zellen im Teratom ausgeweitet werden, da es trotz Überexpression von ERas in ES-Zellen keine größeren Teratome entstanden.

Die Durchführung von Teratom/Teratokarzinomassays ist sehr uneinheitlich (Müller et al. 2010). Teratome können grundsätzlich sehr unterschiedlich sein und in ihrem Gewicht sowie der Zusammensetzung stark variieren. Daher sind Vergleiche erschwert. Müller *et*

al. geben Anregungen, die Tumore auch danach zu analysieren, wie ausgereift die entstandenen Gewebe sind, ob sie sich in einem frühen Stadium der Differenzierung befinden oder schon vollständig differenziert sind. Dies wäre auch für die Teratome aus der vorliegenden Arbeit sinnvoll. Insbesondere die standardisierte Analyse nach histopathologischen Gesichtspunkten wäre für eine Metaanalyse von Teratomen bedeutend. Gropp *et al.* sprechen sich für eine Standardisierung und damit eine bessere Vergleichbarkeit des Teratomassays in humanen Stammzellen aus (Gropp et al. 2012). Dies wäre auch für murine Teratom/Teratokarzinomassays sinnvoll, um den tumorigenen Effekt von verschiedenen molekularen Mechanismen in murinen Stammzellen messen und vergleichen zu können.

Beachtenswert ist, dass sich Tumore aus murinen und humanen Stammzellen unterscheiden. Murine ES-Zellen bilden meist schneller wachsende, oft in den Bauchraum metastasierende Teratokarzinome, die EC-Zellen beinhalten (Blum et al. 2009). Diese EC-Zellen sind Oct3/4 und Nanog positiv (Gidekel et al. 2003, Blum et al. 2009). Humane Teratome sind oftmals benigne und beinhalten entweder keine EC-Zellen mehr oder wenige. Blum *et al.* (2009) postulieren, dass humane Teratome nicht auf Grundlage von EC-Zellen entstehen, sondern ein Ergebnis einer veränderten embryonalen Entwicklung von humanen ES-Zellen sind, wie schon bei einer Debatte um eine korrekte Benennung von Teratomen und Teratokarzinomen festgestellt wurde (Lensch et al. 2007). Dabei bleiben manche Gene exprimiert, die in der normalen Embryogenese abgeschaltet würden. Das starke Wachstum, das das Teratom/Teratokarzinomassay von einer Differenzierung in Embryoid Bodies unterscheidet, könnte durch Gene zustande kommen, die normalerweise im Laufe der Differenzierung supprimiert werden und zum Beispiel für Selbsterneuerung und Hemmung von Apoptose zuständig sind (Blum et al. 2009). Blum *et al.* identifizierten BIRC5 als solch ein Gen, das daraus entstehende Survivin geht mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose einher (Blum et al. 2009). Auch Gertow *et al.* konnten keine undifferenzierten humanen ES-Zellen in den untersuchten Teratomen finden (Gertow et al. 2004).

Diese Theorie steht im Gegensatz zu den folgenden Ergebnissen. Wernig *et al.* (2007) berichteten von einem Differenzierungsgradienten in aus humanen iPSC entstandenen Teratomen. In der Mitte des Teratoms zeigte sich ein Konglomerat an Oct3/4- und Nanog-positiven, undifferenzierten Zellen (Wernig et al. 2007). Ähnliches konnte von Cooke *et*

al. gezeigt werden, dabei war die Menge an undifferenzierten Zellen im Teratom abhängig von der Stelle, an der das Teratom entstanden ist (Cooke *et al.* 2006).

Wieso sich Ergebnisse bei Teratom/Teratokarzinomassays unterscheiden, könnte also zum Beispiel an der Menge an entstandenen EC-Zellen liegen und der molekularen Basis ihrer Entstehung. Auch spielen die Art der ES-Zelllinie und die Injektionsstelle in der Maus eine Rolle (Aleckovic 2008). Um ein murines Teratom/Teratokarzinomassay als Widerspiegelung einer embryonalen Differenzierung verwenden zu können, wie es von Teratomassays von humanen ES-Zellen bekannt ist (Pryzborski 2005), ist es essentiell die Menge an entstandenen EC-Zellen zu kennen.

Um die Tumorigenität von gewissen Proteinen nachweisen zu können, ist es entscheidend zu wissen, ob das Protein auf EC-Zellen im Teratom exprimiert wird. Wenn es auf den Zellen der drei Keimblätter exprimiert ist, spricht dies auch für eine Rolle bei der embryonalen Differenzierung. Über die genaue Zusammensetzung von Zellen in murinen Teratomen/Teratokarzinomen ist noch wenig bekannt. Wie Wernig *et al.* (2007) und Cooke *et al.* (2006) in humanen ES-Zellen berichteten, ergab sich auch bei Pei *et al.* nach Injektion von murinen ES-Zellen und iPSC ein Differenzierungsgradient im Tumor. Zellverbände in den entstandenen Tumoren exprimierten Oct3/4 und generierten erneut Teratome, wenn sie wieder in Mäuse injiziert wurden (Pei *et al.* 2018). Ob diese Zellen EC-Zellen waren, geht aus der Publikation nicht hervor.

Ob durch eine Manipulation an der Genexpression von EpCAM eine Veränderung in der Anzahl oder Beschaffenheit von EC-Zellen entstanden ist, könnte man anhand von Färbungen von Oct3/4 und Nanog untersuchen. Es wäre interessant zu wissen, ob EC-Zellen im Tumor EpCAM-positiv sind. Diese Frage könnte mit einer Färbung von Oct3/4 der EpCAM Überexpressionsteratome beantwortet werden.

Dabei ist noch anzumerken, dass eine Färbung auf AFP hinsichtlich endodermaler Differenzierung in den entstandenen Tumoren in Kombination mit den Färbungen auf EC-Zellen sinnvoll wäre. Der entscheidende Unterschied zwischen humanen und murinen Teratomen/Teratokarzinomen, nämlich die Menge an EC-Zellen könnten Untersuchungen, von Ng *et al.* (2010) in humanen Teratomen durchgeführt, verfälschen. Das von Takahashi *et al.* (2003) durchgeführte Teratom/Teratokarzinomassay ergab durch den ERas Knockout sehr kleine Tumore. Chambers und Smith propagieren, dass dies bedeuten könnte, dass ERas Knockout Tumore keine pluripotenten Zellen mehr beinhalten und somit reine Teratome und keine Teratokarzinome sind (Chambers und Smith 2004). Es wäre interessant, ob sich die Menge an EC-Zellen in den ERas

Überexpressionstumoren dieser Arbeit im Vergleich zu den WT Tumoren erhöht hat. Außerdem würde dies für die EpCAM-Knockout Tumore bedeuten, dass diese immer noch pluripotente Zellen bzw. EC-Zellen beinhalten, es also keinen direkten Einfluss von EpCAM auf die Tumorigenität gibt.

In dieser Arbeit bildete die Zelllinie #149 eine Abtropfmetastase im Bauchraum, was für ein aggressives invasives Wachstum spricht, das durch den EpCAM-Knockout nicht beeinflusst wurde. Da Embryoid Bodies aus Knockout Zelllinien jedoch auch in einem undifferenzierteren Stadium verblieben sind und stärker proliferierten, könnte es sein, dass auch in der Teratom/Teratokarzinombildung fehlendes EpCAM dazu führt, dass mehr Zellen in einem stärker pluripotenten Stadium verweilen. Dadurch kommt es zu einer verringerten Menge an stark ausdifferenzierten Zellen, die Tumore wachsen stärker und metastasieren häufiger. Wie dies mit der Bildung von EC-Zellen zusammenhängt, bleibt noch unklar.

Bei King *et al.* (2009) wurden GFP transfizierte humane ES-Zellen auf die Expression von CD133 angereichert und anschließend mit GFP negativen humanen ES-Zellen vermischt und differenziert. Die entstandenen EBs wurden auf Keimblattmarker gefärbt. Dabei ergab sich eine erhöhte Koexpression von CD133 und Nestin, einem ektodermalen Marker. CD133 negative Zellen waren seltener ektodermal differenziert. Dasselbe Experiment mit GFP und CD133 Koexpression wurde in einem Teratomassay durchgeführt, um nach der Differenzierung im Teratom ursprünglich markierte Zellen wieder zu finden und ihren Differenzierungsweg sichtbar zu machen. Auch nach zehn Wochen war GFP in den Teratomen noch immunhistochemisch nachweisbar (King *et al.* 2009). Ähnliches könnte mit GFP und EpCAM durchgeführt werden, um zu erfahren, ob EpCAM-positive Zellen endodermal differenzieren und ob EpCAM-negative Zellen mesodermal differenzieren.

Teratom/Teratokarzinomassays werden als Goldstandard der Pluripotenz Bestimmung angesehen (Aleckovic und Simon 2008). Kritisch daran sind die stark divergierende Art der Ausführung von Teratom/Teratokarzinomassays (Gropp *et al.* 2012; Müller *et al.* 2010) sowie die Tatsache, dass das Verständnis von definitiver „Pluripotenz“ noch nicht vollständig ist (Müller *et al.* 2010). Vor allem bei der Verwendung von iPSC für sichere Therapien ist eine genaue Kenntnis über Pluripotenz oder Tumorigenität der Zellen essentiell. Bei einer intrathekalen Injektion von unter anderem auch embryonalen Stammzellen kam es bei einem Patienten zur Ausbildung eines glioproliferativen Tumors (Berkowitz *et al.* 2016). Bei Chan *et al.* (2009) wurden iPSC Kolonien identifiziert, die

morphologisch ES-Zellen entsprachen, jedoch nicht vollständig reprogrammiert waren. Diese bildeten unreifzellige Teratokarzinome (Chan et al. 2009). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Tumorigenität von Stammzellen von ihrem Stadium der Pluripotenz abhängen könnte. Um die Bildung von Teratokarzinomen bei Stammzellen zu verhindern, sind weitere Analysen vom Übergang von ES-Zellen zu EC-Zellen vonnöten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Hinweise darauf gefunden werden, dass EpCAM eine Rolle bei der Pluripotenz und der endo- und mesodermalen Differenzierung spielt. Trotzdem ist unser Verständnis von den molekularen Mechanismen, die zur fein abgestimmten EpCAM Expression in der frühen Entwicklung von Säugetieren führt, rudimentär. Durch die gezielte Ausschaltung von bestimmten Proteinen durch CRISPR/Cas9 wird die Untersuchung von Signalwegen vereinfacht. Mittlerweile ist auch der Knockout von mehreren Genen keine Seltenheit mehr, wie bei Wang *et al.* (2013) in Form von fünf Genen in murinen ES-Zellen. Dabei ist es vor allem hinsichtlich therapeutischer Applikation von CRISPR/Cas9 von Bedeutung sich unter anderem auf die Reduktion von off-target effects zu fokussieren und das Design der Nukleasen zu verbessern. Dies wäre zum Beispiel durch Verwendung von Nukleasen wie die high fidelity Nuklease SpCas9-HF1 oder die hyperakkurate Nuklease HypaCas9, sowie die Verwendung von DNA Nickasen statt Nukleasen möglich (Guha und Edgell 2017). Die Erleichterung der Generierung von Knockout Mäusen (Li et al. 2014) und die Rückbesinnung auf Methoden der frühen Phase der Stammzellforschung (Martin 1980) wird die Erforschung der Embryogenese begünstigen.

6. Zusammenfassung

Tumorgenese und Metastasierung sind bestimmt von unkontrollierter Proliferation und Migration. Das dimere Transmembranprotein EpCAM ist stark in Karzinomen exprimiert und spielt eine Rolle bei der Regulation von Proliferation und onkogener Transformation. Darüberhinaus sind murine und humane embryonale Stammzellen vergleichbar stark EpCAM-positiv. Im Verlauf der Differenzierung wird EpCAM herunterreguliert und schlussendlich nur noch von einfachen Epithelien exprimiert. Dieser Unterschied in der Expressionsmenge wirft Fragen nach Regulation und Funktion von EpCAM im pluripotenten Zustand von embryonalen Stammzellen, im Verlauf der frühen Embryogenese und bei der malignen Differenzierung von Tumorzellen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 3D Modell der spontanen Differenzierung in Embryoid Bodies verwendet, um die frühe Embryogenese in vitro nachzuahmen und eine genetische Manipulation der Zellen zu ermöglichen. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte durch eine konstitutive Überexpression von EpCAM ein positiver Einfluss auf die endodermale Differenzierung und eine Hemmung der mesodermalen Differenzierung nachgewiesen werden. Desweiteren wurde eine Interaktion von EpCAM mit der GTPase ERas nachgewiesen.

Um verantwortliche molekulare Mechanismen bei der EpCAM-vermittelten Regulation der Differenzierung von Stammzellen zu entschlüsseln, wurde in der vorliegenden Arbeit ERas und hyperaktive AKT (myrAKT) in ES-Zellen überexprimiert. Die Verbindung zwischen EpCAM und dem PI3Kinase/AKT Signalweg über ERas konnte durch eine AKT Phosphorylierung nach Überexpression von EpCAM nachgewiesen werden. Nach ERas und myrAKT Überexpression wurde eine Hemmung der kardiomyozytären Differenzierung beobachtet. Dies spricht dafür, dass die mesodermale Differenzierung durch EpCAM-ERas-PI3-Kinase/AKT partiell gehemmt wird. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein konstitutiver EpCAM-Knockout mit Hilfe der CRISPR Cas9 Technologie in embryonalen Stammzellen durchgeführt. In EpCAM-negativen embryonalen Stammzellen reduzierte sich die AKT Phosphorylierung auf 30 % des Ausgangswerts in parentalen Stammzellen. Ein zellulärer EpCAM-Knockout zeigte keine Proliferationsnachteile, die embryonalen Stammzellen differenzierten in alle drei Keimblätter. Dies wurde durch Analyse der mRNA früher Keimblattmarkern nach zehntägiger Differenzierung in Embryoid Bodies sowie durch immunhistochemische Färbung von Embryoid Bodies nachgewiesen. Durch den EpCAM-Knockout zeigte sich

jedoch erneut eine Hemmung der kardiomyozytären Differenzierung. Erste Versuche zeigten eine partielle Rekonstitution der kardiomyozytären Differenzierung der EpCAM-negativen embryonalen Stammzellen durch die Anwesenheit von ursprünglich EpCAM-positiven Stammzellen in Embryoid Bodies. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für eine korrekte kardiomyozytäre Differenzierung modulierende Interaktion von EpCAM-positiven endodermalen und EpCAM-negativen mesodermalen Zellen via juxtakriner Zellkommunikation notwendig ist. Eine Störung des streng regulierten Gleichgewichts der EpCAM Expression beeinträchtigt die spontane mesodermale Differenzierung. In der frühen Entwicklungsphase ist eine ausbalancierte EpCAM Expression auf Einzell- und Zellclusterniveau für die Differenzierung zu Kardiomyozyten essentiell sowie es aus dem French Flag Modell der Entwicklung bekannt ist.

Da EpCAM onkogen und proliferativ in Karzinomen wirkt, wurde ein Teratom bzw. Teratokarzinomassay mit EpCAM und ERas Überexpressionszellen sowie EpCAM Knockout Zellen durchgeführt. EpCAM beeinflusste die Tumorigenität von embryonalen Stammzellen nicht. Eine erste immunhistochemische Analyse der EpCAM-Knockout Teratome erbrachte eine Tendenz der Zellentwicklung im Teratom in Richtung mesodermaler Differenzierung. Diese Analyse könnte durch die Färbung von EC-Zellen durch Oct3/4 und Foxa2 ergänzt werden, um einen Einblick in die Rolle von EpCAM bei der Entstehung von EC-Zellen und bei der endodermalen Differenzierung im Teratom zu bekommen. Im Hinblick auf zukünftige Stammzelltherapien ist es essentiell, Signalwege in embryonalen Stammzellen, die zur Differenzierung und Dedifferenzierung führen, weiter zu entschlüsseln.

7. Summary

Tumorigenesis and metastases formation are characterized by uncontrolled proliferation and cell migration. Epithelial cell adhesion molecule EpCAM is a heart-shaped cis-dimer transmembrane protein present at the cell surface, which is highly expressed in various cancers and embryonic stem cells (ESC). In carcinoma cells, EpCAM is involved in proliferation and oncogenic transformation. Expression levels in murine ESCs are comparably high or even higher than in carcinoma cells. In contrast to this, expression of EpCAM in physiological tissue is limited to subsets of epithelia. This difference in expression levels raises questions about the roles of EpCAM in ESCs. To address these questions in the present thesis, the hanging-drop 3D-differentiation model was used to generate embryoid bodies that closely mimics embryogenesis *in vitro*. Previous work of our group demonstrated gain-of-function of EpCAM as supportive in achieving guided endodermal differentiation, but repressive functions in mesodermal differentiation, as exemplified with cardiomyocyte formation. Furthermore, the small GTPase embryonic Ras (ERas) was identified as novel EpCAM interactor.

To gain further insight in molecular pathways of EpCAM-mediated regulation of cell differentiation, ESC clones expressing exogenous ERas and an activated version of AKT (myrAKT) were generated. Over-expression of EpCAM fostered the activating phosphorylation of AKT. Both, over-expression of ERas and the activated version of AKT mimicked limiting effects of EpCAM on cardiomyocyte formation. This is indicative for a novel signaling axis EpCAM/ERas/AKT in ESCs that limits mesodermal differentiation to cardiomyocytes.

For the first time, a loss-of-function knockout of EpCAM was generated through CRISPR-Cas9 technology in murine embryonic stem cells. Cellular EpCAM knockout cells showed a decreased AKT phosphorylation but revealed no major impact on ESC proliferation. EpCAM knockout ESC initially differentiated in all three germ layers, as disclosed by quantitative RT-PCR and immunohistochemical analysis of early germ layer markers. However, CRISPR Cas9- guided cellular EpCAM knockout clones were severely impaired in the formation of contracting EB and loss of EpCAM interfered with correct differentiation, measured with elevated transcripts of Oct3/4 and ERas in quantitative RT-PCR. Disturbed mesodermal 3D-differentiation of EpCAM-negative ESCs was partly reverted by the presence of a minor fraction of initially EpCAM-positive wild-type ESCs, which supported full differentiation of knockout ESCs to cardiomyocytes, as visualized

upon immune- and direct fluorescence in Embryoid bodies. Together these data disclose modulating interaction of endodermal and mesodermal cell, most probably via juxtacrine signalling. Disturbance of the tight control of EpCAM results in perturbation of spontaneous mesodermal differentiation. It displays a need for spatiotemporally balanced expression of EpCAM at single cell and multicellular organism level for the orchestrated completion of ESC differentiation to cardiomyocytes at the earliest time points of gastrulation.

Since EpCAM was reported to regulate cell proliferation and oncogenicity through RIP-dependent signaling in carcinoma cells, a teratoma formation assay was performed. Cellular knockout of EpCAM had no impact on teratoma formation or tumour weight, but immunohistochemical staining of EpCAM^{-/-} teratomas showed a slightly increased fraction of mesodermal cells. Hence, EpCAM is dispensable for teratoma formation. In view of stem cell therapy, it is mandatory to follow up with decoding main pathways and interacting partners of differentiation and dedifferentiation.

8. Literaturverzeichnis

- Addis, R.C. und Epstein, J.A. (2013): Induced regeneration-the progress and promise of direct reprogramming for heart repair. In: *Nat Med* 19, S. 829-836.
- Aleckovic, M. und Simon, C. (2008): Is teratoma formation in stem cell research a characterization tool or a window to developmental biology? In: *Reproductive Biomedicine Online* 17, S. 270–280.
- Anderson, R.; Schaible, K.; Heasman, J.; Wylie, C. (1999): Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. In: *J Reprod Fertil* 116 (2), S. 379–384.
- Armstrong, L.; Hughes, O.; Yung, S.; Hyslop, L.; Stewart, R.; Wappler, I.; Peters, H.; Walter, T.; Stojkovic, P.; Evans, J.; Stojkovic, M.; Lako, M. (2006): The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. In: *Human molecular genetics* 15 (11), S. 1894–1913.
- Arnold, S.J. und Robertson, E.J. (2009): Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2), S. 91-103.
- Artavanis-Tsakonas, S.; Matsuno, K.; Fortini, M.E. (1995): Notch signaling. In: *Science.* 268(5208), S. 225-32.
- Baeuerle, P.A. und Gires, O. (2007): EpCAM (CD326) finding its role in cancer. In: *British journal of cancer* 96 (3), S. 417–423.
- Balzar, M.; Winter, M.J.; de Boer, C.J.; Litvinov, S.V. (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). In: *J Mol Med (Berl)* 77 (10), S. 699–712.
- Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science (New York, N. Y.)* 315 (5819), S. 1709–1712.
- Berkowitz, A.L.; Miller, M.B.; Mir, S.A.; Cagney, D.; Chavakula, V.; Guleria, I.; Aizer, A.; Ligon, K.L.; Chi, J.H. (2016): Glioproliferative Lesion of the Spinal Cord as a Complication of “Stem-Cell Tourism” In: *N Engl J Med* 375, S.196-198.
- Blum, B.; Bar-Nur, O.; Golan-Lev, T.; Benvenisty, N. (2009): The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. In: *Nature Biotechnology* 27, S. 281–287.
- Boiani, M. und Scholer, H.R. (2005): Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (11), S. 872-84.
- Bradley, A.; Evans, M.; Kaufman, M.H.; Robertson, E. (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. In: *Nature* (309), S. 255–256.
- Breuhahn, K.; Baeuerle, P.A.; Peters, M.; Prang, N.; Töx, U.; Köhne-Volland, R.; Dries, V.; Schirmacher, P.; Leo, E. (2006): Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma. In: *Hepatol Res.* 34(1), S. 50-6.
- Cartwright, P.; McLean, C.; Sheppard, A.; Rivett, D.; Jones, K.; Dalton, S. (2005): LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (5), S. 885–896.
- Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. (2003): Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. In: *Cell* 113 (5), S. 643–655.
- Chambers, I. und Smith, A. (2004): Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. In: *Oncogene* 23, S. 7150–7160.

- Chan, E.M.; Ratanasirintrao, S.; Park, I.H.; Manos, P.D.; Loh, Y.H.; Huo, H.; Miller, J.D.; Hartung, O.; Rho, J.; Ince, T.A.; Daley, G.Q.; Schlaeger, T.M. (2009): Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. In: *Nat. Biotechnol.* 27, S. 1033–1037.
- Chaves-Pérez, A.; Mack, B.; Maetzel, D.; KremLing, H.; Eggert, C.; Harréus, U.; Gires, O. (2012): EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. In: *Oncogene* 32 (5), S. 641–650.
- Choi, D.; Lee, H.-J.; Jee, S.; Jin, S.; Koo, S. K.; Paik, S.S.; Jung, S.C.; Hwang, S.Y.; Lee, K.S.; Oh, B. (2005): In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the Embryoid Body. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23 (6), S. 817–827.
- Christian, M.; Cermak, T.; Doyle, E.L.; Schmidt, C.; Zhang, F.; Hummel, A. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. In: *Genetics* 186 (2), S. 757–761.
- Cirulli, V.; Crisa L; Beattie, G.M.; Mally, M.I.; Lopez, A.D.; Fannon, A. (1998): KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. In: *J Cell Biol* (140), S. 1519–1534.
- Condic, M.L. (2014): Totipotency: what it is and what it is not. In: *Stem Cells Dev* 23(8), S. 796–812.
- Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N. (2013): Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. In: *Science* 339 (6121), S. 819–823.
- Cooke, M.J.; Stojkovic, M.; Przyborski, S.A. (2006): Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. In: *Stem Cells and Development* 15, S. 254–259.
- Coronado, D.; Godet, M.; Bourillot, P.-Y.; Tapponnier, Y.; Bernat, A.; Petit, M. (2013): A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. In: *Stem cell research* 10 (1), S. 118–131.
- Dadheech, N.; Srivastava, A.; Belani, M.; Gupta, S.; Pal, P.; Bhonde, R.; Srivastava, A.; Gupta, S. (2013): Basal Expression of Pluripotency-Associated Genes Can Contribute to Stemness Property and Differentiation Potential. In: *Stem Cells Dev.* 22(12), S. 1802–1817.
- de Boer, C.J.; van Krieken, J.H.; Janssen-van Rhijn, C.M.; Litvinov, S.V. (1999): Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. In: *J Pathol* 188 (2), S. 201–206.
- Deltcheva, E.; Chylinski, K.; Sharma, C.M.; Gonzales, K.; Chao, Y.; Pirzada, Z.A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607.
- Denzel, S; Maetzel, D; Mack, B; Eggert, C; Bähr, G; Gires, O (2009): Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. In: *BMC Cancer* 9, S. 402.
- Driemel, C.; Kremling, H.; Schumacher, S.; Will, D.; Wolters, J.; Lindenlauf, N. et al. (2014): Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. In: *Oncogene* 33 (41), S. 4904–4915.
- Dushnik-Levinson, M. und Benvenisty, N. (1995): Embryogenesis in vitro: Study of Differentiation of Embryonic Stem Cells. In: *Biol Neonate* 67, S. 77–83
- Dutta, D. (2013): Signaling pathways dictating pluripotency in embryonic stem cells. In: *The International journal of developmental biology* 57, S. 667-675.
- Evans, M.J. und Kaufman, M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: *Nature* 292 (5819), S. 154–156.
- Fagotto, F. und Gumbiner, B.M. (1996): Cell Contact-Dependent Signaling. In: *Developmental Biology* 180, S. 445 –454.

- Freed, C.R. (2002): Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease? In: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, S. 1755–1757.
- Gaber, A.; Kim, S.; Kaake, R. M.; Benčina, M.; Krogan, N.; Šali, A.; ... Lenarčič, B. (2018): EpCAM homo-oligomerization is not the basis for its role in cell-cell adhesion. In: *Scientific Reports*, 8, 13269.
- Gaiser, M.R.; Lämmermann, T.; Feng, X.; Igyarto, B.Z.; Kaplan, D.H.; Tessarollo, L.; Germain, R.N.; Udey, M.C. (2012): Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (15), S. E889-97.
- Gertow, K.; Wolbank, S.; Rozell, B.; Sugars, R.; Andäng, M.; Parish, C.; Imreh, M.; Wendel, M.; Åhrlund-Richter, L. (2004): Organized Development from Human Embryonic Stem Cells after Injection into Immunodeficient Mice. In: *Stem cells and development* 13, S. 421-35.
- Gidekel, S.; Pizov, G.; Bergman, Y.; Pikarsky, E. (2003): Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. In: *Cancer Cell* 4(5), S. 361-70.
- Gires, O.; Klein, C.A.; Baeuerle, P.A. (2009): On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. In: *Nat Rev Cancer* 9(2):143; author reply 143.
- Gires, O.; Bauerle, P.A. (2010): EpCAM as a target in cancer therapy. In: *J Clin Oncol.* 28 (15), e239-40; author reply e241-2.
- Gires, O. und Stoecklein, N.H. (2014): Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells. Causes and consequences. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (22), S. 4393–4402.
- González, B.; Denzel, S.; Mack, B.; Conrad, M.; Gires, O. (2009): EpCAM Is Involved in Maintenance of the Murine Embryonic Stem Cell Phenotype. In: *Stem Cells* 27 (8), S. 1782–1791.
- Gorges, T.M.; Tinhofer, I.; Drosch, M.; Röse, L.; Zollner, T.M.; Krahn, T.; von Ahsen, O. (2012): Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. In: *BMC Cancer* 12, S. 178.
- 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. In: *Int J Cancer* 38 (1), S. 47–53.
- Gropp, M.; Shilo, V.; Vainer, G.; Gov, M.; Gil, Y.; Khaner, H.; Matzrafi, L.; Idelson, M.; Kopolovic, J.; Zak, N.B.; Reubinoff, B.E. (2012): Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Human ES Cells and Biosafety of Their Differentiated Progeny. In: *PLoS ONE*, 7 (9), e45532.
- 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. In: *PloS one* 7 (11), e49302.
- Guha, T.K. und Edgell, D.R. (2017): Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. In: *Int J Mol Sci.* 18(12), S. 2565.
- Gumbiner, B.M. (1996): Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. In: *Cell* 84, S. 345-357.
- Gun, van der, 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. In: *Carcinogenesis* 31(11), S. 1913-21.
- Hachmeister, M. (Februar 2014): Proteolytische Spaltung und Signaltransduktion des tumorassozierten Antigens EpCAM in murinen Teratom- und embryonalen Stammzellen. Unv. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität, München. Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.

- 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. In: *PLoS one* 8 (8, e71836), S. 1–16.
- Haft, D.H.; Selengut, J.; Mongodin, E.F.; Nelson, K.E. (2005): A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. In: *PLoS computational biology* 1 (6), S. e60.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557–580.
- Hemmings, B.A. und Restuccia, D.F. (2012): PI3K-PKB/Akt pathway. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (9), S. a011189.
- Herlyn, M.; Steplewski, Z.; Herlyn, D.; Koprowski, H. (1979): Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. In: *Proc Natl Acad Sci USA* (76), S. 1438–1442.
- Holtzinger, A.; Rosenfeld, G.E.; Evans, T. (2010): Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells. In: *Developmental Biology* 337 (1), S. 63–73.
- Hsu, P.D.; Lander, E.S.; Zhang, F. (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In: *Cell* 157 (6), S. 1262–1278.
- Huang, H.-P.; Chen, P.-H.; Yu, C.-Y.; Chuang, C.-Y.; Stone, L.; Hsiao, W.-C. (2011): Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (38), S. 33520–33532.
- Imrich, S.; Hachmeister, M.; Gires, O. (2014): EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. In: *Cell Adhesion & Migration* 6 (1), S. 30–38.
- Ishino, Y.; Krupovic, M.; Forterre, P. (2018): History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. In: *J Bacteriol*, JB.00580-17
- Itskovitz-Eldor, J.; Schuldiner, M.; Karsenti, D.; Eden, A.; Yanuka, O.; Amit, M.; Soreq, H.; Benvenisty, N. (2000): Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. In: *Molecular Medicine* 6(2). S. 88–95.
- Jaenisch, R. und Young, R. (2008): Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. In: *Cell* 132, S. 567-582.
- Jansen, R.; Embden van, J.D.A.; Gaastra, W.; Schouls, L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. In: *Mol Microbiol* 43 (6), S. 1565–1575.
- Jedrusik, A.; Parfitt, D.-E.; Guo, G.; Skamagki, M.; Grabarek, J.B.; Johnson, M.H.; Robson, P.; Zernicka-Goetz, M. (2008): Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophoblast and inner cell mass in the mouse embryo. In: *Genes & development* 22 (19), S. 2692–2706.
- Jirmanova, L.; Afanassieff, M.; Gobert-Gosse, S.; Markossian, S.; Savatier, P. (2002): Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. In: *Oncogene* (21), S. 5515–5528.
- Kaizaki, R.; Yashiro, M.; Shinto, O.; Yasuda, K.; Matsuzaki, T.; Sawada, T.; Hirakawa, K. (2009): Expression of ERas Oncogene in Gastric Carcinoma. In: *Anticancer Res.* (6), S. 2189–2193.
- Kameda, T. und Thomson, J.A. (2005): Human ERas gene has an upstream premature polyadenylation signal that results in a truncated, noncoding transcript. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23 (10), S. 1535–1540.
- Karantza, V. (2011): Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. In: *Oncogene*, S. 127–138.
- King, F.W., Ritner, C., Liszewski, W., Kwan, H.C., Pedersen, A., Leavitt, A.D., Bernstein, H.S. (2009): Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. In: *Stem Cells Dev* 18, S. 1441-50.

- Kubota, E.; Kataoka, H.; Aoyama, M.; Mizoshita, T.; Mori, Y.; Shimura, T. et al. (2010): Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer. In: *The American journal of pathology* 177 (2), S. 955–963.
- Ladwein, M.; Pape, U.-F.; Schmidt, D.-S.; Schnolzer, M.; Fiedler, S.; Langbein, L. et al. (2005): The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. In: *Exp Cell Res* 309 (2), S. 345–357.
- Lecuit, T. (2005): Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. In: *Trends in Cell Biology* 15 (1), S. 34–42.
- Lee, A.S.; Tang, C.; Rao, M.S.; Weissman, I.L.; Wu, J.C. (2013): Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. In: *Nat Med*. 19(8), S. 998-1004.
- Lei, Z.; Maeda, T.; Tamura, A.; Nakamura, T.; Yamazaki, Y.; Shiratori, H. (2012): EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. In: *Developmental Biology* 371 (2), S. 136–145.
- Lensch, M.W. und Ince T.A. (2007): The terminology of teratocarcinomas and teratomas. In: *Nature Biotechnology* 25, S. 1211.
- Lensch, M.W.; Schlaeger, T.M.; Zon, L.I.; Dale, G.Q. (2007): Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human–animal chimera. In: *Cell Stem Cell* 1, S. 253–258.
- Li, M.; Suzuki, K.; Kim, Na Y.; Liu, G.-H.; Izpisua B.; Juan, C. (2014): A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. In: *J Biol Chem* 289 (8), S. 4594–4599.
- 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. In: *Cell Adhes Commun* 2 (5), S. 417–428.
- 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. In: *J Cell Biol* 125 (2), S. 437–446.
- Litvinov, S.V.; Balzar, M.; Winter, M.J.; Bakker, H.A.M.; Bruijn, I.H.; Briaire de; Prins, F.; et al. (1997): Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) Modulates Cell–Cell Interactions Mediated by Classic Cadherins. In: *J Cell Biol* 139 (5), S. 1337–1348.
- Liu, Y.; Wang, Z.; Li, H.; Wu, Z.; Wei, F.; Wang, H. (2013): Role of the ERas gene in gastric cancer cells. In: *Oncology reports* 30 (1), S. 50–56.
- Lough, J.; Sugi, Y. (2000): Endoderm and heart development. In: *Dev Dyn*. 217(4), S. 327-42.
- Lu, H.; Ma, J.; Yang, Y.; Shi, W.; Luo, L. (2013): EpCAM Is an Endoderm-Specific Wnt Derepressor that Licenses Hepatic Development. In: *Developmental Cell* 24 (5), S. 543–553.
- 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. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (12), S. 8719–8732.
- Maetzel, Dorothea; Denzel, Sabine; Mack, Brigitte; Canis, Martin; Went, Philip; Benk, M.; Kieu, C.; Papior, P.; Baeuerle, P.A.; Munz, M.; Gires, O. (2009): Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. In: *Nat Cell Biol* 11 (2), S. 162–171.
- 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. In: *Developmental Cell* 27 (3), S. 263–277.
- Martin, G.R. (1975): Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. In: *Cell* 5(3), S. 229-43.

- Martin, G. R. (1980): Teratocarcinomas and Mammalian Embryogenesis. In: *Science N.Y.* 209, S. 768–776.
- Martin G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78(12), S. 7634–8.
- Matsuda, T.; Nakamura, T.; Nakao, K.; Arai, T.; Katsuki, M.; Heike, T.; Yokota, T. (1999): STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. In: *The EMBO Journal* 18(15), S. 4261–4269.
- McKiernan, E.; O'Driscoll, L.; Kasper, M.; Barron, N.; O'Sullivan, F.; Clynes, M. (2007): Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic-like or neuronal- and glial-like phenotypes. In: *Tissue Eng.* 13(10), S. 2419–30.
- McLean, A.B.; D'Amour, K.A.; Jones, K.L.; Krishnamoorthy, M.; Kulik, M.J.; Reynolds, D.M.; Sheppard, A.M.; Liu H.X.Y.; Baetge, E.E.; Dalton, S. (2007): Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (1), S. 29–38.
- Miller, J.C.; Holmes, M.C.; Wang, J.; Guschin, D.Y.; Lee, Y.-L.; Rupniewski, I.; Beausejour, C.M.; Waite, A.J.; Wang, N.S.; Kim, K.A.; Gregory, P.D.; Pabo, C.O.; Rebar, E.J. (2007): An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. In: *Nature biotechnology* 25 (7), S. 778–785.
- Montell, D.J. (2008): Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. In: *Science* (322), S. 1502–1505.
- 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. In: *Oncogene* 23 (34), S. 5748–5758.
- Murakami, M.; Ichisaka, T.; Maeda, M.; Oshiro, N.; Hara, K.; Edenhofer, F. (2004): mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. In: *Mol Cell Biol* 24 (15), S. 6710–6718.
- Müller, F.J.; Goldmann, J.; Löser, P.; Loring, J.F. (2010): A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. In: *Cell Stem Cell* 6(5), S. 412–4.
- Nagao, K.; Zhu, J.; Heneghan, M.B.; Hanson, J.C.; Morasso, M.I.; Tessarollo, L.; Mackem, S.; Udey, M.C. (2009): Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. In: *PLoS one* 4 (12), S. e8543Ng, Valerie Y.; Ang, Sheu Ngo; Chan, Jia Xin; Choo, Andre B.H. (2010): Characterization of Epithelial Cell Adhesion Molecule as a Surface Marker on Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. In: *Stem Cells* 28 (1), S. 29–35.
- 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. In: *Stem Cells*. (1), S. 29–35.
- Nishikawa, S.; Jakt, L.M.; Era, T. (2007): Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, S. 502–507.
- Norris, H.J.; Zirkin, H.J.; Benson, W.L. (1976): Immature (malignant) teratoma of the ovary: a clinical and pathologic study of 58 cases. In: *Cancer* 37(5), S. 2359–72.
- Nubel, T.; Preobraschenski, J.; Tuncay, H.; Weiss, T.; Kuhn, S.; Ladwein, M. (2009): Claudin-7 Regulates EpCAM-Mediated Functions in Tumor Progression. In: *Molecular Cancer Research* 7 (3), S. 285–299.
- Nussbaum, J.; Minami, E.; Laflamme, M.A.; Virag, J.A.I.; Ware, C.B.; Masino, A.; Muskheli, V.; Pabon, V.; Reinecke, H.; Murry, C.E. (2007): Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. In: *FASEB Journal* 21, S. 1345–1357.

- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., Miyajima, A. (2009): Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. In: *Development* 136, S. 1951-1960.
- Okita, K. und Yamanaka, S. (2006): Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. In: *Curr Stem Cell Res Ther* 1 (1), S. 103–111.
- Osta, W.A.; Chen, Y.; Mikhitarian, K.; Mitas, M.; Salem, M.; Hannun, Y.A.; Cole, D.J.; Gillanders, W.E. (2004): EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. In: *Cancer Research* (64), S. 5818–5824.
- Paling, N.R.D.; Wheadon, H.; Bone, H.K.; Welham, M.J. (2004): Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (46), S. 48063–48070.
- Pavšič, M.; Gunčar, G.; Djinović-Carugo, K.; Lenarčič, B. (2014): Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. In: *Nat Commun* 28; 5. S. 4764.
- Pei, Y.; Yue, Y.; Zhang, W.; Xiang, J.; Ma, Z.; Han, J. (2018): Murine pluripotent stem cells that escape differentiation inside teratomas maintain pluripotency. In: *PeerJ*. 6, e4177.
- Pennisi, E. (2013): The CRISPR craze. In: *Science (New York, N.Y.)* 341 (6148), S. 833–836.
- Przyborski, S.A. (2005): Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. In: *Stem Cells* 23, S. 1242–1250.
- Ramalho-Santos, M. und Willenbring, H. (2007): On the Origin of the Term “Stem Cell”. In: *Cell Stem Cell*, Volume 1, Issue 1, S. 35-38.
- Ran, F. A.; Hsu, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, David A.; Zhang, F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308.
- Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. In: *Nature* 414, S. 105–111.
- Riethmüller, G.; Gruber, R.; Schneider-Gädicke, E.; Schlimok, G.; Witte, J.; Raab, R. et al. (1994): Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. In: *Lancet* 343 (8907), S. 1177–1183.
- Roperto, S.; Russo, V.; Urraro, C.; Restucci, B.; Corrado, F.; De Falco, F.; Roperto, F. (2017): ERas is constitutively expressed in full term placenta of pregnant cows. In: *Theriogenology* 103, S. 162-168.
- Saiz, N. und Plusa, B. (2013): Early cell fate decisions in the mouse embryo. In: *Reproduction* 145 (3), S. 65-80.
- Sankpal, N.V.; Willman, M.W.; Fleming, T.P.; Mayfield, J.D.; Gillanders, W.E. (2009): Transcriptional Repression of Epithelial Cell Adhesion Molecule Contributes to p53 Control of Breast Cancer Invasion. In: *Cancer Research* 69 (3), S. 753–757.
- Sarrach, S. (Dezember 2013): Die Expression und Funktion des murinen EpCAM in der embryonalen Stammzellendifferenzierung. Unv. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität, München. Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.
- Sarrach, S.; Huang, Y.; Niedermeyer, S.; Hachmeister, M.; Fischer, L.; Gille, S.; Pan, M.; Mack, B.; Kranz, G.; Libl, D.; Merl-Pham, J.; Hauck, S.M.; Paoluzzi, T.E.; Kieslinger, M.; Jeremias, I.; Scialdone, A.; Gires, O. (2018): Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. In: *Sci Rep*. 8(1), 1801.
- Sasaki, D.T.; Dumas, S.E.; Engleman, E.G. (1987): Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. In: *Cytometry* 8 (4), S. 413–420.
- Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou, A.H. (2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. In: *Nat Med*. 10(1), S. 55-63.

- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B.; Samarut, J. (1995): Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. In: *Oncogene* (12), S. 309–322.
- Schmelzer, E.; Zhang, L.; Bruce, A.; Wauthier, E.; Ludlow, J.; Yao, H.-L.; Moss, N.; Melhem, A.; McClelland, R.; Turner, W.; Kulik, M.; Sherwood, S.; Tallheden, T.; Cheng, N.; Furth, M.E.; Reid, L.M. (2007): Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. In: *J Exp Med* 204 (8), S. 1973–1987.
- Schmoll, H.-J. und Arnold, D. (2009): When wishful thinking leads to a misty-eyed appraisal: the story of the adjuvant colon cancer trials with edrecolomab. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (12), S. 1926–1929.
- Schnell, U.; Cirulli, V.; Giepmans, B.N. (2013): EpCAM: structure and function in health and disease. In: *Biochim Biophys Acta* 1828(8):1989-2001
- Schöler, H.R.; Hatzopoulos, A.K.; Baling, R.; Suzuki, N.; Gruss, P. (1989): A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germ-line-specific expression of an Oct factor. In: *The EMBO Journal* (8(9)), S. 2543–2550.
- Shultz, L.D.; Lyons, B.L.; Burzenski, L.M.; Gott, B.; Chenn, X.; Chaleff, S.; Kotb, M.; Gillies, S.D.; King, M.; Mangada, J.; Greiner, D.; Handgretinger, R. (2005): Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells. In: *J Immunol* 174, S. 6477–6489.
- Sivagnanam, M.; Mueller, J.L.; Lee, H.; Chen, Z.; Nelson, S.F.; Turner, D.; Zlotkin, S.H.; Pencharz, P.B.; Ngan, B.Y.; Libiger, O.; Schork, N.J.; Lavine, J.E.; Taylor, S.; Newbury, R.O.; Kolodner, R.D.; Hoffman, H.M. (2008): Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. In: *Gastroenterology* 135 (2), S. 429–437.
- Smith, A.G. (1991): Culture and differentiation of embryonic stem cells. In: *J. Tiss. Cult. Meth.* (13), S. 89–94.
- Solter, D. (2006): From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. In: *Nat Rev Genet.* 7(4), S. 319-27.
- Solter D. und Knowles B.B. (1978): Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 75(11), S. 5565-9.
- Stephan, J.P.; Roberts, P.E.; Bald, L.; Lee, J.; Gu, Q.; Devaux, B.; Mather, J.P. (1990): Selective cloning of cell surface proteins involved in organ development: epithelial glycoprotein is involved in normal epithelial differentiation. In: *Endocrinology* 140(12), S. 5841-5854.
- Stevens, L.C. (1970): The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. In: *Developmental Biology* 21 (3), S. 364–382.
- Stevens, L.C. und Little, C.C. (1954): Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 40 (11), S. 1080–1087.
- Stevens, L.C. und Little, C.C. (1954): Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 40(11), S. 1080–1087.
- Stiles, B.; Gilman, V.; Khanzenzon, N.; Lesche, R.; Li, A.; Qiao, R.; Liu, X.; Wu, H. (2002): Essential Role of AKT-1/Protein Kinase B in PTEN-Controlled Tumorigenesis. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (11), S. 3842–3851.
- Storm, M.P.; Bone, H.K.; Beck, C.G.; Bourillot, P.; Schreiber, V.; Damiano, T.; Nelson, A.; Savatier, P.; Welham, M.J. (2007): Regulation of Nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (9), S. 6265–6273.

- Sun, H.; Lesche, R.; Li, D.M.; Liliental, J.; Zhang, H.; Gao, J.; Gavrilova, N.; Mueller, B.; Liu, X.; Wu, H. (1998): PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 96(11), S. 6199–6204.
- Sundberg, M.; Jansson, L.; Ketolainen, J.; Pihlajamäki, H.; Suuronen, R.; Skottman, H. (2009): CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. In: *Stem cell research* 2 (2), S. 113–124.
- Tada, S.; Era, T.; Furusawa, C.; Sakurai, H.; Nishikawa, S.; Kinoshita, M. (2005): Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (19), S. 4363–4374.
- Takahashi, K.; Mitsui, K.; Yamanaka, S. (2003): Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. In: *Nature* 423 (6939), S. 541–545.
- Takahashi, K.; Murakami, M.; Yamanaka, S. (2005): Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. In: *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 6), S. 1522–1525.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676.
- Takahashi, K.; Okita, K.; Nakagawa, M.; Yamanaka, S. (2007a): Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. In: *Nat Protoc.* 2(12), S. 3081-9.
- Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. (2007b): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell* 131, S. 861-872.
- Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins. In: *Physiol Rev* 81 (1), S. 153–208.
- Takaoka, K.; Hamada, H. (2012): Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. In: *Development* 139 (1), S. 3-14.
- Tam P.P. und Loebel D.A. (2007): Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. In: *Nat Rev Genet.* 8(5). S. 368-81.
- Tanaka, Y.; Ikeda, T.; Kishi, Y.; Masuda, S.; Shibata, H.; Takeuchi, K.; Komura, M.; Iwanaka, T.; Muramatsu, S.; Kondo, Y.; Takahashi, K.; Yamanaka, S.; Hanazono, Y. (2009): ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. In: *Cell Transplant* 18(4), S. 381-9.
- Tarmann, T.; Dohr, G.; Schiechl, H.; Barth, S.; Hartmann, M. (1990): Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. In: *Acta Anat (Basel)* 137 (2), S. 141–145.
- 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 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (3), S. 2299–2309.
- Trzpis, M.; McLaughlin, P.M.J.; de Leij, L.; Harmsen, M.C. (2007): Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. In: *The American journal of pathology* 171 (2), S. 386–395.
- Trzpis, M.; Bremer, E.; McLaughlin, P.; de Leij, L.; Harmsen M.C. (2008): EpCAM in morphogenesis. In: *Frontiers in Bioscience*, S. 5050-5055.
- Tsaktanis, T.; KremLing, H.; Pavsic, M.; Stackelberg, R.; Mack, B.; Fukumori, A.; Gires, O. (2015): Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). In: *The Journal of biological chemistry* 290 (40), S. 24574–24591.

- Ulbricht, T.M. (2005): Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. In: *Modern Pathology* 18, S. S61–S79.
- Wang, H.; Yang, H.; Shivalila, C.S.; Dawlaty, M.M.; Cheng, A.W.; Zhang, F.; Jaenisch, R. (2013): One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. In: *Cell* 153 (4), S. 910–918.
- Wang, X. und Yang, P. (2008): In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. In: *Journal of visualized experiments: JoVE* (17).
- Watanabe, S.; Umehara, H.; Murayama, K.; Okabe, M.; Kimura, T.; Nakano, T. (2006): Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. In: *Oncogene* 25 (19), S. 2697–2707.
- Wernig, M.; Meissner, A.; Foreman, R.; Brambrink, T.; Ku, M.; Hochedlinger, K.; Bernstein, B.E.; Jaenisch, R. (2007): In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. In: *Nature* 448, S. 318–324.
- Williams, R.L.; Hilton, D.J.; Pease, S.; Willson, T.A.; Stewart, C.L.; Gearing, D.P.; Wagner, E.F.; Metcalf, D.; Nicola, N.A.; Gough, N.M. (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. In: *Nature* 336 (6200), S. 684-7.
- Wobus, A.M. und Boheler, K.R. (2005): Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. In: *Physiological reviews* 85 (2), S. 635–678.
- Wobus, A.M.; Holzhausen, H.; Jakel, P.; Schoneich, J. (1984): Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. In: *Exp Cell Res* 152 (1), S. 212-9.
- Wolpert, L.; Tickle, C.; Arias, A.M. (2015): Principles of Development. Fifth Edition. 5. Aufl. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Wong, D.J.; Liu, H.; Ridky, T.W.; Cassarino, D.; Segal, E.; Chang, H.Y. (2008): Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. In: *Cell Stem Cell* 2(4), S. 333-44.
- Wood, A.J.; Lo, T.-W.; Zeitler, B.; Pickle, C.S.; Ralston, E.J.; Lee, A. H.; Amora, R.; Miller, J.C.; Leung, E.; Meng, X.; Zhang, L.; Rebar, E.J.; Gregory, P.D.; Urnov, F.D.; Meyer, B.J. (2011): Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. In: *Science (New York, N. Y.)* 333 (6040), S. 307.
- Kuan, I.I.; Liang, K.H.; Wang, Y.P.; Kuo, T.W.; Meir, Y.J.; Wu, S.C.; Yang, S.C.; Lu, J.; Wu, H.C. (2017): EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2 α . In: *Sci Rep.* (7), S. 41852.
- Yasuda, K.; Yashiro, M.; Sawada, T.; Ohira, M.; Hirakawa, K. (2007): ERas oncogene expression and epigenetic regulation by histone acetylation in human cancer cells. In: *Anticancer Res.* (6B), S. 4071–4075.
- Ying, Q.-L.; Nichols, J.; Chambers, I.; Smith, A. (2003): BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. In: *Cell* 115 (3), S. 281–292.
- Yu, Y.; Liang, D.; Tian, Q.; Chen, X.; Jiang, B.; Chou, B.-K.; Hu, P.; Cheng, L.; Gao, P.; Li, J.; Wang, G. (2014): Stimulation of somatic cell reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 signaling axis. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (2), S. 349–363.
- Tanaka, Y.; Ikeda, T.; Kishi, Y.; Masuda, S.; Shibata, H.; Takeuchi, K. (2009): ERas Is Expressed in Primate Embryonic Stem Cells But Not Related to Tumorigenesis. In: *Cell Transplantation* (18), S. 381–389.
- Zhang, W.Y.; de Almeida, P.E.; Wu, J.C. (2012): Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. In: *stembook [Internet]*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.

Zhao, Z.-A.; Yu, Y.; Ma, H.-X.; Wang, X.-X.; Lu, X.; Zhai, Y. et al. (2015): The roles of ERAS during cell lineage specification of mouse early embryonic development. In: *Open Biol.* 5 (8), S. 150092.

Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. In: *Nucleic acids research* 32 (12), S. e103.

9. Publikation

Sarrach, S.; Huang, Y.; Niedermeyer, S.; Hachmeister, M.; **Fischer, L.**; Gille, S.; Pan, M.; Mack, B.; Kranz, G.; Libl, D.; Merl-Pham, J.; Hauck, S.M.; Paoluzzi, T.E.; Kieslinger, M.; Jeremias, I.; Scialdone, A.; Gires, O. (2018): Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. In: *Sci Rep.* 8(1), 1801.