

**Funktionelle Charakterisierung des Tumor-assoziierten
epithelialen Zelladhäsionsmoleküls
EpCAM**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Markus Münz

eingereicht am 21.03.2002

**Funktionelle Charakterisierung des Tumor-assoziierten
epithelialen Zelladhäsionsmoleküls
EpCAM**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**von
Markus Münz**

durchgeführt in der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) „Molekulare Onkologie“
der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
und des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München

Leitung: Dr. Olivier Gires (LMU) und Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt (GSF)

Dissertation eingereicht am 21.03.2002

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2002

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht:

Münz, M., Kieu, C., Wollenberg, B., Zeidler, R. and Gires, O. (2002) c-Myc is a direct target of the carcinoma antigen EpCAM.

Submitted.

Münz, M., Kieu, C., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R. and Gires, O. (2002) The tumor associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP.

Manuscript in preparation.

Münz, M., Kieu, C., Wollenberg, B., Zeidler, R. and Gires, O. (2002) The epithelial cell adhesion molecule EpCAM raises the Glyoxalase I enzymatic activity.

Manuscript in preparation.

Pauli, C., Münz, M., Kieu, C., Breinl, P., Wollenberg, B., Zeidler R. and Gires, O. (2002) The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is differentially glycosylated in healthy tissue and in tumors.

Submitted.

Für Andrea

1.	Einleitung.....	1
1.1	Karzinogenese.....	1
1.2	Das humane epitheliale Zelladhäsions Molekül (EpCAM).....	6
1.2.1	Das EpCAM Gen.....	7
1.2.2	Die GA 733-Genfamilie.....	8
1.2.3	Das EpCAM-Protein.....	10
1.2.4	Das Expressionsmuster von EpCAM.....	13
1.2.4.1	EpCAM in gesunden Geweben.....	13
1.2.4.2	Die EpCAM-Expression in Karzinomen.....	14
1.2.5	Die Funktion von EpCAM.....	15
1.3	Zielsetzung.....	17
2.	Material.....	19
2.1	Antikörper.....	19
2.2	Bakterien.....	19
2.3	Chemikalien, Geräte und Sonstiges.....	19
2.3.1	Sonstige Reagenzien.....	20
2.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3.3	Geräte.....	21
2.3.4	Dienstleistungen.....	22
2.4	Plasmide.....	23
2.5	Zelllinien.....	24
3.	Methoden.....	25
3.1	Agarose Gelelektrophorese.....	25
3.2	Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien.....	25
3.3	Bakterienkultur.....	26
3.3.1	Vermehrung und Aufbewahrung.....	26
3.3.2	Transformation von <i>E.coli</i>	26
3.4	FACS-Analysen.....	27
3.4.1	Bestimmung der Oberflächenexpression eines Proteins.....	27
3.4.2	CMFDA-Proliferationsanalysen.....	27
3.5	Bestimmung der Glyoxalase I (Glox I) Enzymaktivität.....	28
3.6	Immunoblots.....	28
3.7	MTT Assay (Mosmann 1983).....	29
3.8	Präparative Plasmidaufarbeitung.....	29
3.9	RNA-Arbeitstechniken.....	29

3.9.1	Isolierung von RNA	29
3.9.2	Radioaktive Markierung von DNA Sonden	30
3.9.3	Nukleäre Run-On Experimente	30
3.10	Soft-Agarose Experimente	31
3.11	Sonstige DNA/RNA Arbeitstechniken.....	32
3.12	Transfektionen.....	32
3.13	Bestimmung der Zellzahl und Zellteilungsrate	32
3.14	Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE).....	33
3.14.1	1.Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	33
3.14.2	2.Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.14.3	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Analyse (MALDI-ToF)	36
3.14.3.1	Trypsin-Verdau	36
3.14.3.2	Beschichten mit DHB Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure)	37
3.14.3.3	MALDI-ToF Analyse.....	37
4.	Ergebnisse	38
4.1	Etablierung zellulärer Systeme zur funktionellen Analyse von EpCAM und die EpCAM-vermittelten Effekte in diesen Systemen.....	39
4.1.1	Konstitutive EpCAM-Expression in humanen embryonalen HEK293 Nierenzellen.....	39
4.1.2	EpCAM vermittelt HEK293-Zellen Wachstumsvorteile und einen erhöhten Metabolismus.....	41
4.1.3	Konstitutive EpCAM-Expression in NIH3T3-Fibroblasten.....	44
4.1.4	EpCAM induziert Wachstumsvorteile und einen erhöhten Metabolismus in NIH3T3-Fibroblasten.....	46
4.2	Inhibition der EpCAM-Expression in Karzinomzelllinien	48
4.2.1	Generierung EpCAM negativer Karzinomzelllinien mittels komplementärer mRNA.....	48
4.2.2	Die Inhibierung von EpCAM in ANT-1 Karzinomzellen hat einen starken Einfluss auf Wachstum, Metabolismus und Morphologie.....	50
4.3	Identifikation EpCAM-regulierter Gene mittels nukleärer Run-On Experimente	55
4.3.1	EpCAM induziert das Onkogen c-myc.....	57
4.3.2	Erhöhte c-Myc Expression nach konstitutiver EpCAM-Expression in HEK293-Zellen	58
4.3.3	Etablierung eines zellulären System zur konditionalen Expression von EpCAM in HEK293-Zellen.....	60
4.3.4	Schnelle Induktion von c-Myc durch EpCAM in HEK293-Zellen	62
4.3.5	Induktion von Cyclin A und E nach EpCAM-Expression in HEK293 Zellen.....	64

4.4	Identifikation EpCAM-regulierter Proteine mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) und Matrix unterstützter Laser Desorption Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-ToF)	66
4.4.1	Etablierung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese mit den HEK293- und Karzinomzelllinien	67
4.4.2	Überexpression von E-FABP in den EpCAM-exprimierenden HEK293-Transfektanten.....	71
4.4.3	Schnelle Induktion von E-FABP durch EpCAM in HEK293 Transfektanten.....	73
4.4.4	Die Expression von EpCAM und E-FABP korreliert in Karzinomzelllinien	76
4.4.5	EpCAM und E-FABP in Primärtumoren	77
4.4.6	EpCAM aktiviert das Glykolyse Enzym Glyoxalase I in HEK293-Zellen....	78
4.5	Soft-Agarose Experimente	82
4.5.1	EpCAM erhöht und beschleunigt die Koloniebildung von HEK293-Zellen in Soft-Agarose.....	82
4.5.2	Koloniebildung von EpCAM-positiven NIH3T3-Fibroblasten in Soft-Agarose	84
4.6	Das Glykosylierungsmuster von EpCAM.....	85
4.6.1	EpCAM in Karzinomzelllinien	86
4.6.2	EpCAM in gesundem und Tumorgewebe	87
5.	Diskussion	89
5.1	EpCAM-vermittelte Effekte auf Zellmorphologie, -wachstum und Metabolismus.....	90
5.2	EpCAM-Inhibierung in Karzinomzelllinien	91
5.3	EpCAM-regulierte Gene und -vermittelte Effekte	93
5.4	EpCAM: Ein Onkogen?	101
5.5	EpCAM in gesundem Epithel und Karzinomen.....	103
6.	Zusammenfassung.....	105
7.	Literatur	107
	Abkürzungen.....	120

1. Einleitung

In den meisten Industrieländern steht Krebs als Todesursache an zweiter Stelle hinter den Herz- und Kreislauferkrankungen. Jeder Dritte in Europa wird mittlerweile zumindest einmal in seinem Leben mit der "Diagnose Krebs" konfrontiert, jeder fünfte stirbt an Krebs. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 350 000 Menschen an malignen Tumoren, mit steigender Inzidenz. Die Ursachen der Krebsentstehung sind dabei von enormer Komplexität. Vereinfacht gesagt geriet bei diesen Patienten der kontrollierte Ablauf von Teilung, Wachstum und programmierter Zellalterung aus dem Gleichgewicht: Wenn sich eine derartige Zelle teilt und vermehrt, verlieren die entstehenden "Töchter" dabei häufig die Eigenschaften, die sie vorher als einen bestimmten Zelltyp definierten. Kleine Veränderungen auf ihrer Oberfläche erlauben es den Zellen dann durch die Maschen der Immunkontrolle zu schlüpfen und manchmal sogar durch den Körper zu wandern – ein Tumor wächst, breitet sich aus und bildet Tochtergeschwülste. Kurzum, die Krebserkrankung nimmt ihren Lauf.

1.1 Karzinogenese

Die Entstehung von Tumoren epithelialen Ursprungs, die Karzinogenese, ist ein komplexer Prozess, der bis zum heutigen Stand der Forschung immer noch nicht vollständig verstanden ist. Eine zentrale Frage ist nach wie vor: Wie kommt es zu einem unkontrollierten Zellwachstum und was ermöglicht Tumorzellen sich einer Immunantwort zu entziehen? Ein Vierteljahrhundert intensiver Forschungsarbeiten brachte eine Vielzahl von Erkenntnissen über eine Reihe komplexer Vorgänge, die an der Karzinogenese beteiligt sind, wie z.B. die permanente Aktivierung von mitogenen Signalwegen, die Deregulierung des Zellzyklus und ein Ausbleiben von Apoptose- sowie Differenzierungsprogrammen. Die Entstehung von Krebs wird der-

zeit als eine Erkrankung betrachtet, die dynamischen Veränderungen des Genoms und Proteoms unterliegt (Hanahan *et al.* 2000). In den vergangenen Jahren wurden zudem grundlegende molekular-biochemische und zelluläre Mechanismen aufgedeckt, die von den meisten, möglicherweise aber von allen Tumorzellen benutzt werden (Hunter 1997; Kinzler *et al.* 1998). Eine Vielzahl von Arbeiten zeigte, dass eigentlich alle Säugetierzellen eine ähnliche molekulare Maschinerie zur Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose besitzen und daher etwaige Fehlfunktionen auf ähnlichen Mechanismen basieren (Hanahan *et al.* 2000; Vogelstein *et al.* 2000).

Die Entartung von Zellen geschieht jedoch nicht aufgrund einer einzigen Fehlregulation, sondern ist eine Verkettung mehrerer dysregulierter Ereignisse, die dann die einzelnen Kontrollmechanismen der Zelle überfordern. Eine große Zahl an Forschungsarbeiten vergangener Jahre führte daher zu der Erkenntnis, dass die Tumorbildung beim Menschen als ein mehrstufiger Prozess (Renan 1993; Hanahan *et al.* 2000) betrachtet werden muss. Die einzelnen Stufen reflektieren dabei genetische Veränderungen, welche die progressive Transformation gesunder humaner Zellen in hochgradig maligne Abkömmlinge charakterisieren. Die Entartung von „gesunden“ humanen Zellen in Tumorzellen entsteht dabei durch eine Anhäufung von Mutationen und chromosomalen Aberrationen. Tumorzellen werden dadurch irreversibel in ihrem Genom verändert (Bishop 1991; Kinzler *et al.* 1996) und können als Konsequenz der genetischen Veränderungen unkontrolliert wachsen, sowie über die Bildung von Metastasen andere Gewebe infiltrieren. Derzeit werden sechs essentielle Voraussetzungen für die Aufrechterhaltung eines malignen Zellwachstums postuliert: 1. Induktion von selbst-stimulierenden Wachstumssignalen, 2. Apoptose-Resistenz, 3. Verlust der Sensitivität gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen, 4. verstärkte Angiogenese, 5. Gewebe-Invasion und Metastasierung, und 6. uneingeschränktes replikatives Potential (Hanahan *et al.* 2000).

Drei Klassen von Genen spielen in diesen Prozessen eine entscheidende Rolle: 1. Proto-Onkogene, 2. Tumor-Suppressor-Gene und 3. DNA-Reparatur-Gene (Vogelstein *et al.* 2000).

Die beiden ersten Genfamilien regulieren in gesunden Zellen ein kontrolliertes Wachstum und die Apoptose, wie es zu einer Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen „turnovers“ z.B. der Haut oder des Bluts notwendig ist.

Eine Mutation oder deregulierte Expression resultiert im Fall der Proto-Onkogene häufig in einer Verstärkung ihrer Funktion, die als „gain of function mutation“ bezeichnet wird. Der Transkriptionsfaktor c-Myc, der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-R) und der Her2-neu-Rezeptor sind klassische Beispiele für Proto-Onkogene. c-myc wurde als zelluläres, humanes Homolog von v-myc des MC29 „avian myelocytomatosis virus“ identifiziert (Vennstrom *et al.* 1982; Colby *et al.* 1983) und besitzt eine zentrale Rolle in der Zellzyklus- und Wachstumsregulation (Amati *et al.* 1998; Dang 1999). Daher ist es nicht verwunderlich, dass c-myc in vielen Tumoren, wie beispielsweise in Burkitt-Lymphomen, Mamma-Karzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen, überexprimiert wird (Marcu *et al.* 1992; Liao *et al.* 2000; de la Guardia *et al.* 2001). Die Expression von c-myc ist aufgrund seiner Funktion in der Wachstumsregulation strikt und komplex reguliert.

Membranrezeptoren, wie der EGF-R, verlieren in Tumorzellen ebenfalls häufig die Regulation ihrer stringenten und transienten Aktivierung (Di Fiore *et al.* 1987). Der EGF-R gehört in die Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt durch eine Ligand-vermittelte Dimerisierung und endet letztendlich, über eine Reihe von Signalkaskaden, in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die in der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Apoptose und der Cytokinproduktion involviert sind (Schlessinger 2000). Die Aktivierung von EGF-R durch seinen Liganden beispielsweise induziert u.a. den Transkriptionsfaktor c-Myc (Coughlin *et al.* 1985). Eine Überexpression oder

Mutation von RTK kann in einer konstitutiven Aktivierung bzw. Dimerisierung resultieren und daher zu einer Tumorentstehung beitragen.

Mutationen der Tumor-Suppressor- und DNA-Reparatur-Gene dagegen resultieren oft in dem Verlust ihrer Funktion und werden als „loss of function mutation“ bezeichnet (Hanahan *et al.* 2000). Prominenteste Beispiele für Tumor-Suppressor-Gene sind das Retinoblastoma Tumor-Suppressor-Protein (Rb) und p53, letzteres wird auch als „guardian of the cell“ bezeichnet (Chen *et al.* 1990).

Rb wurde in einer seltenen Krebsform in der Netzhaut von Kindern, welche mit einer erhöhten Proliferation und einer unreifen Retina verknüpft ist, identifiziert (Lee *et al.* 1987). Die Funktion von Rb liegt in der Bindung vieler, insbesondere regulatorischer Proteine, wie beispielsweise E2F, die über die Dissoziation von Rb aktiviert werden. Das Rb-Protein wird, unabhängig von den einzelnen Zellzyklusphasen, konstitutiv im Zellkern exprimiert und über den Grad der Phosphorylierung reguliert. Eine Phosphorylierung resultiert in einer Inaktivierung von Rb, wodurch die gebundenen Proteine von Rb dissoziieren und dabei aktiv werden (Cooper *et al.* 1989). Die Dissoziation von E2F und Rb initiiert zum Beispiel den Übergang von G1 in die S-Phase des Zellzyklus (Weintraub *et al.* 1995). Eine permanente Inaktivierung von Rb kann daher zu unkontrollierten Phasenübergängen im Zellzyklus führen und somit zu einer Tumorentstehung beitragen (Sherr 1996).

Der Tumor-Suppressor p53 bildet als zentraler Regulator verschiedenster Signalwege mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise p21, 14-3-3 σ und Fas, ein Netzwerk, das Wachstum und Apoptose reguliert. Hierbei ist p53 der „Hauptdarsteller“ dieses Netzwerks, das aufgrund von Zellstress, einer Zellschädigung und infolge der Expression von Onkogenen aktiviert wird (Vogelstein *et al.* 2000). In gesunden Zellen hingegen ist das p53-Netzwerk im „stand by“ Betrieb. Die Aktivierung des Netzwerkes ist verbunden mit einer erhöhten Menge und konformationellen Änderungen von p53, welche durch verschiedene Modifizierungen, wie beispielsweise

Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung ausgelöst werden (Giaccia *et al.* 1998). Aufgrund der Aktivierung von p53 kommt es in Abhängigkeit der Schwere der DNA-Schädigung zu einem Wachstumsarrest und zur DNA-Reparatur. Im Fall einer erheblichen Schädigung des Erbmaterials führt die Aktivierung zum programmierten Zelltod (Apoptose). Eine große Zahl an Arbeiten zeigte, dass p53 in vielen Karzinomen mutiert und dadurch inaktiv ist, wie es beispielsweise bei Kolon-, Brust- und Oesophagus-Karzinomen und auch Neuroblastomen beschrieben wurde (Varley *et al.* 1991; Kastriakis *et al.* 1995; Ostermeyer *et al.* 1996; Chino *et al.* 2001). Der Ausfall dieses potenten Tumor-Suppressors unterstützt damit die Entartung von Zellen aufgrund ausbleibender Reparaturmechanismen.

Die dritte angesprochene Gruppe, die aufgrund von Mutationen zu einer Tumorentstehung beitragen kann, sind Gene, die bei DNA-Reparaturmechanismen essentiell sind. Diese Gene kontrollieren über die Detektion von DNA-Schäden und der Einleitung bzw. Ausführung einer entsprechenden Reparatur die Mutationsrate im Genom. Daher führen Mutationen dieser Gene zu genomischer Instabilität und erhöhter Mutationsrate, wovon auch Proto-Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene betroffen sind. Die Inaktivierung von Sensoren solcher DNA-Schäden, wie beispielsweise des Ataxia-telangiectasia mutierten (ATM) Proteins kann dazu führen, dass Restriktionspunkte im Zellzyklus ohne Beseitigung des Schadens, aufgrund ausbleibender Reparaturmechanismen, durchlaufen werden (Rotman *et al.* 1999). Dadurch können derartige Zellen in die „mitotische Katastrophe“ laufen (Chan *et al.* 1999). Dieser Begriff bezeichnet einen Zustand von chromosomalen Aberrationen während der Mitose. Die Aberrationen entstehen dabei aufgrund mutierter, inaktiver Kontrollmechanismen, wie beispielsweise der Apoptose, die dann letztendlich zu einer Aneuploidie der Tochterzellen führt und somit eine Tumorentstehung ermöglicht.

Zusammengefasst liegt die Gemeinsamkeit der soeben beschriebenen Genfamilien letztlich in ihrem Einfluss auf den Zellzyklus. Mutationen dieser Gene resultieren,

u.a. über eine Deregulierung der Cycline, in einem unkontrollierten Durchlaufen des Zellzyklus. Die Cycline bilden dabei als regulatorische Untereinheiten zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) die Restriktionspunkte, die im Zusammenspiel mit zusätzlichen Proteinen das Durchlaufen der jeweiligen Phasenübergänge im Zellzyklus ermöglichen oder verhindern (Elledge 1996). Die Cycline sind damit ein weiterer Angriffspunkt ein unkontrolliertes Zellwachstum zu ermöglichen (Hartwell 1992; Spruck *et al.* 1999; Strohmaier *et al.* 2001). Die Überexpression von Cyclin E z.B. in Mamma-Karzinomen demonstriert diesen Effekt dabei in anschaulicher Weise (Keyomarsi *et al.* 1993).

Auf einen Punkt gebracht bedeutet dies: Der Zellzyklus gerät außer Kontrolle und eine Tumorentstehung wird ermöglicht.

1.2 Das humane epitheliale Zelladhäsions Molekül (EpCAM)

EpCAM ist ein homophiles, Ca^{2+} -unabhängiges Adhäsionsmolekül (Litvinov *et al.* 1994), das von einer Vielzahl epithelialer, vor allem adenomatöser Gewebe exprimiert wird. Eine Neoplasie bzw. Karzinogenese dieser Gewebe jedoch ist mit einer starken Überexpression dieses Moleküls assoziiert (Balzar *et al.* 1999). Daher sind die meisten Karzinome EpCAM-positiv. Besonders deutlich wird dies bei Kopf-Hals-Karzinomen, die stets eine Expression von EpCAM aufweisen (Dr. Pauli; persönliche Mitteilung): Das gesunde Plattenepithel ist EpCAM-negativ, wohingegen Plattenepithel-Karzinome dieses Molekül *de novo* exprimieren. Der Grad der Dysplasie dieser Karzinome korreliert dabei mit der EpCAM-Proteinmenge (Litvinov *et al.* 1996). Daher wird EpCAM als Tumormarker und Zielantigen bei Immuntherapien verwendet (Braun *et al.* 1999; Chaubal *et al.* 1999; Zeidler *et al.* 1999). Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, dass EpCAM mit der Proliferation und Dedifferenzierung korreliert, erschien es von besonderem Interesse den Zusammenhang von EpCAM und Karzinogenese in dieser Arbeit näher zu studieren.

1.2.1 Das EpCAM-Gen

EpCAM wird von dem GA733-2 Gen kodiert (Szala *et al.* 1990; Linnenbach *et al.* 1993) und ist unter einer Vielzahl weiterer Namen, wie KSA, epitheliales Glykoprotein EGP40 und 17-1A bekannt. Die geschätzte Größe dieses Gens beträgt mindestens 14 kb. Der Locus des GA733-2-Gens wurde kartiert und liegt in der chromosomalen Region 4q. Der Promotor des GA733-2 Gens enthält Konsensus-Sequenzen für SP-1 und AP-1-Transkriptionsfaktoren, jedoch wurden weder eine TATA noch eine CAAT-Box identifiziert (Linnenbach *et al.* 1993). Der bislang klonierte Promotorbereich umfasst etwa 1,1 kb und weist eine starke Aktivität in EpCAM-positiven Zellen auf. Die transkriptionelle Aktivität des Promotors wird durch die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B negativ reguliert (Gires *et al.* 2001), über die positive Regulation ist bis dato nichts bekannt. Der Vergleich von genomischen und cDNA Sequenzen zeigte, dass das GA733-2-Gen aus 9 Exons besteht (Abb. 1.1).

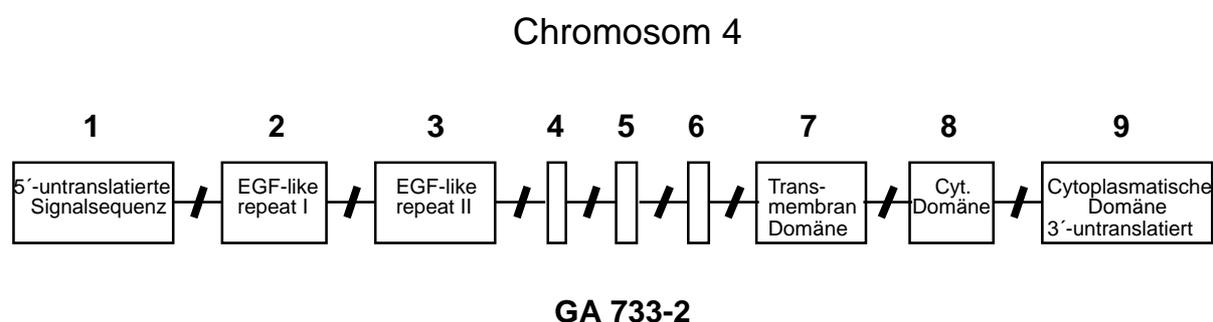


Abb. 1.1: Das GA733-2-Gen kodiert für das humane Transmembran-Glykoprotein EpCAM. Es besteht aus insgesamt 9 Exons und ist auf Chromosom 4 lokalisiert (nach Linnenbach *et al.*).

Die Aminosäure-Sequenz, die von Exon 1 kodiert wird, enthält eine Signalpeptid-Sequenz, die für das Einschleusen von EpCAM in die Membran des endoplasmatischen Retikulums sorgt. Die Exons 2 bis 6 hingegen kodieren die extrazelluläre Domäne von EpCAM, wobei Exon 2 und 3 EGF-ähnliche Wiederholungen beinhalten. Die Transmembran-Domäne von EpCAM wird von Exon 7 und die anschließende, 15 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne von EpCAM, die einen Cluster von 6 positiv geladenen Aminosäuren enthält, von Exon 8 kodiert. Die

restlichen 11 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne, das Stopp-Codon und die 3'-untranslatierte Region werden von Exon 9 kodiert. Die EpCAM-mRNA hat eine Größe von etwa 1,5 kb. Die aus unabhängig isolierten EpCAM-mRNAs ermittelte 5'-untranslatierte Region variiert in ihrer Größe von 16 bis 160 Basen (Perez *et al.* 1989). Alle beschriebenen EpCAM-mRNAs zeigten jedoch eine Übereinstimmung in ihren kodierenden Sequenzen, den 942 bp enthaltenden offenen Leserahmen. Die 3'-untranslatierte Region enthält zwei interessante Motive: das erste Sequenzmotiv (ATTTA) wird als ein Signal für die spezifische Degradation von mRNAs von Cytokinen, Lymphokinen und einigen Proto-Onkogenen (Shaw *et al.* 1986) betrachtet. Das zweite Motiv (TTATTTAT) wurde als Konsensussequenz in der 3'-Region von Entzündungsmediatoren identifiziert (Caput *et al.* 1986). Es wird daher angenommen, dass die Expression von EpCAM auf der post-transkriptionellen Ebene komplex reguliert ist. Es ist außerdem bekannt, dass das EpCAM-Gen kein differentielles Spleißen erfährt, so dass nur eine mRNA detektierbar ist (Balzar *et al.* 1999). Dies wurde über die Analyse einer Vielzahl von Karzinomzellen bestätigt.

1.2.2 Die GA 733-Genfamilie

Das einzig bekannte Molekül, das Homologien zu EpCAM zeigt, ist das Proteinprodukt aus dem GA733-1 Gen, das Epitheliale Glykoprotein 1 (EGP-1/Trop-2). EGP-1 hat zu EpCAM eine Aminosäure-Sequenzhomologie von 49% (Szala *et al.* 1990), wobei beide Proteine zwei stark homologe Bereiche besitzen. Die erste Region umfasst 39 Basen der extrazellulären Domäne und ist durch eine identische Aminosäuresequenz von 79% charakterisiert; die zweite Region repräsentiert die Transmembran-Domäne. Die Erkenntnisse aus der Klonierung von EGP-1 und EpCAM, DNA-Sequenzierung, Aminosäuresequenz Vergleiche und chromosomale Studien deuten auf einen wichtigen Einfluss von „Exon Shuffling“ und Retroposons im Verlauf der Evolution der GA733-Genfamilie (Linnenbach *et al.* 1993). Das intronlose GA733-1-Gen stammt vermutlich aus der Retroposition der EpCAM-mRNA in

die Region des Chromosom 1. Nach der retroviralen Insertion entwickelte sich EGP-1 unabhängig von EpCAM und wird daher als ein eigenständiges Mitglied der GA733-Genfamilie angesehen (Linnenbach *et al.* 1993). Das GA733-1 Genprodukt EGP-1 hat ein höheres Molekulargewicht als EpCAM und besitzt vier Glykosylierungsstellen, die zum Molekulargewicht von 50 kDa dieses Glykoprotein beitragen (Linnenbach *et al.* 1993). EGP-1 besitzt eine Serin-Phosphorylierungsstelle innerhalb der cytoplasmatischen Domäne an der Aminosäure Position 303, die bei EpCAM fehlt (Basu *et al.* 1995). Beide Proteine besitzen ein konserviertes Tyrosin in der cytoplasmatischen Domäne, das bislang jedoch nicht als Phosphorylierungsstelle beschrieben wurde. Die Verschiedenheit beider Proteine wird zudem durch die Tatsache unterstrichen, dass monoklonale Antikörper, die jeweils spezifisch eines der beiden Proteine erkennen keine Kreuzreaktivität zeigen (Stein *et al.* 1994; Fornaro *et al.* 1995; Ripani *et al.* 1998). Das GA733-1 Molekül ist ebenfalls wie EpCAM in epithelialen Geweben exprimiert. Interessanterweise besteht eine negative Korrelation im Expressionsmuster beider Proteine: Gewebe, die EpCAM stark exprimieren, wie beispielsweise Kolon, zeigen eine schwache Expression von EGP-1, und umgekehrt (Stein *et al.* 1994). Die Expression von GA733-1 nimmt dabei mit zunehmender Dedifferenzierung, im Gegensatz zu EpCAM, ab (Klein *et al.* 1987). Mit Hilfe von DNA-Analysen konnten Sequenzhomologien zu den humanen GA733-1 und 733-1-Genen in Affen, Mäusen, Hamstern und Hühnern festgestellt werden (Linnenbach *et al.* 1993). Studien mit spezifischen Antikörpern gegen humanes EpCAM erlaubten die Identifikation von EpCAM-Homologen in der Maus, der Ratte und bei Primaten (Zaloudik *et al.* 1997). Es ist daher anzunehmen, dass EpCAM in höheren Wirbeltieren hoch konserviert ist. Diese Annahme wird durch die hohe Homologie der murinen und humanen EpCAM-Nukleotid- (80%) und Aminosäuresequenz (82%) untermauert (Bergsagel *et al.* 1992).

1.2.3 Das EpCAM-Protein

Der offene Leserahmen von EpCAM kodiert für ein 314 Aminosäuren (AS) langes Polypeptid, bestehend aus einer 23 Aminosäuren umfassenden Leadersequenz, einer 242 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne mit zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen (EGF-like) innerhalb des Cystein-reichen N-Terminus, einer aus 23 Aminosäuren bestehenden Transmembran Domäne und einer 26 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Domäne (Abb. 1.2) (Balzar *et al.* 1999).

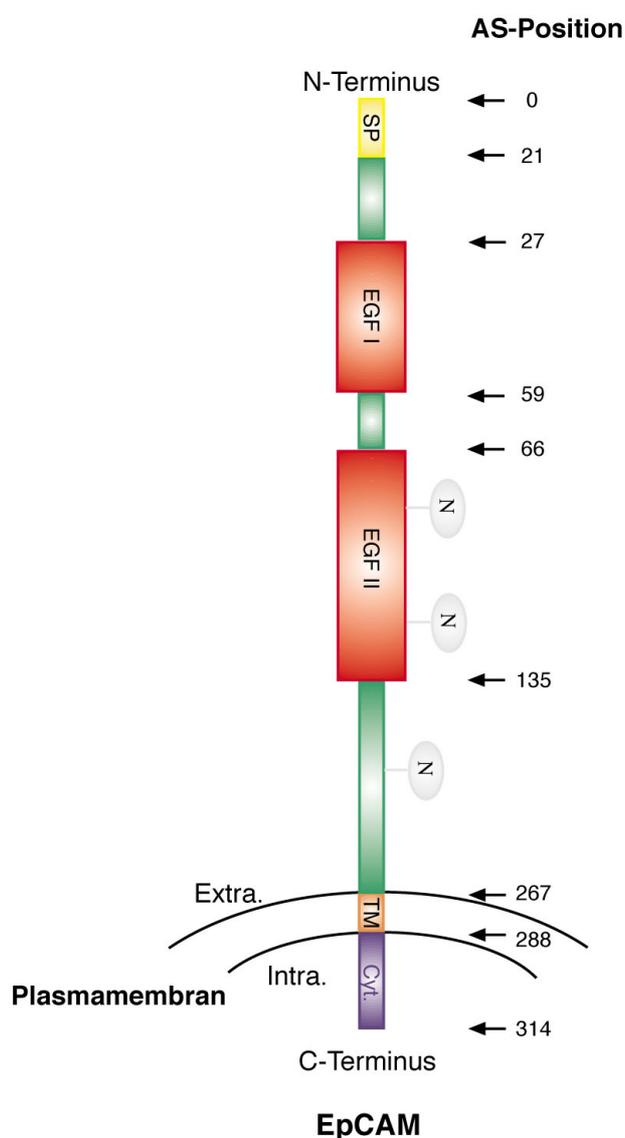


Abb. 1.2: Die Struktur des EpCAM-Proteins. EpCAM besteht aus 314 Aminosäuren. Die Zahlen geben die einzelnen Aminosäure-Positionen an. Die Kreise zeigen die N-Glykosylierungs-Stellen und die Rechtecke die einzelnen Regionen. (SP=Signalpeptid, EGF=epidermal growth factor-like repeat, TM=Transmembran-Domäne, Cyt.=cytoplasmatische Domäne).

Die 265 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Domäne beginnt am N-Terminus mit einer Signalsequenz, bestehend aus 11 hydrophoben Aminosäuren. Der Signal-Peptidase Verdau erfolgt vermutlich zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 (Szala *et al.* 1990). Sequenzanalysen der extrazellulären Domäne EpCAMs zeigten, dass der Cystein-reiche N-Terminus zwei EGF-ähnliche Wiederholungen mit den Motiven CX₁CX₈CX₇CX₁CX₁₀C (Position 27-59) und CX₃₂CX₁₀CX₅CX₁CX₁₆C (Position 66-135), gefolgt von einer Cystein-armen Region beinhaltet. Beide EGF-ähnlichen Wiederholungen von EpCAM zeigen eine Homologie zu den vierten und fünften EGF-ähnlichen Wiederholungen (Position 776-809 und 819-889) in der stabähnlichen (rod-like) Domäne des extrazellulären Laminin-bindenden Matrixprotein Nidogen (Mann *et al.* 1989; Simon *et al.* 1990). Die zweite EGF-ähnliche Wiederholung (EGF-like repeat) EpCAMs besitzt Homologien zu der Thyroglobulin Typ 1 Wiederholung (Lenarcic *et al.* 1997). Im Gegensatz zu der vierten Wiederholung von Nidogen, hat die erste EGF-ähnliche Wiederholung von EpCAM keine potentielle β -Hydrolierungsstelle, wodurch eine Bindung von Ca²⁺ durch EpCAM unwahrscheinlich ist. Aufgrund ihrer Struktur und einiger Konsensussequenzen können EGF-ähnliche Wiederholungen in drei Typen untergliedert werden (EGF-like I, II, III). Die EGF-ähnlichen Wiederholungen von EpCAM zeigen starke Homologien zum Typ II und III, die ebenfalls in Proteinen wie Nidogen, EGF-Vorläufer, LDL-Rezeptor, L-Selektin und „Platelet-epithelial cell adhesion molecule“ (PECAM) vorhanden sind (Appella *et al.* 1988; Davis 1990).

Viele Transmembran-Proteine mit EGF-ähnlichen Wiederholungen sind in der Zelladhäsion und Signaltransduktion involviert, wie beispielsweise Integrine und Zelladhäsionsmoleküle (CAM) (Davis 1990). Strukturanalysen zeigten, dass EpCAM in der Zelladhäsion involviert ist (Simon *et al.* 1990) und vermutlich eine Signaltransduktion, ähnlich den Wachstumsfaktor-Rezeptoren, vermitteln könnte. Derzeit existieren jedoch keine Daten, die diese Annahme beweisen. Den einzigen Hinweis auf eine Beeinflussung der Gentranskription durch EpCAM zeigte die

Aktivierung dieses Proteins mittels monoklonaler Antikörper in Bauchspeicheldrüsengewebe. Hierbei kam es zu einer verstärkten Expression von Glucagon und Insulin (Cirulli *et al.* 1998).

Die Aminosäure-Sequenz von EpCAM deutet auf die Existenz von drei potentiellen Glykosylierungsstellen. Aufgrund experimenteller Daten ist anzunehmen, dass alle drei Positionen mit Mannose-Oligosachariden glykosyliert werden (Durbin *et al.* 1990; Schon *et al.* 1993). Die Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin resultiert in einer 34-kDa-Form von EpCAM. Die Behandlung EpCAM-exprimierender Zellen mit O-Glycanase, einen Inhibitor der O-Glykosylierung, zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Molekulargewicht, so dass eine O-Glykosylierung ausgeschlossen werden kann (Thampoe *et al.* 1988). Die meisten Karzinome zeigen unterschiedliche EpCAM-Formen mit einem Molekulargewicht von 37, 40 und 42 kDa (Litvinov *et al.* 1994). Es ist bislang jedoch nicht beschrieben, ob diese verschiedenen Glykosylierungsformen von EpCAM unterschiedliche Funktionen innehaben bzw. die Glykosylierung Gewebe-spezifisch erfolgt. Zudem existieren noch zwei weitere posttranslational modifizierte Varianten von EpCAM, eine geschnittene und eine ungeschnittene Form. Pulse-Chase Experimente haben gezeigt, dass EpCAM als 34 kDa Protein synthetisiert wird und anschließend zu der 40 kDa Form glykosyliert wird. Nach längeren Pulse-Chase Perioden jedoch konnte eine 32 kDa Form detektiert werden, die ein Proteolyse Produkt der 40-kDa-Form ist (Thampoe *et al.* 1988). Die Position an Arginin 80 ist eine potentielle Restriktionsstelle für Trypsin-verwandte proteolytische Enzyme (Szala *et al.* 1990; Bjork *et al.* 1993). Nach der Restriktion sind beide Spalt-Fragmente unter nativen Bedingungen mittels kovalenter Disulfidbindung verbrückt. Die Zerstörung der Disulfidbrücke durch reduktive Bedingungen resultiert in einem 6 kDa und 32 kDa großen Fragment.

Die Transmembran Domäne von EpCAM enthält 23 hydrophobe Aminosäuren und im Anschluss daran befindet sich die relativ kurze, 26 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische Domäne. Innerhalb der cytoplasmatischen Domäne existiert ein

Internalisierungsmotiv (NPXY), dass bereits in vielen Rezeptoren, wie beispielsweise dem LDL-Rezeptor und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, beschrieben wurde und für eine Internalisierung von EpCAM sorgt (Hopkins 1992). Das Tyrosin in dem Internalisierungs-Motiv ist in EpCAM und dem GA733-1 Proteinprodukt EGP-1 konserviert. Die cytoplasmatische Domäne von EpCAM enthält außerdem zwei Konsensussequenzen (RKKRMAK) für die Bindung des Zytoskelett-interagierenden Proteins α -Actinin (Position 289-296 und 304-314) (Balzar *et al.* 1998).

1.2.4 Das Expressionsmuster von EpCAM

1.2.4.1 EpCAM in gesunden Geweben

Immunhistochemische Daten zeigten, dass EpCAM im adulten Menschen stringent in epithelialen Geweben, wie beispielsweise Kolon und Schilddrüse, exprimiert wird (Bjork *et al.* 1993) (Dr.Pauli; persönliche Mitteilung). EpCAM wird dabei an der basolateralen Membran von allen einfachen (vor allem Drüsengewebe), pseudo-Platten- und Übergangsepithelgeweben exprimiert. Im Gegensatz dazu sind gesunde Plattenepithel-, mesenchymale-, muskel- und neuro-endokrine Gewebe im adulten Menschen EpCAM negativ (Momburg *et al.* 1987; Bumol *et al.* 1988). Es wurde außerdem keine Expression von EpCAM in Zellen lymphoiden Ursprungs detektiert, wie es für das murine EpCAM beschrieben wurde (Borkowski *et al.* 1996; Nelson *et al.* 1996). Die Expressionsstärke von EpCAM variiert zwischen den einzelnen Geweben sehr stark. Im gastro-intestinalen Trakt ist EpCAM im Magenepithel schwach, im Dünndarm intermediär und im Dickdarm sehr stark exprimiert. Weiterhin exprimieren Drüsen und Gallenblase EpCAM (Momburg *et al.* 1987), Urothelium hingegen ist nur schwach EpCAM-positiv (Zorzos *et al.* 1995). In der Haut kommt es zu einer Expression von EpCAM in den Schweißdrüsen und in der proliferativen Zone der Haar-Follikel. Keratinozyten und Melanozyten weisen dagegen keine EpCAM-Expression auf (Momburg *et al.* 1987; Tsubura *et al.* 1992). Desweiteren exprimieren epitheliale Gewebe des weiblichen und männlichen

Genitaltraktes EpCAM (Ovarien, Zervix, Uterus, Testis und Prostata). Das endozervikale Drüsenepithel beispielsweise ist stark EpCAM-positiv, wohingegen das ektozervikale Plattenepithel EpCAM-negativ ist (Momburg *et al.* 1987; Litvinov *et al.* 1996). Die meisten Zellen der Niere, wie beispielsweise proximale, distale Tubuli und Nierengänge, exprimieren EpCAM, wie auch das ductale Gewebe und Inselzellen des Pankreas (Momburg *et al.* 1987; Cirulli *et al.* 1998). Die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Hypophyse, adrenale Drüsen) sowie die Trachea, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen im unteren Respirationstrakt sind ebenfalls EpCAM-positiv (Momburg *et al.* 1987).

Im Verlauf der Embryonalentwicklung wird EpCAM in fötalen Lungen-, Leber-, Nieren- (proximale Tubuli), Pankreas-, Haut- und Keimzellen exprimiert (Kasper *et al.* 1995). Lungenzellen zeigen eine vom Entwicklungsstadium abhängige EpCAM-Expression. Während der frühen Embryonalentwicklung (7-8 Woche) ist eine starke EpCAM-Expression im primären Lungen- und Bronchienepithel nachweisbar, die schließlich im alveolären Epithel des adulten Menschen bestehen bleibt (Kasper *et al.* 1995). Hepatozyten dagegen sind in acht Wochen alten Embryos EpCAM-positiv und verlieren im Verlauf der Entwicklung ihre EpCAM-Expression. Nur in den Gallengängen ist noch eine EpCAM-Expression nachweisbar. Adulte Hepatozyten sind daher EpCAM-negativ (de Boer *et al.* 1999). Interessanterweise zeigen regenerierende Hepatozyten eine erneute Expression von EpCAM. Desweiteren ist beschrieben, dass Pankreasgewebe im adulten Menschen EpCAM exprimiert (Cirulli *et al.* 1995) und bei Keimzellen eine zeitlich eng begrenzte EpCAM-Expression, während der frühen Ausbildung der Gonaden, stattfindet (Anderson *et al.* 1999).

1.2.4.2 Die EpCAM-Expression in Karzinomen

In einer Vielzahl von epithelialen Geweben ist die benigne und maligne Proliferation assoziiert mit einer verstärkten oder gar *de novo* Expression von EpCAM (Zorzos *et al.* 1995; High *et al.* 1996; Litvinov *et al.* 1996). Dies ist besonders im Fall des EpCAM-

negativen Plattenepithels offensichtlich: im frühen Stadium von Neoplasien des Zervix zum Beispiel, ist die *de novo* EpCAM-Expression in atypischen, dedifferenzierten Bereichen des Plattenepithels zu beobachten (Litvinov *et al.* 1996). Der Grad der Expression steigt dabei mit dem Grad der Neoplasie. In zervikalen, intraepithelialen Neoplasien (CIN) vom Grad I und II sind die basalen und suprabasalen Zellen EpCAM-positiv, wohingegen Neoplasien vom Grad III bis zu 100% EpCAM-positive Zellen in allen Schichten des Plattenepithels aufweisen. Die Expressionsstärke von EpCAM nimmt dabei von CIN I nach CIN III stetig und drastisch zu. Die Expression von EpCAM korreliert mit einer Abnahme von Differenzierungsmarkern, wie beispielsweise CK 13 und Involucrin, und auch einer erhöhten Proliferation, die durch immunhistochemische Färbungen gegen Proliferationsmarker wie Ki-67 belegt wurde. Es wurde zudem beschrieben, dass die EpCAM-Proteinmenge mit der verstärkten Proliferation und einer Abnahme der Differenzierung von intestinalen Zellen korreliert (Schiechl *et al.* 1986). Erstaunlicherweise, konnte auch im Kolon, das stark EpCAM-positiv ist, eine verstärkte EpCAM-Expression im Verlauf der Ausbildung von Polypen nachgewiesen werden (Balzar *et al.* 1999). In Mamma-Karzinomen korreliert eine starke EpCAM-Expression zudem mit einer erhöhten Tumormasse und infiltrierten Lymphknoten (Tandon *et al.* 1990). Tumore hingegen, die nicht epithelialen Ursprungs sind, weisen keine EpCAM-Expression auf. Diese Befunde führten dazu, EpCAM als streng epithelialen Tumormarker und Zielantigen in Immunotherapien (Chaubal *et al.* 1999; Zeidler *et al.* 2000) zu verwenden.

1.2.5 Die Funktion von EpCAM

Bislang sind nur wenige funktionelle Aspekte von EpCAM beschrieben. Eine beschriebene Funktion ist die Vermittlung einer homophilen Adhäsion. Es wurde gezeigt, dass in L-Zellen (murine Fibroblasten), die üblicherweise keine interzelluläre Adhäsion aufweisen, die Expression von EpCAM zur Bildung von Zellaggregaten

führte (Litvinov *et al.* 1997; Balzar *et al.* 1999). EpCAM konnte an der Oberfläche von interagierenden Zellen nachgewiesen werden (Litvinov *et al.* 1994). Die cytoplasmatische Domäne von EpCAM ist dabei für die Adhäsion notwendig, da Mutanten, denen dieser Anteil fehlte, keine interzelluläre Adhäsion mehr vermittelten. Die extrazelluläre Domäne zeigte sich jedoch als ausreichend, eine interzelluläre Adhäsion zu vermitteln, wenn EpCAM Moleküle an eine feste Phase immobilisiert wurden (Balzar *et al.* 1998). Daher besitzen cytoplasmatische Deletionsmutanten immer noch eine homophile Spezifität, sind aber unfähig eine stabile interzelluläre Adhäsion zu vermitteln. Die EpCAM-vermittelte Adhäsion ist jedoch verglichen mit klassischen Adhäsionsmolekülen wie den Cadherinen verhältnismäßig schwach.

Desweiteren interagiert EpCAM über die cytoplasmatische Domäne mit dem Actin-Zytoskelett. Die Behandlung EpCAM-exprimierender Zellen mit Cytochalsin D, einem Actin-Depolymerisations-Agenz, resultierte in der Zerstörung der EpCAM-vermittelten Adhäsion und in der Internalisierung von EpCAM (Balzar *et al.* 1998). Die Interaktion von EpCAM mit dem Actin-Zytoskelett erfolgt über die direkte Bindung der cytoplasmatischen Domäne an α -Actinin. Zwei Regionen innerhalb dieser Domäne von EpCAM sind für die Bindung von α -Actinin verantwortlich (Position 289-296 und 304-314).

Eine Überexpression von EpCAM in Zellen, die über Cadherine eine interzelluläre Adhäsion eingehen, führt zu einer Reduktion der Cadherin-vermittelten Adhäsion. Die EpCAM-vermittelte Adhäsion tritt dabei in den Vordergrund (Litvinov *et al.* 1997). Die Cadherin-Menge wird dabei in der Zelle nicht beeinflusst, sondern vielmehr die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett. Damit verbunden ist eine Reduzierung der α -Catenin Proteinmenge, die Menge an β -Catenin hingegen bleibt konstant. Die cytoplasmatischen Deletionsmutanten demonstrierten diesen Effekt erwartungsgemäß nicht. Daher wird angenommen, dass

der cytoplasmatische Teil von EpCAM über die Bindung von α -Actinin in der Regulation der Cadherin-vermittelten Adhäsion involviert ist (Balzar *et al.* 1998).

Die morphoregulatorische Rolle EpCAMs im Verlauf der Entwicklung von Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse zeigte zudem anschaulich die Regulation der interzellulären Adhäsion, um die epitheliale Morphogenese und Gewebserhaltung zu ermöglichen (Cirulli *et al.* 1998).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die EpCAM-Expression mit der Proliferation, einer Abnahme der Cadherin-vermittelten Adhäsion, der Morphoregulation und einer Dedifferenzierung korreliert und daher von einer Signaltransduktion EpCAMs ausgegangen werden kann.

1.3 Zielsetzung

Die Funktion von EpCAM ist, obwohl das Molekül als Tumormarker und Zielantigen verwendet wird, nur andeutungsweise bekannt. Es existieren bislang nur deskriptive Daten, die eine Korrelation von EpCAM mit der Proliferation zeigen und eine EpCAM-vermittelte Signaltransduktion implizieren. Formelle Beweise für diese Hypothese fehlen jedoch. Ziel meiner Arbeit war es daher, den direkten Einfluss von EpCAM auf das Wachstum von Zellen und die Genexpression zu analysieren, um einen Einblick in die Rolle dieses Moleküls in der Karzinogenese zu erhalten. Zu diesem Zweck sollten zunächst adäquate zelluläre Systeme etabliert werden, die eine konstitutive bzw. konditionale Expression von EpCAM erlaubten. Mit Hilfe dieser Systeme sollte anschließend der Einfluss von EpCAM auf das Wachstum und den Metabolismus studiert und mittels 2D-PAGE und mRNA Expressionsanalysen EpCAM-regulierte Gene identifiziert werden. Die Inhibierung der EpCAM-Expression in Karzinomzellen sollte außerdem dazu beitragen, die Rolle EpCAMs in einer *in vivo* nahen Situation zu studieren. Die Auswirkungen der EpCAM-Expression und der Inhibierung, sowie die identifizierten EpCAM-regulierten Gene

sollten es ermöglichen, einen Einblick in die Rolle von EpCAM in der Karzinogenese zu erhalten.

2. Material

2.1 Antikörper

α -EpCAM	C215 und HO-3 freundlicherweise von Dr. Lindhofer zur Verfügung gestellt
α -E-FABP	freundlicherweise von Dr. Siegenthaler zur Verfügung gestellt
α -c-myc	9E10 (Santa Cruz Biotechnology)
α -Cyclin A	sc-239 (Santa Cruz Biotechnology)
α -Cyclin E	sc-247 (Santa Cruz Biotechnology)
α -Actin	sc-1616 (Santa Cruz Biotechnology)
α -EBNA-1	freundlicherweise von Dr. Schepers zur Verfügung gestellt

2.2 Bakterien

Der verwendete Stamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

***E. coli* DH5 α** (Hannahan 1985):

F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *supE* 44, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

2.3 Chemikalien, Geräte und Sonstiges

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

2.3.1 Sonstige Reagenzien

3 MM-Papier	Whatman Limited,
Acrylamid, N,N,-Methylbisacrylamid	Protogel
Agarose	Boehringer Mannheim/Roche,
Agarose SeaPlaque	BioWhittaker Molecular Application
Atlas Array Human Cancer 1.2	BD Biosciences/Clontech
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck
Antibiotika (Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol)	Sigma, Roche
Bakterienmedienskomponenten (Trypton, Hefeextrakt)	Gibco
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford
[α - ³² P]dCTP (800mCi/mmol)	Amersham
[α - ³² P]CTP (800mCi/mmol)	Amersham
Coomassie R350	Serva
Dithioerythritol (DTE)	Sigma, Merck
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma
DNA-modifizierende Enzyme	Fermentas, Roche, New England Biolabs
ECL™ Western blotting system	Amersham
Ethidiumbromid	Merck
Fötale Kälberserum	Seromed/Biochrom, Chargen 569U und 611A
Glycerol	Sigma G-5150
2-Hydroxy-5-Methoxy-Benzoesäure	Fluka
Hygromycin B	Calbiochem
IPG Buffer	Amersham
Iodacetamid	Sigma, Merck
dNTPs	Boehringer Mannheim/Roche
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck
PBS-Tabletten	Gibco
Peptidfragmentstandard für MALDI-ToF	Sigma
Plasmidpräparation	„Jetstar“, Genomed

Proteingrößenstandard "Benchmark" (prestained)	Invitrogen
Restriktionsenzyme	Fermentas, Roche, New England Biolabs
Röntgenfilme	Amersham, Kodak
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	Fermentas
Transfektionsreagenz	„Fugene“, Roche
TriPure	Boehringer Mannheim/Roche
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Trypsin	Seromed/Biochrom
Trypsin, Porcine, Seq.Grade Modified	Promega
Zellkulturmedien und Zusätze	Seromed/Biochrom

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	Costar, Falcon
Elektroporationsküvetten	PeqLab
Immobilon-P Membran	Millipore
IPG-Strips	Amersham
Pipettenspitzen	Gilson
Röhrchen, steril, Zellkultur	Greiner
Shredder Säulen	Qiagen
Sephadex G-50 Säulen	Amersham
Sterilfilter	Millipore
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc
Zellkultur-Multiloch-Platten	„Falcon“ Becton-Dickinson
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, „Falcon“ Becton-Dickinson
Zentrifugengefäße 1,5ml/2ml	Eppendorf

2.3.3 Geräte

2D-PAGE-Anlage bestehend aus IPGphor, Elektrophoresekammer SE600 und Hofer „Gelstainer“	Amersham
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton-Dickinson
Elektroporator „Gene Pulser“	Biorad
Filmkassetten	Amersham

Gelelektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1
Gelelektrophorese-Kammern	Stratagene, Amersham
Gelelektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Consort, Amersham
Glasgeräte	Schott
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus
Lyophilisator mit Speedvac	LKB
MALDI-ToF	Bruker
Phasenkontrast-/UV-Mikroskop	Zeiss
PCR-Maschine	Biometra UNO
Pipetten, Mikroliter-	Gilson
Schüttelinkubatoren	„Certomat“, Braun
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer
Szintillationszähler	„TopCount“, Packard
Thermomixer	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Beckman, Kontron
UV-Mikrophotometer	„GeneQuant Pro“, Pharmacia
UV-Transilluminator	LKB
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

2.3.4 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierungen	Sequiserie (Dr. Metzger), Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	ARK, Darmstadt; Metabion, Martinsried

2.4 Plasmide

Die im Rahmen meiner Arbeit verwendeten Plasmide wurden teilweise durch mehrere Klonierungsschritte unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken (Maniatis *et al.* 1989) generiert. Einige der verwendeten Plasmide waren in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Im folgendem sind alle verwendeten Plasmide als Auszug der englisch-verfassten Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe Klinische Kooperationsgruppe „Molekulare Onkologie“ gezeigt. Die von mir klonierten Plasmide sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

<u>Clone #</u>	<u>Description</u>
<u>pEGFP-C1</u>	green fluorescent protein (GFP) expression vector from Clontech Laboratories, Inc. for the generation of fusion proteins with GFP; CMV promoter
<u>H10</u>	EpCAM cDNA in pCEP4; CMV promoter
H11	EpCAM cDNA in pMEP4; Metallothionein-promoter
H60.2 and	EpCAM cDNA Sense in pREP7; RSV LTR promoter
H60.13*	Second clone
H61.3 and	EpCAM cDNA Antisense in pREP7; RSV LTR promoter
H61.9*	Second clone
H80*	Δ EpCAM in pMEP4; Metallothionein-promoter
H104*	Δ EpCAM in pCEP4; CMV promoter

2.5 Zelllinien

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

Zelllinie	Herkunft	Referenz
293	embryonale Niere	(Graham <i>et al.</i> 1977)
293-ΔEpCAM*	embryonale Niere	in dieser Arbeit etabliert
293-EpCAM*	embryonale Niere	in dieser Arbeit etabliert
ANT-1	Hypopharynx-Karzinom	Dr. Mayer, 1999, in unserem Labor etabliert
ANT-1-AS*	Hypopharynx-Karzinom	in dieser Arbeit etabliert
ANT-1-S*	Hypopharynx-Karzinom	in dieser Arbeit etabliert
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC
HCT-8	Kolon-Karzinom	ATCC
HLAC-78	Larynx-Karzinom	ATCC
MCF-7	Mamma-Karzinom	ATCC
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI-13	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
SKBR3	Mamma-Karzinom	ATCC
Tu179	Zungenrand-Karzinom	Dr. Moosmann, 2001, in unserem Labor etabliert
NIH3T3	murine Fibroblasten	ATCC
NIH3T3-ΔEpCAM*	murine Fibroblasten	in dieser Arbeit etabliert
NIH3T3-EpCAM*	murine Fibroblasten	in dieser Arbeit etabliert
NIH3T3-Raf	v-Raf-transformierte NIH3T3 (3611)	freundlicherweise von Dr. Kieser zur Verfügung gestellt

3. Methoden

3.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden, je nach Größe, in Agarose-Gelen geeigneter Konzentration aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei dem Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportional. Die Agarosekonzentration eines Gels betrug zwischen 0.7% und 4%. Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem Abstand der beiden Elektroden und sollte etwa 3 V/cm betragen. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Gel nach dem Lauf für ca. 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (40 ng/ml) gebadet und unter UV Licht betrachtet.

- Laufpuffer: 1xTBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) oder 1xTAE (40 mM Tris Acetat, 1 mM EDTA).

3.2 Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxid und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Standardmedium für Suspensionszellen und adhärente Zellen war Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Glutamin wurde als N-Acetylalanylglutamin zugesetzt („stabiles Glutamin“). Medien und Zusätze wurden von Biochrom (Berlin) bezogen. Im Fall von stabilen Transfektanten wurde das Kulturmedium mit 200 µg/ml Hygromycin B supplementiert. Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, dann mit 0.05% Trypsin/0.02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst, einmal in Medium mit 10% FCS gewaschen und in gewünschter Dichte ausplattiert. Die Zentrifugation von eukaryontischen Zellen zum Zweck der Konzentrierung oder des Waschens erfolgte in der Regel in 50 ml Einmal-Zentrifugengefäßen bei 350 g (entspricht 1200 rpm in den verschiedenen Tischzentrifugen von Hettich und Jouan) für 5-10 min bei 20°C.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen (10^6 - 10^7 pro Aliquot) in 0.75 ml Kulturmedium resuspendiert, auf Eis gekühlt, mit 0.75 ml kaltem FCS/DMSO (v/v 4:1) gemischt und in ein 1.8 ml-Kryogefäß (Nunc) überführt. Zur langsamen Abkühlung wurden die Zellen zunächst in einem allseitig verschlossenen Styroporbehälter in ein -80°C -Gefriergerät gestellt. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Lagertank überführt.

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

3.3 Bakterienkultur

3.3.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurde LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ supplementiert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

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

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

3.3.2 Transformation von *E.coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte durch Inkubation einer *E.coli* DH5 α Kultur in TFB-Puffer auf Eis (Hannahan 1985). Zu einem Aliquot (200 μl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50 ng eines

Ligierungsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA und 7 µl DMSO pipettiert und für 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von glukosesupplementiertem (10 mM) SOB-Medium und einer 30-minütigen Anzucht bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

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

3.4 FACS-Analysen

3.4.1 Bestimmung der Oberflächenexpression eines Proteins

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen auf Zellen kann mit Hilfe spezifischer Antikörper und eines Durchflusszytometers (FACS™) erfolgen. Dazu wurden 2×10^5 Zellen in einer 1:50 Verdünnung des jeweiligen Antikörpers (200 µg/ml) in FACS Puffer eine halbe Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in FACS Puffer wurden die Zellen in einer 1:50 Verdünnung des jeweiligen α-IgG-FITC markierten Sekundärantikörpers (1.0 mg/ml) in FACS Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression in einem FACS™ Durchflusszytometer (BectonDickinson) bestimmt.

-FACS Puffer: PBS + 5% FCS (Maniatis et al. 1989).

3.4.2 CMFDA-Proliferationsanalysen

Zur Proliferationsanalyse wurden 5×10^5 Zellen 30 min in DMEM 10% FCS, supplementiert mit 10 µM des Fluoreszenzfarbstoffes 5-Chlormethyl-fluoresceindiacetat (CMFDA, Molecular Probes), kultiviert. Anschließend wurde das CMFDA-haltige Medium abgenommen und durch frisches DMEM 10% FCS ersetzt. Die auf Zellteilung beruhende Abnahme der CMFDA Fluoreszenz wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt.

3.5 Bestimmung der Glyoxalase I (Glox I) Enzymaktivität

5×10^6 Zellen wurden nach einmaligen Waschen in PBS in 100 μ l TBS-T 1% Puffer lysiert, bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Die Glox I Enzymaktivität des jeweiligen Proteinlysats wurde anschließend über die Umsetzung von Methylglyoxal und Glutathion in Imidazolpuffer zu S-Lactoylglutathion ermittelt. Die Bildung von S-Lactoylglutathion konnte dabei über den Anstieg der Absorbtion bei 240 nm verfolgt werden. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = (\Delta A \times V) / (\epsilon \times d \times v \times t)$$

mit ΔA =Absorbtdifferenz; V =Probenvolumen; $\epsilon=2.86\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; d =Küvettenlänge; v =Lysatvolumen; t = Zeitdifferenz

TBS-T 1% Puffer: 1% Triton X100; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 1 mM Natriumvanadat

Glutathion: 1 mM

Methylglyoxal: 7.9 mM

Imidazol Puffer (pH7.0): 200 mM Imidazol; 14.6 mM Magnesiumsulfat

3.6 Immunoblots

Proteine wurden in 10-15%-igen SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V; 30 mA/Gel) und anschließend auf Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Westernblot; 100 V; 500 mA). Die unspezifische Bindung des Antikörper an die Membran wurde durch eine vorhergehende Inkubation der Membran in Blockpuffer verhindert. Die Detektion der Proteine wurde mit spezifischen Primärantikörpern (1:1000 in TBS-Tween) und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000 in TBS-Tween) nachgewiesen.

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

- TBS-Tween: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferte Lösung, 0,1% Tween 20.

3.7 MTT Assay (Mosmann 1983)

Zellen (3×10^3) wurden für 0-4 Tage in 96-Loch Platten kultiviert. Die Konversion des Substrats MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch ein mitochondriales Enzym dient als Maß für den Metabolismus und die Vitalität der Zellen (Mosmann 1983). Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein farbiges Produkt, das durch Messung der optischen Dichte bei 690 nm quantifiziert wird. Zur Messung der MTT-Konversion wurde den Zellen je 10 μl /Loch MTT Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in 200 μl /Loch eines 24:1 Isopropanol und 1 M HCl gründlich resuspendiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 690 nm in einem ELISA Gerät gemessen. Zum Vergleich verschiedener Experimente wurden die gemessenen OD-Werte stets auf den Tag 0 einer Zeitreihe gemessenen Wert standardisiert.

- *MTT-Reagenz*: Gemisch aus 990 μl einer Stammlösung aus 5 mg/ml Thiazolblau [Sigma] in PBS und 110 μl einer Stammlösung aus 1 mg/ml Superoxid-Dismutase [Sigma] in PBS

3.8 Präparative Plasmidaufarbeitung

Die präparative Plasmidaufarbeitung erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed).

3.9 RNA-Arbeitstechniken

3.9.1 Isolierung von RNA

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von gesamtzellulärer RNA dienten 5×10^6 Zellen. Die Zellen wurden direkt auf der Kulturplatte mit TriPure (Boehringer Mannheim/Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers lysiert und aufgearbeitet. Die Qualität und Menge der isolierten RNA wurde anschließend auf einem denaturierenden 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel überprüft.

3.9.2 Radioaktive Markierung von DNA Sonden

Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet, bei der Hexanukleotide von zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA binden und als Startpunkte für die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg *et al.* 1983). Die Markierung von 50 ng DNA wurde mit dem "random primed DNA labelling kit" der Firma Roche Diagnostics nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G50 Säule (Nick Column, Amersham Pharmacia). Nach Hitzedenaturierung (5 min bei 95°C, 5 min Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

3.9.3 Nukleäre Run-On Experimente

Die Isolierung der Zellkerne und die Durchführung der nukleären Run-On Reaktion erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Schuhmacher *et al.* 2001). Die Zellen wurden von der Kulturplatte abgeschabt und pelletiert (7 min 1200 rpm 4°C). Anschließend, wurden diese einmal in eiskaltem PBS gewaschen, zentrifugiert (7min 1200 rpm 4°C) und in 10 ml Lysis Puffer 15 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (7 min 1500 rpm 4°C) wurden die Kerne in TMEG Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff (100 µl Aliquots; entsprechend 2×10^7 Kerne) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Durchführung der Run-On Reaktion wurden die Kerne auf Eis aufgetaut und mit 100µl Reaktions Puffer 15 min bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde DNase I (50 U, RNase frei, Roche Diagnostics) hinzugefügt und die Reaktionslösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (zweimal). Im Anschluss folgte eine 60-minütige Inkubation mit Proteinase K (0.65 mg/ml) bei 37°C. Nach der Isolierung der nukleären Transkripte über Sephadex G-50 Säulen wurde die radioaktiv-markierte RNA in 5ml ExpressHyb (Clontech) gegeben und mit Clontech Atlas Human Cancer 1.2 Nylonmembranen (Clontech, <http://www.clontech.com>) für 36 h bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen sukzessive je

zweimal mit Waschpuffer I-III behandelt. Vor der Zugabe des Wasch Puffers III wurden die Filter 1-2 mal mit Waschpuffer III ohne RNase gewaschen. Abschließend wurden die Filter nach erneuter Behandlung mit Waschpuffer II in einer Filmkassette mit Intensivierungsschirm bei -80°C und Kodak X-Omat AR Film für zwei Wochen exponiert.

-Lysis Puffer: 10 mM Tris/HCl pH7.5; 3 mM MgCl_2 ; 10 mM NaCl; 0.5% (v/v) NP40

-TMEG Puffer: 50 mM Tris/HCl pH8.3; 5 mM MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA/NaOH pH8.0; 40% (v/v) Glycerin

-Reaktions Puffer: 300 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; je 0.5 mM ATP, UTP, GTP und 100 μCi [α - ^{32}P]-CTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Amersham pharmacia biotech)

-Waschpuffer I: 1% SDS; $2\times\text{SSC}$; 20 min 45°C

-Waschpuffer II: 0.5% SDS; $0.1\times\text{SSC}$; 20 min 45°C

-Waschpuffer III: $2\times\text{SSC}$; 1 mM EDTA; 2 mg/ml RNase A, 15 min 30°C

3.10 Soft-Agarose Experimente

$1-3\times 10^4$ Zellen wurden in 0.35% Agarose/10% FCS DMEM auf einer Schicht aus 0.5% Agarose/10% FCS DMEM in 60mm Kulturschalen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Koloniebildung wurde mit Hilfe eines Mikroskops verfolgt. Im Fall der HEK293-Transfektanten wurde die Koloniebildung zusätzlich als Verhältnis von gebildeten Kolonien zu der Gesamtzellzahl im ausgewählten Blickfeld nach 7 Tagen in Agarose bestimmt und der Mittelwert aus fünf solcher zufällig ausgewählten Blickfelder berechnet. Der gepaarte Student'sche t-Test wurde mit Hilfe der Microsoft Excel Software durchgeführt.

3.11 Sonstige DNA/RNA Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein verbreiteter Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt werden, beispielsweise Northern-Blot, Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren und deren Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase, Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über Affinitätsmatrices, Ligation freier DNA-Enden, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Maniatis *et al.* 1989).

3.12 Transfektionen

Die zur Transfektion verwendeten Zellen wurden über Nacht in 6-Loch-Platten ($1-3 \times 10^5$ Zellen/Loch) bzw. 90 mm-140 mm Zellkultur-Platten ($5-10 \times 10^6$ Zellen/Platte) kultiviert, um eine ca. 70%-ige Konfluenz zu erreichen. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin in serumfreiem Medium (Optimem I) nach den Angaben des Herstellers. Alle DNA Mengen wurden durch Zugabe von Salmon Testis DNA (Sigma) angeglichen. Stabile Transfektanten wurden mittels Liposomen-vermittelter Transfektion und anschließender Selektion mit steigenden Mengen Hygromycin (Startkonzentration $100 \mu\text{g/ml}$) gewonnen.

3.13 Bestimmung der Zellzahl und Zellteilungsrate

Die Zellen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension mit 1 Volumen einer 0.1%-igen Trypanblau-Lösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind deshalb im Mikroskop an ihrer Blaufärbung zu erkennen. Der gepaarte Student'sche t-Test wurde mit Hilfe der Microsoft Excel Software durchgeführt.

Die Zellverdopplungszeiten wurden mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$t_d = \ln 2 / \lambda$$

$$\lambda = (\ln(n_0) - \ln(n_x)) / (t_0 - t_x)$$

mit n_0 = Zellzahl am Tag 0; n_x = Zellzahl am Tag x; λ = Wachstumskonstante; t_0 =Tag 0;
 t_x =Tag x

3.14 Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

3.14.1 1.Dimension: Isoelektrische Fokussierung

1×10^7 Zellen wurden sukzessive einmal in PBS und PBS/H₂O (1:1) gewaschen, in 350 μ l Lysis Puffer lysiert, die austretende DNA durch Zentrifugation in QIAshredder Säulen (13000 rpm, 2 min RT) zerkleinert und anschließend bei 42000 g bei RT 1h pelletiert. Die Proteine im Überstand wurden mit 2 μ l IPG Puffer und 1 μ l Bromphenolblau Puffer versetzt und mit Hilfe von „immobiline dry strip“ Gradienten (pH 3-10 und pH 4-7; 18 cm) auf einer IPGphor-Fokussierungseinheit nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Das dabei verwendete Fokussierungsprotokoll ist in folgender Tabelle aufgeführt:

Stufen	Spannung (V)	Dauer (h)
Rehydrierung	0	0.1
1	30	8
2	50	4
3	200	2
4	500	2
5	2000	2
6	4000	2
Gradient	8000	1
8	8000	9

Die Fokussierung erfolgte über den Zeitraum von 30 h bei 20°C und 50 μ A/strip. Die üblicherweise erhaltene Gesamtvoltstunden Zahl betrug 92 kWh. Nach der Fokussierung wurden die IPG-strips entweder bei -80°C weggefroren oder sofort auf die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) gegeben.

2D-Lysis Puffer: 9 M Harnstoff; 4% CHAPS; 1% DTT; 1 mM EDTA

Resolving Puffer (pH8.8): 1.5 M Tris; 0.4% SDS; 1.5 mM NaN₃; (zwei Wochen bei 4°C haltbar)

Bromphenolblau Puffer: 3 mM Bromphenolblau in Resolving Puffer

3.14.2 2.Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

IPG-strips wurden sukzessive mit bromphenolblau-haltigem Equilibrierungspuffer behandelt, der jeweils 65 mM DTE oder 215 mM 2-Iodacetamid enthielt. Anschließend wurden die IPG-strips auf 13-15% SDS-Polyacrylamid Gele aufgelegt, mit 0.5% Agarose (in Equilibrierungspuffer) fixiert, und die fokussierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-Lauf Puffer; 5W, 30min zum Einlaufen der Proteine, danach 60 W).

Equilibrierungspuffer: 6 M Harnstoff; 3.3 M Glycerin; 70 mM SDS; 3.3% Resolving Puffer (2Wochen haltbar)

SDS-Laufpuffer: 1.92 M Glycin; 0.25 M Tris; 1% SDS

Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend mit Coomassie- oder Silber Färbung. Die verwendeten Protokolle sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Coomassie-Färbung

<i>Schritt</i>	<i>Lösung</i>	<i>Dauer (min)</i>
1	Fixierer	15
2	Entfärber	1.5
3	0.02% Coomassie	45
4	Entfärber	7.5
5	Entfärber	22.5
6	Entfärber	60
7	Entfärber	60
8	Aufbewahrung	30

Fixierlösung: 40% Methanol; 10% Essigsäure

Entfärbelösung: 25% Ethanol; 8% Essigsäure

Coomassie-Stocklösung: 0.2% Coomassie R350; 60% Methanol

Aufbewahrungslösung: 25% Ethanol; 8% Essigsäure; 4% Glycerin

Silber-Färbung

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer	30
2	Sensitivierung	30
3	Wasser	5
4	Wasser	5
5	Wasser	5
6	Silber	20
7	Wasser	1
8	Wasser	1
9	Entwickler	0.5-3
10	Stopp	10
11	Wasser	5
12	Wasser	5
13	Wasser	5
14	Aufbewahrung	30

Fixierlösung: 50% Ethanol; 12% Essigsäure

Sensitivierungslösung: 1.5 mM Natriumthiosulfat

Silberlösung: 12mM Silbernitrat; 0.075%Formaldehyd (37%)

Entwicklerlösung: 0.57 M Natriumcarbonat; 2.5% Sensitivierungslösung; 0.05% Formaldehyd (37%)

Stopplösung: 40 mM EDTA oder 50% Methanol; 12% Essigsäure

Aufbewahrungslösung: 20% Ethanol; 2% Glycerin

3.14.3 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Analyse (MALDI-ToF)

Proteine von Interesse wurden aus Coomassie-gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und anschließend mit einer organischen Matrix auf einer Metallplatte für die MALDI-ToF Analyse kristallisiert und im Anschluss daran vermessen. Die erhaltenen „peptid mass fingerprints“ wurden zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptid mass fingerprint“ Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

3.14.3.1 Trypsin-Verdau

Gelstücke, welche die gewünschten Proteinespots enthielten, wurden kleingeschnitten, in silanisierte 500 µl Eppendorf Gefäße überführt und mit 100 µl Wasser (Millipore) zweimal 10-30 min bei RT gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Wasser anschließend mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Die Gelstücke wurden zweimal im Wechsel ca. 10-15 min mit 50% Acetonitril, 50mM Ammonium-Bicarbonat (frisch) gewaschen, letztendlich in 20 µl Ammonium-Bicarbonat und 0.5 µl Trypsin (100 ng/µl) aufgenommen und über Nacht bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die verbliebenen Gelstücke nochmal mit ca. 30 µl 70% Acetonitril für 20 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit dem erstem vereinigt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und in der Speedvac getrocknet. Mit ca. 50 µl Wasser wurde das Lyophilisat gelöst und erneut getrocknet. Dieser Prozess wurde solange wiederholt bis keine Salzurückstände mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

3.14.3.2 Beschichten mit DHB Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure)

Die MALDI-ToF Metallplatte wurde vor jeder Messung mit 50% Methanol gespült und an der Luft getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 10 µl Resolving Puffer ultrageschallt und anschließend 1 µl dieser Lösung mit 1 µl des DHB-Mixes vermischt. Aus dieser Mischung wurden dann 0.5 µl auf die Metallplatte aufgebracht und nach Kristallisation in der MALDI-ToF vermessen.

Resolving Puffer: 10% Acetonitril; 0.1% Trifluoressigsäure

DHB-Mix: bestehend aus 9 Teilen DHB (20% Acetonitril; 0.1% Trifluoressigsäure; 20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure) und 1 Teil HMB (20% Acetonitril; 0.1% Trifluoressigsäure; 20 mg/ml 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure)

3.14.3.3 MALDI-ToF Analyse

Zur Analyse der aufgetragenen Peptidfragmente wurde die Metallplatte in das Massenspektrometer (MALDI-ToF) eingeführt. Anschließend wurden die in der DHB-Matrix co-kristallisierten Peptidfragmente im Hochvakuum mit Hilfe eines Lasers ionisiert und deren massen- und ladungsabhängige Flugzeit durch ein angelegtes Spannungsfeld bestimmt. Die so erhaltenen Massenspektren wurden anschließend kalibriert und zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptid mass fingerprint“ Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

4. Ergebnisse

Das in dieser Arbeit untersuchte Epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein Transmembranprotein, das aufgrund unterschiedlicher Glykosylierung in Formen von 37, 40 bzw. 42 kDa existiert (Fernsten *et al.* 1990). Über die Funktion von EpCAM gibt es derzeit nur bedingt Erkenntnisse, insbesondere wenige, die über die Molekularbiologie dieses Proteins Aufschluss geben. Es ist bekannt, dass EpCAM als homophiles und Calcium-unabhängiges Adhäsionsmolekül an der Regulation des Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontaktes beteiligt ist (Litvinov *et al.* 1997; Balzar *et al.* 1999; Balzar *et al.* 2001). EpCAM ist auf der basolateralen Membran gesunder Drüsenepithelien und auf verschiedenen Zellen, die ihre Differenzierung noch nicht abgeschlossen haben, exprimiert. Dazu gehören beispielsweise Lungen-, Leber- und Keimzellen (Anderson *et al.* 1999; de Boer *et al.* 1999; Piyathilake *et al.* 2000). Interessanterweise wird die Expression von EpCAM eingestellt, sobald die Zellen vollständig differenziert sind. Eine *de novo* Expression in EpCAM-negativen Zellen hingegen ist assoziiert mit benignen und malignen Dysplasien. Im Verlauf der Karzinogenese kommt es, abhängig vom dysplastischen Gewebe, entweder zu einer starken Überexpression, oder auch zu einer Neusynthese von EpCAM (Litvinov *et al.* 1996; Poczatek *et al.* 1999). Die Proteinmenge korreliert dabei mit der Dedifferenzierung und erhöhten Proliferation der betroffenen Zellen. Infolgedessen wird EpCAM als pan-Karzinommarker bezeichnet und in einer Reihe immuntherapeutischer Ansätze als Zielmolekül genutzt (Zeidler *et al.* 2000; Riesenberg *et al.* 2001). All diese Befunde weisen auf einen direkten Beitrag von EpCAM zur Karzinogenese hin; liefern jedoch keinen formalen Beweis dafür. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effekte von EpCAM in humanen, epithelialen Zellen auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zelluläre Systeme etabliert, die eine funktionelle Charakterisierung von EpCAM ermöglichen

sollten. Zudem wurde die Auswirkung von EpCAM auf die Genexpression mittels differentieller cDNA-Expressionsanalyse und zwei-dimensionaler Gelelektrophorese untersucht.

4.1 Etablierung zellulärer Systeme zur funktionellen Analyse von EpCAM und die EpCAM-vermittelten Effekte in diesen Systemen

4.1.1 Konstitutive EpCAM-Expression in humanen embryonalen HEK293 Nierenzellen

Um die Effekte der EpCAM-Expression in epithelialen Zellen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit einem Expressionsplasmid, welches für die gesamte cDNA von EpCAM kodiert, stabil transfiziert (293-EpCAM). Die hierfür verwendete cDNA stammte aus einem Kolon-Karzinom (Szala *et al.* 1990). Als Kontrolle wurde ebenfalls der entsprechende Leervektor des EpCAM-Expressionsplasmids stabil transfiziert (293- Δ EpCAM). Die Expression von EpCAM wurde anschließend in beiden stabilen HEK293-Transfektanten analysiert. In Northern-Blot Experimenten konnte mit einer radioaktiv-markierten und EpCAM-spezifischen Sonde die Transkription der EpCAM-mRNA in 293-EpCAM Zellen nachgewiesen werden. In 293- Δ EpCAM Zellen hingegen wurde keine EpCAM-mRNA detektiert (Abb. 4.1). Die Expression des EpCAM-Proteins konnte in Immunoblot Experimenten mit einem spezifischen Antikörper (C215) nachgewiesen werden. Das Glykosylierungsmuster und die EpCAM-Proteinmenge in 293-EpCAM Zellen waren vergleichbar mit der Hypopharynx Karzinomzelllinie FaDu (Abb. 4.1).

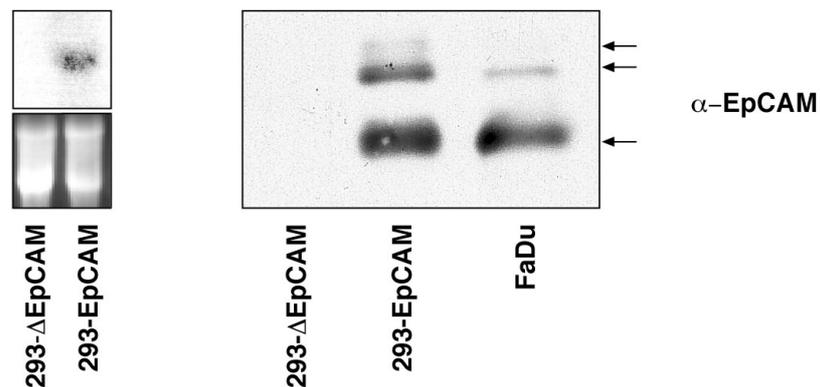


Abb. 4.1: EpCAM-Expression in stabil transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden stabil mit einem EpCAM-kodierenden Expressionsvektor (293-EpCAM) oder dem korrespondierenden Leervektor (293-ΔEpCAM) transfiziert. Die Transkription von EpCAM wurde mit Hilfe einer EpCAM-spezifischen Sonde im Northern-Blot überprüft. Eine Ethidiumbromid Färbung des Gels bestätigte die Auftragung gleicher Mengen an Gesamt-RNA (linke Teilabbildung). Die Expression des EpCAM-Proteins wurde im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (C215) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Dabei wurden gleiche Gesamtproteinmengen (30 µg), welche mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, auf das Gel aufgeladen. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Glykosylierungsformen von EpCAM. Die Karzinomzelllinie FaDu, welche endogenes EpCAM exprimiert, wurde als positiv-Kontrolle verwendet.

Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation von EpCAM an der Zellmembran wurde dessen Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern (C215, FITC-IgG) bestimmt. Als positiv-Kontrolle diente die Karzinomzelllinie FaDu, welche eine starke EpCAM-Oberflächenexpression aufweist. Die Expression von EpCAM auf der Membran von 293-EpCAM Zellen war vergleichbar mit FaDu-Karzinomzellen, wohingegen EpCAM auf 293-ΔEpCAM Zellen erwartungsgemäß nicht nachweisbar war (Abb. 4.2).

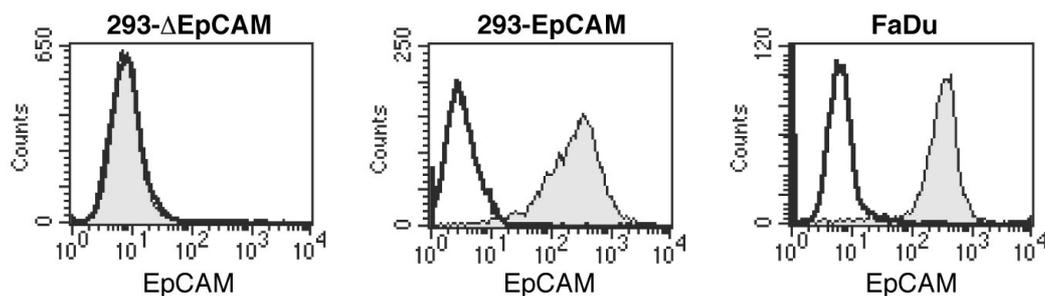


Abb. 4.2: Oberflächenexpression von EpCAM in 293-ΔEpCAM, 293-EpCAM und FaDu-Zellen. Die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie mit Hilfe spezifischer Antikörper (C215, FITC-IgG) nachgewiesen. Graue, gefüllte Histogramme repräsentieren EpCAM, die offenen Histogramme die jeweilige FITC-Kontrolle.

Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, die Auswirkungen der EpCAM-Expression in HEK293-Zellen zu untersuchen. Diese werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1.2 EpCAM vermittelt HEK293-Zellen Wachstumsvorteile und einen erhöhten Metabolismus

Die Expression von EpCAM wurde, wie bereits erwähnt, mit einer erhöhten Proliferation und Dedifferenzierung von epithelialen Zellen in Verbindung gebracht. Diese Aussage basierte jedoch ausschließlich auf einer immunhistochemisch festgestellten Zunahme des Proliferationsmarker Ki-67 und einer Abnahme des Differenzierungsmarkers CK 13 in EpCAM exprimierenden Geweb dysplasien (Litvinov *et al.* 1996). Der formale Beweis, dass diese Effekte durch EpCAM vermittelt werden, wurde bislang jedoch nicht erbracht. Mit der Etablierung der konstitutiv EpCAM-exprimierenden HEK293-Transfektanten (4.1.1) konnten daher erstmalig die direkten Effekte einer EpCAM-Expression auf das Wachstum epithelialer Zellen analysiert werden. Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Wachstumsfaktoren auf das Wachstum untersucht. Zu diesem Zweck wurden 293-ΔEpCAM und 293-EpCAM Zellen zu gleichen Zellzahlen (5×10^5

Zellen/90 mm Kulturplatte) jeweils mit 1% fötalem Kälberserum (FCS) und 10% FCS in Standardkulturmedium (DMEM) kultiviert. Nach 4 Tagen wurde die Zahl der adhären den Zellen in einer Fuchs-Rosenthal Kammer bestimmt. Trypanblau diente dabei als Farbstoff, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind an ihrer blauen Farbe erkennbar. Wie in Abb. 4.3 dargestellt, wurde nach vier Tagen in 1% FCS DMEM, in drei unabhängigen Experimenten, reproduzierbar eine um den Faktor 2.5 bis 3 erhöhte Zellzahl der 293-EpCAM Zellen bestimmt. Eine Kultivierung der Zellen unter 10% FCS DMEM zeigte am vierten Tag keinen signifikanten Unterschied in der Zellzahl beider Zelllinien (Abb. 4.3).

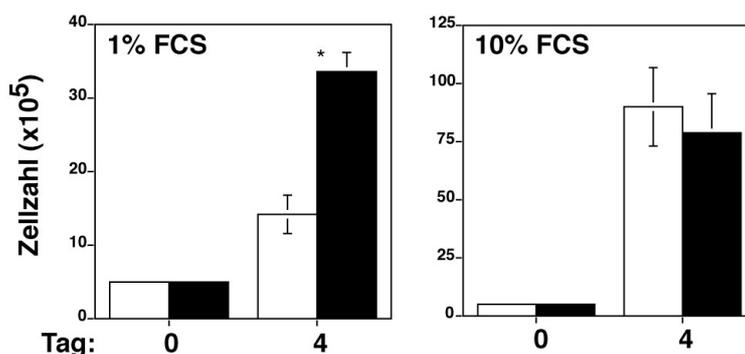


Abb. 4.3: EpCAM induziert eine verminderte Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren. Dargestellt sind die ermittelten Zellzahlen am Tag 0 bzw. Tag 4 bei Kultivierung der Zellen in 1% FCS bzw. 10% FCS. Die weißen Balken repräsentieren die 293-ΔEpCAM Zellen, schwarze Balken 293-EpCAM Zellen. Gepaarter Student'sche t-Test *= 0.022.

Bei der Kultivierung von HEK293-Transfektanten zeigten sich morphologische Veränderungen der 293-ΔEpCAM Zellen in 1% FCS-haltigem Medium. Die Abbildung 4.4 demonstriert in einem repräsentativem Experiment die morphologischen Unterschiede zwischen 293-ΔEpCAM und 293-EpCAM Zellen in Abhängigkeit von der Wachstumsfaktorkonzentration. 293-ΔEpCAM Zellen wuchsen bei Zugabe von 1% FCS in kleinen Zellagglomeraten, die sich teilweise von der Zellkulturschale lösten. Die 293-EpCAM Zellen hingegen waren stets adhären d und zeigten weiterhin einen epithelialen Phänotyp. Unter 10% FCS DMEM

Kulturbedingungen war kein morphologischer Unterschied zwischen beiden Zelllinien feststellbar.

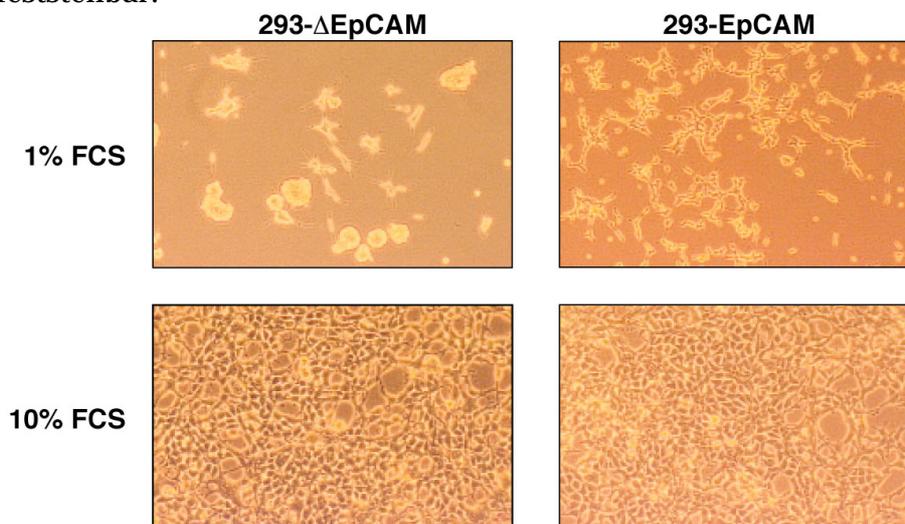


Abb. 4.4: Morphologische Veränderungen der 293-ΔEpCAM Zellen unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen. Gezeigt sind mikroskopisch vergrößerte Ausschnitte der 293-ΔEpCAM und 293-EpCAM Zelllinien nach vier Tagen Kultivierung in 1% FCS bzw. 10% FCS DMEM.

Die dargestellten Versuche unterstreichen, dass die EpCAM-Expression zu einer reduzierten Wachstumsfaktorabhängigkeit führt.

In den folgenden Experimenten wurde die Auswirkung von EpCAM auf den Zellmetabolismus studiert. Dazu wurden beide Zelllinien bei gleicher Zellzahl (3×10^3 /Loch in 96-Loch Platten) in 1% FCS DMEM und 10% FCS DMEM für 4 Tage kultiviert und jeweils an Tag 0, 1, 3 und 4 die metabolische Aktivität in einem Standard MTT-Konversionsexperiment bestimmt. In Abb. 4.5 sind die, aus 4 unabhängigen MTT-Konversionsexperimenten, erhaltenen Mittelwerte der optischen Dichte, welche ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen sind, in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt. Unabhängig von der Wachstumsfaktorkonzentration, zeigten 293-EpCAM Zellen einen signifikant erhöhten Metabolismus im Vergleich zu 293-ΔEpCAM Zellen. Zusätzlich konnte bei den 293-ΔEpCAM Zellen ab Tag 3 unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen eine Stagnation der metabolischen Aktivität festgestellt werden.

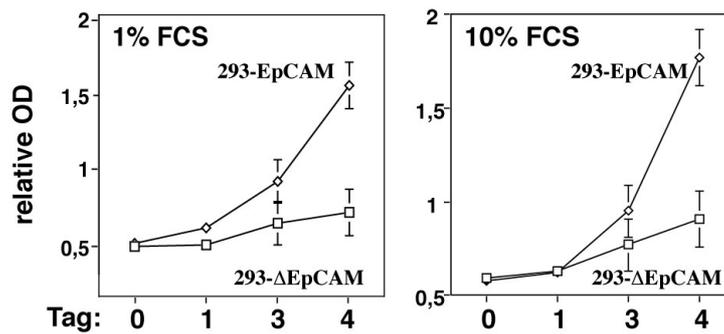


Abb. 4.5: EpCAM induziert einen erhöhten Zellmetabolismus. Gezeigt sind die metabolischen Aktivitäten von 293-ΔEpCAM und 293-EpCAM Zellen unter Serum-reduzierten (1% FCS) und Standardkulturbedingungen (10% FCS) zu den angegebenen Zeitpunkten, ausgedrückt als Mittelwerte der relativen optische Dichte nach MTT-Konversion. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

Die signifikant erhöhte metabolische Aktivität der 293-EpCAM Zellen unter Serum-reduzierten (1% FCS) und Standardkulturbedingungen (10% FCS) bestätigt damit auch die erhöhten Zellzahlen und die unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen unveränderte Morphologie der 293-EpCAM Zellen.

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Expression von EpCAM den Metabolismus und das Wachstum epithelialer HEK293-Zellen verstärkt.

4.1.3 Konstitutive EpCAM-Expression in NIH3T3-Fibroblasten

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit den HEK293-Transfektanten, die im vorangegangenen Kapitel 4.1.2 beschrieben wurden, zeigten einen starken Einfluss von EpCAM auf Zellwachstum und -metabolismus. Um auszuschließen, dass dieser Einfluss nicht nur auf das HEK293-Zellsystem beschränkt oder klonal bedingt ist, wurde EpCAM stabil in murine NIH3T3-Fibroblasten transfiziert. NIH3T3-Zellen wurden analog zu den HEK293-Zellen mit einem EpCAM-Expressionsplasmid (NIH3T3-EpCAM) oder dem entsprechendem Leervektor (NIH3T3-ΔEpCAM) als Kontrolle stabil transfiziert. Die EpCAM-Expression wurde anschließend in den generierten NIH3T3 Linien mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (C215) und eines

HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers analysiert. Erwartungsgemäß zeigten NIH3T3-EpCAM Zellen eine starke EpCAM-Expression, wohingegen EpCAM in den NIH3T3- Δ EpCAM Zellen nicht nachweisbar war. Abbildung 4.6 zeigt einen repräsentativen Immunoblot.

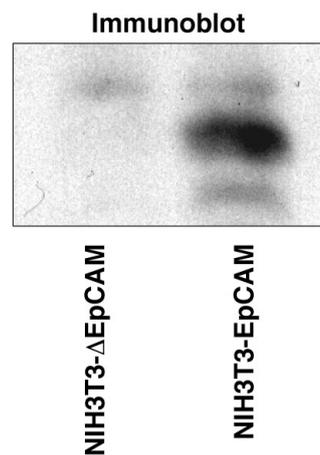


Abb. 4.6: EpCAM-Expression in NIH3T3-Transfektanten. NIH3T3-Zellen wurden stabil mit einem EpCAM-Expressionsplasmid (NIH3T3-EpCAM) oder dem korrespondierenden Leervektor (NIH3T3- Δ EpCAM) transfiziert. Gesamtzelllysate beider Zelllinien wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Immobilon-P Membran übertragen. Die Färbung für EpCAM erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (C215) in Kombination mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Eingesetzt wurden gleiche Gesamtproteinmengen, die mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden.

Die korrekte Lokalisation von EpCAM in NIH3T3-EpCAM Zellen wurde anschließend in der Durchflusszytometrie überprüft. NIH3T3-EpCAM Zellen zeigten eine deutliche EpCAM-Oberflächenexpression, während auf NIH3T3- Δ EpCAM Zellen EpCAM nicht nachweisbar war (Abb. 4.7).

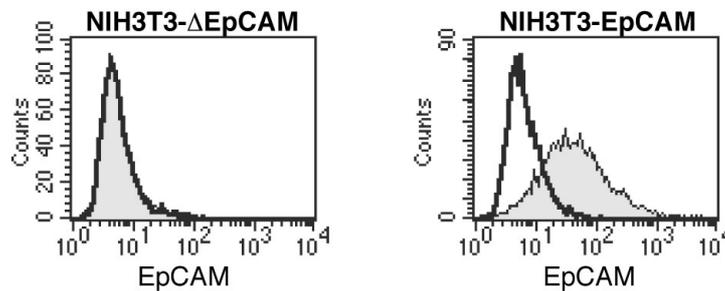


Abb. 4.7: EpCAM-Oberflächenexpression in stabil transfizierten murinen NIH3T3-Fibroblasten. Die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Graue, gefüllte Histogramme repräsentieren EpCAM, die offenen Histogramme die jeweilige FITC-Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives aus fünf Experimenten.

Die Voraussetzungen zur Analyse EpCAM-vermittelter Effekte in diesen zellulären System waren damit geschaffen. Die Auswirkungen der EpCAM-Expression in diesen murinen Fibroblasten werden im folgendem Kapitel beschrieben.

4.1.4 EpCAM induziert Wachstumsvorteile und einen erhöhten Metabolismus in NIH3T3-Fibroblasten

Der Einfluss von EpCAM in den generierten NIH3T3- Δ EpCAM und NIH3T3-EpCAM Zelllinien wurde im folgendem untersucht, um die allgemeine Gültigkeit der EpCAM-vermittelten Effekte, die in HEK293-Zellen beobachtet wurden (4.1.2), zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden gleiche Zellzahlen (2×10^4 Zellen/6-Loch Kulturplatte) von NIH3T3- Δ EpCAM bzw. NIH3T3-EpCAM Zellen in DMEM mit 10% FCS kultiviert und nach 4 Tagen die Zellzahl bestimmt (analog den HEK293-Transfektanten). NIH3T3-EpCAM Zellen wiesen eine 2 bis 3-fach erhöhte Zellzahl im Vergleich zu NIH3T3- Δ EpCAM auf (Abb. 4.8). Die Unterschiede zwischen beiden Zelllinien waren hoch signifikant, wie der gepaarte Student'sche T-Test beweist.

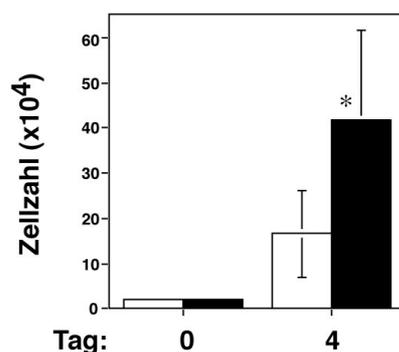


Abb. 4.8: EpCAM induziert ein schnelleres Zellwachstum in NIH3T3-Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzahlen am Tag 0 bzw. Tag 4 nach Kultivierung der Zellen in 10% FCS DMEM (weiße Balken = NIH3T3-ΔEpCAM; schwarze Balken = NIH3T3-EpCAM). Gepaarter Student'sche t-Test *= 0.026

Wie auch im Fall der HEK293-Transfektanten, sollte die erhöhte Proliferation von NIH3T3-EpCAM Zellen ebenfalls einhergehen mit einer erhöhten MTT-Konversion. Aus diesem Grund wurde die metabolische Aktivität von NIH3T3-ΔEpCAM und NIH3T3-EpCAM Zellen in MTT-Konversionsexperimenten bestimmt. Gleiche Zellzahlen (3×10^3 /Loch in 96-Loch Platten) beider Zelllinien wurden 4 Tage in 10% FCS DMEM kultiviert und jeweils am Tag 0, 1, 3 und 4 die metabolische Aktivität bestimmt. Analog zu den 293-EpCAM Zellen zeigten NIH3T3-EpCAM Zellen einen deutlichen Anstieg in der MTT-Konversion, im Vergleich zu NIH3T3-ΔEpCAM Zellen. In Abb. 4.9 sind die Mittelwerte der optischen Dichten mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

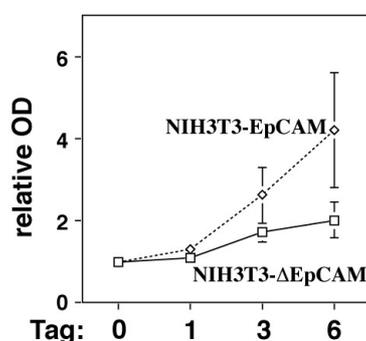


Abb. 4.9: EpCAM vermittelt einen erhöhten Zellmetabolismus in NIH3T3-Fibroblasten. Gezeigt sind die OD-Werte nach MTT-Konversion als Maß für die metabolische Aktivität von NIH3T3-ΔEpCAM und NIH3T3-EpCAM Fibroblasten unter Kultivierung mit 10% FCS DMEM. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen Experimenten gebildet.

Zusammengefasst stimmen somit die erhaltenen Daten der NIH3T3-Transfektanten in Bezug auf Zellmetabolismus und -proliferation mit denen der HEK293-Transfektanten überein. EpCAM-vermittelte in beiden Zelltypen und außerdem Spezies-unabhängig eine Erhöhung der Wachstumsrate und des Metabolismus. Eine interessante Frage war daher nun: Welche Auswirkungen hat eine Inhibierung der EpCAM-Expression in EpCAM positiven Karzinomzelllinien? Auf diese zentrale Frage wird in den folgenden Kapiteln experimentell eingegangen.

4.2 Inhibition der EpCAM-Expression in Karzinomzelllinien

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Expression von EpCAM, unabhängig von Zelltyp und Spezies, stets einen erhöhten Metabolismus und verstärktes Wachstum vermittelt. Inwieweit dieses auch in Karzinomzellen relevant ist, wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Dazu sollte die EpCAM-Expression in Karzinomzelllinien über eine komplementäre mRNA inhibiert und die daraus resultierenden Auswirkungen analysiert werden.

4.2.1 Generierung EpCAM negativer Karzinomzelllinien mittels komplementärer mRNA.

Die Inhibierung der EpCAM-Expression in EpCAM-positiven Karzinomzelllinien sollte mittels Antisense Technik erreicht werden. Bei dieser Technik wird ein Antisense-Konstrukt in die betreffenden Zellen transfiziert. Eine Hygromycin-Phosphotransferase, die von dem Antisense-Konstrukt ebenfalls kodiert wird, ermöglicht die Selektion transfizierter Zellen. Bei der Transkription der Antisense-kodierenden Region entsteht eine mRNA, die komplementär zur mRNA des zu inhibierenden Gens ist. Durch die Hybridisierung dieser beiden komplementären mRNAs wird somit die Translation gehemmt. Zudem induziert die doppelsträngige RNA den post-transkriptionellen „Gene silencing“ Prozess, der als RNA-Interferenz Mechanismus („RNAi-Pathway“) bezeichnet wird (Nykanen *et al.* 2001). Bei diesem

Prozess kommt es zur Degradation von doppelsträngiger RNA (Grishok *et al.* 2001). Alle in unserem Labor vorhandenen EpCAM-positiven Karzinomzelllinien (ANT-1, GHD-1, FaDu, PCI, SkBr3) wurden mit einem Antisense- bzw. Sense-Konstrukt transfiziert. Sowohl das Sense- als auch das Antisense-Konstrukt enthielt die gesamte, 1.4 kB umfassende, cDNA von EpCAM, jedoch in unterschiedlicher Orientierung. Die Sense (S) sowie Antisense (AS) transfizierten Zellen wurden daraufhin mit Hygromycin behandelt, um stabile Klone zu selektionieren. Die einzige Karzinomzelllinie in der es gelang, die Expression von EpCAM über die Antisense Technik zu inhibieren, war die ANT-1 Linie. In allen anderen Linien konnte keine stabile Inhibierung der EpCAM-Expression erreicht werden, obwohl die stabile Transfektion mit dem Sense-Konstrukt gelang.

Die Inhibierung der EpCAM-Expression wurde jeweils im Immunoblot und FACS analysiert. In Abb. 4.10 sind Immunoblot und FACS Histogramme der ANT-1-AS und ANT-1-S Zellen dargestellt. Sowohl der Immunoblot als auch die FACS Analyse zeigten die Inhibierung der EpCAM-Expression in ANT-1-AS Zellen.

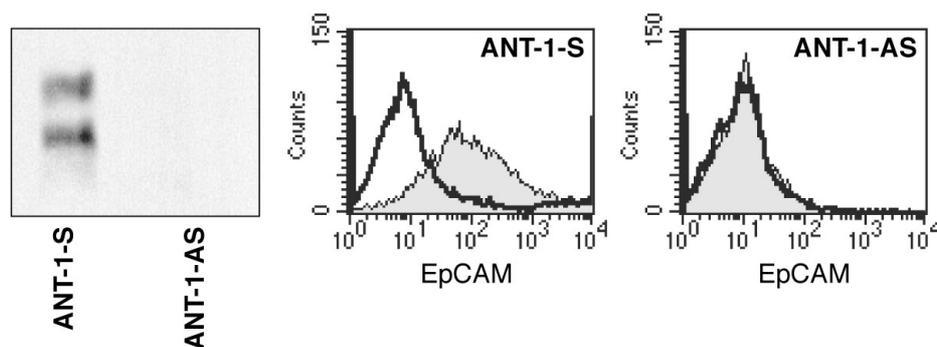


Abb. 4.10: EpCAM Inhibierung in ANT-1 Karzinomzellen. Immunoblot und FACS Analyse der EpCAM-Expression in ANT-1-S und ANT-1-AS Zellen. Im Immunoblot sind die unterschiedlichen Glykosilierungen von EpCAM zu sehen. Graue, gefüllte Histogramme repräsentieren EpCAM, die offenen Histogramme die jeweilige FITC-Kontrolle

Mit den ANT-1-AS und ANT-1-S Zellen war es nun möglich, die Effekte einer Inhibierung der EpCAM-Expression in Karzinomzellen zu untersuchen.

4.2.2 Die Inhibierung von EpCAM in ANT-1 Karzinomzellen hat einen starken Einfluss auf Wachstum, Metabolismus und Morphologie

Analog zu HEK293 und NIH3T3-Transfektanten (Kapitel 4.1) sollte nun der Einfluss der Inhibierung der EpCAM-Expression in ANT-1 Zellen auf Zellmorphologie, -wachstum und -metabolismus analysiert werden. Bei der routinemäßigen Kultivierung der ANT-1-Transfektanten in 10% FCS DMEM war zu beobachten, dass die ANT-1-AS Zellen im Vergleich zu ANT-1-S Zellen morphologisch verändert waren. Um dies zu dokumentieren wurden gleiche Zellzahlen ($3 \times 10^6 / 175 \text{ cm}^2$ Kulturflasche) beider ANT-1-Transfektanten in 1% FCS und 10% FCS DMEM kultiviert. Nach vier Tagen in Kultur wurden dann die ANT-1-AS und ANT-1-S Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. ANT-1-AS Zellen zeigten in Medium mit 1% bzw. 10% FCS starke morphologische Veränderungen. Sie waren im Vergleich zu den ANT-1-S Zellen rundlicher und teilweise, vor allem unter 1% FCS Zusatz, von der Kulturplatte abgeschwommen. Im Gegensatz hatten ANT-1-S Zellen eine Morphologie, die den parentalen Zellen glich. Abbildung 4.11 zeigt Bildausschnitte der Zellen unter den jeweiligen FCS-Konzentrationen am vierten Tag der Kultivierung.

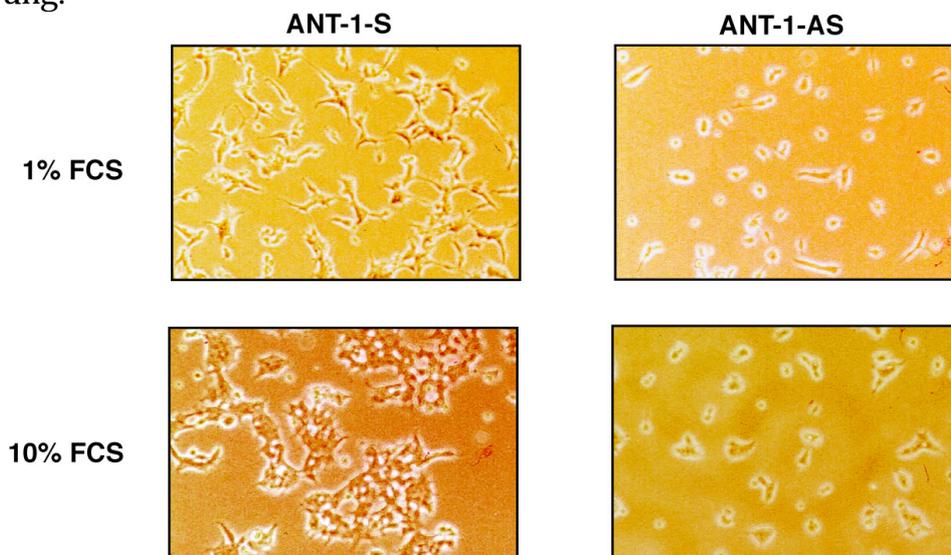


Abb. 4.11: Morphologie von ANT-1-S und ANT-1-AS Karzinomzellen. Gleiche Zellzahlen ($3 \times 10^6 / 175 \text{ cm}^2$ Kulturflasche) von ANT-1-S und ANT-1-AS Zellen wurden mit 1% bzw. 10% FCS DMEM vier Tage kultiviert. Gezeigt sind vergrößerte Bildausschnitte beider Zelllinien am Tag vier (100xVergrößerung).

Aufgrund der starken Veränderungen der Morphologie von ANT-1-AS Zellen war zu erwarten, dass sie sich auch in ihrem Wachstum von ANT-1-S Zellen unterscheiden. Daher wurden beide Zelllinien zu gleichen Zellzahlen ($3 \times 10^6 / 175 \text{ cm}^2$ Kulturflasche) in 1% und 10% FCS DMEM kultiviert und die Zahl vitaler Zellen am Tag 4 mittels Trypanblauausschluss bestimmt. In Abb. 4.12 sind die ermittelten Zellzahlen mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt. Die ANT-1-AS Zellen zeigten unter beiden Kulturbedingungen eine stark verminderte Zellzahl im Vergleich zu den ANT-1-S Zellen (2-3 fach).

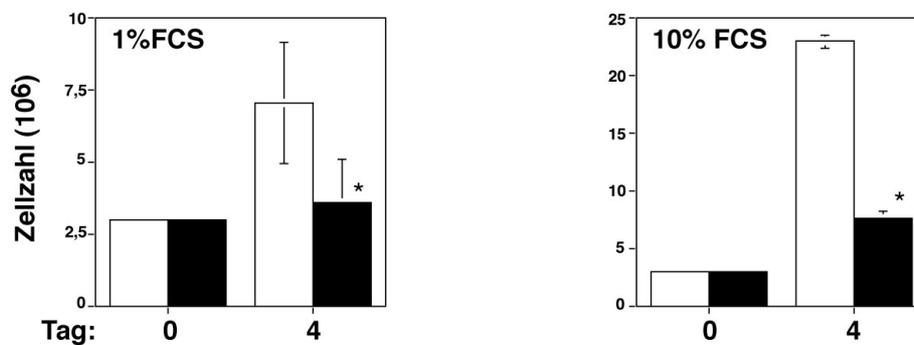


Abb. 4.12: Die EpCAM Inhibierung resultiert in einem reduzierten Zellwachstum. Dargestellt sind die ermittelten Zellzahlen am Tag 4 nach Kultivierung der Zellen in 1% FCS bzw. 10% FCS DMEM aus vier unabhängigen Experimenten. Die weißen Balken repräsentieren ANT-1-S Zellen, schwarze Balken ANT-1-AS Zellen. * Gepaarter Student'sche t-Test 1%FCS $p=0.023$; 10% FCS $p=0.018$.

Das stark verminderte Zellwachstum von ANT-1-AS Zellen sollte zudem mit einem reduzierten Metabolismus dieser Zellen einhergehen. Um dies zu überprüfen, wurde die MTT-Konversion von ANT-1-Transfektanten bestimmt. Zu diesem Zweck wurden ANT-1 Transfektanten zu gleichen Zellzahlen ($3 \times 10^3 / \text{Loch}$ in 96-Loch Platten) für 4 Tage in 1% FCS DMEM bzw. 10% FCS DMEM kultiviert und jeweils an Tag 0, 1, 3 und 4 die MTT-Konversion bestimmt. Um mögliche Schwankungen, die aus geringen Unterschieden beim Ausplattieren der Zellen entstehen können zu vermeiden, wurde die MTT-Konversion an Tag 0 gemessen und als Referenz verwendet. Dabei erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem MTT-Substrat,

nachdem die Zellen wieder adhären waren. In Abb. 4.13 sind die aus vier unabhängigen Experimenten ermittelten Mittelwerte der optischen Dichten mit Standardabweichung in Abhängigkeit der Kulturdauer dargestellt. Unabhängig von der Menge an Wachstumsfaktoren, zeigten die ANT-1-AS Zellen einen signifikant reduzierten Metabolismus im Vergleich zu den ANT-1-S Zellen. Zudem war bei den ANT-1-AS Zellen unter beiden Kulturbedingungen etwa ab dem dritten Tag eine Stagnation der MTT-Konversion zu erkennen.

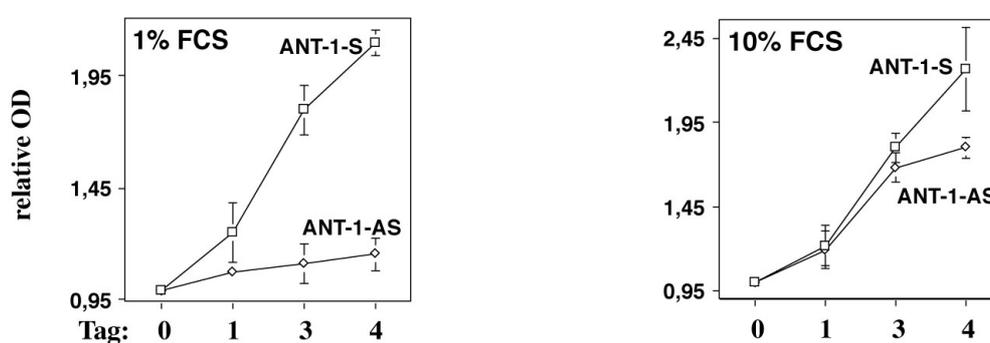


Abb. 4.13: Die EpCAM Inhibierung resultiert in einem verminderten Zellmetabolismus. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen MTT-Experimenten mit ANT-1-S und ANT-1-AS Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten.

Zur Aufklärung der Frage, ob das verminderte Zellwachstum der ANT-1-AS Zellen auf eine reduzierte Proliferation zurückzuführen ist, wurden beide ANT-1-Transfektanten (gleiche Zellzahl) mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMFDA inkubiert und die auf Zellteilung beruhende Abnahme der CMFDA-Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die FACS Analyse erfolgte über zwei Tage: Am ersten Tag erfolgte die Messung direkt nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Am zweiten Tag wurde dann die Abnahme der CMFDA-Fluoreszenz gemessen. Damit ließ sich, anhand der gemessenen CMFDA-Fluoreszenz der Zellen, eine Aussage über ihr Proliferationsverhalten treffen. ANT-1-S Zellen zeigten im Vergleich zu den ANT-1-AS Zellen eine deutlich verminderte Fluoreszenz. Dies bedeutet, dass die ANT-1-AS Zellen im Vergleich zu den ANT-1-S

Zellen wesentlich langsamer proliferierten. In Abb. 4.14 sind die erhaltenen FACS Histogramme dargestellt.

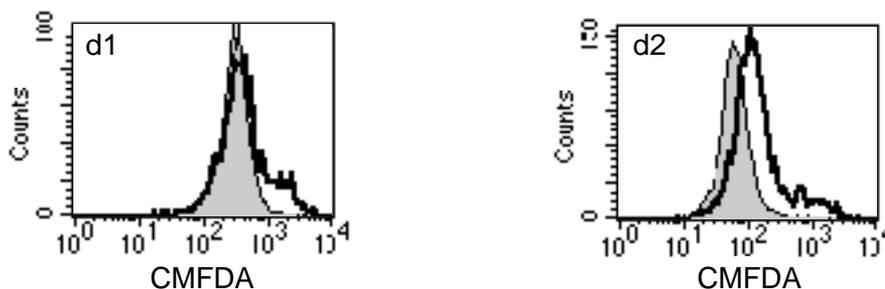


Abb. 4.14: Die EpCAM Inhibierung resultiert in einer verminderten Proliferation von ANT-1 Zellen. Gezeigt ist die CMFDA Fluoreszenz von ANT-1-S (geschlossene Kurve) und -AS Zellen (offene Kurve) am Tag 1 (CMFDA Zugabe) und Tag 2 ermittelt mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Inhibierung der EpCAM-Expression in der Karzinomzelllinie ANT-1 starke Auswirkungen auf den Metabolismus, die Morphologie und auch auf die Proliferation dieser Zellen hatte. Die Ergebnisse bestätigen nicht nur die mit HEK293 und NIH3T3-Transfektanten (Kapitel 4.1) erhaltenen Daten, sondern zeigen auch die essentielle Rolle von EpCAM für das Wachstum von Karzinomzellen. Um dies zusätzlich mit Zahlen zu verdeutlichen, wurden die Zellverdopplungszeiten der HEK293, NIH3T3 und ANT-1 Tranfektanten berechnet (siehe Material und Methoden). Aus der Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass eine Expression von EpCAM in humanen epithelialen HEK293-Zellen und NIH3T3-Zellen, aber insbesondere in ANT-1 Karzinomzellen eine erhöhte Proliferationsrate induziert.

	DMEM 1% FCS (Tage)	DMEM 10% FCS (Tage)
293-ΔEpCAM	2.63	0.96
293-EpCAM	1.4	1.0
ANT-1-S	3.2	1.36
ANT-1-AS	15	2.9
NIH3T3- ΔEpCAM	n.d	1.31
NIH3T3- EpCAM	n.d	0.91

Tabelle 1: Berechnete Teilungsraten von 293-ΔEpCAM, 293EpCAM, ANT-1-S, ANT-1-AS , NIH3T3-ΔEpCAM und NIH3T3-EpCAM Zellen (n.d. = nicht durchgeführt).

4.3 Identifikation EpCAM-regulierter Gene mittels nukleärer Run-On Experimente

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Expression von EpCAM in humanen Epithelzellen und in murinen Fibroblasten einen erhöhten Metabolismus und ein verstärktes Wachstum dieser Zellen bewirkt. Folglich resultierte die Inhibierung der EpCAM-Expression in ANT-1 Karzinomzellen in einem stark verminderten Wachstum und Metabolismus dieser Zellen. Daher erschien die Untersuchung der molekularen Grundlage für die beobachteten Effekte äußerst interessant. Die Identifizierung EpCAM-regulierter Gene sollte dazu beitragen die beobachteten Effekte der EpCAM-Expression auf molekularer Ebene besser zu verstehen und möglicherweise weitere Auswirkungen von EpCAM aufzudecken.

Zur Identifikation EpCAM regulierter Gene wurde der nukleäre Run-On Ansatz gewählt, bei dem *in vitro* transkribierte mRNAs von 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen miteinander verglichen wurden. Zu diesem Zweck wurden Kerne von 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen isoliert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um sie in ihrem jeweiligen Zustand zu fixieren. Nach anschließendem Auftauen wurde eine *in vitro* Transkription unter Zugabe von radioaktiven [α - 32 P]CTP mit den Zellkernen durchgeführt. Die neu synthetisierte, radioaktiv-markierte mRNA wurde im Anschluss, nach zweimaliger Behandlung mit DNase und Proteinase K, mit Clontech Atlas Arrays Human Cancer 1.2 hybridisiert. Auf diesen Filtern sind cDNA Fragmente von 1176 bekannten Genen in einem zwei-dimensionalen Koordinatensystem aufgetragen. Die in 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen differentiell exprimierten Gene wurden anhand der unterschiedlichen Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilms identifiziert. Mit Hilfe der beschriebenen Technik konnten in zwei unabhängigen Experimenten reproduzierbar EpCAM-reprimierte und -induzierte Gene identifiziert werden. Diese Gene und ihre Funktion sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: EpCAM-regulierte Gene (Run-On Experimente)

Array Position	Accession Nummer	Genbeschreibung	Funktion	Regulation
A3c	L00058	c-myc	Zellwachstum, Proliferation	induziert
A10k	X54941	CDC28 Protein Kinase 1	Zellzyklus-Kontrolle	induziert
B11i	X06820	Rho B	Gentranskription, Adhäsion, Regulation des Actin Zytoskeletts und Zellzyklus	induziert
B5l	D45887	Calmodulin 1	Zellzyklus-Kontrolle, Zellwachstum, Proliferation, intrazellulärer Ca^{2+} - Rezeptor, involviert in pre-mRNA splicing	induziert
C4f	M87339	Replikations Faktor 1 RFC 37	Nucleotid-/DNA Synthese	induziert
E11l	M34671	CD59 Rezeptor	Schutz vor Komplement-vermittelter Lyse	induziert
B3m	AF029082	14-3-3 sigma	Zellwachstumsinhibition	reprimiert
B7m	X94991	Zyxin	Zelldifferenzierung	reprimiert
C10i	X90392	DNase X	DNA Verdau, Apoptose	reprimiert
C12j	M62829	EGR 1	Transformations suppression, Wachstumsregulation, Zelldifferenzierung	reprimiert
D13b	M24795	CD 36	Zelladhäsion	reprimiert

Interessanterweise wurde mittels nukleärer Run-On Experimente eines der prominentesten proto-Onkogene als EpCAM-reguliertes Gen identifiziert: der Transkriptionsfaktor *c-myc*. Dieses Protein besitzt eine zentrale Rolle in der Wachstumsregulation und Zellproliferation und ist in einer Vielzahl humaner Tumoren überexprimiert (Dang 1999). Die Induktion von *c-myc* durch EpCAM könnte daher zu dem Wachstumsvorteil EpCAM-exprimierender Tumorzellen beitragen. Aus diesem Grund wurde die Arbeit zunächst auf dieses Genprodukt fokussiert.

4.3.1 EpCAM induziert das Onkogen *c-myc*

Mit Hilfe der in Kapitel 4.3 beschriebenen Technik wurde das Onkogen *c-myc* als EpCAM-induziertes Gen identifiziert. In Abbildung 4.15 sind exemplarisch Clontech Atlas Human Cancer 1.2 Array Filter dargestellt, welche jeweils mit neu transkribierten mRNAs von 293- Δ EpCAM bzw. 293-EpCAM Zellen hybridisiert wurden. Die hybridisierten und radioaktiv-markierten mRNAs wurden anschließend mit Hilfe eines Röntgenfilmes visualisiert. Die Pfeile in Abb. 4.15 weisen auf die Position von *c-myc* auf den Clontech Filtern. Die am unteren Filterrand, außerhalb des Koordinatensystems, aufgetragene cDNA repräsentiert Sequenzen, welche als interne Beladungskontrolle der Membranen dienen.

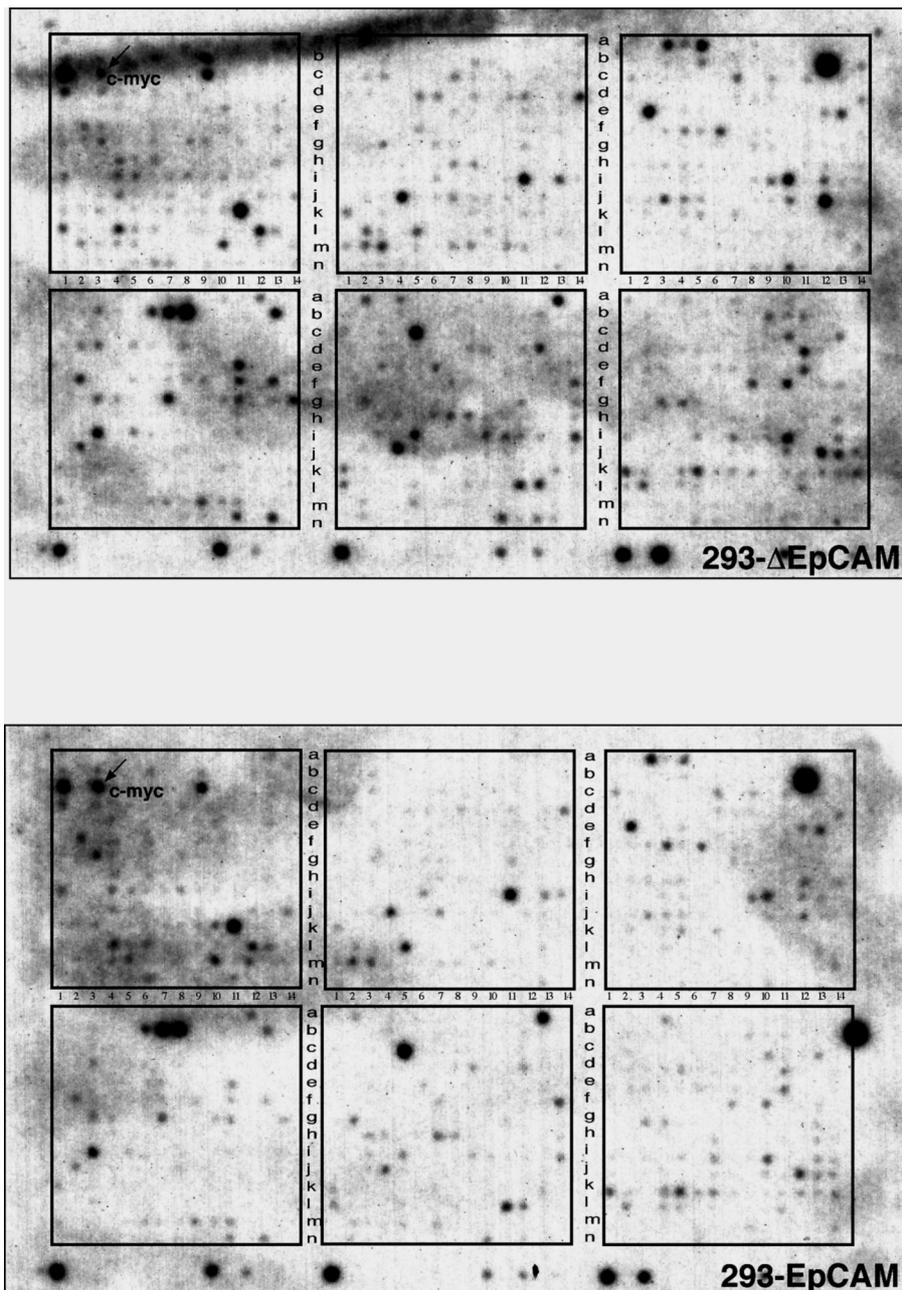


Abb. 4.15: Clontech Atlas Arrays: c-myc Induktion in 293-EpCAM Zellen. Human Cancer Atlas 1.2 Filter wurden mit [α - 32 P]CTP-markierter in vitro synthetisierter mRNA der Zelllinien 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM hybridisiert. Die Pfeile weisen auf die Position des c-myc Gens, welches in 293-EpCAM Zellen hochreguliert ist.

4.3.2 Erhöhte c-Myc Expression nach konstitutiver EpCAM-Expression in HEK293-Zellen

Die in Run-On Experimenten beobachtete Erhöhung der c-myc Expression in 293-EpCAM Zellen wurde in Northernblot Experimenten überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA aus beiden Zelllinien isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt

und auf Nylonmembranen übertragen. Eine c-myc-spezifische cDNA Sonde, bestehend aus Exon zwei und drei des Gens, wurde mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markiert und mit der Gesamt-RNA hybridisiert. Die c-myc mRNA Menge in 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen wurde anschließend mit Hilfe eines Röntgenfilmes visualisiert. In Abbildung 4.16 ist exemplarisch ein c-myc Northern-Blot dargestellt.

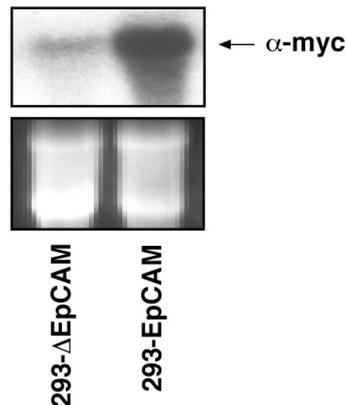


Abb. 4.16: Erhöhte c-myc Transkription in 293-EpCAM Zellen. Gezeigt ist ein Northern-Blot Experiment mit 10 μ g Gesamt-RNA aus 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen, hybridisiert mit einer [α - 32 P]dCTP-markierten, c-myc spezifischen Sonde. Die Ethidiumbromid Färbung des Gels zeigt die Auftragung gleicher Mengen an Gesamt-RNA.

Aus Abbildung 4.16 ist ersichtlich, dass die 293-EpCAM Zelllinie im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 293- Δ EpCAM einen stark erhöhten c-myc mRNA Gehalt aufwies. Die Ethidium-Bromid Färbung des Gels zeigte vergleichbare Mengen an mRNA in beiden Gelspuren. Dieses Northern-Blot Experiment bestätigt somit die Erhöhung der c-myc Expression in 293-EpCAM Zellen, welche auch in den Run-On Experimenten beobachtet wurde.

Mit beiden stabilen HEK293-Transfektanten wurden anschließend Immunoblot Versuche mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper durchgeführt. Dazu wurden Gesamtzelllysate in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Immobilon-P Membran transferiert. Abbildung 4.17 zeigt einen repräsentativen Immunoblot gegen c-Myc mit Gesamtzellextrakten aus 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen.

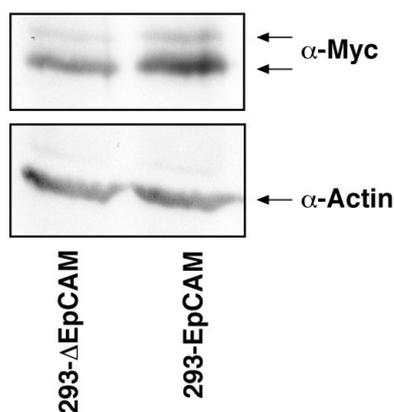


Abb. 4.17: Erhöhter c-Myc Proteingehalt in 293-EpCAM Zellen. Gezeigt ist ein Immunoblot gegen c-Myc mit Gesamtzellysaten aus 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen. Dabei wurde der c-Myc-spezifische Antikörper 9E10 (Santa Cruz) und ein HRP gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (oben). Die Pfeile deuten auf die 64 und 67kDa Formen von c-Myc. Das gleichmäßige Beladen des Gels wurde mit Hilfe eines Actin-spezifischen Immunoblots überprüft (unten).

Die 293-EpCAM Zellen zeigten, in Übereinstimmung mit dem erhöhten c-myc mRNA Gehalt (Abb. 4.16), auch eine erhöhte c-Myc Proteinmenge. Beide Proteinprodukte, sowohl die 64 kDa als auch die 67 kDa Form von c-Myc waren erhöht im Vergleich zu den 293- Δ EpCAM Zellen. Dieser Unterschied in der c-Myc Expression resultierte nicht aus dem Auftrennen ungleicher Proteinmengen, wie die Färbung mit einem Actin-spezifischen Antikörper bestätigte.

4.3.3 Etablierung eines zellulären System zur konditionalen Expression von EpCAM in HEK293-Zellen

Zur Analyse schneller Effekte und einer möglichen direkten Induktion von c-myc durch EpCAM wurde ergänzend zur beschriebenen konstitutiven Expression (siehe 4.1.1) ein zelluläres System zur konditionalen Expression dieses Moleküls erarbeitet. Zu diesem Zweck wurde die EpCAM cDNA unter die transkriptionelle Kontrolle des Methallothionin-Promotors gestellt (pMEP-EpCAM Vektor). Der Promotor des Methallothioneingens kann durch Zugabe von Schwermetallionen, wie Cadmium-

oder Zinkionen, induziert und somit die gezielte Expression des nachgeschalteten Gens in stabil transfizierten Zellen (293-pMEP-EpCAM) erreicht werden. Als Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz der adequate Leervektor stabil in HEK293-Zellen transfiziert (293-pMEP-Kontroll).

In Vorversuchen wurde zunächst das geeignete Schwermetall und dessen optimale Konzentration ermittelt, um eine Induktion von EpCAM in 293-pMEP-EpCAM zu erreichen. Hierbei erwiesen sich Cadmiumionen in einer Konzentration von 10 μM als geeignet. Anschließend wurde die Induktion der EpCAM-Expression nach Zugabe von 10 μM CdCl_2 in 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll Zellen im Immunoblot überprüft (Abb. 4.18). Dabei konnte eine starke Induktion der EpCAM-Expression in den 293-pMEP-EpCAM Zellen durch CdCl_2 beobachtet werden. Die gebildete Menge an EpCAM-Protein war vergleichbar mit der Hypopharynx Karzinomlinie FaDu (siehe auch Abb. 4.1). Die Behandlung der 293-pMEP-Kontrollzelllinie mit CdCl_2 verursachte keine Expression von EpCAM (Abb. 4.18). Das Vorhandensein des jeweiligen Plasmides in den stabilen Transfektanten wurde mit Hilfe eines Immunoblotes gegen das Epstein-Barr Virus (EBV) nukleäre Antigen 1 (EBNA-1), welches ebenfalls von den Vektoren kodiert wird, überprüft. Wie aus Abb. 4.18 ersichtlich, sind beide Zelllinien, 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll stabil mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. Die Expression von EBNA-1 blieb nach Inkubation des Zellen mit CdCl_2 unbeeinflusst. Als interne Kontrolle zeigte die EBNA-1 Färbung ebenfalls die Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen im Immunoblot.

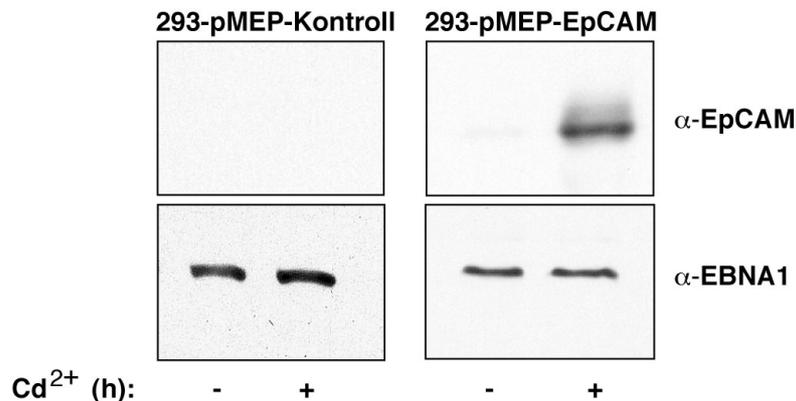


Abb. 4.18: Konditionale Expression von EpCAM in HEK293-Zellen. Dargestellt ist ein Immunoblot gegen EpCAM aus Gesamtzelllysaten von 293-pMEP-EpCAM bzw. 293-pMEP-Kontroll Zellen (oberer Teil). Eine Immunfärbung gegen EBNA-1, welches ebenfalls durch die Expressionsvektoren kodiert wird, zeigte die stabile Transfektion beider Zelllinien und eine gleichmäßige Proteinauftragung (unterer Teil).

4.3.4 Schnelle Induktion von c-Myc durch EpCAM in HEK293-Zellen

Wie in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 gezeigt wurde, kam es zu einer Erhöhung der c-myc Expression in den EpCAM positiven HEK293-Transfektanten (293-EpCAM), sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene. Mit Hilfe des in Kapitel 4.3.3 vorgestellten konditionalen EpCAM-Expressionssystems gelang es, c-myc als direktes Zielgen von EpCAM zu identifizieren und gleichzeitig die Möglichkeit auszuschließen, dass die beobachtete Überexpression in 293-EpCAM Zellen durch eine klonale Selektion bedingt war. Zu diesem Zweck wurde die Induktion von c-Myc nach EpCAM Induktion in einer Zeitreihe bestimmt. Abbildung 4.19 zeigt den zeitlichen Verlauf der c-Myc und EpCAM-Expression nach der Zugabe von CdCl_2 in das Kulturmedium von 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM Zellen.

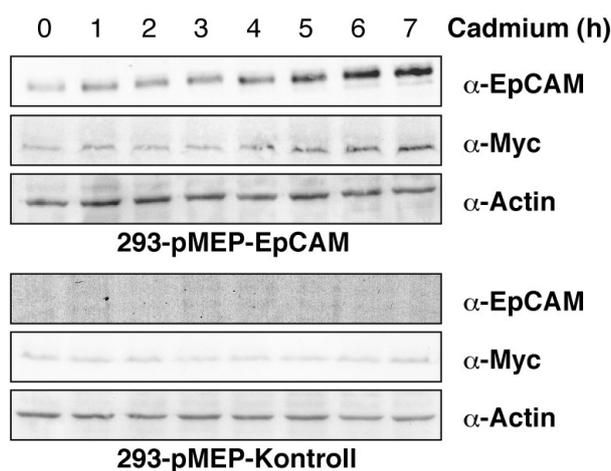


Abb. 4.19: EpCAM vermittelt eine schnelle Induktion von c-Myc. 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll Zellen (3×10^6) wurden für die angegebenen Zeiträume (0-7h) mit $10 \mu\text{M CdCl}_2$ inkubiert und anschließend lysiert (siehe Material und Methoden). Gleiche Proteinmengen ($50 \mu\text{g}$) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen übertragen. Anschließend wurde EpCAM und c-Myc mit spezifischen Antikörpern (C215; 9E10) und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper im Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen, wurde neben der Proteinquantifizierung über BCA ein Immunoblot gegen Actin durchgeführt.

Wie in Abb. 4.19 gezeigt, war in den 293-pMEP-EpCAM Zellen eine Stunde nach Inkubation mit CdCl_2 eine Erhöhung der Expression von EpCAM nachweisbar, welche stetig zunahm. Die Induktion des c-Myc-Proteins in den 293-pMEP-EpCAM Zellen folgte dem zeitlichen Verlauf der EpCAM Induktion mit einer Verzögerung und erreichte nach 7h ein um das 2.6-fache erhöhte c-Myc Expressionsniveau. Die im Immunoblot sichtbare, schwache Expression von EpCAM ohne Zugabe von CdCl_2 resultierte aus der Grundaktivität des Metallothionin Promotors. In den 293-pMEP-Kontroll Zellen war erwartungsgemäß auch unter CdCl_2 keine Expression von EpCAM nachweisbar. Die Expression von c-Myc war ebenfalls unbeeinflusst in 293-pMEP-Kontroll Zellen nach CdCl_2 -Behandlung. Die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde zusätzlich zur kolorimetrischen Proteinquantifizierung über BCA, mittels Immunoblot gegen Actin bestätigt. Mit Hilfe der NIH-Image Software wurde die Bandenintensität von EpCAM und c-Myc mit eingescannten Immunoblots berechnet. Die erhaltenen Werte wurden auf die jeweilige Actin-Kontrolle normiert

und als n-fache Induktion, bezogen auf den Anfangszeitpunkt (0 h), dargestellt (Abb. 4.20).

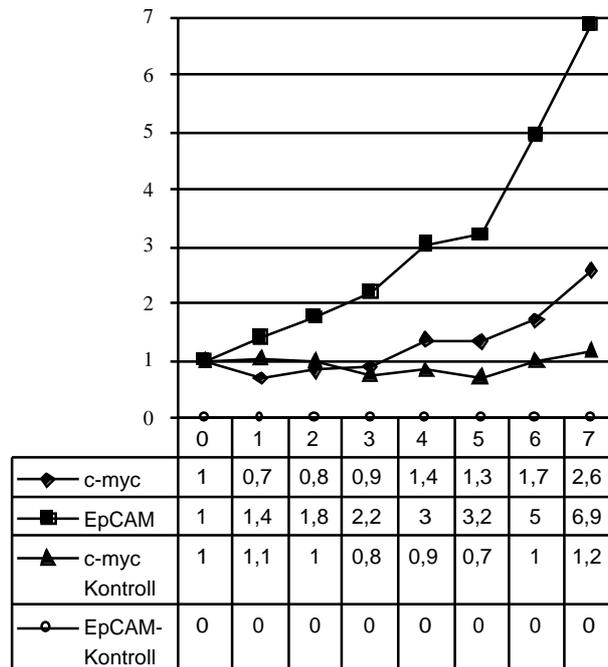


Abb. 4.20: n-fache Induktion von c-Myc und EpCAM in 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM Zellen. Gezeigt ist die berechnete n-fache Induktion von c-Myc und EpCAM in den beiden Zelllinien 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM in Abhängigkeit von der Zeit. Die jeweiligen n-fachen Induktionen wurden aus densitometrischen Auswertungen der Immunoblot Bandenintensitäten mittels NIH-Image Software berechnet.

Aus Abbildung 4.19 und 4.20 geht hervor, dass EpCAM die erhöhte Expression von c-Myc schnell induziert. Die zeitliche Verschiebung, die aus der Kinetik ersichtlich ist, läßt vermuten, dass die Induktion von c-Myc direkt und ohne zusätzliche Proteinsynthese erfolgt. Aufgrund der Induktion von c-Myc und der Tatsache, dass c-Myc in der Regulation des Zellzyklus involviert ist, wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss der EpCAM-Expression auf den Zellzyklus von HEK293-Transfektanten untersucht.

4.3.5 Induktion von Cyclin A und E nach EpCAM-Expression in HEK293-Zellen

Es ist bekannt, dass c-Myc eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, auf Grund der Fähigkeit, Cycline und weitere Zellzyklusregulatoren, wie die

Phosphatase *cdc25* zu beeinflussen (Schuhmacher *et al.* 2001). Cyclin A und E sind beschriebene Zielgene, die durch *c-Myc* induziert werden (Jansen-Durr *et al.* 1993). Um den Einfluss der EpCAM-vermittelten *c-Myc* Induktion auf die Expression der Cycline A und E zu untersuchen, wurde die Expression beider Proteine in Immunoblots analysiert. Zu diesem Zweck wurde die Expression von EpCAM durch CdCl_2 Zugabe in 293-pMEP-EpCAM Zellen induziert und die Expression von Cyclin A und E in Abhängigkeit der Zeit mit spezifischen Antikörpern bestimmt. Als Kontrolle wurden die 293-pMEP-Kontroll Zellen ebenfalls mit CdCl_2 behandelt und die Expressionsniveaus von Cyclin A und Cyclin E detektiert. In Abb. 4.21 sind repräsentative Immunoblots gegen Cyclin A und Cyclin E dargestellt.

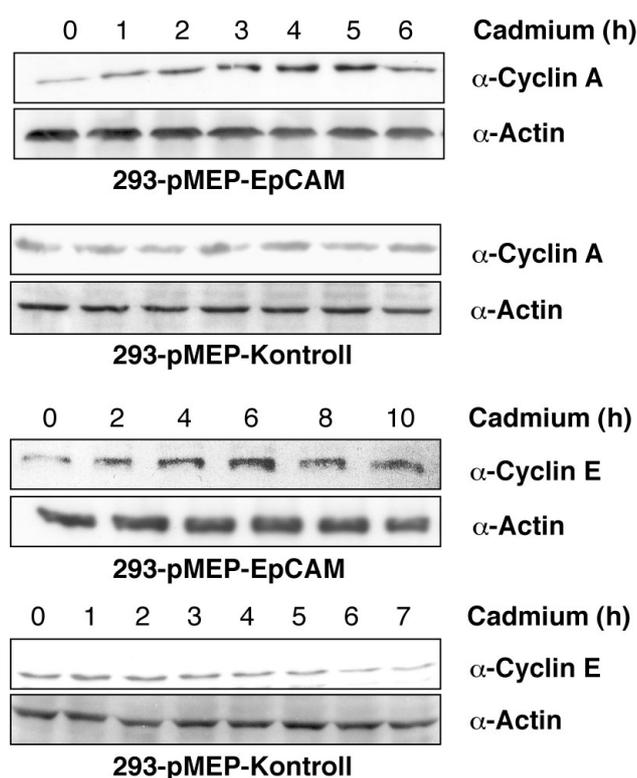


Abb. 4.21: EpCAM induziert Cyclin A und Cyclin E. 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll Zellen (3×10^6) wurden für die angegebenen Zeiträume mit $10 \mu\text{M}$ CdCl_2 inkubiert und anschließend lysiert (siehe Material und Methoden). Gleiche Proteinmengen ($50 \mu\text{g}$) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen übertragen. Anschließend wurde Cyclin A und Cyclin E mit spezifischen Antikörpern (Santa Cruz) und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung wurde neben der Proteinquantifizierung über BCA ein Immunoblot gegen Actin durchgeführt.

Die Neusynthese von EpCAM in 293-pMEP-EpCAM Zellen nach Zugabe von CdCl_2 führte stets zur Erhöhung der Cyclin A und E Proteinmenge mit einer Verzögerung gegenüber EpCAM von ca. 1h. Um auszuschließen, dass die beobachtete Induktion der Cycline A und E durch EpCAM aus der Auftragung unterschiedlicher Proteinmengen resultierte, wurde zusätzlich zur BCA-Proteinbestimmung ein Immunoblot gegen das Zytoskelettprotein Actin durchgeführt. Die gleiche Intensität der einzelnen Actin Banden bestätigte eine gleichmäßige Beladung der SDS-Polyacrylamidgele.

Die EpCAM-vermittelte Induktion von c-Myc, Cyclin A und E ist daher möglicherweise zum großen Teil für das erhöhte Wachstum, die Morphologie und den verstärkten Metabolismus EpCAM-exprimierender Zellen verantwortlich.

Zur weiteren Identifizierung EpCAM regulierter Gene, vor allem aber, um EpCAM-induzierte posttranslationale Modifikationen von Proteinen zu detektieren, wurde die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) etabliert. Die Etablierung und die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.4 Identifikation EpCAM-regulierter Proteine mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) und Matrix unterstützter Laser Desorption Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-ToF)

Im vorangegangenen Kapitel 4.3 wurden EpCAM-regulierte Gene mittels Run-On Experimenten untersucht. Dabei bediente man sich der differentiellen Transkription von mRNA EpCAM-positiver bzw. -negativer HEK293-Zellen. Die anschließende Hybridisierung dieser mRNA's mit Membranen, welche über 1100 bekannte Gene enthielten, führte dann zu der Identifizierung der in Tab. 2 beschriebenen EpCAM regulierten Gene. Der Vorteil dieser Methode liegt insbesondere darin, dass Gene, welche nur in sehr geringen Kopienzahlen in der Zelle transkribiert werden, detektiert werden können. Zudem läßt sich mit dieser Methode relativ schnell eine große Anzahl von interessanten Genen untersuchen. Ein Nachteil ist jedoch, dass

man, bedingt durch die Methode, nur bekannte Gene analysieren kann. Proteine sind aber als Endprodukte der Genexpression die ausführenden „Werkzeuge“ in einer Zelle. Daher ist es entscheidend Unterschiede nicht nur auf der mRNA Ebene zu detektieren, sondern auch auf der Proteinebene zu studieren. Diesbezüglich bietet die zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) wesentliche Vorteile: Bei dieser Methode werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt, um sie dann in einer anschließenden zweiten Dimension, in einem SDS-Polyacrylamidgel, bezüglich ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Gekoppelt mit einer darauf folgenden Proteinfärbung (Coomassie- oder Silberfärbung) kann damit ein Teil des Proteoms der Zelle visualisiert werden. Proteine von Interesse lassen sich direkt aus dem Gel ausschneiden und in der Massenspektrometrie (z.B. MALDI-ToF) identifizieren. Eine weitere Stärke der 2D-PAGE liegt in der Möglichkeit, posttranslationale Modifikationen von Proteinen zu detektieren. Daher sollte in unserem Labor die Methode der 2D-PAGE etabliert werden, um weitere EpCAM-regulierte Gene bzw. Proteine und auch posttranslationale Modifikationen zu identifizieren. Zudem erlaubt die Kombination aus beiden Methoden, der mRNA Expressionsprofilanalyse und Proteomanalyse, einen umfassenden Einblick in die Genregulation.

4.4.1 Etablierung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese mit den HEK293- und Karzinomzelllinien

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit die isoelektrische Fokussierung der Proteine innerhalb verschiedener pH-Gradienten durchzuführen. Sinnvoll ist es, zunächst einen möglichst großen pH-Gradienten zu wählen, um auch den Bereich der sauren und basischen Proteine ausreichend abzudecken. Als erstes wurden daher die Probenaufbereitung und die Parameter der isoelektrischen Fokussierung für die pH 3-10 und pH 4-7 Gradienten anhand von HEK293-Transfektanten und ANT-1 Zellen optimiert. Dazu wurden verschiedene Lysispuffer mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Harnstoff bzw. Thioharnstoff getestet (9-9.8M). Für die isoelektrische Fokussierung wurden unterschiedliche Fokussierungszeiten und -parameter gewählt und deren Einfluss auf die Auftrennung untersucht. Das optimierte Standardprotokoll ist ausführlich im Methodenteil beschrieben. Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch ein Silber-gefärbtes 2D-Gel eines ANT-1 Proteinlysats nach Standardprotokoll.

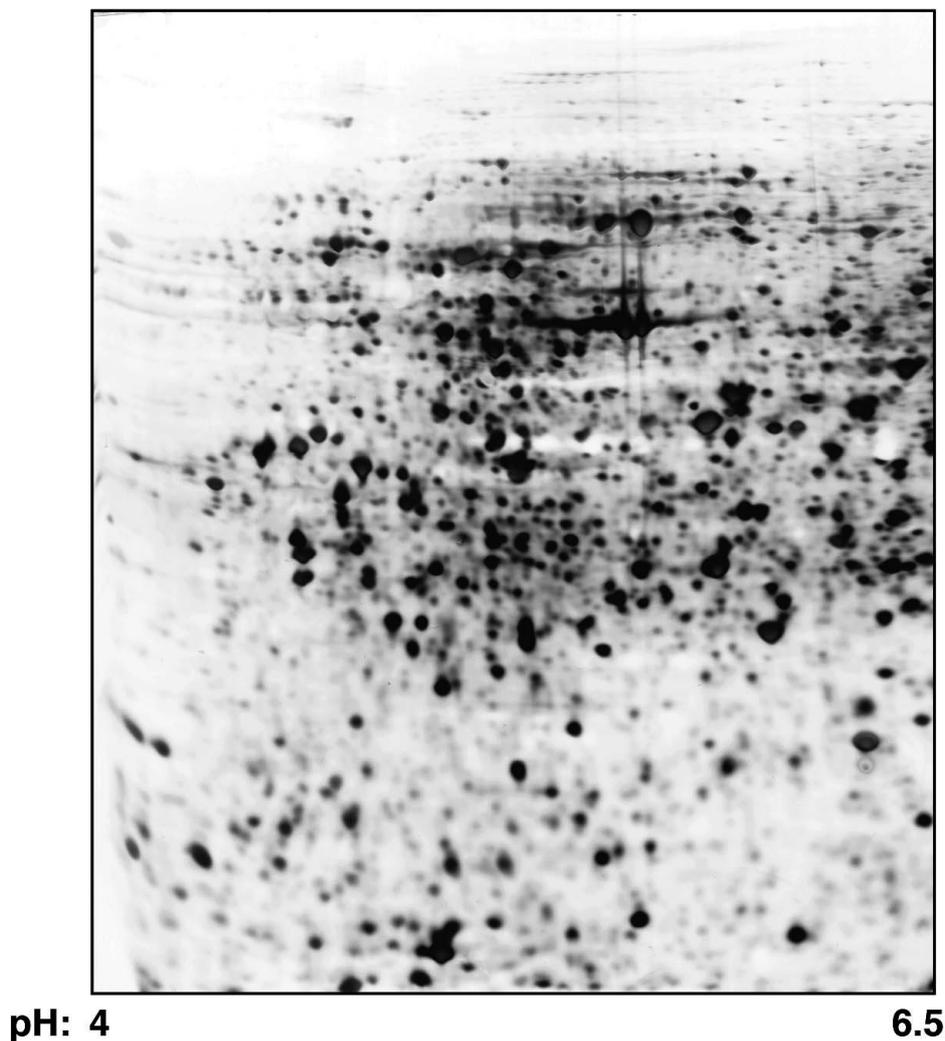
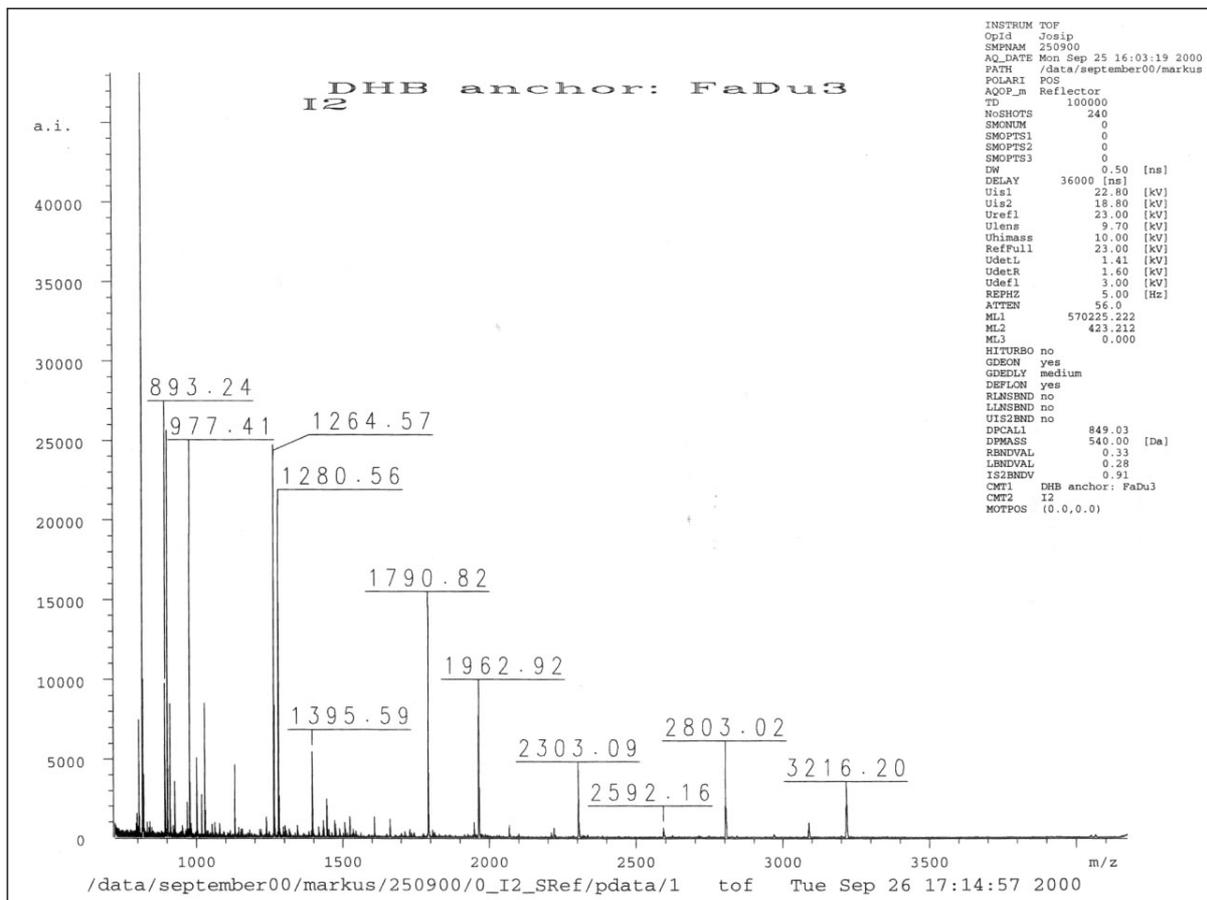


Abb. 4.22: Ausschnitt aus einem Silber-gefärbten 2D-Gel. ANT-1 Zellen (1×10^7) wurden in 2D-Lysispuffer aufgenommen und auf einer IPGphor Fokussierungseinheit mit einem pH Gradienten von pH 4-7 fokussiert (92kVh, 1.1 mg Gesamtprotein). Anschließend wurde die fokussierten Proteine in einem 14%-igem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Aus diesen 2D-Gelen wurden dann die Proteine von Interesse ausgeschnitten, tryptisch verdaut, mit organischen Matrixsubstanzen auf einer Metallplatte kristallisiert und abschließend in einem MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionisation Time of Flight) Massenspektrometer analysiert. Nach Etablierung unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden für die MALDI-ToF Analyse wurde es so möglich, aus Coomassie-, aber auch aus Silber-gefärbten Gelen gut aufgelöste Massenspektren zu erzeugen. Mit den erhaltenen Massenspektren, einem sog. „Peptid mass fingerprint“ (PMF) des analysierten Proteins, kann dann eine Datenbanksuche durchgeführt werden. Aus einem Vergleich des gemessenen mit dem theoretisch berechneten PMF läßt sich das Protein identifizieren. Abbildung 4.23 zeigt einen solchen fingerprint und das Ergebnis einer Datenbanksuche, repräsentativ für alle in dieser Arbeit mittels MALDI-ToF Analyse identifizierten Proteine.



(Fortsetzung nächste Seite)

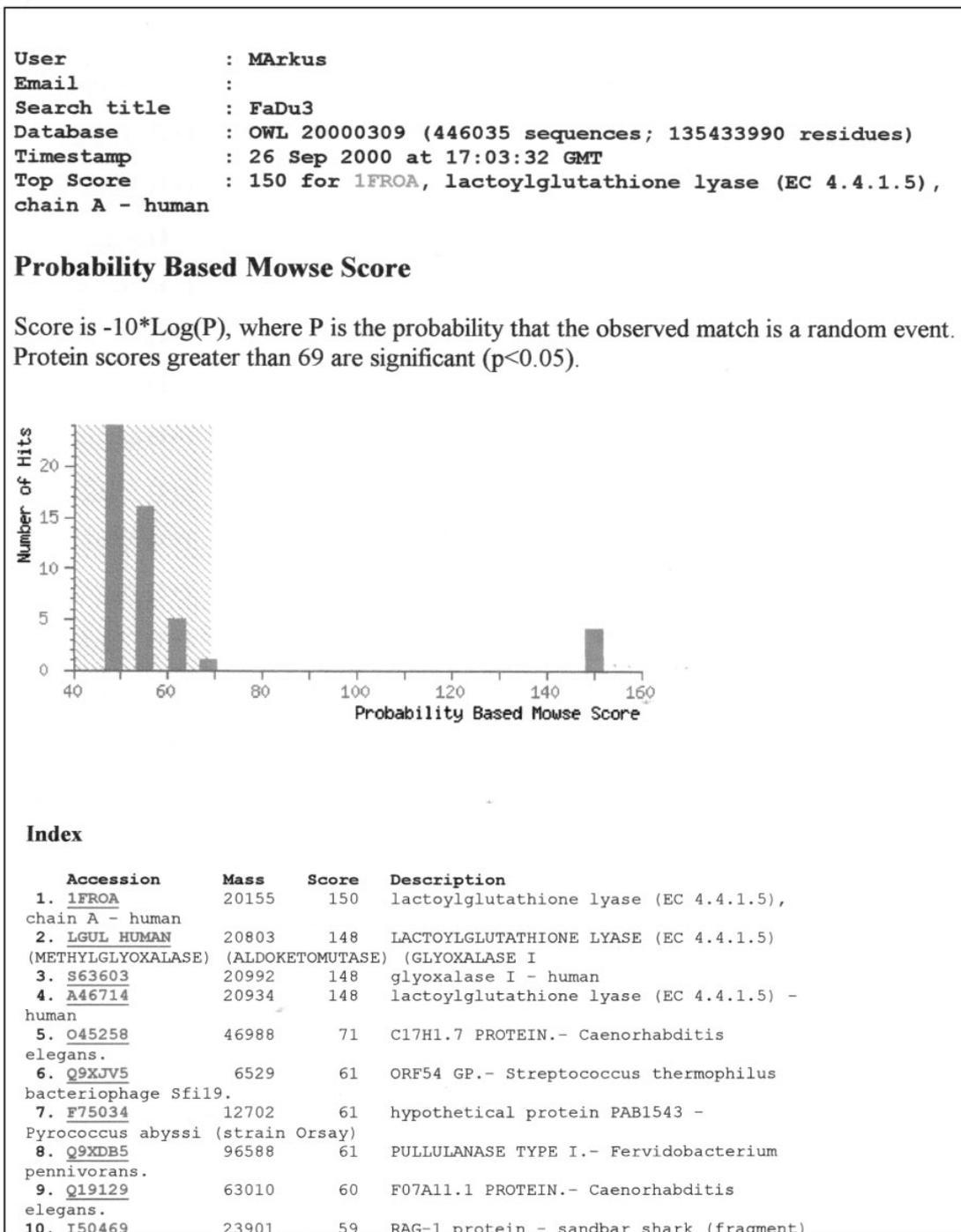


Abb. 4.23: „Peptid mass fingerprint“ eines in der MALDI-ToF analysierten Proteins mit dem dazugehörigen Datenbanksuchergebnis. Das analysierte Protein wurde aus einem Coomassiegefärbten 2D-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und in einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB) mittels MALDI-ToF Massenspektrometer analysiert.

4.4.2 Überexpression von E-FABP in den EpCAM-exprimierenden HEK293-Transfektanten

Wie in Kapitel 4.4.1 angesprochen, war ein Ziel der Proteomanalyse, EpCAM-regulierte Gene bzw. posttranslationale Modifikationen in HEK293-Transfektanten zu identifizieren, um die in Kapitel 4.1 und 4.2 beschriebenen Auswirkungen der EpCAM-Expression auf molekularer Ebene näher zu durchleuchten. Hierzu wurden 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen (1×10^7) mit 2D-Lysispuffer aufgeschlossen, die Proteine mittels IPGphor in einem pH Gradienten von pH 3-10 fokussiert und anschließend in 13%-igen SDS-PAGE Gelen aufgetrennt. Eine darauf folgende Silber- bzw. Coomassie Proteinfärbung ermöglichte dann einen Proteomvergleich zwischen den 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen. Dabei war konsistent die Überexpression eines etwa 15 kDa großen Proteins in den 293-EpCAM Zellen zu beobachten (Abb. 4.24).

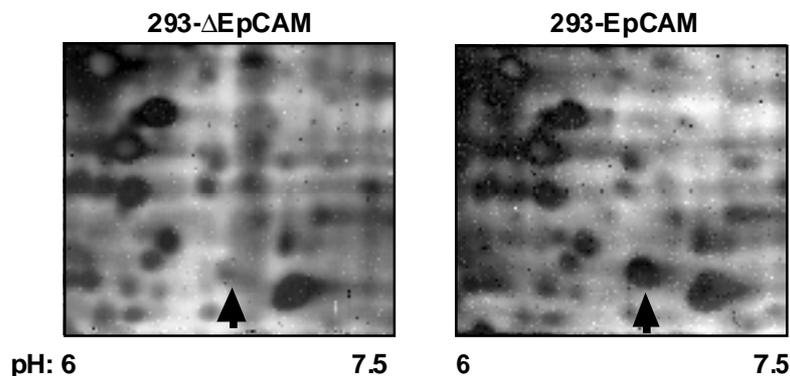


Abb. 4.24: Überexpression von E-FABP in den 293-EpCAM Zellen. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus silbergefärbten 2D-Gelen von HEK293-Transfektanten. Die Pfeile deuten auf das EpCAM-regulierte Protein, das in einer anschließenden MALDI-ToF Massenspektrometeranalyse als das epidermale Fettsäure bindende Protein E-FABP identifiziert wurde.

Das EpCAM-regulierte Protein wurde anschließend aus einem Coomassie gefärbten 2D-Gel isoliert, tryptisch verdaut und mittels MALDI-ToF Massenspektrometer-Analyse als das epidermale Fettsäure bindende Protein E-FABP identifiziert. E-FABP spielt eine wichtige Rolle bei der Fettsäureaufnahme, dem Fettsäuretransport und -metabolismus (Stewart 2000). Zudem ist bekannt, dass E-FABP in einer Vielzahl von

Karzinomen und auch bei Psoriasis, einer Hautkrankheit mit verstärkter Keratinozyten Proliferation, überexprimiert ist (Siegenthaler *et al.* 1994; Sinha *et al.* 1999). Eine Validierung dieser E-FABP Überexpression in den HEK293-EpCAM Zellen erfolgte mittels Immunoblot Experimenten. Dazu wurden 50µg Gesamtproteinextrakt beider HEK293-Transfektanten in einer 15%-igen SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Immobilon-P Membran übertragen und E-FABP mit einem spezifischen E-FABP Antikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Auf diese Weise konnte eine starke Überexpression von E-FABP in 293-EpCAM Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Die gleichmäßige Beladung des Gels mit den jeweiligen Proteinlysaten wurde mit Hilfe eines Actin-spezifischen Antikörpers bestätigt.

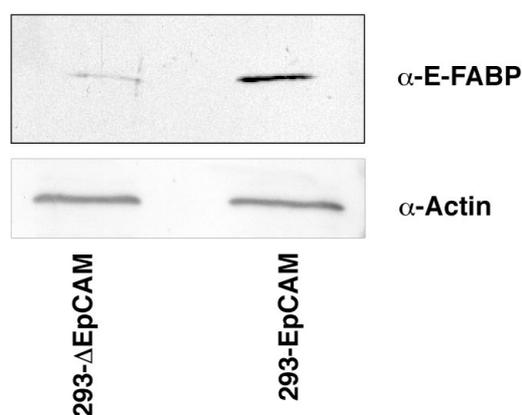


Abb. 4.25: E-FABP Expression in HEK293-Transfektanten. Immunoblot gegen E-FABP mit Gesamtproteinextrakt der Zelllinien 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM. Eine spezifische Immunfärbung von Actin auf derselben Membran bestätigte das gleichmäßige Beladen des Gels.

Die im Immunoblot erhaltenen spezifischen E-FABP Banden beider Zelllinien wurden mit Hilfe der NIH-Image Software densitometrisch ausgewertet. Dabei zeigte sich eine 5.3 fache Überexpression von E-FABP in 293-EpCAM Zellen. Dies ist in Abb. 4.26 graphisch dargestellt.

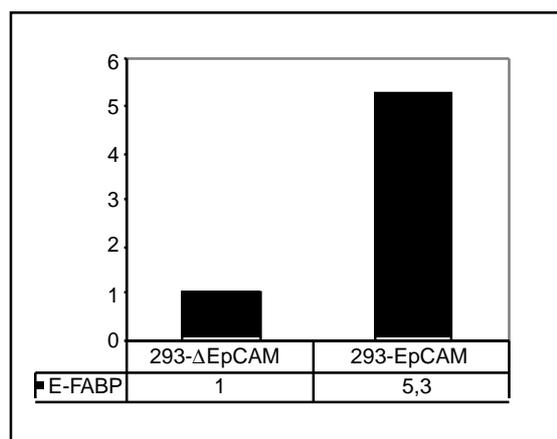


Abb. 4.26: EpCAM vermittelt eine erhöhte E-FABP Expression. Mit Hilfe der NIH-Image Software wurden die im Immunoblot erhaltenen Intensitäten der E-FABP Banden beider HEK293-Transfektanten densitometrisch analysiert. Berechnet wurde dabei eine 5.3-fach erhöhte E-FABP Expression in den 293-EpCAM Zellen (normiert auf die jeweiligen Actin Mengen).

Damit bestätigten die E-FABP-spezifischen Immunoblots, die in der Proteomanalyse beobachtete Überexpression von E-FABP in EpCAM-exprimierenden HEK293-Zellen.

4.4.3 Schnelle Induktion von E-FABP durch EpCAM in HEK293-Transfektanten

Die Kinetik der E-FABP Induktion nach einer konditionalen Expression von EpCAM in HEK293-Zellen wurde mit Hilfe des Methallothionin Systems studiert. 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll Zellen wurden mit CdCl_2 behandelt und die Induktion von EpCAM und E-FABP in Abhängigkeit von der Zeit im Immunoblot verfolgt. Dabei zeigte sich in Bezug auf die EpCAM-Expression eine um ca. 2h verzögerte Induktion der E-FABP Expression. In der 293-pMEP-Kontroll Zelllinie dagegen blieb die Menge an E-FABP über die Zeit hinweg konstant und EpCAM wurde, erwartungsgemäß, nicht gebildet. E-FABP ist daher als ein rasch reguliertes Zielgen von EpCAM zu werten. In Abbildung 4.27 ist der zeitliche Verlauf der E-FABP und EpCAM-Expression gezeigt.

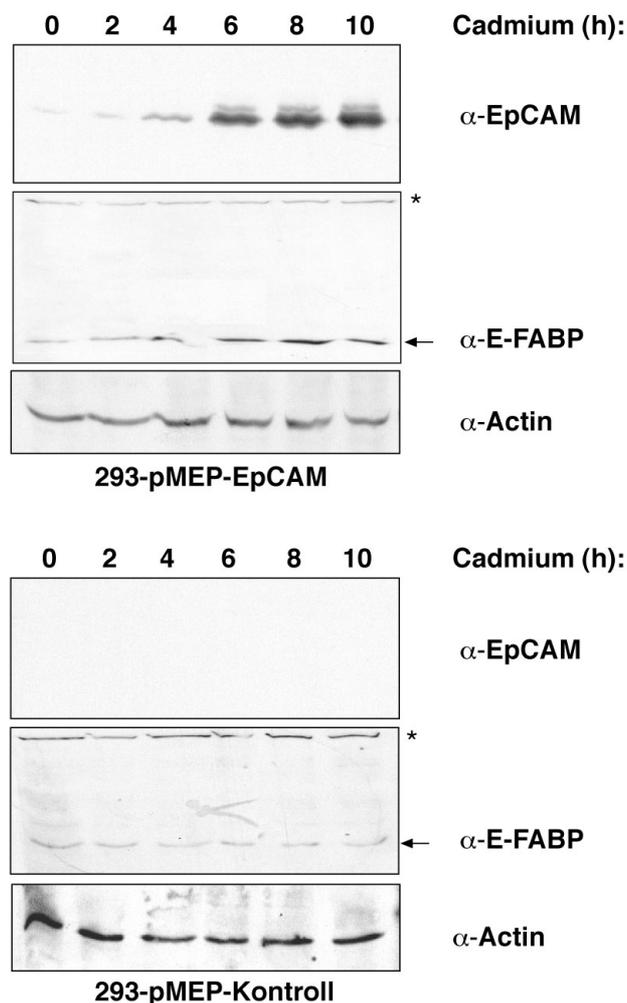


Abb. 4.27: EpCAM induziert eine schnelle Hochregulation von E-FABP. 293-pMEP-EpCAM und 293-pMEP-Kontroll Zellen (1×10^6) wurden für die angegebenen Zeiträume (0-10 h) mit $10 \mu\text{M CdCl}_2$ inkubiert und anschließend lysiert (siehe Material und Methoden). Gleiche Proteinmengen ($50 \mu\text{g}$) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-P Membran übertragen. Anschließend wurden EpCAM und E-FABP mit spezifischen Antikörpern (C215; Siegenthaler) und einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde, neben der Proteinquantifizierung über BCA, ein Immunoblot gegen Actin durchgeführt.

Eine densitometrische Auswertung der jeweiligen EpCAM und E-FABP Immunoblot Banden mit Hilfe der NIH-Image Software ermöglichte die Berechnung der n-fachen Induktionen beider Proteine in Abhängigkeit der Zeit in 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM Zellen. Diese sind in Abb.4.28 angegeben.

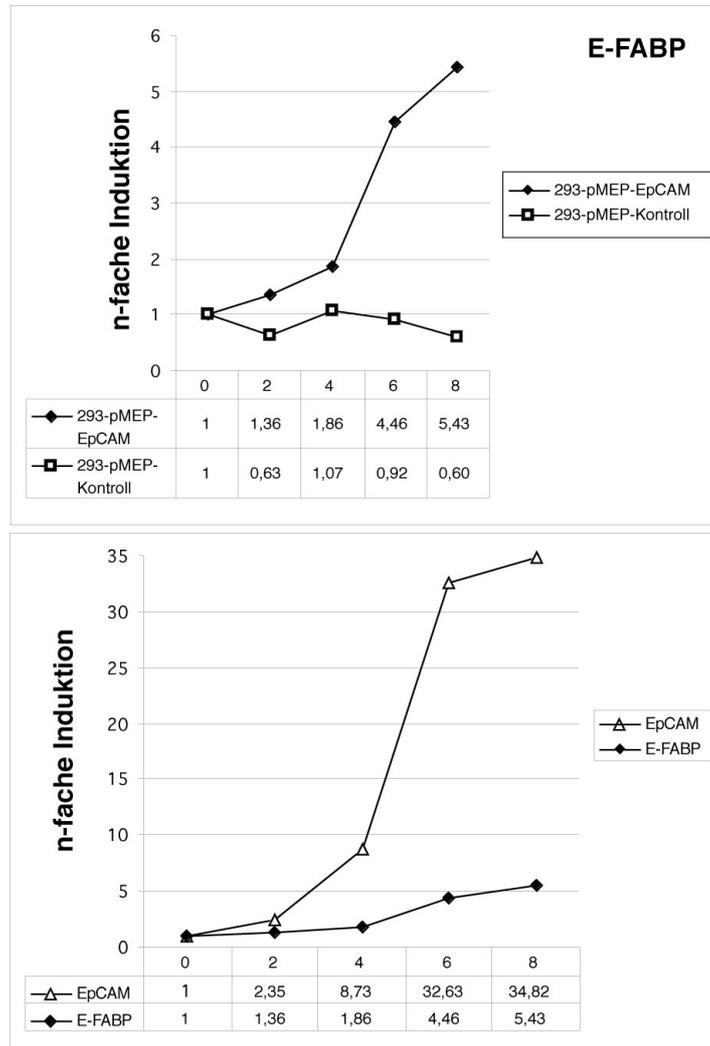


Abb. 4.28: Induktion von E-FABP und EpCAM in 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Gezeigt ist die berechnete n-fache Induktion von E-FABP in den Zelllinien 293-pMEP-Kontroll und 293-pMEP-EpCAM (oberer Teil) und die zeitliche Verlauf und die n-fache Induktion von E-FABP und EpCAM in den 293-pMEP-EpCAM Zellen (unterer Teil). Die einzelnen Induktionswerte wurden errechnet aus densitometrischen Auswertungen der Bandenintensitäten mittels NIH-Image Software. Alle Werte wurden auf die Actin Bandenintensitäten bezogen.

Zusammenfassend ist aus den Abbildungen 4.27 und 4.28 ersichtlich, dass EpCAM eine schnelle Induktion von E-FABP vermittelt. Die Überexpression von E-FABP beruhte demnach nicht auf klonalen Artefakten sondern auf einem EpCAM-vermittelten Effekt.

4.4.4 Die Expression von EpCAM und E-FABP korreliert in Karzinomzelllinien

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwieweit die Überexpression von E-FABP auch auf Karzinomzelllinien zutrifft. Die EpCAM-Expression wurde zunächst in vier HNO-Karzinomzelllinien (ANT-1, GHD-1, FaDu, PCI-1) in der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei zeigte sich, dass ANT-1 und GHD-1 Zellen eine relative schwache, FaDu und PCI-1 hingegen eine sehr starke EpCAM-Oberflächenexpression aufwiesen (Abb. 4.29). Mit diesen Karzinomzelllinien wurden anschließend Immunoblots gegen EpCAM und E-FABP durchgeführt. Dabei erfolgte die Inkubation mit den EpCAM und E-FABP spezifischen Antikörpern sukzessive in einem Arbeitsgang, um die Expression beider Proteine auf derselben Membran zu visualisieren. Interessanterweise zeigte sich eine Korrelation der EpCAM und E-FABP Expression in diesen Karzinomzelllinien: FaDu und PCI-1 Zellen wiesen eine starke E-FABP Expression auf, wohingegen die schwach EpCAM-positiven ANT-1 und GHD-1 Zellen auch E-FABP nur gering exprimierten. Als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung wurde parallel eine Immunfärbung gegen Actin durchgeführt. Abbildung 4.29 zeigt einen repräsentativen Immunoblot gegen EpCAM und E-FABP bzw. Actin mit den vier Karzinomzelllinien und die entsprechenden durchflusszytometrischen Daten.

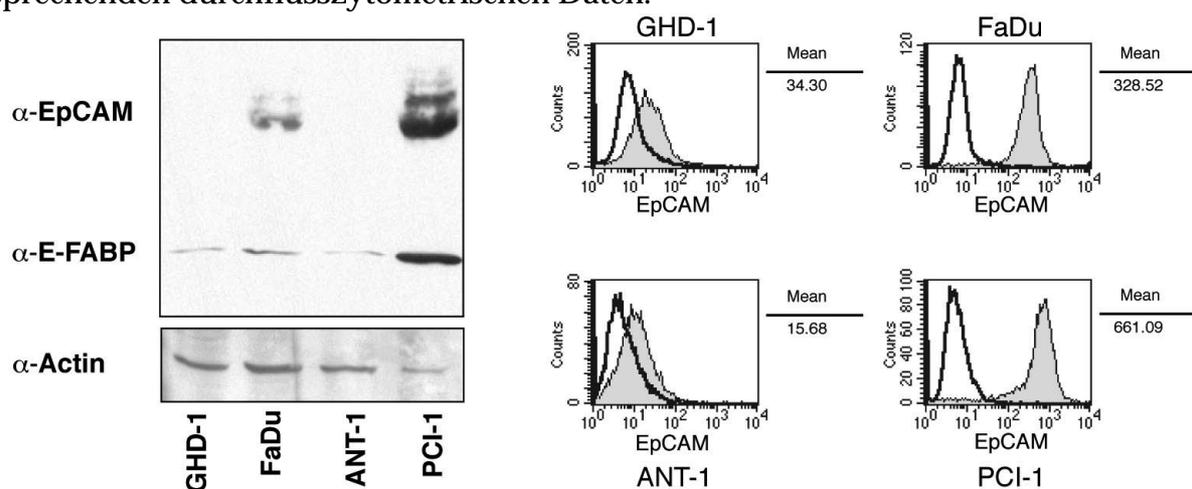


Abb. 4.29: Korrelation von E-FABP und EpCAM in Karzinomzelllinien. Gezeigt ist ein Immunoblot gegen E-FABP und EpCAM mit Gesamtzellextrakten aus den Karzinomzelllinien ANT-1, GHD-1, FaDu und PCI-1. Als Kontrolle wurde parallel eine Immunfärbung gegen Actin durchgeführt (linker Teil). Im rechten Teil der Abbildung sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse mit den Werten der Durchschnittsfluoreszenz aufgetragen (C215; anti-EpCAM).

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte somit gezeigt werden, dass in Karzinomzelllinien die Expression von E-FABP mit der Menge an EpCAM einhergeht. Diese Ergebnisse implizieren daher ebenfalls eine Korrelation dieser beiden Proteine *in vivo*, bezüglich ihrer Expression, liefern jedoch keinen Beweis dafür.

4.4.5 EpCAM und E-FABP in Primärtumoren

Wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben, geht in Karzinomzelllinien die E-FABP Expressionsstärke mit der Menge an EpCAM einher. Daher sollte im folgendem untersucht werden, ob dieser Befund auch *in vivo* zutrifft. Dazu wurde die Expression von EpCAM und E-FABP in acht Biopsien von Primärtumoren des Kopf-Hals Bereiches im Immunoblot analysiert. Dabei erfolgte die Inkubation mit den EpCAM und E-FABP spezifischen Antikörpern ebenfalls in einem Arbeitsgang, um die Expression beider Proteine auf derselben Membran nachzuweisen. Interessanterweise zeigte sich auch hier eine Korrelation der Expression von EpCAM und E-FABP. Primärtumoren, die viel EpCAM bildeten, zeigten ebenfalls eine starke E-FABP Expression (Abb. 4.30).

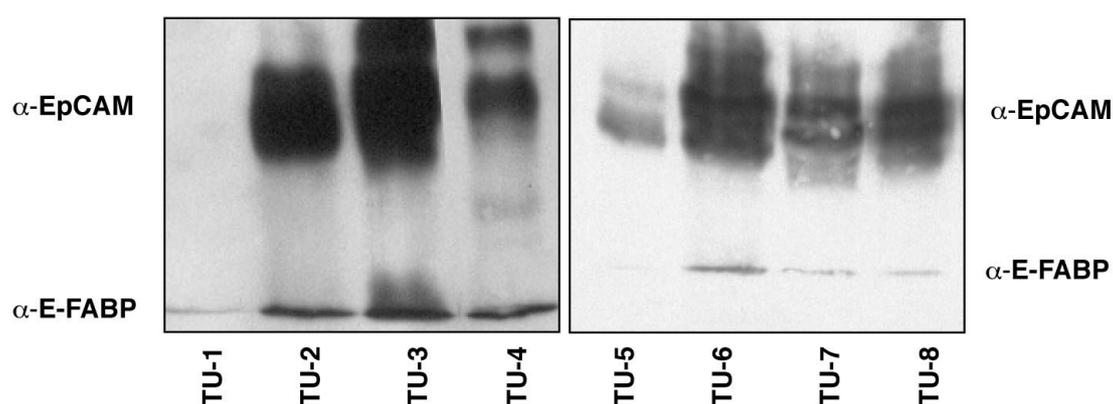


Abb. 4.30: EpCAM und E-FABP Expression in Primärtumoren. Gezeigt ist ein Immunoblot mit Gesamtzellextrakten aus acht unterschiedlichen Primärtumoren. Die Färbung erfolgte mit E-FABP und EpCAM spezifischen Antikörpern. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde über eine BCA-Proteinbestimmung gewährleistet.

Desweiteren wurde die Expression von EpCAM und E-FABP in einem Hypoharynx-Karzinom und in dem Tumor-angrenzendem (1cm von dem Resektionsrand), gesundem Gewebe untersucht. Dabei konnte sowohl eine starke *de novo* EpCAM-Expression, als auch eine hohe E-FABP Proteinmenge im Primärtumor nachgewiesen werden. Das EpCAM negative, Tumor-angrenzende, gesunde Gewebe hingegen wies nur eine schwache E-FABP Expression auf (Abb. 4.31).

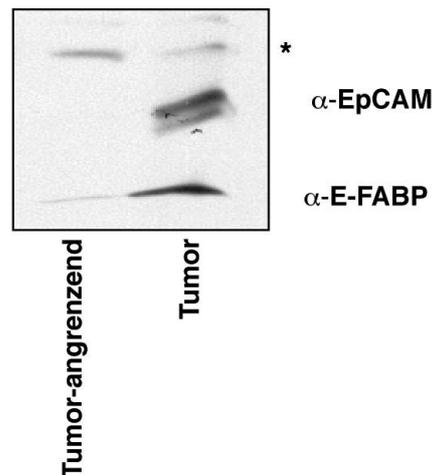


Abb. 4.31: Vergleich der EpCAM und E-FABP Expression in gesundem Gewebe und Tumorgewebe. Gezeigt ist ein EpCAM und E-FABP Immunoblot mit Gesamtzellextrakten aus Primärtumor und angrenzendem, gesundem Gewebe (autolog). Der Einsatz gleicher Gesamtproteinmengen im Immunoblot, wurde über eine BCA-Proteinbestimmung gewährleistet. (*)unspezifische Bande, welche die gleichmäßige Proteinbeladung bestätigt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.4.2 bis 4.4.5 einheitlich und reproduzierbar eine EpCAM-vermittelte Induktion und Überexpression von E-FABP *in vitro* sowie die Korrelation von EpCAM und E-FABP *in vivo*. Die EpCAM-vermittelte Überexpression von E-FABP könnte daher ebenfalls zum verstärkten Wachstum EpCAM exprimierender Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beitragen.

4.4.6 EpCAM aktiviert das Glykolyse Enzym Glyoxalase I in HEK293-Zellen

Ein weiteres EpCAM reguliertes Protein, das durch die Proteomanalyse der 293- Δ EpCAM und 293 EpCAM Zellen identifiziert wurde, ist in Abb. 4.32 dargestellt.

Gezeigt sind Ausschnitte aus silbergefärbten 2D Gelen von 293- Δ EpCAM und 293 EpCAM Zellen. Das Protein (Ziffer 1) mit einem pI von circa 5.2 ist reproduzierbar in den 293-EpCAM Zellen nicht mehr detektierbar; stattdessen ist bei etwa gleichem Molekulargewicht und pI 5.0 eine starke Induktion des in der Abbildung mit Ziffer 2 bezeichneten Proteins zu sehen. Eine MALDI-ToF Analyse der beiden Proteine an Position 1 und 2 ergab in beiden Fällen einen Peptid mass fingerprint, der für das Enzym Glyoxalase I (EC. 4.4.1.5 Lactoylglutathion Lyase/Glox I) spezifisch ist. Glyoxalase I ist ein zentrales Enzym im Glyoxalase System (Glox I/Glox II und Gluthathion (GSH) als co-Faktor), welches über die Detoxifizierung von Methylglyoxal, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, und anderer α -Oxoaldehyden in dem Metabolismus pro- und eukaryontischer Zellen involviert ist (Ranganathan *et al.* 1995).

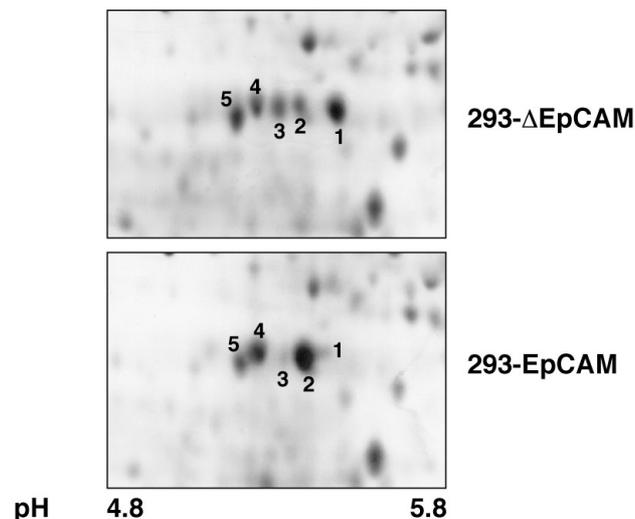


Abb. 4.32: Das Enzym Glyoxalase I ist ein EpCAM-reguliertes Protein. Gezeigt sind Ausschnitte aus silbergefärbten 2D-Gelen von 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen. Die Ziffern bezeichnen die einzelnen Positionen in Bezug auf Molekulargewicht und pI der Proteine im Gel. Die Proteine mit Ziffer 1 und 2 wurden in einer MALDI-ToF Analyse als das Glykolyseenzym Glyoxalase I identifiziert.

Die beobachtete Verschiebung des pI von 5.2 nach 5.0 weist auf eine posttranslationale Modifikation der Glox I hin und könnte mit der Regulation der Enzymaktivität verknüpft sein. Da beschrieben wurde, dass Karzinome eine erhöhte

Glox I Aktivität besitzen (Ranganathan *et al.* 1993), erschien die Untersuchung der Glox I in Bezug auf Molekulargewicht und pI in einer HNO-Karzinomzelllinie interessant. Eine 2D-PAGE Analyse der Karzinomlinie FaDu und darauf folgende Proteomvergleiche mit den HEK293-Transfektanten ergaben, dass Glox I bei FaDu-Zellen ein vergleichbares Laufverhalten hat, wie in 293-EpCAM Zellen (Abb. 4.33). Dies wurde über eine MALDI-ToF Analyse des Proteins auf Position 2 bestätigt.

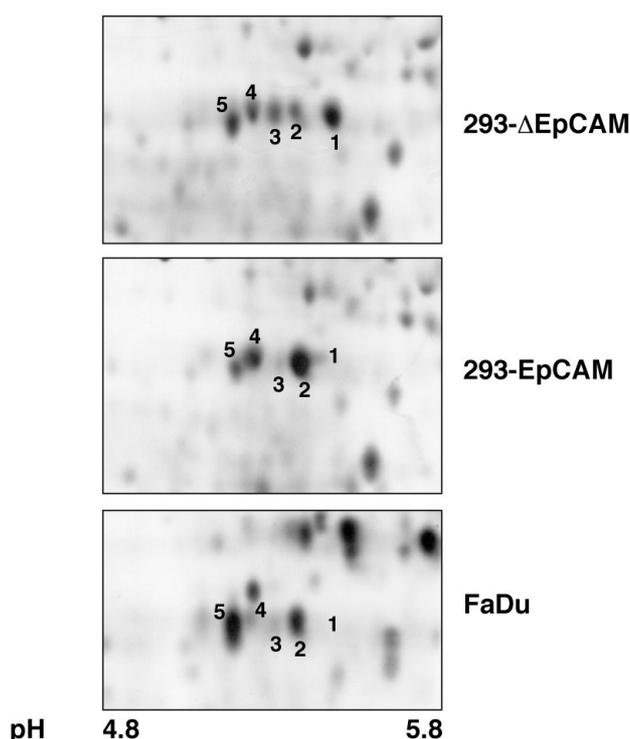


Abb. 4.33: Laufverhalten der Glyoxalase I in FaDu-Karzinomzellen im Vergleich zu HEK293-Transfektanten. Gezeigt sind silbergefärbte Ausschnitte aus 2D-Gelen von 293- Δ EpCAM, 293-EpCAM und FaDu-Zellen. Die Ziffern bezeichnen die einzelnen Positionen der Proteine im Gel in Bezug auf Molekulargewicht und pI. Die Proteine mit Ziffer 1 und 2 wurden in einer MALDI-ToF Analyse als das Glykolyseenzym Glox I identifiziert. Die weiteren Ziffern markieren Proteine, die zur vereinfachten Orientierung als Anhaltspunkte verwendet werden.

In beiden EpCAM-positiven Zelllinien, 293-EpCAM und FaDu, lag der isoelektrische Punkt bei circa 5.0, so dass die posttranslationale Modifikation der Glox I möglicherweise einen EpCAM-vermittelten Effekt darstellt.

Aus Studien an humanen endothelialen Zellen, die mit Stickstoffmonoxid behandelt wurden, war bekannt, dass beide Varianten der Glox I unterschiedliche enzymatische Aktivitäten besitzen (Mitsumoto *et al.* 1999). Ein Wechsel des pI von 5.2 auf 5.0 ging einher mit einer Zunahme der Aktivität. Die Bestimmung der Glyoxalase Enzymaktivität *in vitro*, sollte daher Aufschluss geben über die Glox I in den studierten Zelllinien. Zu diesem Zweck wurden die 293- Δ EpCAM, 293-EpCAM und FaDu-Zellen in Lysispuffer (TBS-T-1%) lysiert und die Proteinkonzentration der Gesamtzellsate über eine BCA-Proteinbestimmung ermittelt. Gleiche Gesamtproteinmengen der Lysate wurden anschließend in einem Enzymaktivitätstest eingesetzt. Dieser spezifische Test basiert auf der Umsetzung von Methylglyoxal und Glutathion durch Glox I zu S-D-Lactoylglutathion. Der Anstieg der Absorption bei 240 nm in Abhängigkeit von der Zeit ist ein Maß für die Enzymaktivität, welche in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Gesamtproteineinsatz angegeben wird. In diesen Experimenten zeigten die 293-EpCAM (2.9-fach) und FaDu Karzinom (2.3-fach) Zellen eine erhöhte Enzymaktivität im Vergleich zu den 293- Δ EpCAM Zellen. Die ermittelten Enzymaktivitäten sind in Abb. 4.34 dargestellt.

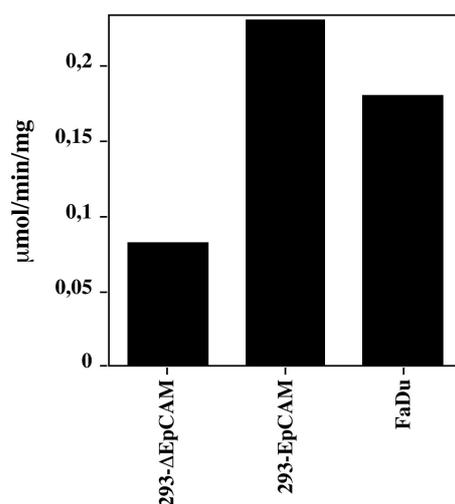


Abb. 4.34: Erhöhte Glox I Aktivität in 293-EpCAM und FaDu-Zellen. Die Glox I Aktivität wurde durch die Umsetzung von Methylglyoxal und Glutathion über den Anstieg der Absorption bei 240 nm, bedingt durch die Produktbildung von S-D-lactoylglutathion, bestimmt. Als Quelle für die Glox I dienten jeweils gleiche Proteinmengen von Gesamtzellsaten der 293- Δ EpCAM, 293-EpCAM und FaDu Zelle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Über die Proteomanalyse der HEK293-Transfektanten wurde somit eine EpCAM-regulierte, posttranslationale Modifikation der Glox I identifiziert, welche zu einer Aktivitätssteigerung dieses Enzyms führt. Zudem bewiesen die erzielten Ergebnisse, dass HEK293 ein adäquates zelluläres System zum Studium von EpCAM ist, da die Ergebnisse sich bei Karzinomlinien und Primärtumoren bestätigen ließen.

4.5 Soft-Agarose Experimente

4.5.1 EpCAM erhöht und beschleunigt die Koloniebildung von HEK293-Zellen in Soft-Agarose

Nachdem gezeigt wurde, dass 1. das Onkogen c-myc ein direktes Zielgen von EpCAM ist, 2. eine EpCAM-Expression die Proliferation und den Metabolismus von HEK293-Zellen antreibt und 3. EpCAM eine reduzierte Wachstumsfaktor-abhängigkeit vermittelt, stellte sich als nächstes die Frage, inwieweit eine EpCAM-Expression die Koloniebildung in Soft-Agarose Experimenten unterstützen kann. Die Koloniebildung ist ein Maß für die transformierende Eigenschaft und das onkogene Potential eines Proteins (Auvinen *et al.* 1992). Die bisherigen Befunde ließen eine transformierende Eigenschaft von EpCAM vermuten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen (1×10^4) in 0.35% Agarose/10% FCS DMEM auf einer Schicht aus 0.5% Agarose/10% FCS DMEM in 60 mm Kulturplatten ausplattiert und die Koloniebildung verfolgt. In Abb. 4.35 sind vergrößerte Ausschnitte beider Zelllinien nach 7 Tagen Kultivierung in Soft-Agarose gezeigt. Es war eine signifikante Erhöhung der Anzahl und Größe gewachsener Kolonien bei 293-EpCAM Zellen zu beobachten.

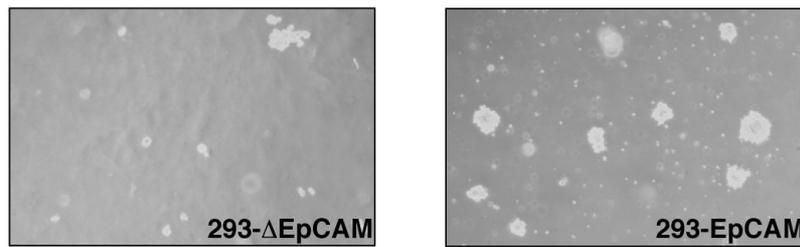


Abb. 4.35: Koloniebildung bei HEK293-Transfektanten in Soft-Agarose. 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zellen (1×10^4) wurden 7 Tage in 0.35% Agarose/10% FCS DMEM auf einer Schicht aus 0.5% Agarose/10% FCS DMEM in 60 mm Kulturplatten kultiviert. Die Koloniebildung ist in einem mikroskopischen Bild mit einer 10-fachen Vergrößerung dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

Die Koloniebildung wurde als Verhältnis von gebildeten Kolonien zu der Gesamtzellzahl im ausgewählten Blickfeld nach 7 Tagen Kultur in Soft-Agarose bestimmt. Die so ermittelte Koloniebildung ist in Abb. 4.36 prozentual dargestellt. Dabei zeigten 293-EpCAM Zellen reproduzierbar eine um den Faktor 3 signifikant erhöhte prozentuale Koloniebildungskapazität im Vergleich zu den 293- Δ EpCAM Zellen.

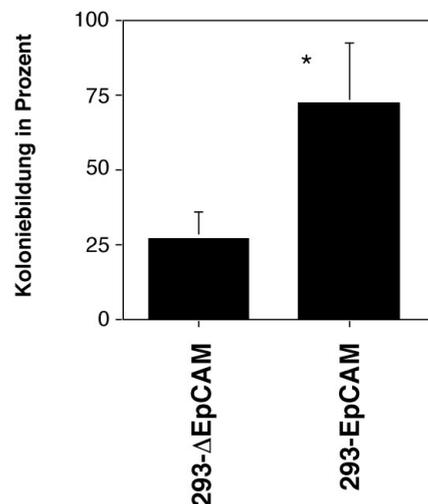


Abb. 4.36: Koloniebildung in HEK293-Transfektanten. Angegeben ist das Verhältnis der gebildeten Kolonien zu der Gesamtzellzahl im ausgewählten Blickfeld von 293- Δ EpCAM und 293-EpCAM Zelllinien nach 7 Tagen Kultur in Soft-Agarose. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten in denen die Zellen in Triplikaten ausplattiert wurden, berechnet. Gepaarter Student'sche t-Test $* = 0.027$.

HEK293-Zellen sind durch die adenoviralen Onkogene E1A und E1B transformiert und bilden auf Grund dessen per se Kolonien. Die vorgestellten Ergebnisse aus den Soft-Agarose Versuchen zeigten jedoch, dass EpCAM in diesen Zellen in der Lage ist, eine schnelle und verstärkte Bildung von Kolonien zu vermitteln.

4.5.2 Koloniebildung von EpCAM-positiven NIH3T3-Fibroblasten in Soft-Agarose

Mit den generierten NIH3T3- Δ EpCAM und NIH3T3-EpCAM Linien stand nun ein System zur Verfügung, das auf einer in Soft-Agarose Experimenten standardmäßig eingesetzten Zelllinie basiert. Parentale NIH3T3-Fibroblasten bilden in Soft-Agarose keine Kolonien. Erst die Expression eines Onkogenes, wie beispielsweise der Kinase Raf, führt zur Bildung von Kolonien durch diese Zellen. Analog zu den Experimenten mit HEK293-Transfektanten wurden NIH3T3- Δ EpCAM und NIH3T3-EpCAM Zellen (3×10^4) in 60 mm Kulturplatten ausplattiert und die Koloniebildung verfolgt. Als positiv-Kontrolle dienten dabei Raf-transformierte NIH3T3-Zellen (3611), welche innerhalb einer Woche Kolonien bildeten. Im Vergleich dazu bildeten NIH3T3-EpCAM Zellen innerhalb von 2-3 Wochen, in Abhängigkeit der ausplattierten Zellzahl, Kolonien. Die Koloniebildung erfolgte jedoch mit einer geringeren Frequenz als bei Raf-transformierten NIH3T3-Fibroblasten. NIH3T3- Δ EpCAM Zellen hingegen bildeten nur sehr selten Kolonien. In Abb. 4.37 sind vergrößerte Ausschnitte von NIH3T3- Δ EpCAM, NIH3T3-EpCAM und Raf-transformierten NIH3T3-Zellen nach 21 Tagen Kultivierung in Soft-Agarose gezeigt.

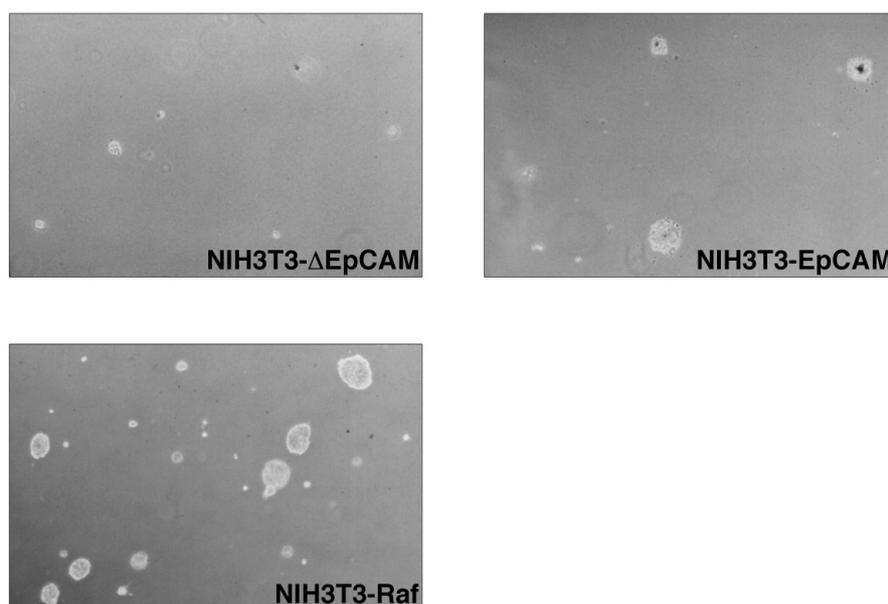


Abb. 4.37: Koloniebildung von NIH3T3-Transfektanten in Soft-Agarose. NIH3T3- Δ EpCAM, NIH3T3-EpCAM und NIH3T3-Raf (positiv-Kontrolle) Zellen (3×10^4) wurden 21 Tage in 0.35% Agarose/10% FCS DMEM auf einer Schicht aus 0.5% Agarose/10% FCS DMEM in 60 mm Kulturplatten kultiviert. Die gebildeten Kolonien wurde mit Hilfe eines Mikroskops visualisiert und fotografiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus vier.

4.6 Das Glykosylierungsmuster von EpCAM

Die bisherigen Ergebnisse belegen den Einfluss von EpCAM auf Zellwachstum, Metabolismus und Gentranskription und somit vermutlich die zentrale Rolle dieses Moleküls in der Karzinogenese. Da EpCAM jedoch in gesundem Epithelgewebe, wie beispielsweise in der Schilddrüse und dem Darm, exprimiert wird, stellte sich die Frage nach möglichen funktionellen Unterschieden zwischen „gesundem“ und Tumor-assoziiertem EpCAM. Seit längerem ist bekannt, dass glykosylierte Varianten von EpCAM in Lungen-Karzinomen auftreten (Fernsten *et al.* 1990). Es wurde jedoch weder eine solche Modifikation bei HNO-Plattenepithelkarzinomen noch eine gewebsspezifische Glykosylierung beschrieben.

Aus diesem Grund wurde zunächst die Glykosylierung von EpCAM in Karzinomzelllinien, vorrangig aus dem Kopf-Hals Bereich untersucht. Anschließend wurde das Glykosylierungsmuster dieses Proteins in gesundem und Tumorgewebe

(autolog) studiert, um möglicherweise unterschiedliche Formen von EpCAM in „krankem und gesundem Gewebe“ nachzuweisen.

4.6.1 EpCAM in Karzinomzelllinien

Das Glykosylierungsmuster von EpCAM wurde zunächst in neun verschiedenen Karzinomzelllinien (FaDu, HeLa, HCT-8, HLAC-78, MCF-7, SKBR3, PCI-1, PCI-13 und Tu179) im Immunoblot analysiert. Alle Karzinomzelllinien, mit Ausnahme der EpCAM-negativen Karzinomzelllinie HeLa, zeigten ein vergleichbares Glykosylierungsmuster von EpCAM (Abb. 4.38). Zusätzlich zur glykosylierten 40kDa Bande, ließ sich die glykosylierte 42kDa und bei HCT-8 Zellen außerdem die unglykosylierte 37kDa Form von EpCAM auftrennen.

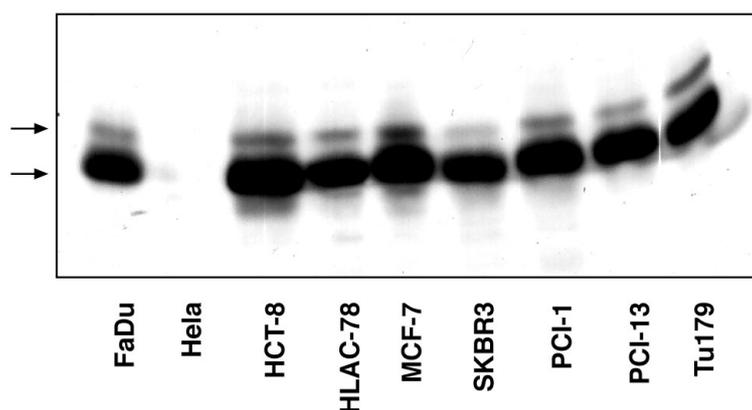


Abb. 4.38: EpCAM Glykosylierung in Karzinomzelllinien. Die Glykosylierung von EpCAM in FaDu (Hypopharynx), HeLa (Zervix), HCT-8 (Kolon), HLAC-78 (Kopf-Hals), MCF-7 (Brust), SKBR3 (Brust) PCI-1 und PCI-13 (Hypopharynx) und Tu179 (Zungengrund) Zellen wurde mit Hilfe von Immunoblot Experimenten analysiert. Der Einsatz gleicher Gesamtproteinmengen, wurde über eine BCA-Proteinbestimmung gewährleistet Die Pfeile deuten auf unterschiedliche Glykosylierungsvarianten von EpCAM.

Die Behandlung der Karzinomzelllinie FaDu mit Glykosylierungshemmern, die spezifisch eine N-Glykosylierung (Tunicamycin) bzw. eine O-Glykosylierung (N-Acetyl-Galactosaminid) inhibieren, demonstrierte, dass das im Immunoblot beobachtete Muster auf einer N-Glykosylierung von EpCAM beruht (Abb. 4.39).

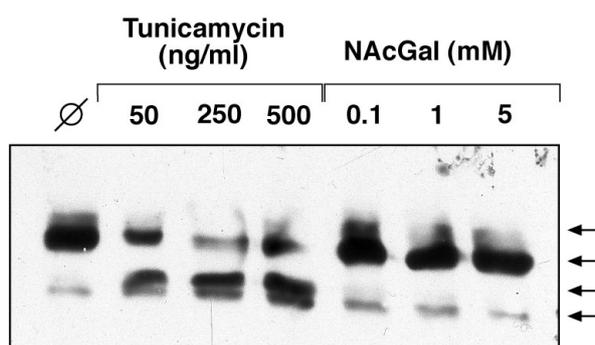


Abb. 4.39: N-Glykosylierung von EpCAM in FaDu-Karzinomzellen. FaDu-Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen an Tunicamycin bzw. N-Acetyl-Galactosaminid kultiviert, lysiert und anschließend gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. EpCAM wurde im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile deuten auf unterschiedliche Glykosylierungsvarianten von EpCAM.

Die Behandlung der Karzinomzellen mit steigenden Mengen an Tunicamycin führte zur Anhäufung der unglykosylierten 37 kDa Form und einer Reduktion der glykosylierten 40 und 42 kDa Formen. Der O-Glykosylierungshemmer N-Acetyl-Galactosaminid hingegen hatte keinen Einfluss auf das Glykosylierungsmuster von EpCAM.

4.6.2 EpCAM in gesundem und Tumorgewebe

Der Vergleich der Glykosylierungsmuster von EpCAM in gesundem und Tumorgewebe wurde an autologen Biopsien durchgeführt. Mit Hilfe von Immunoblot Experimenten wurde gezeigt, dass EpCAM in Karzinomen (Hypopharynx-, Larynx-Karzinomen) im Gegensatz zu gesundem Gewebe (Schilddrüse) glykosyliert vorliegt. Die glykosylierten 40 und 42 kDa Formen von EpCAM konnten ausschließlich in Karzinomen detektiert werden, jedoch nicht in gesundem Gewebe (Schilddrüse). Das gesunde Gewebe hingegen zeigte nur die unglykosylierte 37 kDa Form und das 32 kDa Spaltprodukt von EpCAM. In Abb. 4.40 ist exemplarisch ein Immunoblot gezeigt.

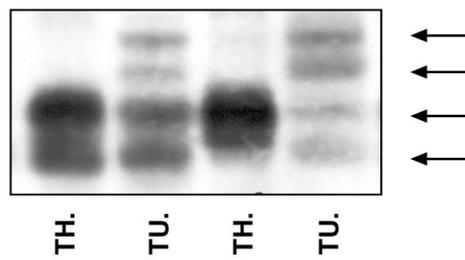


Abb. 4.40: EpCAM Glykosylierung in gesundem und Tumorgewebe. Gezeigt ist ein EpCAM Immunoblot mit Gesamtzellextrakten aus Primärtumor (TU) und gesundem Schilddrüsengewebe (TH) zweier Patienten (autolog). Der Einsatz gleicher Gesamtproteinmengen im Immunoblot wurde über eine BCA-Proteinbestimmung gewährleistet. Die Pfeile deuten auf unterschiedliche Glykosylierungsvarianten von EpCAM.

5. Diskussion

Die Deregulation des Zellzyklus und eine damit verbundene, unkontrollierte Proliferation sind klassische Merkmale der Karzinogenese. Gene, die in der Zellzyklusregulation bzw. Tumorsuppression involviert sind unterliegen dabei häufig Mutationen, die zu einem Funktionsverlust, „loss of function“, oder einer Verstärkung, „gain of function“, führen (Hanahan *et al.* 2000). Diese Gene lassen sich in folgende Gruppen einteilen: 1. Tumor-Suppressor-Gene (p53, Rb), 2. Zellzyklusregulatoren (Cycline, cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und ihre Inhibitoren etc.), 3. Transkriptionsfaktoren (c-myc, AP 1) und ihre Regulatoren (Kinasen, Phosphatasen und Inhibitoren) und 4. Membran-ständige Rezeptoren, die mitogene Signale in den Zellkern transduzieren (Rezeptor Tyrosin Kinasen, EGF-R, Her2/neu). Seit Beginn der 90er Jahre ist bekannt, dass das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM in den meisten Karzinomen überexprimiert wird (Szala *et al.* 1990; de Boer *et al.* 1999). Dabei wurde beobachtet, dass der Dysplasiegrad mit der Expressionshöhe dieses Moleküls zunimmt (Litvinov *et al.* 1996). EpCAM lässt sich somit als tumor-assoziiertes Antigen bezeichnen. Daher besitzt die Anwendung von EpCAM als Tumormarker und als Zielantigen bei Immuntherapien mit monoklonalen und bispezifischen Antikörpern einen hohen klinischen Stellenwert (Braun *et al.* 1999; Zeidler *et al.* 2000). Trotz seiner Verwendung als Marker und Zielmolekül existieren bislang keine Daten über die Funktion und Molekularbiologie von EpCAM. Eine geringe Anzahl an Publikationen beschreibt zwar die Korrelation von EpCAM mit der Proliferation und Dedifferenzierung (Litvinov *et al.* 1996; Piyathilake *et al.* 2000), jedoch wurde kein direkter Einfluss auf diese Prozesse nachgewiesen. Ziel meiner Arbeit war es daher, die Auswirkungen der EpCAM-Expression in verschiedenen zellulären Systemen auf molekularer Ebene zu studieren.

Hierzu wurden zunächst geeignete zelluläre Systeme etabliert, die den Vergleich EpCAM-negativer und -positiver Zellen mit gleichem genetischen Hintergrund erlaubten, um so erstmals den direkten Einfluss von EpCAM auf Proliferation und Metabolismus zu studieren. Die anschließende Identifizierung EpCAM-regulierter Gene in diesen Zelllinien erlaubte einen Einblick in die molekularen Mechanismen der EpCAM-vermittelten Effekte und den Beitrag EpCAMs zur Karzinogenese.

5.1 EpCAM-vermittelte Effekte auf Zellmorphologie, -wachstum und Metabolismus

Mit Hilfe der etablierten HEK293 und NIH3T3 Zellsysteme (4.1) konnte erstmalig der direkte Effekt von EpCAM auf das Wachstum und den Metabolismus von Zellen gezeigt werden. Die Verwendung dieser Zelllinien als Studienobjekte hatte folgende Gründe: 1. HEK293-Zellen sind EpCAM-negative, epitheliale humane embryonale Nierenzellen und bieten dadurch die Voraussetzungen zur Analyse eines epithelialen Adhäsionsmoleküls. Zudem zeichnet HEK293-Zellen ihre einfache Handhabbarkeit aus: sie lassen sich effizient transfizieren und ermöglichen dadurch eine effektive Etablierung von Transfektanten. 2. Murine NIH3T3-Fibroblasten wurden verwendet, weil sie das Studium EpCAM-vermittelter Effekte in einem zusätzlichen Zelltyp und einer anderen Spezies erlaubten. In beiden Zelllinien führte die Expression von EpCAM zu einem verstärkten Zellwachstum. Der Wachstumsvorteil EpCAM-exprimierender HEK293-Zellen war dabei nur unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen messbar (Abb. 4.3). Dies mag daran liegen, dass HEK293-Zellen durch die stabil integrierten adenoviralen Onkogene E1A und E1B (Graham *et al.* 1977) bereits eine verminderte Wachstumsfaktorabhängigkeit besitzen. HEK293-Zellen sind vermutlich unter 10% FCS bereits optimal mit mitogenen Stimuli versorgt, so dass ein zusätzliches mitogenes Signal von den Zellen nicht in ein erhöhtes Wachstum umgesetzt wird. EpCAM-exprimierende NIH3T3-Transfektanten hingegen zeigten auch unter 10% FCS ein deutlich erhöhtes Zellwachstum (Abb. 4.8). Anders als HEK293-Zellen benötigen NIH3T3-Fibroblasten

eine höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren und sind bereits unter 5% FCS nicht mehr kultivierbar. Daher führte die Expression von EpCAM selbst noch unter 10% FCS zu einem deutlichen Wachstumsvorteil. Interessanterweise sind die Induktion einer reduzierten Wachstumsfaktorabhängigkeit und einer verstärkten Proliferation klassische Merkmale von Onkogenen. Derartige Effekte wurden etwa für c-myc, EGF-R und v-Src beschrieben (Stern *et al.* 1986; Iritani *et al.* 1999; Simon 2000; Riley *et al.* 2001). Diese Beobachtungen lassen ein onkogenes Potential von EpCAM vermuten und weisen auf eine zentrale Rolle dieses Moleküls in der Karzinogenese.

Bemerkenswert ist zudem, dass EpCAM -unabhängig von den Kulturbedingungen den Metabolismus von HEK293 und NIH3T3-Zellen stets erhöhte (Abb. 4.5 und 4.9). So hatten die schneller wachsenden 293-EpCAM Transfektanten unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen auch eine höhere metabolische Aktivität: 293- Δ EpCAM Zellen zeigten im Gegensatz zu 293-EpCAM Zellen nach drei Tagen eine Stagnation ihrer metabolischen Aktivität (Abb. 4.5). Gründe hierfür könnten ein Gleichgewicht zwischen Apoptose- und Wachstumsrate oder eine Zellzyklus-arretierung sein.

Unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen demonstrierte die Zellmorphologie zudem den verminderten Bedarf von Wachstumsfaktoren EpCAM-exprimierender Zellen in anschaulicher Weise: Während die Morphologie von 293-EpCAM Zellen unbeeinflusst blieb, waren die 293- Δ EpCAM Zellen abgerundet und zum Teil von der Kulturplatte abgeschwommen, was auf eine stark verminderte Vitalität der Zellen wies (Abb. 4.4). Diese Annahme wurde durch die, um den Faktor 2, reduzierte Zellteilungsrate der EpCAM-negativen HEK293-Transfektanten bestätigt (Tab. 1).

5.2 EpCAM-Inhibierung in Karzinomzelllinien

Die bis dahin gewonnenen Erkenntnisse zeigten, dass die Expression von EpCAM ein erhöhtes Wachstum und einen verstärkten Metabolismus vermittelt. Diese

Befunde ließen darauf schließen, dass die Inhibierung dieses Moleküls in EpCAM-positiven Karzinomzellen drastische Auswirkungen zur Folge hat. Die Schwierigkeiten EpCAM-negative Klone solcher Karzinomzellen zu generieren, stützen diese Vermutung: In stark EpCAM-exprimierenden Zellen gelang es nicht, die Expression dieses Moleküls durch ein Antisense-Konstrukt stabil zu hemmen - die Inhibierung war stets transient. Als Erklärung kommt hierfür in Betracht, dass Zellen, in denen die Expression von EpCAM nicht vollständig inhibiert war, einen Wachstumsvorteil besaßen und die Kultur überwuchsen. Die Etablierung der korrespondierenden Sense-Transfektanten hingegen war stets erfolgreich, so dass nicht von technischen Schwierigkeiten auszugehen war. Lediglich in der schwach EpCAM-positiven Karzinomzelllinie ANT-1 gelang es, die EpCAM-Expression längerfristig zu inhibieren. ANT-1-AS Zellen zeigten, unabhängig von den Kulturbedingungen, eine drastisch veränderte Morphologie, welche die schlechte Vitalität der Zellen reflektierte (Abb. 4.11): ANT-1-AS Zellen waren im Vergleich zu ANT-1-S Zellen stark abgerundet und schwammen teilweise von der Platte ab. Die Wachstumsrate von ANT-1-AS Zellen unter 10% FCS war drastisch vermindert und stagnierte nahezu unter Serum-reduzierten Kulturbedingungen (Abb. 4.12). Die berechneten Zellverdopplungszeiten von 15 Tagen bei ANT-1-AS Zellen im Vergleich zu 3.2 Tagen bei ANT-1-S Zellen belegten dies in deutlicher Weise (Tab. 1). Auch der Metabolismus von ANT-1-AS Zellen war im Vergleich zu ANT-1-S Zellen stark vermindert und stagnierte -unabhängig von den Kulturbedingungen- (Abb. 4.13). Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMFDA deuten auf eine Stagnation der Zellproliferation bei ANT-1-AS Zellen als Erklärung für diesen Effekt (Abb. 4.14). Bemerkenswert ist, dass unabhängig vom untersuchten Zelltyp (HEK293, NIH3T3, ANT-1) die Expression oder Inhibierung von EpCAM die Proliferationsrate und den Metabolismus in ähnlichem Umfang beeinflusste (Faktor 2-3). Im Fall der ANT-1-AS Zellen bewirkte die Inhibierung nahezu einen Proliferationsstopp unter Serum-

reduzierten Kulturbedingungen. Diese Erkenntnisse lassen die Inhibierung EpCAMs auch unter therapeutischen Aspekten interessant erscheinen.

Aufgrund der geschilderten Probleme bei der Generierung von EpCAM-negativen Transfektanten arbeiten wir zur Zeit an der Etablierung eines konditionalen, zellulären EpCAM Knock-outs (Feederle *et al.* 2000) in einer Karzinomzelllinie.

5.3 EpCAM-regulierte Gene und -vermittelte Effekte

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten auf eine wachstumsregulierende Funktion von EpCAM. Die Identifizierung EpCAM-regulierter Gene mittels Run-On Experimenten (4.3) und 2D-Proteomanalysen (4.4) sollte daher einen Einblick in die Signaltransduktion dieses Moleküls liefern. So sollte die Funktion von EpCAM während der Karzinogenese erstmals auf molekularer Ebene beschrieben werden.

Ein sehr interessantes Zielgen ist das Onkogen *c-myc* (Abb. 4.15-17). Die wachstumsfördernden Eigenschaften dieses Moleküls sowie die Induktion einer reduzierten Wachstumsfaktorabhängigkeit sind im Einklang mit den beobachteten Auswirkungen der EpCAM-Expression. Die Etablierung stabiler Transfektanten birgt jedoch stets das Risiko einer klonalen Selektion, so dass die Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen EpCAM und der *c-myc* Induktion an dieser Stelle unklar blieb. Dieser Punkt wurde mit Hilfe des induzierbaren EpCAM HEK293 Expressionssystem experimentell angegangen. Es zeigte sich, dass die *c-myc* Induktion dem zeitlichen Verlauf der EpCAM-Expression mit einer 1-2 stündigen Verzögerung folgte (Abb. 4.19 und 4.20). Damit war eine klonale Selektion als Ursache für die beobachtete *c-myc* Überexpression ausgeschlossen. Im Gegenteil, die rasche Induktion von *c-myc* beschreibt dieses proto-Onkogen als direktes Zielgen von EpCAM.

Das *c-Myc* Protein nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellzyklus, -wachstum und -differenzierung ein (Cole 1991; Dang 1999). Seine Überexpression

inhibiert eine Zellzyklusarretierung in Folge von wachstumshemmenden Signalen, Differenzierungsstimuli sowie einer Reduzierung von Wachstumsfaktoren (Amati *et al.* 1998). Die beobachtete, reduzierte Wachstumsfaktorabhängigkeit EpCAM-exprimierender Zellen lässt sich daher, zumindest teilweise, auf die Induktion von c-myc zurückführen. Eine deregulierte, konstitutive oder erhöhte Expression von c-myc trägt außerdem zur Progression von Neoplasien bei Mensch und Tier bei (Garte 1993; Eick *et al.* 1996; Luscher 2001). In Burkitt-Lymphomen beispielsweise kommt es zu einer Translokation des c-myc Gens in den Locus der Immunoglobulin Enhancer kodierenden Regionen des Genoms (Leder *et al.* 1983). Als Folge davon kommt es zu einer Expression von c-myc unter der Kontrolle der Immunoglobulin Enhancer und zur unkontrollierten B-Zell Proliferation. Die strikte Regulation der c-myc Expression in gesunden Zellen ist daher zwingend notwendig, um dem Risiko einer Tumorerkrankung vorzubeugen. EpCAM jedoch ist in der Lage, die strikte Regulation von c-myc zu durchbrechen und seine Überexpression zu induzieren. Interessanterweise bestehen auch *in vivo* auffällige Parallelen im Expressionsmuster beider Proteine: sowohl EpCAM (de Boer *et al.* 1999) als auch c-myc (Downs *et al.* 1989) werden im Verlauf der Embryonalentwicklung und post-natal in einigen Geweben, wie Lymphgewebe und Leber (Morello *et al.* 1989), exprimiert. Die Induktion von c-myc durch EpCAM ist daher wahrscheinlich ein zentraler Aspekt der EpCAM-vermittelten Effekte in neoplastischen Epithelzellen. Besonders erwähnenswert ist, dass in Kopf-Hals Karzinomen eine erhöhte c-myc Expression mit dem Tumorstadium und einer schlechten Prognose dieser Tumorpatienten (de la Guardia *et al.* 2001), ähnlich wie es für EpCAM beschrieben wurde, verknüpft ist (Gastl *et al.* 2000).

Auch die rasche Induktion der beiden Cycline A und E durch EpCAM (Abb. 4.21) bestätigt die angesprochene, zentrale Rolle dieses Moleküls. Beide Cycline bilden dabei als regulatorische Untereinheiten zusammen mit den CDKs die Restriktionspunkte, die im Zusammenspiel mit zusätzlichen Proteinen das

Durchlaufen der jeweiligen Phasenübergänge im Zellzyklus ermöglichen oder verhindern (Elledge 1996). Interessanterweise ist bekannt, dass Cycline in einigen Karzinomzellen, wie beispielsweise Mamma- und Schilddrüsen-Karzinomen, überexprimiert sind (Motokura *et al.* 1991; Keyomarsi *et al.* 1993). Eine Überexpression von Cyclin E in ruhenden Fibroblasten alleine jedoch ist nicht ausreichend, diesen Zellen den Eintritt in den Zellzyklus zu erlauben (Perez-Roger *et al.* 1997). Vielmehr ist die zusätzliche Expression von c-myc notwendig. Beide Cycline, A und E sind zudem als c-myc-regulierte Gene beschrieben (Jansen-Durr *et al.* 1993). Die EpCAM-vermittelte Induktion von c-myc und der beiden Cycline könnte es daher Zellen erlauben, die jeweiligen Restriktionspunkte unkontrolliert zu durchlaufen und verstärkt zu proliferieren.

EpCAM-regulierte Proteine, die mittels Proteomanalyse (4.4) identifiziert wurden, leisteten einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der beobachteten Effekte dieses Tumor-assoziierten Antigens. Es zeigte sich, dass EpCAM auch die Expression des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) induziert (Abb. 4.24, 4.25 und 4.26). E-FABP, das auch als Psoriasis-assoziiertes Fettsäure-bindendes Protein (PA-FABP) bezeichnet wird, gehört in die evolutionär konservierte FABP Familie und besitzt u.a. wichtige Funktionen im Transport, der Solubilisierung von langkettigen Fettsäuren (LCFA) als auch in der Bereitstellung signaltransduzierender Zellmetaboliten, wie Eicosanoide und Prostaglandine (Glatz *et al.* 1993; Siegenthaler *et al.* 1993; Siegenthaler *et al.* 1994). Die Induktion von E-FABP könnte daher das verstärkte Wachstum EpCAM-exprimierender Zellen unterstützen, indem ein erhöhter Vorrat an „Baustoffen“ für Plasmamembranen, sowie „Brennstoffe“ für den Fettsäuremetabolismus bereitgestellt werden.

E-FABP wird üblicherweise in der Epidermis, endothelialen Zellen und einigen weiteren Geweben, wie Neuronen exprimiert (Masouye *et al.* 1997; Liu *et al.* 2000). Eine Überexpression von E-FABP ist in einer Vielzahl von Tumoren und bei Psoriasis, einer Hauterkrankung, die mit einer erhöhten Proliferation von

Keratinocyten assoziiert ist (Siegenthaler *et al.* 1993; Masouye *et al.* 1996), zu beobachten. Interessanterweise, wurde auch in chemotherapeutika-resistenten Adenokarzinomen des Pankreas von einer E-FABP Überexpression berichtet (Sinha *et al.* 1999). In murinen Plattenepithelkarzinomen wird ein Homolog von E-FABP überexprimiert (Krieg *et al.* 1993), das eine erhöhte Selenaufnahme gewährleistet (Bansal *et al.* 1989) und so die Aktivität vieler Enzyme, wie der Thioredoxin-Reduktase beeinflusst (Mustacich *et al.* 2000). Selen trägt zum Gleichgewicht des zellulären oxidativen Potentials bei und ist essentiell für schnell proliferierende Zellen. Die Beiträge von E-FABP in schnell proliferierenden Geweben könnten daher vielfältig sein: 1. E-FABP sorgt für die ausreichende Versorgung der Zelle mit LCFA, die für den Aufbau von Plasmamembranen und weitere grundlegende Prozesse in der Zelle, wie beispielweise Fettsäuremetabolismus und Metaboliten-vermittelte Signaltransduktion (Glatz *et al.* 1995) notwendig sind, und 2. E-FABP bindet Selen und trägt so zum Gleichgewicht des zellulären oxidativen Potentials bei, das für schnell proliferierende Zellen essentiell ist.

Die Expression von E-FABP und EpCAM korreliert in Karzinomzelllinien (Abb. 4.29), Primärtumoren (Abb. 4.30) und Tumor-angrenzenden Gewebe (Abb. 4.31). Aufgrund der beobachteten Kinetiken der E-FABP (Abb. 4.27 und 4.28) und c-Myc Expression (Abb. 4.19 und 4.20) nach EpCAM Induktion und der kürzlichen Identifikation von E-FABP als Zielgen von c-myc (Coller *et al.* 2000), liegt der Schluss nahe, dass sich diese Proteine in einer Signalkaskade befinden.

In den Bereich der Zellproliferation, des Metabolismus und der Dedifferenzierung fügt sich die Glyoxalase I als weiteres EpCAM-reguliertes Protein (Abb. 4.32) hervorragend ein. Die Glyoxalase I (Glox I) ist ein zentrales Enzym im Glyoxalase System, welches über die Detoxifizierung von Methylglyoxal, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, und anderer α -Oxoaldehyden im Metabolismus prokaryontischer und eukaryontischer Zellen involviert ist. Methylglyoxal entsteht in der Zelle als primäres Nebenprodukt bei der Umwandlung von intrazellulären

Triosephosphaten (Kavarana *et al.* 1999). Die Anhäufung von Methylglyoxal in der Zelle bewirkt eine Inhibierung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese und damit einen Wachstumsstopp. Beschrieben ist, dass 1. die DNA Synthese durch die kovalente Bindung von Methylglyoxal an die Guanine des DNA Rückrats, 2. die Proteinsynthese am Beginn der Translation und 3. die RNA Synthese durch das Ausbleiben der Reifung der 28S rRNA Untereinheit im Cytoplasma inhibiert wird (White *et al.* 1982). Basierend auf diesen Erkenntnissen werden Glox I Inhibitoren als antitumorale Substanzen eingesetzt (Kavarana *et al.* 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von EpCAM in HEK293 und in Karzinomzelllinien eine posttranslationale Modifikation der Glox I verursacht, welche die Enzymaktivität steigert (Abb. 4.34). Die Aktivitätszunahme der Glox I verhindert eine Anhäufung von Methylglyoxal und kann daher ein erhöhtes Zellwachstum unterstützen. Eine gesteigerte Aktivität der Glox I wurde auch in Kolon-Karzinomen (Ranganathan *et al.* 1993) und in foetalen Geweben beschrieben (Amicarelli *et al.* 1998). Der Vorteil einer erhöhten Glox I Aktivität für EpCAM-exprimierende Tumoren könnte außerdem in einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika liegen. So ist beschrieben, dass Glox I in Leukämiezellen die Apoptoseresistenz gegenüber Chemotherapeutika fördert (Sakamoto *et al.* 2000) und eine Rolle bei der Detoxifikation von Chemotherapeutika einnimmt (Ranganathan *et al.* 1995). Interessanterweise wurde die Ca²⁺-abhängige Calmodulin 1 Kinase (CaM) in Run-On Experimenten (4.3) als EpCAM-induziertes Gen identifiziert. CaM wurde beschrieben als Regulator der Glox I Enzymaktivität (Deswal *et al.* 1999) und ist einer der wichtigsten, intrazellulären Calcium Rezeptoren (Means *et al.* 1980). Die Aktivierung von Glox I könnte daher über die EpCAM-vermittelte Induktion von CaM erfolgen. CaM ist zudem über die Regulation einer großen Anzahl von Enzymen im Zellzyklus und Wachstum beteiligt (Means *et al.* 1991). Es bindet beispielsweise den CDK-Inhibitor p21 und ist in der Aktivierung von CDK 4 involviert (Taules *et al.* 1999). Dadurch ist CaM u.a. an der Regulation der nukleären

Lokalisation von Cyclin D1-CDK 4 im Verlauf der G1-Phase beteiligt (Taulés *et al.* 1998). Zudem ist CaM essentiell für die Phosphorylierung von Rb (Takuwa *et al.* 1993) und erlaubt dadurch ein Durchlaufen des G1-S-Übergangs. Eine weitere Validierung dieses EpCAM-regulierten Gens ist daher ein wichtiger Punkt und derzeit in Arbeit.

In Run-On Experimenten (4.3) wurden weitere EpCAM-regulierte Gene identifiziert, die das wachstumsfördernde, onkogene Potential dieses Moleküls unterstreichen. Die Validierung dieser reproduzierbar regulierten Gene konnte aber aus Zeitmangel nicht erfolgen. Sowohl die regulatorische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase (CKS 1)/CDC28 Kinase, als auch Rho B, ein Mitglied der Ras-Homologen Genfamilie und der Replikationsfaktor RFC 37 wurden durch EpCAM induziert und sind an der Zellzyklusregulation beteiligt. CKS 1, das humane Homolog der cdc28 Proteinkinase von *Saccharomyces cerevisiae*, bindet am Cyclin B-cdc 2 Komplex (Richardson *et al.* 1990) und ist, als Komponente des mitotischen Spindel Restriktionspunkt, an der Regulation der Mitose beteiligt (Rudner *et al.* 2000). Es ist beschrieben, dass die Inaktivierung von Suc 1, dem CKS 1 Homolog aus *Saccharomyces pombe*, zu einem Arrest in der Mitose führt (Moreno *et al.* 1989; Basi *et al.* 1995).

Rho B ist am G1-S Übergang und an der S-Phase des Zellzyklus beteiligt (Zalcman *et al.* 1995) und besitzt ein transformierendes Potential (Ridley 1997). Außerdem ist Rho B über die Interaktion mit verschiedenen Zielproteinen an der Regulation des Actin Zytoskeletts, der Adhäsion und auch der Gentranskription beteiligt (Hall 1998).

Die Funktion von RFC 37 liegt in der Beladung der DNA mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen), der Rekrutierung von DNA-Polymerasen und ist damit essentiell für die DNA-Elongation (Mossi *et al.* 1998). Es gibt außerdem Hinweise, dass RFC 37 an der Regulation der S-Phase und der Telomerenlänge beteiligt ist (Mossi *et al.* 1998). Interessanterweise ist RFC 37 ein c-myc Zielgen (Schuhmacher *et al.* 2001). Somit erhält man über die Signalkaskade EpCAM/c-myc/RFC37 einen weiteren Einblick in die molekularen Grundlagen der EpCAM-vermittelten Effekte.

Die Induktion des CD59 Rezeptors hingegen könnte die Immunevasion von Tumorzellen unterstützen. Es ist beschrieben, dass dieser Rezeptor malignen, neoplastischen Zellen einen Schutz vor Komplementsystem-vermittelter Lyse (Maio *et al.* 1998) verleiht.

Aber auch EpCAM-reprimierte Gene fügen sich in die bislang erworbenen Erkenntnisse über die Funktion dieses Moleküls nahtlos ein: *14-3-3-sigma*, ein Mitglied der 14-3-3 Proteinfamilie, ist ein p53-regulierter Inhibitor der G2/M Progression, dessen ektopische Expression einen G2-Arrest in proliferierenden Zellen bewirkt (Hermeking *et al.* 1997). Die gegenläufige Regulation von *14-3-3-sigma* und CKS 1 schafft eine weitere Voraussetzung den G2/M Restriktionspunkt unkontrolliert zu durchlaufen. Der *Early Growth Response Transkriptionsfaktor* EGR-1 supprimiert zudem eine Transformation über die Induktion von TGF- β und fördert den programmierten Zelltod (Apoptose) über die Induktion von p53 (Liu *et al.* 1998). Die DNase X spielt eine Rolle in Apoptose und DNA-Verdau (Pergolizzi *et al.* 1996) und könnte daher mit einer erhöhten Apoptose Resistenz EpCAM-positiver Zellen einhergehen. CD36 und Zyxin hingegen sind in die Familie der Adhäsionsmoleküle einzuordnen. Zyxin ist ein schwach exprimiertes Phosphoprotein, das vermutlich über die Interaktion mit α -Actinin in die Regulation des Actin-Filament Aufbaus während der Zelldifferenzierung eingreift (Beckerle 1997). Es ist hinreichend beschrieben, dass die Expression von EpCAM mit der Dedifferenzierung von Karzinomzellen einhergeht (Litvinov *et al.* 1996), so dass die Reprimierung von Zyxin einen ersten Einblick in diese funktionelle Eigenschaft von EpCAM gibt. Die Reprimierung des Adhäsionsmoleküls CD36 könnte zudem die Metastasierung EpCAM-exprimierender Tumorzellen fördern (Tsuchida *et al.* 1999; Rofstad *et al.* 2001).

Die Kombination aus Run-On und 2D-PAGE Technik erlaubte somit erstmalig einen Einblick in die EpCAM-vermittelte Signaltransduktion und trug zur partiellen Auf-

schlüsselung EpCAM-induzierter Signalkaskaden bei. Diese sind in Abb. 5.1 zusammengefasst.

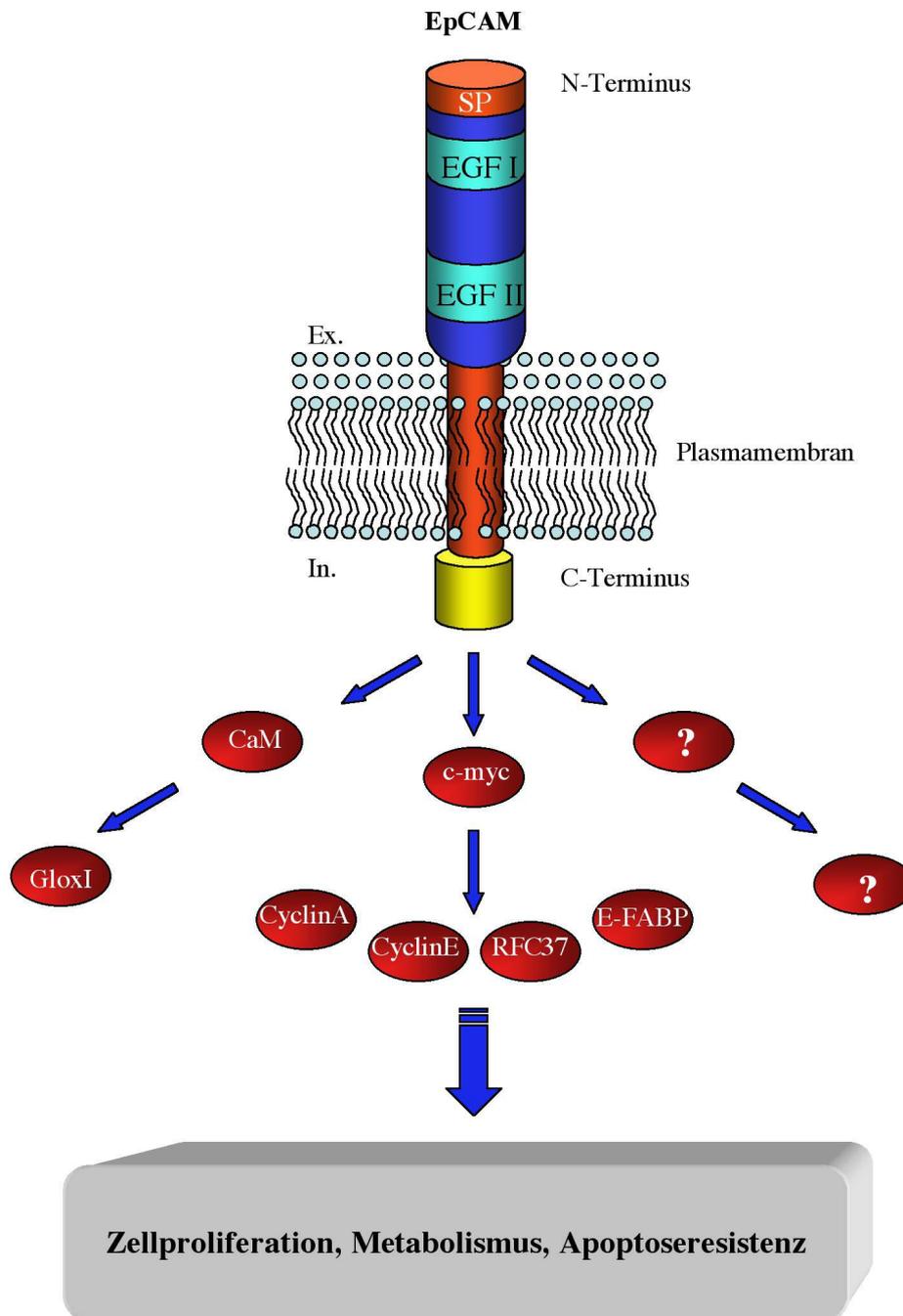


Abb. 5.1: EpCAM-induzierte Signalwege. Dargestellt sind EpCAM (nach Abb. 1.2) und seine potentiellen Zielgene, die zu einer Verstärkung der Zellproliferation, Erhöhung des Metabolismus und möglicherweise einer Apoptoseresistenz beitragen.

5.4 EpCAM: Ein Onkogen?

Die erarbeiteten Erkenntnisse unterstreichen eine aktive Beteiligung von EpCAM in der Karzinogenese, die für klassische Onkogene wie z.B. EGF-R (Di Fiore *et al.* 1987) und Her2-neu (Kokai *et al.* 1989) bereits beschrieben wurde. Interessanterweise zeigen die drei Transmembranproteine EpCAM, EGF-R und Her2/neu konservierte Motive. EpCAM besitzt, analog zu EGF-R und Her2/neu, eine Cystein-reiche Domäne im N-Terminus, in der zusätzlich zwei EGF-ähnliche Wiederholungen lokalisiert sind (Balzar *et al.* 1999). Die Cystein-reiche Region ist typisch für Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) und ist sowohl an der Strukturbildung der extrazellulären Domäne als auch der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt (Burke *et al.* 1998). Die Aktivierung solcher Rezeptoren erfolgt in gesunden Zellen stringent über eine Ligand-vermittelte Dimerisierung. Im Fall einer onkogenen Aktivierung führen jedoch Mutationen häufig zur konstitutiven Dimerisierung und damit zur permanenten Aktivierung der cytoplasmatischen, katalytischen Domäne, wie es bei Met-R, EGF-R und Her2/neu Rezeptoren beschrieben ist (Rodrigues *et al.* 1994; Robertson *et al.* 2000). Kürzlich wurde berichtet, dass EpCAM *in vitro* als Dimer und Tetramer vorliegt (Trebak *et al.* 2001). Die Oligomerisierung wird durch die zweite EGF-ähnliche Wiederholung vermittelt (Balzar *et al.* 2001).

Ein weiterer Aspekt, der zur Aufklärung der Funktion beitrug, war die kürzliche Identifikation eines extrazellulären Liganden EpCAMs, des Leukocyten-assoziierten Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptors LAIR1 (Meyaard *et al.* 2001). LAIR1 wird in einer Reihe von Immunzellen exprimiert und es wird vermutet, dass dieser mittels cytoplasmatischer „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM)“ inhibitorische Signale in Zellen transduziert. Es ist daher vorstellbar, dass EpCAM-exprimierende Tumoren infiltrierende Leukozyten inhibieren und sich auf diese Weise einer Immunantwort entziehen. EpCAM könnte daher in Tumorzellen eine duale Rolle übernehmen: 1. die Induktion von Proliferation und Dedifferenzierung durch die Aktivierung von c-myc, Cyclin A und E und weiteren Genen, und 2. die

Inhibierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) durch die Aktivierung von LAIR1 auf diesen Zellen. Die Induktion des CD59 Rezeptor durch EpCAM bekräftigt zudem die Immunevasion von EpCAM-positiven Tumorzellen.

Zur Aufklärung des onkogenen Potentials von EpCAM wurden Soft-Agarose Experimente durchgeführt (Auvinen *et al.* 1992). HEK293 Kontrollzellen zeigten in Soft-Agarose aufgrund der Expression der beiden adenoviralen Onkogene E1A und E1B eine bereits beschriebene schwache Koloniebildung (Graham *et al.* 1977). Die Expression von EpCAM in diesen Zellen beschleunigte und erhöhte jedoch die Frequenz der Koloniebildung (Abb. 4.35 und 4.36). Die Induktion von c-myc durch EpCAM und die gleichzeitige Inhibierung von p53 und Rb durch die beiden adenoviralen Proteine E1A und E1B könnten maßgeblich zu diesem Effekt beitragen. Ähnlich wurde beschrieben, dass die Expression von Ras, SV40 T-Antigen und eines weiteren Proteins, wie z.B der regulatorischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) ausreichend ist, primäre humane Epithelzellen zu transformieren (Elenbaas *et al.* 2001). Es ist zudem anzunehmen, dass weitere EpCAM-regulierte Gene, die mit Wachstum, Zellzyklusregulation und Transformationssuppression einhergehen, wie Rho B und EGR-1, wahrscheinlich an den beobachteten Effekten beteiligt sind.

Außerdem wurde die Koloniebildung von NIH3T3-Fibroblasten in An- und Abwesenheit von EpCAM untersucht. Parentale NIH3T3-Zellen wachsen nicht in Soft-Agarose, sondern sind auf die Adhäsion an Zellkulturoberflächen angewiesen (Blondel *et al.* 1990). EpCAM-exprimierende NIH3T3-Transfektanten zeigten eine Koloniebildung, im Vergleich zu Raf-transformierten NIH3T3-Zellen aber mit geringerer Frequenz (Abb. 4.37). Die erhöhte Proliferation, der verstärkte Metabolismus und die Koloniebildung in Soft-Agarose Experimenten, sowohl in humanen Epithelzellen wie auch in murinen Fibroblasten, belegen erstmals eine zentrale Rolle von EpCAM in der Karzinogenese. Derzeitige Arbeiten sollen deshalb die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe von Mausexperimenten *in vivo* bestätigen. Zu diesem Zweck sollen EpCAM-exprimierende bzw. Kontroll-NIH3T3-

Transfektanten (4.1) in SCID Mäuse („severe combined immunodeficiency) injiziert (Mueller *et al.* 1991), und eine Tumorbildung anschließend verfolgt werden. Damit wäre das onkogene Potential von EpCAM erstmals *in vivo* gezeigt.

5.5 EpCAM in gesundem Epithel und Karzinomen

Der Einfluss von EpCAM auf die Proliferation und seine Über- bzw. *de novo* Expression in Karzinomen lies die Frage aufkommen: Gibt es funktionell unterschiedliche Varianten von EpCAM in gesundem Epithel und Karzinomen? Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass eine gewebsspezifische posttranslationale Modifikation von EpCAM erfolgt, die zu unterschiedlichen Varianten führt: Sowohl in Karzinomzelllinien als auch in primären HNO-Karzinomen wird EpCAM als N-glykosyliertes Protein exprimiert. Im Gegensatz dazu war EpCAM in gesundem autologem Schilddrüsenepithel unglykosyliert (Abb.4.38-40). Weiterführende Untersuchungen aus unserem Labor bestätigten zudem an 40 HNO-Primärkarzinomen und 21 autologen Pärchen, bestehend aus gesundem Schilddrüsengewebe und HNO-Karzinombiopsie, diese Befunde. In 17 von 21 autologen Pärchen (81%) war EpCAM N-glykosyliert, wovon 11 (64.3%) keine Glykosylierung in der gesunden Schilddrüse und 6 eine schwache Glykosylierung von EpCAM aufwiesen. Bei drei von 21 Fällen (14.3%) war EpCAM in beiden untersuchten Geweben gleichermaßen glykosyliert und in nur einem Fall (4.8%) in der Schilddrüse stärker glykosyliert. Diese gewebsspezifische Modifikation korrelierte dabei nicht mit dem Tumorstadium und der Lokalisation (Dr. Christof Pauli; persönliche Mitteilung). Das gewebsspezifische Glykosylierungsmuster zeigte sich ebenfalls in Karzinomen anderer Herkunft (Magen, Kolon; Dr. Christof Pauli; persönliche Mitteilung).

Diese beobachteten, differenziellen Modifikationen könnten Einfluss auf die Funktion von EpCAM in gesundem und „erkranktem“ Gewebe nehmen. Es wurde beschrieben, dass die Glykosylierung von Proteinen eine wichtige Rolle in der gegen-

seitigen Erkennung von Liganden und Rezeptoren, wie beispielsweise der Fcγ-Rezeptoren, Immunglobuline, CD 44 und extrazellulärer Matrixproteine, spielt (Rudzki *et al.* 1997; Katoh *et al.* 1999; Mimura *et al.* 2001; Radaev *et al.* 2001). Die glykosylierten und unglykosylierten EpCAM-Varianten könnten daher Unterschiede in der Bindung des bereits erwähnten LAIR-1 Proteins als auch anderer Liganden besitzen. Solch eine veränderte Liganderkennung kann zudem, wie es für den CD44 Rezeptor gezeigt wurde, einen starken Einfluss auf die Invasivität und das metastatische Potential von Tumorzellen nehmen (Rudzki *et al.* 1997). Es ist daher in zukünftigen Arbeiten geplant, EpCAM-Varianten zu generieren, die aufgrund mutierter Konsensussequenzen nicht mehr glykosyliert werden können. Nach der Etablierung stabiler Transfektanten können die Auswirkungen dieser Mutationen auf das Wachstum im Vergleich zu Wildtyp-EpCAM analysiert werden.

Die beschriebene, tumorspezifische Modifikation von EpCAM bietet zudem neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie von Karzinomen. Die Herstellung eines Antikörpers, der spezifisch die glykosylierten Formen von EpCAM erkennt, würde es erlauben, gesundes von entartetem Gewebe zu unterscheiden. Dies wurde für andere Tumor-assoziierte Moleküle, wie Mucin (MUC-1) (Taylor-Papadimitriou *et al.* 1999) beschrieben. Zudem würde ein solcher Antikörper die Spezifität von Immuntherapien, in denen EpCAM als Zielmolekül dient, deutlich verbessern.

6. Zusammenfassung

Die Funktion des epithelialen Adhäsionsmoleküls EpCAM ist, obwohl das Protein als Tumormarker und Zielantigen im Rahmen von Immuntherapien verwendet wird, nur unzureichend erforscht. Es existieren *bis dato* nur deskriptive Daten, die eine EpCAM-vermittelte Zelladhäsion und eine Korrelation dieses Moleküls mit der Proliferation zeigen. Diese Merkmale suggerieren eine aktive Beteiligung EpCAMs an der Proliferation über die Transduktion mitogener Signale in den Zellkern. Formelle Beweise für diese Hypothese fehlen jedoch. In meiner Arbeit habe ich daher den direkten Einfluss von EpCAM auf das Zellwachstum und die Genexpression analysiert, um einen Einblick in die Rolle dieses Moleküls in der Karzinogenese zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden adequate zelluläre Systeme etabliert, die sowohl eine konstitutive bzw. konditionale Expression als auch die Inhibierung von EpCAM erlaubten.

Es zeigte sich, dass die Expression von EpCAM unabhängig von Zelltyp und Spezies das Wachstum und den Metabolismus deutlich verstärkte. Die Inhibierung von EpCAM in Karzinomzellen resultierte sogar nahezu in einem Proliferationsstopp. Die Koloniebildung EpCAM-exprimierender HEK293 und NIH3T3-Zellen in Soft-Agarose Experimenten bekräftigte das onkogene Potential dieses Moleküls. Dies wurde zudem durch die Identifizierung EpCAM-regulierter Gene aus unterschiedlichen funktionellen Bereichen, wie der Zellzyklusregulation, des Stoffwechsels, der DNA-Synthese und der Transformationssuppression untermauert. Insbesondere aber die rasche Induktion des Onkoproteins c-myc, einem Hauptdarsteller in der Wachstumsregulation, bestätigte dies eindrucksvoll.

Die spezifische Inhibierung EpCAMs könnte daher im Rahmen neuer Therapieformen ein Fortschreiten der Karzinogenese hemmen. Interessanterweise war in dieser Arbeit eine gewebspezifische Modifizierung von EpCAM nachweisbar: in

gesundem Gewebe war EpCAM nicht oder nur schwach glykosyliert, wohingegen es in Karzinomen stark glykosyliert vorlag. Die Aufklärung der Bedeutung dieser Modifikation könnte helfen etwaige funktionelle Unterschiede dieses Moleküls in gesundem und Tumorgewebe zu charakterisieren und eine spezifische Inhibierung in Tumorzellen ermöglichen. Die kürzliche Identifizierung von EpCAM als Ligand des „leukocyten-assoziierten Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor“ LAIR1 ließ zudem auf eine Rolle dieses Moleküls bei der Immunevasion schließen. Diese Hypothese konnte durch die EpCAM-vermittelte Induktion des CD 59 Rezeptors untermauert werden.

Es ist daher vorstellbar, dass EpCAM eine duale Rolle in Karzinomzellen übernimmt:

1. Die Induktion einer reduzierten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, einer Proliferation, einer Dedifferenzierung, und eines verstärkten Metabolismus über die Aktivierung von c-myc, Cyclin A und E, E-FABP, Giox I und weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Genen. 2. Die Unterstützung der Immunevasion über die Bindung und Aktivierung von LAIR-1 sowie der Induktion von CD59.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals die essentielle Rolle EpCAMs in Karzinomzellen und dessen direkter Einfluss auf Genexpression und Proliferation demonstriert.

7. Literatur

- Amati, B., Alevizopoulos, K. und Vlach, J.** (1998). "Myc and the cell cycle." Front Biosci **3**: D250-68.
- Amicarelli, F., Sacchetta, P., Colafarina, S., Angelucci, S., Miranda, M. und Di Ilio, C.** (1998). "Glyoxalases activity during Bufo bufo embryo development." Mech Ageing Dev **100**(3): 261-7.
- Anderson, R., Schaible, K., Heasman, J. und Wylie, C.** (1999). "Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line." J Reprod Fertil **116**(2): 379-84.
- Appella, E., Weber, I. T. und Blasi, F.** (1988). "Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins." FEBS Lett **231**(1): 1-4.
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C. und Holtta, E.** (1992). "Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation." Nature **360**(6402): 355-8.
- Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O. und Litvinov, S. V.** (1998). "Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule." Mol Cell Biol **18**(8): 4833-43.
- Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I. H., Rees-Bakker, H. A., Prins, F. A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S. O., Fleuren, G. J. und Litvinov, S. V.** (2001). "Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions." Mol Cell Biol **21**(7): 2570-80.
- Balzar, M., Prins, F. A., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O. und Litvinov, S. V.** (1999). "The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM." Exp Cell Res **246**(1): 108-21.
- Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J. und Litvinov, S. V.** (1999). "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)." J Mol Med **77**(10): 699-712.
- Bansal, M. P., Cook, R. G., Danielson, K. G. und Medina, D.** (1989). "A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein." J Biol Chem **264**(23): 13780-4.
- Basi, G. und Draetta, G.** (1995). "p13suc1 of Schizosaccharomyces pombe regulates two distinct forms of the mitotic cdc2 kinase." Mol Cell Biol **15**(4): 2028-36.
- Basu, A., Goldenberg, D. M. und Stein, R.** (1995). "The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7-3G11, is phosphorylated on serine 303." Int J Cancer **62**(4): 472-9.
- Beckerle, M. C.** (1997). "Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion." Bioessays **19**(11): 949-57.

- Bergsagel, P. L., Victor-Kobrin, C., Timblin, C. R., Trepel, J. und Kuehl, W. M. (1992). "A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells." *J Immunol* **148**(2): 590-6.
- Bishop, J. M. (1991). "Molecular themes in oncogenesis." *Cell* **64**(2): 235-48.
- Bjork, P., Jonsson, U., Svedberg, H., Larsson, K., Lind, P., Dillner, J., Hedlund, G., Dohlsten, M. und Kalland, T. (1993). "Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody." *J Biol Chem* **268**(32): 24232-41.
- Blondel, B., Talbot, N., Merlo, G. R., Wychowski, C., Yokozaki, H., Valverius, E. M., Salomon, D. S. und Bassin, R. H. (1990). "Efficient induction of focus formation in a subclone of NIH3T3 cells by c-myc and its inhibition by serum and by growth factors." *Oncogene* **5**(6): 857-65.
- Borkowski, T. A., Nelson, A. J., Farr, A. G. und Udey, M. C. (1996). "Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells." *Eur J Immunol* **26**(1): 110-4.
- Braun, S., Hepp, F., Kentenich, C. R., Janni, W., Pantel, K., Riethmuller, G., Willgeroth, F. und Sommer, H. L. (1999). "Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow." *Clin Cancer Res* **5**(12): 3999-4004.
- Bumol, T. F., Marder, P., DeHerdt, S. V., Borowitz, M. J. und Apelgren, L. D. (1988). "Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the KS1/4 monoclonal antibody." *Hybridoma* **7**(4): 407-15.
- Burke, C. L. und Stern, D. F. (1998). "Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface." *Mol Cell Biol* **18**(9): 5371-9.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S. und Cerami, A. (1986). "Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1670-4.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1999). "14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage." *Nature* **401**(6753): 616-20.
- Chaubal, S., Wollenberg, B., Kastenbauer, E. und Zeidler, R. (1999). "Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN." *Anticancer Res* **19**(3B): 2237-42.
- Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R. und Lee, W. H. (1990). "Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene." *Science* **250**(4987): 1576-80.
- Chino, O., Kijima, H., Shimada, H., Nishi, T., Tanaka, H., Kise, Y., Kenmochi, T., Himeno, S., Machimura, T., Tanaka, M., Inokuchi, S., Tajima, T., Osamura, R. Y. und Makuuchi, H. (2001). "Accumulation of p53 in esophageal squamous cell carcinoma." *Int J Mol Med* **8**(4): 359-63.

- Cirulli, V., Crisa, L., Beattie, G. M., Mally, M. I., Lopez, A. D., Fannon, A., Ptasznik, A., Inverardi, L., Ricordi, C., Deerinck, T., Ellisman, M., Reisfeld, R. A. und Hayek, A. (1998).** "KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development." *J Cell Biol* **140**(6): 1519-34.
- Cirulli, V., Ricordi, C. und Hayek, A. (1995).** "E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata." *Transplant Proc* **27**(6): 3335.
- Colby, W. W., Chen, E. Y., Smith, D. H. und Levinson, A. D. (1983).** "Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29." *Nature* **301**(5902): 722-5.
- Cole, M. D. (1991).** "Myc meets its Max." *Cell* **65**(5): 715-6.
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. und Golub, T. R. (2000).** "Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3260-5.
- Cooper, J. A. und Whyte, P. (1989).** "RB and the cell cycle: entrance or exit?" *Cell* **58**(6): 1009-11.
- Coughlin, S. R., Lee, W. M., Williams, P. W., Giels, G. M. und Williams, L. T. (1985).** "c-myc gene expression is stimulated by agents that activate protein kinase C and does not account for the mitogenic effect of PDGF." *Cell* **43**(1): 243-51.
- Dang, C. V. (1999).** "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." *Mol Cell Biol* **19**(1): 1-11.
- Davis, C. G. (1990).** "The many faces of epidermal growth factor repeats." *New Biol* **2**(5): 410-9.
- de Boer, C. J., van Krieken, J. H., Janssen-van Rhijn, C. M. und Litvinov, S. V. (1999).** "Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver." *J Pathol* **188**(2): 201-206.
- de la Guardia, C., Casiano, C. A., Trinidad-Pinedo, J. und Baez, A. (2001).** "CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas." *Head Neck* **23**(2): 104-12.
- Deswal, R. und Sopory, S. K. (1999).** "Glyoxalase I from Brassica juncea is a calmodulin stimulated protein." *Biochim Biophys Acta* **1450**(3): 460-7.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., Schlessinger, J. und Aaronson, S. A. (1987).** "Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells." *Cell* **51**(6): 1063-70.
- Downs, K. M., Martin, G. R. und Bishop, J. M. (1989).** "Contrasting patterns of myc and N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo." *Genes Dev* **3**(6): 860-9.

- Durbin, H., Rodrigues, N. und Bodmer, W. F.** (1990). "Further characterization, isolation and identification of the epithelial cell-surface antigen defined by monoclonal antibody AUA1." Int J Cancer **45**(3): 562-5.
- Eick, D. und Hermeking, H.** (1996). "Viruses as pacemakers in the evolution of defence mechanisms against cancer." Trends Genet **12**(1): 4-6.
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C. und Weinberg, R. A.** (2001). "Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells." Genes Dev **15**(1): 50-65.
- Elledge, S. J.** (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science **274**(5293): 1664-72.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. und Delecluse, H. J.** (2000). "The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators." Embo J **19**(12): 3080-9.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
- Fernsten, P. D., Pekny, K. W., Reisfeld, R. A. und Walker, L. E.** (1990). "Biosynthesis and glycosylation of the carcinoma-associated antigen recognized by monoclonal antibody KS1/4." Cancer Res **50**(15): 4656-63.
- Fornaro, M., Dell'Arciprete, R., Stella, M., Bucci, C., Nutini, M., Capri, M. G. und Alberti, S.** (1995). "Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas." Int J Cancer **62**(5): 610-8.
- Garte, S. J.** (1993). "The c-myc oncogene in tumor progression." Crit Rev Oncog **4**(4): 435-49.
- Gastl, G., Spizzo, G., Obrist, P., Dunser, M. und Mikuz, G.** (2000). "Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival." Lancet **356**(9246): 1981-2.
- Giaccia, A. J. und Kastan, M. B.** (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." Genes Dev **12**(19): 2973-83.
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Munz, M., Wollenberg, B. und Zeidler, R.** (2001). "Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule." Cancer **92**(3): 620-8.
- Glatz, J. F., Borchers, T., Spener, F. und van der Vusse, G. J.** (1995). "Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **52**(2-3): 121-7.
- Glatz, J. F., Vork, M. M., Cistola, D. P. und van der Vusse, G. J.** (1993). "Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **48**(1): 33-41.

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G. und Mello, C. C.** (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." Cell **106**(1): 23-34.
- Hall, A.** (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hannahan, D.** (1985). "Techniques for Transformation of *E. coli*." IRL Press, Oxford: 109-135.
- Hartwell, L.** (1992). "Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells." Cell **71**(4): 543-6.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1997). "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." Mol Cell **1**(1): 3-11.
- High, A. S., Robinson, P. A. und Klein, C. E.** (1996). "Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias." J Oral Pathol Med **25**(1): 10-3.
- Hopkins, C. R.** (1992). "Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter." Trends Biochem Sci **17**(1): 27-32.
- Hunter, T.** (1997). "Oncoprotein networks." Cell **88**(3): 333-46.
- Iritani, B. M. und Eisenman, R. N.** (1999). "c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13180-5.
- Jansen-Durr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. und Eilers, M.** (1993). "Differential modulation of cyclin gene expression by MYC." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3685-9.
- Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D. und Muller, M.** (1995). "Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury." Histochem Cell Biol **103**(4): 281-6.
- Kastrinakis, W. V., Ramchurren, N., Rieger, K. M., Hess, D. T., Loda, M., Steele, G. und Summerhayes, I. C.** (1995). "Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression." Oncogene **11**(4): 647-52.
- Katoh, S., Miyagi, T., Taniguchi, H., Matsubara, Y., Kadota, J., Tominaga, A., Kincade, P. W., Matsukura, S. und Kohno, S.** (1999). "Cutting edge: an inducible sialidase regulates the hyaluronic acid binding ability of CD44-bearing human monocytes." J Immunol **162**(9): 5058-61.

- Kavarana, M. J., Kovaleva, E. G., Creighton, D. J., Wollman, M. B. und Eiseman, J. L. (1999). "Mechanism-based competitive inhibitors of glyoxalase I: intracellular delivery, in vitro antitumor activities, and stabilities in human serum and mouse serum." J Med Chem **42**(2): 221-8.
- Keyomarsi, K. und Pardee, A. B. (1993). "Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1112-6.
- Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998). "Landscaping the cancer terrain." Science **280**(5366): 1036-7.
- Klein, C. E., Cordon-Cardo, C., Soehnchen, R., Cote, R. J., Oettgen, H. F., Eisinger, M. und Old, L. J. (1987). "Changes in cell surface glycoprotein expression during differentiation of human keratinocytes." J Invest Dermatol **89**(5): 500-6.
- Kokai, Y., Myers, J. N., Wada, T., Brown, V. I., LeVea, C. M., Davis, J. G., Dobashi, K. und Greene, M. I. (1989). "Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts." Cell **58**(2): 287-92.
- Krieg, P., Feil, S., Furstenberger, G. und Bowden, G. T. (1993). "Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein. Identification and characterization of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin." J Biol Chem **268**(23): 17362-9.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. und Taub, R. (1983). "Translocations among antibody genes in human cancer." Science **222**(4625): 765-71.
- Lee, W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y. und Lee, E. Y. (1987). "Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence." Science **235**(4794): 1394-9.
- Lenarcic, B., Ritonja, A., Strukelj, B., Turk, B. und Turk, V. (1997). "Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain." J Biol Chem **272**(21): 13899-903.
- Liao, D. J. und Dickson, R. B. (2000). "c-Myc in breast cancer." Endocr Relat Cancer **7**(3): 143-64.
- Linnenbach, A. J., Seng, B. A., Wu, S., Robbins, S., Scollon, M., Pyc, J. J., Druck, T. und Huebner, K. (1993). "Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes." Mol Cell Biol **13**(3): 1507-15.
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., Fleuren, G. J. und Warnaar, S. O. (1997). "Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins." J Cell Biol **139**(5): 1337-48.
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J. und Warnaar, S. O. (1996). "Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the

- disappearance of markers for terminal differentiation." Am J Pathol **148**(3): 865-75.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J. und Warnaar, S. O.** (1994). "Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule." J Cell Biol **125**(2): 437-46.
- Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E. und Mercola, D.** (1998). "Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1." Cancer Gene Ther **5**(1): 3-28.
- Liu, Y., Longo, L. D. und De Leon, M.** (2000). "In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain." Brain Res **852**(1): 16-27.
- Luscher, B.** (2001). "Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network." Gene **277**(1-2): 1-14.
- Maio, M., Brasoveanu, L. I., Coral, S., Sigalotti, L., Lamaj, E., Gasparollo, A., Visintin, A., Altomonte, M. und Fonsatti, E.** (1998). "Structure, distribution, and functional role of protectin (CD59) in complement-susceptibility and in immunotherapy of human malignancies (Review)." Int J Oncol **13**(2): 305-18.
- Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J.** (1989). "Molecular Cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Press, New York.
- Mann, K., Deutzmann, R., Aumailley, M., Timpl, R., Raimondi, L., Yamada, Y., Pan, T. C., Conway, D. und Chu, M. L.** (1989). "Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells." Embo J **8**(1): 65-72.
- Marcu, K. B., Bossone, S. A. und Patel, A. J.** (1992). "myc function and regulation." Annu Rev Biochem **61**: 809-60.
- Masouye, I., Hagens, G., Van Kuppevelt, T. H., Madsen, P., Saurat, J. H., Veerkamp, J. H., Pepper, M. S. und Siegenthaler, G.** (1997). "Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein." Circ Res **81**(3): 297-303.
- Masouye, I., Saurat, J. H. und Siegenthaler, G.** (1996). "Epidermal fatty-acid-binding protein in psoriasis, basal and squamous cell carcinomas: an immunohistological study." Dermatology **192**(3): 208-13.
- Means, A. R. und Dedman, J. R.** (1980). "Calmodulin--an intracellular calcium receptor." Nature **285**(5760): 73-7.
- Means, A. R., VanBerkum, M. F., Bagchi, I., Lu, K. P. und Rasmussen, C. D.** (1991). "Regulatory functions of calmodulin." Pharmacol Ther **50**(2): 255-70.
- Meyaard, L., van Der Vuurst De Vries, A. R., de Ruiter, T., Lanier, L. L., Phillips, J. H. und Clevers, H.** (2001). "The epithelial cellular adhesion molecule (ep-cam) is a ligand for the leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor (lair)." J Exp Med **194**(1): 107-12.

- Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S. P., Goodall, M. und Jefferis, R. (2001). "Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIB binding." *J Biol Chem* **276**(49): 45539-47.
- Mitsumoto, A., Kim, K. R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nakagawa, Y. (1999). "Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein." *Biochem J* **344 Pt 3**: 837-44.
- Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J. und Moller, P. (1987). "Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues." *Cancer Res* **47**(11): 2883-91.
- Morello, D., Asselin, C., Lavenu, A., Marcu, K. B. und Babinet, C. (1989). "Tissue-specific post-transcriptional regulation of c-myc expression in normal and H-2K/human c-myc transgenic mice." *Oncogene* **4**(8): 955-61.
- Moreno, S., Hayles, J. und Nurse, P. (1989). "Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis." *Cell* **58**(2): 361-72.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mossi, R. und Hubscher, U. (1998). "Clamping down on clamps and clamp loaders--the eukaryotic replication factor C." *Eur J Biochem* **254**(2): 209-16.
- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Juppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. und Arnold, A. (1991). "A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene." *Nature* **350**(6318): 512-5.
- Mueller, B. M. und Reisfeld, R. A. (1991). "Potential of the scid mouse as a host for human tumors." *Cancer Metastasis Rev* **10**(3): 193-200.
- Mustacich, D. und Powis, G. (2000). "Thioredoxin reductase." *Biochem J* **346 Pt 1**: 1-8.
- Nelson, A. J., Dunn, R. J., Peach, R., Aruffo, A. und Farr, A. G. (1996). "The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells." *Eur J Immunol* **26**(2): 401-8.
- Nykanen, A., Haley, B. und Zamore, P. D. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* **107**(3): 309-21.
- Ostermeyer, A. G., Runko, E., Winkfield, B., Ahn, B. und Moll, U. M. (1996). "Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15190-4.
- Perez, M. S. und Walker, L. E. (1989). "Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker." *J Immunol* **142**(10): 3662-7.
- Perez-Roger, I., Solomon, D. L., Sewing, A. und Land, H. (1997). "Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and

- inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes." *Oncogene* **14**(20): 2373-81.
- Pergolizzi, R., Appierto, V., Bosetti, A., DeBellis, G. L., Roviada, E. und Biunno, I.** (1996). "Cloning of a gene encoding a DNase I-like endonuclease in the human Xq28 region." *Gene* **168**(2): 267-70.
- Piyathilake, C. J., Frost, A. R., Weiss, H., Manne, U., Heimburger, D. C. und Grizzle, W. E.** (2000). "The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung." *Hum Pathol* **31**(4): 482-7.
- Poczatek, R. B., Myers, R. B., Manne, U., Oelschlagel, D. K., Weiss, H. L., Bostwick, D. G. und Grizzle, W. E.** (1999). "Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia." *J Urol* **162**(4): 1462-6.
- Radaev, S. und Sun, P. D.** (2001). "Recognition of IgG by Fc gamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors." *J Biol Chem* **276**(19): 16478-83.
- Ranganathan, S. und Tew, K. D.** (1993). "Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon." *Biochim Biophys Acta* **1182**(3): 311-6.
- Ranganathan, S., Walsh, E. S. und Tew, K. D.** (1995). "Glyoxalase I in detoxification: studies using a glyoxalase I transfectant cell line." *Biochem J* **309**(Pt 1): 127-31.
- Renan, M. J.** (1993). "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." *Mol Carcinog* **7**(3): 139-46.
- Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P. und Reed, S. I.** (1990). "Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." *Genes Dev* **4**(8): 1332-44.
- Ridley, A. J.** (1997). "The GTP-binding protein Rho." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(11): 1225-9.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H. und Lindhofer, H.** (2001). "Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3)." *J Histochem Cytochem* **49**(7): 911-7.
- Riley, D., Carragher, N. O., Frame, M. C. und Wyke, J. A.** (2001). "The mechanism of cell cycle regulation by v-Src." *Oncogene* **20**(42): 5941-50.
- Ripani, E., Sacchetti, A., Corda, D. und Alberti, S.** (1998). "Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer." *Int J Cancer* **76**(5): 671-6.
- Robertson, S. C., Tynan, J. A. und Donoghue, D. J.** (2000). "RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad." *Trends Genet* **16**(6): 265-71.
- Rodrigues, G. A. und Park, M.** (1994). "Oncogenic activation of tyrosine kinases." *Curr Opin Genet Dev* **4**(1): 15-24.
- Rofstad, E. K. und Graff, B. A.** (2001). "Thrombospondin-1-mediated metastasis suppression by the primary tumor in human melanoma xenografts." *J Invest Dermatol* **117**(5): 1042-9.

- Rotman, G. und Shiloh, Y.** (1999). "ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress." Oncogene **18**(45): 6135-44.
- Rudner, A. D., Hardwick, K. G. und Murray, A. W.** (2000). "Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast." J Cell Biol **149**(7): 1361-76.
- Rudzki, Z. und Jothy, S.** (1997). "CD44 and the adhesion of neoplastic cells." Mol Pathol **50**(2): 57-71.
- Sakamoto, H., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Hashimoto, Y., Naito, M. und Tsuruo, T.** (2000). "Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis." Blood **95**(10): 3214-8.
- Schiechl, H., Dohr, G. und Eherer, A.** (1986). "Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1." J Histochem Cytochem **34**(12): 1659-65.
- Schlessinger, J.** (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-25.
- Schon, M. P., Schon, M., Mattes, M. J., Stein, R., Weber, L., Alberti, S. und Klein, C. E.** (1993). "Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4." Int J Cancer **55**(6): 988-95.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H. und Eick, D.** (2001). "The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc." Nucleic Acids Res **29**(2): 397-406.
- Shaw, G. und Kamen, R.** (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." Cell **46**(5): 659-67.
- Sherr, C. J.** (1996). "Cancer cell cycles." Science **274**(5293): 1672-7.
- Siegenthaler, G., Hotz, R., Chatellard-Gruaz, D., Didierjean, L., Hellman, U. und Saurat, J. H.** (1994). "Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro." Biochem J **302**(Pt 2): 363-71.
- Siegenthaler, G., Hotz, R., Chatellard-Gruaz, D., Jaconi, S. und Saurat, J. H.** (1993). "Characterization and expression of a novel human fatty acid-binding protein: the epidermal type (E-FABP)." Biochem Biophys Res Commun **190**(2): 482-7.
- Simon, B., Podolsky, D. K., Moldenhauer, G., Isselbacher, K. J., Gattoni-Celli, S. und Brand, S. J.** (1990). "Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): 2755-9.
- Simon, M. A.** (2000). "Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals." Cell **103**(1): 13-5.
- Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D. und Lage, H.** (1999). "Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-

- 3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas." Electrophoresis **20**(14): 2952-60.
- Spruck, C. H., Won, K. A. und Reed, S. I.** (1999). "Deregulated cyclin E induces chromosome instability." Nature **401**(6750): 297-300.
- Stein, R., Basu, A., Goldenberg, D. M., Lloyd, K. O. und Mattes, M. J.** (1994). "Characterization of cluster 13: the epithelial/carcinoma antigen recognized by MAb RS7." Int J Cancer Suppl **8**: 98-102.
- Stern, D. F., Roberts, A. B., Roche, N. S., Sporn, M. B. und Weinberg, R. A.** (1986). "Differential responsiveness of myc- and ras-transfected cells to growth factors: selective stimulation of myc-transfected cells by epidermal growth factor." Mol Cell Biol **6**(3): 870-7.
- Stewart, J. M.** (2000). "The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting." Cell Mol Life Sci **57**(10): 1345-59.
- Strohmaier, H., Spruck, C. H., Kaiser, P., Won, K. A., Sangfelt, O. und Reed, S. I.** (2001). "Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line." Nature **413**(6853): 316-22.
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H. und Linnenbach, A. J.** (1990). "Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3542-6.
- Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M. und Takuwa, Y.** (1993). "Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts." J Biol Chem **268**(1): 138-45.
- Tandon, A. K., Clark, G. M., Chamness, G. C. und McGuire, W. L.** (1990). "Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer." Cancer Res **50**(11): 3317-21.
- Taules, M., Rius, E., Talaya, D., Lopez-Girona, A., Bachs, O. und Agell, N.** (1998). "Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-Cdk4 during G1." J Biol Chem **273**(50): 33279-86.
- Taules, M., Rodriguez-Vilarrupla, A., Rius, E., Estanyol, J. M., Casanovas, O., Sacks, D. B., Perez-Paya, E., Bachs, O. und Agell, N.** (1999). "Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization." J Biol Chem **274**(35): 24445-8.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D. W. und Dalziel, M.** (1999). "MUC1 and cancer." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 301-13.
- Thampoe, I. J., Ng, J. S. und Lloyd, K. O.** (1988). "Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing." Arch Biochem Biophys **267**(1): 342-52.
- Trebak, M., Begg, G. E., Chong, J. M., Kanazireva, E. V., Herlyn, D. und 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." J Biol Chem **276**(3): 2299-309.
- Tsubura, A., Senzaki, H., Sasaki, M., Hilgers, J. und Morii, S.** (1992). "Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors." J Cutan Pathol **19**(1): 73-9.
- Tsuchida, T., Kijima, H., Tokunaga, T., Oshika, Y., Hatanaka, H., Fukushima, Y., Abe, Y., Kawai, K., Yoshida, Y., Miura, S., Yamazaki, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y. und Nakamura, M.** (1999). "Expression of the thrombospondin 1 receptor CD36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer." Int J Oncol **14**(1): 47-51.
- Varley, J. M., Brammar, W. J., Lane, D. P., Swallow, J. E., Dolan, C. und Walker, R. A.** (1991). "Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas." Oncogene **6**(3): 413-21.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. und Bishop, J. M.** (1982). "Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29." J Virol **42**(3): 773-9.
- Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A. J.** (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.
- Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H., He, S. und Dean, D. C.** (1995). "Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein." Nature **375**(6534): 812-5.
- White, J. S. und Rees, K. R.** (1982). "Inhibitory effects of methyl glyoxal on DNA, RNA and protein synthesis in cultured guinea pig keratocytes." Chem Biol Interact **38**(3): 339-47.
- Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A. und Olofsson, B.** (1995). "Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle." Oncogene **10**(10): 1935-45.
- Zaloudik, J., Basak, S., Nesbit, M., Speicher, D. W., Wunner, W. H., Miller, E., Ernst-Grotkowski, C., Kennedy, R., Bergsagel, L. P., Koido, T. und Herlyn, D.** (1997). "Expression of an antigen homologous to the human CO17-1A/GA733 colon cancer antigen in animal tissues." Br J Cancer **76**(7): 909-16.
- Zeidler, R., Mysliwietz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B. und Lindhofer, H.** (2000). "The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells." Br J Cancer **83**(2): 261-6.
- Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B. und Lindhofer, H.** (1999). "Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing." J Immunol **163**(3): 1246-52.
- Zorzos, J., Zizi, A., Bakiras, A., Pectasidis, D., Skarlos, D. V., Zorzos, H., Elemenoglou, J. und Likourinas, M.** (1995). "Expression of a cell surface

antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study." Eur Urol **28**(3): 251-4.

Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
BCA	Bicinchonic Acid
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	radioaktive Zerfälle (disintegrations) pro Minute
DTE	Dithioerythritol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HRP	Horse-radish Peroxidase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
mA	Milliampere
min	Minute
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
Std	Stunde
SV	Simian Virus
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
u.a.	unter anderem
Vol.	Volumen
W	Watt
z. T.	zum Teil

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Reinhard Zeidler für die Vergabe des Themas, Hilfe und Unterstützung bei allen Problemen und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Dr. Olivier Gires für die geniale Betreuung, die anregenden Diskussionen und seine motivierende und menschliche Art. Danke!

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick mit all seinen Pflichten als „Doktorvater“ dieser Arbeit. Seinen Rat und seine kritischen Anregungen wußte ich stets sehr zu schätzen,

Herrn Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer für die guten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung und seinen „Klinikern“ für die Beschaffung von Primärmaterial,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und seiner „Truppe“ für die rege wissenschaftliche Kooperation und Unterstützung,

Frau Dr. Sabine Suppmann und Martin Schlee (Os...) für Rat und Tat in der Folge „Wenn die MALDI mal nicht so wollte, wie sie sollte“,

dem gesamten Laborteam für das hervorragende Arbeitsklima und die Zusammenarbeit, vor allem Bärbel Schmitt („la mama“ des Labors und meine Zellen-Urlaubspension) für die unverzichtbaren Pläuschchen im Kaffee-Kuschel, Tanja Hofmann (Helge) für ihre 100%-ige Zuverlässigkeit in allen Dingen (wissenschaftlich und auch beim Griechen...), Andreas Moosmann (die Nachtule unseres Labors) für seine Bereitschaft sowohl über wissenschaftliche als auch über weniger wissenschaftliche Dinge zu philosophieren, Michael Benk (hi, hi...), der seit kurzem unser Labor in jeder Hinsicht erheitert und bereichert (NBA „Lakers“), Annette Walz bei HNO-Problemchen, und natürlich „IT-specialist“ Cuong Kieu („meine lieben N(L)iebenden...“) für seine tatkräftige Unterstützung,

dem Duo Infernale, Marcus Conrad, für prägende und ausgleichende Bergerlebnisse, und Rob Chapman (the „native speaker“) für seine unübertreffbaren Englischkenntnisse...

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Markus Münz
Geburtsdatum: 12.03.1971
Geburtsort: Erlangen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Wohnort: Kanalstr. 16
82515 Wolfratshausen

Schulbildung/Studium

1977-1981: Grundschule Herzogenaurach
1981-1990: Naturwissenschaftliches Gymnasium
Herzogenaurach
Abitur
1991-1997: Studium der Chemie an der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen
1997: Diplomarbeit am Lehrstuhl
für Genetik, Mikrobiologie und
Biochemie der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen
bei Prof. Dr. Wolfgang Hillen
Januar 1999-März 2002: Promotion in der klinischen
Kooperationsgruppe
„Molekulare Onkologie“ der LMU und
GSF, München