

# Isolierung und Identifizierung CEACAM1<sub>cyt</sub>- assoziierter Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der biologischen Fakultät der Universität Konstanz

vorgelegt von

Alireza Ebrahimnejad (Dipl. Chem.)

aus Neyschabour (Iran)

Hamburg 2002

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie der  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums

Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Direktor: Prof. Dr. med. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. med. W. Hofer

Korreferent: Prof. Dr. med. C. Wagener

Tag der Prüfung:

Meinen Eltern und meiner Frau

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	V
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	10
<b>4</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	11
<b>4.1</b>	<b>Materialien</b>	11
<b>4.2</b>	<b>Puffer und Medien</b>	13
4.2.1	Puffer	13
4.2.2	Stammlösungen	16
4.2.3	Kulturmedien	17
<b>4.3</b>	<b>Allgemeine Labormaterialien</b>	18
<b>4.4</b>	<b>Laborgeräte</b>	18
<b>4.5</b>	<b>Methoden</b>	19
4.5.1	Granulozyten-Präparation, Lyse und Extraktion	19
4.5.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford	21
4.5.3	Gelelektrophorese von Proteinen	21
4.5.4	Proteinnachweismethoden	24
4.5.5	Klonierungen	26
4.5.6	Protein-Bindungsstudien mit CEACAM1 <sub>cyt</sub> als His-Tag-Fusionsprotein	27
4.5.7	Plasmidpräparation aus Bakterien	27
4.5.8	Bakterielle Expression	27
4.5.9	Chromatographie	28
4.5.10	In-Vitro Bindungsstudie via Chromatographie	29
4.5.11	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	29
4.5.12	Perchlorsäure-Extraktion	31
4.5.13	Gel Size-Chromatographie	31
4.5.14	Reversed Phase Chromatographie	31
4.5.15	Elektronen-Spray Massenspektrometrie	32
4.5.16	Phosphorylierungsreaktionen	33
4.5.17	P-Tyr-Affinitätschromatographie	33
4.5.18	Immunhistochemische (IH) und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLMS)	34
4.5.19	Invasions-Assay	36

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	37
5.1	<b>Charakterisierung von CEACAM1</b>	37
5.1.1	Granulozyten-Präparation	37
5.1.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von CEACAM1 aus Granulozyten-Extrakten	42
5.1.3	Charakterisierung der rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1	46
5.2	<b>Herstellung und Aufreinigung von CEACAM1<sub>cyt</sub> und deren Mutanten</b>	47
5.2.1	Expression von rekombinantem CEACAM1 <sub>cyt</sub> und Konstrukten in <i>E. Coli</i>	47
5.2.2	Aufreinigung	48
5.2.3	SDS PAGE und Silberfärbung der aufgereinigten CEACAM1 <sub>cyt</sub> und den entsprechenden Mutanten	52
5.3	<b>Funktionsuntersuchungen mit CEACAM1<sub>cyt</sub></b>	55
5.4	<b>Protein-Wechselwirkungsstudien</b>	56
5.4.1	Die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin $\beta_3$ bzw. Paxillin erfordert die Phosphorylierung von Tyr-488-Rest der CEACAM1 <sub>cyt</sub>	61
5.5	<b>Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLMS)</b>	63
5.5.1	Koexpression und Koloaliation von CEACAM1 und Paxillin auf Granulozyten und HT29-Zellen	64
5.5.2	Koexpression und Koloaliation von CEACAM1 und Integrin $\beta_3$ auf Granulozyten und HT29-Zellen	66
5.5.3	Koexpression und Koloaliation von CEACAM1 mit Integrin $\beta_3$ im Endometrium und Placenta-Stukturen	68
5.5.4	Untersuchung des Invasionsverhaltens von CEACAM1 positiven Zelllinien	71
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	74
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	87
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	88
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	93

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AmU	Atomare Masseneinheit
ATP	Adenosintri-phosphat
°C	Grad Celsius
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CNBr	Bromcyan
cyt	zytoplasmatische Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
kDa	Kilodalton
min	Minute
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimol
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
ng	Nanogramm
pI	Isoelektrischer Punkt
PCA	Perchlorsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Std	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
U	Units

ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

## 2 EINLEITUNG

Zellen werden beständig mit Signalen konfrontiert: Signalen, die korrekt interpretiert werden müssen, damit sich eine Zelle ihrer Umgebung richtig anpassen kann. Komplexe Informationen müssen in zelluläre Aktionen übersetzt werden, wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Migration.

Das Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 (CEACAM1) ist das Hauptantigen einer Familie strukturell homologer Proteine der Familie des Carcinoembryonalen Antigens (CEA), einer Unterfamilie der Immunglobulin-Superfamilie. Bei dieser Familie wurden 29 verschiedenen CEA-verwandte Gene identifiziert. Diese liegen alle benachbart auf dem langen Arm des Chromosoms 19 [19q13.1-3] (Zimmermann, W. et al., 1988, Watt, S.M. et al., 1994, Thompson, J.A. et al., 1995, Ding, Y.-P. et al., 1996). Sie besitzen eine Struktur, die aus einem kurzen, hydrophoben Leader-Peptid (34 Aminosäuren) einer IgV-artigen N-terminalen Domäne (108 Aminosäuren) und einer variablen Anzahl (oder keiner) IgC-artiger Domänen besteht (Thompson et al., 1991).

Bei den IgC-artigen Domänen kann man zwei getrennte Einheiten A (93 Aminosäuren) und B (85 Aminosäuren) unterscheiden, jede enthält Cysteine, die die Ausbildung einer Sekundär- und Tertiärstruktur ermöglichen, welche diese Einheiten als immunoglobulinartige C2-Domäne kennzeichnet (Boehm et al., 1996).

Die CEA-Familie wird in zwei Untergruppen eingeteilt: Zum einen die membran-gebundenen CEA-Familienmitglieder (CEACAM) und zum anderen die sezernierten PSG (pregnancy specific glycoprotein) -Familienmitglieder. Innerhalb der Untergruppe ist die Ähnlichkeit auf DNA-Ebene ca. 70-90%, zwischen den Untergruppen liegt der Wert nur bei ca. 50-60% (Thompson, J.A. et al., 1995). Die Expression von CEACAM-Familienmitgliedern wurde durch Studien mit Antikörpern, in situ Hybridisierung und RT/PCR-Assays untersucht (Thompson, J.A. et al., 1993, Thompson, J.A. et al., 1995).

Gen	Größe der mRNA in kB	Protein	Gewebe oder Zellen
CEACAM5	3,5; 3,0	CEA	Gastrointestinaltrakt, ekkrine Schweißdrüsen, Lungenepithel, Hoden, Kolonpolypen, Adenokarzinome des Kolons (~100%), muzinöse Karzinome des Ovars (~100%), weniger in Karzinomen anderer epithelialer Herkunft (Brust, Lunge, Pankreas, Magen)

CEACAM1	3,9; 3,7; 2,2; 1,8	CEACAM1	normale Hepatozyten, Kolonmukosa, Leukozyten, Endothelien und Epithelien herabreguliert in hepatozellulären und Kolon- Karzinomen Talg- und Schweißdrüsen der Haut
CEACAM6	2,5	CEACAM6	meist mit CEA koexprimiert, weniger in Kolonmukosa und Polypen, zusätzlich in Granulozyten
CEACAM3	~1,3	CEACAM3	Neutrophile Granulozyten, bei CML auf Leukozyten
CEACAM8	2,2	CEACAM8	Granulozyten
CEACAM4	~1,3	CEACAM4	periphere Leukozyten
CEACAM7	2,5	CEACAM7	Kolonmukosa, herabreguliert in Adenokarzinomen des Kolons und muzinösen Karzinomen des Ovars
PSG1	1,7-2,5	PSG	Placenta (10/11 PSGs), submandibuläre Speicheldrüsen, fetale Leber (10/11 PSGs), hydatiforme Mole, Chorionkarzinome, Brusttumoren

Tabelle 1: Expressionsmuster der CEACAM-Familie (Thompson et al., 1995; Godfraind et al., 1995; Metze et al., 1996; Prall et al., 1996)

Tabelle 1 fasst die Expressionsmuster der CEACAM-Familie zusammen. Normalerweise findet sich CEACAM5 im Hoden (Beatty et al., 1986), in Epithelien des Gastrointestinal-Traktes (Nap et al., 1988), der Lungen (Kim et al., 1992) und in ekkrinen Schweißdrüsen (Tezuka et al., 1989). Granulozyten exprimieren, wie oben genannt, eine Vielzahl von CEA-Familienmitgliedern. Dazu gehören CEACAM1, CEACAM3, CEACAM8 und wahrscheinlich CEACAM4 (Berling et al., 1990; Kuroki et al., 1991; Stoffel et al., 1993). CEACAM7-Transkripte hat man in normaler Kolonmukosa und in Kolonkarzinomen sowie in muzinösen Karzinomen des Ovars, aber nicht auf Leukozyten finden können (Thompson et al., 1995).

Die membrangebundenen Mitglieder der CEA-Familie sind entweder über eine Glycosyl Phosphatidyl-Inositol (GPI) - Gruppe in der Membran verankert, oder sie sind trans-

membranär mit verschiedenen zytoplasmatischen Domänen angelegt (Watt et al., 1994; Thompson et al., 1995).

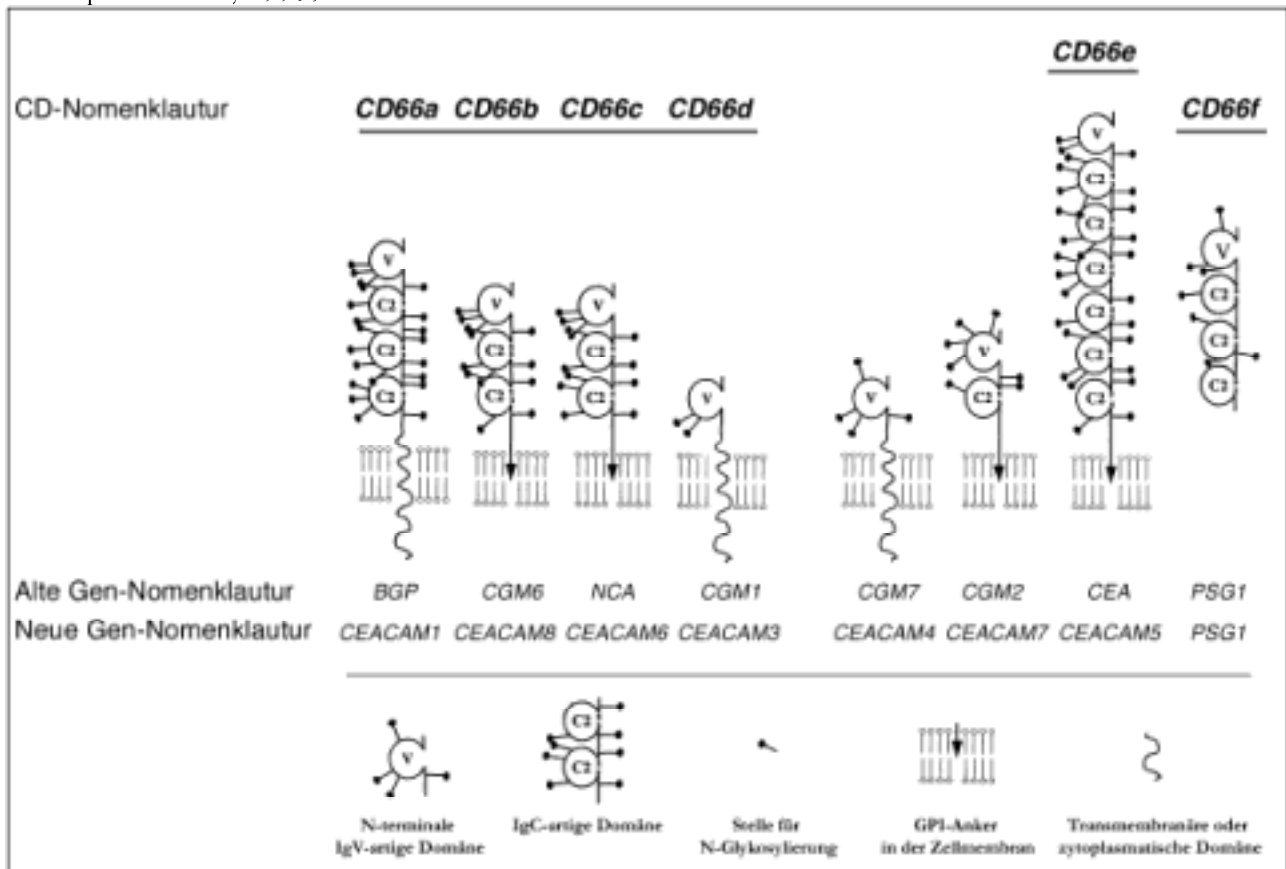


Abbildung 1: Schematische Darstellung von den Mitgliedern der CEACAM-Familie

Abbildung 1 zeigt die Domänenstruktur von Mitgliedern der CEACAM-Familie. Zu den GPI-verankerten Proteinen gehören CEA, CEACAM6, CEACAM7, und CEACAM8. Die transmembranären Mitglieder sind CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4.

Für das menschliche *CEACAM1*-Gen sind mehr als dreizehn verschiedene mRNAs beschrieben, die durch alternatives Spleißen des Primärtranskriptes entstehen (Thompson, J.A., 1991).

Abbildung 2 zeigt die bekannten Spleißvarianten von CEACAM1. Die Zusammensetzung der größten CEACAM1-Spleißvariante lautet: L-A1-B1-A2-TM-Cyt, wobei L eine Peptidkette (Leader-Peptid) aus 34 Aminosäuren präsentiert. Die Peptidkette L wird während des Transportes von reifem Protein an die Zelloberfläche gespalten. Die IgC-artigen Domänen (A1 und B1) folgen der hydrophoben transmembranösen Domäne (TM) und einer langen oder kurzen zytoplasmatischen Domäne (Cyt). Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen CEACAM1-Spleißvarianten ist das Vorhandensein von zwei Formen (lang bzw. kurz) der zytoplasmatischen Domäne.

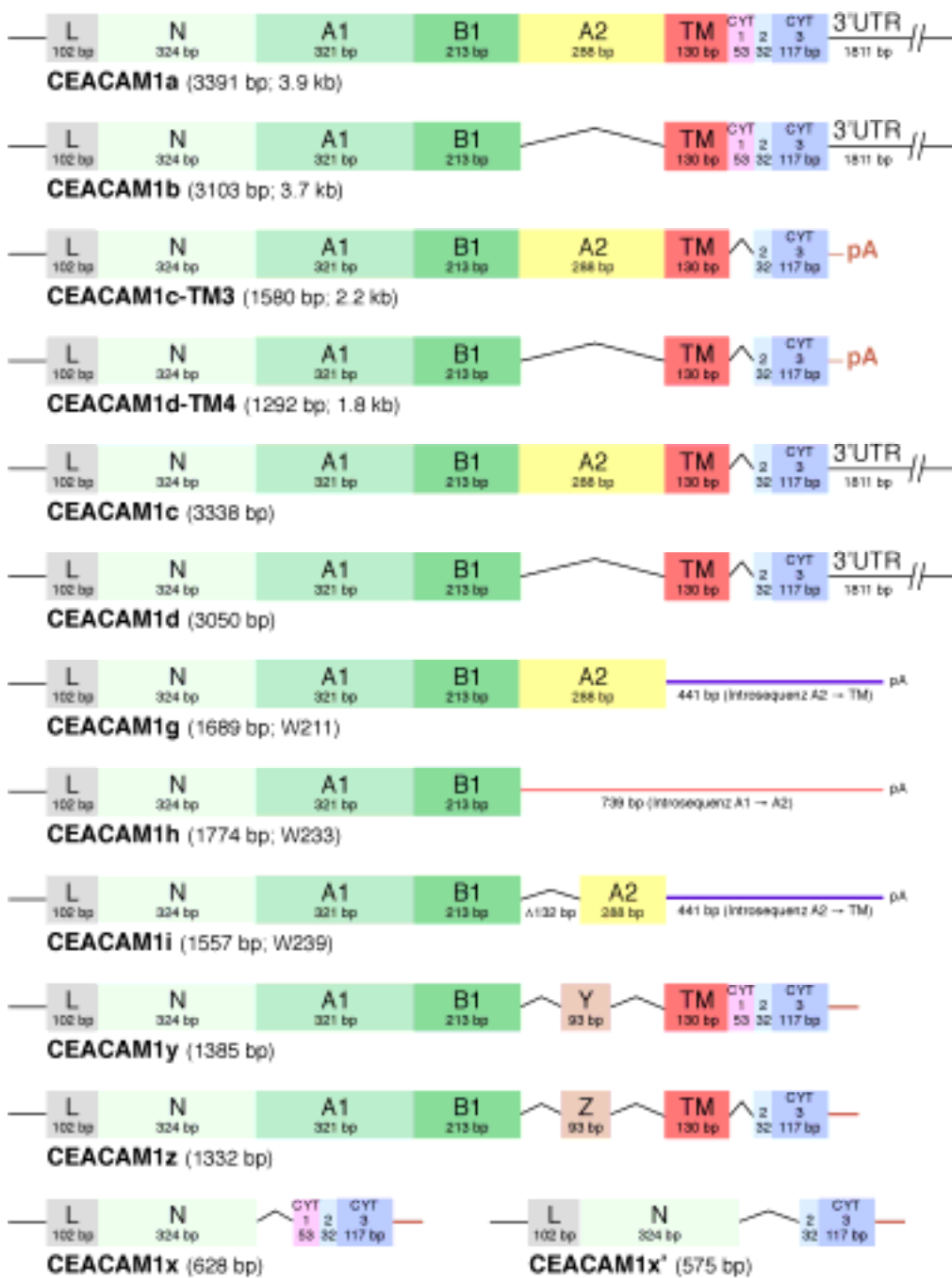


Abbildung 2: CEACAM1-Spleißvarianten

Die zytoplasmatische CEACAM1-Domäne liegt entweder in einer verkürzten (entsprechend 10 Aminosäuren) oder in der ungekürzten, langen (entsprechend 72 Aminosäuren) Form vor.

S-CEACAM1: 450 KTGSBGPLQ

L-CEACAM1: 450 KTGRASDQRDLTTEHKPSVENHHTQDHSNDPPNKMNEVTY<sup>488</sup>STLNFEAQOPTQPT<sup>515</sup>SASP<sup>515</sup>SLTATEIT<sup>515</sup>YSEVKKQ

Abbildung 3: Aminosäure-Sequenzen der kurzen und langen zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1. Sie zeigen mögliche Phosphorylierungsstellen für Tyrosin-Kinasen (Rot), aber auch Angriffspunkte für Serin-Kinasen (Grün) bzw. Threonin-Kinasen (Blau)

Abbildung 3 zeigt die Aminosäure-Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1. Die lange Form der zytoplasmatischen Domäne (CEACAM1<sub>cyt</sub>) ist reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, die in der Zelle phosphoryliert vorliegen können. Die beiden Tyrosinreste (Tyr-488 und Tyr-515) liegen in Sequenzmotiven, die einem "Immuno-receptor Tyrosin-based Activation Motif" [ITAM] oder "Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif" [ITIM] ähneln, obwohl der Abstand zwischen den beiden größer ist als in den klassischen ITAMs (26 Aminosäuren versus 10 Aminosäuren).

Die Tyrosinreste in klassischen ITAMs werden durch Tyrosinkinase der Src-Familie schnell phosphoryliert und bieten Bindungsstellen für die SH2-Domänen von Tyrosinkinase z.B. der Syk Familie. Außerdem liegen beide Tyrosinreste in Sequenzmotiven (pYXXV) eines ITIM, welches nach Phosphorylierung die Bindung von Tyrosinphosphatasen vermittelt.

Brümmer et al. (1995) und Huber et al. (1999) zeigten, daß sowohl Tyrosinkinase der Src-Familie als auch Tyrosinphosphatasen (SHP-1 und SHP-2) an tyrosinphosphoryliertes CEACAM1<sub>cyt</sub> binden.

Der Befund, daß CEACAM1 *in-vitro* und *in-vivo* mit der Tyrosinkinase Src assoziiert, war ein konkreter Hinweis auf die Signalfunktion von CEACAM1. Die Assoziation von Src und CEACAM1 beruht auf einer direkten Bindung der Src-Kinase an die zytoplasmatische CEACAM1 Domäne, da mit der rekombinant exprimierten und *in-vitro* phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne ebenfalls Src-Kinase kopräzipitiert wird. Die Src-Kinase bindet über eine einzelne Domäne, die Src-SH2-Domäne (SH2: Src homology module 2). Die Aktivität der Src-Kinase wird dabei über die intermolekulare Bindung der SH2-Domäne an CEACAM1<sub>cyt</sub> positiv reguliert. So könnte die Src-Kinase auf zweierlei sich nicht ausschließende Weisen aktiviert werden: Zum einen könnte eine Protein-Tyrosin-Phosphatase mit der Src-Kinase interagieren, indem sie das C-terminale Tyrosin dephosphoryliert und somit zu einer Konformationsänderung und einer Autophosphorylierung führt, einem Ereignis, das für die Aktivierung wichtig ist (Caron et al., 1992). Zum anderen könnten zwischen Protein-Tyrosin-Kinasen selbst Wechselwirkungen bestehen, die zu einer Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle in der *trans*-Position und somit wiederum zu Konformationsänderungen führen (Boerner et al., 1995).

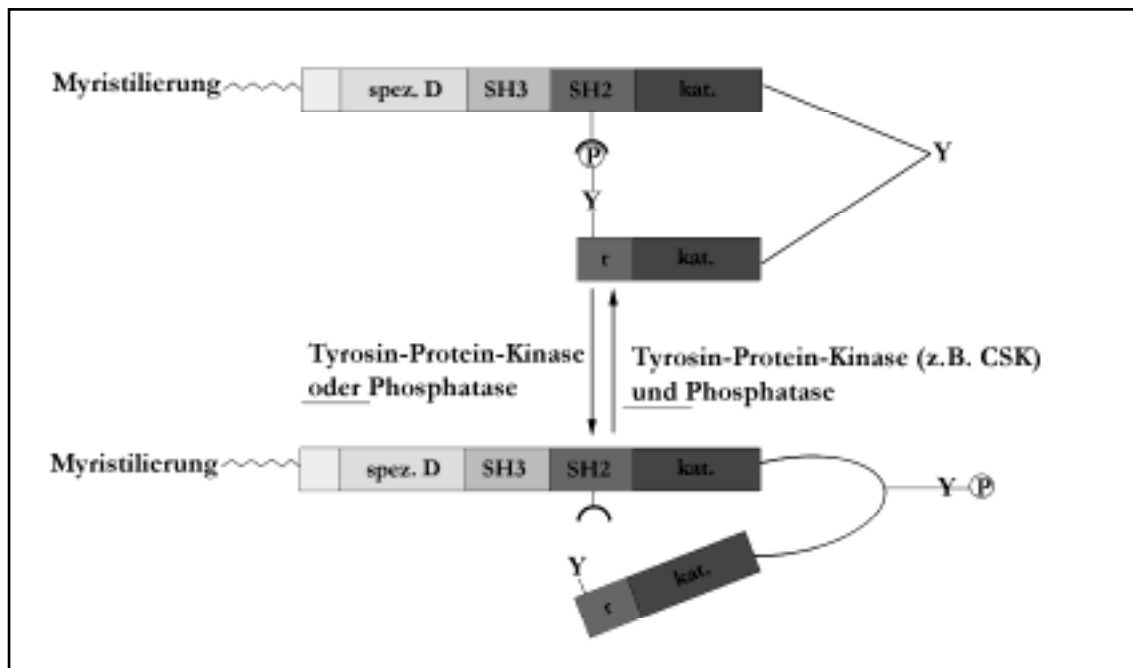


Abbildung 4: Aktivierung und Inaktivierung der Kinasen der Src-Familie (C. Wagener, 1996: Molekulare Onkologie)

In der Abbildung 4 finden sich zwei Domänen in der Src-Kinase, die mit SH2 und SH3 (Src-Homologie-Domäne) bezeichnet sind. Diese Domänen existieren in einer Vielzahl von Proteinen, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Die SH2-Domäne bindet an Phosphotyrosinreste in charakteristischen Aminosäuresequenzmotiven.

Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 enthält ebenso wie die von CEACAM1 zwei potentielle Bindungsmotive für SH2-Domänen von Tyrosin-Kinasen der Src-Familie. Diese Bindungsmotive sind selten in anderen Proteinen in so hoher Übereinstimmung vorhanden, was den Schluß nahelegt, daß an diesen Stellen hochaffine Bindungen möglich sind. Einen Nachweis lieferten Brümmer et al., 1995, und Streichert et al., 2001, indem sie zeigen konnten, daß korrespondierende Peptide zu den tyrosinhaltigen Domänen der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 bzw. CEACAM3 die Src-Kinase stärker aktivieren konnten als ein Phosphopeptid aus der regulatorischen Domäne von Src. Dies läßt CEACAM1 und CEACAM3 als besonders interessante Moleküle für Signaltransduktionswege, in denen Src-Kinasen vorkommen, erscheinen.

Wenn man die mögliche Bindungssequenz der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3<sub>cyt</sub> im Vergleich mit anderen Motiven sieht, die Songyang untersucht hat (Human CD3, Human vav oncogene, Human ErbB3, Human T Cell CD7 etc.), fällt auf, daß sich in keinem der beschriebenen Proteine eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Idealmotiv – wie bei CEACAM3<sub>cyt</sub> der Fall – findet. CEACAM3 könnte am Anfang eines Signaltransduktionsweges stehen und über die Phosphorylierung der Bindungsgruppen funktionelle Proteine (Kinasen der Src-Familie) in ihrer Aktivität regulieren.

So unterstützen die SH2-Domänen die C-terminale Dephosphorylierung durch eine Phosphatase (siehe oben), indem die intramolekulare Bindung des Phosphotyrosin-Reste an

die SH2-Domäne z.B. durch Kompetetion mit einem höheraffinen Phosphotyrosin-Peptid-Motiv anderer Phosphotyrosin-Proteine (z.B. CEACAM1 und CEACAM3) gelöst werden. Gerade bei CEACAM3 könnte ein kompetetiver Prozeß aufgrund des deutlich besseren SH2-Bindungsmotivs eine Rolle spielen. Die resultierende Konformationsänderung bewirkt dann die Autophosphorylierung des Tyrosin-Restes der katalytischen Domäne (Bolen et al., 1992; Pawson et al., 1995). Diese Autophosphorylierung konnte man bei Phosphorylierungsreaktionen mit der Src-Kinase an CEACAM1 beobachten. Die Anlagerung von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-Aktivität an die Src-Kinase bei der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne spricht für eine Modifikation der Kinase. Es könnte z.B. die oben beschriebene katalytische Domäne freigelegt werden.

Neben der Assoziation von CEACAM1<sub>cyt</sub> mit Kinasen der Src-Familie (Brümmer, J. et al., 1995, Skubitz, K.M. et al., 1995) und mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 (Huber, M. et al., 1999) konnten zwei weitere mit CEACAM1 assoziierte Proteine identifiziert werden.

Die Bindung von Calmodulin erfolgt unabhängig von der CEACAM1<sub>cyt</sub>-Phosphorylierung und ist auch für die kurze CEACAM1<sub>cyt</sub>-Isoform nachweisbar. Diese Assoziation wird durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert und führt zu einer verminderten CEACAM1-Dimerisierung (Edlund, M. et al., 1996).

Luo und Mitarbeiter (Luo,W. et al., 1998) konnten CAP-80 (C-Gam associated protein), ein nicht näher charakterisiertes Protein von 80 kDa, aus Rattenleber mittels Crosslinking isolieren. Diese Interaktion erfolgt über CEACAM1<sub>cyt</sub> und ist unabhängig von dem Tyrosinrest 488.

Außerdem wurde z.B. die Interaktion von CEACAM1<sub>cyt</sub> mit dem Actin-Zytoskelett und die Rolle von Rho-GTPasen in der Lokalisierung dieser Komplexe beschrieben. Dabei war die CEACAM1-Interaktion mit dem Actin-Zytoskelett indirekt und wurde nur durch die lange Form der zytoplasmatischen Domäne vermittelt (Sadekova, S. et al., 2000).

CEACAM1 wird in einer Reihe epithelialer Gewebe z.B. Dünndarm und Endometrium (Prall, F. et al., 1996) sowie in Leber, Kolon, Endothel-, und Blutzellen exprimiert. Während eine - für alle CEACAM1 positiven Zellen - gültige CEACAM1-Funktion bisher nicht nachgewiesen wurde, konnte für unterschiedlichste zellbiologische Vorgänge eine essentielle Beteiligung gezeigt werden. Ausgehend von der Herstellung einer Reihe monoklonaler Antikörpern unter anderem des bis heute einzigen spezifischen monoklonalen CEACAM1-Antikörpers (4D1C2) konnten wesentliche Funktionen von CEACAM1 in unterschiedlichen zellbiologischen Systemen beschrieben werden.

Da CEACAM1 in einer Reihe von epithelialen Geweben streng polar - es ist luminal ausgerichtet - exprimiert wird, wurde schon früh eine wichtige Funktion für CEACAM1 in der zellulären Organisation von Drüsenstrukturen postuliert. Für die Mammaepithelzelle

MCF10F konnte erstmals eine essentielle Rolle für CEACAM1 in der *in-vitro* Formation von Lumina dieser Zellen gezeigt werden (Huang, J. et al., 1999).

Neuere Untersuchungen (Öbrink, B. et al., 2000) zeigten, daß CEACAM1 die durch Wachstumsfaktoren induzierte Zellproliferation von konfluenten Prostatazellen (NBT-II) hemmt. Da ein Crosslinking von CEACAM1 ebenfalls zu einer verminderten Proteinkonzentration des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27<sup>kip1</sup> führte, wird vermutet, daß diese Hemmung der Zellproliferation über die Aktivität der Cyclin E-abhängigen Kinase cdk2 vermittelt wird (Milde-Langosch, K. et al., 2000).

Die verminderte CEACAM1-Expression in Kolonkarzinomen (Neumaier, M. et al., 1993) und der Nachweis einer verminderten Expression bei kolorektalen Adenomen (Nollau, P. et al., 1997) weist auf eine wichtige Rolle von CEACAM1 in der Entstehung kolorektaler Karzinome hin. CEACAM1 zählt zu den 20 Genen, die am häufigsten in kolorektalen Tumoren vermindert exprimiert werden (Zhang, L. et al., 1997). Die veränderte CEACAM1-Expression in malignen Läsionen ist inzwischen für eine Vielzahl von Tumoren nachgewiesen (z.B. hepatozelluläre Karzinome, (Tanaka, K. et al., 1997), Mamma-Karzinome (Riethdorf, L. et al., 1997), Endometrium-Karzinome (Bamberger, A.M. et al., 1998) und eine direkt tumorsupprimierende Wirkung konnte unabhängig für Prostata- (Hsieh, J.T. et al., 1995) und Mamma-Karzinomzellen (Luo, W. et al., 1997) gezeigt werden.

Eine Reihe Untersuchungen zeigen, daß manche Mitglieder der CEACAM-Familie auf Granulozyten als Rezeptor für die opacity assoziierte (Opa) Proteine pathogener Neisserien fungieren und solche Funktionen wie z.B. die Bindung, Adhärenz und die Internalisierung von Opa<sup>+</sup>-Neisserien vermitteln (Virji, M. et al., 1996; Chen, T. et al., 1997; Gray-Owen, S. et al., 1997). Gray-Owen et al. konnten diese Resultate für die sämtliche Mitglieder des CD66-Cluster nachvollziehen. Sie zeigten die Bindung von Gonokokken und transfizierten *E. Coli*-Stämmen, die das Opa-Protein 52 synthetisieren, an CD66 a,c,d,e-transfizierte HeLa-Zellen. Eine Bindung für CD66b konnte nicht gezeigt werden, die erhobenen Daten deuten auf eine Wechselwirkung des Opa-Proteins mit der N-terminalen Domäne hin (Gray-Owen et al., 1997).

Wenn die unterschiedlich transfizierten HeLa-Zellen auf ihre relative Fähigkeit hin, Opa<sup>+</sup>-Bakterien zu binden und zu phagozytieren, untersucht wurden, ergab sich das folgende Bild: Die Bindungsfähigkeit nahm in der nachstehenden Reihenfolge ab: CEA=CEACAM1>CEACAM3>CEACAM6>CEACAM8=Neo, dagegen war die Fähigkeit, die Invasion oder Phagozytose der Bakterien zu mediieren, folgend:

CEACAM3>CEA>CEACAM1>CEACAM6>CEACAM8=Neo (Neo ist die Kontrolle) (Bos et al., 1997; Chen et al., 1997).

Insbesondere die extrazellulären Domänen der CEACAM-Antigene sind für diese Interaktionen verantwortlich (Bos, M.P. et al., 1998) und diese Interaktion ist auch bei der Adhärenz und Transzytose von Opa<sup>+</sup>-Neisserien durch koloepitheliale Zellen nachweisbar

(Wang, J. et al., 1998). So ist in der Maus das CEACAM1- Homolog (Ceacam1) der Rezeptor für das Maus-Hepatitisvirus (Dveksler, G.S. et al., 1993) und in humanen System wurde gezeigt, daß CEACAM1 die Bindung von Salmonellen und *Escherichia coli* vermittelt (Leusch, H.G. et al., 1991) und ein Rezeptor für die Opacity-associated (Opa) Proteine pathogener Neisserien ist. Diese vermitteln die Adhärenz, Bindung, und Internalisierung von Opa<sup>+</sup>-Neisserien (Virji, M. et al., 1996). Es wurde auch für *Hämophilus influenzae* eine Interaktion mit CEACAM1 nachgewiesen (Virji, M. et al., 2000). Somit wurde nicht nur der erste „natürliche“ Ligand für CEACAM1 identifiziert, sondern auch eine wichtige Funktion dieser Interaktion bei der Pathogenese von Infektionen nachgewiesen.

CEACAM1 wird zudem in Kapillaren sich regenerierenden und proliferierenden Geweben exprimiert. Durch lösliche Formen von CEACAM1, aufgereingt aus Granulozytenextrakten, Überständen von Endothelzellen, sowie aus rekombinantem CEACAM1 von HEK 293-Zellen, wird in humanen Endothelzellen Proliferation und Chemotaxe induziert und somit essentielle Schritte der Gefäßneubildung ausgelöst (Ergün, S. et al., 2000). Es wird vermutet, daß die VEGF-aktivierten Endothelzellen CEACAM1 produzieren, worauf die Proliferation und Migration der Endothelzellen erfolgt. Somit wird CEACAM1 die Rolle eines autokrinen Faktors zugeschrieben. Bei der Formierung von Blutgefäßen kann die membrangebundene Form von CEACAM1 als Zell-Adhäsionsmolekül bei der Kapillarformierung „Tube-Formation“ fungieren. Außerdem könnte CEACAM1 durch die Bindung an Komponenten der Basallamina die Anordnung der Basalmembran beeinflussen. Somit könnte CEACAM1 einen Effekt auf die Morphogenese und Reifung von Blutgefäßen ausüben.

Der Nachweis einer spezifischen CEACAM1 Expression auf dem invasiven Trophoblasten während der Placentaentwicklung (Bamberger, A.M. et al., 2000) läßt vermuten, daß CEACAM1 auch funktionell an der Invasion von fetalen Trophoblasten in die maternale Decidua bzw. maternaler Gefäße beteiligt ist.

CEACAM1 könnte bei der Vermittlung der adhäsiven Interaktion zwischen Trophoblasten und Endothelzellen der maternalen Gefäße beteiligt sein. Zudem könnte CEACAM1 bei heterophilen Wechselwirkungen mit weiteren Adhäsionsmolekülen an dem fetal-maternalem Übergang mitwirken. So werden z.B.  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  - also Integrine und Cadherine - während der Implantationsphase in diesem Bereich exprimiert (Tabibzadeh S. et al., 1995).

Obwohl in keinem dieser zellbiologischen Systeme der exakte molekulare Mechanismus einer CEACAM1-Funktion aufgeklärt ist, wird allgemein davon ausgegangen, daß CEACAM1 an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt ist.

### 3 FRAGESTELLUNG

Da gezeigt wurde, daß die lange Form der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 - insbesondere der Tyr-488 - für den tumorsuppressiven Effekt essentiell ist (Izzi, L. et al., 1999), wird von unterschiedlichen Gruppen intensiv nach weiteren mit CEACAM1<sub>cyt</sub>-assoziierten Proteinen gesucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Identifizierung weiterer Bindungspartner von CEACAM1 in Abhängigkeit des Tyrosinphosphorylierungsstatus der zytoplasmatischen Domäne. Dazu sollten die rekombinant exprimierten langen zytoplasmatischen Domänen von CEACAM1 (CEACAM1<sub>cyt</sub> sowie deren Mutanten Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Y488F,Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>) jeweils in Tyrosinphosphorylierter bzw. unphosphorylierter Form als Targetmolekül eingesetzt werden.

## 4 MATERIALIEN UND METHODEN

### 4.1 Materialien

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, bei den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Pharmacia Biotech (Upsala, Schweden) sowie Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die Zusätze zu Bakterienmedien wie Bacto-Tryptone und Bacto-Hefe-Extrakt stammen von der Firma Difco (Detroit, USA). Kulturmedien für die humanen Zelllinien wurden bei Gibco (Karlsruhe) gekauft. Das ebenso in der Zellkultur verwendete FCS stammte von Gibco oder von PAA Laboratories. In den folgenden Tabellen finden sich die Bezugsquellen der verwendeten Materialien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	Amersham, Braunschweig
Acrylamid, Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
DNA Extraktionskit	Qiagen, Hilden
TEMED	Bio-Rad, München
Buffy-Coats	Blutspendedienst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Abteilung für Transfusionsmedizin
Molekulargewichtsstandard, Protein (Low-Range-Marker)	Promega, Mannheim
Vitrogen 100	Cohesion, California
Diff-Quik®	DADE Behring AG, Marburg
IPG Strips	Bio-Rad, München
Invasion Assay	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 2: Herkunft der verwendeten Materialien

Antigen	Spezies	Klon	Quelle	Isotyp	Konzentration
CEACAM1	Maus	4D1C2	Prof. Dr. C. Wagener	IgG <sub>1</sub>	1 mg/ ml
CEACAM6	Maus	T.84.1	Prof. Dr. C. Wagener	IgG <sub>1</sub>	1 mg/ml
CEACAM3	Maus	HT010	Pro.Dr.C.Wagener	IgG <sub>1</sub>	0,1 mg/ml
CEA & CEACAM1	Maus	12-140-4	Prof. Bömmer	IgG <sub>1</sub>	1 mg/ml
Integrin $\beta_3$	Maus	PM6/13	Chemicon	IgG <sub>1</sub>	1 mg/ml
Integrin $\beta_3$	Maus	Y2/51	DAKO	IgG <sub>1</sub>	0,1 mg/ml
Paxillin	Maus	349	Transduction-Laboratories	IgG <sub>1</sub>	0,25 mg/ml

Talin	Maus	TA205	GENOSYS	IgG <sub>1</sub>	0,1 mg/ml
Vinculin	Maus	V248	GENOSYS	IgG <sub>1</sub>	0,1 mg/ml
Vinculin-Head	Maus	15E7	Technische Universität Braunschweig	IgG <sub>1</sub>	Kultur-Überstand
Vinculin-Tail	Maus	4E7	Technische Universität Braunschweig	IgG <sub>1</sub>	Kultur-Überstand
Penta-Histidin	Maus	----	Qiagen	IgG <sub>1</sub>	0,2 mg/ml
Phosphotyrosin	Maus	PY20	ICN	IgG <sub>2b</sub>	1 mg/ml

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Quelle	Konzentration
Ziege anti-Maus IgG, Fc spezifisch, Peroxidase konjugiert	Dianova	0,8 mg/ml
Ziege anti-Maus IgG, F(ab') <sub>2</sub> FITC konjugiert	Dianova	1,5 mg/ml
Ziege anti-Maus IgG, F(ab') <sub>2</sub> TRITC konjugiert	Dianova	1,5 mg/ml
Ziege anti-Maus IgG, F(ab') <sub>2</sub>	Dianova	0,6 mg/ml

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Enzym	Quelle
c-Src-Kinase	Upstate Biotechnology Incorporated
Protein Kinase C (PKC)	Biomol

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

## 4.2 Puffer und Medien

### 4.2.1 Puffer

NP-40-Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,7 150 mM NaCl 1% NP-40 2% Aprotinin 2 mM EDTA 50 mM NaF 10 mM Na-Pyruvat 10% Glycerin 1 mM Pefabloc®SC 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF
Triton-X-100-Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,7 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 2% Aprotinin 2mM EDTA 50 mM NaF 10 mM Na-Pyruvat 10% Glycerin 1 mM Pefabloc®SC 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF
RIPA-Lysepuffer	20 mM Tris, pH 7,5 5 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF 75 µg/ml Leupeptin 20 µg/ml Aprotinin 1% Triton X-100 1% Nadeoxycolat 0,1% SDS

Harnstoff-Lysepuffer	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M Tris, pH 8
Sonication-Lysepuffer	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 300 mM NaCl, pH 8
Natriumborat-Lysepuffer	150 mM Natriumborat 1 M NaCl 1 mM EDTA, pH 8
Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	0,04% (w/v) Bromphenolblau 0,04% (w/v) Xylencyanol FF 2,5% (w/v) Ficoll (400) in TAE-Puffer
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
Rehydratisierungs-Puffer	8 M Harnstoff 4% CHAPS 10 mM DTT 0,2% (w/v) Bio-Lytes 3/10
SDS-PAGE Äquilibrierungs-Puffer mit DTT	6 M Harnstoff 0,375 M Tris, pH 8,8 2% SDS, 20% Glycerin, 2% (w/v) DTT
SDS-PAGE Äquilibrierungs-Puffer mit Iodacetamid	6 M Harnstoff 0,375 M Tris, pH 8,8 2% SDS, 20% Glycerin, 2,5% (w/v) Iodacetamid
Ladepuffer (SDS-PAGE)	4% SDS 12% Glycerin 50 mM Tris-Cl 2% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,01% Serva Blue, pH 6,8

Sammelgelpuffer

0,625 M Tris-Cl, pH 6,8

Trenngelpuffer

1,88 M Tris-Cl, pH 8,8

Acrylamid-Konzentration	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (ml)	1,5	2	2,5	3	3,5
1,88 M Tris-HCl, pH 8,8 (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
0,5 % SDS (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
H <sub>2</sub> O (ml)	2,1	1,6	1,7	0,5	0,1
10 % APS (µl)	30	30	30	30	30
TEMED (µl)	5	5	5	5	5

Tabelle 6: Trenngel für SDS-PAGE

30% Acrylamid, 0,8%Bisacrylamid (ml)	0,33
0,625 M Tris-HCl, pH 6,8 (ml)	0,4
0,5 % SDS (ml)	0,4
H <sub>2</sub> O (ml)	0,87
10 % APS (µl)	10
TEMED (µl)	2

Tabelle 7: Sammelgel für SDS-PAGE

Kinase Assay Puffer (K. A. P)

50 mM HEPES, pH 7,5

0,1 mM EDTA

0,015% Brij 35

Kinase Dilution Puffer

990 µl (K. A. P)+10 µl β-Mercaptoethanol

ATP-Mix

2 mM ATP

25 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

10 x Anodenpuffer

0,3 M Tris

10 % Methanol, pH 10,4

1 x Anodenpuffer

25 mM Tris

10 % Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer	25 mM Tris 192 mM 6-Amino-n-Hexansäure 10 % Methanol, pH 9,4
Blotpuffer (Naßblot)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % SDS 20 % Methanol
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBS-Tween	PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20
1x TBS	1,4 M NaCl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
Citrat-Puffer	0,1 M Na <sub>3</sub> -Citrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O) 0,1 M Citrat pH 5,0
Tris-Puffer (Immunhistochemie)	0,05 M Tris-HCl pH 7,6 0,15 M NaCl 0,1%(v/v) Triton-X-100
Tris-Puffer (Waschpuffer)	0,1 M Tris 1,4 M NaCl pH 8

#### 4.2.2 Stammlösungen

Amidoschwarz	0,02% Naphtholblau 40% Methanol 10% Essigsäure
--------------	--

Amidoschwarz-Entfärber	20% Ethanol 5% Essigsäure
Ammoniumpersulfat	10% in H <sub>2</sub> O
Blockierungslösung (Westernblot)	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS, pH 7,5
DAB-Färbelösung (Immunhistochemie)	5 mg/ml Tris pH 7,6
DAB-Färbelösung (Westernblot)	10 mg/15 ml Tris pH 8 30 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycin 50 mg/ml d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin 100 mg/ ml d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O

#### 4.2.3 Kulturmedien

RPMI 1640 suppl. mit	10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Dulbecco´s MEM suppl. mit	10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
McCoy 5xA suppl. mit	10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g Trypton 5 g Yeast-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O und autoklavieren

LB-Agarplatten	15 g Bacto-Agar ad 1000 ml d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ad 1000 ml 2x LB-Medium und autoklavieren
----------------	---

### 4.3 Allgemeine Labormaterialien

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filterationseinheiten	Millipore, Eschborn
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zentrifugeröhrchen	Falkon, Heidelberg
Objektträger	Menzel-Glasäer, Braunschweig
XK-Säulen	Pharmacia, Freiburg

### 4.4 Laborgeräte

Analysenwaage	Mettler, Zürich
β-Counter	1250 Betaplate Wallac, Freiburg
Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Elektrophorese-Kammer für SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Zeis, Jena
FPLC	Bio-Rad, München
HPLC	Merck-Hitachi, Darmstadt
Inkubator für Bakterien	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKA, Staufen
Platten-Photometer	SLT, Crailsheim
Schüttelinkubator	TEQ®, Spanien
Sterilw Werkbank	Gelaire, Meckenheim
Spektral-Photometer	Shimadzu, Japan
Ultraschallgerät	Bandelin, Berlin
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

## 4.5 Methoden

### 4.5.1 Granulozyten-Präparation, Lyse und Extraktion

Granulozyten wurden aus humanen Blut als Ausgangsmaterial zur Reinigung von CEACAM1 und CEACAM1-assoziierte Proteinen benutzt. Es wurden in ausreichender Menge Buffy Coat ( $\approx$  Abfallprodukt nach der Trennung von Erythrozyten und Plasma von Vollblut) gesammelt, um analytische sowie präparative Experimente durchführen zu können.

Die Aufarbeitung zur Isolierung der Granulozyten wurde entweder über einen Ficoll-Gradienten ( $d=1,077 \text{ g / cm}^3$ ) oder ohne Ficoll-Gradienten wie folgt durchgeführt:

Langsames aufpipettieren von ca. 30 ml Buffy Coat auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Falcon.

- Zentrifugation bei 1500 U / min im Swing-Rotor, 30 min bei 4°C.
- Abheben und verwerfen des Überstands (bestehend aus Lymphozyten und Plasma).
- Suspendieren des Sediments, das hauptsächlich Erythrozyten und Granulozyten enthält, in Lyse-Puffer [155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA].
- Zentrifugation bei 1500 U / min im Swing-Rotor, 20 min bei 4°C.
- Dekantieren der Überstände und Wiederholen des Lyseschritts, um eine möglichst quantitative Lyse der Erythrozyten zu erreichen.

Die Pellets wurden dreimal in PBS gewaschen (jeweils mit 20 ml überschichtet und 15 min wie oben zentrifugiert), der Überstand abgenommen und wiederum in PBS resuspendiert.

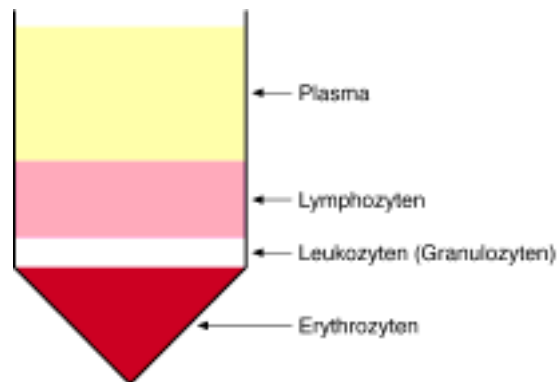


Abbildung 5: Auftrennung der Blutzellen im Ficoll-Gradienten

#### 4.5.1.1 Behandlung von Zellen mit Pervanadat

Pervanadat (PV) ist ein starker Inhibitor von Protein-Tyrosinphosphatasen. Nach Zugabe von PV zu Zellen findet man bereits nach wenigen Minuten eine starke Zunahme an tyrosinphosphorylierten Proteinen in der Zelle. Man kann daher PV zum Studium der Tyrosinphosphorylierung verwenden, wobei PV das physiologische Signal wie z.B. die Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Cytokinen ersetzt bzw. deutlich verstärkt. So kann PV eingesetzt werden, um tyrosinphosphorylierte Proteine zu identifizieren, die an die SH2-Domänen bestimmter Signaltransduktionsproteine binden.

#### 4.5.1.2 Herstellung von Pervanadat

Das Pervanadat wurde unmittelbar vor der Zugabe zu den Zellen wie folgt angesetzt:

- $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wasserstoffperoxid, 30%) 0,226 ml
- $\text{Na}_3\text{OV}_4$  (10 mM Stock-Lösung,  $-20^\circ\text{C}$ ) 2,0 ml
- PBS 7,774 ml  
10 ml
- Die Zellen (ca.  $5 \times 10^7$ ) wurden abzentrifugiert und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  (ca. 5 ml) in Medium resuspendiert
- Das Pervanadat wurde angesetzt (siehe oben) und 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und war dann gebrauchsfertig. Man gibt  $1/20$  des Zellkulturvolumens zu den Zellen (0,25 ml) und inkubiert die Zellen für 2 min bis zu 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator.
- Die Zellen wurden in eiskaltes PBS überführt und für 7 min bei 1300 U / min abzentrifugiert.
- Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in NP40-, oder Triton X-100-Lyse-Puffer lysiert.

#### 4.5.1.3 Zell-Lyse und Protein-Extraktion

Um die Signaltransduktion und Kinase-Aktivitäten in den Zellen zu untersuchen, wurden drei verschiedene Arten von Proteinlysaten angefertigt:

Medienlysate: Die Zellen wurden in dem Nährmedium, in dem sie angezogen worden waren, gehalten und einen Tag vor der Lyse mit frischem Medium gefüttert.

Lysate von unter Hungermedium wachsenden Zellen: Das Nährmedium wurde einen Tag vor der Lyse durch Hungermedium ersetzt. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml gehalten und 18 bis 22 Std hungern gelassen.

Lysate von stimulierten Zellen: Die hungern gelassenen Zellen wurden unmittelbar vor ihrer Lyse mit entsprechenden Faktoren für 5 min stimuliert.

Für ihre Lyse wurden die Zellen 7 min mit 1000 rpm pelletiert (Heraeus-Zentrifuge) und zu  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in dem gleichen Medium resuspendiert. In dieser Dichte wurden sie mindestens 30, aber nicht länger als 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In die zu stimulierende Zellfraktion wurden entsprechende Faktoren pipettiert und durch Schwenken der Schale verteilt. Nach Ablauf von 5 min wurden die Zellfraktionen in 1x PBS / 1 mM Natriumorthovanadat (kalt) pipettiert. Im folgenden mußten alle Schritte weiterhin bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt werden. Die Zellen wurden in diesem Puffer 1 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Die Röhrchen wurden 1 min umgekehrt aufgestellt und Medienreste durch Abklopfen entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml NP40-Puffer pro  $5 \times 10^7$  Zellen unter kräftigem Auf- und Abpipettieren lysiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und 10 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Der

Überstand wurde in Nunc™ -Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. 10 µl-Aliquote wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen.

Typischerweise wurden 10 µg Protein / µl Lysat, d.h. 20 mg Protein / 1 x 10<sup>8</sup> Zellen erhalten. Die Lyse von Granulozyten wurde mit NP40-, oder mit Triton-X-100-Puffer (im Falle präparative Aufarbeitung) über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler durchgeführt. Die Lysate wurden auf 200 ml-Reaktionsgefäße verteilt und 60 min mit 10000 rpm zentrifugiert.

#### 4.5.2 Konzentrationsbestimmung der Protein nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit Reagentien des Protein Assay von der Firma BioRad durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe von BSA-Standard-Verdünnungen von Rinderserumalbumin Fraktion V (Sigma) im Bereich 0,05 mg/ml bis 0,9 mg/ml bzw. (0,05 µg / ml bis 20 µg / ml). 800 µl Standard-Verdünnungen 800 µl Verdünnungen des Lysates vorgelegt, mit 200 µl Bradford Reagenz versetzt und durchmischt. Es folgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Aus den Extinktionswerten der BSA-Standardes, die in Form von Triplets bestimmt wurden, ließ sich eine Eichgerade erstellen, mit deren Hilfe die Konzentration der Proteine in den Lysatproben ermittelt werden konnte.

#### 4.5.3 Gelelektrophorese von Proteinen

Die zwei wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine, nämlich Molekülgröße und Ladungszustand, werden überwiegend zu ihrer Trennung und Charakterisierung verwendet, wobei den elektrophoretischen Trennmethoden eine Schlüsselstellung bei dieser Aufgabe zukommt.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Shapiro et al., 1967) ist eine Gelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz SDS und trennt Proteine ausschließlich nach Molekülgröße. Die Proteine werden hierbei denaturiert und an die Peptidketten lagert sich SDS an, wobei anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Da sich aus diesem Sachverhalt eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt, kann man mit Hilfe von Markerproteinen eine Eichkurve aufstellen und die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteinen bestimmen.

Molekulargewicht (kDa)[Sigma]	Protein:	Molekulargewicht (kDa)[Promega]	Protein:
205	Myosin	31	Carbonanhydrase
116	β-Galaktosidase	20,4 / 19,7	Trypsininhibitor aus der Sojabohne
97	Phosphorylase-B	16,9	Myoglobin aus Pferdeherzen

66	BSA	14,4	Lysozym
45	Ovalbumin	8,1	Myoglobin Fragment 1
29	Carboanhydrase	2,5	Myosin aus Kanninchenmuskel

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Molekulargewichtsstandard

Das allgemein für die SDS-Elektrophorese verwendete Puffersystem nach Laemmli (Laemmli et al. 1970) [Tris-Glycin-HCl] ist für lineare Trennungen von niedermolekularen Peptiden (<14 kDa) nicht geeignet. Schägger et al. (1987) konzipierten deshalb ein neues Gel- und Puffersystem, das die lineare Trennung von Polypeptiden mit 100 kDa bis 1 kDa zulässt.

Eindimensionale Trenntechniken wie SDS-PAGE können jedoch im günstigsten Fall nur ca. 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse von vielen hundert Proteinen, wie sie in ganzen Zellen vorkommen, ist dieses Auflösungsvermögen unzureichend.

O' Farrell (1975) entwickelte die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE), die Proteine nach Ladung und Molekulargewicht, trennt und damit die simultane Untersuchung von vielen Genprodukten auf einem Gel ermöglicht.

#### 4.5.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Der erste Schritt bei der 2D-PAGE von Proteinen ist die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung, wobei der immobilisierte pH-Gradient im Gel durch Kopolymerisation der Immobiline® (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren entsteht.

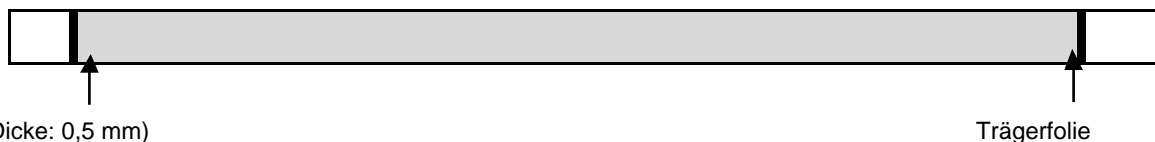


Abbildung 6: Geometrie der IPG-Gelstreifen, nach Görg et al. (1988)

Der aktuelle Stand dieser Technik wird regelmäßig von Görg et al. im Internet publiziert (<http://www.edv.agar.tu-muenchen.de/blm/deg/>).

#### 4.5.3.1.1 Durchführung

Proben-Applikation während der Rehydratisierung:

- Auflösen der Probe in Rehydratisierungslösung (in der Regel ist 5-100 µg für Silberfärbung und bis zu 1 mg für Coomassie-Färbung notwendig)
- Vorsichtiges Entfernen der IPG-Folie.
- Man pipettiert die Rehydratisierungslösung in die Mitte der einzelnen Vertiefungen des Kunststoffeinsetzes (trays) und legt die 3 mm breiten IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig hinein. Die Menge an Rehydratisierungslösung richtet sich nach der Länge der IPG-Streifen.

- Pipettieren einer ausreichenden Menge an Glycerin bzw. Silikonöl auf den Streifen.
- Rehydratisierung unter passive Bedingung (0 Volt , RT,12-16 Std).

Länge des IPG <sup>3-10</sup> -Streifens (mm)	Gesamtvolumen pro Streifen (µl)
70	125
110	200
170	330

Tabelle 9: Probe-Applikation für IPG-Streifen

#### 4.5.3.1.2 Fokussierung

Folgende Parameter wurden nach dem Schließen der Fokussierungskammer am Stromversorger für eine analytische Fokussierung eingestellt:

	IPG <sup>3-10</sup> (7 cm)		IPG <sup>3-10</sup> (17 cm)
200 Volt	1 Std	200 Volt	1 Std
500 Volt	1 Std	500 Volt	1 Std
500-4000 Volt	30 min	500-10000 Volt	1 Std
4000 Volt	1,5 Std	10000 Volt	2,5 Std

Tabelle 10: Werte für die Durchführung der Isoelektrische Fokussierung

#### 4.5.3.1.3 Äquilibrieren der IPG-Streifen

Äquilibrieren der IPG-Streifen in 10 ml Äquilibrierlösung (DTT) für 10 min.

Äquilibrieren der IPG-Streifen in 10 ml Äquilibrierlösung (Jodacetamid) für 10 min.

#### 4.5.3.2 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese Großformat

Das SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli ohne Sammelgel hergestellt und die zweite Dimension in der Regel über Nacht durchgeführt. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz in Tankpuffer getaucht, luftblasenfrei auf das vertikale SDS-Gel gelegt und mit einem Spatel leicht angedrückt. Der IPG-Streifen wurde mit heißer Agarose [0,5% (W/V)] in 1x Elektrodenspuffer fixiert. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, wurde die Stromstärke für 45 min auf 20 mA pro Gel begrenzt.

#### 4.5.4 Proteinnachweismethoden

Nach der Elektrophorese werden Proteine als gefärbte Komplexe nach ihrer Reaktion mit Farbstoffen (z.B. Coomassie) oder Silbersalzen sichtbar gemacht. Die Silberfärbung ist bedeutend empfindlicher (Faktor 10-100) als die Coomassiefärbung, die bevorzugt für die Färbung von präparativen 2D Gelen eingesetzt wird.

#### 4.5.4.1 Kolloidale Coomassiefärbung

Die Färbung wurde nach Neuhoff et al. (1985) folgendermaßen modifiziert:

- Färbelösung: 6 Std
- Dest. Wasser: bis der Gelhintergrund klar ist
- Die Gele werden ohne Fixierschritt direkt in die Färbelösung gegeben und mit dest. Wasser entfärbt.

#### 4.5.4.2 Silberfärbung

Die Färbung wurde nach Blum et al. (1987) folgendermaßen modifiziert:

- Fixierlösung (50% Methanol, 10% Essigsäure): 30 min oder über Nacht
- Quenchen (5% Methanol, 7,5% Essigsäure): 10 min
- Dest. Wasser: 10 min
- Sensitivieren (0,02% Thiosulfat): 1 min
- Dest. Wasser: 1-2 min
- Färben (0,2% Silbernitrat, 1 mM Formaldehyd): 30 min
- Dest. Wasser: 2x1 min
- Entwickeln (6% Na-Carbonat, 6 mM Formaldehyd): 5-10 min
- Dest. Wasser: 2x1min
- Abstoppen (2,3 M Zitronensäure): 5 min
- Dest. Wasser: 30min
- In 20% Ethanol kann man das Gel aufbewahren

#### 4.5.4.3 Westernblot

Der Transfer von Proteinen aus Elektrophoresegelelen wird in der Regel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes bewerkstelligt (Kyhse-Andersen J., 1984). Der Immunblot (Westernblot) wurde im Naßblot-, sowie als Semi-Dry-Verfahren durchgeführt.

##### 4.5.4.3.1 Naßblot

Auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulosemembranen (0,45 µm) wurden in 1x Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS, 20% Methanol) äquilibriert und auf das Polyacrylamidgel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen zwei Whatman® 3MM-Chromatographiepapiere und zwei Scotch-Schwämme in die Westernblot-Apparatur eingespannt. Die Proteine wurden im „Tankblotting“-Verfahren in 2 h bei 50 V auf die Membran transferiert. Die gebloottete Membran wurde kurz in 1x TBS gewaschen und mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für 1 Stunde geblockt.

Der am Rand aufgetragene Marker wurde als Streifen von der Membran abgeschnitten und mit Amidoschwarzlösung gefärbt. Der primäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers in 1xTBS / 0,5%Tween 2,5% Magermilchpulver / 0,01% Natriumazid verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Sie wurde am nächsten Tag dreimal für 10 min mit 1x TBS / 0,5%Tween 2,5% Magermilchpulver gewaschen und 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper oder Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, beide konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) nach Angaben des Herstellers in 1x TBS / 0,5%Tween 2,5% Magermilchpulver verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal mit 1x TBS gespült und wie folgt gewaschen:

- zweimal für 10 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20
- einmal für 10 min mit 1x TBS / 3% Tween 20
- zweimal für 15 min mit 1xTBS / 0,5% Tween 20
- zweimal für 30 min mit 1xTBS / 0,5% Tween 20
- zweimal für 30 min mit 1x TBS

Je 7 ml der ECL-Lösung I und II von Amersham wurden in einer Plastikschaale miteinander vermischt. Die Membran wurde 1 min in der Lösung inkubiert, auf Whatman®-Papier getrocknet und zwischen zwei Plastikfolien in eine Filmkassette gelegt. Nun wurden Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiten aufgelegt und im Entwicklungsgerät entwickelt.

Die Membran wurde nach der Exposition in 1x TBS bei 4°C gelagert. Wenn sie mit einem anderen, primären Antikörper inkubiert werden sollte, wurde sie für eine halbe Stunde in 62 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 70°C inkubiert und fünfmal für je 10 min mit 1xTBS / 0,5% Tween 20 gewaschen. das Protokoll konnte anschließend mit dem Blockieren der Membran wieder aufgenommen werden.

#### 4.5.4.3.2 *Semi-Dry-Blot*

Beim Semi-Dry-Blotting ist Puffer-Verbrauch relativ zum Naßblotverfahren geringer. Darüber hinaus ist diese Methode eher geeignet für den Transfer der kleineren Proteine (<100 kDa). Der Transfer wurde mit 0,8 mA / cm Geloberfläche gestartet und nach ca. 90-120 min beendet. Für eine nachfolgende Proteinsequenzanalyse wurde die Blotmembran (PVDF) in der Regel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blot 2-3 sec in Methanol getränkt, 5 min mit dest. Wasser gewaschen und dann bis zum Gebrauch mit Transferpuffer äquilibriert.

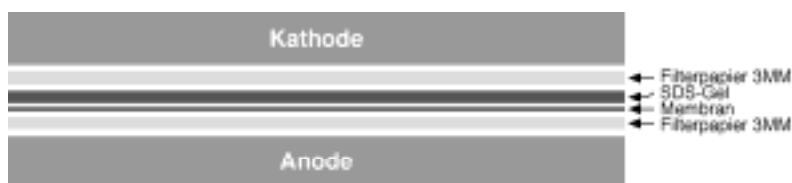


Abbildung 7: Aufbau eines "Blotting-Sandwich" für den Semi-Dry-Blot

#### 4.5.4.4 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein durch seine Bindung an einen spezifischen Antikörper aus einer Mischung zahlreicher Proteine isoliert werden. Der Antikörper wird zunächst an Protein A-Sepharose bzw. Protein A- oder G/A-Agarose gekoppelt und erst dann mit einem Gesamt-Zellysat inkubiert. Die Bindung zwischen Antikörper und Protein A-Sepharose kommt nur mit einem Kaninchen-, nicht aber mit einem Maus-Antikörper in ausreichendem Maße zustande. Deshalb wird in der Regel ein Kaninchen-Anti-Maus (R $\alpha$ M)-Antikörper zwischengeschaltet, wenn der antigenspezifische Antikörper aus der Maus stammt. Es wurden 4  $\mu$ g des R $\alpha$ M-Antikörpers mit 25  $\mu$ l einer 50%-igen Protein A-Sepharose-Lösung (Protein A-Sepharose<sup>®</sup>CL-4B, Pharmacia) und 250  $\mu$ l NP-40-Lysispuffer für 90 min bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Probe wurde anschließend dreimal mit NP-40-Lysispuffer gewaschen. Im anschließenden Waschschrift, wurde das Volumen im Reaktionsgefäß auf 900  $\mu$ l Lysepuffer gebracht, die Suspension durch kurzes Vortexen gemischt, die Protein A-Sepharose 2 min mit 5000 rpm sedimentiert und dann der Überstand mit einer Pipette entfernt. Im folgenden wird der antigenspezifische, monoklonale Antikörper (5  $\mu$ g / mg Gesamtzellysat) in gleicher Weise mit den Protein A-Sepharose-Pellets inkubiert.

Nachdem erneut dreimal gewaschen worden war, erfolgte die 90-minutige Inkubation mit 1 mg Zell-Lysat, woraufhin fünfmal gewaschen wurde. Die Proben wurden mit je 70  $\mu$ l 1x Protein-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 100°C gekocht und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran geblottet und immunochemisch analysiert.

#### 4.5.5 Klonierungen

Unter Verwendung entsprechender Primersets in PCR-Reaktionen wurden der Wildtyp sowie die Mutanten Y488F, Y515F, und Doppelmutante (Y488F and Y515F) von CEACAM1<sub>cyt</sub> und dem Wildtyp von CEACAM3 hergestellt. Die amplifizierte Domänen wurden in BamHI-PstI sites 3' im 6x-Histidinsequenz des bakteriellen Expressionsvektor pQE31 kloniert (Brümmer, J., 1995). Die rekombinanten Plasmiden wurden anschließend via Temperaturschock-Methode in kompetenten SG 13009 Bakterien transformiert. Diese werden dann auf Selektionsplatten ausplattiert. Die transformierten Bakterien sind antibiotikaresistent und werden nach der ü.N. Inkubation bei 37°C sichtbar. Die einzelne Bakterienklonien wurden

von den Selektionsplatten mit einem sterilen Zahnholz in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und inkubiert (37°C, ü.N., 180 rpm). Aus der 3 ml Übernachtskultur wurden 800 µl entnommen, mit 200 µl Glycerol (100%) versetzt, in sterile Glasröhrchen abgefüllt und diese bei -80°C gelagert.

#### 4.5.6 Protein-Bindungsstudien mit CEACAM1<sub>cyt</sub> als His-Tag-Fusionsprotein

In den Studien wurden gezielt Bereiche oder Domänen eines Proteins ausgewählt und als Fusionsproteine exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Ni-NTA-Agarose [Nitrilo-Tri-Acetic-acid] (Qiagen), die an den His-Anteil der Fusionsproteine bindet. Es wurden His-Tag-Fusionsproteine der CEACAM1<sub>cyt</sub>, Y488FCEACAM1<sub>cyt</sub>, Y515FCEACAM1<sub>cyt</sub>, Y488F, Y515FCEACAM1<sub>cyt</sub> verwendet. Die Inkubation und Waschschrte wurden analog zu den Immunpräzipitationen durchgeführt. Die His-Tag-Fusionsproteine waren in Bakterien exprimiert und auf Polyacrylamidgel quantifiziert worden. 5 µg Fusionsproteine wurden mit 30 µl einer 50%-igen Ni-NTA-Agarose- oder Immunokomplex-Suspension (bestehend aus spezifischem Antikörper-Protein A-Agarose-Komplex) [5% Endkonzentration] in 250 µl NP-40-Lysispuffer inkubiert. Die Endkonzentration der Proteine betrug in einem solchen Ansatz 16,7 ng / µl. Die Proben wurden fünfmal mit Lysepuffer gewaschen und mit je 1 mg Zell-Lysat inkubiert. Nach fünf Waschungen wurden sie wie bei der Immunpräzipitation in 70 µl 1x Protein-Ladepuffer aufgenommen, in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

#### 4.5.7 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die Plasmidpräparation aus Bakterien erfolgte nach der alkalischen Lyse. Das Maxiprep-Kit (Qiagen) wurde zur Plasmidpräparation aus größeren Kulturvolumina (bis zu 500 ml) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben vom Hersteller.

#### 4.5.8 Bakterielle Expression

Das Qiagen-pQE-System (pQE31) wurde für die Expression rekombinanter Proteine in Bakterien verwendet. Die Vorkulturen (30 ml LB-Medium, 100 µg / ml Ampicillin, 25 µg / ml Kanamycin) wurden aus dem Glycerolstock [-70°C] beimpft und über Nacht bei 37°C, 170 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Vorkulturen in 1000 ml-Schikane-Kolben (LB-Ampicillin & Kanamycin) expandiert und bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600 nm</sub>) von 0,7-0,9 inkubiert (37°C, 170 rpm, 4 Std). Anschließend folgte die Induktionsphase durch die Zugabe von 2 mM IPTG. Die Inkubation wurde für weitere 3-4 Stunden fortgesetzt. Nach Abschluß der Expression wurden die Bakterien abzentrifugiert (4000 U / min, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden wie folgt lysiert:

- Vortexen der Peletts in 5 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,1% Triton-X-100, 0,1 mg Lysozym / ml) und Inkubation bei RT für 10 min.
- Abzentrifugieren der Suspension (5000 U / min, 10 min, 4°C).
- Resuspendieren der Peletts in Sonication-Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8) und Inkubation bei RT für 10 min.
- Sonication für 5 min.

Anschließend wurde die Suspension bei 4°C, 10000 U / min, 30 min zentrifugiert. Aus dem Überstand (löslichen Proteinen) wurden die His-Tag-Fusionsproteine über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt und in Bindungsstudien eingesetzt.

#### 4.5.9 Chromatographie

Zur Aufreinigung der Proteinen wurden entsprechend deren Eigenschaften wie z.B. Ladung, Hydrophobizität, Affinität, Löslichkeit und Stabilität sowie Molekulargewicht verschiedene chromatographische Schritte verwendet.

Die Chromatographie wurde mit der FPLC (Pharmacia) und HPLC (D-7000-System von Firma Merck-Hitachi) durchgeführt.

##### 4.5.9.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Die His-Tag-Fusionsproteine wurden über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die beiden freien Positionen des quadratisch-bipyramidalen Komplexes von Ni-NTA-Agarose interagieren mit den Stickstoffatomen des Imidazolrings von Histidin.

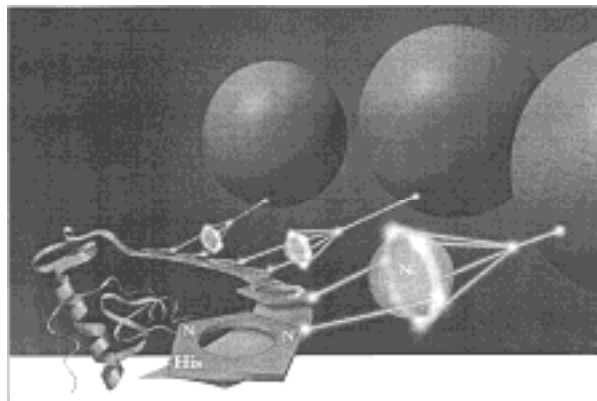


Abbildung 8: Interaktion von Ni-NTA mit dem 6xHis-Tag (nach Hersteller Qiagen)

Das Procedere für die Vorbereitung der Ni-NTA-Matrix, die Kopplung des Proteinlysates sowie die native Aufreinigung der Fusionsproteine wurde dem Qiagen-Handbuch entsprechend durchgeführt:

- Äquilibrieren der Ni-NTA-Matrix mit Sonication-Puffer, pH 8,0 (10 min Raumtemperatur Überkopfschüttler), Zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- Inkubation von Proteinlysaten mit Ni-NTA (2 Std oder über Nacht bei 4°C).
- Packen der Gelsuspension in eine Säule (je breiter die Säule, um so effizienter ist die Aufreinigung).
- Waschen mit Sonication-Puffer pH 6,0 (5-7 Fache Säulenvolumen).
- Elution der Fusionsproteine mit einem pH-Gradient (6 zu 3) in Waschpuffer.
- Quantifikation der aufgereinigten Proben auf Polyacrylamidgel.

#### 4.5.10 In-Vitro Bindungsstudien via Chromatographie

Die aufgereinigte native Wildtyp Domäne "CEACAM1<sub>cyt</sub>" wurde an Ni-NTA-Matrix immobilisiert. Für die Bindungsstudie im Rahmen dieser Arbeit wurde experimentell das Ligand-Rezeptor-Verhältnis {Fusionsprotein : Gesamtproteinlysat} 1:5 festgestellt. Die Bindungsstudie wurde wie folgt durchgeführt:

- Kopplung von CEACAM1<sub>cyt</sub> an Ni-NTA-Matrix (4°C, 1 Std, Überkopfschüttler).
- Inkubation mit Proteinlysate (4°C, 2 Std, Überkopfschüttler).
- Packen von Gelmatrixkomplex in einer XK-16 Säule (Pharmacia).
- Waschen mit Waschpuffer (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7,2).
- Kompetitive Elution (Linearer Gradient) mit (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,2).
- pH-Elution (Linearer Gradient) mit (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 3,5).
- Final-Elution (Stufengradient) mit (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M EDTA, 0,5 M NaCl, pH 7,2).
- Quantifizierung der isolierten Antigene via SDS-PAGE, Westenblot auf PVDF-Membran mit anschließender Edman-Abbau-Sequenzierung.

#### 4.5.11 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die Aufreinigung von mAb T.84.1 erfolgte über Protein A-Agarose (Bio-Rad) oder rekombinante Protein A-Sepharose (Pharmacia). Das Protein A wurde zunächst mit 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8 äquilibriert und anschließend die Zellüberstände (Hollow-Fiber-Produkt) über die Säulen mit 0,5 ml / min mindestens zweimal zirkuliert. Nach dem Waschen mit 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% NaN<sub>3</sub>, pH 7,2 wurde der Antikörper unter einem linearen Gradient mit 20 mM Na<sub>3</sub>-Citrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, M=294,10 g mol<sup>-1</sup>), pH 4,2 eluiert. Der aufgereinigte mAb wurde über Nacht gegen d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 4 mM PMSF bei 4°C dialysiert und anschließend lyophilisiert. Ein Teil von den Lyophilisaten wurde in 50% Glycerin, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH

7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mg / ml BSA für Westernblot-Untersuchungen gelöst und bei -20°C aufbewahrt und der Rest wurde für die Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B wie folgt eingesetzt:

- Das Lyophilisat wurde in Kopplungspuffer (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,2) aufgelöst und gegen Kopplungspuffer dialysiert (48 Std, 4°C).
- Filterieren (0,45 µm) und photometrische Konzentrationsbestimmung (Ey, P.L. et al., 1978) [Konzentration<sub>mg/ml</sub> = OD<sub>280</sub>/1,42] des Antikörpersgehalts.
- Vorbereitung des Gels nach den Herstellersangaben (Pharmacia) wie folgt:
- Waschen von 1 g CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B mit 200 ml 1 mM HCl und nachwaschen mit Kopplungspuffer bis der pH-Wert neutral wird.
- Inkubation des Antikörpers (T.84.1) mit gequollenem Gel im Verhältnis 3 mg / 1 ml (4°C, 24 Std, Überkopfschüttler).
- Packen des Gel-Antikörperkomplexes in XK-Säulen (z.B. XK-16, XK-25 oder -50).
- Blockieren der freien Gruppen von Sepharose mit 1 M Triethanolamin, pH 8, (2 Std, bei Raumtemperatur).
- Waschen der Säule in drei Schritten (Stufengradient) mit jeweils 10 ml 0,1 M Acetatpuffer, pH 4 und 0,1 M Boratpuffer, pH 8.
- Die Säule wurde für Aufreinigung von CEACAM1 eingesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Die Aufreinigung von mAb 4D1C2 wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei mAb T.84.1 durchgeführt. Die Immunoaffinitätschromatographie mit mAb 4D1C2 wurde wegen geringer Kopplungseffizienten nicht durchgeführt. Der Antikörper wurde aber oft in anderen Untersuchungen wie z.B. Westernblot, Immunhistochemie sowie Zellbiochemie verwendet.

Zeit(min)	% Wasch-Puffer	% Elutionspuffer	Flußrate (ml/min)
0,01	100	0,0	1
30	100	0,0	1
100	0,0	100	1
120	0,0	100	1
121	100	0,0	1
150	100	0,0	1

Tabelle 11: Das HPLC-Protokoll für Reinigung von mAb 4D1C2 (Ø 16 mm, Höhe 50 mm) mit dem Wasch-Puffer [20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% NaN<sub>3</sub>, pH 7,2] und Elutionspuffer [20 mM Na<sub>3</sub>-Citrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O), 0,05% NaN<sub>3</sub>, pH 4]

#### *4.5.11.1 Anreicherung von CEACAM1 über Immunoaffinitätschromatographie mit dem immobilisierten mAb T.84.1*

Um die Effizienz der Immunoaffinitätschromatographie bei der Anreicherung von CEACAM1 zu erhöhen, wurde das Rohextrakt einer Perchlorsäureextraktion unterworfen. Anschließend wurde es über eine Säule mit der Flußrate 0,5 ml / min gepumpt (FPLC, Pharmacia). Nach dem Auftragen wurde die Säule solange mit PBS gewaschen bis die Absorption die Basislinie erreicht wurde. Die Elution der spezifischen Proteinen erfolgte über einem linearen Gradienten mit Elutionspuffer (0,2 M Glycin, pH 3). Nach je drei Aufreinigungen wurde 6 M Guanidium-HCl als Elutionspuffer verwendet.

#### **4.5.12 Perchlorsäure-Extraktion**

1,6 M kalte Perchlorsäure (PCA) wurde tropfenweise unter Rühren zu der Probe gegeben. Anschließend wurde das Gemisch für weitere 30 min bei 4°C gerührt. Die Endkonzentration an PCA war 0,8 M. Nach der Zentrifugation (3000 U / min, 15 min) wurde der Überstand mit NaOH neutralisiert und gegen d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 4 mM PMSF für 24 Stunden dialysiert. Das d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O wurde zweimal gewechselt. Es folgten die Zentrifugation (10000 U / min, 30 min) und das Einengen mittels Lyophilisator. Das eingengte Rohextrakt wird über Ultrafiltrationseinheiten (Millipore™-30K) mit Triton-X-100-Lysepuffer umgepuffert. Das somit vorbereitete Rohextrakt diente als Ausgangsmaterial für die Immunoaffinitätschromatographie.

#### **4.5.13 Gel Size-Chromatographie**

Die Gel Size-Chromatographie (GSC) basiert auf der Unterschiede der Elutionsgeschwindigkeit von Proteinen. Die kleinen Proteine diffundieren in das Gel hinein, daher werden sie später als die größten Proteine eluiert. Das Molekulargewicht von unbekannt Proteinen kann auf dieses Basis abgeschätzt werden, indem man das Elutionsvolumen mit den Molekulargewichten definierter Proteinstandards korreliert.

Das Ausschlußvolumen ( $V_0$ ) der Gelfiltrationssäule wurde mit Dextran-Blue-2000® bestimmt. Nach dem Äquilibrieren der Säule wurde die Probe ( $\cong$  2-5% Gelbedvolumen) über ein Injektionssystem in die Säule appliziert. Die mobile Phase bildete PBS. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Elutionsfraktionen worden mittels Zentrifugation (Ultrafiltrationseinheit 10®) eingengt und für verschiedene Assays verwendet.

#### **4.5.14 Reversed Phase Chromatographie**

Die Reversed Phase Chromatographie (RPC) basiert auf dem Prinzip „Wechselwirkung der Proteine mit einer hydrophoben Matrix“. Somit werden die hydrophoben Proteine mit steigendem Gehalt an lipophilem Laufmittel eluiert. Die CEACAM1-positiven Fraktionen nach der Immunoaffinitäts-Chromatographie (mit mAb T.84.1) wurden entsalzt, lyophilisiert und mit verschiedenen Gradienten an Pro RPC HR 10 Säule®(Pharmacia) chromatographiert.

Mit Hilfe eines HPLC-Pumpsystems (D-7000 Merck) wurden Gradienten der folgenden Laufmittel angewendet:

Zeit(min)	% Wasch-Puffer	% Elutionspuffer	Flußrate (ml/min)
0,01	100	0,0	0,30
50	100	0,0	0,30
120	0,0	100	0,30
160	0,0	100	0,30
161	100	0,0	0,30
200	100	0,0	0,30

Tabelle 12: HPLC-Trennung an Pro RPC HR 10 Säule<sup>®</sup> (Pharmacia) mit dem Wasch-Puffer [0,1% TFA (in d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)] und Elutionspuffer [0,1% TFA, 80% Acetonitril (in d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)]

Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit dem Verhältnis (1:5) in PBS überführt und für ca. 15 min im Hochvakuum (Speed-Vac) zentrifugiert. Als Alternative wurden die Proben in lösungsmittelbeständigen Ultrafiltrationseinheiten (Centricon 3SR<sup>®</sup> Pharmacia) umgepuffert und eingengt. Die Proben wurden für SDS-PAGE und Westernblot Experimente eingesetzt

#### 4.5.15 Elektronen-Spray Massenspektrometrie

Mittels eines Vestec 201 Single-Quadropol-Massenspektrometers (Vestec Corp., Houston, USA) mit einem Massenbereich bis 2000 amU und Einheitsauflösung erfolgten die Elektronen-Spray Massenspektrometrie (ES-MS)-Messungen. Das Elektrospray wurde durch Anlegen einer Spannung von 1,8-2,3 kV an der Nadelspitze und 200 V an der Düse erzeugt. Alle Messungen wurden bei einer Repellerspannung von jeweils 20 V und Repeller-blocktemperatur von 200°C durchgeführt. Die Spray-Kammer wurde auf ca. 40°C thermostatisiert. Zur Optimierung der Spektrenaufnahme wurde die Distanz zwischen Nadel und Nozzle mit Hilfe einer Justierschraube variiert. Die Massenkalisierung erfolgte anhand von 8-, 9- und 10-fach protonierten Molekülonen des Lysozyms. Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit Hilfe eines Datensystems (Vector 2; Tekniver, Maryland, USA) aufgezeichnet und ausgewertet.

##### 4.5.15.1 Probenpräparation zur ES-MS

Als Lösungsmittel wurde bei allen Messungen 2%-ige Essigsäure/Methanol (9:1, v/v), pH 2,5 verwendet. Die Konzentration der Probe lag bei 50 µM. Die Probenlösung wurde in eine 100 µl Hamiltonspritze überführt und mit Hilfe eines Pumpsystems (Haward Pumpe `Apparatus 44`) bei einer Flußrate von 2 µl / min über eine 60 cm lange Fused-Silica-Kapillare (Ø 50 µm) in die Ionenquelle gepumpt.

Alle Berechnungen zur Molekulargewichtsbestimmung der Peptide erfolgten mit dem Programm MASS (Maryland, USA). Das Programm umfasste einen Sequenzeditor zum

Erstellen von Sequenzdaten und bot neben der Berechnung von Durchschnitts- und Monoisotopenmassen der  $[M+H]^+$ -Ionen von Proteinen und Peptiden umfangreiche Möglichkeiten zur Auswertung von Peptide-Mapping-Analysen an.

#### 4.5.16 Phosphorylierungsreaktionen

Die Tyrosinreste von CEACAM1<sub>cyt</sub> und deren Mutanten wurden *in-vitro* mittels verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert. Bei der Verwendung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP erfolgte die Detektion mittels Röntgenfilm, bei dem nicht radioaktiven ATP wurde das Gel geblottet und die Phosphorylierung mittels eines anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (PY20) nachgewiesen.

Die rekombinante humane Src-Kinase (pp60<sup>c-src</sup>) der Firma Upstate Biotechnology Incorporated mit der spezifischen Aktivität von 900000 Units / mg wurde für die Untersuchungen eingesetzt.

Zunächst wurden die CEACAM1<sub>cyt</sub>-Probe in Kinase Assay Puffer umgepuffert und eingengt. Anschließend wurde die Phosphorylierung wie folgt durchgeführt:

	Positiv-Ansatz	Kontroll-Ansatz	Temperatur
CEACAM1 <sub>cyt</sub>	100 µl (≅ 10 µg)	10 µl (≅ 1 µg)	37°C
Kinase-Dilution-Puffer	15 µl	1,5 µl	37°C
Kinase-Assay-Puffer	-----	3 µl	37°C
Src-Kinase	3 µl	-----	37°C
ATP-Mix	15 µl	1,5 µl	37°C
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP*	50 µCi (30Ci/mM)	5 µl (Ci 30Ci / mM)	37°C

Tabelle 13: Phosphorylierungsprotokoll für SRC-Kinase

- \* Beim Ansatz von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP musste hinter einem Plexi-Glas-Schirm gearbeitet werden. Hierbei konnte die Inkubationszeit 30 min bis maximal 90 min sein. Im Falle von nicht radioaktiven Ansätzen wurde die Inkubationszeit auf 5 bis 24 Stunden erhöht.

#### 4.5.17 P-Tyr-Affinitätschromatographie

Die Isolierung von den Phosphorylierungsdomänen aus den Reaktionsansätzen erfolgte nach dem Protokoll des P-Tyr Immunaffinitätssystem (PTS01) der Firma Oncogene Science (USA):

- Aquilibrieren der P-Tyr (Ab-1)-Agarose mit Wasch-Puffer
- Manuelles Zirkulieren des Reaktionsansatzes über die Säule (10 mal bei 4°C)
- Waschen der Säule mit 3-5 ml Wasch-Puffer

- Eluieren mit dem Elutions-Puffer, je 10 Tropfen wurden als Elutionsfraktion gesammelt und durch Westernblot (mit anti P-Tyr-Antikörper) oder mittels Geiger-Zähler bzw. Szintillationsmessgerät untersucht.

Wasch-Puffer	Elutions-Puffer
1% Triton X-100	1% Triton X-100
10 mM Tris-HCl, pH 7,6	10 mM Tris-HCl, pH 7,6
2 mM EDTA	2 mM EDTA
50 mM NaCl	50 mM NaCl
30 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	30 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O
50 mM NaF	50 mM NaF
100 µM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 µM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
0,1% NaN <sub>3</sub>	0,1% NaN <sub>3</sub>
	10 mM Phenyl Phosphat

#### 4.5.17.1 Protein Kinase C (PKC)

Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 enthält eine Reihe Serine bzw. Threonine, die durch PKC phosphoryliert werden. Die Serin / Threonin-Phosphorylierung mittels PKC wurde wie folgt durchgeführt:

	Positiv-Ansatz	Kontroll-Ansatz	Temperatur
CEACAM1 <sub>cyt</sub>	100 µl (≅ 10 µg)	10 µl (≅ 1 µg)	37°C
Kinase-Dilution Buffer	20 µl	2 µl	37°C
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	20 µl	2 µl	37°C
0,1 M MgCl <sub>2</sub>	20 µl	2 µl	37°C
2 mM EDTA	20 µl	2 µl	37°C
Diacylglycerol 10 µg / ml	20 µl	2 µl	37°C
PKC	5 U	.....	37°C
ATP-Mix	20 µl	2 µl	37°C
[γ- <sup>32</sup> P]ATP*	50 µCi (30 Ci / mM)	5 µCi (30 Ci / mM)	37°C

Tabelle 14: Phosphorylierungsprotokoll für PKC

#### 4.5.18 Immunhistochemische (IH) und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLMS)

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden HUVEC-, HT29-Zellen und Granulozyten verwendet. Die Granulozyten wurden zunächst aus Buffy-Coat gewonnen und anschließend per Cyto-Spin auf Objekt-Träger übertragen. Die adhärennten HUVEC- sowie

HT29-Zellen in Flasketten (Nunc) kultiviert. Um Entdifferenzierungserscheinungen bei den HUVEC-Zellen vorzubeugen, wurden nur die Passagen 1-3 gefärbt. Die IH-, sowie CLMS-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Unteregger, Institut für Molekularbiologie in Homburg wie folgt durchgeführt:

#### 4.5.18.1 Präparation der Objektträger

Nach der Kultivierung im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub> und 37°C) wurde das Medium abgesaugt und das Oberteil der Flaskette entfernt. Die Fixierung erfolgte mit -20°C kaltem Aceton bzw. 4%-igen Paraformaldehyd. Anschließend wurden die Objektträger bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.5.18.2 Immunchemische Färbung

Nach dem Auftauen der Objektträger wurden die Inkubationsschritte in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Schritt		
1	1-3 min waschen mit PBS	
2	Fixierung mit kaltem Aceton für 10 min	Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min
3	3x5 min waschen mit PBS	
4	30 min Blockierung mit 10% FCS, 1% BSA in PBS	
5	60 min Inkubation mit dem ersten Primär-Antikörper, 1:50	
6	3x5 min waschen mit PBS	
7	5 min Blockierung mit 10% FCS, 1% BSA in PBS	
8	1 min waschen mit PBS	
9	Inkubation mit TRITC oder FITC markierten sekundär-Antikörper, 1:50 [Ziege anti Maus]	
10	3x5 min waschen mit PBS	
11	30 min Inkubation mit irrelevanten Ziege anti Maus (Fab'), 1:50	
12	3x5 min waschen mit PBS	
13	60 min Inkubation mit dem zweiten Primär-Antikörper, 1:25	
14	3x5 min waschen mit PBS	
15	Inkubation mit TRITC oder FITC markierten sekundär-Antikörper, 1:50	
16	3x5 min waschen mit PBS	

Tabelle 15: Protokoll für die Immunchemische Färbung

#### 4.5.18.3 Immunchemische Färbung mit Peroxidase-konjugiertem Antikörper

Nach der üblichen immunchemischen Färbung erfolgte die DAB-Substrat Reaktion für 15-20 Minuten. Das DAB-Substrat wird wie folgt angesetzt:

Eine 10 mg DAB-Tablette in 50 ml Tris-Cl (0,05 M) mit 120 µl 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lösen.

Nach dem Waschen der Objektträger mit Tris-Cl (0,05 M) erfolgt die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer für maximal 10 sec. Nach kurzem Spülen in 1% Essigsäure wurden die Objektträger für 10 min unter Leitungswasser gehalten. Die Zellen werden anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Danach erfolgt drei Waschschrte in HistoClear (RT, 5 min) und das Eindeckeln mit Eukitt.

#### 4.5.19 Invasions-Assay

Für diese Untersuchung wurde das Matrigel Invasion Chamber System von Becton Dickensen eingesetzt und den Angaben des Herstellers folgend gearbeitet:

- Rehydratisieren von Matrigel Matrix mit RPMI-1640 (120 min, 5% CO<sub>2</sub> 37°C).
- Vorsichtiges Entfernen von Medium.
- Zugabe von ca. 750 µl Medium (5% FCS) in jeder Vertiefung und 500 µl Zell-Suspension (2,5x 10<sup>4</sup> Zelle / Chamber).
- Inkubation der Chamber bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 22 Stunden.
- Entfernen der nicht-invasiven Zellen mit einem Wattestäbchen von der Membranoberfläche.
- Fixieren und Färben der Membran mit Baxter Diff-Quick (DADE Behring AG, Marburg).
- Auszählung der invasiven Zellen in den zufällig ausgewählten Feldern unter dem Phasenkontrast-Lichtmikroskop.

Der Invasionsprozentsatz wird definiert als Anzahl der invasiven Zellen in die Invasion-Chamber geteilt durch die Anzahl der migrierenden Zellen durch das Kontroll-Insert (ohne Matrigel-Beschichtung).

Definition Invasionsprozent:

$$\% \text{ Invasion} = \frac{\text{Mittelwert aus invadierten Zellen durch Matigel-Insert-Membran}}{\text{Mittelwert aus migrierten Zellen durch Kontroll-Insert-Membran}}$$

Der Invasionsindex wird als das Verhältnis der Invasionsprozentzahl der Test-Zellen zu der Invasionsprozentzahl der nicht-invasiven Kontroll-Zellen definiert.

Definition Invasionsindex:

$$\% \text{ Invasionsindex} = \frac{\% \text{ Invasion der Test-Zellen}}{\% \text{ Invasion der Kontroll-Zellen}}$$

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Charakterisierung von CEACAM1

#### 5.1.1 Granulozyten-Präparation

Die Präparation von Granulozyten wurde auf zweierlei Weise durchgeführt:

Für analytische Zwecke wurden die Granulozyten über einen Ficoll-Gradient präpariert,

für semi-präparative Zwecke wurden die Granulozyten ohne Ficoll-Gradient präpariert.

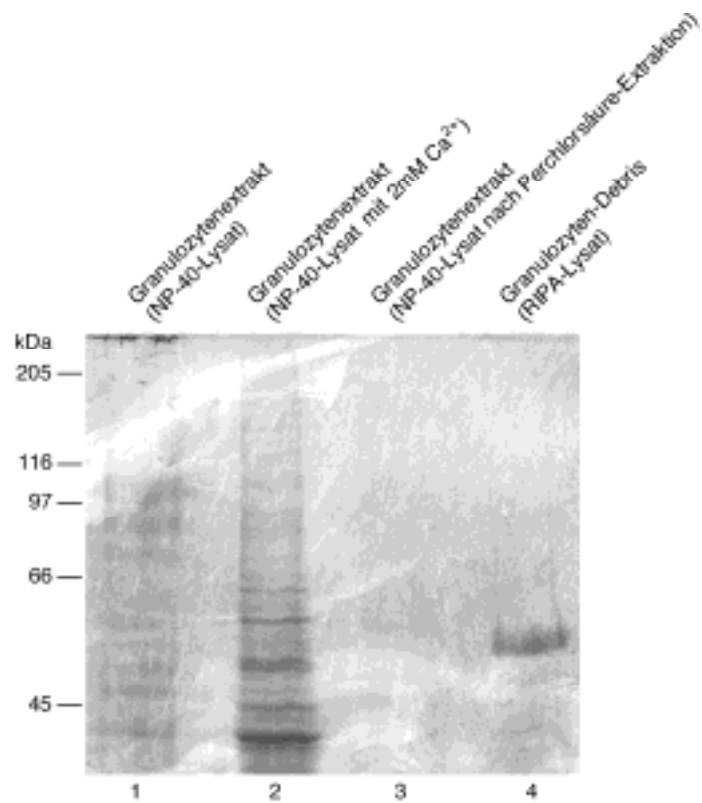
Folgende Daten (bezogen auf jeweils 6 Buffy-Coat, ca. 200 ml) zeigen die Unterschiede der beiden Verfahren:

	Ficoll-Gradient	Ø Ficoll-Gradient
• Ausbeute/Naß-Gewicht	0,43 g	1,33 g
• Zell-Zahl	$1,5 \times 10^8$	$5 \times 10^{10}$
• Arbeitszeit	120 min	90 min
• Protein-Konzentration	$0,54 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	$2,2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$

Tabelle 16: Vergleich der Granulozytenpräparationsergebnisse unter An-, bzw. Abwesenheit vom Ficoll

Um die Phosphatasen zu blockieren wurde die Lyse der Zellen in Anwesenheit von Pervanadat durchgeführt. Die Lyse dauerte 180 min und wurde bei 4°C an einem Überkopfrührer durchgeführt. Um eine Art Vorreinigung oder Fraktionierung der Proteine zu erreichen, wurde das Zell-Lysat einer 1,6 M Perchlorsäure-Extraktion unterworfen.

Abbildung 9 zeigt Granulozytenextrakte nach der SDS-PAGE. Es wurden annähernd gleiche Mengen der Protein-Lysate (ca. 5 µg) aufgetragen. Die Lyse der Granulozyten wurde in Abwesenheit (Spur 1), bzw. in Anwesenheit (Spur 2) von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Die Spur 3 zeigt die Granulozytenlysate nach der Perchlorsäure-Extraktion und Spur 4 zeigt die Granulozyten-Debris nach der Perchlorsäure-Extraktion.



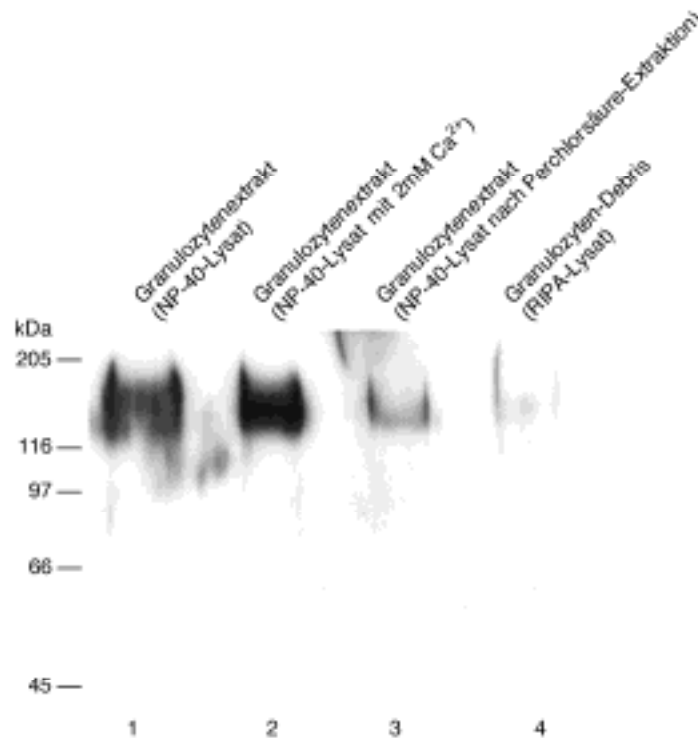
Spur 1: 5 µg Granulozytenextrakte (Lyse mit NP-40 als Detergens)

Spur 2: 5 µg Granulozytenextrakte (Lyse mit NP-40 als Detergens und 2 mM Ca<sup>2+</sup>)

Spur 3: 5 µg Granulozytenextrakte (NP-40-Lysat nach Perchlorsäure-Extraktion)

Spur 4: 5 µg Granulozyten-Debris nach der Lyse mit RIPA-Puffer

Abbildung 9: 7,5% SDS-PAGE der Granulozytenextrakte mit anschließender Coomassie-Färbung (hier in Graustufen dargestellt)



Spur 1: 5 µg Granulozytenextrakte (Lyse mit NP-40 als Detergens)

Spur 2: 5 µg Granulozytenextrakte (Lyse mit NP-40 als Detergens und 2 mM Ca<sup>2+</sup>)

Spur 3: 5 µg Granulozytenextrakte (NP-40-Lysat nach Perchlorsäure-Extraktion)

Spur 4: 5 µg Granulozyten-Debris nach der Lyse mit RIPA-Puffer

Detektion: α-CEACAM1 mAb (4D1C2) 0,5µg /1000 µl, Ziege anti-Maus-POD 1:5000

Abbildung 10: 7,5%-SDS-PAGE der Granulozytenextrakte mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunfärbung mit CEACAM1 mAb 4D1C2

Abbildung 10 zeigt Granulozytenextrakte nach der SDS-PAGE mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunofärbung mit CEACAM1-mAb 4D1C2. Es wurden annähernd gleiche Menge Protein-Lysate (ca. 5 µg) aufgetragen. Die Lyse der Granulozyten wurde in Abwesenheit (Spur 1), bzw. in Anwesenheit (Spur 2) von 2 mM Ca<sup>2+</sup> durchgeführt. Spur 3 zeigt die Granulozytenlysate nach der Perchlorsäure-Extraktion und Spur 4 zeigt die Granulozyten-Debries nach der Perchlorsäure-Extraktion. Die Bande bei ca. 160 kDa weist auf das granulozytäre CEACAM1 hin. Die Spuren 1 und 2 (Lyse mit NP-40 bzw. NP-40 mit 2 mM Ca<sup>2+</sup>) zeigen eindeutig bessere CEACAM1-Ausbeuten als im Falle von NP-40-Lysat nach Perchlorsäure-Extraktion (Spur 3) und CEACAM1 ist immer noch in Granulozyten-Debris vorhanden (Spur 4). Es ist daher wichtig je nach Vorhaben die bestimmte Lyseart zu wählen. Bei dieser Arbeit wurde die NP-40-Lyse nach Perchlorsäure-Extraktion für die CEACAM1-Isolierung und die einfache NP-40-Lyse bzw. NP-40-Lyse mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> für die Bindungsstudien verwendet.

Weil mehr als dreizehn Spleißvarianten von CEACAM1 bekannt sind (Thompson, J.A., 1991) und da mit dem spezifischen  $\alpha$ -CEACAM1 Antikörper (4D1C2) in Granulozytenextrakten (SDS-PAGE & Western Blot) nur CEACAM1 detektiert wird, wurde das Vorhandensein von Spleißvarianten und/oder von unterschiedlich modifizierte CEACAM1 via zwei dimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) untersucht.

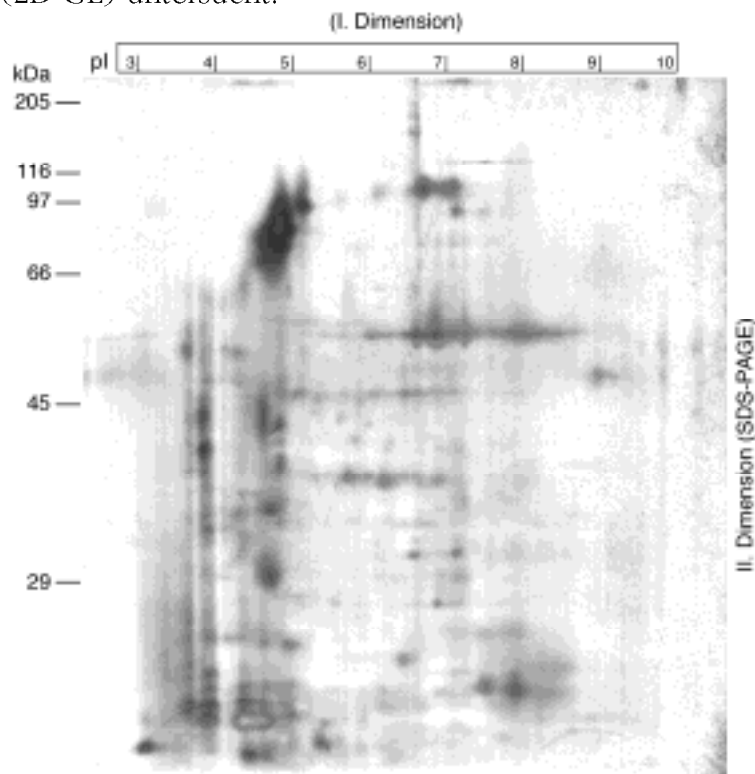


Abbildung 11: Die zweidimensionale Gelelektrophorese ( 2D-GE ) der Granulozytenextrakte mit anschließender Coomassiefärbung (hier in Graustufen dargestellt)

Abbildung 11 zeigt die isoelektrische Fokussierung der Granulozytenextrakte unter passiven Bedingung ( I. Dimension, der untersuchte Bereich der isoelektrischen Punkte „pI 3 bis pI 10“ ) gefolgt von 10% SDS-PAGE als II. Dimension. Das Gel wurde anschließend Coomassie gefärbt.

Abbildung 12 zeigt die isoelektrische Fokussierung der Granulozyten-Extrakte unter passiven Bedingungen ( I. Dimension, der untersuchte Bereich der isoelektrischen Punkte „pI 3 bis pI 10“ ) gefolgt von 10% SDS-PAGE als II. Dimension. Das Gel wurde anschließend auf Nitrocellulose Membran geblottet. Durch Immunfärbung mit CEACAM1-mAb (4D1C2) konnten zwei isoelektrische Punkte für CEACAM1 festgestellt werden. Die linke Spur zeigt nur die eindimensionale Auftrennung der Granulozyten und deren Immunfärbung mit CEACAM1-mAb (4D1C2). Somit konnte festgestellt werden, daß das granulozytäre CEACAM1 in mindestens zwei Isoformen (mit kurzer oder langer zytoplasmatischer Domäne) und/oder zwei unterschiedlich modifizierten Formen vorkommt.

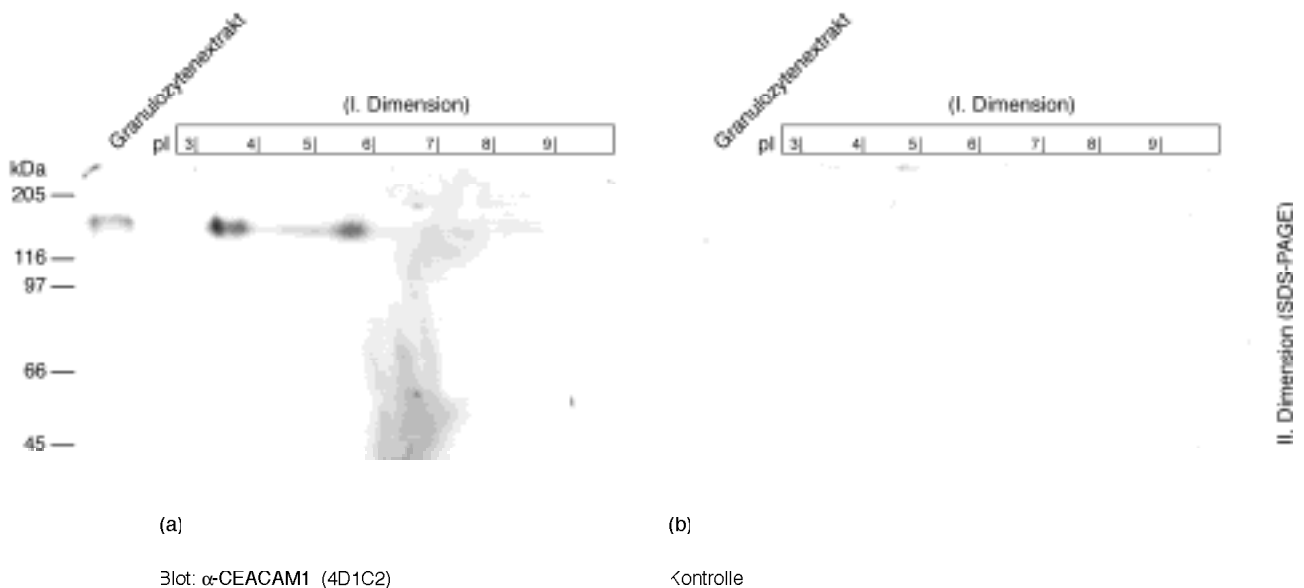


Abbildung 12: Die zweidimensionale Gelelektrophorese ( 2D-GE ) der Granulozytenextrakten mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunfärbung mit mAb 4D1C2 (a); Maus IgG als Kontrolle (b), Detektion: CEACAM1-mAb (4D1C2) bzw. Maus IgG 0,5  $\mu$ g / 1000  $\mu$ l , Ziege anti-Maus-POD 1:5000

Durch die Perchlorsäure-Extraktion konnte ein großer Teil von humanen Albumin sowie Immunoglobulin getrennt werden, die sonst bei der Affinitätschromatographie stören. Daher wurde das Proteinlysate erst nach der Perchlorsäure-Extraktion als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie eingesetzt (Abbildung 14, Abbildung 15).

Der berechnete isoelektrische Punkt von CEACAM1 beträgt 5,7. Aber experimentell konnten zwei isoelektrische Punkte von CEACAM1 festgestellt werden:  $pI(1)= 3,5$  und  $pI(2)= 5,7$  (Abbildung 12).

Angesichts des bereits vorhandenen Antikörpers T.84.1, wodurch unter anderem das Ziel-Antigen CEACAM1, angereichert werden kann [Affinitätschromatographie] wurde auf sonst übliche Reinigungsschritte wie z.B. Anionen-, bzw. Kationenaustauscher verzichtet.

Um eine entsprechende Affinitätschromatographie durchführen zu können, musste der Antikörper (Hollow-Fiber Produkt) zunächst über Protein A (Bio Rad) bzw. rekombinantes Protein A (Pharmacia) aufgereinigt werden.

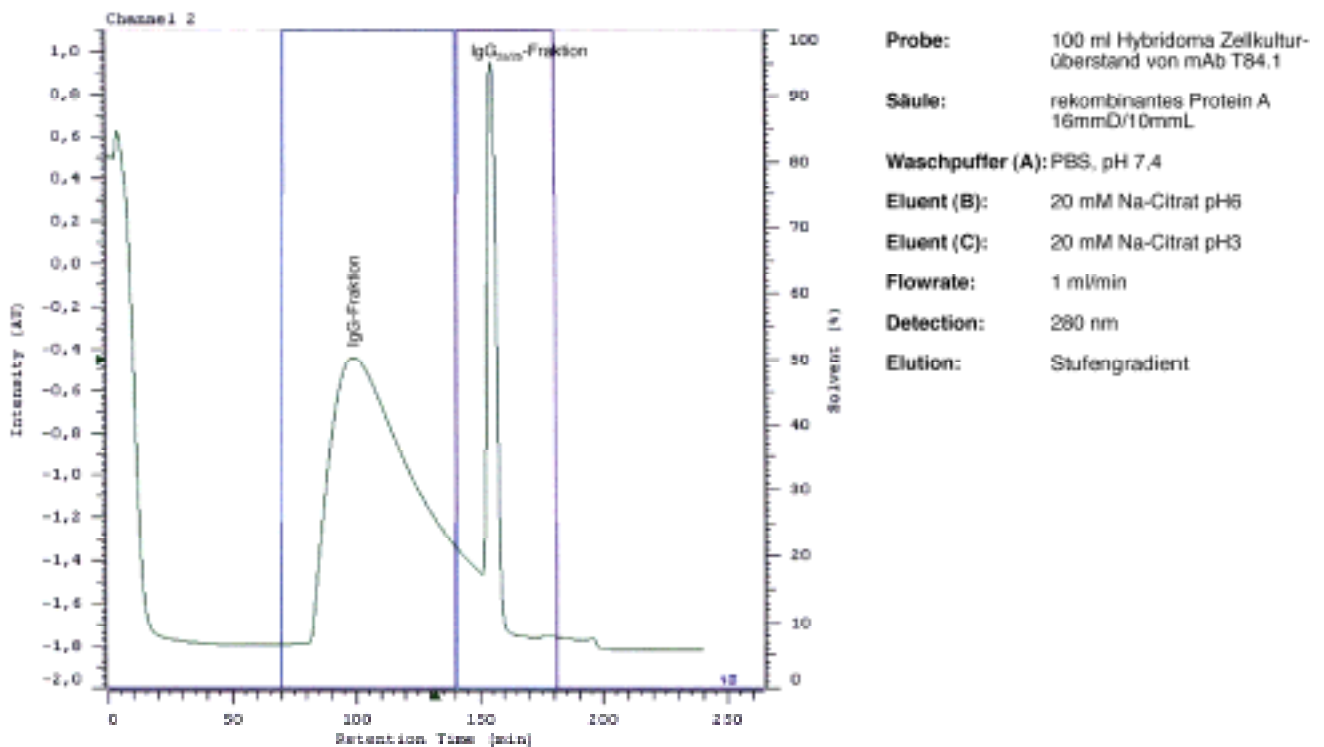


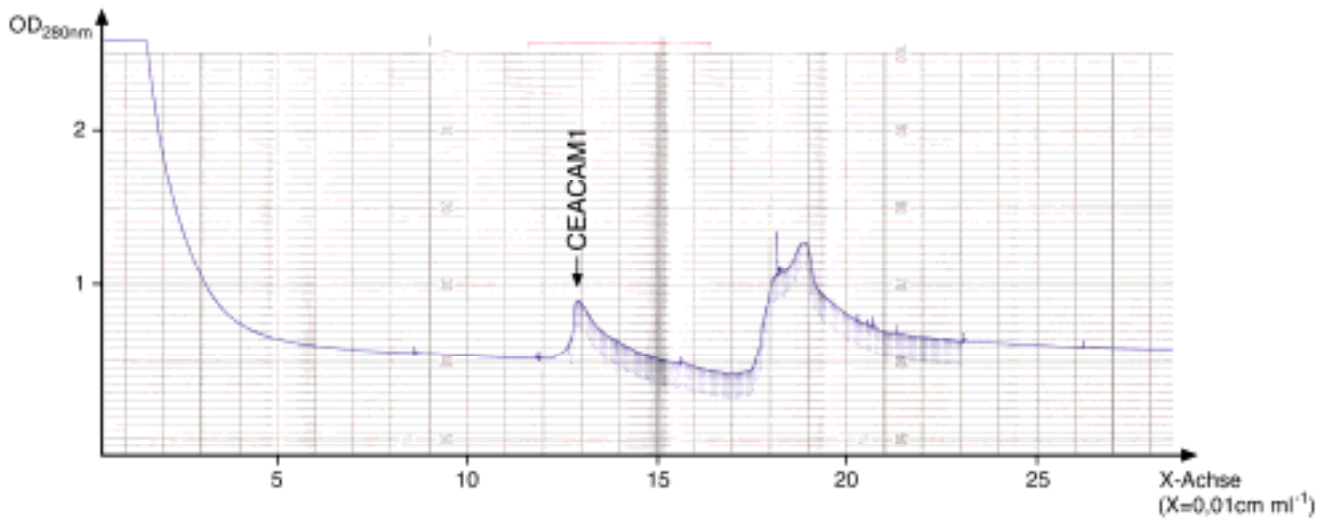
Abbildung 13: Aufreinigung von mAb T.84.1 über rekombinantes Protein A

Abbildung 13 zeigt das Aufreinigungschromatogram für mAb T.84.1. Das Auftragen des Ausgangsmaterials "Zellkultur-Überstand" erfolgte mit 0,5 ml / min. Nach 70 min Waschen mit PBS pH 7,4 wurden die IgG-Fraktion mit 70 ml Puffer ( 20 mM Na-Citrat pH 6 ) und IgG2a/2b mit 40 ml Puffer ( 20 mM Na-Citrat pH 3 ) stufenweise eluiert.

Nach ca. 100 Aufreinigungen konnten insgesamt 2 g des Antikörpers gewonnen werden. Die Kopplung des Antikörpers an BrCN- Sepharose CL4B fand entsprechend des Herstellerprotokolls (Pharmacia) statt.

### 5.1.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von CEACAM1 aus Granulozyten-Extrakten

In der Affinitätschromatographie wurden die Granulozytenlysate aufgereinigt (siehe Methoden Aufreinigung). Die Elution erfolgte über die Zugabe von 0,2 M Glycin, pH 3. Die Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen typische FPLC-, und HPLC-Chromatogramme der Läufe. Die Elution erfolgte stufenweise und zwar nach 215 min bzw. 300 min (siehe X-Achse).



**Probe:** 2000 ml Granulozytenextrakt

**Säule:** semipräparative Affinitätschromatographie mit mAb T.84.1-BrCN-Sepharose CL4B als Matrix (150 mm Ø / 700 ml)

**Waschpuffer (A):** PBS, pH 7,4, 0,05 %  $\text{NaN}_3$

**Eluent (B):** 0,2 M Glycin, pH 3, 0,05 %  $\text{NaN}_3$

**Flowrate:** 10 ml / min

**Detection:** 280 nm

**Elution:** Stufengradient

Abbildung 14: Aufreinigung von aus Granulozyten präpariertem CEACAM1 über eine semipräparative T.84.1 Säule

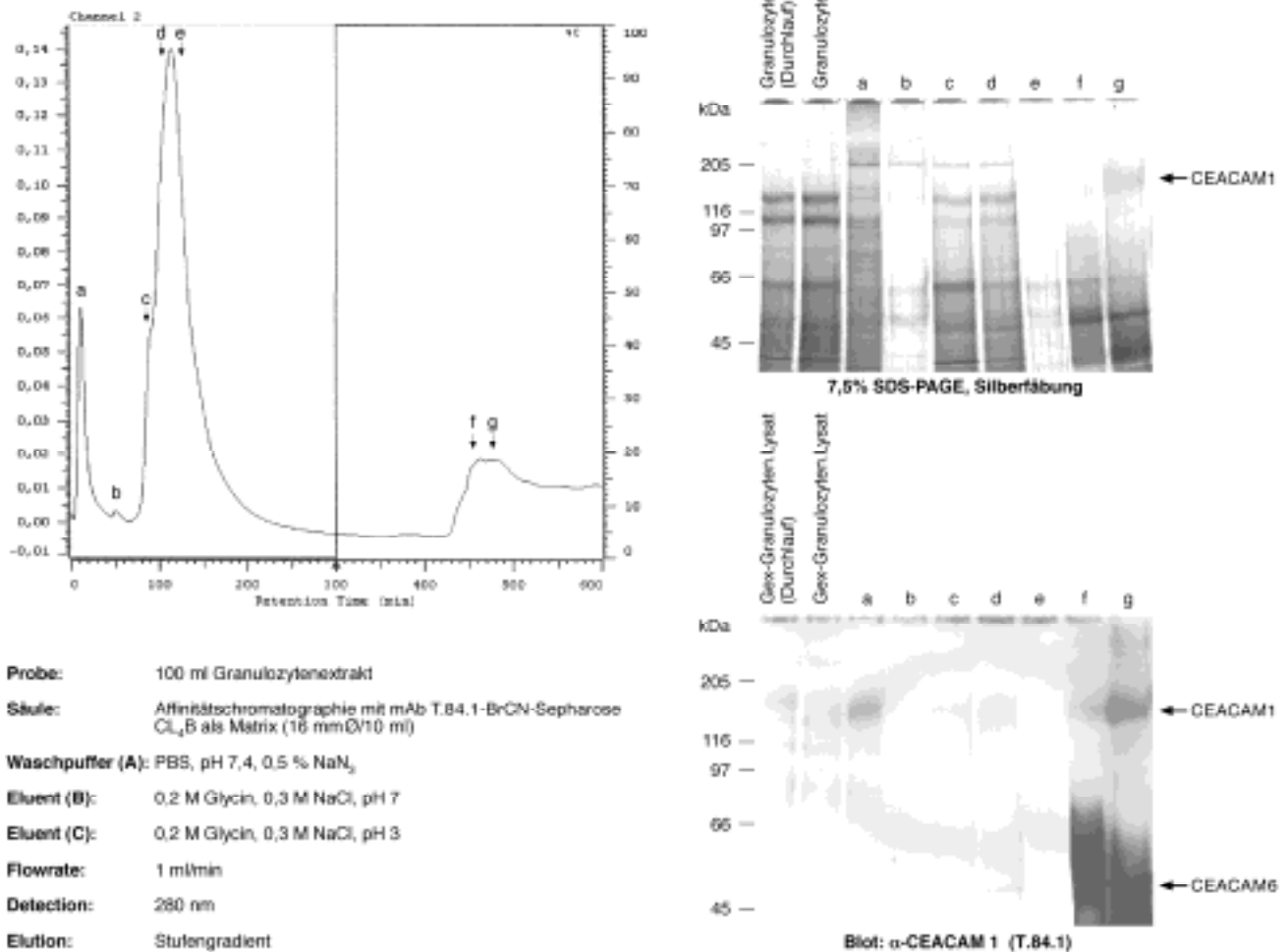
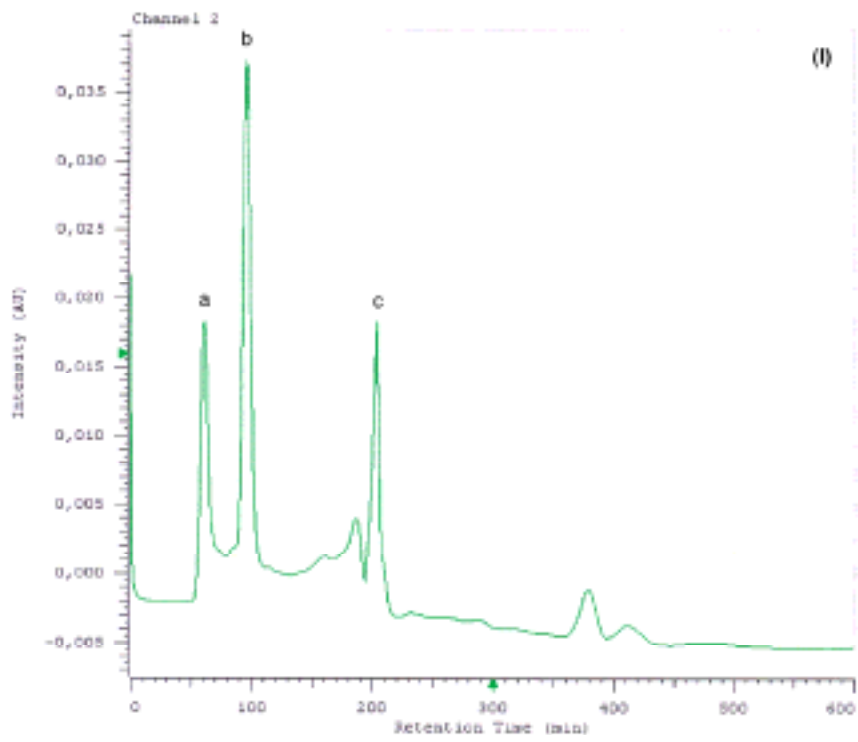


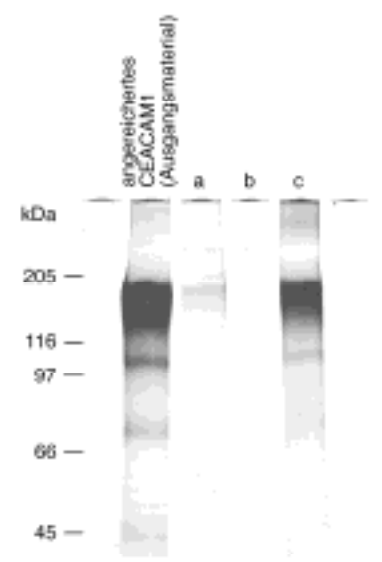
Abbildung 15: Aufreinigung von aus Granulozyten präpariertem CEACAM1 über eine analytische T.84.1 Säule: links das Chromatogramm, die einzelnen Fraktionen wurden mit a-g gekennzeichnet, rechts oben die 7,5% SDS-PAGE, mit den entsprechenden Fraktionen, rechts unten der korrespondierende Blot, detektierender Antikörper war T.84.1. Es wurden jeweils ca. 2 µg Elutionsfraktionen aufgetragen.

Abbildung 15 zeigt die affinitätschromatographische Aufreinigung von CEACAM1 aus Granulozytenextrakten. Die erhaltenen Fraktionen, die mit a-g gekennzeichnet wurden, wurden einer 7,5% SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse unterworfen. Die SDS-PAGE rechts oben sowie der korrespondierende Blot zeigen, daß hauptsächlich CEACAM1 sowie CEACAM6 bei pH 3 eluiert wird. Der Antikörper T.84.1 erkennt außer CEACAM1 auch CEACAM3 sowie CEACAM6.

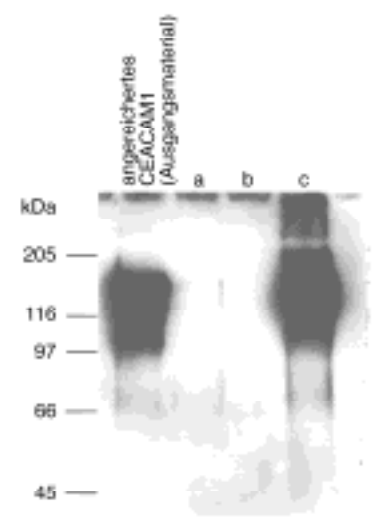
Für die weitere Reinigung von CEACAM1 wurde eine Gel Size-Chromatographie (GSC) als zweiter Schritt eingesetzt.



**Probe:** 2 ml angereichertes CEACAM1 über Affinitätschromatographie T84.1  
**Säule:** Fractogel EMD Bio SEC (S). Merk (16 mm Ø / 170 ml)  
**Eluent (A):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,01M NaN<sub>3</sub>, pH 7,2  
**Eluent (B):** 100 mM Harnstoff, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM Tris, pH 7,2  
**Flowrate:** 0,5 ml/min  
**Detection:** 280 nm  
**Elution:** Stufengradient



(II) 7,5% SDS-PAGE, Silberfärbung



(III) Blot: α-CEACAM (T84.1)

Abbildung 16: Aufreinigung von angereichertem CEACAM1 über Gel Size-Chromatographie „GSC“ (I); Silberfärbung der erhaltenen Elutionsfraktionen (II); sowie deren immunchemischen Färbung mittels T.84.1 (III).

Abbildung 16 zeigt die Gel Size-Chromatographie der angereicherten CEACAM1 aus Granulozytenextrakten. Die erhaltenen Fraktionen, die mit a-c gekennzeichnet wurden, wurden einer 7,5% SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse unterworfen. Die SDS-PAGE rechts oben sowie der korrespondierende Blot rechts unten zeigen, daß mittels Gel Size-Chromatographie die erwünschte Reinheit von ca. 90% erreicht wurde.

### 5.1.3 Charakterisierung der rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1

Als Ausgangspunkt für die Aufreinigungsversuche lag die cDNA der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 und deren Mutanten im einem pQE-Vektor (pQE31) kloniert in dem kompetenten SG 13009 Bakterien vor. Durch die DNA-Sequenzierung wurden die Sequenz der Klone verifiziert.

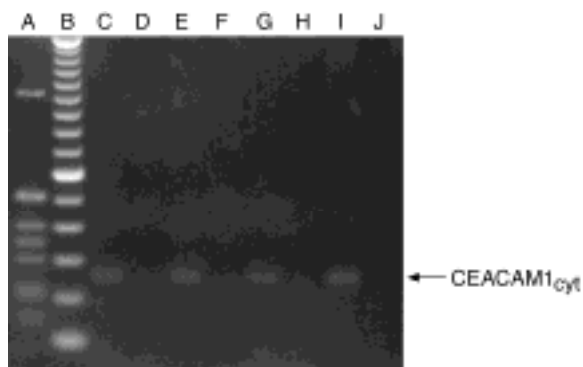


Abbildung 17: DNA-Gelelektrophorese der CEACAM1<sub>cyt</sub> Klone und Mutanten nach einem Bam HI / Hind III - Restriktionsverdau. 1% TAE-Agarosegel. Es wurde jeweils der komplette Ansatz (10 µl) aufgetragen.

A: 1 Kbp-Leiter

B: 100 bp-Leiter

C: BamHI / HindIII-Verdau der Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>

D: Y488FCEACAM1<sub>cyt</sub>

E: BamHI / HindIII-Verdau der Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>

F: Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>

G: BamHI / HindIII-Verdau der Y515F,Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>

H: Y515F,Y488FCEACAM1<sub>cyt</sub>

I: BamHI / HindIII-Verdau der CEACAM1<sub>cyt</sub>

J: CEACAM1<sub>cyt</sub>

Abbildung 17 zeigt die erwartete Bande des Bam HI / Hind III-Restriktionsverdaues der eingesetzten Klone. Die exakte Fragmentslänge des Inserts betrug 250 bp.



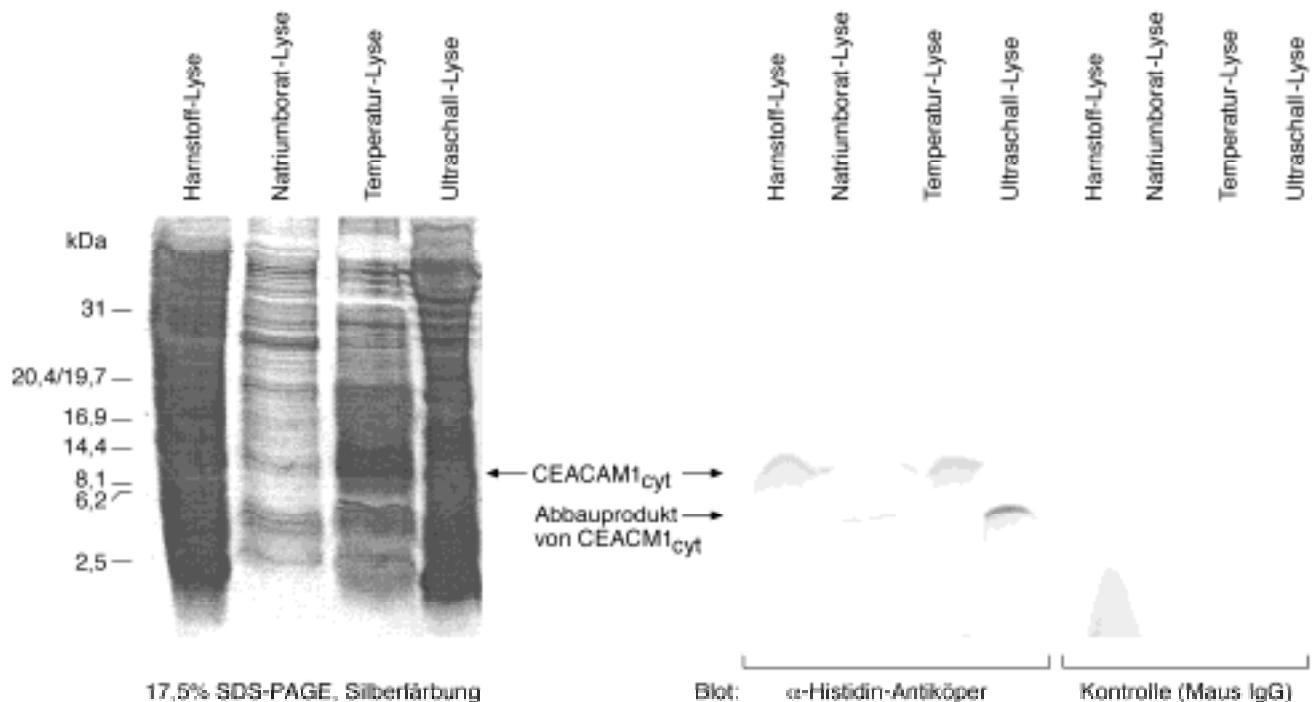


Abbildung 19: Vergleich der verschiedenen Lysemethoden

17,5% SDS-PAGE der verschiedenen lysierten rekombinanten CEACAM1<sub>cyt</sub> mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunfärbung mit mAb α-Histidin mAb 1 µg/1000 µl PBS, Ziege anti Maus POD 1:5000

Spur 1: 10 µg Bakterin-Lysate (Denaturierte Lyse mit Urea, RT, 1 Std)

Spur 2: 10 µg Bakterin-Lysate (Lyse mit Natriumborat, 4°C, ÜN)

Spur 3: 10 µg Bakterin-Lysate (Lyse mit Na-Phosphat, 100°C, 10 min)

Spur 4: 10 µg Bakterin-Lysate (Lyse mit Na-Phosphat, Ultraschall, 5 min)

Abbildung 19 zeigt, daß die Effizienz der Temperaturlyse (Spur 3) verglichen mit anderen Lysemethoden am besten ist. Es schien dabei zum einen die absolute Konzentration der zytoplasmatischen Domäne am höchsten, zum anderen aber auch die Menge der „verunreinigenden“ Proteine geringer zu sein.

## 5.2.2 Aufreinigung

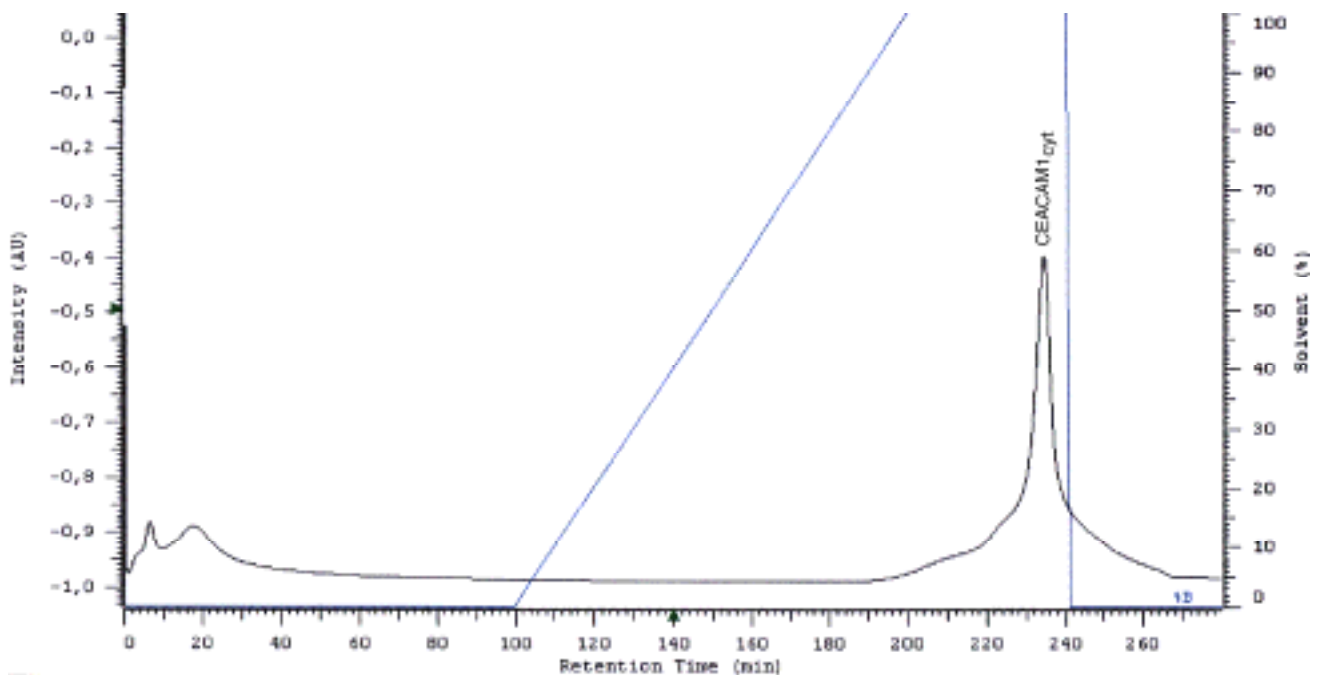
Die Aufreinigung erfolgte über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Unter den kommerziell erhältlichen Metall-Chelat-Affinitätsmatrices erwies sich die Ni-NTA (Qiagen) für die Aufreinigung rekombinanten CEACAM1<sub>cyt</sub> als beste. Unter den Elutionsmöglichkeiten wurde ebenfalls experimentell die pH-Elution als die effizienteste festgestellt. Die Abbildungen 20, 21, 22, und 23 zeigen typische HPLC-Chromatogramme der Läufe. Es wurden Gradienten der folgenden Laufmittel angewendet:

Zeit (min)	% Waschpuffer	% Elutionspuffer	Flußrate (ml/min)
0,01	100	0	0,5
100	100	0	0,5
190	0	100	0,5
240	0	100	0,5
241	100	0	0,5
260	100	0	0,5

Tabelle 17: Das HPLC-Protokoll für die Reinigung von rekombinant exprimiertem CEACAM1<sub>cyt</sub> mit dem Waschpuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 6) und Elutionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 3). Die erhaltenen Elutionsfraktionen, gekennzeichnet im Chromatogramm mit CEACAM1<sub>cyt</sub>, wurden anschließend per 17,5% SDS-PAGE und Silberfärbung untersucht.

Im folgenden werden die HPLC- Chromatogramme für die Aufreinigung von CEACAM1<sub>cyt</sub>, Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub> und Y488F Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>, mit anschließender SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen gezeigt.

#### 5.2.2.1 Aufreinigung von CEACAM1<sub>cyt</sub>, Elution mittels pH-Gradient

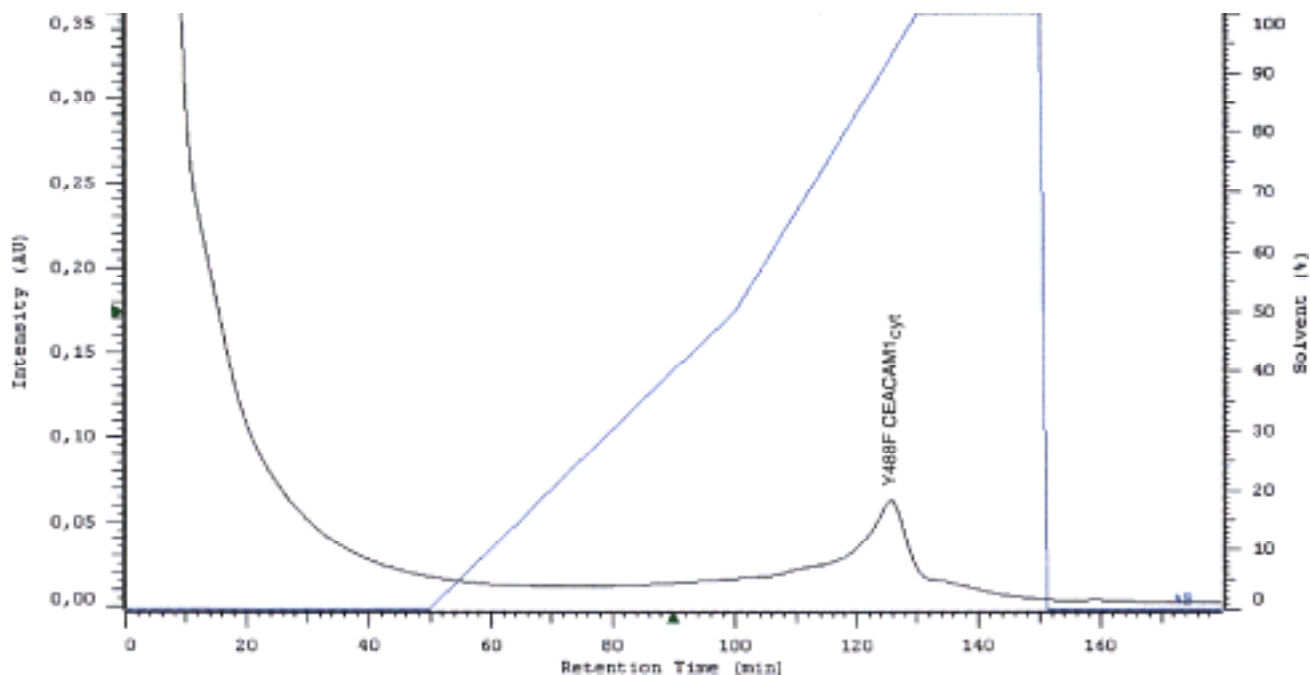


**Probe:** 50 ml natives Lysat von CEACAM1<sub>cyt</sub>  
**Säule:** Ni - NTA (Qiagen), 16 mm Ø / 10 ml  
**Waschpuffer (A):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 6  
**Eluent (B):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 3  
**Detektion:** 280 nm  
**Elution:** Linearer Gradient

Abbildung 20: Aufreinigung von rekombinant exprimierter zytoplasmatischer Domäne von CEACAM1

Im Chromatogramm (Abbildung 20) zeigte sich ein homogener Peak bei der Retentionszeit von 230 min, der in der SDS-PAGE eine starke Bande mit apparentem Molekulargewicht von 13 kDa liefert (Abbildung 24).

### 5.2.2.3 Aufreinigung von Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Elution mittels pH-Gradient



**Probe:** 50 ml natives Lysat von Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>

**Säule:** Ni - NTA (Qiagen), 16 mmØ / 10 ml

**Waschpuffer (A):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 6

**Eluent (B):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 3

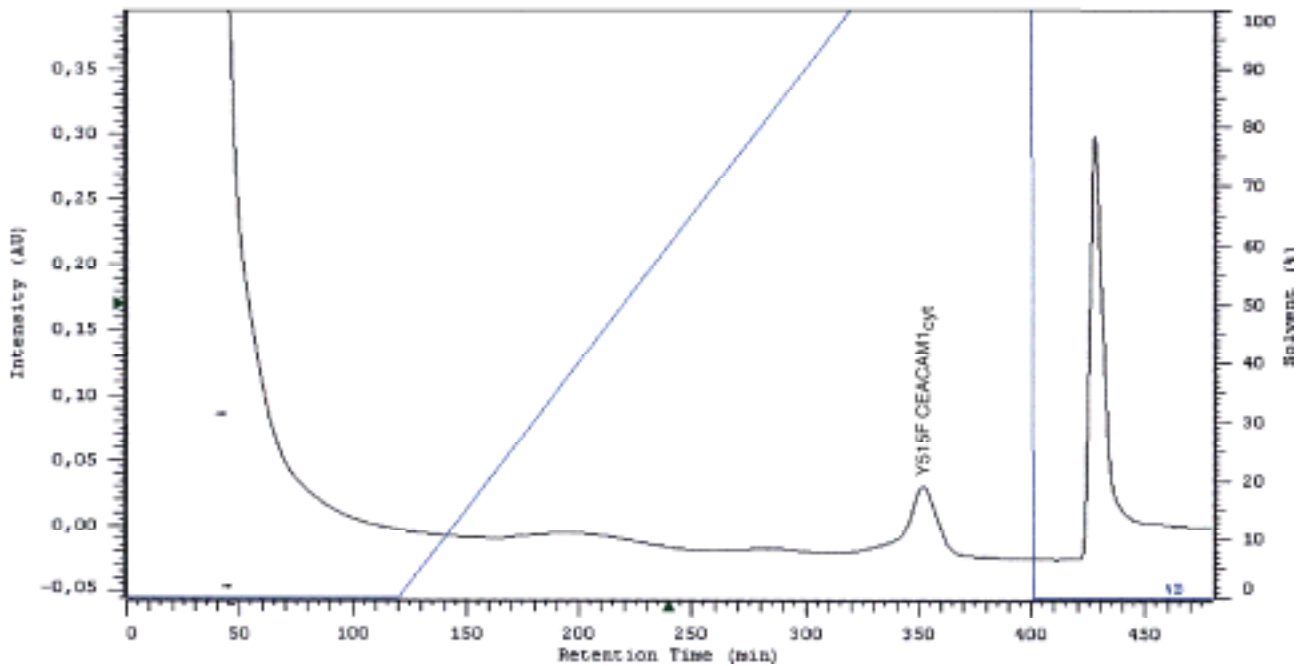
**Detektion:** 280 nm

**Elution:** Linearer Gradient

Abbildung 21: Aufreinigung von rekombinant exprimierter und mutierter zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 (Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>).

Bei der Aufreinigung von Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub> wurde trotz der annähernd gleichen Menge an eingesetzten Gesamtprotein relativ zu CEACAM1<sub>cyt</sub>-Aufreinigung eine geringere Ausbeute erzielt, die Reinheit war hingegen bei ca. 95% (Abschätzung auf SDS-PAGE).

#### 5.2.2.4 Aufreinigung von Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Elution mittels pH-Gradient



**Probe:** 50 ml natives Lysat von Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>

**Säule:** Ni - NTA (Qiagen), 16 mmØ / 10 ml

**Waschpuffer (A):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 6

**Eluent (B):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 3

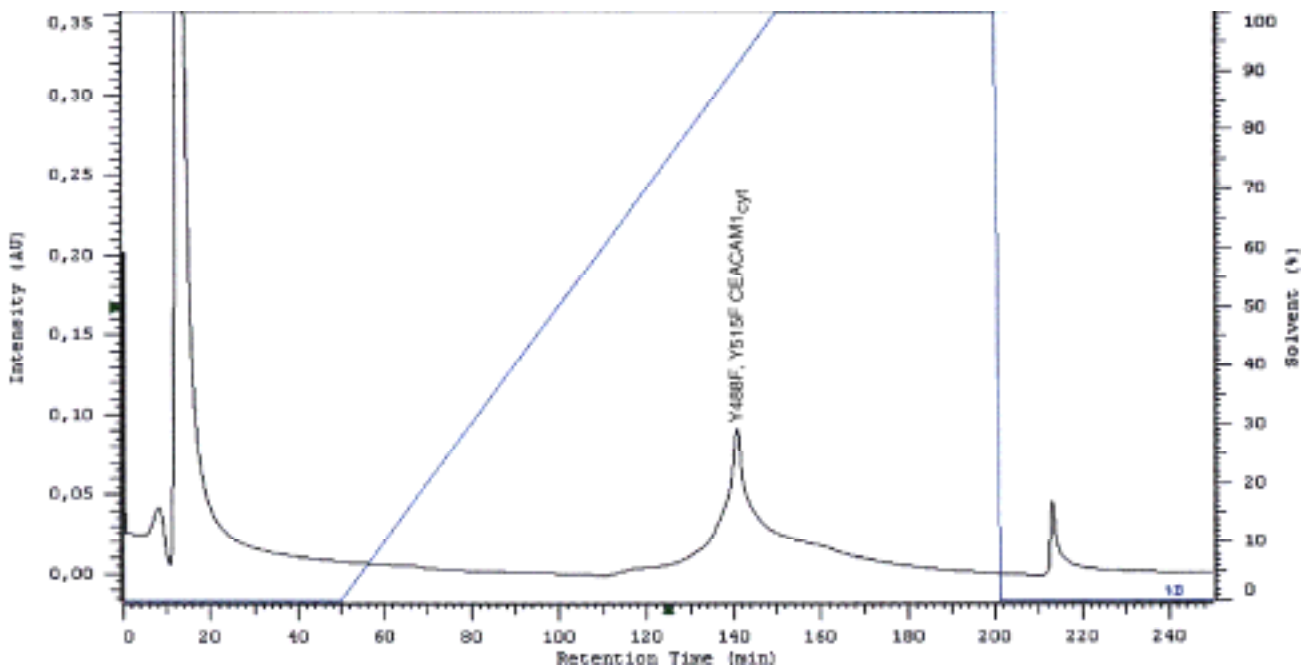
**Detektion:** 280 nm

**Elution:** Linearer Gradient

Abbildung 22: Aufreinigung von rekombinant exprimierter und mutierter zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 (Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>)

Bei der Aufreinigung von Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub> wurde eine ähnlich geringe Ausbeute wie bei Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>-Aufreinigung erzielt. Die SDS-PAGE des erhaltenen Elutionspeaks lieferte eine einzelne Bande in der Höhe der zytoplasmatischen Domäne.

#### 5.2.2.4 Aufreinigung von Y488F, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>, Elution mittels pH-Gradient



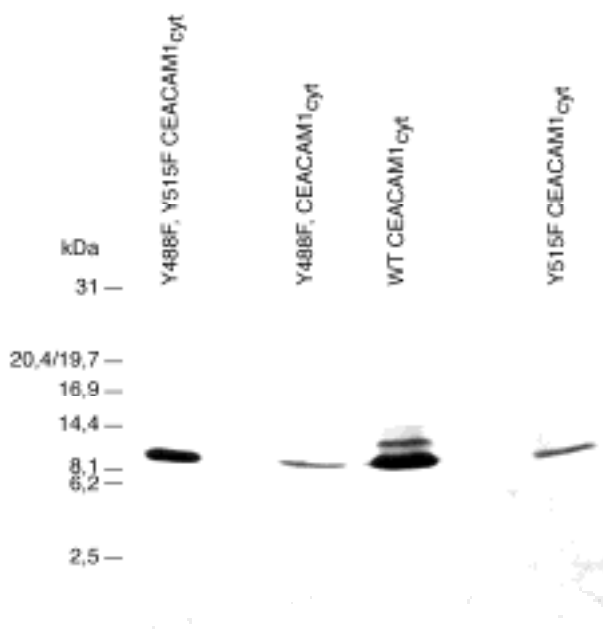
- Probe:** 50 ml natives Lysat von rekombinant exprimierter und doppelmutierter Y488F, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>
- Säule:** Ni - NTA (Qiagen), 16 mmØ / 10 ml
- Waschpuffer (A):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 6
- Eluent (B):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 3
- Detektion:** 280 nm
- Elution:** Linearer Gradient

Abbildung 23: Aufreinigung von rekombinant exprimierter und doppelmutierter zytoplasmatischer Domäne von CEACAM1 (Y488F, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>)

Bei der Aufreinigung von doppelmutierter zytoplasmatischer Domäne von CEACAM1 wurde die annähernd gleiche Ausbeute wie bei der Aufreinigung von CEACAM1<sub>cyt</sub> erzielt. Es fand sich in der SDS-PAGE eine einzelne Bande in Höhe von ca. 13 kDa.

#### 5.2.3 SDS PAGE und Silberfärbung der aufgereinigten CEACAM1<sub>cyt</sub> und den entsprechenden Mutanten

Abbildung 24 zeigt die Silberfärbung von erhaltenen Elutionsfraktionen der Aufreinigungs-chromatogramme (Abbildungen 20, 21, 22 und 23). Pro Spur wurden jeweils 0,5-1 µg der aufkonzentrierten Proteine aufgetragen.



Spur a: 1 µg Y488F, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>

Spur b: 0,5µg Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub>

Spur c: 2µg WT CEACAM1<sub>cyt</sub>

Spur d: 0,5µg Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>

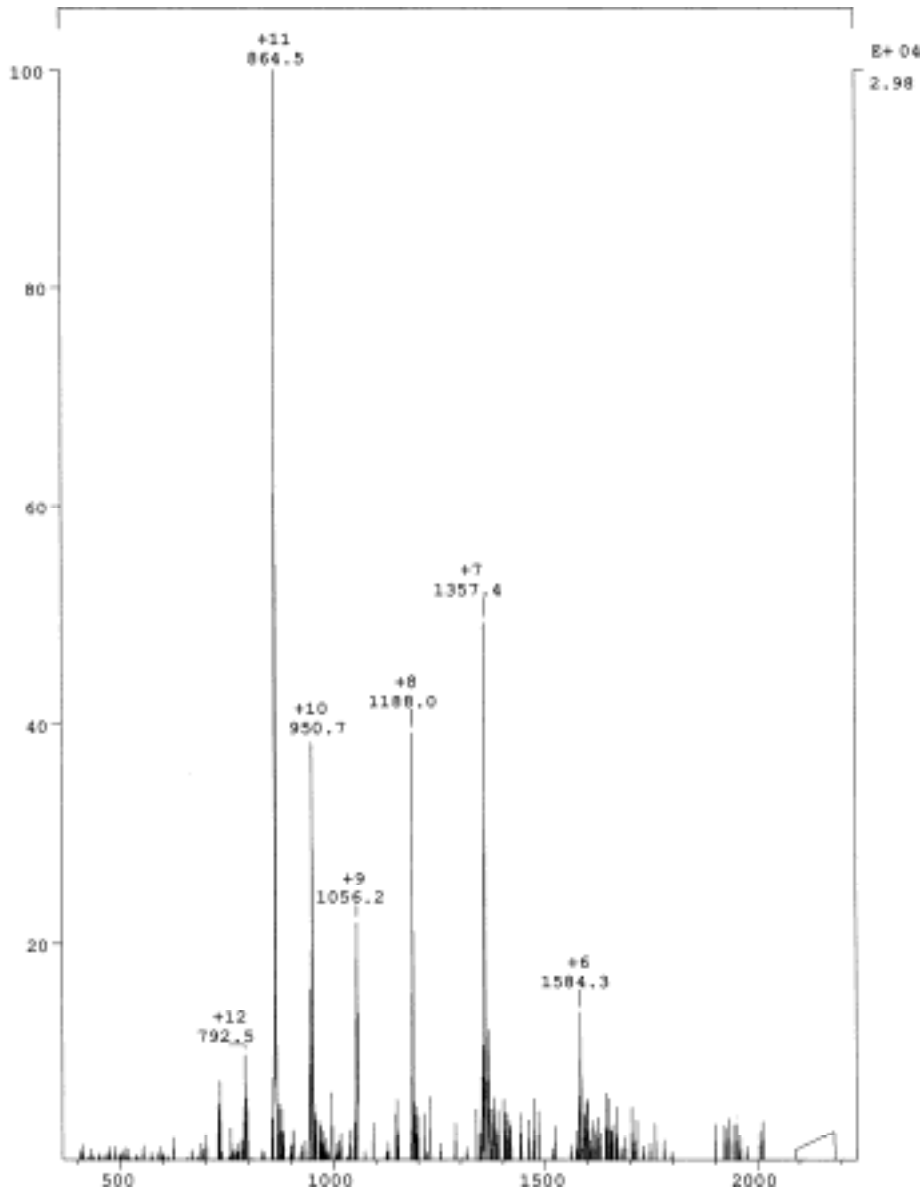
Je 0,5-2 µg der erhaltenen gekennzeichneten Elutionsfraktionen aus den Chromatogrammen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

Abbildung 24: 17,5%-SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung.

Das apparente Molekulargewicht der CEACAM1<sub>cyt</sub> betrug ca. 13000 Da. Das sind etwa 3600 Da. mehr, als das theoretisch berechnete Molekulargewicht. Das ist wahrscheinlich bedingt durch das Vorhandensein von Tyrosin- sowie Histidinreste, die das Laufverhalten bei der SDS-PAGE beeinflussen. Bei der Aufreinigung der rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domänen von CEACAM1 konnte mittels Metal-Chelat-Affinitätschromatographie eine Reinheit von über 90% erzielt werden. Die N-Terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) der aufgereinigten CEACAM1<sub>cyt</sub>-Domäne stimmte mit der Proteinsequenz der CEACAM1<sub>cyt</sub> überein.

Das exakte Molekulargewicht des rekombinant hergestellten CEACAM1<sub>cyt</sub> wurde mittels Elektronen-Spray Massenspektrometrie ermittelt.

**Probe:** CEACAM1<sub>cyt</sub>                      **Norm:** 864.5  
**Base:** 864.5                                **RIC:** 311200  
**Inten:** 29810                               **Mode:** ESI + VE + HMR BSCAN (EXP) UP PRO  
**Com1:** 0.9                                    **Peak:** 1000.00 mmU  
**Biomass:** 9497.2



MH<sup>+</sup> Monoisotopic Mass = 9861.7518 amU

Isoelectric Point (pI) = 5,5

**MH<sup>+</sup> Average Mass** = 9867.8046 amU

Elemental Composition = C<sub>426</sub>H<sub>653</sub>N<sub>130</sub>O<sub>138</sub>S<sub>3</sub>

Abbildung 25: ESI - Spektrum von ca. 10 µg Proteolysegemisch der über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Ni-NTA) aufgereinigten rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 (CEACAM1<sub>cyt</sub>). Das Spektrum wurde in 1% TFA / Glycerin (1:1) aufgenommen.

Abbildung 25 zeigt das ESI-Spektrum von ca.10 µg Proteolysegemisch nach Endoprotease Glu-C Abbau. Es wurden ca 10 µg CEACAM1<sub>cyt</sub> mit 1 µg Protease Glu-C (1 µg / µl) in 25 mM Ammoniumcarbonat-Puffer bei 25°C umgesetzt. Nach 18 stündiger Inkubation wurde die Probe lyophilisiert und in 1% TFA / Glycerin aufgenommen.

### 5.3 Funktionsuntersuchungen mit CEACAM1<sub>cyt</sub>

Um zu zeigen, daß die Tyrosinreste für die Funktion von CEACAM1<sub>cyt</sub> eine Rolle spielen könnten und schliesslich über eine Tyrosinphosphorylierung (P-Tyr) assoziierte Proteine zu finden sind, wurde CEACAM1<sub>cyt</sub> mit Src-Kinase phosphoryliert. Da der Tyrosinphosphorylierungsstatus des nativen CEACAM1 nicht exakt definiert ist, wurden entsprechende Ansätze diesbezüglich nicht durchgeführt.

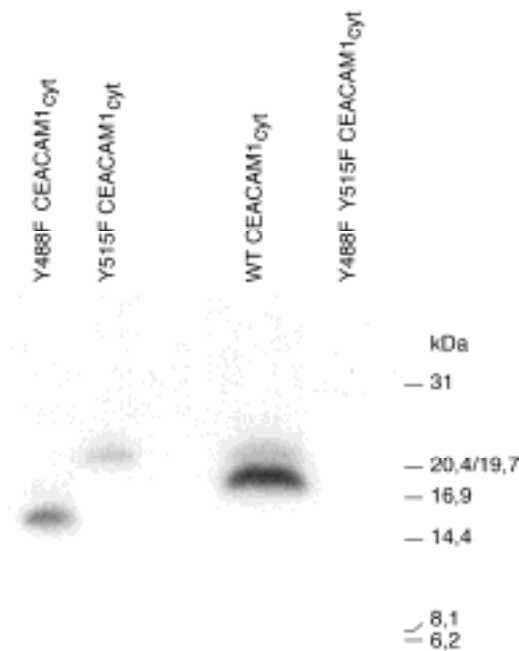


Abbildung 26: SDS-PAGE (17,5%), Autoradiographie des *in-vitro* tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub> und die entsprechenden Mutanten

Abbildung 26 zeigt die zweifach-tyrosinphosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub> und die einfach-tyrosinphosphorylierte Y488F CEACAM1<sub>cyt</sub> und Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub>. Im Falle Y488F Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub> wo die beiden Tyrosinreste gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden, ist eindeutig kein Signal zu erkennen.

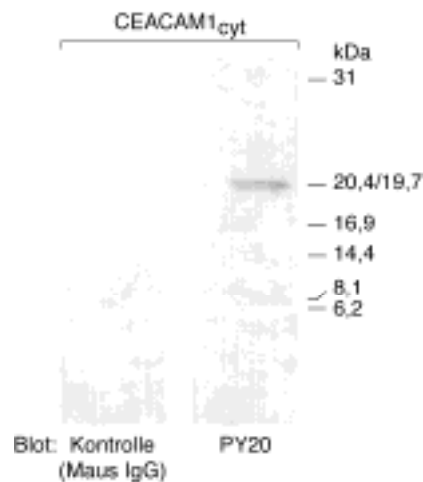


Abbildung 27: 17,5% SDS-PAGE der *in-vitro* tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub> mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunfärbung mit mAb PY20 und Maus IgG als Kontrolle. Detektion:  $\alpha$ -Phosphotyrosin mAb (PY20) und Maus IgG 1:1000, Ziege anti-Maus-POD 1:5000

Abbildung 27 zeigt die Immunreaktivität von kalt-tyrosinphosphoryliertem CEACAM1<sub>cyt</sub>. Das *in-vitro* tyrosinphosphoryliertes CEACAM1<sub>cyt</sub> wurde über eine PTS01 „Phosphotyrosin-Affinitätschromatographie“ aufgereinigt und bei -70°C gelagert.

#### 5.4 Protein-Wechselwirkungsstudien

Auf der Suche nach assoziierten Proteinen wurden die aufgereinigte und die *in-vitro* tyrosinphosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub> an Ni-NTA Matrix immobilisiert und anschließend mit Granulozytenextrakten inkubiert. Die transient assoziierten Proteine mit CEACAM1<sub>cyt</sub> bzw. CEACAM1<sub>cyt-p</sub> wurden über kompetitive Salze mit darauffolgendem pH-Gradienten eluiert. Die chromatographischen Untersuchungen in diesem Zusammenhang zeigten unterschiedliche Chromatogrammprofile an.

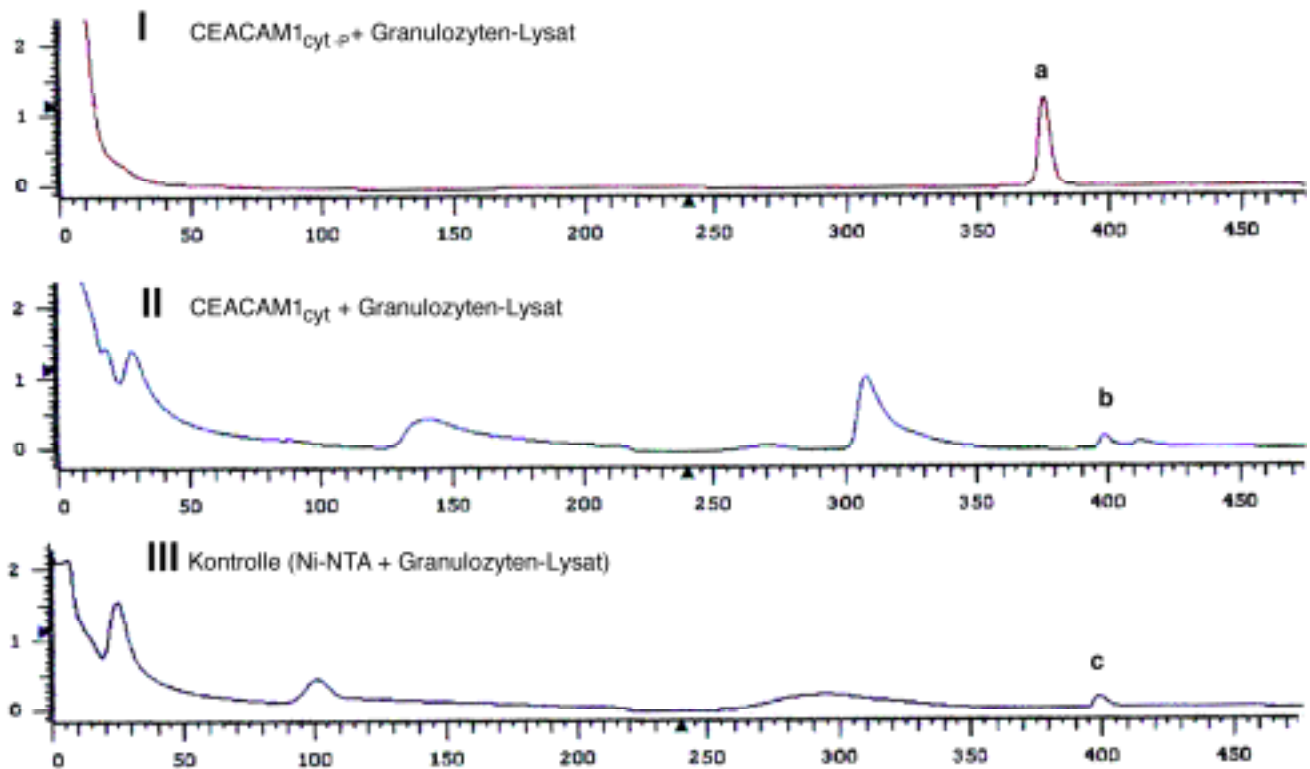
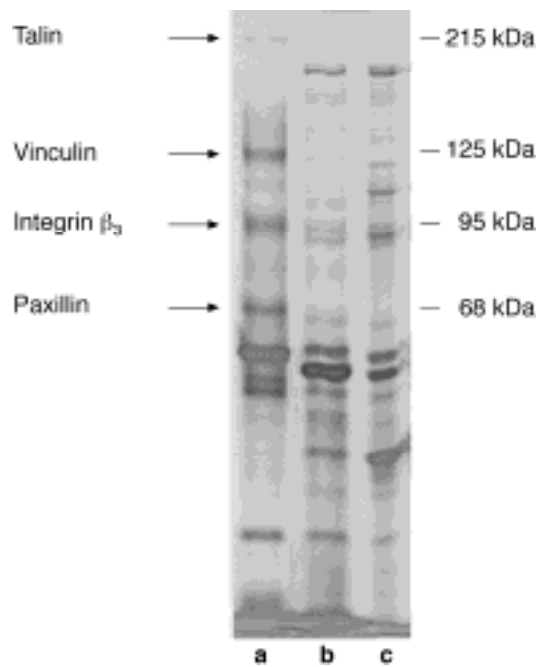


Abbildung 28: Interaktion zwischen *in-vitro* tyrosinphosphoryliertem CEACAM1<sub>cyt</sub> und Granulozytenextrakten (Chromatogram I), CEACAM1<sub>cyt</sub> und Granulozytenextrakten (Chromatogram II), Granulozytenextrakten und Ni-NTA Matrix (Chromatogram III) als Kontrolle

Abbildung 29 zeigt die Aufreinigung der CEACAM1<sub>cyt</sub>-assoziierten Proteine aus Granulozyten. Die Elutionsfraktionen wurden einer SDS-PAGE mit anschließender Silbernitrat-Färbung unterworfen. Für diesen Zweck wurden zunächst die phosphorylierte CEACAM1<sub>cyt-p</sub> bzw. CEACAM1<sub>cyt</sub> an Ni-NTA-Matrix gekoppelt und anschließend mit Granulozytenextrakt in Wechselwirkung gebracht. Die Spur (a) zeigt die assoziierte Proteinen mit CEACAM1<sub>cyt-p</sub>; die Spur (b) zeigt die assoziierte Proteinen mit CEACAM1<sub>cyt</sub>; die Spur (c) zeigt die Interaktion zwischen Ni-NTA-Matrix und Proteinen aus Granulozyten (Kontrolle).



Spur a: Interaktion zwischen CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und Proteinen aus Granulozyten

Spur b: Interaktion zwischen CEACAM1<sub>cyt</sub> und Proteinen aus Granulozyten

Spur c: Interaktion zwischen Ni-NTA-Matrix und Proteinen aus Granulozyten (Kontrolle)

Abbildung 29: SDS-PAGE (7,5%), Silberfärbung der Elutionspeaks von Chromatogrammen I,II,III in der Abb. 28

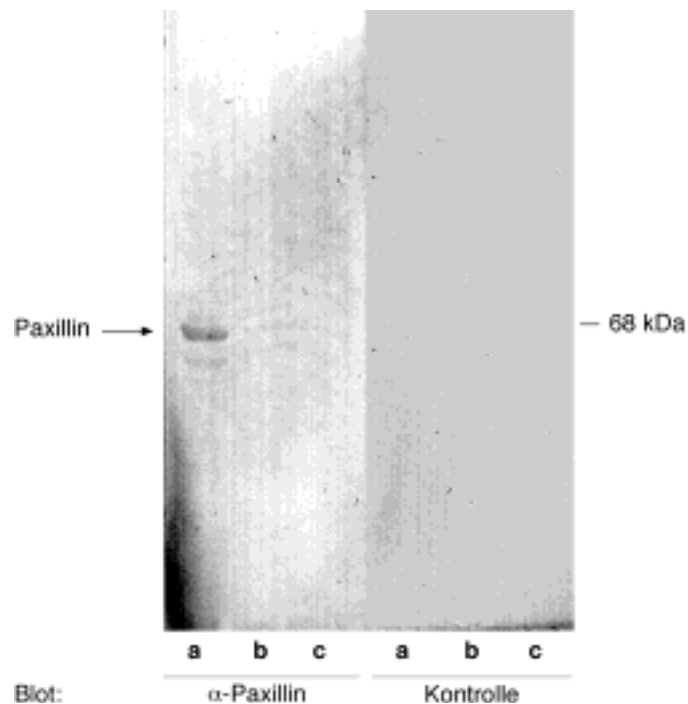
Die SDS-PAGE der Elutionspeaks von CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und Granulozytenextrakten wies auf spezifische Bandenmuster hin. Die Edman-Abbau-Sequenzierung der Bande bei Molekulargewicht 215 kDa stimmte mit Talin und die Bande bei ca.120 kDa mit Vinculin und die Bande bei 95 kDa mit Integrin  $\beta_3$  überein.

N-Terminale Sequenz von Talin:	VALSLKISIGNVVKT
N-Terminale Sequenz von Vinculin:	PVFHTRTIEXILEPV
N-Terminale Sequenz von Integrin $\beta_3$ :	MRARQRPRPIWVSVLAIGAL

Die Sequenzierung der Bande bei ca. 68 kDa war wegen einer N-terminalen Blockierung nicht möglich.

Angesichts der transienten Interaktion zwischen CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und den Zytoskelett-Proteinen wurde mittels einer Reihe kommerzieller Antikörper (wie z.B. PTB1B, PTB1C, SYK, ZAP70, Paxillin) gegen Zytoskelett-Antigene die Identität der 68kDa Bande untersucht.

Abbildung 30 zeigt die assoziierten Proteine nach Wechselwirkung mit CEACAM1<sub>cyt-p</sub> bzw. CEACAM1<sub>cyt</sub>, die einer Immunfärbung mit mAb Paxillin unterworfen wurden. Die Bande bei 68 kDa weist auf das Antigen Paxillin hin, das nur mit CEACAM1<sub>cyt-p</sub> wechselwirkt.

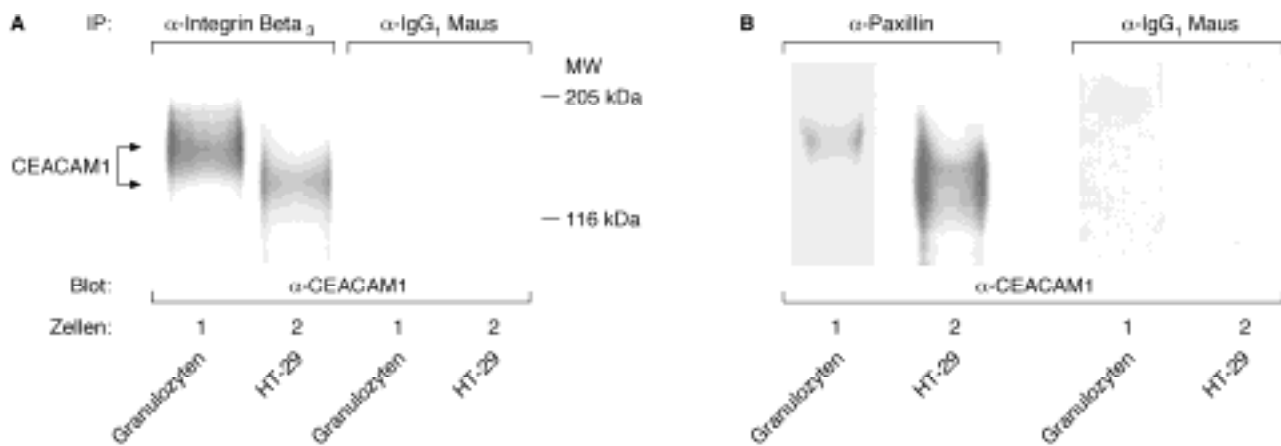


- Spur a: Interaktion zwischen CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und Proteinen aus Granulozyten  
 Spur b: Interaktion zwischen CEACAM1<sub>cyt</sub> und Proteinen aus Granulozyten  
 Spur c: Interaktion zwischen Ni-NTA-Matrix und Proteinen aus Granulozyten (Kontrolle)

Abbildung 30: 7,5% SDS-PAGE der Elutionspeaks der Chromatogramme I,II,III in Abbildung 27 mit anschließendem Transfer des Gels auf NC-Membran und Immunfärbung mit mAb Paxillin. Detektion:  $\alpha$ -Paxillin mAb 1:500, Ziege anti-Maus-POD 1:5000

Um die erhaltenen Daten zu präzisieren bzw. die Kandidaten, die direkt miteinander interagieren, auffindig zu machen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt (siehe 4.5.4.4).

Die Granulozytenextrakte wurden mit den monoklonalen Antikörpern  $\alpha$ -CEACAM1 (12-140-4),  $\alpha$ -Talin,  $\alpha$ -Integrin  $\beta_3$ ,  $\alpha$ -Vinculin,  $\alpha$ -Paxillin, und Protein G/A inkubiert. Die Auftrennung der kopräzipitierten Antigene erfolgte über SDS-PAGE. Hierbei konnte festgestellt werden, daß mittels CEACAM-mAb 12-140-4 die Antigene Paxillin sowie Integrin  $\beta_3$  sich präzipitieren liessen. Zudem wurde CEACAM1 jeweils mit Paxillin und Integrin  $\beta_3$  kopräzipitiert.



Westernblot der CEACAM1-Immunpräzipitate mittels mAb Integrin  $\beta_3$  bzw. mAb Paxillin.

A: Spur 1: Granulozytenextrakte wurde einer Immunpräzipitation mit mAb Integrin  $\beta_3$  bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

Spur 2: HT29-Zell-Lysat wurde einer Immunpräzipitation mit mAb Integrin  $\beta_3$  bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

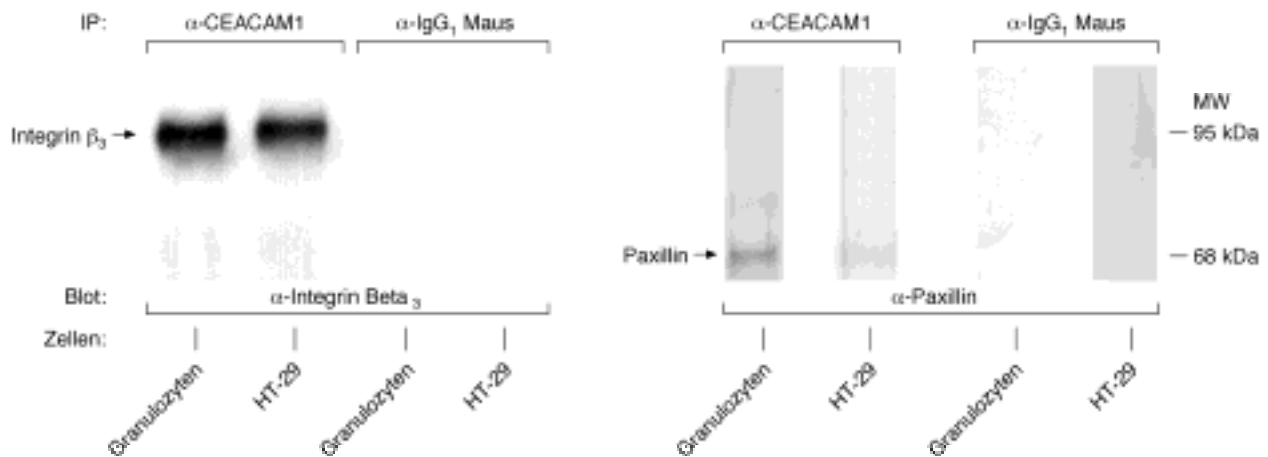
B: Spur 1: Granulozytenextrakte wurde einer Immunpräzipitation mit mAb Paxillin bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

Spur 2: HT29-Zell-Lysat wurde einer Immunpräzipitation mit mAb Paxillin bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

Detektion: mAb CEACAM1 (4D1C2), 1:1000, Ziege anti Maus POD 1:5000

Abbildung 31: Kopräzipitation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  bzw. mit Paxillin aus Granulozyten-Lysat bzw. HT29-Zell-Lysat.

Abbildung 31 zeigt die Interaktion von CEACAM1 mit Paxillin bzw. mit Integrin  $\beta_3$ . Die genannten Zell-Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit mAb Integrin  $\beta_3$  bzw. mit mAb Paxillin und als Kontrolle mit nicht-immunem-IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen. Anschließend wurden die Proteine per SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membran geblottet. Der Blot wurde mit  $\alpha$ -CEACAM1 Antikörper (4D1C2) immungefärbt. Die Banden bei 160 kDa bzw. 120 kDa weisen auf das Antigen CEACAM1 in Granulozyten bzw. HT29-Zellen hin. Das unterschiedliche apparente Molekulargewicht von CEACAM1 ist wahrscheinlich durch die Modifikationsart (Glykosidierung) bedingt.



Westernblot der Integrin  $\beta_3$ - bzw. Paxillin-Immünpräzipitate, mittels  $\alpha$ -CEACAM-Antikörper (12-140-4)

A und B: Spur 1: Granulozytenextrakte wurde einer Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -CEACAM-Antikörper (12-140-4) bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

A und B: Spur 2: HT29-Zell-Lysat wurde einer Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -CEACAM-Antikörper (12-140-4) bzw. mit nicht immunem IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen.

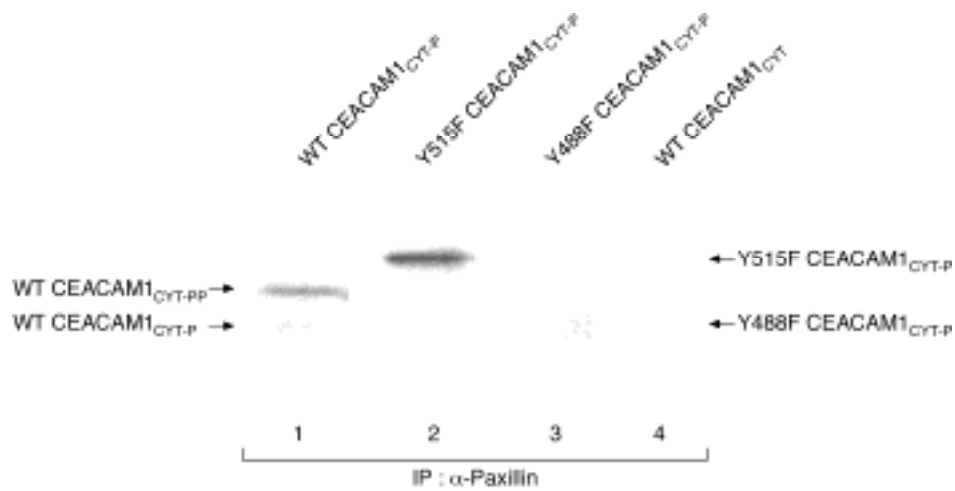
Detektion: A) mAb Integrin  $\beta_3$ , B) mAb Paxillin, 1:1000, Ziege anti Maus POD 1:5000

Abbildung 32: Kopräzipitation von Integrin  $\beta_3$  und Paxillin und mit CEACAM1 aus Granulozyten-Lysat bzw. HT29-Zell-Lysat

Abbildung 32 zeigt die Interaktion von Integrin  $\beta_3$  bzw. Paxillin mit CEACAM1. Die genannten Zell-Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -CEACAM-Antikörper (12-140-4) und als Kontrolle mit nicht-immunem-IgG<sub>1</sub>-Maus unterworfen. Anschließend wurden die Proteine per SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membran geblottet. Der Blot (A) wurde mit mAb Integrin  $\beta_3$  und der Blot B mit mAb Paxillin immungefärbt. Die Bande bei 95 kDa bzw. 68 kDa weisen auf die Antigene Integrin  $\beta_3$  bzw. Paxillin in Granulozyten bzw. HT29-Zellen hin.

#### 5.4.1 Die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin $\beta_3$ bzw. Paxillin erfordert die Phosphorylierung von Tyr-488-Rest der CEACAM1<sub>cyt</sub>

Die lange zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 ist wegen ihrer Funktion als Tumorsuppressor wichtig (Hsieh, J.T. et al., 1995; Luo, W. et al., 1997; Izzi, L. et al., 1999; Kunath, T. et al., 1995). Um die strukturelle Basis für die Interaktion zwischen CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  bzw. Paxillin näher zu untersuchen, wurden die Immunpräzipitationsexperimente unter Anwendung von *in-vitro* tyrosinphosphoryliertem, radioaktiv markiertem CEACAM1<sub>cyt</sub> und deren Mutanten in Wechselwirkung mit den Granulozytenextrakten durchgeführt.



Spur 1: Präzipitation der CEACAM1<sub>cyt-p</sub> bzw CEACAM1<sub>cyt-pp</sub> mit mAb Paxillin.

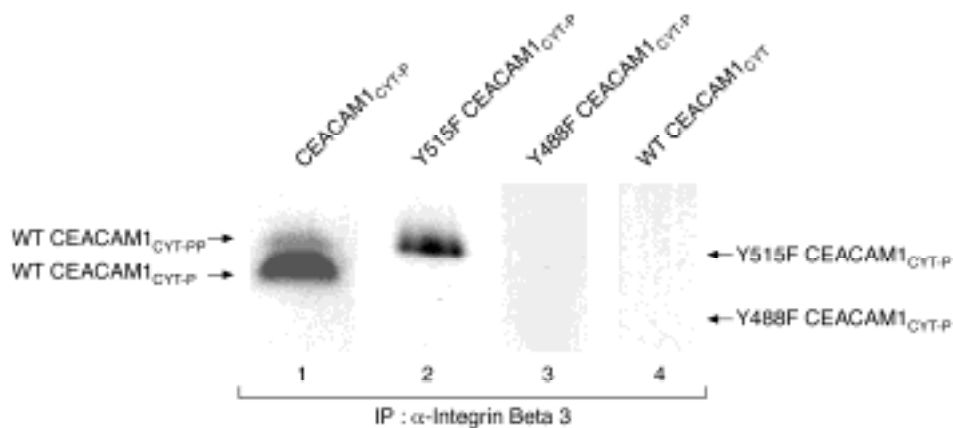
Spur 2: Präzipitation der Y515F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mit mAb Paxillin.

Spur 3: zeigt, daß Y488F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mit mAb Paxillin sehr schwach präzipitiert wird.

Spur 4: zeigt, daß die nicht phosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub> mit mAb Paxillin nicht präzipitiert wird (Kontrolle).

Abbildung 33: Autoradiographie. Kopräzipitation von *in-vitro* phosphoryliertem CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und der Mutante Y488FCEACAM1<sub>cyt-p</sub> sowie Y515F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mittels immobilisiertem mAb Paxillin (17,5% SDS-PAGE der Präzipitate mit anschließender Autoradiographie). Die radioaktiv markierten tyrosinphosphorylierten zytoplas-matischen Domänen von CEACAM1 wurden nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Matrix mit Granulozyten-extrakten für zwei Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend einer Immunpräzipitation mit mAb Paxillin unterworfen.

Somit konnte festgestellt werden, daß das Tyrosin an Position 488 für die Assoziation von CEACAM1 mit Paxillin erforderlich ist. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde eine entsprechende Immunpräzipitation mit mAb Integrin  $\beta_3$  durchgeführt. Es wurde ebenfalls die essentielle Rolle des Tyrosin 488 für die Assoziation von Integrin  $\beta_3$  mit CEACAM1 beobachtet (Abbildung 34) .



Spur 1: Präzipitation der CEACAM1<sub>cyt-p</sub> bzw. CEACAM1<sub>cyt-pp</sub> mit mAb Integrin  $\beta_3$ .

Spur 2: Präzipitation der Y515F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mit mAb Integrin  $\beta_3$ .

Spur 3: zeigt, daß Y488F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mit mAb Integrin  $\beta_3$  nicht präzipitiert wird.

Spur 4: zeigt, daß die nicht phosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub> mit mAb Integrin  $\beta_3$  nicht präzipitiert wird (Kontrolle).

Abbildung 34: Autoradiographie. Kopräzipitation von *in-vitro* Tyrosin phosphoryliertem CEACAM1<sub>cyt-p</sub> und der Mutante Y488F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> sowie Y515F CEACAM1<sub>cyt-p</sub> mittels immobilisiertem mAb Integrin  $\beta_3$ . 17,5% SDS-PAGE der Präzipitate mit anschließender Autoradiographie. Die radioaktiv markierten tyrosinphosphorylierten zytoplasmatischen Domänen von CEACAM1 wurden nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Matrix mit Granulozytenextrakten für zwei Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend einer Immunpräzipitation mit mAb Integrin  $\beta_3$  unterworfen.

## 5.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die Überprüfung der Kolo-kalisation der *in vitro* gefundenen oben genannten Antigene, Integrin  $\beta_3$ , Talin, Vinculin, Paxillin mit CEACAM1 in Zellkulturen der Kolonkarzinom-zelllinie HT29, HUVEC und in Granulozytenpräparaten sollte Klarheit darüber geben (unter semi-*in-vivo* Bedingungen) welche Antigene unmittelbar mit CEACAM1 kolo-kalisiert sind.

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurde angewandt, um dieses Vorhaben zu untersuchen. Die Assoziation wurde mit den Antikörpern gegen die oben genannten Antigene sowie mit den mAb 4D1C2 und T.84.1, die CEACAM1 erkennen, getestet. Um die unspezifische Kreuzreaktion zwischen dem ersten und zweiten Primärantikörper bei der Einfach-bzw. Doppelimmunfärbung zu verhindern, wurde der Primärantikörper mit einem Ziege anti Maus F(ab)-Fragment blockiert.

Grundsätzlich wurden bei der Doppelmarkierung sowie der Einzelmarkierung die Primärantikörper 4D1C2 und T.84.1 mit TRITC (Rot) detektiert. Alle anderen Antikörper, d.h. die Integrine, Paxillin, Talin und Vinculin wurden mit einem FITC (Grün) markierten Antikörper detektiert.

### 5.5.1 Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 und Paxillin auf Granulozyten und HT29-Zellen

Mittels CLSM wurde zunächst die zelluläre Verteilung und die relative Intensität der Fluoreszenz auf HT29 Zellen qualitativ untersucht. Die Immunfluoreszenz von TRITC-markiertem mAb 4D1C2, wurde für die Lokalisation von CEACAM1 verwendet (Abbildung 35-A) und von FITC-markiertem mAb Paxillin (Abbildung 35-B) zeigen ein starkes membran-assoziiertes granuläres Muster für CEACAM1 (Abbildung 35-A) mit einer diffusen Paxillinfärbung (Abbildung 35-B). Unter Anwendung der Doppel-Fluoreszenz Markierung mit TRITC (für die Detektion von mAb CEACAM1, Rot) und FITC für die Detektion von mAb Paxillin (Grün) konnte die Kolokalisation von CEACAM1 mit Paxillin (Abbildung 35-C) als gelbe Fluoreszenz gesehen werden. Bei den Granulozyten zeigen manche Zellen eine polare Verteilung von CEACAM1 (Abbildung 35-D). Die Doppel-Fluoreszenz Markierung zeigt die Assoziation von CEACAM1 mit Paxillin (Abbildung 35-F). Das Muster der Paxillin-Färbung bei Granulozyten scheint weder membran-assoziiert noch polar zu sein (Abbildung 35-E).

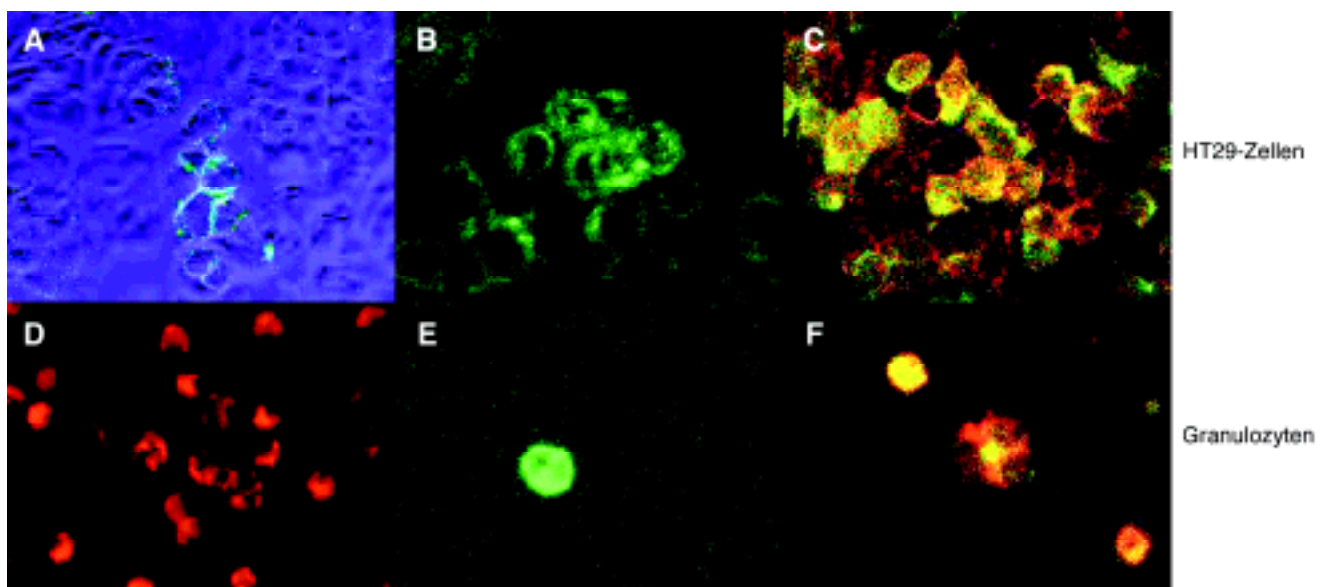
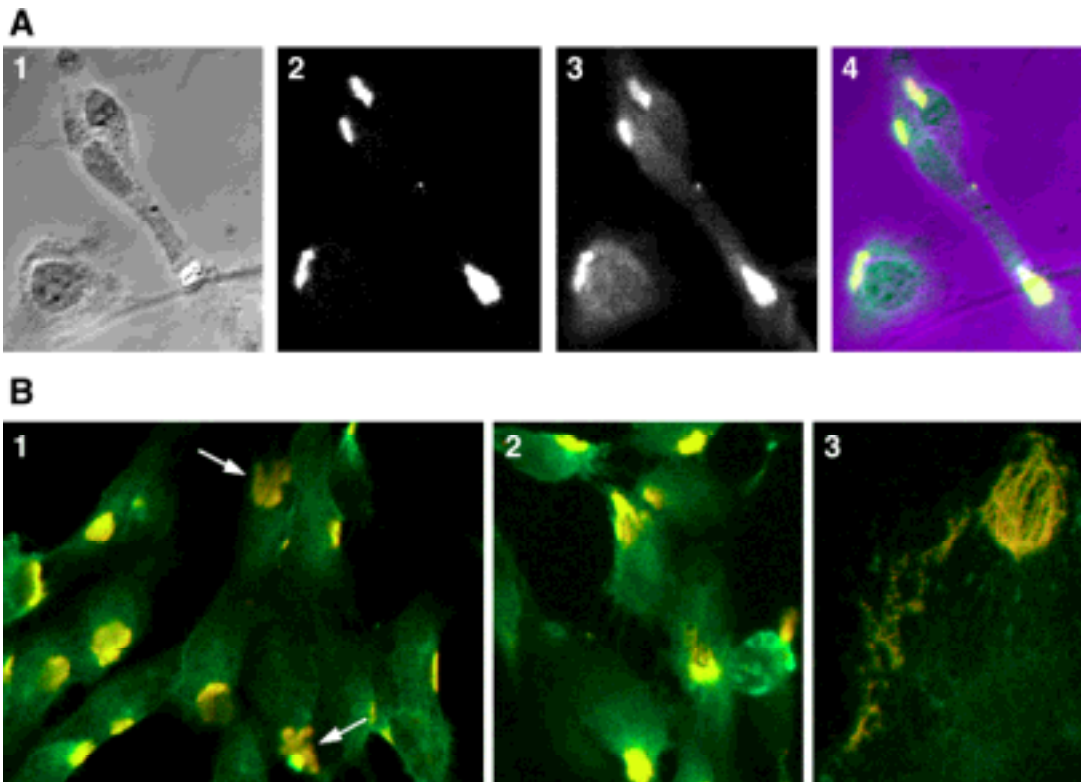


Abbildung 35: Immunfluoreszenz des TRITC markierten 4D1C2 zum Lokalisieren von CEACAM1 (A in Kombination mit phasenkontrast Blau) und FITC markierte mAb Paxillin (B) bei HT29-Zellen. Die Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde mit TRITC (für Detektion der mAb CEACAM1, Rot) und FITC (für Detektion der mAb Paxillin, Grün) gezeigt (C). Bei den Granulozyten wurde die Immunreaktivität (4D1C2, D, mAb Paxillin, E) und Doppel-Fluoreszenz-Färbung (F) gezeigt.

Bei kultivierten HUVEC-Zellen, die eine runde oder gestreckte Morphologie aufweisen (Abbildung 36-A1) wurde eine hoch polare Expression von den beiden Molekülen CEACAM1 (Abbildung 36-A2) und Paxillin (Abbildung 36-A3) sowie eine starke Kolokalisation (Abbildung 36-A4) beobachtet. Diese polarisierte Koexpression und Kolokalisation ist bei den runden sowie gestreckten Zellen zu sehen (Abbildung 36-A4).

Wenn die HUVEC-Zellen konfluent gewachsen sind, ist die Paxillin-Verteilung einheitlicher als CEACAM1 (Abbildung 36-B1). Die genaue polare Kolokalisation von CEACAM1 mit Paxillin auf der Plasma-Membran ist in Abbildung 36-B1 zu sehen. Offenbar sind diese Kolokalisationsareale nicht auf der Seite der Zell-Zell-Kontakte konzentriert, während bei nicht konfluenten Zellen die Kolokalisation von CEACAM1 mit Paxillin auf der Seite der berührenden Areale ist. Dieses sogenannte „Touching“ der Zelle lässt sich in Abbildung 36-B2 erkennen. CEACAM1 ist interessanterweise bei manchen konfluenten Zellen nicht mit Paxillin kolokalisiert Abbildung 36-B1 (mit dem Pfeil gezeichnet). Hier scheint sich CEACAM1 an der Spitze der sich hervorstreckenden Pseudopodia in einer speziellen subzellulären reticulären Struktur zu organisieren (Abbildung 36-B3).



Doppel-Fluoreszenz-Markierung der HUVEC-Zellen (Abbildung 36, A1-A4) mit TRITC( für die Detektion von mAb CEACAM1, Rot) und mit FITC (für die Detektion von mAb Paxillin,Grün)

A1: transluzenter Kanal

A2: Immunfluoreszenz von CEACAM1-Färbung (roter Kanal, b/w Modus)

A3: Immunfluoreszenz von Paxillin-Färbung (grüner Kanal, b/w Modus)

A4: Doppel-Fluoreszenz-Färbung (RGB-Overlay) zeigt eine klare Kolo-kalisation von beiden Signalen.

B):(1 und 2) Doppel-Fluoreszenz-Markierung (RGB-Overlay) mit TRITC (für die Detektion von mAb CEACAM1, Rot) und mit FITC (für die Detektion von mAb Paxillin,Grün) der konfluenten HUVEC-Zellen. Die Pfeile zeigen Arealen wo vorwiegend CEACAM1 exprimiert ist (Rot).(3) Detail (Zoom=3) der Doppel-Fluoreszenz markierten konfluenten HUVEC-Zellen (RGB-Overlay) mit vorwiegender CEACAM1-Expression

Abbildung 36: Koexpression und Kolo-kalisation von CEACAM1 mit Paxillin auf HUVEC-Zellen

### 5.5.2 Koexpression und Kolo-kalisation von CEACAM1 und Integrin $\beta_3$ auf Granulozyten und HT29-Zellen

Um die *in-vivo* Assoziation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  zu untersuchen, wurden Granulozyten sowie die Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die zelluläre Verteilung und die relative Fluoreszenz-intensität der Zellen wurden somit festgestellt. Die Immunfluoreszenz von TRITC markiertem mAb 4D1C2 (Abbildung 37 A-Rot) und von FITC markiertem mAb Integrin  $\beta_3$  (Abbildung 37 B-Grün) zeigen ein starkes Membran assoziiertes granuläres Muster der CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  Moleküle. Mit einer Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde die Kolo-kalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  als gelbe Fluoreszenz angezeigt (Abbildung 37-C).

Die Kolonkarzinom Zelllinie HT29 wurde dementsprechend untersucht. Die Immunreaktivität von mAb CEACAM1 (4D1C2) (Abbildung 37 D-Rot) und mAb Integrin  $\beta_3$  (Abbildung 37 E-Grün) wurden lokalisiert. Die korrespondierende Doppel-Fluoreszenz-Markierung zeigt die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  in HT29 Zellen (Abbildung 37 F).

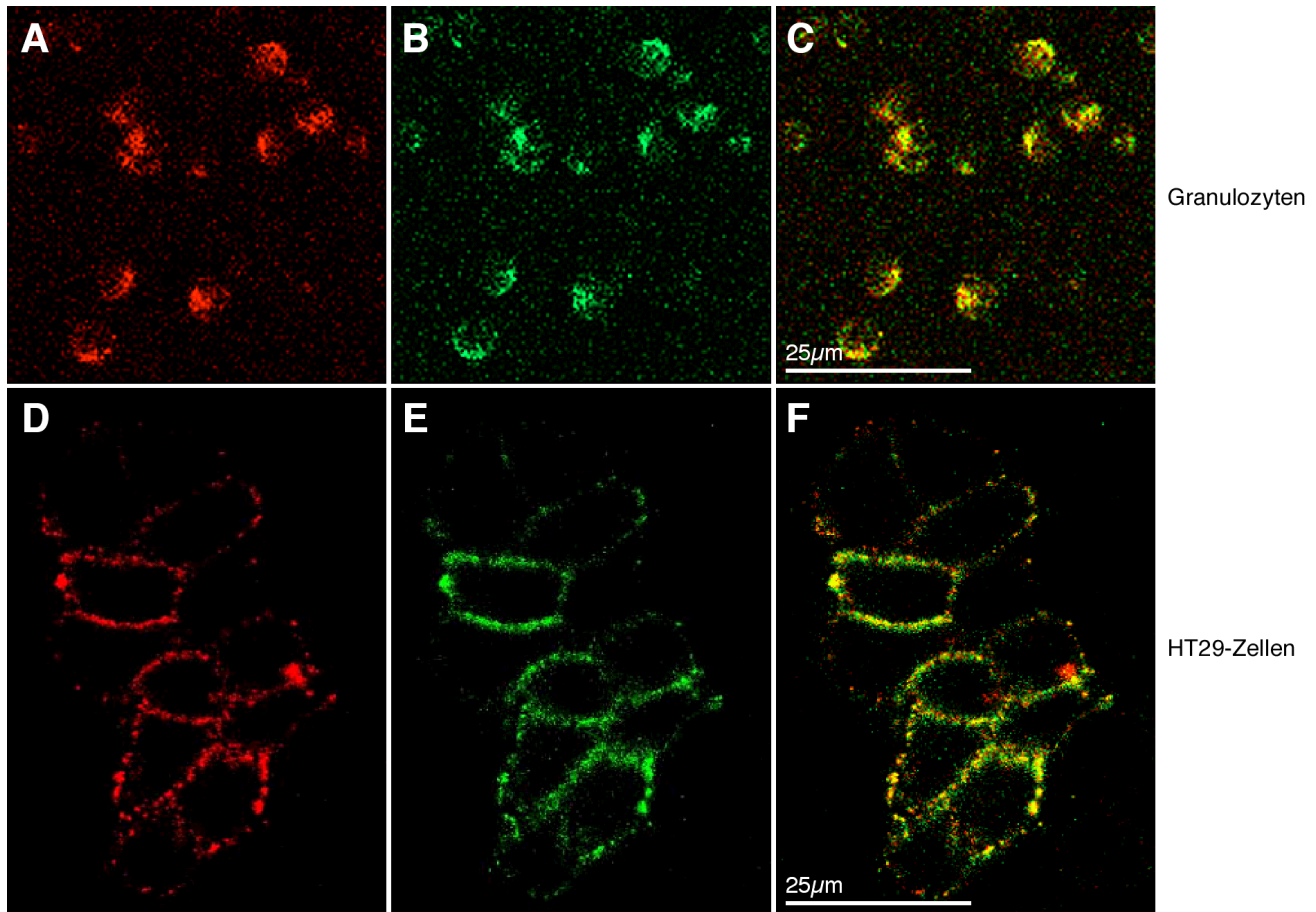


Abbildung 37: Immunfluoreszenz des TRITC markierten mAb 4D1C2 zur Markierung von CEACAM1(A) und des FITC-markierten mAb Integrin  $\beta_3$  (B) auf Granulozyten. Die Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde mit TRITC (für die Detektion der CEACAM1, Rot) und FITC (für die Detektion der Integrin  $\beta_3$  mAb, Grün) gezeigt (C). Bei den HT29-Zellen wurde die Immunreaktivität (4D1C2, D, mAb Integrin  $\beta_3$ , E) und Doppel-Fluoreszenz-Färbung (F) gezeigt.

#### 5.5.2.1 Koexpression und Kolo-kalisation von CEACAM1 und Integrin $\beta_3$ bzw. CEACAM1 und Paxillin auf HUVEC-Zellen

Die HUVEC Zellen wurden ebenfalls mittels CLSM untersucht. Die Immunreaktivität von mAb CEACAM1 (4D1C2) (Abbildung 38 A-Rot) und von mAb Paxillin (Abbildung 38 B-Grün) wurden lokalisiert. Mit einer Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde die Kolo-kalisation von CEACAM1 und Paxillin als gelbe Fluoreszenz angezeigt (Abbildung 38 C).

Die Immunfluoreszenz von TRITC markiertem mAb 4D1C2 (Abbildung 38 D-Rot) und von FITC markiertem mAb Integrin  $\beta_3$  (Abbildung 38 E-Grün) zeigen die starke Expression der

jeweiligen Moleküle. Die korrespondierende Doppel-Fluoreszenz-Markierung zeigt die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  in HUVEC-Zellen (Abbildung 38 F).

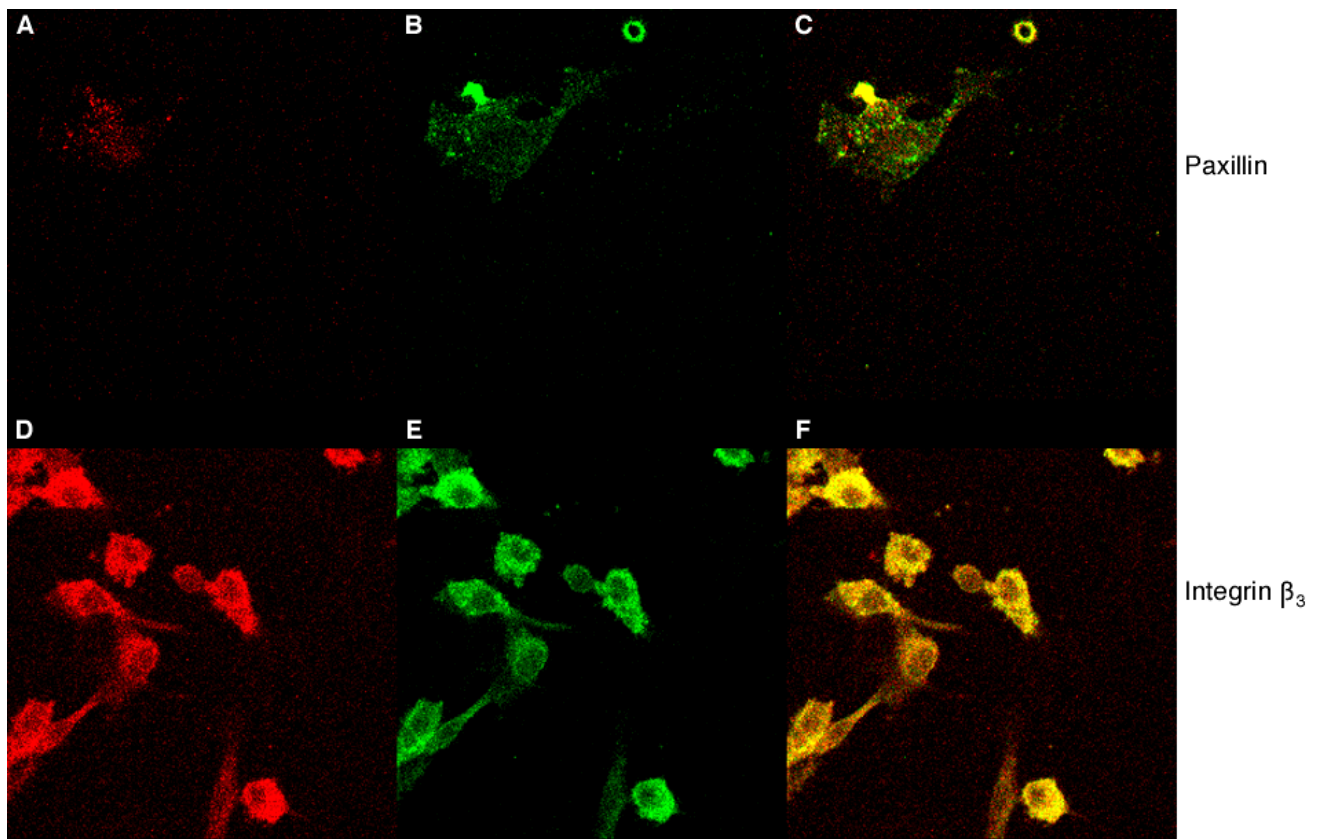


Abbildung 38: Immunfluoreszenz des TRITC markierten mAb 4D1C2 zur Markierung von CEACAM1 (A) und FITC markierten mAb Paxillin (B) in HUVEC-Zellen. Die Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde mit TRITC (für Detektion von mAb 4D1C2, Rot) und FITC (für Detektion von mAb Paxillin, Grün) gezeigt (C). Immunfluoreszenz von TRITC markiertem mAb 4D1C2 zur Lokalisation von CEACAM1 (D) und von FITC markierten mAb Integrin  $\beta_3$  (E) in HUVEC-Zellen. Die Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde mit TRITC (für die Detektion von mAb 4D1C2, Rot) und FITC (für die Detektion von mAb Integrin  $\beta_3$ , Grün) gezeigt (F).

### 5.5.3 Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 mit Integrin $\beta_3$ im Endometrium und Placenta-Strukturen

Die Westernblot-Analyse von Proteinextrakten der isolierten und kultivierten Epithelzellen des Endometriums mit mAb 4D1C2 wies auf die Expression von CEACAM1 hin (Bamberger et al., 1998, Bamberger et al., 2000).

Um die Expression und Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  im Endometrium der Schwangerschaft zu untersuchen, wurde die Doppel-Fluoreszenz Mikroskopie mit Fluorchrom TRITC für die Lokalisation von CEACAM1 und FITC-Markierung für die Integrin  $\beta_3$ -Expression angewandt. Die Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  ist auf den apikalen Epithelzellen der Endometriumdrüsen zu sehen (Abbildung 39-C).

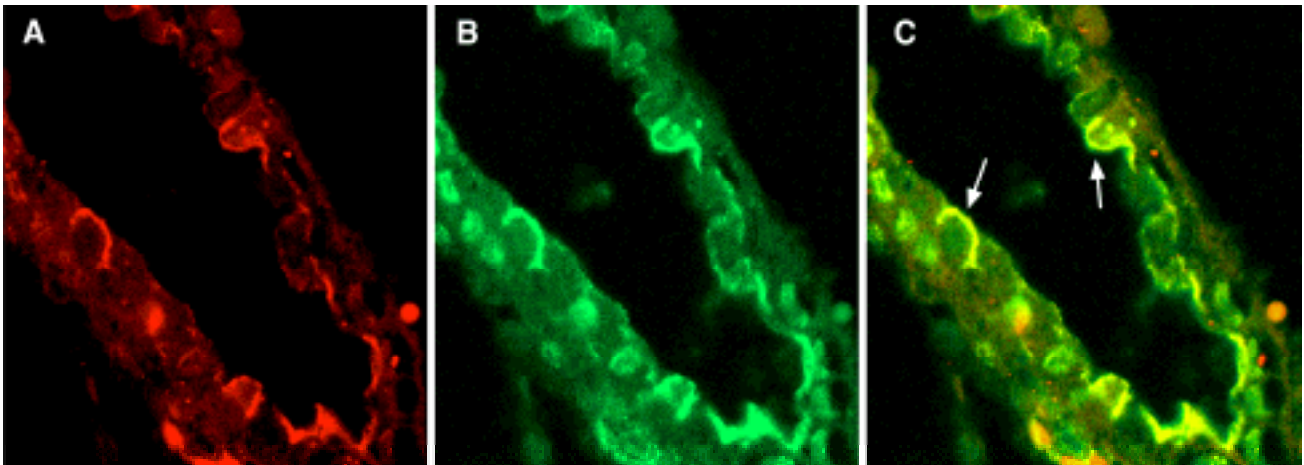


Abbildung 39: Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  im Endometrium. Immunofluoreszenz-Färbung des Endometriums mittels TRITC markiertem mAb 4D1C2 (A) und FITC markiertem mAb Integrin  $\beta_3$  (B). Die Doppel-Fluoreszenz-Markierung wurde in (C) gezeigt.

Wegen der spezifischen CEACAM1-Expression in extravillösen Trophoblasten (Bamberger, A-M. et al., 2000) und der Integrin  $\beta_3$ -Expression in humanem Endometrium im sogenannten Implantationsfenster (Damsky, CH. et al., 1996 und Damsky, CH. et al., 1998), wurde die Expression von CEACAM1 & Integrin  $\beta_3$  im Bereich des fetal-maternalen-Überganges untersucht. Representative Ergebnisse von Doppel-Fluoreszenz-CLSM der zwei verschiedenen Implantationsstellen werden in Abbildung 40 gezeigt. Da bei den beiden Implantationsseiten die Integrin  $\beta_3$ -positiven Zellen (Abbildung 40 B und E) noch in Kontakt miteinander stehen, ist keine Expression von Integrin  $\beta_3$  an der Invasionsfront (IF), sondern eher an der Übergangszone (TZ) des proliferativen zum extravillösen Trophoblasten zu sehen. Auf dieser Übergangszone wurde die starke Koexpression sowie Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  beobachtet. Im Gegensatz zu Integrin  $\beta_3$  wird CEACAM1 an der Invasionsfront, wo die Zellen isoliert voneinander in Kontakt mit Decidua-Komponenten stehen, exprimiert. An der Invasionsfront (Abbildung 40 C und F) sind die Zellen CEACAM1 positiv aber Integrin  $\beta_3$  negativ.

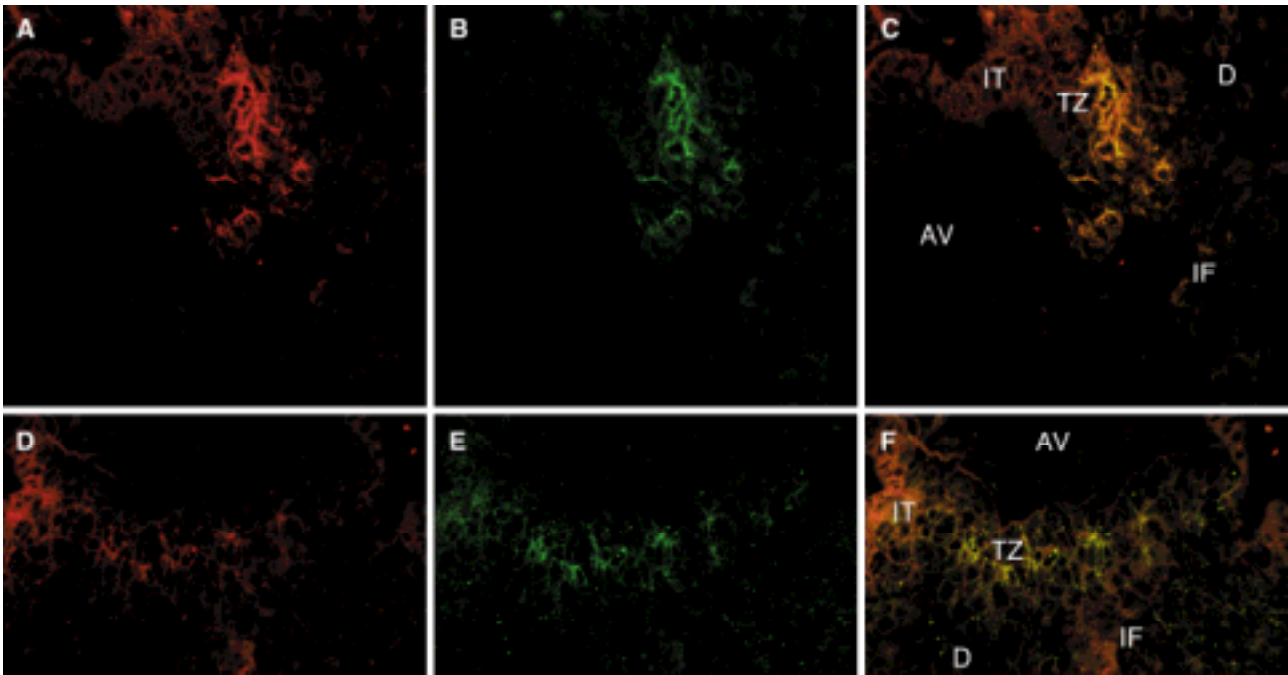


Abbildung 40: Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  am fetal-maternalen-Übergang.

Abbildung 40 zeigt die Immunfluoreszenz Färbung von zwei Implantationsstellen des ersten Trimenon mittels TRITC markierten mAb 4D1C2 (A und D, Rot) und FITC markierten mAb Integrin  $\beta_3$  (B und E, grün). Die simultane Detektion von Integrin  $\beta_3$  und CEACAM1 zeigte die Kolokalisation der beiden Signale (C und F, gelb) an der Übergangszone (TZ) von proliferativen zum invasiven Trophoblasten, wobei keine Koexpression oder Kolokalisation an der villösen Verankerung (AV) oder der Decidua (D) zu beobachten ist. Es ist besonders die breite Expression von CEACAM1 an den intermediär Trophoblasten (IT) und der Invasionsfront (IF) zu erkennen.

#### 5.5.3.1 Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 mit Integrin $\beta_3$ in primären Melanomen.

Da Integrin  $\beta_3$  eine führende Rolle bei der Invasion und Metastasierung von malignen Melanomen spielt (Hsu, MY. et al., 1998 und Natali, PG. et al., 1997) und CEACAM1 mit der Metastasierung von Melanomen korreliert ist (Thies, A. et al., 2002), wurde die CEACAM1-/Integrin  $\beta_3$ -Expression an Gewebeschnitten von primären Melanomen untersucht.

Abbildung 41 zeigt die repräsentativen Resultate der CEACAM1- und Integrin  $\beta_3$ -Expression in CEACAM1-positiven primären Melanomen. Im Zentrum von primären Melanomen ist eine heterogene CEACAM1/Integrin $\beta_3$ -Kolokalisation zu sehen (Abbildung 41-A). Die horizontalen (Abbildung 41-B) sowie longitudinalen Gewebeschnitte (Abbildung 41 C-E) zeigen dagegen eine konzentrierte Kolokalisation der CEACAM1-Integrin  $\beta_3$ -Komplexe an der Tumor-Stroma Grenzfläche von invadierenden Tumorzapfen. Interessanterweise wurde eine starke Koexpression und Kolokalisation an der Invasionsfront beobachtet (Abbildung 41-E).

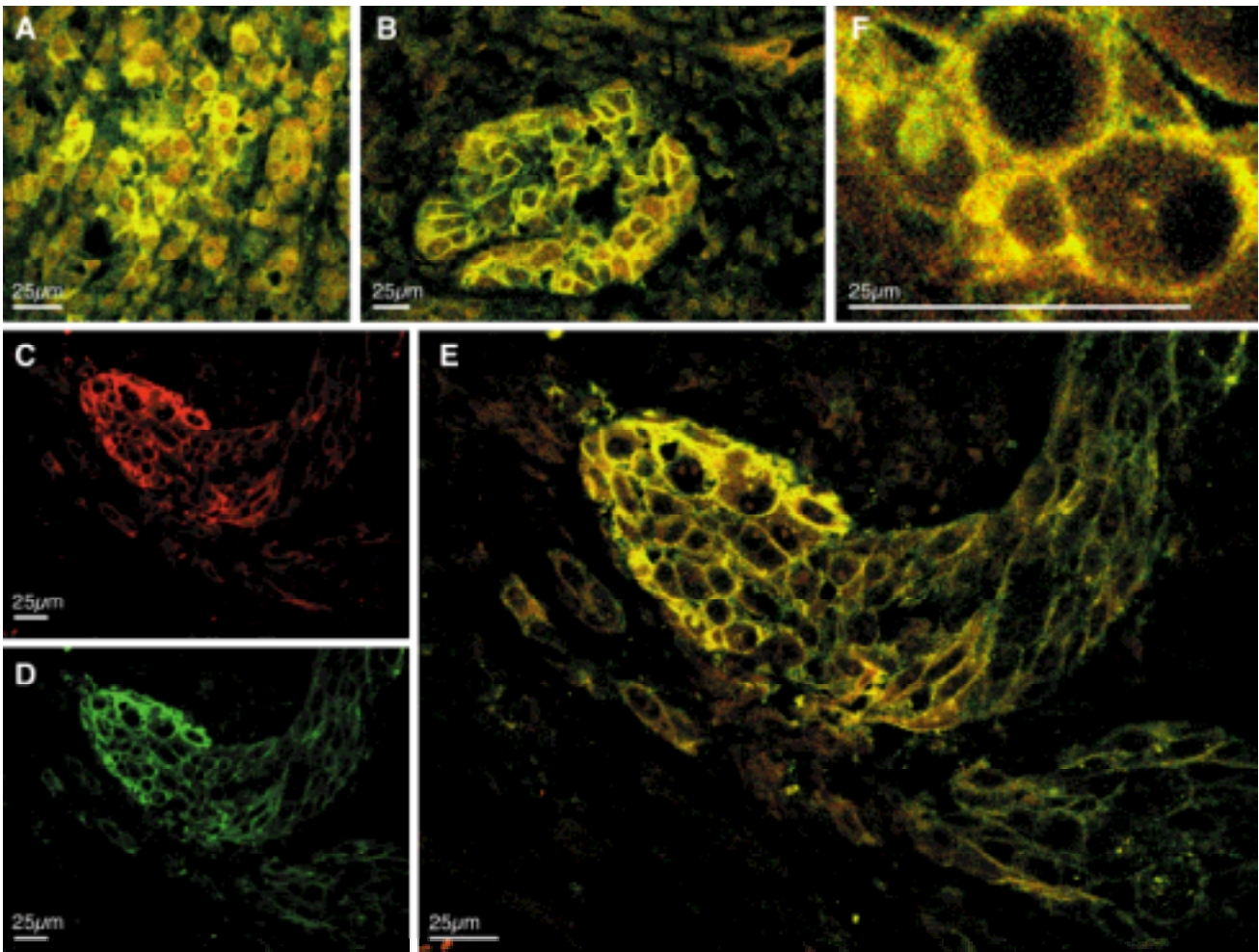


Abbildung 41: Immunfluoreszenz Färbung von primären Melanomen mittels TRITC markierten mAb 4D1C2 (C, Rot) und FITC markierten mAb Integrin  $\beta_3$  (D, grün). Die simultane Detektion von Integrin  $\beta_3$  und CEACAM1 zeigt die heterogene Kolokalisation der beiden Signale (gelb) im Zentrum vom primären Melanomen (A) und die konzentrierte Kolokalisation an der invadierenden Tumorzapfen (B, E, und F).

#### 5.5.4 Untersuchung des Invasionsverhaltens von CEACAM1 positiven Zelllinien

Die Invasion durch extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein kritischer Schritt in der Tumor-Metastasierung, daher wurde als Pilotversuch das Invasionsverhalten von stabilen CHO-CEACAM1-Transfektanten sowie CEACAM1 positiven Zellen (G361) in einer Invasions-Kammer untersucht, wobei als Negativ-Kontrolle die CHO-Zellen bzw. CEACAM1 negative Zellen (MV<sub>3</sub>) eingesetzt wurden.

Abbildung 42 zeigt eine Ansicht der invadierten Zellen durch die mit Matrigel beschichtete Membran. Die Membran wurde nach dem Assay mit Diff-Quick (DADE Behring, Mannheim) gefärbt. Es ist eindeutig zu sehen, daß die stabile CHO-CEACAM1-Zelllinie das Matrigel stärker als CHO-Zelllinie durchwandert.

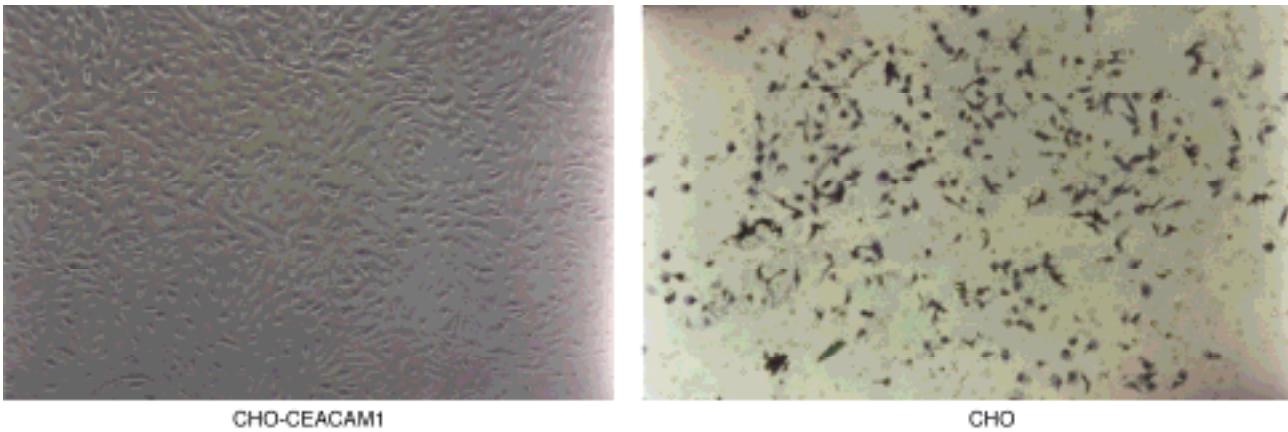


Abbildung 42 :Makroskopische Ansicht von Zell-Invasion durch die Matrigel-Invasionskammer

Abbildung 43 zeigt die Auswertung der Invasion oder der Migration von stabilen CHO-CEACAM1-, versus CHO-Zelllinien. Es ist zu erkennen, daß die CHO-CEACAM1-Zellen (a) in der Lage sind um ca. 60% mehr als CHO-Zellen (b) Matrigel zu durchwandern. Dieser Effekt konnte mittels mAb CEACAM (12-140-4) sukzessive reduziert werden, während die Kontrolle (Maus IgG) keine Wirkung auf Invasion von CHO-CEACAM1-Zellen hat.

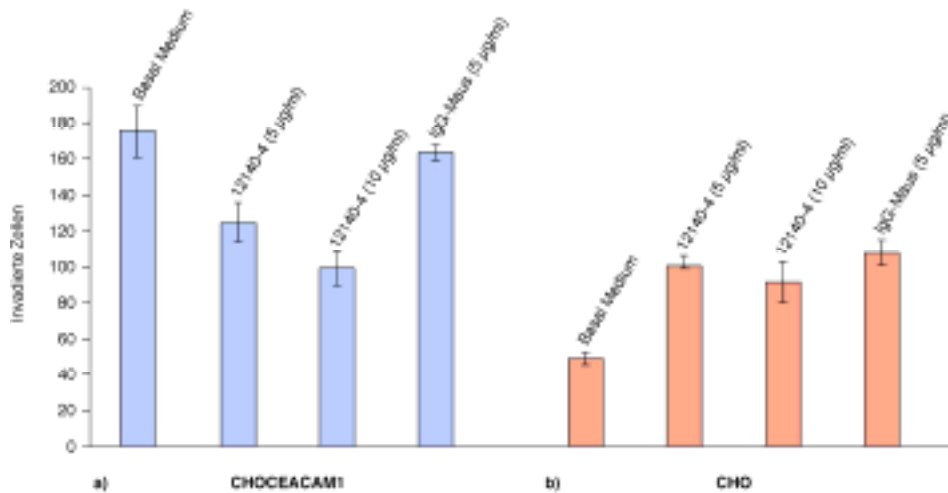


Abbildung 43: Quantifizierung der Zell-Invasion von gefärbten CHO-, stabilen CHO-CEACAM1-Transfektanten-Zellen durch visuelle Auszählung.

Abbildung 44 zeigt, daß sowohl CEACAM1-positiven Zellen (G361) als auch die CEACAM1-negativen Zellen (MV3) annähernd gleich Matrigel durchwandern, wobei dieser Effekt nur im Falle von CEACAM1 positiven Zellen (G361) mittels mAb CEACAM (12-140-4) zu inhibieren ist.

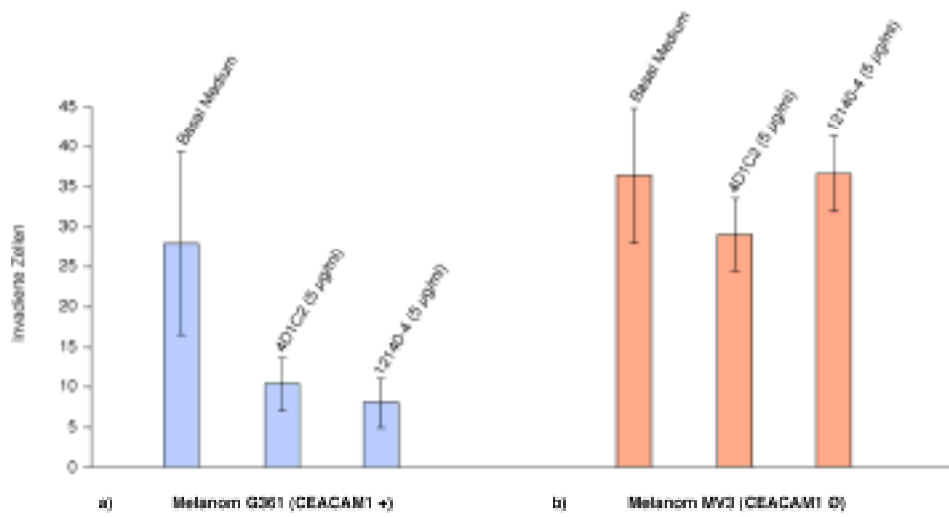


Abbildung 44: Quantifizierung der Zell-Invasion von gefärbten CEACAM1-positiven Zellen G361 (a) und CEACAM1-negativen Zellen MV3 (b) durch visuelle Auszählung

## 6 DISKUSSION

Der Schwerpunkt dieser Arbeit – die Isolierung und Identifizierung weiterer CEACAM1<sub>cyt</sub>-assoziierter Proteine – setzte die quantitative Aufreinigung und Charakterisierung von CEACAM1 voraus. Das native CEACAM1 sollte dazu dienen, assoziierte Zielmoleküle zu isolieren. Nach der Isolation folgte die Charakterisierung der gefundenen Ziele und schließlich die Identifikation.

Die wesentlichen Schwierigkeiten bei der Isolierung und Aufarbeitung CEACAM1<sub>cyt</sub>-assoziierter Proteine bestehen in der Lokalisation und/oder der Detektierbarkeit sowie der Aufklärung der Bindungsart der interagierenden Moleküle.

Die Charakterisierung der assoziierten Moleküle erfolgte nach der Isolierung aus Granulozyten und den sich anschließenden säulenchromatographischen Reinigungsschritten durch Methoden, bei denen die Polypeptide identifiziert werden konnten. Für die analytischen Untersuchungen wurde die Präparation von Granulozyten über einen Ficoll-Gradienten durchgeführt. Somit konnte ein großer Teil von Kontaminationen, herrührend von Plasma-, Lymphozyten- und/oder Erythrozytenresten, entfernt werden. Für die Isolierung von CEACAM1 im semi-präparativen Stil war der Ficoll-Gradient wegen des großen Zeitaufwands nicht empfehlenswert. Da CEACAM1 über die transmembranöse Domäne in der Membran verankert ist, wurde die Lyse Methode mit NP-40 als Detergens in An-, bzw. Abwesenheit von 2 mM Ca<sup>2+</sup> durchgeführt. Um heterophile Wechselwirkungen zu untersuchen, wurde Ca<sup>2+</sup> eingesetzt. So konnte die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3, aber nicht der von CEACAM1, mit dem Calprotectin-Komplex unabhängig vom Phosphorylierungsstatus festgestellt werden (Streichert, T. et al., 2001).

Die Charakterisierung von nativem CEACAM1 aus Granulozyten stand im Vordergrund. Die Aufklärung des Tyrosinphosphorylierungsstatus des nativen CEACAM1 war trotz der Blockierung von Phosphatasen in Anwesenheit von Pervanadat nicht möglich. Als mögliche Gründe dafür kommen sterische Hindernisse wie z.B. Glykosylierung oder der schnelle Abbau von Phosphatgruppen in Frage. Darüber hinaus war es nicht möglich, die Inhomogenität bezüglich der langen oder kurzen zytoplasmatischen Domäne von nativem CEACAM1 zu definieren.

Im Rahmen der CEACAM1-Charakterisierung ist es aber zum ersten Mal gelungen den isoelektrischen Punkt vom CEACAM1 experimentell festzulegen. Das Vorhandensein von zwei isoelektrischen Punkten (pI=3,5 und pI=5,7) weist auf mögliche Spleißvarianten "CEACAM1 mit der langen oder der kurzen zytoplasmatischen Domäne" oder auch unterschiedliche Modifikationen "Phosphorylierung und/oder Glykosylierung" hin.

Bei der Aufreinigung von CEACAM1 aus Granulozyten wurde der Granulozytenextrakt einer Perchlorsäure-Extraktion unterzogen. Unter diese Bedingungen wurde die ursprüngliche CEACAM1-Menge um etwa 50% reduziert. Obwohl CEACAM1 mit dem spezifischen CEACAM1-Antikörper (4D1C2 oder T.84.1) in einer relativ kleinen Menge Granulozyten-

extrakt (1-5 µg) stark zu detektieren ist, ist die entsprechende Bande mit Coomassie-, oder Silberfärbung nicht sichtbar. Das hat eventuell folgende Erklärung: Der in zwei verschiedenen Farben (Rot und Blau) auftretende Coomassie Brilliant Blue G-250-Farbstoff kann nicht an das Glykopeptid mit *intakten* Zuckerketten binden, d.h. eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm ist nicht meßbar, weil der Zugang des Farbstoffs zum Peptid durch den Kohlenhydratmantel des Glykokonjugates verhindert wurde. Auch im Falle Silberfärbung wird die Bindung des Farbstoffs an das Peptid erschwert. Es ist aber bemerkenswert, dass wenn das aufgereinigte CEACAM1 mit den genannten Färbetechniken gefärbt wird, die CEACAM1-Banden sichtbar werden, was auf ein denaturiertes bzw. besser zugängliches CEACAM1-Molekül hinweist.

Für die Anreicherung von CEACAM1 wurde auf übliche Aufreinigungsschritte wie z.B. Anionen-, oder Kationenaustauschchromatographie (Mono Q oder Mono S) wegen der Verfügbarkeit des CEACAM-mAb T.84.1 verzichtet. Der mAb T.84.1 erkennt außer CEACAM1 zwei weitere Mitglieder der CEACAM-Familie, nämlich CEACAM3 und CEACAM6. Die Aufreinigung von T.84.1 (Hybridomzellkulturüberstand) erfolgte über rekombinantes Protein A. Bei dieser Aufreinigung wurden neben der IgG-Fraktion auch die IgG<sub>2a/2b</sub>-Fraktion eluiert, wobei die IgG-Fraktion eine bessere Effizienz für die Affinitätschromatographie zeigte. Der monoklonale Antikörper 4D1C2, der in Granulozyten nur CEACAM1 erkennt, erwies sich als ungeeignet für den Zweck der Affinitätschromatographie.

Durch die auf das Molekül zugeschnittene Affinitätschromatographie mittels Antikörper T.84.1 konnte außer CEACAM1 auch CEACAM3 und CEACAM6 angereichert werden.

Durch die Affinitätschromatographie mit dem Target-Antikörper T.84.1 wurde zwar die Anreicherung von CEACAM1 erreicht, aber für eine hohe Reinheit waren weitere Aufreinigungsschritte wie Reversed Phase-, oder Gelsizechromatographie notwendig.

Obwohl mittels RP-Chromatographie (RPC) zum großen Teil die niedermolekularen Antigene, die sich als unspezifisch koeluierte Proteine bei der Affinitätschromatographie herausstellten, getrennt wurden, war die RP-Chromatographie wegen der hohen Verluste beim Umpuffern der Elutionsfraktionen nicht die Methode der Wahl.

Die Gel Size-Chromatographie (GSC) ist zwar relativ zur RPC gesehen zeitaufwendig, wurde aber angesichts der Ausbeute und der Reinheitsqualität gewählt. Dadurch konnte eine Reinheit von etwa 90% erreicht werden.

Die native Aufreinigung des Glykoproteins CEACAM1 wurde entsprechend der erzielten experimentellen Fakten folgendermaßen gewählt:

- Membran-Lyse (NP-40) der Granulozyten (ohne Ficoll-Gradient)
- Perchlorsäure-Extraktion
- Affinitätschromatographie mit T.84.1 als Target-Antikörper
- Gel Size-Chromatographie

Die Affinitätschromatographie auf Basis des Antikörpers T.84.1 erschien auf den ersten Blick als gutes Instrument für die Suche nach assoziierten Proteinen von CEACAM1. Da aber dessen Interaktionsspektrum d.h. vier extrazelluläre Domänen, diverse unbekannte Zucker-Modifikationen sowie Wechselwirkungen über tertiäre Strukturen die Suche beinahe aussichtslos erschienen liessen, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt..

Weitere etablierte und moderne Methoden (wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken mit radioaktiv markierten CEACAM1<sub>cyt</sub>-konstrukten, Two-Hybrid-System (Hefe), ES-MS, NMR) führen aufgrund der Größe und Mikroheterogenität der Moleküle und je nach dem Reinheitsgrad noch zusätzlich vorliegenden höher- oder niedermolekularen Verunreinigungen nicht zur gewünschten Identifizierung der assoziierte Partner.

Die massenspektroskopischen Meßverfahren wie z.B. ES-MS, MALDI-TOF sind nicht für den vorliegenden Fall geeignet, weil es nicht auszuschließen ist, daß mehrere Spaltprodukte in der Fraktion vorkommen und daher eine Inhomogenität der Proben verursachen; schließlich mußte die Mikroheterogenität bezüglich der O-, bzw. N-Glykan-Einheiten vom Targetmolekül nämlich CEACAM1 betrachtet werden. Des weiteren besteht die Heterogenität bezüglich des Glykosylierungsgrades des CEACAM1-Moleküls, der weitgehend unbekannt ist. Darüber hinaus führt das Substanzmengenproblem der zu untersuchenden Proben zu erheblichen Schwierigkeiten.

Das eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR (nuclear magnetic resonance) liefert aufgrund überlappender Signale nur den Überblick über die chemische Verschiebung der Protonen. Um die interagierenden Moleküle bzw. Komplexe identifizieren zu können, ist die Ermittlung der Sekundärstruktur notwendig. Die zweidimensionale HH-COSY (correlation spectroscopy) oder HH-NOESY (nuclear overhauser spectroscopy) leisten zwar einen Beitrag zur Identifizierung der Sekundärstruktur der Peptide, sind aber nicht ausreichend zur Aufklärung der räumlichen Anordnung der in der Sequenz nebeneinander liegenden Aminosäuren und der benachbarten Modifikationen geeignet. Erst wenn mit Hilfe solcher Experimente die Sekundärstruktur sowie die Torsionswinkel ermittelt wurden und wenn die tertiären NOE-Effekte, d.h. Kern-Overhauser-Effekte, in der Sequenz weit entfernt liegender Protonen aufgeklärt wurden (2D-NOESY, 2D isotopmarkiertes NOESY), ist es möglich die dreidimensionale Struktur der Peptide aufzuklären. Die dreidimensionale NMR-Spektroskopie gelöster Proteine neben der Röntgenstrukturuntersuchung kristallisierter Proteine ist zwar eine exzellente und enorm leistungsfähige Methode zur Aufklärung der Raumstruktur von Proteinen, weist aber auch praktischen Einschränkungen auf. Andere Ursachen könnten aber ebenso die Messbarkeit erschweren oder verhindern: so sollte das Protein in millimolaren Konzentrationen löslich sein, nicht zu Aggregationen neigen und bis zu 40°C stabil bleiben. Nach diesen Ausführungen konnte von einem erhöhten Schwierigkeitsgrad bei der Aufklärung von Proteinen wie im vorliegenden Fall ausgegangen werden.

Die erwähnten Schwierigkeiten bei der Charakterisierung und Aufklärung der interagierenden Moleküle führten zu der spezifischen Zielsetzung: die zytoplasmatische Domäne von

CEACAM1 als Probemolekül einzusetzen, um assoziierte Partner zu isolieren und zu charakterisieren.

Bekannt ist, daß CEACAM1 mit der Tyrosinkinase SRC assoziiert. Diese Assoziation beruht auf einer direkten Bindung der Src-Kinase an die zytoplasmatische CEACAM1 Domäne. Die Src-Kinase bindet dabei über eine einzelne Domäne, die Src-SH2-Domäne (SH2: Src homology module 2). Die Aktivität der Src-Kinase wird über die intermolekulare Bindung der SH2-Domäne an CEACAM1<sub>cyt</sub> positiv reguliert (Brümmer, J. et al., 1995).

Somit kam bei dieser Arbeit die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie für die Anreicherung von Proteinen, die spezifisch mit tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub> assoziieren, zum Einsatz. Dieser Ansatz beruht prinzipiell auf der Anreicherung CEACAM1<sub>cyt</sub>-assoziiierter Proteine über die rekombinant exprimierte, *in-vitro* tyrosin-phosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub>-Domäne. Die Methode basiert auf der Affinität von Proteinen (und anderen Biomolekülen) zu Metallionen, die durch Komplexierung an einem chelierenden Liganden der stationären Phase immobilisiert wurden. Dieser Ligand ist Iminodiessigsäure. Die koordinativen Bindungen des Chelatbildners zum Metallion sind wesentlich stärker als die von Proteinen; daher ist es im allgemeinen möglich, die gebundenen Proteine zu desorbieren, ohne daß sie mit dem Metallion verunreinigt sind. Die Affinität zu komplexierten Metallionen ist von Protein zu Protein unterschiedlich ausgeprägt und erlaubt daher ihre Fraktionierung. Sie hängt von der Anzahl und der räumlichen Anordnung bestimmter Aminosäuren, die an der Proteinoberflächen zugänglich sind. Diese Amino-säuren fungieren als Elektronen-Donor (Lewis-Basen); ihr basischer Charakter, der für Bindungsstärke ausschlaggebend ist, variiert:

His > Trp > Cys > Tyr

In Homologie zu CEACAM1 läßt auch die deduzierte Aminosäure-Sequenz von CEACAM3 erkennen, daß das Molekül modular angelegt ist. Dabei besteht CEACAM3 aus einem kurzen Leader-Peptid, einer IgV-artigen Domäne, einer transmembranär angelegten Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil (Thompson et al., 1991). Die Untersuchung der CEACAM3<sub>cyt</sub> zeigen ebenfalls Phosphorylierungsstellen für Tyrosin-Kinasen, aber auch Angriffspunkte für Serin-/Threonin-Kinasen. Daher wurden als Kontrolle bzw. interner Standard parallel serin-/threoninphosphorylierte und unphosphorylierte CEACAM1<sub>cyt</sub>-Domänen sowie unphosphorylierte bzw. differentiell phosphorylierte CEACAM3<sub>cyt</sub>-Domänen verwendet.

Bei diesem methodischen Ansatz (Metall-Chelat-Affinitätschromatographie) ist man in der Lage, die transiente Wechselwirkung zwischen Bindungspartnern ohne Änderung und/oder Beeinflussung der räumlichen Anordnung von Proteinen zu untersuchen, was z.B. bei der Kreuz-Vernetzung der Fall ist. Trotzdem müssen negative Aspekte dieser Methode wie z.B. die schwache Korrelierbarkeit zu physiologischen d.h. *in vivo*-Wechselwirkungen, die Säulengeometrie und daraus resultierende Laufverhalten der Moleküle und die unter-

schiedliche Nettoladung der Moleküle unter verschiedenen Elutionsbedingungen berücksichtigt werden.

Nichtsdestotrotz lieferte dieser Ansatz deutliche Hinweise, die mit Folgeuntersuchungen konkretisiert werden konnten.

Die Tyrosinreste (Tyr-488 und Tyr 515) der langen Form der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 liegen in Sequenzmotiven, die einem "Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif" [ITAM] oder Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif [ITIM] ähneln. Somit war es möglich das Interaktionsspektrum über diese Tyrosinreste im Hinblick des Phosphorylierungszustandes über die SRC-Kinase näher zu betrachten. Als Ausgangspunkt für die Aufreinigung lagen CEACAM1<sub>cyt</sub>-DNA und deren Mutanten im pQE31-Vektor kloniert in kompetenten SG 13009 Bakterien vor. Entsprechend den experimentellen Fakten wurde die native Lyse gewählt. Die denaturierende Lyse mit 8 M Harnstoff störte die folgenden Untersuchungen und die Lyse mit Ultraschall lieferte ebenfalls störende Abbauprodukte. Die Aufreinigung erfolgte über abfallenden pH-Gradienten: dadurch werden die Elektronengebenden Gruppen an der Protein-Oberfläche allmählich protoniert; die Anzahl der koordinativen Bindungen sinkt kontinuierlich, bis das Protein schließlich desorbiert. Das geschieht typischerweise reproduzierbar bei einem bestimmten, charakteristischen pH-Wert. Ein Gradient bis pH 3 löst praktisch jedes Protein von der stationären Phase.

Bei der Aufreinigung von CEACAM1<sub>cyt</sub> und den Konstrukten konnten trotz der Anwendung derselben Aufreinigungsmatrix (Ni-NTA) und identischen Säulengeometrien und Laufprogrammen keine identischen Retentionszeiten erzielt werden. Das wäre durch die Wirkung der Tyrosinreste zu erklären, so daß die Nettoladung sich innerhalb der Säule von Fall zu Fall unterscheidet. Nach mehreren Aufreinigungsschritten konnte ausreichend CEACAM1<sub>cyt</sub> und dessen Mutanten mit einer Reinheit von über 90% erhalten werden.

Das apparente Molekulargewicht (ca. 13000 Da) von CEACAM1<sub>cyt</sub> stimmte mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht (9867,8 Da) nicht überein. Mittels ES-MS konnte ein Molekulargewicht von 9867,8 Da festgestellt werden. Dieser Sachverhalt ist wahrscheinlich durch das Vorhandensein von Tyrosin-, sowie Histidinresten bedingt, die das Laufverhalten bei der SDS-PAGE beeinflussen. Mit SRC-Kinase konnte CEACAM1<sub>cyt</sub> und die entsprechenden Konstrukte mit Ausnahme von Y488F, Y515F CEACAM1<sub>cyt</sub> phosphoryliert werden. Für die *in-vitro* Bindungsstudien wurde die Phosphorylierung mit nicht radioaktiven ATP durchgeführt und mittels Westernblot (mAb PY20) getestet. Nach intensiven Aufreinigungsschritten sowohl für CEACAM1<sub>cyt</sub> als auch für die phosphorylierte Domäne (CEACAM1<sub>cyt-p</sub>) über eine Phosphotyrosin-Affinitätschromatographie und ständigen Effizienttests bei den Kopplungsschritten der Konstrukte an die Ni-NTA-Matrix sollten die optimalen Interaktionsbedingungen festgestellt werden, was entsprechend viel Zeit und Ausgangsmaterial in Anspruch nahm. Hierbei konnte ein Richtwert von 1:5 (CEACAM1<sub>cyt</sub> : Granulozytenlysate) festgestellt werden. Die Wahl der Kontrolle war ebenfalls von großer Bedeutung. Außer der Ni-NTA-Matrix ohne angekoppelte Konstrukte wurde die

zytoplasmatische Domäne von CEACAM3, die ebenfalls zwei mit SRC phosphorylierbare Tyrosinreste aufweist, als interner Standard verwendet.

Die Phosphorylierung der Tyrosinreste (Y488 und Y515) der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 diente bei der Detektion der assoziierten Moleküle als eine empfindliche Sonde: nach der säulenchromatographischen Fraktionierung an Ni-NTA, zeigte der Test (SDS-PAGE) an, in welcher der erhaltenen Fraktionen sich das zu isolierende Molekül befand: die Fraktionen, die den intensivsten Nachweis zeigten, wurden den sich jeweils anschließenden Aufreinigungsschritten unterzogen. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich aus den niedrigen Substanzmengen, was u.a. die Edman-Abbau-Sequenzierung erschwerte.

Mit dieser Methode konnte reproduzierbar eine Reihe von Proteinen gereinigt werden, die spezifisch mit der tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub>-Domäne assoziiert waren und nicht mit der phosphorylierten oder unphosphorylierten CEACAM3<sub>cyt</sub>-Domäne oder der Säulenmatrix interagieren.

Mit der tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub>-Domäne ergab sich ein deutliches Bandenmuster mit den abgeschätzten Molekulargewichten von 215, 120, 95 und 68 kDa. Nach SDS-PAGE konnten drei der entsprechenden Proteine nach Transfer auf PVDF-Membran sequenziert werden (AG. Richter, Hamburg). Ein Vergleich der gewonnenen Peptidsequenzen mit den in SwissProt gespeicherten Proteinsequenzen konnten die Banden eindeutig als Talin (215 kDa-Bande), Vinculin (120 kDa-Bande) und Integrin  $\beta_3$  (95 kDa-Banden) identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern im Immunoblot konnten die aufgereinigte Bande bei 68 kDa als Paxillin identifizieren.

Streichert et al. (2001) fanden unter ähnlichen experimentellen Ansätze mit der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 unabhängig vom Phosphorylierungszustand Peptide bei 8, 14 und 30 kDa. Es handelte sich dabei um den Calprotectin-Komplex (8 und 14 kDa) sowie CEACAM3 (30 kDa). Die Tatsache, daß in den Ansätzen mit der phosphorylierten und unphosphorylierten CEACAM3<sub>cyt</sub>-Domäne trotz ähnlicher Sequenz zu CEACAM1<sub>cyt</sub> gänzlich unterschiedliche assoziierte Proteine gefunden wurden, weist auf unterschiedliche Funktionen der beiden Moleküle hin.

Die *in-vitro* Bindungsstudie zeigte die Wechselwirkung von der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 mit einigen Zytoskelettproteinen. Dies war zwar ein konkreter Hinweis für die Beteiligung der erwähnten Proteine in einem Komplex, aber nicht ausreichend genug. Daher war die Bestätigung der erzielten Daten durch weitere Verfahren notwendig. Mittels Immunpräzipitation wurde die Bildung der Immunkomplexe untersucht. Diesbezüglich wurde die Assoziation von CEACAM1 mit Paxillin, Integrin, Vinculin und Talin aus Granulozytenextrakt sowie HT-29-, oder HUVEC-Lysaten durch Koimmunopräzipitationsversuche untersucht. Hierbei wurden entsprechende Lysate mit den monoklonalen Antikörpern gegen Paxillin, Integrin, Vinculin oder Talin und Protein G Plus/Protein A Agarose inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden einer SDS-PAGE mit anschließendem

Westernblot und der Immunfärbung mit spezifischen CEACAM1 mAb (4D1C2), der keine Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie eingeht, unterzogen.

In Immunpräzipitationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit mAb Integrin  $\beta_3$  sowie mAb Paxillin das CEACAM1 zu präzipitieren ist, während IgG<sub>1</sub> Maus (Kontrolle) dieses Ergebnis nicht liefert. Das weist auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen CEACAM1, Integrin  $\beta_3$  und Paxillin hin.

In weiteren Immunpräzipitationsuntersuchungen konnte nur für Paxillin und Integrin  $\beta_3$  - nicht aber für Vinculin und Talin - gezeigt werden, daß diese mit CEACAM1-spezifischen Antikörpern aus Granulozyten-, sowie HT29-Extrakten kopräzipitiert werden. Mit mAb gegen Vinculin war CEACAM1 nur schwach kopräzipitierbar. Das Talin zeigte keine direkte Wechselwirkung mit CEACAM1.

Auf dieser Stufe der Untersuchung war dieser Befund ein Hinweis darauf, daß Talin und Vinculin als assoziierte Partner für Integrin in Betracht kommen könnten. Da mit dem CEACAM-mAb sowohl Paxillin als auch Integrin  $\beta_3$  kopräzipitiert wurden, ist es sehr wahrscheinlich, daß sowohl Vinculin als auch Talin indirekt - über Paxillin bzw. Integrin  $\beta_3$  - mit CEACAM1 assoziiert sind. Da auch Actin in dem Paxillinpräzipitat nachweisbar war, läßt es sich vermuten, daß die kürzlich beschriebene indirekte Interaktion von CEACAM1 und dem Actin-Zytoskelett durch Paxillin vermittelt werden könnte (Sadekova, S. et al., 2000).

Die lange zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 ist essentiell für ihre Funktion als Tumorsuppressor (Hsieh, J:T et al., 1995, Luo, W. et al., 1997, Izzi, L. et al., 1999, Kunath, T. et al., 1995). Die Tyrosinreste (Tyr-488 und Tyr 515) der langen Form von zytoplasmatischer Domäne von CEACAM1 liegen in Sequenzmotiven, die einem "Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif" [ITAM] oder Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif"[ITIM] ähneln. Die Tyrosinreste in klassischen ITAM-Motiv werden schnell durch Proteintyrosinkinasen der SRC-Familie phosphoryliert und fungieren somit als Andockstelle für SH2-Domänen von Proteintyrosinkinasen der Syk-Familie. Da sowohl Paxillin als auch Integrin  $\beta_3$  aus Granulozytenextrakt durch die tyrosinphosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 aufgereinigt wurden, wurde vermutet, daß erstens die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 für diese Interaktion ausreichend und zweitens die Phosphorylierung des einen oder der beiden Tyrosinreste dafür erforderlich ist. Für die Bestätigung dieser Vermutung und Aufklärung derer strukturellen Basis wurden die rekombinant exprimierten und *in-vitro* tyrosinphosphorylierten CEACAM1<sub>cyt</sub>-Konstrukte für die Immunkomplex-studien eingesetzt.

Durch die Verwendung von rekombinanten CEACAM1<sub>cyt</sub>-Mutanten für die Kopräzipitationsversuche, bei denen jeweils einer oder beide Tyrosinreste ausgetauscht wurden, konnte weiter gezeigt, daß der phosphorylierte Tyrosinrest 488 in CEACAM1<sub>cyt</sub> für die Bindung an Paxillin sowie Integrin  $\beta_3$  essentiell ist. Diese Befunde weisen darauf hin, daß die Interaktion von Paxillin sowie Integrin  $\beta_3$  mit dem nativen CEACAM1 über die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 erfolgt und der Tyrosinrest 488 aber nicht Tyr-515 für diese

Assoziation erforderlich ist. Izzi et al. (1999) erwähnen, daß der wachstumshemmende Effekt von CEACAM1 in der Kolonkarzinom-Zelllinie CT51 von dem Tyr-488 abhängig ist.

Für weitere *in-vivo* Untersuchungen der Assoziation von CEACAM1 mit Paxillin sowie Integrin  $\beta_3$  auf Granulozyten, HT29-, und HUVEC-Zellen wurde die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) eingesetzt. So wurde die zelluläre und die relative Fluoreszenzintensität der Zellen festgestellt. Die Immunfluoreszenz von TRITC-markiertem mAb 4D1C2 (Rot) wurde für die Lokalisation von CEACAM1 und von FITC-markiertem mAb Paxillin bzw. mAb Integrin  $\beta_3$  für die Lokalisation von Paxillin bzw. Integrin  $\beta_3$  verwendet.

Somit konnte mittels (CLMS) auf Granulozyten und der koloepithelialen Karzinomzelllinie HT29 eine Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 mit Paxillin - nicht aber mit Vinculin oder Talin - an der Zellmembran bestätigt werden. Dabei konnte ein starkes membranassoziiertes granuläres Muster für CEACAM1 und eine diffuse Paxillinfärbung beobachtet werden. Darüber hinaus ergaben CLSM-Untersuchungen an endothelialen Zellen (HUVEC) eine hochpolare fast 100%ige Kolokalisation von CEACAM1 und Paxillin in Endothelzellen. Die Dynamik dieser polaren Kolokalisation vor, während und nach der Konfluenz der Zellen läßt eine funktionelle Rolle dieser CEACAM1-Paxillin Interaktion während der Angiogenese vermuten (Ebrahimnejad, A. et al. 2000).

Paxillin enthält multiple Bindungsstellen für Proteine wie z.B. FAK und Vinculin. Es dient als ein regulatorisches Multiadapterprotein, das die verschiedenen Regulator-, und Gerüstproteine in einem Signaltransduktionskomplex rekrutiert. Paxillin bindet die ECM-Liganden an das Aktin-Zytoskelett und ist daher für den Erhalt der Zellmorphologie, Motilität, Zellteilung, Zell-Zell-Kontakt sowie Zell-ECM-Kontakten wichtig (Brown, M.C. et al., 1996 & Turner, C.E. et al., 1998).

Hauck, C.R. et al. (1998) berichten über den Zusammenhang von CEACAM1 und eine Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts in Opa-vermittelter Bindung und Internalisierung auf Granulozyten. Sadekova, S. et al. (2000) haben ebenfalls die indirekte Assoziation von CEACAM1 und Aktin in Abhängigkeit der langen zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 festgestellt. Es ist daher wahrscheinlich, daß Paxillin als ein Multiadaptor-Protein für die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett zuständig ist.

Die Koexpression und Kolokalisation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  auf Granulozyten und der kolonepithelialen Karzinomzelllinie HT29 wurde ebenfalls mittels CLSM untersucht. Es konnte ein starkes Membran-assoziiertes granuläres Muster der jeweiligen Moleküle beobachtet werden. Bei HUVEC-Zellen wurde ebenfalls die Kolokalisation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  bzw. Paxillin nachgewiesen.

Die Untersuchungen der CEACAM1-Expression im Endometrium (Bamberger, A.M. et al., 1998, Bamberger, A.M. et al., 2000) ergaben den Nachweis einer spezifischen CEACAM1 Expression auf dem invasiven Trophoblasten während der Plazentaentwicklung. Da für Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine wichtige Funktion in der Invasion der maternalen Decidua durch die

fetalen Trophoblasten im ersten Trimenon nachgewiesen ist, wurden fetale Implantationsstellen mittels CLSM untersucht. Auch hier zeigte sich jeweils eine eindeutige Kollokalisierung von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  an der Invasionsfront der fetalen Trophoblasten. Diese Ergebnisse lassen eine funktionelle Rolle der CEACAM1- Integrin  $\beta_3$  Komplexe in der Fetusimplantation vermuten (Brümmer, J. et al., 2001).

In weiterführenden CLSM-Untersuchungen an Gewebeschnitten von CEACAM1-positiven primären Melanomen zeigte sich eine konzentrierte Kollokalisierung der CEACAM1- Integrin  $\beta_3$  -Komplexe an der Tumor-Stroma Grenzfläche von invadierenden Tumorzapfen. Für die funktionelle Relevanz der beschriebenen CEACAM1- Integrin  $\beta_3$ -Assoziation in der Invasion und Metastasierung von Melanomen spricht auch die Beobachtung, daß die CEACAM1- und  $\alpha_v\beta_3$ - Expression eindeutig mit der Metastasierung der Primärtumoren korreliert ist (Thies, A. et al., 2002).

Ferner ergibt die Zusammenschau der CLSM-Befunde an Zellen und Geweben folgende Befunde:

In konfluenten epithelialen Zellen (HT29) ist CEACAM1 sowohl mit Paxillin als auch Integrin  $\beta_3$  vorwiegend in Arealen des Zell-Zellkontaktes kollokalisiert. Diese Kollokalisierungen lassen sich nur teilweise - mittels Vinculinfärbung - Fokalkontakten zuordnen. Eine erhöhte Zelldichte führt bei diesen Zellen möglicherweise über eine Kontaktinhibition zu einer verminderten Koexpression und Kollokalisierung.

In migrierenden bzw. invadierenden Zellen (Melanom, invasiver Trophoblast) kollokalisiert CEACAM1 fast ausschließlich mit Integrin  $\beta_3$ . Obwohl die Aufklärung des exakten molekularen Mechanismus dieser Interaktion (direkt versus indirekt) weitere Untersuchungen erfordert, wird in der vorliegenden Arbeit die Hypothese formuliert, daß der Komplex aus CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  die Zellmigration fördert. Für Integrin  $\beta_3$  wurden als Vermittler bei der Zellmigration während Angiogenese (Petitclerc, E. et al., 1999) und Tumorerkrankung (Natali, PG. et al., 1997, Brooks, PC. et al., 1995) weitergehende Untersuchungen durchgeführt. Bezüglich der möglichen Rolle von CEACAM1 bei der Zellmigration oder dem „Zellspreading“ ist dagegen weniger bekannt. Es wird allgemein postuliert (Öbrink, B. et al., 1997), daß CEACAM1 zur Kontaktinhibition der Zellproliferation beiträgt und die Beweise dafür lieferten Singer BB. et al., (2000). CEACAM1 wurde nicht nur in epithelialen Geweben sondern auch in migrierenden Zellen wie z.B. aktivierten T-Zellen (Möller, M. et al., 1996) und Endothel-Zellen (Ergün, S. et al., 2000, Sawa, H. et al., 1994) gefunden. Im Gegensatz zu Epithel-Zellen steigert CEACAM1 die Proliferation in aktivierten T-Zellen (Kammerer, R. et al., 1998) und in Endothel-Zellen (Ergün, S. et al., 2000). Das weist auf spezifische Funktion von CEACAM1 hin.

Um die Invasion bzw. die Migration unter dem Einfluß vom CEACAM1 zu untersuchen und darüberhinaus die CLSM-Befunde (Melanom, invasiver Trophoblast) in einem Invasions-Assay zu testen, wurden im Rahmen einer Reihe von Vorversuchen das Invasions bzw. Migrationsverhalten von CEACAM1-positiven Zellen (stabiler Transfektant CHO-

CEACAM1 und die Zelllinie G361) sowie CEACAM1-negative Zellen (CHO- und die Zelllinie MV3) untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, daß CEACAM1-exprimierende Zellen in der Lage sind, das Matrigel viel stärker zu durchwandern als Zellen die nicht CEACAM1 exprimieren. Es ist wichtig zu erwähnen, daß dieses Invasionsverhalten durch CEACAM-mAb (12140-4) sowie CEACAM1-mAb (4D1C2) dosisabhängig sukzessiv reduzierbar ist, während die Kontrolle (Maus IgG) keine Wirkung auf die Invasion und / oder Migration der Zellen hat.

Die Existenz vielzelliger Organismen hängt davon ab, ob deren Zellen aneinander bzw. an einem einbettenden Füllmaterial haften. Die Adhäsion ist nicht nur für den Zusammenhalt der Gewebe oder Zellen samt der extrazellulären Matrix zuständig, sondern auch für die Steuerung von Prozessen wie z.B. während der Embryonalgenese für eine korrekte Entwicklung von Geweben und Organen und im ausgebildeten Organismus dann beispielsweise für die Blutgerinnung, Wundheilung und Infektionsbekämpfung. Eine Reihe von Krankheiten und insbesondere das maligne Wachstum hängt unmittelbar von dieser Prozesssteuerung ab. Trotz dieser zentralen Rolle in biologischen Abläufen ist die Adhäsion für die Zellen und der exakte Mechanismus wie diese so vielfältigen Effekte zustande kommen, noch nicht ausreichend verstanden. Erst vor etwa 20 Jahren wurden einige der extrazellulären Matrixmoleküle isoliert, an denen Zellen haften. Bestimmte Membranzmoleküle „Integrine“ spielen bei der Adhäsion selbst und bei vielen damit zusammenhängenden Phänomenen eine wichtige Rolle (Horwitz, A.F., 1998).

Die Abbildung (Abbildung 45) gibt am Beispiel der Integrine eine Idee wieder, wie komplex diese Regulationsvorgänge sein können.

Über die Fokalkontakte, an denen außer den Integrinen viele andere Moleküle beteiligt sind, wird ein hochgeordneter Komplex gebildet. Mit der Formierung von Fokalkontakten ordnet sich das innere Gerüst in einer Weise, daß die Zelle ihre runde, undifferenzierte Gestalt verliert und ihre Form verändert. Hierbei werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Die extrazellulären Faktoren, die Zellwachstum und die Differenzierung regulieren, binden oft an Zelloberflächenrezeptoren. Die Signale werden anschließend zum Nukleus transduziert, wo sie spezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren, die die entsprechende Gentranskription hervorrufen.

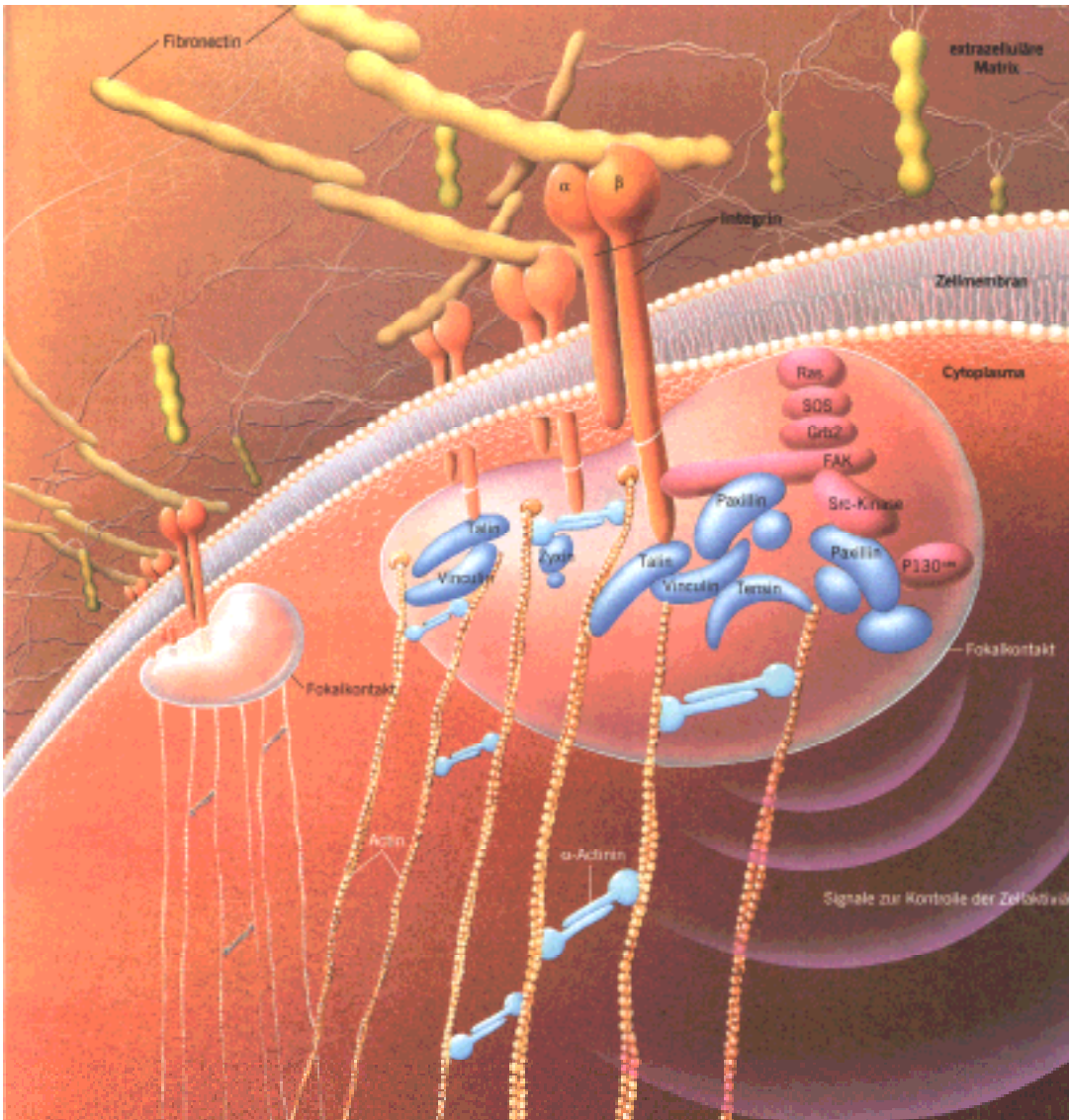


Abbildung 45: Schematische Darstellung der ECM und den entsprechenden Partnern (Horwitz, A.F., 1998)

Es sind eine Reihe linearer Signaltransduktionskaskaden bekannt und sie kommunizieren oft miteinander. Aber wo und wie sie sich treffen und ob das Ergebnis dieser Kommunikation ein verstärktes Signal („Synergy“) oder ein reduziertes Signal („Antagonism“) ist, ist noch nicht eindeutig klar.

Der Befund, daß CEACAM1 *in-vitro* und *in-vivo* mit der Tyrosinkinase Src assoziiert, war ein konkreter Hinweis auf die Signalfunktion von CEACAM1 (Brümmer, J. et al., 1995). Die Assoziation von Src und CEACAM1 beruht auf einer direkten Bindung der Src-Kinase an die zytoplasmatische CEACAM1 Domäne, da mit der rekombinant exprimierten und *in-vitro* phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne ebenfalls Src-Kinase kopräzipitiert wird. Die Src-Kinase bindet über eine einzelne Domäne, die Src-SH2-Domäne (SH2: Src homology module 2). Die Aktivität der Src-Kinase wird dabei über die intermolekulare Bindung der SH2-Domäne an CEACAM1<sub>cyt</sub> positiv reguliert. So könnte die Src-Kinase auf zweierlei sich nicht ausschließende Weisen aktiviert werden: Zum einen könnte eine Protein-Tyrosin-Phosphatase mit der Src-Kinase interagieren, indem sie das C-terminale Tyrosin

dephosphoryliert und somit zu einer Konformationsänderung und einer Autophosphorylierung führt, einem Ereignis, das für die Aktivierung wichtig ist [Caron et al., 1992]. Zum anderen könnten zwischen Protein-Tyrosin-Kinasen selbst Wechselwirkungen bestehen, die zu einer Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle in der *trans*-Position und somit wiederum zu Konformationsänderungen führen [Boerner et al., 1995]. Die vorliegende Arbeit liefert *in-vitro* und *in-vivo* Daten für die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  und Paxillin. Aufgrund der bekannten und den in dieser Arbeit gesammelten Daten wäre folgendes Modell vorstellbar:

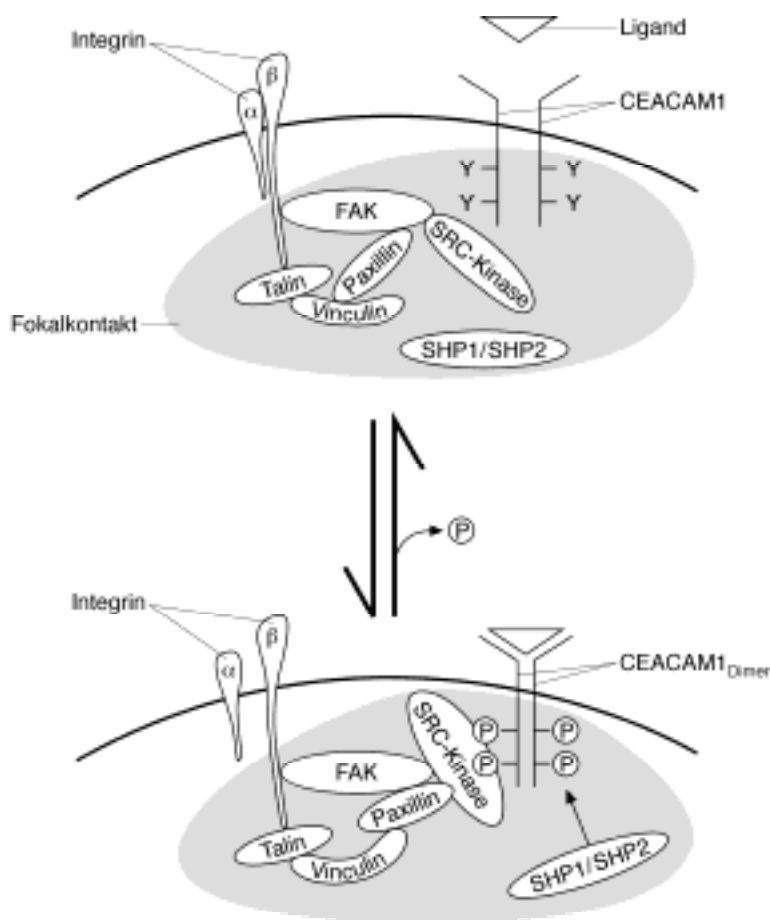


Abbildung 46: Modellvorstellung für die Interaktion von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  und Paxillin

Da die Assoziation von CEACAM1 mit Integrin  $\beta_3$  und Paxillin über die zyttoplasmatische Domäne von CEACAM1 erfolgt und außerdem die Phosphorylierung des Tyr-488 dafür erforderlich ist, könnte man von einem Inside-Out-Signaling sprechen. Eine Dephosphorylierung von CEACAM1 durch SHP 1/SHP 2 würde wahrscheinlich einen Gleichgewichtszustand herstellen.

Die Aktivierung der Integrine bzw. CEACAM1 durch z.B. einen Ligand würde die Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste der Proteine hervorrufen. Die phosphorylierten Reste dienen als Substrat für die Mobilisierung einer aktiven Signalkaskade. Das unmittelbare Resultat der Aktivierung des Protein-gekoppelten Enzyms ist die Aktivierung der

Kinasekaskade, die die Amplifikation der Signale somit zulässt. In jedem Fall ist das Endresultat der Kinasekaskade die modifizierte Transkription bestimmter Gene im Nukleus. Die Adhäsionsrezeptoren sind wegen ihrer Fähigkeit zur Kopplung der „Outside-in“ ,bzw. „Inside-Out“-Signale für die Aktivierung der intra-, bzw. interzellulären Signalkaskade notwendig. Fokale Adhäsionen bestehen aus heterodimeren, transmembranösen Matrixproteinen, bekannt als Integrine. Diese interagieren über ihre zytoplasmatischen Domänen mit einem Komplex von intrazellulären Proteinen und dem Aktin-Zytoskelett. Außerdem gibt es multiple Regulator-Proteine, wie z.B. Kinasen und Phosphatasen, die auf dieser Seite konzentriert sind und zur effizienten Transduktion von extrazellulären Signalen dienen. Diese Signale führen zur Modulation von Adhäsion und Genexpression. Trotz der vielen Bemühungen auf dem Gebiet der Signaltransduktion bleiben die elementaren Fragen - ob die individuellen Signalwege eine einheitliche oder redundante Änderung in Genexpressionsmuster induzieren, ob Signalwege, die eine nukleare Antwort auslösen, bevor sie den Nukleus erreichen, an einem bestimmten Punkt konvergieren oder als Alternative jeder Signalweg ein einheitliches Signal sendet - völlig offen. Die vorhandenen Modelle bzw. Befunde beschreiben lediglich eine Momentaufnahme des jeweiligen Zustandes. Nichtsdestotrotz erscheint die molekulare Charakterisierung der nachgewiesenen CEACAM1-Src, CEACAM1-Paxillin und CEACAM1-Integrin  $\beta_3$  Assoziation notwendig. Darüber hinaus ist es wichtig unter dem Einfluß der erwähnten Assoziationen die Zellmorphologie und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix zu untersuchen und vor allem das Invasionsverhalten unter diesen Aspekten präziser zu verfolgen.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Eine essentielle Funktion des humanen Cell-CAM-Homologs **CEACAM1** in diversen zellbiologischen Prozessen (z.B. epitheliale Lumenbildung, Carcinogenese, Bindung und Internalisierung mikrobieller Pathogene, Angiogenese) ist nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß CEACAM1 mit **Paxillin** (Ebrahimnejad, A. et al., 2000) und **Integrin  $\beta_3$**  (Brümmer, J. et al., 2001) über die zytoplasmatische CEACAM1-Domäne assoziiert.

*In vivo* konnten diese Interaktionen in verschiedenen Zellsystemen (Blut-, Epithel-, Endothelzellen) gesichert werden und darüber hinaus an Gewebeschnitten eine hochspezifische Kolo-kalisation von CEACAM1 und Integrin  $\beta_3$  in der Invasionsfront fetaler Trophoblasten sowie der Tumor / Stroma-Grenzfläche primärer Melanome gezeigt werden.

Zusammenfassend wurde aus unseren Befunden die Arbeitshypothese entwickelt, daß CEACAM1- über eine direkte Assoziation - die Funktion von Integrin  $\beta_3$  moduliert. Über den transmembranösen Signaltransfer und die subzelluläre Organisation des Zytoskeletts könnte damit CEACAM1 morphogenetische Effekte vermitteln. Diese könnte ein integratives Prinzip für alle bisher bekannten CEACAM1-Funktionen (angiogenetische Wirkung, epithelialer Morphoregulator, Tumorsuppressor, Effektor einer OPA-vermittelten Transzytose, Fetusimplantation) darstellen.

Die Interaktionen von CEACAM1 mit zwei essentiellen Proteinen fokaler Adhäsionsstellen (Paxillin und Integrin  $\beta_3$ ) sowie der Nachweis einer Bindung und Aktivierung von Tyrosinkinase der Src-Familie bzw. von Phosphatasen sollten die strukturellen Grundlagen sein für die verschiedenen postulierten Funktionen von CEACAM1 in der Zelladhäsion, Tumorentstehung und -progression, Angiogenese, Signaltransduktion und Opa vermittelten Internalisierung von Bakterien.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Bamberger, A.M., Riethdorf, L., Nollau, P., Naumann, M., Erdmann, I., Götze, J., Brümmer, J., Schulte, H.M., Wagener, C. & Löning, T. (1998). Dysregulated expression of CEACAM1 (BGP, C-CAM) an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am. J. Pathol.* 152, 1401-1406.

Bamberger, A.M., Sudahl, S., Löning, T., Wagener, C., Bamberger, C., Drakakis, P., Coutifaris, C. and Makrigiannakis, A. (2000). The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am. J. Pathol.* 156, 1165-1170.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammerström, S., et al. (1999). Redefined Nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.*, 25, 243-249.

Blum, H., H. Beier, and H. J. Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

Boerner, R.J., Kassel, D.B., Edison, A.M., and Knight, W.B. (1995). Examination of the Dephosphorylation reactions catalyzed by pp60<sup>c-src</sup> Tyrosine kinase explores the roles of autophosphorylation and SH2 Ligand binding. *Biochemistry* 34, 14852-14860.

Bos, M.P., Kuroki, M., Krop-Watorek, A., Hogan, D., Belland, R.J. (1998). CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains. *Proc Natl Acad Sci U-S-A.*, 95 (16) , 9584-9.

Brooks, PC., Strömbald, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, FH., Cheresh, DA.. (1995). Anti-integrin  $\alpha v \beta_3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest.* 96: 1815-1822.

Brümmer, J., Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Schumacher, U., Löning, T., Bamberger, A.M., and Wagener, C. (2001). Cis Interaction of the Cell Adhesion Molecule CEACAM1 with Integrin  $\beta_3$ . *Am. J. Pathol.* 159, 537-546.

Brümmer, J., Neumaier, M., Göpfert, C. & Wagener, C. (1995). Association of pp60<sup>c-src</sup> with biliary glycoprotein, an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11, 1649-1655.

Caron, L., Abraham, N., Pawson, T., and Veillette, A. (1992). Structural requirements for enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Mol Cell Biol.* 12(6), 2720-2729.

Clark, S.G., Stern, M. J., Horvitz, H. R., (1992). *C. elegans* cell-signaling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356: 340-344.

Damsky, CH., Librach, C., Lim, KH., Fitzgerald, ML., McMaster, MT., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, SK., Fisher, SJ. : Integrin switching regulates normal trophoblast invasion (1996). *Development* , 120: 3657-3666

- Damsky, CH., Fisher, SJ.: Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptor (1998). *Curr Opin Cell Biol*, 10: 660-666
- Ding, Y.-P., Remmers, E.F., Du, Y., Longmon, R.E., Goldmuntz, E.A., Zha, H., Kotake, S., Cannon, G.W., Griffiths, M.M., and Wilder, R.L., (1996). Genetics Maps of Polymorphic DNA Loci on Rat Chromosom 1. *Genomic* 36, 320-327.
- Dveksler, G.S., Dieffenbach, C.W., Cardellichio, C.B., McCuaig, K., Pensiero, M.N., Jiang, G.S., Beauchemin, N., Holmes, K.V. (1993). Several members of the mouse carcino-embryonic antigen-related glycoprotein family are funtional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.*, 67: 1-8.
- Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Unteregger, G., Wagener, C., Brümmer, J. (2000). Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 260, 365-373.
- Edlund, M. & Öbrink, B. (1994). Evidence for calmodulin binding to the cytoplasmatic domains of two C-CAM isoforms. *FEBS Letters*, 327, 90-94.
- Ergün, S. , Kilic, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P.,Götze, J.,Wurmbach, J.H., Horst, A. Weil, J. Malkanthi, F., Wagener, C. ( 2000 ). CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1): a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Molecular Cell*, 5, 311-320.
- Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.(1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry*, 15, 429
- Giorgio Berton, Carlo Laudanna, Claudio Sorio and Filippo Rossi (1992). Generation of signals activating Neutrophil functions by leukocyte Integrins.*The Journal of Cell Biology*, Vol.116, Number 4, 1007-1017
- Görg, A., W. Postel and S. Günther (1988). The current state of two-dimensional electrophotesis with pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546
- Guan, J.L., Trevthick, J.E. and Hynes, R.O. (1991). *Cell Regul.* 2, 951-964.
- Hammarström S., (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested funtions and expression in normal and malignant tissues. seminars in *CANCER BIOLOGY*, 9, 67-81
- Hsu, MY., Shih, DT., Meier, FE., Van Belle, P., Hsu, JY., Elder, DE., Buck, CA., Herlyn, M.:Adenoviral gene transfer of  $\beta_3$  integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma (1998). *Am J Pathol*, 153: 1435-1442
- Hauck, C.R., Meyer, T.F., Lang, F., Gulbins, E. (1998). CD66- mediated phagocytosis of Opa<sub>52</sub> Neisseria gonorrhoeae requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *The EMBO Journal* Vol. 17 No.2 pp 443-454 .

- Horwitz, A.F., (1998). *Spektrum der Wissenschaft*, Jan. 1998, 86-94.
- Hsieh, J.T., Luo, W., Song, W., Wang, Y., Kleinerman, D.I., Van, N.T. & Lin, S.H. (1995). Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res.* 55, 190-197.
- Huang, J., Hardy, J.D., Sun, Y., Shively, J.E. (1999). Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. *J. Cell Sci.* 112, 4193-4205.
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., Beauchemin, N. (1999). The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274 (1), 335-344.
- Izzi, L., Turbide, C., Kunath, T., Beauchemin, N. (1999). Cis-determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene*, 18: 5563-5572.
- Juliano, R.L. and Varner, J.A. (1993). Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 812-818.
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., von Kleist, S. (1998). Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur J Immunol* , 28: 3664-3674.
- Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C., Beauchemin, N. (1995). Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*, 11: 2375-2382.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., Pawson, T., (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins, *Science* 252: 668-674.
- Kyhse-Andersen J (1984). Electrophoretic transfer from multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins to nitrocellulose membranes. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leusch, H.G., Drzeniek, Z., Maros-Pusztai, Z., Wagener, C. (1991). Bindung of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect., Immun.*, 59, 20251-20257.
- Luo, W., Wood, C.G., Earley, K., Hung, M.C., Lin, S.H. (1997). Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains. *Oncogene* 14, 1697-1704.

Massimo Pignatelli and Wallter F. Bodmer (1988). Genetics and biochemistry of collagen binding-triggered glandular differentiation in a human colon carcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.85, pp. 5561-5565.

Milde-Langosch, K., Bamberger, AM., Methner, C., Rieck, G., Löning, T. (2000) : Expression of cell cycle regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/Kip1, p21/Waf1, cyclin D1 and cyclin E1 in breast cancer ; correlation with expression of activating protein-1 family members. *Int J Cancer* 87, 468-472

Möller, M., Kammerer, R., Grunert, F., von Kleist, S. (1996). Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell subpopulation. *Int J cancer*, 65:740-745.

Natali, PG., Hamby, CV., Felding-Habermann, B., Liang, B., Nicotra, MR., Di Filippo, F., Giannarelli, D., Temponi, M., Ferrone, S.: Clinical significance of  $\alpha(V)\beta_3$  integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions (1997). *Cancer Res*, 57: 1554-1560

Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985). *Elektrophoresis*, 6, 427-448

Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P. & Wagener, C. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10744-10748.

Nollau, P., Scheller, H., Kona-Horstmann, M., Rohde, S., Hagenmüller, F., Wagener, C., Neumaier, M. (1997). Expression of CEACAM1 (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res.* 57, 2354-2357.

Öbrink, B., (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 616-626.

Petitclerc, E., Strömblad, S., von Schalscha, TL., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, AM., Cheresch, DA., Brooks, PC. (1999). Integrin  $\alpha(v)\beta_3$  promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res*, 59: 2724-2730.

Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z. Helmchen, U., Löning, T., Wagener, C. (1996). CEACAM1 (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 44(1), 35-41.

Riethdorf, L., Lisboa, B.W., Henkel, U., Naumann, M., Wagener, C., Löning, T. (1997). Differential expression of CEACAM1 (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 957-963.

Sadekova, S., Lamarche-Vane, N., Li, X., & Beauchemin N. (2000). The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 65-77.

Sawa, H., kamada, K., sato, H., Sendo, S., Kondo, A., Saito, I., edlund, M., Öbrink, B. (1994). C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Dev Brain Res*, 78: 35-43.

Schägger, H., and G. Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

Schwartz, M.A., Schaller, M-D. and Ginsberg, M.H. (1995). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 549-599.

Shapiro, A.L., E. Vinuela and J.V. Maizel (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.

Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Ahmed, K., and Skubitz, A.P. (1995). Cd66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 155, 5382-5390.

Streichert, T., Ebrahimnejad, A., Ganzer, S., Flayeh, R., Wagener, C. and Brümmer, J. (2001). The Microbial Receptor CEACAM3 is linked to the Calprotectin Complex in Granulocytes. *Biochemical and Biophysikal Research Communications* 289, 191-197.

Tabibzadeh S., Babakian A. (1995). : The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaktion between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Hum Reprod*, 10: 1579-1602

Talamanti, M.S., M.S. Roh, S.A., Curley, G.E. Gallick (1993). Increase in activity and level of pp<sup>60SRC</sup> in progressive stages of human colorectal cancer. *J. Clin Invest* 91, 53.

Tanaka, K., Hindoa, Y., Takahashi, H., Sakamoto, H., Nakajima, Y., Imai, K. (1997). Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer* 74, 15-19.

Thies, A., Moll, I., Berger, J., Wagener, C., Brümmer, J., Schulze, H-J., Brunner, G. and Schumacher, U. (2002). CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the Development of Metastatic Disease. *Journal of Clinical Onkology*, Vol 20, 2530-2536.

Thompson, J.A., Grunert, F. & Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5, 344-366.

Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Watt, S.M. (1996). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol. Microbiol.*, 22, 941-950.

Virji, M. Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A., Watt, S.M., (2000). Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable haemophilus influenzae. *Mol. Microbiol.*, 36, 784-795.

Wagener, C.: *Molekulare Onkologie*, 2. Auflage, Thieme (1999) pp77-114.

Watt, S.M., Fawcett, J., Murdoch, S. J., Teixeira, A. M., Gschmeissner, S. E., Hajjibagheri, N.M.A.N. and Simson, P.L. (1994). CD66: Identifies the biliary Glycoprotein (BGP) Adhesion Molecule: Cloning, Expression, and Adhesion Functions of BGPc Splice Variant. *Blood* 84, 200-210.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-1272.

Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, HH., Shively, JE., von Kleist, S., Thompson, J., (1988). Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res* 48, 2550-2554

## 9 DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. W. Hofer (Fakultät für Biologie der Universität Konstanz) danke ich für die freundliche Betreuung meiner externen Dissertation.

Herrn Prof. Dr. C. Wagener danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für die Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die richtungsweisende Unterstützung meiner Arbeit und für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Jens Christian Brümmer danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeits-gruppe, die Überlassung des Dissertationsthemas und die exzellente wissenschaftliche Betreuung. Er stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Herzlichst gedankt sei Herr Dr. Thomas Streichert für die zahlreiche interessanten Gespräche und Diskussionen und für seine Unterstützung, die weit über das Fachliche hinausging.

Herrn Dipl. Chemiker Raid Flayeh danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit über die Jahre und viele anregende Diskussionen und Vorschläge.

Frau Sabine Wuttke danke ich ganz herzlich für ihre Hilfe bei der Erstellung zahlreicher Grafiken und Abbildungen.

Allen Mitarbeitern unseres Arbeitskreises für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, wobei ich besonders Frau Christa Frenz hervorheben möchte.