

Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
Leiter Prof. Dr. Werner Reutter  
Arbeitsgruppe PD Dr. Lothar Lucka

**Identifizierung und Charakterisierung  
neuer intrazellulärer Bindungspartner von CEACAM1-L  
und deren Einfluss auf CEACAM1-L-vermittelte  
zelluläre Funktionen**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

eingereicht von  
Esther Klaile aus Bremen  
Berlin, November 2005

1. Gutachter Prof. Dr. Werner Reutter
2. Gutachter Prof. Dr. Gerd Multhaup

Tag der Disputation: 8. Februar 2006

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
Zelladhäsion und Migration.....	8
Integrine und die extrazelluläre Matrix .....	9
GTPasen der Rho-Familie und fokale Adhäsionen.....	11
Epithelial-mesenchymale Transition und Zellstreuung.....	13
Cadherine und Melanomentstehung.....	14
Ig-CAMs und Tumorprogression.....	16
Die CEA-Proteinfamilie .....	17
CEACAM1: Struktur und extrazelluläre Interaktionen.....	199
CEACAM1: Funktionen.....	20
CEACAM1: Signaltransduktion und intrazelluläre Interaktionen.....	21
Filamin A: ein Gerüstprotein .....	23
Die kleine GTPase RalA.....	24
<b>Zielsetzung.....</b>	<b>26</b>
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
<b>I. Identifizierung intrazellulärer Interaktionspartner .....</b>	<b>27</b>
<b>II. CEACAM1-L interagiert funktionell mit Filamin A.....</b>	<b>32</b>
Charakterisierung des Filamin A-Yeast-Two-Hybrid-Klons.....	32
Herstellung des Filamin A-GST-Fusionsproteins für Bindungs-Assays.....	33
CEACAM1-L und Filamin A- interagieren direkt in Affinitätspräzipitationen.....	34
Messung und Berechnung der Bindungskonstanten der Interaktion zwischen CEACAM1-L und Filamin A durch SPR-basierte Analyse.....	36
CEACAM1 bindet Filamin A <i>in vivo</i> .....	38
Transfektion und Charakterisierung der M2- und A7-Melanomzellen.....	39
Die Expression von CEACAM1-L und Filamin A beeinflusst Invasion und Migration .....	42
Unterschiede im Migrations- und Invasionsverhalten beruhen nicht auf differenzieller Expression oder Funktionalität der Integrin-Untereinheiten $\beta 1$ , $\beta 3$ , $\alpha 3$ , $\alpha 6$ und $\alpha v$ .....	44
Filamin A verändert das Spreiten der Zellen und die Membranstabilität.....	46
CEACAM1-L und Filamin A beeinflussen den Wundschluss konfluenten Zellen .....	48
Die Expression von CEACAM1-L verstärkt das Streuverhalten ( <i>scattering</i> ) von Filamin A-defizienten Zellen .....	49
Koloniebildung in Softagar-3D-Kultur.....	51
Unterschiede in der Zellstreuung beruhen nicht auf E-Cadherin.....	52
Intrazelluläre CEACAM1- und Filamin A-Lokalisation.....	53

CEACAM1-Assoziation in Membranmikrodomänen in M2-CC1- und A7-CC1-Zellen.....	54
Lösliche CEACAM1-Fusionsproteine haben keinen Einfluss auf die Morphologie, Invasion und Migration von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen.....	55
CEACAM1 beeinflusst Wund-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts.....	56
A7-CC1-Zellen haben einen gestörten Turnover der fokalen Adhäsionen .....	57
Die Bindung von CEACAM1 an Filamin A ist dynamisch.....	60
CEACAM1-L hat keinen Einfluss auf die A-RalA-Aktivierung.....	61
Die Bindung von CEACAM1-L an Filamin A inhibiert die Filamin A-RalA-Interaktion .....	62
<b>III. CEACAM1-L interagiert mit Poldip2.....</b>	<b>64</b>
Charakterisierung des Yeast-Two-Hybrid-Poldip2-Klons .....	64
Charakterisierung von Poldip2 auf RNA-Ebene.....	66
Herstellung des Poldip2-GST-Fusionsproteins für Bindungsassays.....	68
CEACAM1-L und Poldip2 interagieren direkt in Affinitätspräzipitationen .....	69
Messung und Berechnung der Bindungskonstanten der Interaktion zwischen CEACAM1-L und Poldip2 durch SPR-basierte Analyse .....	70
Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen Poldip2.....	72
CEACAM1 interagiert mit Poldip2 <i>in vivo</i> .....	74
Poldip2-Lokalisation im Zytoplasma und im Kern von RBE-Zellen.....	75
Die intrazelluläre Verteilung von Poldip2 in NBT-II-Zellen wird durch den Grad der Konfluenz verändert .....	77
Der Verlust der CEACAM1-Expression hat keinen Einfluss auf die Kern-Zytosol-Verteilung von Poldip2 in NBT-II-Zellen.....	78
Poldip2-Lokalisation in NBT-II-Zellen.....	79
<b>IV. CEACAM-Fc-Fusionsproteine.....</b>	<b>82</b>
Klonierung und Expression.....	82
mCC1-ExD-Fc bindet Ratten-CEACAM1 auf der Zelloberfläche.....	84
Der Fc-Anteil beeinflusst die Bindungskapazität von Fc-Fusionsproteinen .....	85
<b>V. Suche nach CEACAM1-Zielgenen mittels cDNA-Arrays .....</b>	<b>86</b>
<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
CEACAM1 und Filamin A beeinflussen Integrin-abhängige Signale .....	90
Filamin A beeinflusst die Membranstabilität von Zellen .....	92
CEACAM1-L und Filamin A verändern die Regulation von kleinen GTPasen .....	93
CEACAM1-L bindet Filamin A Phosphorylierungs-unabhängig.....	95
CEACAM1 beeinflusst die Tumorprogression und Zellstreuung.....	96
Poldip2 und seine intrazelluläre Lokalisation.....	99
Kann Poldip2 als Signalprotein funktionieren? .....	102
Kann Poldip2 die Wachstums-regulierende Eigenschaft von CEACAM1 vermitteln?.....	103

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>104</b>
<b>Summary</b> .....	<b>106</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>108</b>
<b>Material</b> .....	<b>108</b>
Chemikalien und Zellkulturmaterial.....	108
Geräte.....	108
Antikörper .....	108
Oligonukleotide und Matrizen-cDNA.....	109
Vektoren.....	112
<b>Methoden</b> .....	<b>112</b>
<b>Molekularbiologische Methoden (DNA und RNA)</b> .....	<b>112</b>
Plasmid-Präparation.....	112
DNA-verändernde Enzyme.....	113
PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	114
Sequenzierung .....	114
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	115
Agarosegel-Elektrophorese.....	115
Elution von DNA aus dem Agarosegel .....	116
RNA Isolierung (Gesamt-RNA) mit RNazol.....	116
Reverse Transkription von RNA (Erststrang-cDNA-Synthese) .....	116
Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA .....	117
cDNA-Array-Analyse.....	118
Bakterienstämme, Kultivierung und Transformation.....	120
<b>Yeast-Two-Hybrid-Methoden</b> .....	<b>121</b>
Hefestämme und allgemeine Kulturbedingungen .....	121
Transformation von Hefen nach der Lithium-Acetat-Methode .....	122
Yeast-Two-Hybrid-Screen und Selektion von positiven Klonen.....	123
Quantitativer $\alpha$ -Galaktosidase-Assay (MEL1 Reportergenaktivität).....	124
Filter-Lift-Assay ( $\beta$ -Galaktosidase, lacZ Reportergenaktivität) .....	124
<b>Zellbiologische Methoden für Säugerzellen</b> .....	<b>125</b>
Zelllinien, Primärzellen, allgemeine Zellkulturbedingungen und Transfektion .....	125
Proliferations-Assays.....	126
Adhäsions-Assays und morphologische Untersuchungen.....	127
Koloniebildungs-Assays (2D und 3D) .....	128
Chemotaktischer Transwell-Invasions-Assay.....	128
Chemotaktischer Transwell-Migrations-Assay (Boyden-Chamber).....	129
Monolayer-Wundheilungs-Assay.....	129
Durchflusszytometrie/FACS ( <i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i> ) .....	130
Indirekte Immunfluoreszenz (Epifluoreszenz und konfokale Aufnahmen) .....	130

<b>Herstellung von Fusionsproteinen .....</b>	<b>131</b>
GST-Fusionsproteine: Klonierung .....	131
GST-Fusionsproteine: Expression.....	132
GST-Fusionsproteine: Aufarbeitung der Zellpellets und Reinigung .....	133
His-Fusionsproteine.....	133
CEACAM-Fc-Fusionsproteine: Klonierung .....	133
CEACAM-Fc-Fusionsproteine: Expression und Reinigung.....	135
<b>Protein-Biochemische Methoden .....</b>	<b>135</b>
Herstellung von Zell- und Leberlysaten .....	135
Herstellung von Natriumorthovanadat- und Pervanadat-Lösungen.....	136
Kern-Zytosol-Trennung .....	136
Affinitätspräzipitationen .....	137
Immunpräzipitationen.....	137
RalA-Aktivierungs-Assay und Affinitätspräzipitationen von Filamin A.....	137
Isopyknische diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten- Ultrazentrifugation zur Isolierung von Membranmikrodomänen.....	138
Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	138
SDS-PAGE nach Laemmli .....	139
Tricin-SDS-PAGE.....	139
Färbung von Protein-Gelen.....	139
Western-Blot .....	140
Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran .....	140
ELISA (Enzyme Linked Immuno Adsorbent Assay).....	141
SPR (Surface Plasmon Resonance)-Analyse (BIAcore) .....	141
Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS ( <i>Matrix-Assisted         Laser-Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> ) .....	142
<b>Literatur .....</b>	<b>144</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>155</b>
<b>cDNA-Sequenzen der Yeast-Two-Hybrid-Klone.....</b>	<b>155</b>
<b><i>Multiple Cloning Sites</i> der benutzten Vektoren .....</b>	<b>156</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>160</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>163</b>
<b>Förderung .....</b>	<b>164</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>165</b>