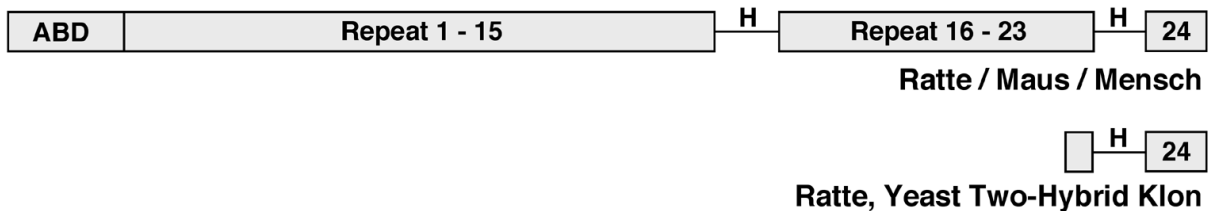


II. CEACAM1-L interagiert funktionell mit Filamin A

Charakterisierung des Filamin A-Yeast-Two-Hybrid-Klons

Der im Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundene Klon #73 kodiert die 187 Carboxy-terminalen Aminosäuren des Ratten-Filamin A (Aminosäuren 2460-2647). Er beinhaltet somit 59 Aminosäuren des Filamin-Repeat 23, die zweite Hinge-Region und den kompletten Filamin-Repeat 24. Die Sequenz des Klonen #73 stimmt mit der veröffentlichten Sequenz von Ratten-Filamin überein (Acc.-Nr. XM_238167).

A



B

```

Ratte  GACCTTTCGGTTACCATTGATGGCCCTCCAAGGTGAAGATGGATTGCCAGGAGTGCCCTGAGGGCTACCGTGTACCTATACCCCATG
Maus   "C"
Mensch "C"
Ratte  TATGGTGGCCCTATCACATTGGGGGAAGCCCTTCAAAGCCAAGGTCACAGGTCCCGTGCACCTGGCAGCTACCTCATCTCCATCAAG
Maus   "T"
Mensch "C"
Ratte  CTGTGTAGCAACCACAGCCTCCATGAGACATCATCTGTGTTGTGGACTCTCTGACTAAAGTGTACTGTCCCCAGCATGCAACCTCA
Maus   "A"
Mensch "C"
Ratte  GTAGCCAAAGGCTGGGGCTAAGCAAAGCTTATGTAGGCCAGAAGAGCAACTTCACAGTAGGCCAGGCTCCTGCTGATGTCAGCAAGGTA
Maus   "G"
Mensch "G"
Ratte  GATTGCAGCAAAGCAGGTAACAACATGTTGCTGGTGGCGTGCATGGCCCAAGGACACCCTGTGAAGAGATCCTGGTGAAACACATGGGC
Maus   "C"
Mensch "C"
Ratte  AAAGACAAAGGGGAATACACATTGGTGGTCAAGTGGGGTGATGAGCATATCCAGGCAGCAGTCGCCTCTATAGTGTCTCCTACCTGCTC
Maus   "G"
Mensch "G"
Ratte  CCATACCGCATTATGGTGCCCTGAGCTTG
Maus   "A"
Mensch "C"

```

Abb. 11: Der Filamin A-Yeast-Two-Hybrid-Klon. (A) Schematische Darstellung von Filamin A und von dem im Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundenen C-terminalen Fragment des Homologes aus der Ratte. (ABD = Aktin-Bindungsdomäne; H = Hinge-Region; 1 bis 24 = Filamin-Repeats). (B) Sequenzvergleich des im Yeast-Two-Hybrid Screen gefundenen Ratten-Filamin A-Fragmentes mit den homologen Regionen aus Maus und Mensch.

Filamin A ist hochkonserviert und die Sequenzen aus der Ratte und der Maus, aber auch des humanen Filamin A, gleichen sich vor allem im kodierenden Bereich (Abb. 11B). Der Grad der Konservierung auf mRNA-Ebene ist mit 96% im Vergleich Ratte/Maus (Acc.-Nr. Q8BTM8) und 87% im Vergleich Ratte/Human (Acc.-Nr. NP_001447) sehr hoch. Auf Aminosäure-Ebene gleichen sich Ratte und Maus im Bereich der hier abgebildeten Sequenz sogar zu 100%, während sich Ratte und Mensch zu 93% gleichen.

Herstellung des Filamin A-GST-Fusionsproteins für Bindungs-Assays

Um festzustellen, ob die gefundene Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne der langen CEACAM1-Isoform und dem C-Terminus von Filamin A direkt oder indirekt war, wurden Affinitätspräzipitationen und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-basierte ("BIAcore"-) Messungen durchgeführt. Hierfür wurden gereinigtes Filamin A und CEACAM1-L sowie Kontrollproteine benötigt. Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L und ein Kontrollprotein wurden von Mario Müller (AG Lucka, Berlin) als His-Fusionsproteine in hochreiner Form zur Verfügung gestellt (Abb. 12A) [Budt et al., 2002b].

Um die Reinigung des Filamin A und eine spätere Anwendung zu erleichtern, wurde die Filamin A-cDNA des Klons #73 im richtigen Leserahmen in den Vektor pGEX4T kloniert und als Fusionsprotein mit GST (Glutathionthioferase)-Tag exprimiert (Abb. 12A). Die Klonierung sowie die verwendeten Schnittstellen sind detailliert im Material-und-Methoden-Abschnitt aufgeführt. Der GST-Fusionsanteil umfasst ca. 26 kDa, der Filamin-Anteil ca. 21 kDa. Daraus ergibt sich für das Fusionsprotein GST-FLNa eine Größe von ca. 47 kDa. Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21-Star genutzt.

Da bei einer Expression nach dem Standardprotokoll das Fusionsprotein in Form von nicht löslichen Einschlüssen im Zellpellet verblieb, wurden zunächst die optimalen Expressionsbedingungen ausgetestet. Die Verwendung von Detergenz im Lysepuffer erhöhte die Ausbeute nicht (Abb. 12B), so dass bei der Reinigung darauf verzichtet wurde. Eine Expression bei verringerter Temperatur mit verstärktem Schütteln und kürzerer Induktionszeit ergab dann eine Verschiebung zu vorwiegend löslichen Fusionsproteinen. Die Reinigung erfolgte wie im Material-und-Methoden-Abschnitt beschrieben über Glutathion-Sepharose-Säulen (Abb. 12C). Außerdem wurde als Kontrollprotein der GST-Fusionsanteil alleine exprimiert und gereinigt (ohne Abbildung).

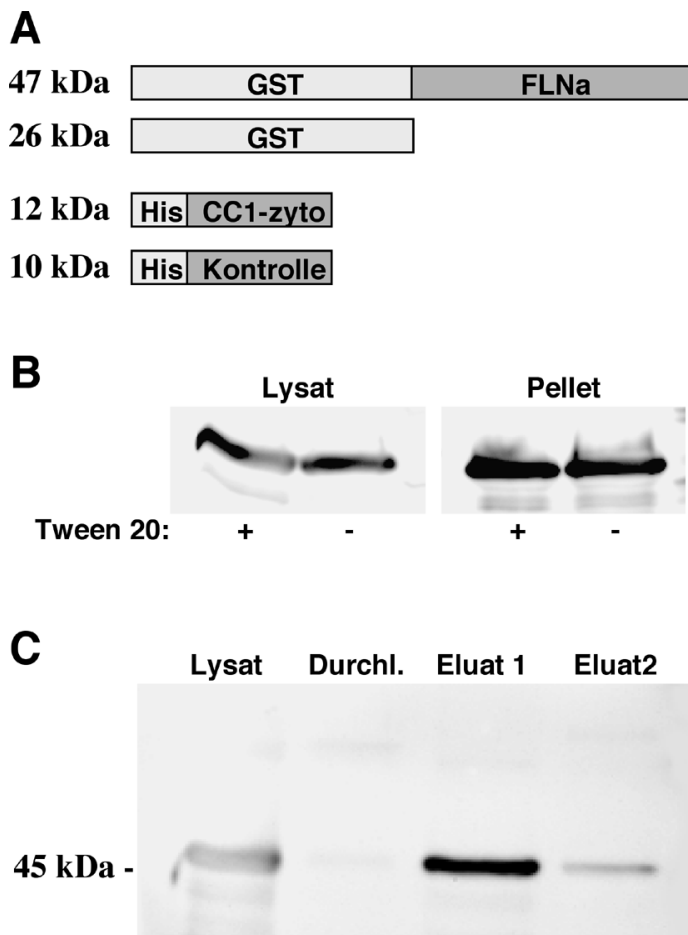


Abb. 12: Reinigung von GST-FLNa. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine "GST-FLNa", "GST", "CC1-zyto-His" und "Kontroll-His". (B) GST-FLNa-transfizierte *E. coli* wurden mit oder ohne 1% Tween 20 im Lysepuffer aufgebrochen und abzentrifugiert. Von den Überständen ("Lysat") wurden je 30 µg Protein/Spur aufgetragen. Die Pellets wurden in 100 µl Probenpuffer aufgeköcht und davon je 10 µl aufgetragen. Blot: anti-GST. (C) Lysate von GST-FLNa-exprimierenden Bakterien wurden über Glutathion-Sephrose-Säulen gereinigt. Es wurden 30 µg Protein/Spur der Lysate bzw. 40 µl des Durchlaufs und der Eluate 1 und 2 aufgetragen. Blot: anti-GST.

CEACAM1-L und Filamin A- interagieren direkt in Affinitätspräzipitationen

Zunächst wurden die beiden gereinigten Komponenten GST-FLNa und CC1-zyto-His für Affinitätspräzipitationen eingesetzt. Dazu wurden GST-FLNa sowie als Kontrolle GST an Glutathion-Sephrose gebunden. Die immobilisierten Proteine wurden dann mit CC1-zyto-His bzw. mit His-getagtem Kontroll-Fusionsprotein inkubiert. Der zytoplasmatische Teil von CEACAM1 (CC1-zyto), welcher auch im Yeast-Two-Hybrid-Assay als Köder diente, wurde in der Affinitätspräzipitation nur durch GST-FLNa, nicht aber durch GST gebunden (Abb. 13A). Keines der beiden GST-Konstrukte hat das Kontrollprotein gebunden.

Die Affinitätspräzipitation *vice versa* mit immobilisierten His-getagten Proteinen durchzuführen war nicht möglich, da alle GST-Konstrukte Interaktionen mit der Nickel-NTA-Matrix zeigten und gebunden wurden (ohne Abbildung). Auch eine Präinkubation der Nickel-NTA-Sephrose mit GST zur Sättigung konnte die direkte Bindung der GST-Konstrukte nicht ganz verhindern (ohne Abbildung).

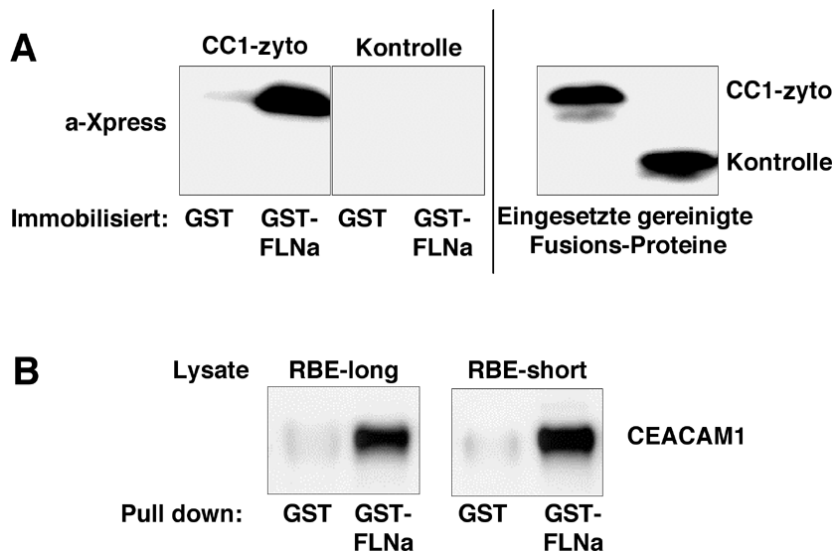


Abb. 13: CEACAM1

bindet Filamin A direkt.

(A) Affinitätspräzipitation von CC1-zyto-His oder Kontroll-His durch immobilisiertes GST-FLNa bzw. GST. Blot: anti-Xpress. Rechts: eingesetzte His-Fusionsproteine. (B) Affinitätspräzipitation von CEACAM1-L und CEACAM1-S aus RBE-Zelllysate durch immobilisiertes GST-FLNa bzw. GST. Blot: Be9.2 (anti-CEACAM1).

Außerdem konnte eine Bindung von CEACAM1 aus Zelllysaten durch GST-FLNa mittels Affinitätspräzipitationen gezeigt werden. Es wurden verschieden transfizierte RBE-Zellen (*Rat Brain Endothelial cells*) verwendet. RBE-Zellen sind endothelialen Ursprungs und exprimieren zunächst auch CEACAM1. Diese Expression geht jedoch in der Zellkultur während der ersten Passagen verloren, so dass die Zellen mit den Konstrukten CEACAM1-L (lange Isoform) und CEACAM1-S (kurze Isoform) transfiziert wurden [Müller et al., 2005]. Für die Affinitätspräzipitation wurden GST und GST-FLNa an Glutathion-Sepharose gebunden und mit den Zelllysaten RBE-CEACAM1-long bzw. RBE-CEACAM1-short inkubiert. Beide CEACAM1-Isoformen wurden durch GST-FLNa, nicht aber durch GST alleine gebunden (Abb. 13B).

Ob die Bindung an CEACAM1-S indirekt über im Zelllysate vorhandene Adapterproteine, wie z.B. Aktin, vermittelt wurde oder ob eine direkte Bindung der kurzen Isoform vorlag, ist noch unklar.

Messung und Berechnung der Bindungskonstanten der Interaktion zwischen CEACAM1-L und Filamin A durch SPR-basierte Analyse

Um die in den Affinitätspräzipitationen gefundene direkte Interaktion von CEACAM1-L und Filamin A zu bestätigen und um eine quantitative Aussage über die Bindung zu erhalten, wurden Oberflächen-Plasmon-Resonanz-(SPR-) basierte Messungen der Bindung mit einem BIAcore-2000-Gerät durchgeführt. Dazu wurde die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L (CC1-zyto-His) und als Kontrolle die zytoplasmatische Domäne von α 3-Integrin (α 3-zyto-His) auf einem CM5-Chip immobilisiert. Das gereinigte α 3-zyto-His-Fusionprotein wurde von Diana Mutz (Berlin, AG Danker) zur Verfügung gestellt. Verschiedene Konzentrationen von GST-FLNa wurden appliziert und deren Bindung an die beiden immobilisierten Proteine gemessen.

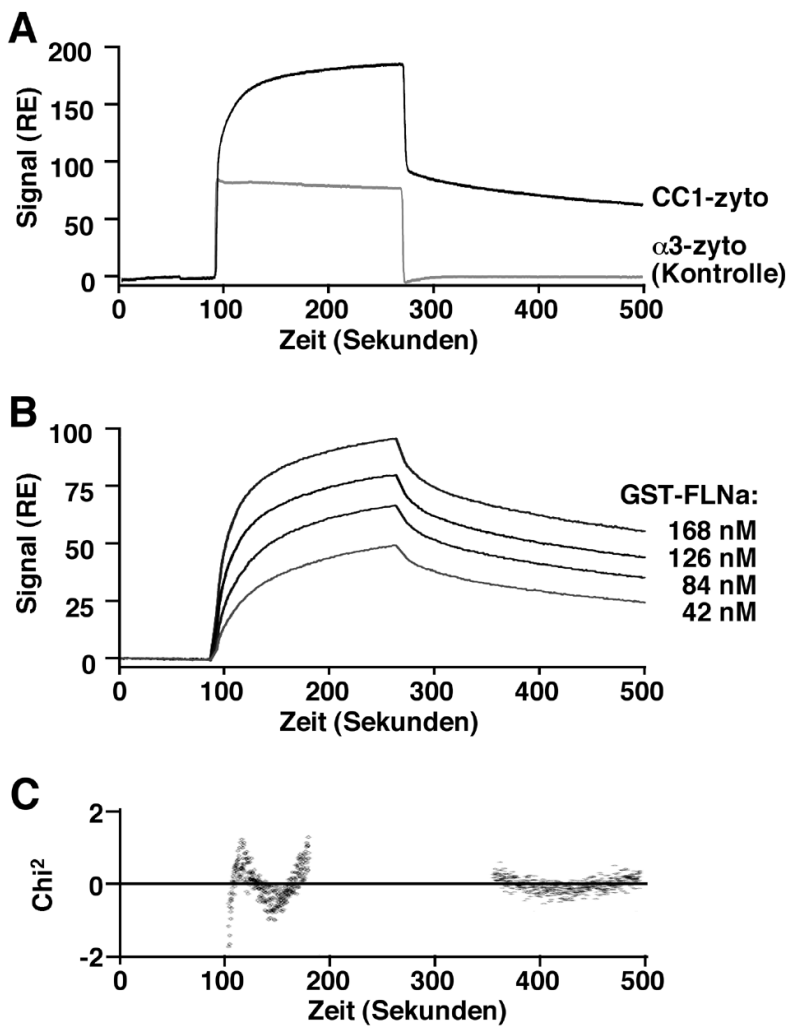


Abb. 14: Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Bindungskinetiken vom Filamin A–C-Terminus (GST-FLNa) an die immobilisierte zytoplasmatische Domäne der langen CEACAM1 Isoform (CC1-zyto-His).

(A) Primäre Sensogramme der Echtzeit-Bindung von 168 nM GST-FLNa an die CC1-zyto-His beschichtete Durchflusszelle, bzw. an die α 3-zyto-His beschichtete Kontrolldurchflusszelle. (B) Repräsentative Sensogramme der Echtzeit-Bindung verschiedener Konzentrationen von GST-FLNa an CC1-zyto-His mit abgezogenem Hintergrund (entsprechende Werte der Kontrollzelle). RE: Relative Einheit (C) Abweichungen der Sensogramme aus (B) im Vergleich zu den theoretischen Sensogrammen

einer 1:1 Langmuir-Bindung mit entsprechenden Molekulargewichten und Konzentrationen, dargestellt als χ^2 . Die gezeigten Abweichungen umfassen die für die Berechnungen der Bindungskonstanten k_{on} und k_{off} verwendeten Bereiche 100 s bis 200 s und 350 s bis 500 s auf der X-Achse.

Die primären Sensogramme für die Bindung von 168 nM GST-FLNa an CC1-zyto und an die Kontrolle sind in Abb. 14A dargestellt. Der spontane Anstieg des Signals bei Beginn der Injektion (bei 100 s), der auch in der Kontrollzelle zu erkennen ist, ist auf den so genannten Puffersprung zurückzuführen, d.h., die Inhaltsstoffe des GST-FLNa-haltigen Puffers haben unabhängig von einer Bindung diesen Einfluss auf die Messung. Wie nach Ende der Injektion bei 280 s gut zu erkennen ist, war keinerlei Bindung an die Kontrollzelle meßbar und das Sensogramm geht auf die Null-Linie zurück, während das Sensogramm der CC1-zyto-beschichteten Zelle eine deutliche Bindung zeigt.

In Abb. 14B sind die Sensogramme für die Bindungskinetik von 42, 84, 126 und 168 nM GST-FLNa mit abgezogenem Hintergrund abgebildet. Diese Sensogramme wurden mithilfe der BIAevaluation-Software aus den primären Sensogrammen der Kontrollzelle und der mit CC1-zyto beschichteten Zelle berechnet. Die Sensogramme der Kinetik zeigen eine Konzentrations-abhängige Bindung von GST-FLNa an CC1-zyto. Eine Sättigung der Bindung wurde nicht erreicht.

Die Berechnung der Bindungskonstanten erwies sich als kompliziert, da die Bindung nicht ganz der Gleichung nach Langmuir ('1') folgt. Dies bedeutet, dass das Sensogramm im Bereich von 200 s bis 350 s nicht einer 1:1-Bindung entspricht. Die Ursache hierfür könnte einerseits eine zweite Bindungsstelle sein, andererseits könnte eine Multimerisierung des Liganden, also eine Mischung verschiedener, unterschiedlich großer Komplexe, ebenfalls eine Abweichung des Sensogramms vom 1:1-Modell zur Folge haben. GST-FLNa liegt wahrscheinlich nicht homogen vor, da das Fusionsprotein die Dimerisierungsdomäne von Filamin A im Repeat 24 beinhaltet und auch GST häufig Multimere bildet [Lederer und Boger, 2005].

Benutzt man die Sensogramme nur innerhalb der Bereiche 100 s bis 200 s und 350 s bis 500 s auf der X-Achse zur Berechnung der Bindungskonstanten, so zeigen diese Bereiche hochsignifikante Übereinstimmungen mit dem Langmuir-Modell einer 1:1 Bindung. Die sehr geringen Abweichungen sind als χ^2 in Abb. 14C dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei der Assoziation, nicht aber in der Dissoziation, ein systematischer Fehler in der Abweichung auftritt. Von allen in der BIAevaluation-Software vorgegebenen Bindungsmodellen kam im ausgewählten Bereich die 1:1-Bindung unseren Messungen am nächsten. Die Berechnungen ergaben folgende Werte für die Bindung von GST-FLNa an CC1-zyto:

$$k_{\text{on}} = 2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\chi^2=0,25)$$

$$k_{\text{off}} = 1,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \quad (\chi^2=0,03)$$

$$K_D = 6,5 \times 10^{-9} \text{ M} \quad (K_A = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1})$$

Diese Werte liegen im Bereich von anderen Interaktionen von CEACAM1, die durch SPR-basierte Messungen bestimmt wurden, wie z.B. die Bindung an Calmodulin und Annexin [Edlund et al., 1996; Kirshner et al., 2003]. Auch für Filamin A wurden ähnliche Werte für die Bindung an FAP52 (*Focal Adhesion associated Phosphoprotein 52*) bestimmt [Nikki et al., 2002].

CEACAM1 bindet Filamin A *in vivo*

Um die Interaktion von CEACAM1 und Filamin A *in vivo* zu bestätigen, wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt. Zelllysate von RBE-CEACAM1-L, RBE-CEACAM1-S und RBE-Y488,515F (einer nicht mehr tyrosinphosphorylierbaren CEACAM1-long-Mutante) wurden mit Protein-G-Sepharose gekoppeltem Be9.2 (anti-CEACAM1) oder IgG-Kontrollantikörper inkubiert. Um eine indirekte Interaktion via Aktin auszuschließen, war im Lysepuffer außerdem Cytochalasin D und DNaseI enthalten.

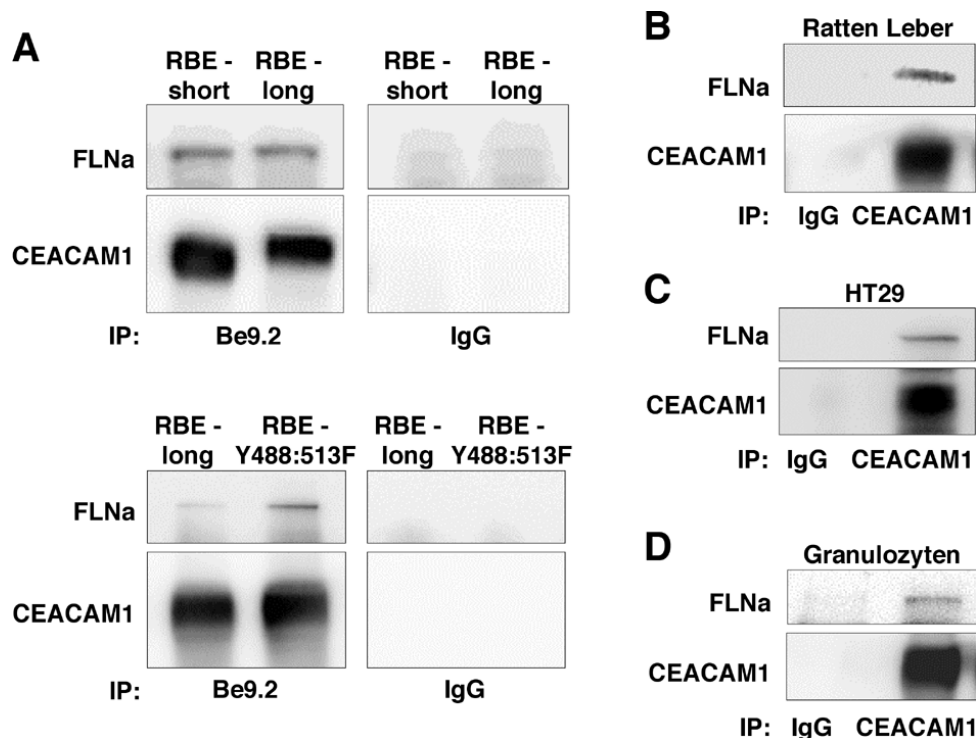


Abb. 15: Koimmunpräzitationen von Filamin A durch CEACAM1. Zelllysate von RBE-CEACAM1-L, RBE-CEACAM1-S und RBE-Y488,515F (A) oder Rattenleberlysat (B) wurden mit Be9.2 oder IgG-Kontrollantikörper präzipitiert. Blot: FLMN01 (anti-Filamin) und Be9.2 (anti-Ratten-CEACAM1). Lysate von humanen HT29 Zellen (C) und von frisch präparierten, adhärenen, humanen Granulozyten (D) wurden mit 4/3/17 (anti-human CEACAM1) oder IgG-Kontrollantikörper präzipitiert. Blot: FLMN01 und 4/3/17.

Alle drei CEACAM1-Konstrukte zeigten eine Kopräzipitation von Filamin A, während die Filamin A-Bande in keiner der Kontrollreaktionen zu erkennen ist (Abb. 15A). Somit scheint auch *in vivo* nicht nur die lange, sondern auch die kurze CEACAM1-Isoform Filamin A zu binden. Die Kopräzipitation durch die Tyrosin-Doppelmutante beweist außerdem, dass die Bindung der langen Isoform tatsächlich unabhängig von Tyrosinphosphorylierungen stattfindet. Dies stimmt mit den Daten aus Affinitätspräzipitationen und BIAcore-Messungen überein, die mit aus Bakterien gereinigten und somit wahrscheinlich nicht phosphorylierten Proteinen durchgeführt wurden.

Die Kopräzipitation aus Rattenleberlysate zeigt, dass die Bindung auch im endogenen Ratten-System vorhanden ist (Abb. 15B). Außerdem konnte die Interaktion in endogen exprimierenden humanen Zellen gezeigt werden. Der mit humanem CEACAM1 reaktive Antikörper 4/3/17 zeigte eine Kopräzipitation von Filamin A aus der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 (Abb. 15C) und aus frisch isolierten, adhärenenten, humanen Granulozyten (Abb. 15D). In allen Experimenten betrug die Menge des kopräzipitierten Filamin A ca. 0,5% bis 1,5% des gesamten Filamin A-Gehaltes. Dies stimmt mit den Daten über andere Interaktionspartner (außer F-Aktin) überein, welche nur eine kleine Fraktion des Filamin A binden [Marti et al., 1997; Ohta et al., 1999].

Transfektion und Charakterisierung der M2- und A7-Melanomzellen

Um funktionelle Aspekte der CEACAM1-FLNA-Interaktion untersuchen zu können, wurde ein gut etabliertes humanes Melanom-Zellsystem benutzt. Die M2-Zellen wurden von C.C. Cunningham *et al.* bei einem Screen nach Melanomzellen mit spontanem Verlust der Filamin A-Expression entdeckt [Cunningham et al., 1992]. Aus M2-Zellen wurden durch Transfektion mit Filamin A-cDNA A7-Zellen generiert. Die Reexpression von Filamin A führte zu einer Erhöhung der zuvor stark eingeschränkten Migration der M2-Zellen. Beide Zelllinien wiesen keine Expression von CEACAM1 auf, wie durch FACS- und Western-Blot-Analyse sowie mittels RT-PCR gezeigt wurde (Abb. 16A, B, C).

FACS-Analysen zeigten außerdem, dass kein anderes membranverankertes Mitglied der CEA-Proteinfamilie exprimiert wird (Abb. 16D). Weder transmembranäres CEACAM3 und CEACAM4 noch GPI-verankertes CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 wurden detektiert. M2- und A7-Zellen wurden stabil mit humaner CEACAM1-4L-cDNA transfiziert und zweimal subkloniert. Die resultierenden Zelllinien wurden M2-CC1 und A7-CC1 benannt. Die für die weiteren Versuche verwendeten Klone zeigten eine ähnliche Oberflächen- und Gesamtexpression der langen CEACAM1-Isoform, wie durch FACS-

Analyse (Abb. 16A) und Western-Blot (Abb. 16B) gezeigt wurde. Im Western-Blot migrierte CEACAM1-long als diffuse Bande von ungefähr 130 kDa. Die benutzten A7-CC1-Klone und die parentalen A7-Zellen exprimieren ähnliche Mengen Filamin A (Abb. 16B).

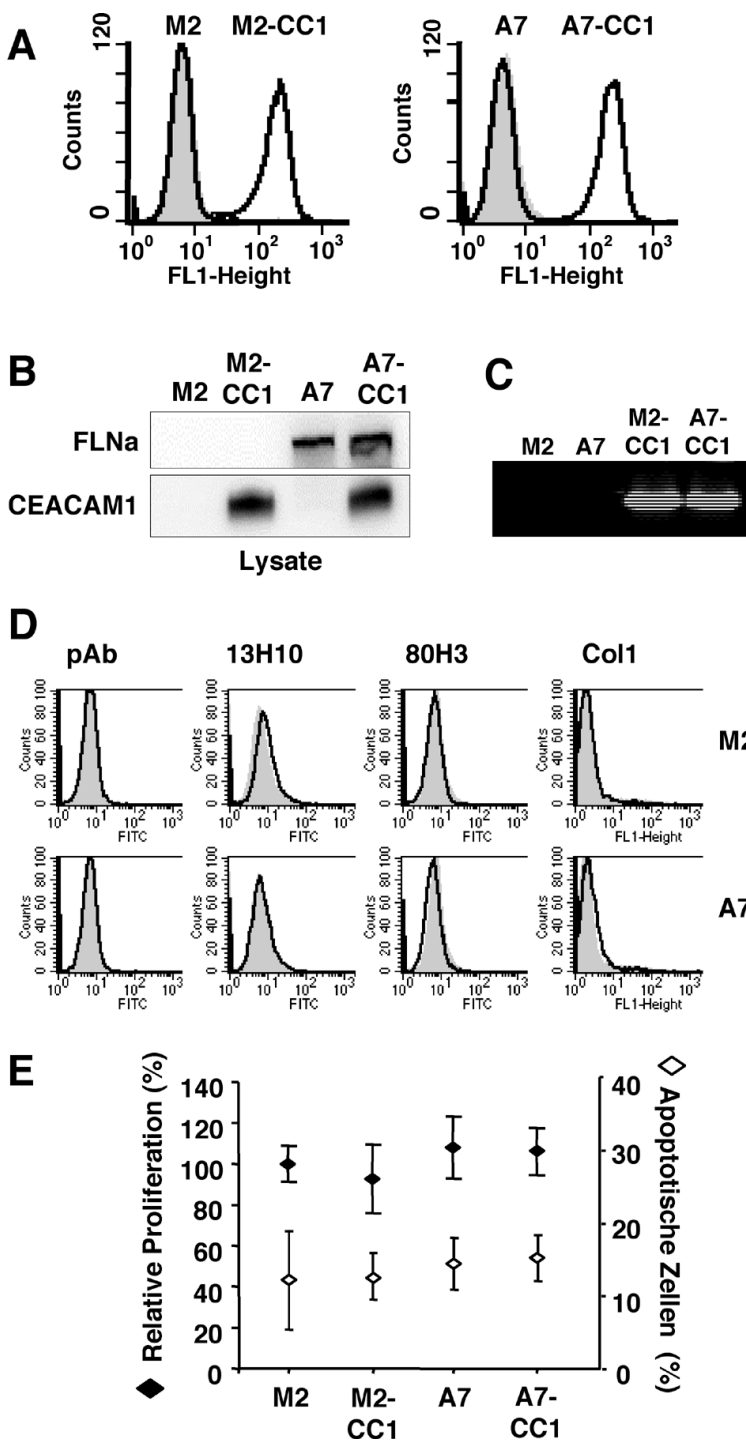


Abb. 16: Charakterisierung und CEACAM1-L-Transfektion von humanen M2- und A7-Melanomzellen. M2- und A7-Zellen wurden stabil mit humaner CEACAM1-4L-cDNA transfiziert und subkloniert, wodurch die Zelllinien M2-CC1 und A7-CC1 entstanden. (A) FACS-Analyse der CEACAM1-Expression von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen mit dem Antikörper 4/3/17 (schwarze Linien) oder mit einem Kontrollantikörper (graue Fläche). (B) Western-Blot von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zelllysaten. Blot: Kaninchen-anti-human-CEA (CEACAM1-kreuzreaktiv) und FLMN01 (anti-Filamin A). (C) RT-PCR-Analyse von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen mit human-CEACAM1-spezifischen Primern. (D) FACS-Analyse von M2- und A7-Zellen mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-human-CEA-Antikörper (pAb; erkennt CEACAM1, 5 und 6) bzw. den monoklonalen Antikörpern 13H10 (CEACAM6), 80H3 (CEACAM8) und Col1 (CEACAM3 und 5). (E) Spontane Apoptose und Proliferation von A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen relativ zu M2-Wildtypzellen. Die spontane Apoptose wurde durch FACS-Analyse von Propidiumiodid- und AnnexinV-gefärbten Zellen bestimmt

Die Proliferation wurde in einem auf BrdU-Einbau basierendem System gemessen. Gezeigt sind jeweils Durchschnittswerte von drei Parallelansätzen eines typischen Experimentes und ihre Standardabweichung (n=3).

M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen zeigten in einem auf BrdU-Inkorporation basierendem Assay keine Unterschiede in der Proliferation. Auch in der spontanen Apoptose, die durch Annexin-V- und Propidiumiodid-Färbung untersucht wurde, gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16E).

Die Interaktion von CEACAM1 und Filamin A in den kotransfizierten A7-CC1-Zellen wurde durch Koimmunpräzipitationen von Filamin A durch den CEACAM1-reaktiven Antikörper 4/3/17 bestätigt (Abb. 17A). Zudem zeigten konfokale Aufnahmen von CEACAM1-Filamin A-Doppelimmunfluoreszenzen eine deutliche Kolokalisation von beiden Proteinen an Zell-Zell-Kontaktbereichen in nicht konfluent wachsenden A7-CC1-Zellen (Abb. 17B). Wurde den Zellen erlaubt für eine Stunde auf Laminin-1 zu adhären, kolokalisierten die Proteine in distinkten Bereichen der dorsalen Plasmamembran von Einzelzellen (Abb. 17C).

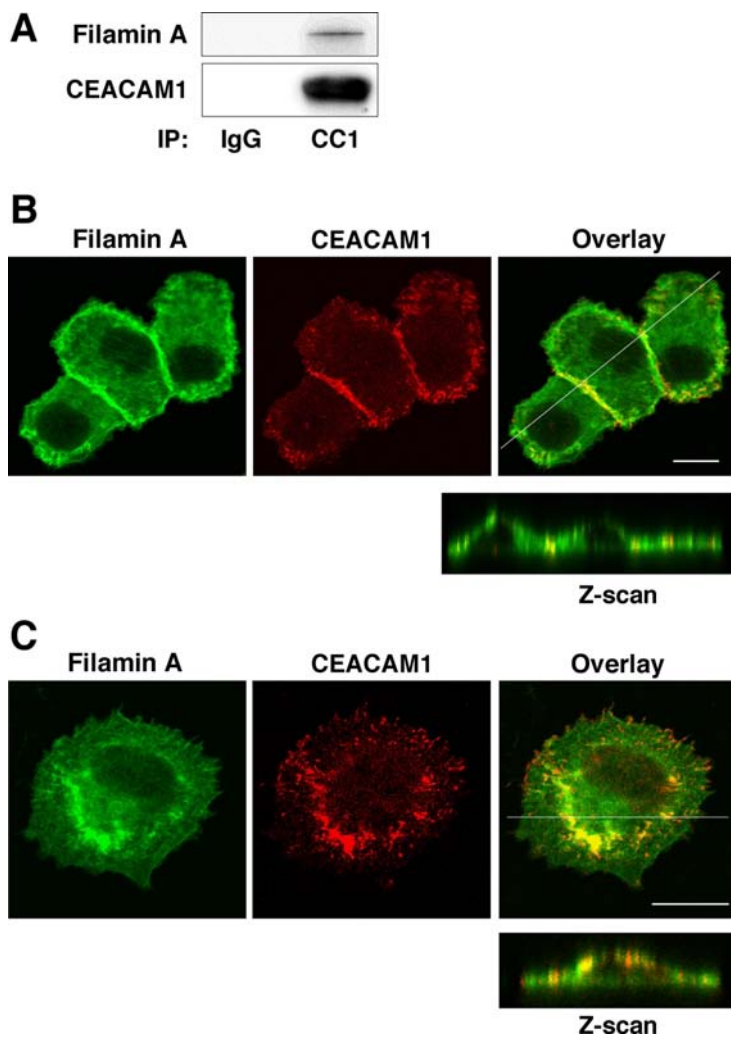


Abb. 17: CEACAM1 und Filamin A interagieren und kolokalisieren in A7-CC1-Zellen.

(A) Koimmunpräzipitation. Lysate von A7-CC1-Zellen wurden mit Protein-G-Sepharose gekoppeltem 4/3/17 oder IgG-Kontrollantikörper inkubiert. Blot: FLMN01 (anti-Filamin) und 4/3/17 (anti-human CEACAM1). (n=4)
(B,C) Konfokale Aufnahmen von indirekten Immunfluoreszenzen von A7-CC1-Zellen gefärbt mit FLMN01 (Filamin A, grün) und 4/3/17 (CEACAM1, rot). Werden die Filamin-Färbung und die CEACAM1-Färbung übereinandergelegt, erscheinen Kolokalisationen von CEACAM1 und Filamin A gelb (Overlay). Vor dem Fixieren wurden die Zellen entweder 24 h nicht konfluent auf Zellkultur-behandelten Plastikobjektträgern wachsen gelassen (B) oder sie durften 1 h auf Laminin-1 behandelten Plastikobjektträgern adhären (C). (n=3)

Die Expression von CEACAM1-L und Filamin A beeinflusst Invasion und Migration

Um die Invasion einzelner Zellen zu testen, wurden so genannte chemotaktische Transwell-Invasions-Assays durchgeführt. Diese basieren, wie schematisch in Abb. 18A gezeigt, auf einem Zwei-Kammer Kultur-System, bei dem die beiden Kammern durch eine poröse, innen mit einer künstlichen extrazellulären Matrix beschichteten Membran getrennt sind.

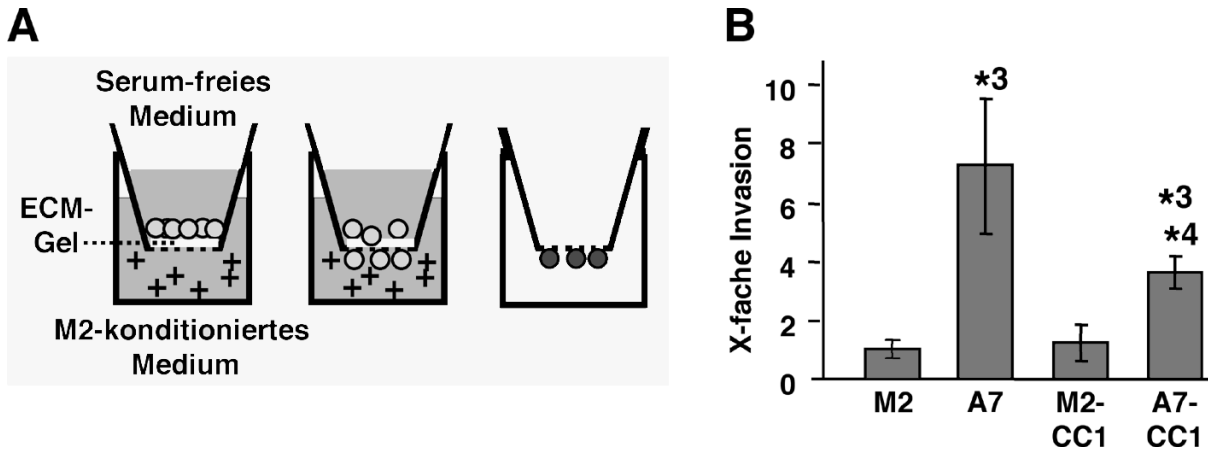


Abb. 18: Transwell-Invasions-Assays. (A) Schematische Darstellung eines Transwell-Invasions-Assays. Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen. (B) Relative Invasion von A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen im Vergleich zu M2-Wildtypzellen in BD-Biocoat-Matrigel-Invasions-Assays. Die Durchschnittswerte von drei (jeweils dreifach durchgeführten) Versuchen und deren Standardabweichung sind gezeigt. Berechnungen nach dem Student's t-Test ergaben: (*1) $p < 0,006$ im Vergleich zu M2-Zellen und (*2) $p < 0,01$ im Vergleich zu A7-Zellen.

Die Zellen werden zunächst von Serum depriviert, um jegliche Aktivierung durch im Serum enthaltene Faktoren auszuschließen und anschließend in serumfreiem Medium in die obere Kammer gegeben. In der unteren Kammer befindet sich Medium, welches Inhaltsstoffe enthält, die einen chemotaktischen Reiz auf die Zellen ausüben. Über die Membran baut sich dann ein Gradient dieser Lockstoffe auf, der die Zellen veranlasst, auf die Außenseite der Membran gelangen zu wollen. Um dies zu erreichen, müssen die Zellen in der Lage sein, die extrazelluläre Matrix zu degradieren und zu migrieren. Die Zellen auf der Außenseite des Filters können anschließend gezählt werden. In der hier verwendeten Versuchsanordnung wurde von M2-Zellen konditioniertes Medium als chemotaktisch wirksame Substanz verwendet (Abb. 18B). A7-Zellen zeigten eine stark erhöhte Invasivität im Vergleich zu den nur gering invasiven M2-Wildtyp-Zellen (7,2-fach \pm 2,3). Die Expression von CEACAM1 hatte keinen Einfluss auf die Invasivität: M2-CC1-Zellen zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu M2-Zellen (1,2-fach \pm 0,6). Die Koexpression von CEACAM1 und Filamin A in A7-CC1-Zellen reduziert die Invasivität im Vergleich zu parentalen A7-

Zellen um 50% ($0,5\text{-fach} \pm 0,1$). Allerdings zeigten sie verglichen mit den gering invasiven M2-Zellen immer noch eine erhöhte Invasion ($3,6\text{-fach} \pm 0,5$).

Um die Migration einzelner Zellen unabhängig von der Invasion zu testen, wurden chemotaktische Transwell-Migrations-Assays durchgeführt, die ebenfalls auf dem Zweikammer Kultur-System basieren (Abb. 19A). Die Innenseite der porösen Membran ist allerdings nicht mit extrazellulärer Matrix beschichtet, so dass die Zellen ungehindert migrieren können.

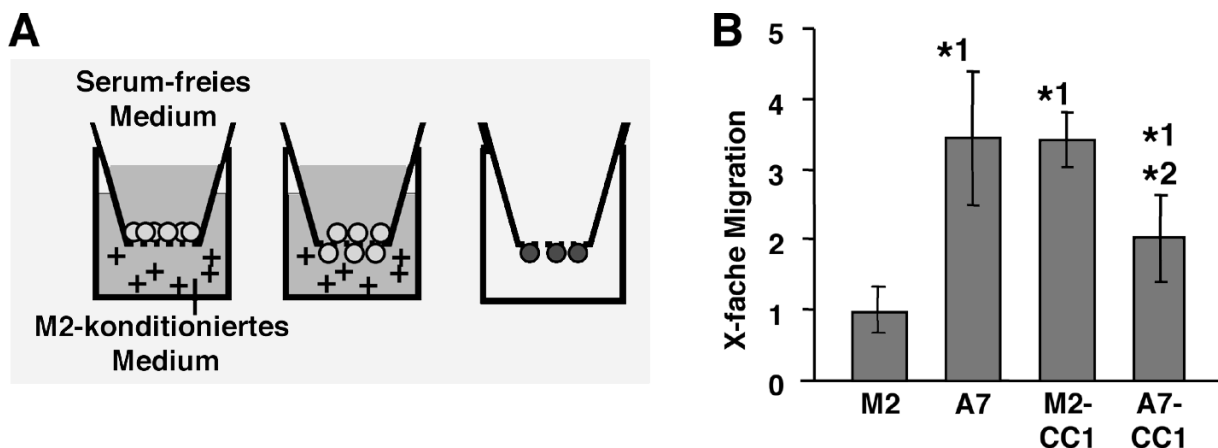


Abb. 19: Transwell-Migrations-Assays. (A) Schematische Darstellung eines Transwell-Migrations-Assays. Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen. (B) Relative Migration von A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen im Vergleich zu M2-Wildtypzellen in Transwell-Boyden-Chamber-Assays. Die Durchschnittswerte von drei (jeweils dreifach durchgeführten) Versuchen und deren Standardabweichung sind gezeigt. Berechnungen nach dem Student's t-Test ergaben: (*1) $p < 0,005$ im Vergleich zu M2-Zellen und (*2) $p < 0,01$ im Vergleich zu A7-Zellen.

Die Zellen migrierten wieder gegen einen Gradienten von M2-konditioniertem Medium (vgl. Cunningham 1992) (Abb. 19B). Die Außenseite der porösen Membran wurde mit Gelatine beschichtet, um einen direkten Einfluss von Integrinen auf die Migration zu minimieren und dennoch eine verbesserte Adhäsion zu gewährleisten. Wie von Cunningham *et al.* (1992) beschrieben, migrierten die A7-Zellen deutlich schneller durch die poröse Membran als die langsamen M2-Zellen ($3,5\text{-fach} \pm 0,9$). Die Expression von CEACAM1 in M2-Zellen erhöhte die Motilität in gleichem Maße wie die Expression von Filamin A ($3,5\text{-fach} \pm 0,4$). Im Gegensatz dazu zeigten die kotransfizierte A7-CC1-Zellen eine um 40% reduzierte Migration im Vergleich zu den einzeln transfizierten M2-CC1- und A7-Zellen ($0,6\text{-fach} \pm 0,2$). Verglichen mit den M2-Wildtyp-Zellen zeigten sie allerdings immer noch eine erhöhte Migration ($1,9\text{-fach} \pm 0,6$).

Unterschiede im Migrations- und Invasionsverhalten beruhen nicht auf differenzieller Expression oder Funktionalität der Integrin-Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und αv

Die künstliche extrazelluläre Matrix (Matrigel®) auf den Filtern des Invasions-Assays besteht aus einer komplexen Mischung verschiedener Matrixproteine und auch die Gelatine in den Migrations-Assays kann eventuell Matrixproteine aus dem Serumanteil des Mediums in der unteren Kammer annehmen. Diese werden durch Integrine gebunden, welche dadurch die Adhäsion, Migration und Invasion der Zelle kontrollieren.

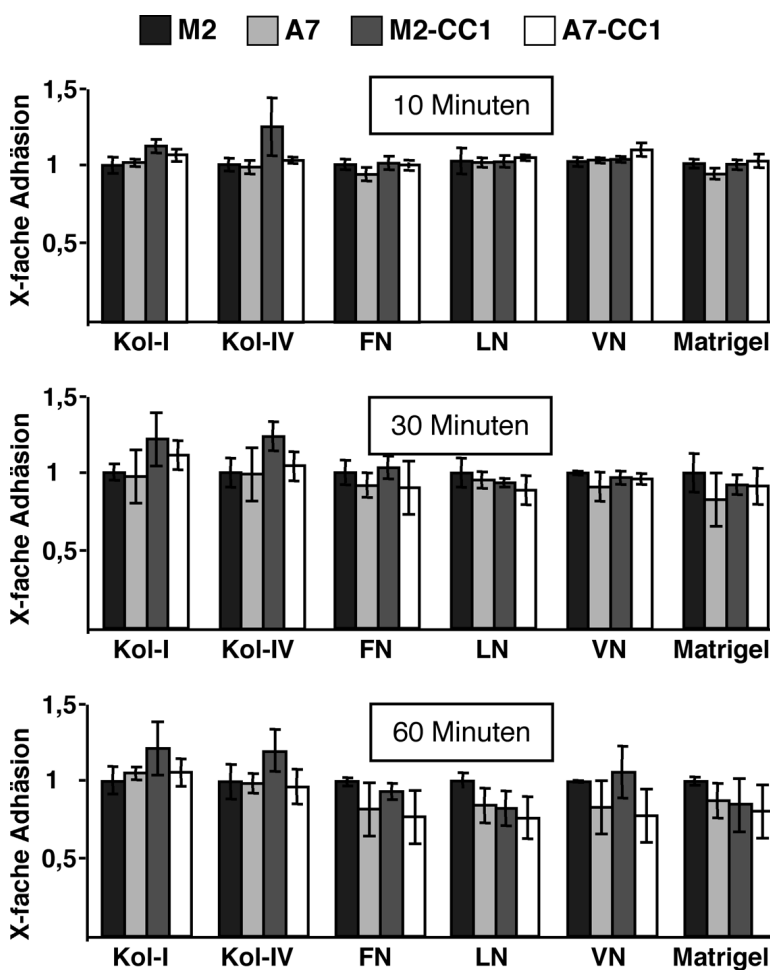


Abb. 20: Adhäsionskinetiken auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen. M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen durften für 10, 30 oder 60 min auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) adherieren. Kol-I: Kollagen-1; Kol-IV: Kollagen-IV; FN: Fibronectin; LN: Laminin-1; VN: Vitronectin; Matrigel: komplexe Mischung aus allen EZM-Komponenten. Gezeigt ist die relative Adhäsion auf den jeweiligen Proteinen im Vergleich zu den M2-Wildtyp-Zellen als Durchschnittswert einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung eines typischen Versuches (n=3).

Es wurde daher untersucht, ob die gefundenen Unterschiede in Migration und Invasion auf Unterschiede in der Funktionalität oder Expressionshöhe von verschiedenen Integrinen beruhen. Die adhäsiven Eigenschaften aller vier benutzten Melanom-Zelllinien wurden auf verschiedenen Matrixproteinen in einer Kinetik nach 10, 30 und 60 min Adhäsion gemessen. A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen zeigten im Vergleich zu M2-Wildtyp-Zellen keine Unterschiede in der Adhäsion auf 96-Well-Platten beschichtet mit Matrigel, Vitronectin, Fibronectin, Laminin-1, Kollagen-I oder Kollagen-IV (Abb. 20).

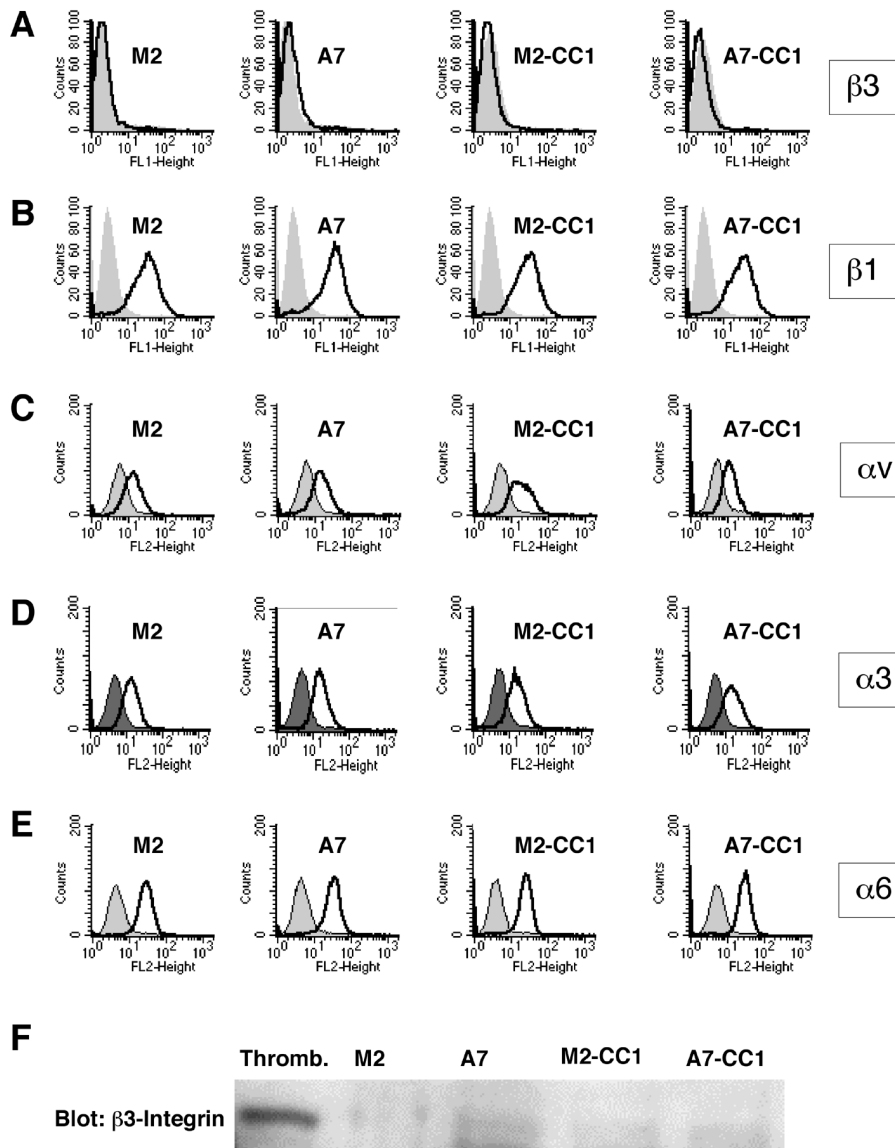
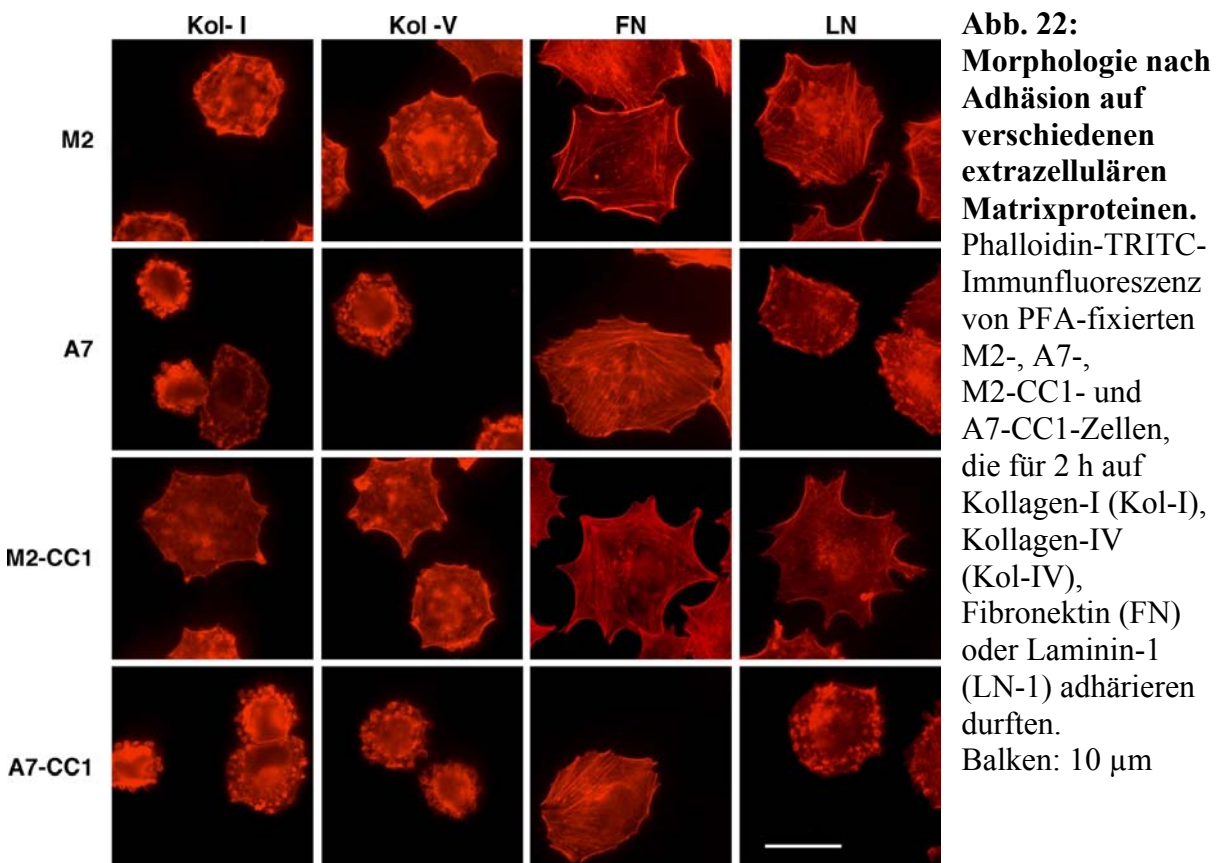


Abb. 21: Expressionsanalyse verschiedener Integrin-Untereinheiten. (A bis E) FACS-Analyse der Oberflächenexpression verschiedener Integrin-Untereinheiten auf M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen. (A) $\beta 3$ -Integrin, (B) $\beta 1$ -Integrin, (C) αv -Integrin, (D) $\alpha 3$ -Integrin, (E) $\alpha 6$ -Integrin. (F) Western-Blot-Analyse der Gesamt- $\beta 3$ -Integrin Expression in Zelllysaten von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen. Als Positivkontrolle diente Thrombozytenlysat.

Es wurde in FACS-Analysen auch kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenexpression der Integrin-Untereinheiten $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und αv auf allen vier Zelllinien gefunden (Abb. 21B bis E). Die Integrin-Untereinheit $\beta 3$ konnte weder im FACS noch im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 21A, F). Dies bedeutet, dass der für die verstärkte Migration von M2-CC1-Zellen verantwortliche Mechanismus sich von dem durch Ebrahimnejad und Mitarbeiter (2004) beschriebenen Mechanismus unterscheidet und einen neuen, $\beta 3$ -Integrin-unabhängigen Signalweg beinhaltet.

Filamin A verändert das Spreiten der Zellen und die Membranstabilität

Obwohl alle vier Melanom-Zelllinien ähnliche Adhäsionsraten auf den untersuchten Matrixproteinen aufwiesen, zeigten sie Unterschiede im Spreiten (*spreading*) auf verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (Abb. 22). Diese Unterschiede erlaubten aber nur zwischen Filamin A-exprimierenden Zellen und Filamin A-defizienten Zellen zu diskriminieren. Die Expression von CEACAM1-L hatte keinen Einfluss auf das Spreiten. Insgesamt schienen alle Zellen auf Laminin-1 und vor allem auf Fibronektin gut zu spreiten, während sie auf Kollagen-I und -IV kein ausgeprägtes Spreiten zeigten. Die beiden Filamin A-defizienten Zelllinien, M2 und M2-CC1, schienen auf allen Matrices schneller und besser zu spreiten als die Filamin A exprimierenden Zelllinien, A7 und A7-CC1. Dies war überraschend, da Filamin A ursprünglich als wichtiger Organisator des orthogonalen F-Aktin-Netzwerkes beschrieben wurde, und somit das Spreiten unterstützen müsste.



Differenzielle-Interferenz-Kontrast-(DIC-)Aufnahmen von frisch auf unbeschichteten Zellkulturschalen ausgesäten Zellen ergaben, dass A7- und A7-CC1-Zellen viele blasenartige Membranausstülpungen (*membrane blebs*) bildeten, welche die gesamte Zellperipherie umfassten (Abb. 23). Im Gegensatz dazu wiesen M2- und M2-CC1-Zellen keine solchen Membranausstülpungen auf und zeigten ein gutes Spreiten.

Die blasenartigen Membranaustülpungen der Filamin A-exprimierenden A7-Zellen schienen von gleichmäßiger Größe zu sein, während die Membranaustülpungen der doppeltransfizierten A7-CC1-Zellen verschieden groß waren und auch einen größeren Durchmesser erlangten.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu von Cunningham *et al.* veröffentlichten DIC-Aufnahmen [Cunningham *et al.*, 1997]. In dieser Veröffentlichung wurden die beiden oben beschriebenen Phänotypen genau entgegengesetzt den M2- ("blebs") und A7-Zellen ("no defect") zugeordnet. Es wurden daher alle Zelllinien, welche für die in Abb. 23 gezeigten Aufnahmen verwendet wurden, nochmals im Western-Blot auf Filamin A- und CEACAM1-Expression getestet und die korrekte Zuordnung bestätigt.

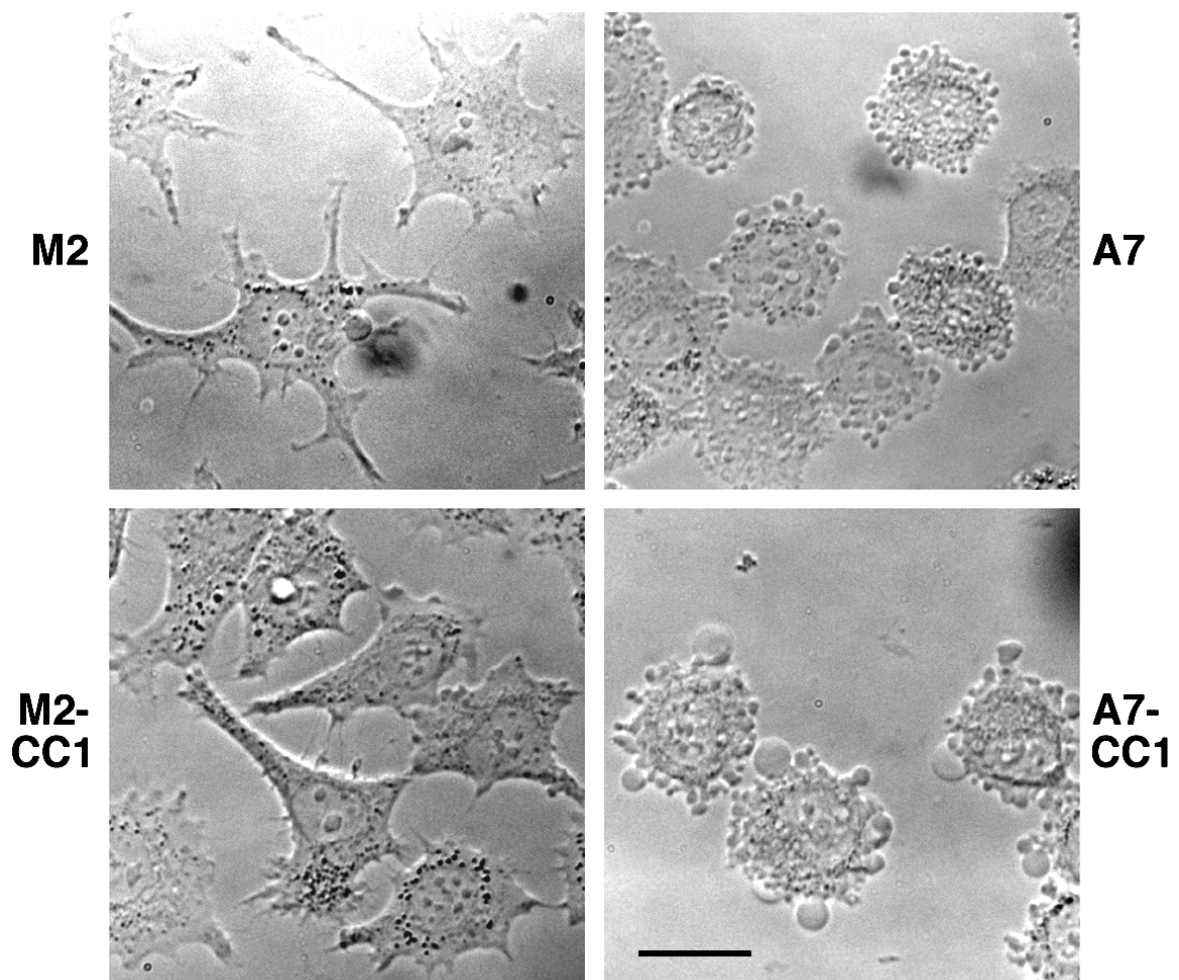


Abb. 23: Morphologie nach Adhäsion auf Zellkulturplatten. DIC-Aufnahmen von nicht-fixierten M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen, die für 4 h auf nicht beschichteten Zellkulturplatten adhären durften. Balken: 10 μm

CEACAM1-L und Filamin A beeinflussen den Wundschluss konfluenten Zellen

Im Gegensatz zu Transwell-Assays, welche die Migration von vereinzelt Zellen messen, imitieren so genannte Wundheilungs-Assays eher eine *in vivo*-Situation. Wundheilungs-Assays erlauben die Beobachtung induzierter Migration von Zellen, die sich noch im Zellverband befinden und die reife Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte besitzen (Abb. 24A, B). Für Wundheilungs-Assays wurden konfluent gewachsene Zellen (Monolayer) durch Kratzen mit einer Pipettenspitze "verwundet". Der entstandene, zellfreie Spalt hatte eine Breite von ca. 300 µm.

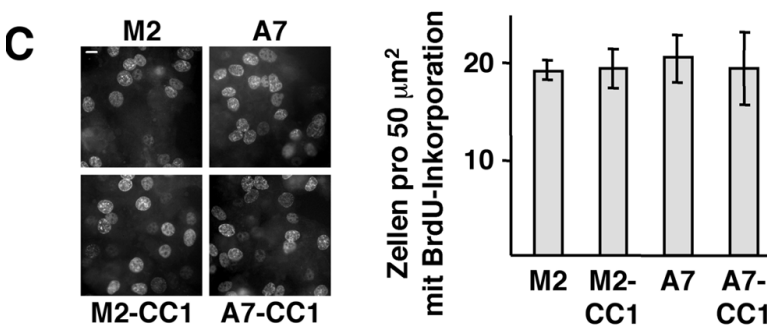
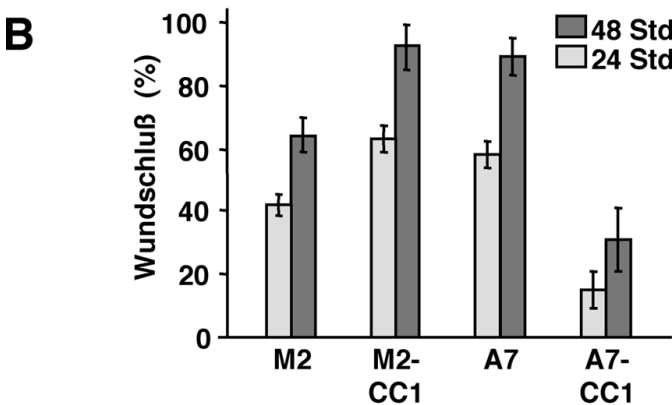
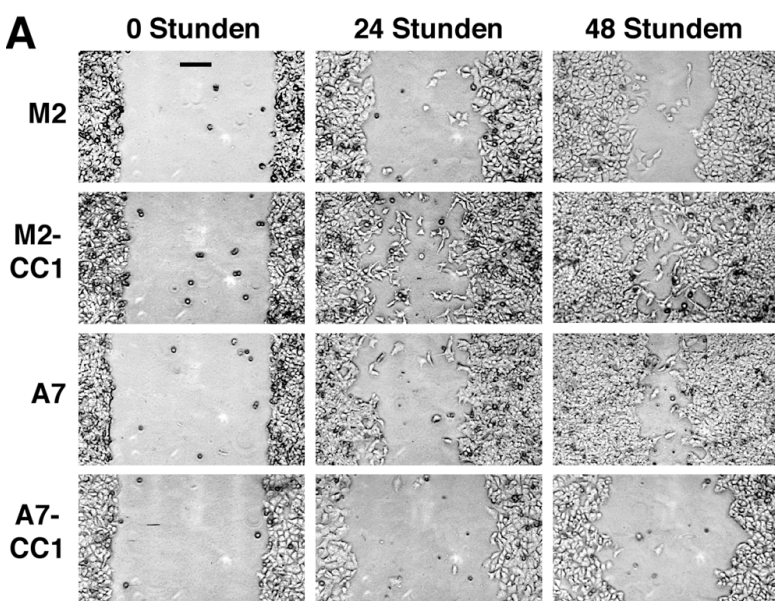


Abb. 24: CEACAM1-Filamin A-Interaktion inhibiert Wundheilung *in vitro*. Konfluent gewachsene M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden mit einer Pipettenspitze "verwundet". Die Wunde wurde nach 0, 24 und 48 h fotografiert (A, Balken: 100 µm) und die Abstände zwischen den Wundrändern bestimmt (B). (C) Proliferation am Wundrand. M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden 24 h nachdem die Wunde gesetzt wurde mit BrdU inkubiert, fixiert und mit FITC-gekoppeltem anti-BrdU-Antikörper gefärbt. BrdU-positive Zellen wurden in je 3 an den Wundrand grenzenden, 50 µm² großen Flächen gezählt. Die Bilder zeigen je Zelllinie eine repräsentative Fläche. Im Diagramm ist der Durchschnittswert einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung eines typischen Versuches gezeigt (n=3).

M2-Wildtyp-Zellen haben innerhalb von 24 h 52% ($\pm 8\%$) und innerhalb von 48 h 64% ($\pm 6\%$) der Wunde geschlossen. Der komplette Wundschluss trat bei dieser langsam migrierenden Zelllinie nach circa 72 h ein (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu haben nach 24 h Filamin A-exprimierende A7-Zellen 66% ($\pm 11\%$) und CEACAM1-exprimierende M2-CC1-Zellen 69% ($\pm 12\%$) der Wunde bedeckt. Nach 48 h war bei beiden Zelllinien ein fast kompletter Wundschluss erreicht (A7: 89% $\pm 6\%$; M2-CC1: 92% $\pm 7\%$). Die A7-CC1-Doppeltransfektanten zeigten eine stark verringerte Migration und bedeckten nur 16% ($\pm 7\%$) der Wunde nach 24 h bzw. 24% ($\pm 10\%$) nach 48 Stunden. A7-CC1-Zellen waren auch nach 72 h nicht in der Lage, die Wunde zu schließen (ohne Abbildung).

Mittels BrdU-Inkorporation in Zellen am Wundrand konnte gezeigt werden, dass diese Befunde nicht auf unterschiedlicher Proliferation während des Wundschlusses beruhen, sondern Unterschiede in der Migration darstellen (Abb. 24C). Als relevanter Zeitpunkt für diesen Assay wurden 24 h gewählt. Garlick und Taichman haben gezeigt, dass bei normalen Keratinozyten der so genannte *Proliferation Burst* (der starke, durch die Wunde induzierte Anstieg der Proliferation) zu diesem Zeitpunkt stattfindet [Garlick und Taichman, 1994]

Die Expression von CEACAM1-L verstärkt das Streuverhalten (*scattering*) von Filamin A-defizienten Zellen

In Wundheilungs-Assays zeigen epitheliale Zellen für gewöhnlich eine Migration, welche dadurch charakterisiert ist, dass alle Zellen im Verbund bleiben und sich als flächige Einheit fortbewegen ("*sheet-like migration*"). Da sich in den Wundflächen der CEACAM1-transfizierten M2-CC1-Zellen besonders viele vereinzelte Zellen befanden (Abb. 24A), wurden Zeitraffer-Aufnahmen des Wundschlusses der vier Melanom-Zelllinien während der ersten 3 h nach dem Setzen der Wunde gemacht (Abb. 25).

Diese Zeitraffer-Aufnahmen zeigten, dass M2-CC1-Zellen innerhalb von 3 h begannen, sich vom Wundrand zu lösen und als Einzelzellen zu migrieren (Abb. 25A). M2- und A7-Zellen fingen frühestens nach 6 bis 10 h an, sich zu separieren (Abb. 25B, C) und zeigten auch eine reduzierte Zahl an Einzelzellen im Bereich der Wunde (Abb. 24A). Die A7-CC1-Doppeltransfektanten zeigten keinerlei Streuung und blieben strikt im nur sehr langsam migrierenden Zellverband (Abb. 25D). Auch nach 48 h wurden keine Einzelzellen im Wundbereich gefunden (Abb. 24A).

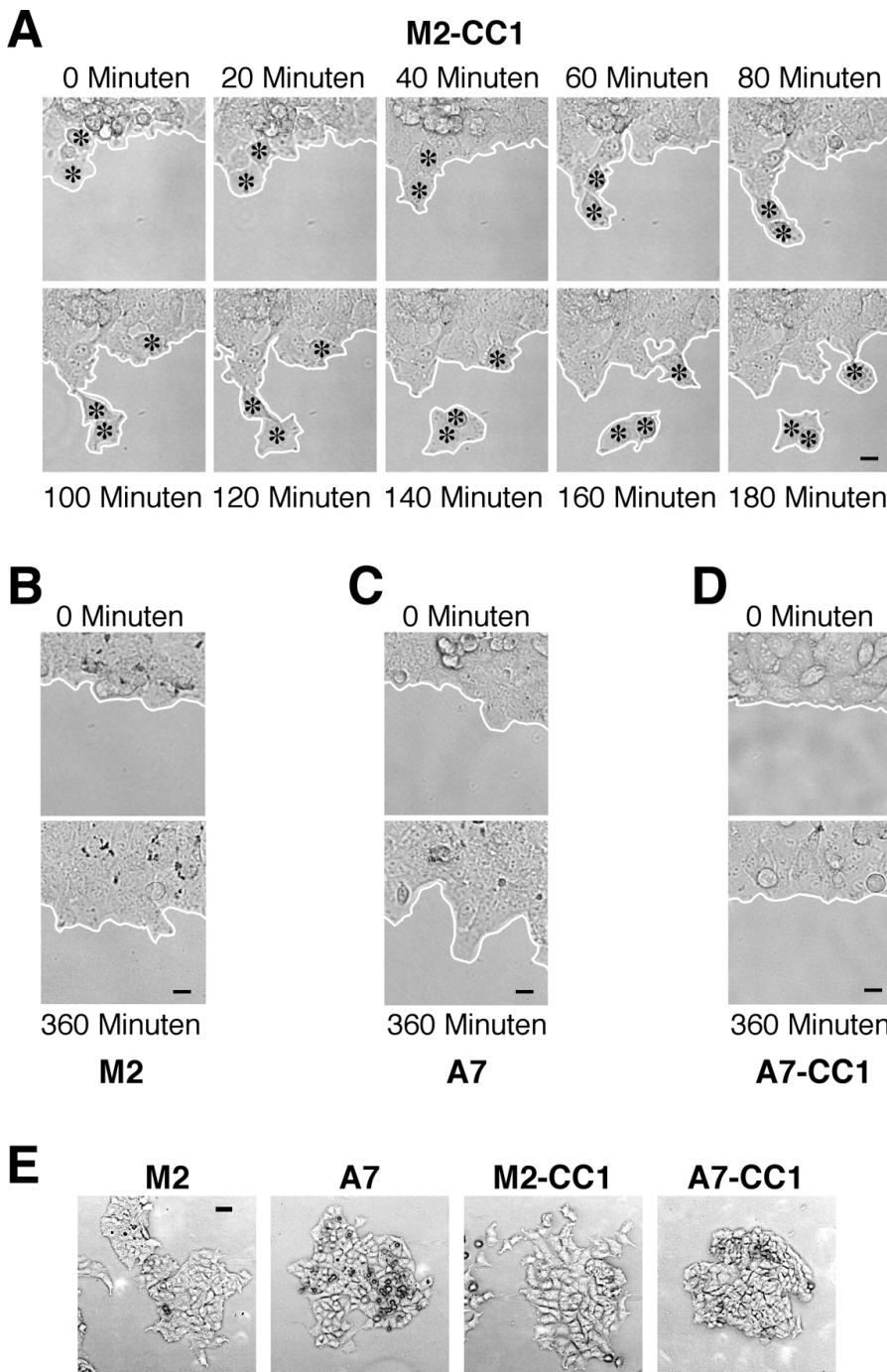


Abb. 25:
CEACAM1-Expression in M2-Zellen verstärkt die Zellstreuung (scattering).
Konfluent gewachsene M2-CC1- (A), M2- (B), A7- (C), und A7-CC1-Zellen (D) wurden mit einer Pipettenspitze "verwundet" und über 6 h alle 20 min fotografiert. Gezeigt sind Details dieser Filme zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Zellgrenzen sind zur besseren Erkennung mit einer weißen Linie nachgeformt. Sich komplett vom Wundrand lösende Zellen sind mit einem Asterisk (*) gekennzeichnet. Balken: 5 µm. (E) Koloniebildung und spontane Streuung bei M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen. Die Zellen wurden vereinzelt, dünn ausgesät und 10 Tage wachsen gelassen. Balken: 10 µm.

Ähnliche Resultate ergaben sich aus der Beobachtung von aus einzelnen Zellen entstandenen Kolonien (Abb. 25E). A7-CC1-Zellen wuchsen in dicht gepackten Kolonien und zeigten keine Ablösung von Einzelzellen aus dem Zellverband. Die Kolonieränder von M2- und A7-Zellen waren zerfranst, die Kolonien blieben jedoch weitgehend als Einheit bestehen und nur vereinzelt waren Zellen außerhalb von Zellverbänden zu beobachten. Von M2-CC1-Zellen gebildete Kolonien zeigten diesen Zusammenhalt nicht. Es sind deutlich Einzelzellen zu erkennen, die sich gelöst haben und sich von der Kolonie entfernen. CEACAM1 scheint also

in Gegenwart von Filamin A das Streuen von Zellen zu verhindern, während es allein exprimiert das Streuen verstärkt.

Koloniebildung in Softagar-3D-Kultur

Etablierte Krebszelllinien wie z.B. Hela-Zellen, aber auch normale, Virus-transformierte Zellen sind in der Lage, in Softagar-Kulturen, die eine Adhäsion verhindern, zu überleben und Kolonien zu bilden. Die meisten normalen Zellen wachsen nicht unter diesen Verhältnissen. Um den Grad der Entartung, also die erreichte Stufe der Transformation einer Krebszelle, zu bestimmen, können solche Softagar-Kulturen herangezogen werden. Bei der in diesem System gemessenen "Transformation" muss allerdings bedacht werden, dass die Fähigkeit der Zellen, in Suspension zu wachsen, nicht zwangsläufig mit der Fähigkeit korreliert, im entsprechenden Wirt einen Tumor bilden zu können.

Generell waren alle vier Zelllinien in der Lage, Kolonien zu bilden (Abb. 26). Die von M2-CC1-Zellen gebildeten Kolonien schienen kleiner als durch M2-, A7- oder A7-CC1-Zellen gebildete Kolonien. Die Kolonien von A7-CC1-Zellen schienen häufig besonders kompakt zu sein, was gut mit den Daten der zweidimensionalen Kolonien, die keinerlei Zell-Scattering aufweisen, übereinstimmt. Es konnte leider aus Zeitgründen kein statistisch abgesicherter, signifikanter Unterschied zwischen den hier benutzten Zelllinien dargestellt werden. Die vorläufigen Daten sind jedoch vielversprechend und verlangen nach einer Optimierung des Systems, um statistisch relevante Auswertungen zu ermöglichen.

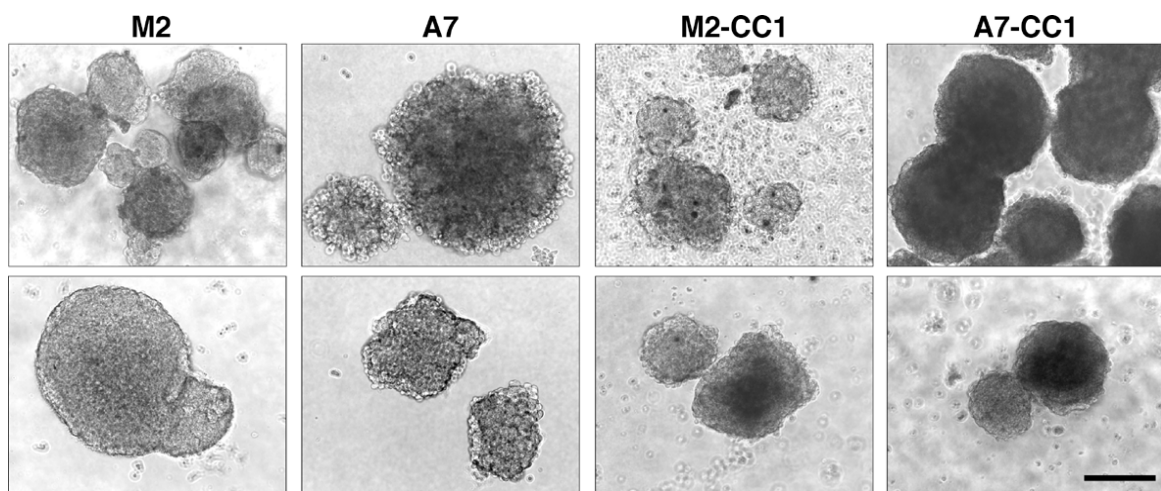


Abb. 26: Koloniebildung in Softagar. Gut vereinzelte Zellen wurden in Softagar ausgesät und 3 Wochen inkubiert. Es sind jeweils 2 repräsentative Aufnahmen gezeigt. Balken: 1 mm.

Unterschiede in der Zellstreuung beruhen nicht auf E-Cadherin

Die Inhibition der Zellstreuung in epithelialen Zellen wird normalerweise durch Zell-Zell-Adhäsionspunkte (*Adherens-Junctions*) vermittelt, welche E-Cadherin als Grundbaustein verwenden. Daher wurden alle vier Zelllinien auf die Expression von E-Cadherin untersucht. E-Cadherin zeigte in allen Zellen ein punktartiges Muster in indirekten Immunfluoreszenzen (Abb. 27A). Konfokale Aufnahmen zeigten, dass diese Färbung eindeutig intrazellulär war (Abb. 27B). Für fortgeschrittene Melanome ist bekannt, dass diese oft die endogene E-Cadherin-Expression verlieren und statt dessen N-Cadherin exprimieren [Haass et al., 2005]. Alle vier in dieser Studie verwendeten Zelllinien zeigten eine deutliche Oberflächenexpression von N-Cadherin, welches in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert war (Abb. 27A). Es gab keine Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen, wie durch Western-Blot gezeigt wurde (ohne Abbildung). Die Streuung der M2-CC1-Zellen ist also nicht auf Veränderungen der E- oder N-Cadherin-Expression zurückzuführen.

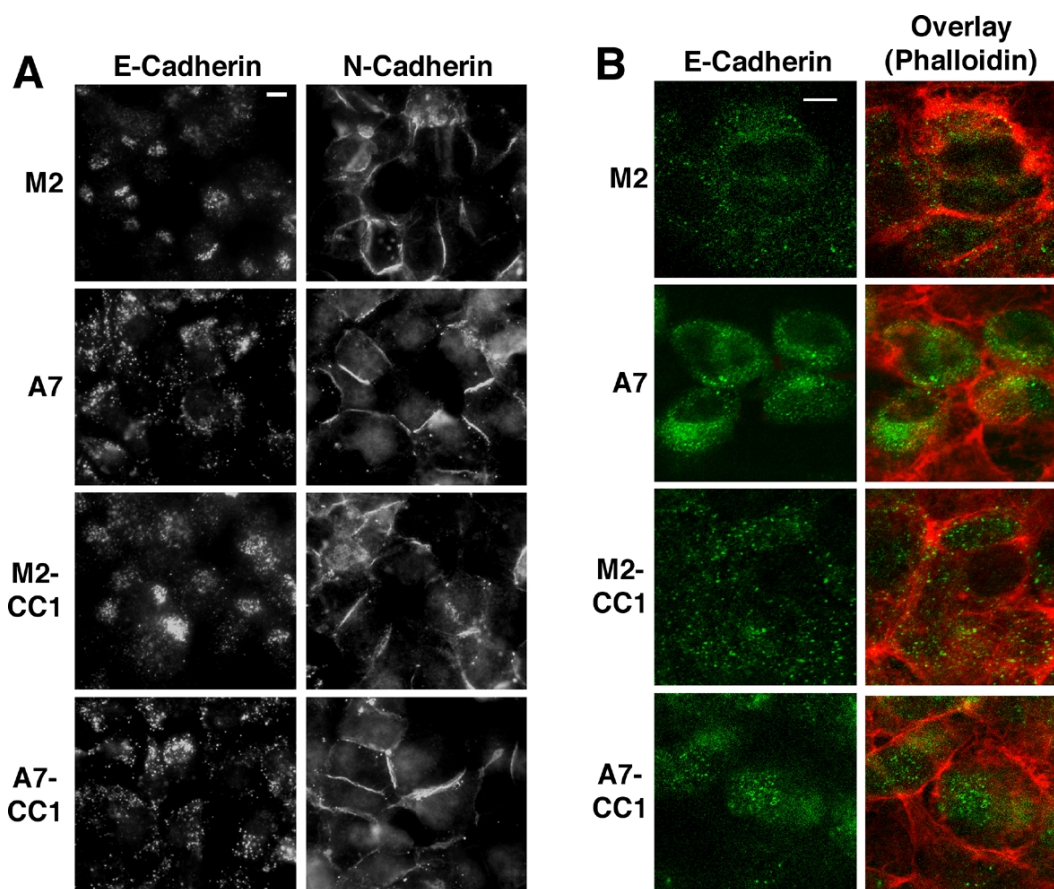


Abb. 27: Expression und Lokalisation von E-Cadherin und N-Cadherin. Indirekte Immunfluoreszenzen von konfluenten, fixierten und permeabilisierten M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen. (A) Epifluoreszenz, E-Cadherin und N-Cadherin (B) Konfokale Aufnahmen, E-Cadherin (grün) überlagert mit F-Aktin (rot, Phalloidin). Balken: 5 µm.

Intrazelluläre CEACAM1- und Filamin A-Lokalisation

In nicht konfluenten M2-CC1- und A7-CC1-Zellen ist CEACAM1 großenteils in den Zell-Zell-Kontakten zu finden (Abb. 28). Es ist jedoch auch auf der gesamten übrigen Oberfläche lokalisiert. F-Aktin ist in den Zell-Zell-Kontakten und in der Peripherie angereichert

Während die CEACAM1-Verteilung in konfluenten Zellen beider Zelllinien eher diffus ist und sich in den Zell-Zell-Kontakten nur ein kleiner Teil des CEACAM1-L befindet (ohne Abbildung), verändert sich die intrazelluläre Lokalisation von CEACAM1, nachdem konfluente M2-CC1- und A7-CC1-Zellen verwundet wurden. Fast die gesamte CEACAM1-L-Population wird innerhalb einer Stunde an die Zell-Zell-Kontakte rekrutiert (Abb. 29A).

Nach nur 10 min ist bereits eine deutliche Rekrutierung zu erkennen (ohne Abbildung). Nach 18 h ist CEACAM1-L immer noch in den Zell-Zell-Kontakten zu finden (Abb. 29A). Die schnell migrierenden M2-CC1-Zellen stellen auch als Einzelzellen noch Kontakte über lange Ausläufer mit Nachbarzellen her. Diese Kontaktstellen zeigen eine deutliche CEACAM1-Färbung. Auch die nicht-beweglichen A7-CC1-Zellen zeigen nach 18 h eine deutliche CEACAM1-Färbung in den Zell-Zell-Kontakten.

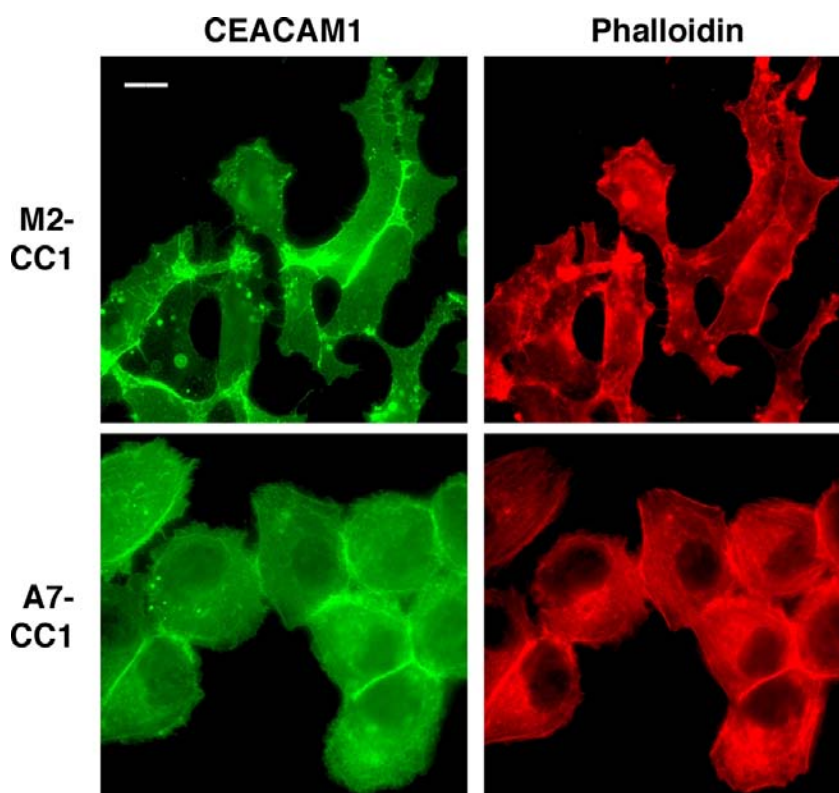


Abb. 28: CEACAM1 befindet sich in Zell-Zell-Kontakten nicht konfluenter M2-CC1- und A7-CC1-Zellen. Immunfluoreszenzen (Epifluoreszenzen) von CEACAM1 bzw. Phalloidin in nicht konfluenten Zellen nach PFA-Fixierung. Balken: 5µm.

Filamin A zeigt in konfluenten A7- und A7-CC1-Zellen eine diffuse Verteilung (ohne Abbildung) und wird nach dem Setzen einer Wunde innerhalb einer Stunde zum Teil an die

Zell-Zell-Kontakte rekrutiert (Abb. 29B). Nach 18 h ist Filamin A vorwiegend im cortikalen Bereich des Lamellipodiums lokalisiert.

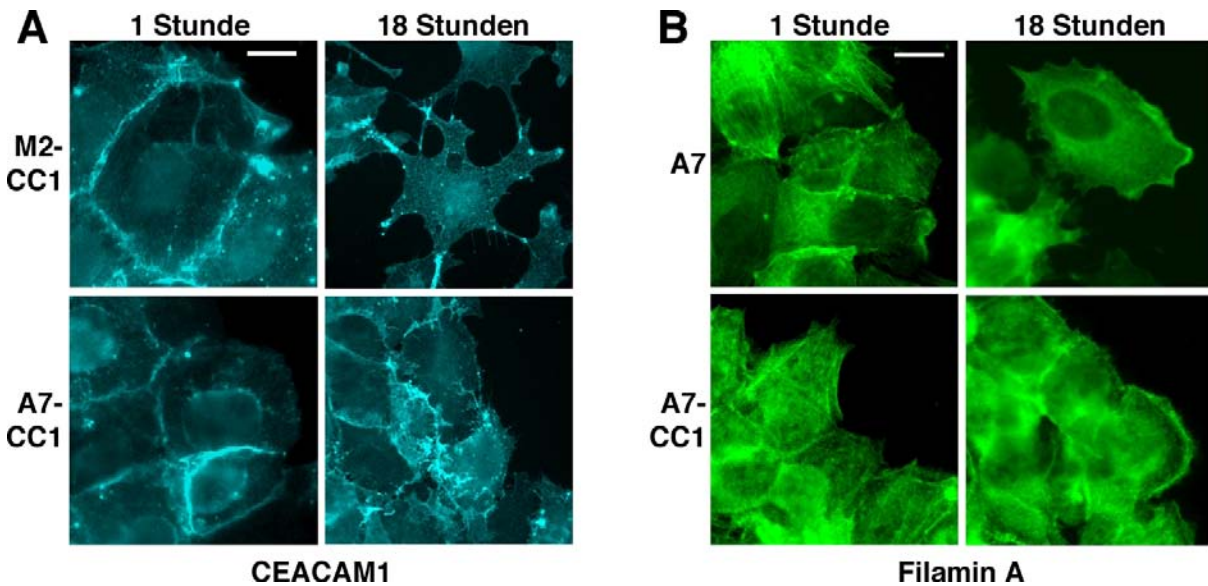


Abb. 29: CEACAM1 und Filamin A werden an Zell-Zell-Kontakte rekrutiert. Konfluente Zellen wurden 1 bzw. 18 h nach dem Setzen einer "Wunde" mit einer Pipettenspitze fixiert und für CEACAM1 (A) und Filamin A (B) gefärbt. Balken: 5µm.

CEACAM1-Assoziation in Membranmikrodomänen in M2-CC1- und A7-CC1-Zellen

Es wurde gezeigt, dass CEACAM1 in PBMCs (*peripheral blood monocytes*) Membranmikrodomänen-assoziiert ist [Chen und Shively, 2004]. Membranmikrodomänen stellen kleine Unterbereiche der Zellmembran dar, welche sich durch die erhöhte Konzentration von Cholesterol und Glykosphingolipiden auszeichnen. In diesen Membranbereichen können bestimmte Proteine angereichert werden, was z.B. in der Signalentstehung oder –weiterleitung eine Rolle spielen kann [Simons und Ikonen, 1997]. Proteine, die in Detergenz-resistenten Membranfraktionen gefunden werden, gelten als Mikrodomänen-assoziiert.

Eine Möglichkeit diese Mikrodomänen und ihre assoziierten Proteine darzustellen, sind Sucrose-Gradienten. Unten werden die mit Detergenz-haltigem Lysepuffer hergestellten Zelllysate (45% Sucrose) eingesetzt und darauf wird der Gradient mit geringer werdenden Konzentrationen an Sucrose (35%, 20% und 5%) geschichtet. Während der Ultrazentrifugation schwimmen die leichteren Detergenz-resistenten Membranfraktionen in die weniger konzentrierten (geringe Dichte) Bereiche des Sucrose-Gradienten hinauf,

während alle schwereren, nicht Mikrodomänen-assoziierten Proteine, in der unteren Hälfte des Gradienten (hohe Dichte) verbleiben.

CEACAM1 war in M2-CC1- und A7-CC1-Zellen Mikrodomänen-assoziiert (Abb. 30). Filamin A blieb unter den hier gewählten Bedingungen im unteren Bereich des Gradienten. Dennoch schien die Expression von Filamin A einen Einfluss auf die Verteilung von CEACAM1 in Mikrodomänen-assoziierte und nicht-assoziierte Fraktionen zu haben. Durch Quantifizierung der CEACAM1-Menge in der oberen (geringe Dichte) und der unteren (hohe Dichte) Hälfte des Gradienten ein Verhältnis von 1:2 (assoziiert:nicht-assoziiert) in M2-CC1-Zellen und von 1:1 (assoziiert:nicht-assoziiert) in A7-CC1-Zellen zu finden. Ob dieser Unterschied tatsächlich einen Einfluss auf das CEACAM1-Signaling hat, und ob Filamin A stets mit der nicht Mikrodomänen-assoziierten CEACAM1-Fraktion interagiert, muss in weiteren Studien untersucht werden.

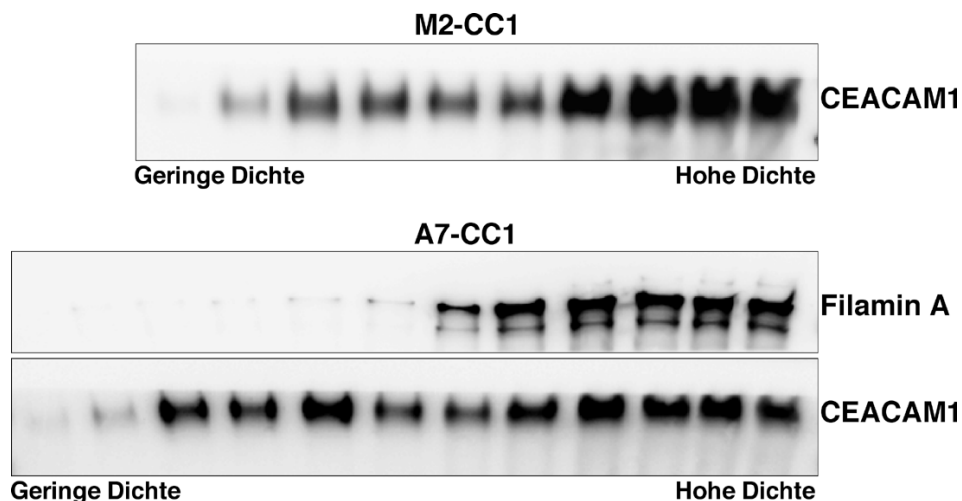


Abb. 30: Sucrose-Dichtezentrifugationen. M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden solubilisiert und Sucrose-Dichtezentrifugationen unterworfen. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Blot: 4/3/17 (anti-CEACAM1) und FLMN01(anti-Filamin A). (n=2)

Lösliche CEACAM1-Fusionsproteine haben keinen Einfluss auf die Morphologie, Invasion und Migration von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen

CEACAM1-Moleküle gehen homophile Bindungen *in cis* auf der Plasmamembran, aber auch *in trans* zwischen verschiedenen Zellen ein [Hunter et al., 1996; Wikstrom et al., 1996]. Es wird daher spekuliert, dass diese Bindungen möglicherweise einen Einfluss auf die Signaleigenschaften von CEACAM1 haben. Um einen solchen Einfluss auf verschiedene Verhaltensweisen der Melanomzellen weiter zu charakterisieren, wurden Fusionsproteine aus

der extrazellulären Domäne des humanen CEACAM1 und der konstanten Region der schweren Kette eines humanen Antikörpers (IgG) benutzt. Die Klonierung und Herstellung dieser Fusionsproteine ist im Abschnitt IV des Ergebnisteils beschrieben. Die vier Zelllinien wurden für den jeweiligen Versuch mit 10 µg/ml CEACAM1-Fc-Fusionsprotein und Kontroll-Fc-Fusionsprotein inkubiert.

Es wurde zunächst die Morphologie der Zellen nach Adhäsion auf unbeschichteten (vgl. Abb. 24), wie auch auf Kollagen I-, Kollagen IV-, Fibronectin- und Laminin 1-beschichteten 96-Well-Platten (vgl. Abb. 23) untersucht (ohne Abbildung), aber kein Unterschied zu den in Abb. 23 und 24 gezeigten, nicht mit Fusionsprotein inkubierten Zellen gefunden. Auch Invasions-Transwell-Assays (vgl. Abb. 19), Migrations-Transwell-Assays (vgl. Abb. 20) und Wundheilungs-Assays (vgl. Abb. 25) wurden mit Fusionsprotein durchgeführt (ohne Abbildung), und wieder ergab sich kein Unterschied zu den in den entsprechenden Abbildungen gezeigten, unbehandelten Zellen im Migrations- und Invasionsverhalten. Auch die in Abb. 17 und 34 dargestellten Koimmunpräzipitationen von Filamin A durch CEACAM1 sowie die Kolokalisation der beiden Proteine in A7-CC1-Zellen (Abb. 17) wurde nicht verändert (ohne Abbildung). Möglicherweise muss CEACAM1 für diese Melanomzellen immobilisiert vorliegen, um eine "echte" Bindung, z.B. an andere CEACAM-1-exprimierende Zellen, vorzutäuschen. Dass die Konstrukte funktionell sind, zeigen Versuche mit Granulozyten, bei denen das lösliche Fc-CEACAM1 eine Verzögerung der Apoptose induziert hat [Singer et al., 2005].

CEACAM1 beeinflusst Wund-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts

Um Erklärungen für die deutlichen Unterschiede im Migrationsverhalten von M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen im Wundheilungs-Assay zu finden, wurden Immunfluoreszenzen angefertigt. Durch Phalloidin-Färbungen wurde untersucht, ob die Expression von CEACAM1 und Filamin A einen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett hat.

Konfluente Zellen aller vier Zelllinien zeigten eine diffuse F-Aktin-Färbung (ohne Abbildung). Innerhalb einer Stunde nach dem Setzen einer Wunde zeigten alle Zellen eine polarisierte Morphologie mit einem in die zellfreie Zone ausgestreckten Lamellipodium (Abb. 31). M2-Wildtypzellen und Filamin A-exprimierende A7-Zellen bildeten nach einer Stunde Stressfasern und zeigten eine Anreicherung von F-Aktin in kortikalen Bereichen der Zellperipherie und an Zell-Zell-Kontakten. Nach 18 h waren keine Stressfasern mehr zu erkennen. Im Gegensatz zu den CEACAM1-negativen Zellen bildeten M2-CC1- und A7-CC1-Zellen nach einer Stunde keine Stressfasern und zeigten eine verstärkte Anreicherung

von F-Aktin in cortikalen Bereichen der Zellperipherie und an Zell-Zell-Kontakten. Nach 18 h war die F-Aktin-Färbung in M2-CC1-Zellen mit der Färbung in M2-Zellen vergleichbar. Die wenig motilen A7-CC1-Zellen erhielten die verstärkte F-Aktin-Akkumulation in cortikalen Bereichen aufrecht.

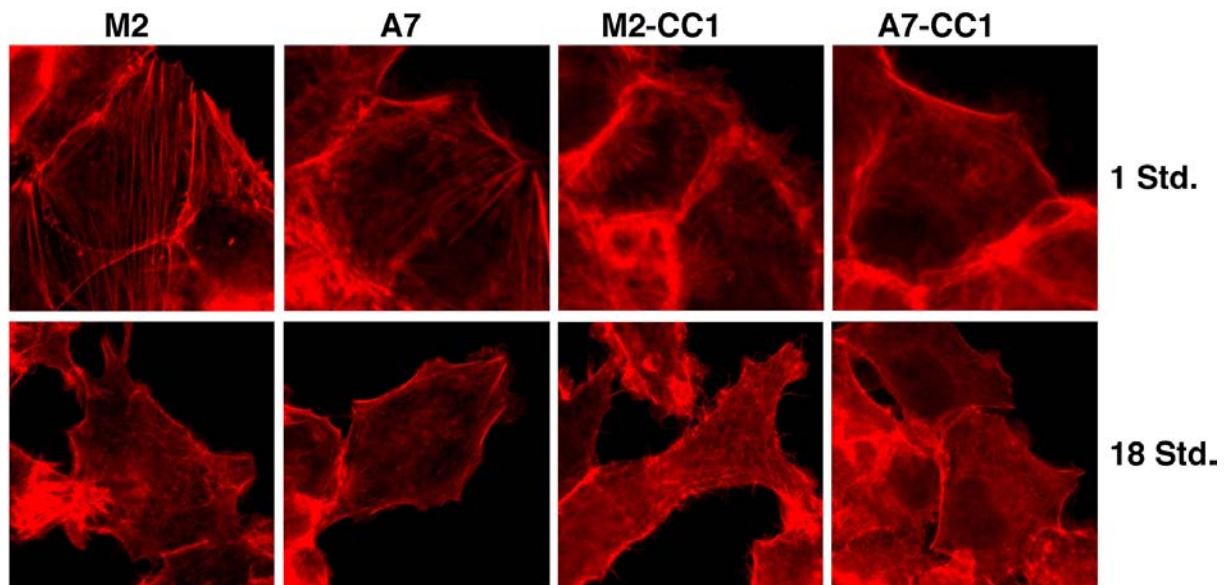


Abb. 31: Die Expression von CEACAM1 verändert den Umbau des Zytoskeletts. Konfluente M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden 1 bzw. 18 h nachdem eine Wunde gesetzt wurde, fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin gefärbt.

A7-CC1-Zellen haben einen gestörten Turnover der fokalen Adhäsionen

Konfluente M2- und A7-Zellen zeigten eine diffuse Verteilung der Tyrosinphosphorylierung (ohne Abbildung). Nach einer Stunde wurden punktartige Strukturen an der Zellperipherie und im Zellkörper gefärbt (Abb. 32). Diese Strukturen wurden wie unten beschrieben als fokale Adhäsionen identifiziert.

Nach 18 h zeigten M2- und A7-Zellen weniger Phosphotyrosin-positive fokale Adhäsionen, die sich vorwiegend an der Zellperipherie befanden. Im Gegensatz zu den parentalen Zelllinien zeigten M2-CC1- und A7-CC1-Zellen bereits im nicht verwundeten konfluenten Zustand zusätzlich zu dem diffusen ein leicht punktartiges Muster nach Färbung mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper (ohne Abbildung). Innerhalb einer Stunde nach dem Setzen einer Wunde wiesen M2-CC1- und A7-CC1-Zellen eine deutlich stärkere Tyrosinphosphorylierung der fokalen Adhäsionen auf als M2- und A7-Zellen (Abb. 32).

Nach 18 h zeigten M2-CC1-Zellen eine mit M2-Zellen vergleichbare Tyrosinphosphorylierung der peripher gelegenen fokalen Adhäsionen und eine Tyrosinphosphorylierung in Zell-Zell-Kontaktbereichen. Nach 18 h glich das Phosphotyrosin-Muster in A7-CC1-Zellen weitgehend dem Muster, welches eine Stunde nach der Verwundung erhalten wurde. Zusätzlich zu den über den ganzen Zellkörper verteilten fokalen Adhäsionen wurden auch Zell-Zell-Kontakte durch den anti-Phosphotyrosin-Antikörper gefärbt.

Somit zeigen M2-, A7- und M2-CC1-Zellen, trotz der kurzfristigen Differenzen im F-Aktin-Aufbau (Abb. 31) und in der Tyrosinphosphorylierung (Abb. 32), einen vergleichbaren Langzeit-Turnover der fokalen Adhäsionen bei der Wund-induzierten Migration (Abb. 32). Nur die wenig motilen A7-CC1-Zellen erhielten die verstärkte Tyrosinphosphorylierung der fokalen Adhäsionen bei längerer Inkubation, so dass der gestörte Turnover der fokalen Adhäsionen eine mögliche Erklärung für die geringe Migration darstellt. Dies würde auch erklären, weshalb der Migrations-inhibierende Effekt in Transwell-Assays geringer ausfällt. Dort sind keine reifen fokalen Adhäsionen vorhanden, die negativ beeinflusst werden könnten.

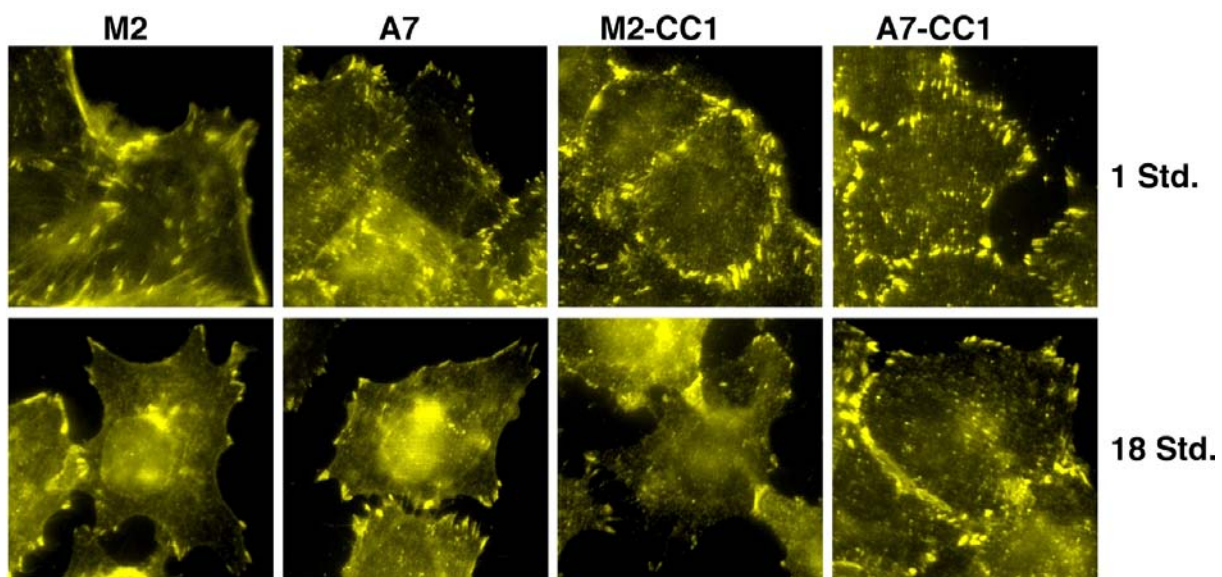


Abb. 32: CEACAM1-Expression verändert die Tyrosinphosphorylierung. Konfluente M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden 1 bzw. 18 h nachdem eine Wunde gesetzt wurde, fixiert, permeabilisiert und mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY99 gefärbt.

Die punkt- bis strichartigen, durch den anti-Phosphotyrosin-Antikörper erkannten Strukturen wurden durch Färbung der Zellen mit anti-Vinkulin- (Abb. 33A), anti- β 1-Integrin- und anti-Paxillin-Antikörper (ohne Abbildung) als fokale Adhäsionen identifiziert. Die Bindung von

Integrinen an Proteine der extrazellulären Matrix führt zur Phosphorylierung verschiedener Proteine. So werden z.B. die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin aktiviert, welche in die Funktion und den Turnover von fokalen Adhäsionen involviert sind [Crowe und Ohannessian, 2004; Ilic et al., 1995]

Um den Phosphorylierungs-Status dieser beiden Proteine zu untersuchen, wurden Phosphotyrosin-spezifische Immunpräzipitationen mit unbehandelten oder verwundeten Zellen durchgeführt (Abb. 33B, C). Die Proben wurden im Western-Blot analysiert und präzipitiertes Phospho-FAK oder Phospho-Paxillin wurde quantifiziert. Unbehandelte Zellen aller vier Zelllinien wiesen eine ähnlich starke Phosphorylierung von FAK und Paxillin auf. Wurden die Zellen verwundet, zeigen die beiden CEACAM1-L-transfizierten Zelllinien M2-CC1 und A7-CC1 eine deutlich höhere Verstärkung der FAK- und Paxillin-Phosphorylierung im Vergleich zu den parentalen M2- und A7-Zellen. FAK und Paxillin tragen also zumindest zum Teil zu der erhöhten Phosphorylierung der fokalen Adhäsionen in M2-CC1- und A7-CC1-Zellen bei.

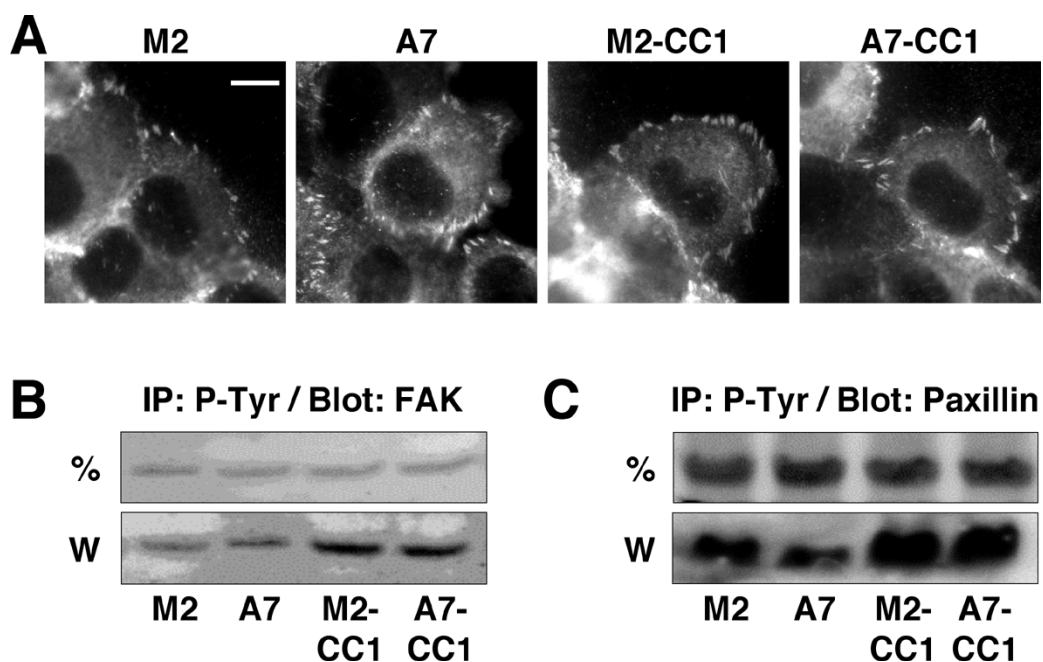


Abb. 33: Die Expression von CEACAM1 verändert die Tyrosinphosphorylierung von FAK und Paxillin. (A) Konfluente M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden 1 h nachdem eine Wunde gesetzt wurde fixiert, permeabilisiert und mit anti-Vinkulin-Antikörper gefärbt. Balken: 5 µm. (B, C) CEACAM1-Expression verändert die Tyrosinphosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin. Konfluente M2-, A7-, M2-CC1- und A7-CC1-Zellen wurden vor der Herstellung der Lysate entweder nicht weiter behandelt oder bekamen Wunden mit einer Multikanalpipette gesetzt und wurden dann 1 h inkubiert. Die Lysate wurden mit dem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper PY99 immunpräzipitiert, Blot: FAK (B) und Paxillin (C).

Die Bindung von CEACAM1 an Filamin A ist dynamisch

Filamin A ist ein Aktin-Zytoskelett-assoziiertes Protein. Es wurde daher untersucht, ob die Bindung von Filamin A an CEACAM1 in A7-CC1-Zellen unter Bedingungen, die zu einem Umbau des Aktin-Zytoskeletts führen, verändert ist. Migration und Adhäsion sind durch einen Aufbau an F-Aktin und Zell-Matrix-Kontakten gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu wird das ansonsten gut organisierte Aktin-Zytoskelett abgebaut, wenn die Zellen keine Matrix zum Adhärenz vorfinden. Aus den Lysaten unbehandelter, konfluenter A7-CC1-Zellen wurde 1% ($\pm 0,3\%$) des Gesamt-Filamin A kopräzipitiert (Abb. 34). Wurde Migration durch Verwundung konfluenter Zellen induziert oder durften die Zellen frisch adhären, erhöhte sich die Menge des kopräzipitierten Filamin A deutlich auf 2,6% ($\pm 0,4\%$) und 2,7% ($\pm 0,7\%$) des Gesamt-Filamin A. Wurden die Zellen aber in Suspension gehalten, reduzierte sich die Menge des kopräzipitierten Filamin A auf 0,11% ($\pm 0,13\%$) des Gesamt-Filamin A. Diese Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Zell-Matrix-Adhäsion und der Stärke der CEACAM1-L-Filamin A-Interaktion hin.

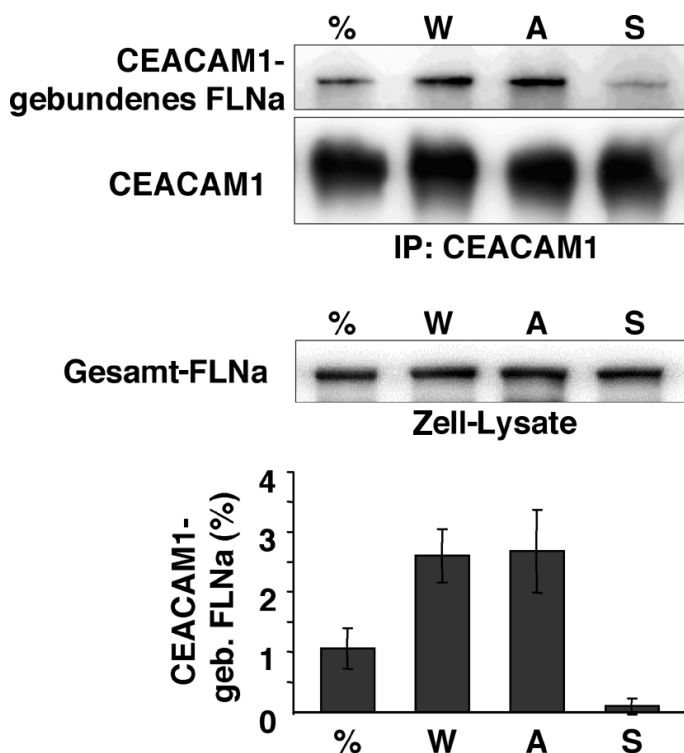


Abb. 34: Die Bindung von CEACAM1-L an Filamin A ist dynamisch. Konfluente A7-CC1-Zellen wurden entweder nicht behandelt (" %"), bekamen Wunden mit einer Multikanalpipette gesetzt und wurden 1 h inkubiert ("W"), durften 1 h auf Zellkulturschalen adhären ("A") oder wurden für 1 h in Suspension gehalten ("S"). Aliquots der Lysate mit angeglichenen Proteinmengen wurden geblottet. Die restlichen Lysate (gleiche Proteinmengen) wurden mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4/3/17 präzipitiert. Blot: 4/3/17, FLMN01 (anti-Filamin A). Die Mengen des kopräzipitierten Filamin A sowie des Gesamt-Filamin A wurden quantifiziert und der prozentuale Anteil des kopräzipitierten Filamin A am Gesamt-Filamin A berechnet.

CEACAM1-L hat keinen Einfluss auf die A-RalA-Aktivierung

Ohta et al. (1999) zeigten, dass die kleine GTPase RalA an den Filamin-Repeat 24 bindet und so die Migration reguliert. Die in dieser Studie benutzten Melanom-Zelllinien exprimieren RalA gleich stark (ohne Abbildung). Um die Aktivierung von RalA zu bestimmen, wurden Affinitätspräzipitationen mit der Ral-Bindedomäne des Ral-Binde-Proteins-1 durchgeführt (Abb. 35).

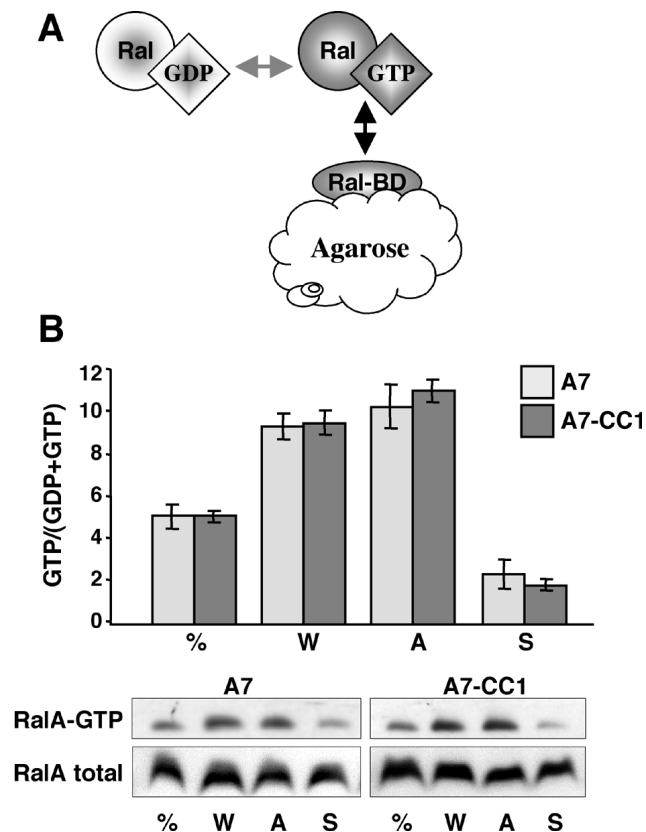


Abb. 35: Die Expression von CEACAM1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von RalA. (A) Schematische Darstellung der Ral-GTP-Affinitätspräzipitation. (B) Konfluente A7- und A7-CC1-Zellen wurden entweder nicht behandelt (" %"), bekamen Wunden mit einer Multikanalpipette gesetzt und wurden dann 1 h inkubiert ("W"), durften 1 h auf Zellkulturschalen adhären ("A") oder wurden für 1 h in Suspension gehalten ("S"). Aliquots der Lysate mit angeglichenen Proteinmengen wurden geblottet. Die restlichen Lysate (gleiche Proteinmengen) wurden mit immobilisierter Ral-Bindedomäne (RalBD) des Ral-Binde-Protein-1 präzipitiert. Blot: anti-RalA. Die Mengen des präzipitierten RalA-GTP sowie des Gesamt-RalA wurden quantifiziert und der prozentuale Anteil des GTP-gebundenen RalA am Gesamt-RalA berechnet.

Die Ral-Bindedomäne bindet spezifisch an die GTP-gebundene, aktive Form des RalA und lag als GST-Fusionsprotein an Glutathion-Agarose gekoppelt vor (Abb. 35A). Um zu untersuchen, ob die Expression von CEACAM1 einen Einfluss auf die Aktivierung von RalA hat, wurden Affinitätspräzipitationen von A7- und A7-CC1-Zellen unter den gleichen Bedingungen getestet, die die Stärke der Interaktion von CEACAM1 und Filamin A verändert haben (Abb. 35B). Die Präzipitate wurden geblottet und mit RalA-spezifischem Antikörper entwickelt, so dass der Anteil an GTP-gebundenem RalA bestimmt werden konnte. Um einen Vergleich zum Gesamt-RalA zu ermöglichen, wurden auch Aliquots der eingesetzten Lysate geblottet und die RalA-Menge (GTP+GDP) quantifiziert. Dies war möglich, da der eingesetzte RalA-spezifische Antikörper nicht zwischen GTP- und GDP-gebundener Form diskriminiert. In unbehandelten A7- und A7-CC1-Zellen (" %") betrug der Anteil von RalA-

GTP etwa 5% des Gesamt-RalA. Wurden konfluente A7- und A7-CC1-Zellen mit einer Multikanalpipette verwundet ("W") oder durften die Zellen für 1 h adhären ("A"), verdoppelte sich die Menge an aktiviertem RalA und stieg auf etwa 10% RalA-GTP an. Wurden beide Zelllinien in Suspension gehalten ("S"), war eine leichte Reduzierung auf etwa 2,5% RalA-GTP zu verzeichnen. A7- und A7-CC1-Zellen zeigen also eine ähnlich starke Aktivierung von RalA unter den hier getesteten Bedingungen.

Die Bindung von CEACAM1-L an Filamin A inhibiert die Filamin A-RalA-Interaktion

RalA interagiert nur in GTP-gebundener Form mit dem Repeat 24 von Filamin A. Da der Repeat 24 auch CEACAM1-L bindet, sollte untersucht werden, ob die CEACAM1-L-Filamin A-Interaktion einen Einfluss auf den RalA-Filamin A-Signalweg hat. Dazu wurden die oben beschriebenen Western-Blots auch für kopräzipitiertes Filamin A entwickelt (Abb. 36).

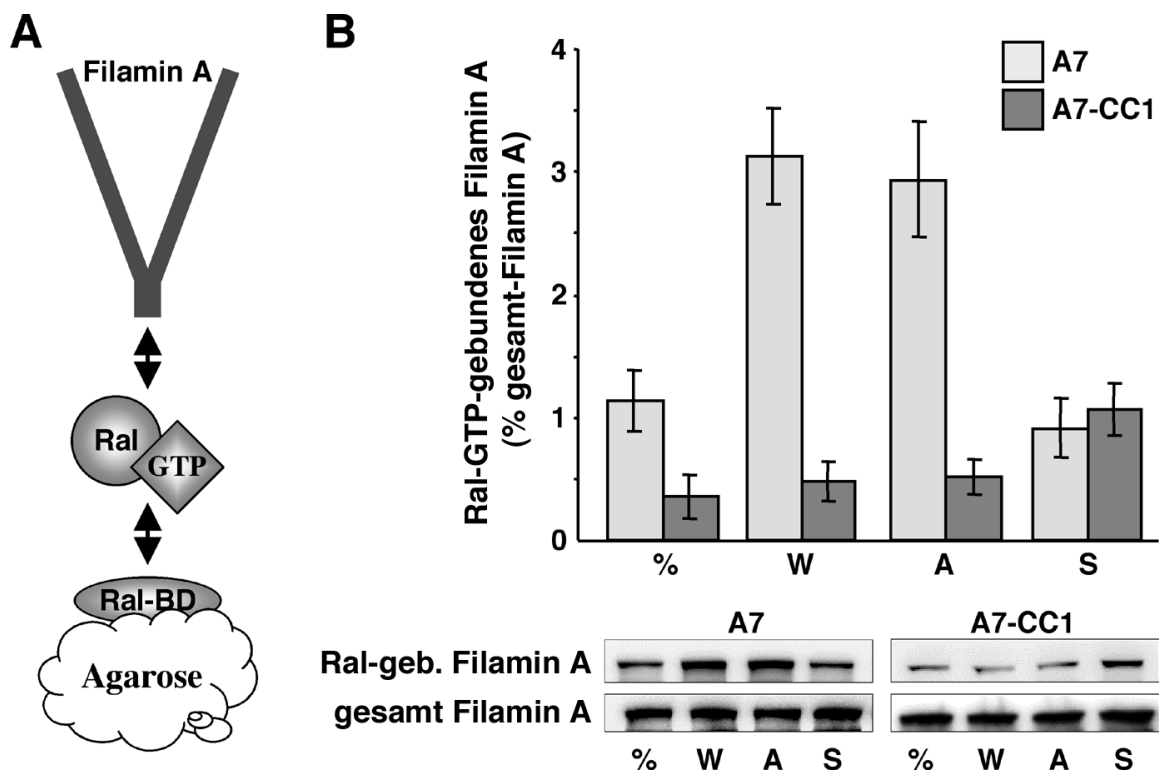


Abb. 36: Die Bindung von RalA an Filamin A wird durch die Überexpression von CEACAM1 beeinflusst. Die in Abb. 35 gezeigten Western-Blots wurden mit dem Antikörper FLMN01 entwickelt, um durch RalA kopräzipitiertes Filamin A zu detektieren. (A) Schematische Darstellung der Kopräzipitation. (B) Blot: FLMN01. Die Mengen des kopräzipitierten Filamin A sowie des Gesamt-Filamin A wurden quantifiziert und der prozentuale Anteil des kopräzipitierten Filamin A am Gesamt-Filamin A berechnet.

In unbehandelten ("") oder in Suspension gehaltenen ("S") A7-Zellen wurde etwa 1% des Gesamt-Filamin A kopräzipitiert. Verwundung ("W") oder Adhäsion ("A") führten zu einer Verdreifachung des kopräzipitierten Filamin A (ca. 3%). Es scheint also eine Korrelation zwischen der Konzentration an GTP-RalA und der Menge an kopräzipitiertem Filamin A zu bestehen. In A7-CC1-Doppeltransfektanten zeigte sich ein völlig anderes Bild. In unbehandelten, verwundeten und adhätierenden A7-CC1-Zellen wurde unabhängig von der RalA-GTP-Menge eine stark reduzierte Menge an kopräzipitiertem Filamin A gefunden. Es wurden jeweils nur 0,3 bis 0,5% des Gesamt-Filamin A gebunden. Nur wenn die A7-CC1-Zellen in Suspension gehalten wurden, wurde auch eine mit A7-Zellen vergleichbare Menge an Filamin A von ca. 1% gebunden.

In Abwesenheit einer CEACAM1-Expression (A7-Zellen) ist die Menge des GTP-gebundenen RalA scheinbar proportional zu der Menge des kopräzipitierten Filamin A. Während in A7-Zellen also eine von der RalA-GTP-Menge begrenzte Bindung stattfand, wurde durch die Überexpression von CEACAM1 in A7-CC1-Zellen die Interaktion von Filamin A mit RalA verhindert. Nur wenn die A7-CC1-Zellen in Suspension gehalten wurden und CEACAM1-L nicht mit Filamin A interagierte, war RalA in der Lage, an Filamin A zu binden. Auf jeden Fall scheint dieses komplexe Zusammenspiel der drei Proteine einen möglichen Mechanismus zur Regulation der Migration darzustellen. Wie dieser Mechanismus in endogenen Systemen reguliert wird, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.