

III. CEACAM1-L interagiert mit Poldip2

Charakterisierung des Yeast-Two-Hybrid-Poldip2-Klons

Der zweite im Yeast-Two-Hybrid-Screen identifizierte Interaktionspartner von CEACAM1-L ist das Poldip2 (*Polymerase- δ -interacting protein 2*). Das humane Homolog des Poldip2 wurde unter dem Namen PDIP38 (*Polymerase- δ -Interacting Protein MW 38 kDa*) als direkter Interaktionspartner der p50-Untereinheit der humanen Polymerase- δ identifiziert [Liu et al., 2003]. Außerdem wurde eine Interaktion mit dem "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA) beschrieben und eine Funktion im Prozess der DNA-Replikation und Reparatur postuliert. Neueste Daten belegen, dass Poldip2 die Funktion der Polymerase- δ in HeLa-Zellen inhibieren kann [Xie et al., 2005].

Der Yeast-Two-Hybrid-Klon #528 ist 470 Basenpaare lang und stimmt in der Sequenz mit der veröffentlichten cDNA des Ratten-Homologes von Poldip2 überein. Im Gegensatz zum humanen Poldip2 wurde das Ratten-Homolog von Poldip2 bisher nur als theoretisches Protein beschrieben (Acc.-Nr.: XM_237790), dessen mRNA-Sequenz aufgrund von automatischen, Computer-unterstützten Analysen der genomischen Sequenz NW_047336 vorausgesagt wurde. 227 Basenpaare des Yeast-Two-Hybrid-Klons #528 kodieren den C-Terminus des Ratten-Poldip2, die restliche Sequenz liegt im 3'-nicht-translatierten Bereich (UTR) der Ratten-Poldip2-cDNA.

Wie im Sequenzvergleich in Abb. 37 zu erkennen ist, sind die homologen Poldip2-Proteine aus dem Menschen (Acc.-Nr.: BC009265), der Maus (*Mus musculus*, Acc.-Nr.: BC012879), der Ratte (*Rattus norvegicus*, Acc.-Nr.: XM_237790), dem Hund (*Canis familiaris*, Acc.-Nr.: XM_548282) und dem Huhn (*Gallus gallus*, Acc.-Nr.: NM_001030717), bis hin zum Zebrafisch (*Danio rerio*, Acc.-Nr.: NM_212714) hoch konserviert. Diese Konservierung betrifft vor allem die 315 C-terminalen Aminosäuren von insgesamt 353 bis 376 vorhandenen Aminosäuren in den obengenannten Wirbeltieren. Der N-Terminus scheint eher variabel zu sein und differiert teilweise auch in der Länge, obwohl zwischen Maus, Hund und Mensch auch hier noch hohe Übereinstimmungen zu finden sind. Das komplette murine und humane Poldip2 besteht aus 369 Aminosäuren.

Charakterisierung von Poldip2 auf RNA-Ebene

Das Expressionsmuster der mRNA von Poldip2 wurde durch Northern-Blots dargestellt. Es wurde sowohl die Gewebeverteilung im Menschen untersucht wie auch die Transkription verschiedener Zelllinien aus Mensch, Maus und Ratte. Da Poldip2 sehr stark konserviert ist, konnte für alle drei untersuchten Spezies die cDNA-Sonde des humanen Poldip2 benutzt werden.

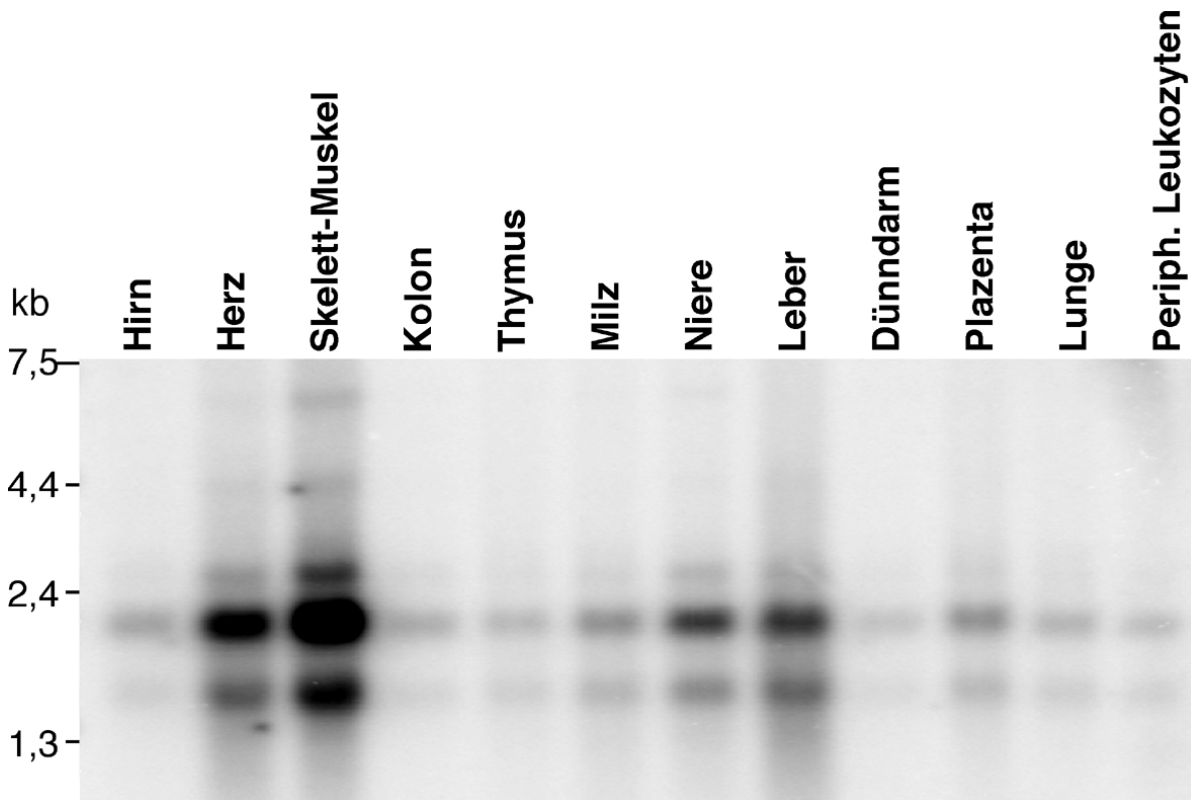


Abb. 38: Northern-Blot verschiedener humaner Gewebe. Es wurde der ‘Human 12lane MTN-Blot’ von BD Biosciences verwendet. Die Membran wurde mit $[P^{32}]dCTP$ markierter humaner Poldip2-cDNA hybridisiert. Die Auswertung erfolgte am Phospho-Imager.

Zunächst wurde ein humaner Gewebe-Blot mit der Poldip2-Sonde hybridisiert (Abb. 38). Poldip2-mRNA ist in allen getesteten Geweben exprimiert, am stärksten in Skelettmuskel, Herz, Leber und Niere. Es sind mindestens zwei Banden von ca. 2200 bp und 1500 bp zu erkennen. Die obere Bande entspricht in ihrer Größe in etwa der bisher bekannten Poldip2-cDNA. Ob die untere Bande eine kleinere Splicevariante darstellt, kann erst durch eine RT-PCR mit anschließender Sequenzierung verifiziert werden. Bei den stärkeren Signalen sind noch drei weitere, schwächere Banden bei 2800 bp, 4500 bp und 6500 bp zu erkennen.

Um zu untersuchen, ob sich die ubiquitäre Expression auch über Zellen epithelialen, endothelialen und hematopoietischen Ursprungs erstreckt, wurde eine Northern-Blot-Analyse

für verschiedene Zelllinien aus dem chinesischen Streifenhamster, der Maus, der Ratte und dem Menschen durchgeführt (Abb. 39). Die Membranen wurden mit der humanen Poldip2-Sonde hybridisiert.

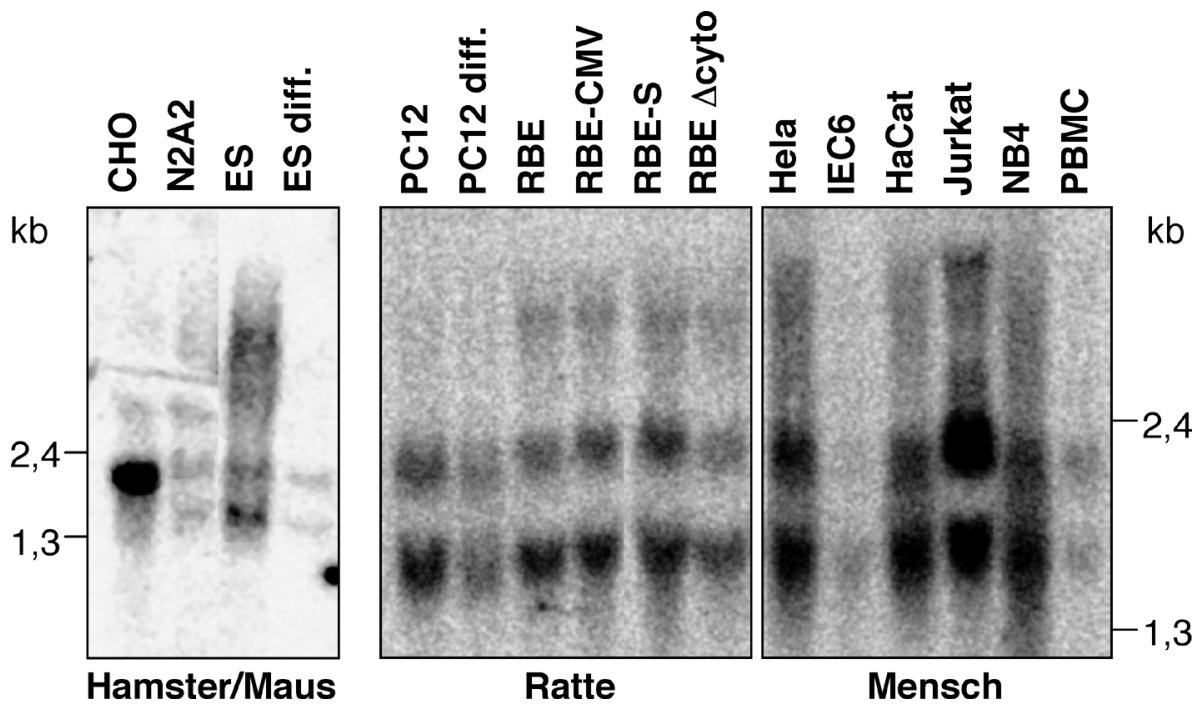


Abb. 39: Northern-Blot verschiedener Zelllinien. Es wurde RNA aus den folgenden Zelllinien und primären Zellen isoliert und geblottet: Chinesischer Streifenhamster: CHO (epithelial); Maus: N2A2 (neuronal); ES (Embryonale Stammzellen) undifferenziert und zu Kardiomyozyten differenziert (diff.); Ratte: PC12 (neuronaler Ursprung) undifferenziert und neuronal differenziert (diff.); RBE (endothelial) Wildtyp (wt), Vektortransfiziert (CMV), CEACAM1- Δ cyto (deletierte zytoplasmatische Domäne) und CEACAM1-S (kurze Isoform) transfiziert; Mensch: HeLa (epithelial); IEC6 (epithelial); HaCat (Keratinocyten); Jurkat (T-Zell Ursprung); NB4 (monozytärer Ursprung); PBMC (*Peripheral Blood Monocytic Cells*, primäre Zellen). Es wurden je 10 μ g Gesamt-RNA geblottet, mit Ausnahme von ES-Zellen und PBMC, von denen ca. 2 μ g Gesamt-RNA geblottet wurden. Die Membranen wurden mit [P^{32}]dCTP-markierter humaner Poldip2-cDNA-Sonde hybridisiert. Die Auswertung erfolgte am Phospho-Imager.

Poldip2 wird in allen untersuchten Zellen auf RNA-Ebene exprimiert (Abb. 39). Es sind die selben Bandenmuster wie auf dem Gewebe-Blot zu erkennen. Vor allem die sehr starke Doppelbande mit 1500bp und 2200bp ist Spezies-übergreifend. Banden oberhalb dieser zwei Transkripte sind zwar in Maus, Ratte und Mensch vorhanden, differieren allerdings in ihrer Größe. Ein anderes Muster zeigen die CHO-Zellen, bei denen nur eine einzige starke Bande von ca. 2000bp zu erkennen ist. Interessanterweise scheinen differenzierte ES-Zellen und PC12-Zellen weniger Poldip2-mRNA zu besitzen als undifferenzierte.

Herstellung des Poldip2-GST-Fusionsproteins für Bindungsassays

Um zu untersuchen, ob die im Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundene Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne der langen CEACAM1 Isoform und dem Poldip2-C-Terminus direkt oder indirekt ist, wurden wieder Affinitätspräzipitationen und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-basierte ("BIAcore"-) Messungen durchgeführt. Die in Abschnitt 4.2.2. beschriebene, His-getagte zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L (CC1-zyto-His) und das Kontrollprotein (Kontroll-His) wurden auch hier benutzt (Abb. 40A).

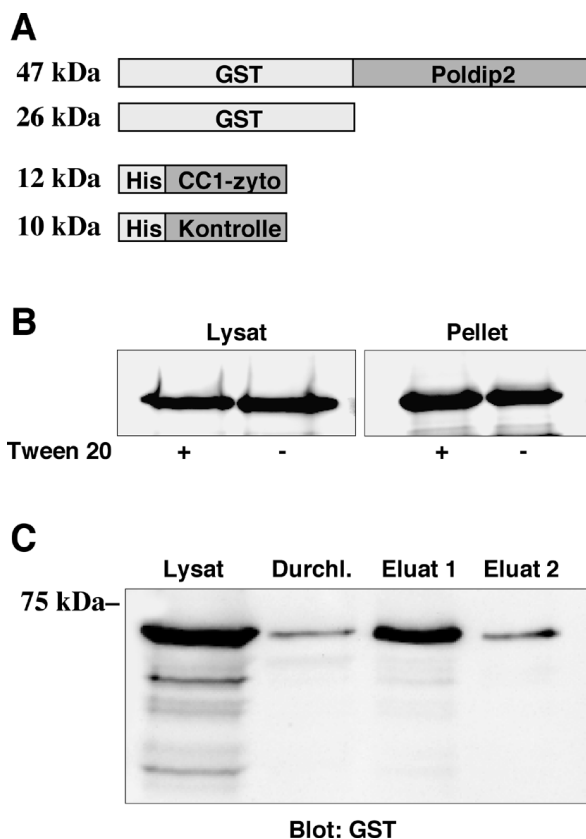


Abb. 40: Reinigung von GST-Poldip2.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine "GST-Poldip2", "GST", "CC1-zyto-His" und "Kontroll-His". (B) GST-Poldip2-transfizierte *E. coli* wurden mit oder ohne 1% Tween 20 im Lysepuffer mit der Frier-Tau-Methode 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) Es wurden Lysate von GST-Poldip2-exprimierenden Bakterien hergestellt und über Glutathion-Sepharose-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.

Auf Grund des hohen Konservierungsgrades wurde mit der murinen Poldip2-cDNA gearbeitet. Diese lag als IMAGE-Klon mit der vollständigen Sequenz vor (Acc.-Nr.: BC012879) und musste nur in den Vektor pGEX4T umkloniert werden, so dass das murine Poldip2 als GST-Fusionsprotein exprimiert werden konnte (Abb. 40A). Die Klonierung sowie die verwendeten Schnittstellen sind detailliert im Material-und-Methoden-Abschnitt aufgeführt. Der GST-Fusionsanteil umfasst ca. 26 kDa, der Poldip2-Anteil ca. 38 kDa. Daraus ergibt sich für das Fusionsprotein GST-Poldip2 eine Größe von ca. 64 kDa. Das Standardprotokoll zur Protein-Expression in BL21-*E. coli* wurde wie für den Filamin-GST-Klon beschrieben optimiert. In Abb. 40B ist zu erkennen, dass auch hier die Zugabe von Detergenz zum Lysepuffer die Löslichkeit des Fusionsproteins nicht erhöhte. Die Expression

erfolgte unter verstärktem Schütteln bei Raumtemperatur. Die Reinigung des Poldip2-GST-Fusionsproteins erfolgte wie im Material-und-Methoden-Abschnitt beschrieben über Glutathion-Sepharose-Säulen (Abb. 40C).

CEACAM1-L und Poldip2 interagieren direkt in Affinitätspräzipitationen

Zunächst wurden die beiden gereinigten Komponenten GST-Poldip2 und CC1-zyto-His für Affinitätspräzipitationen eingesetzt. Dazu wurden GST-Poldip2 sowie als Kontrolle GST an Glutathion-Sepharose gebunden. Die immobilisierten Proteine wurden dann mit CC1-zyto-His bzw. mit His-getagtem Kontrollprotein inkubiert, gewaschen und geblottet.

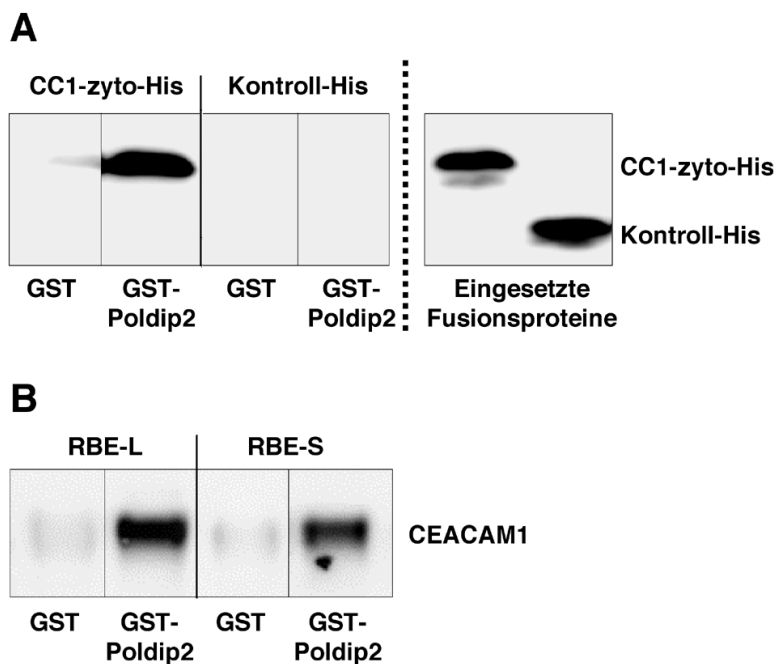


Abb. 41: CEACAM1 bindet Poldip2 direkt.

(A) Affinitätspräzipitation der zytoplasmatischen Domäne der langen CEACAM1-Isoform durch Poldip2. GST-Poldip2 bzw. GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit gereinigtem CC1-zyto-His oder Kontroll-His inkubiert, gewaschen und geblottet. Präzipitierte His-Fusionsproteine wurden durch den anti-Xpress-Antikörper nachgewiesen. Das rechte Panel zeigt die eingesetzten His-Fusionsproteine.

(B) Affinitätspräzipitation von CEACAM1-L und CEACAM1-S aus RBE-Zellysaten durch Poldip2. GST-Poldip2 bzw. GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Lysaten von CEACAM1-L- bzw. CEACAM1-S-transfizierten RBE-Zellen inkubiert, gewaschen und geblottet. Assoziiertes CEACAM1-L und -S wurde durch den Ratten-CEACAM1-spezifischen Antikörper Be9.2 nachgewiesen.

Der zytoplasmatische Teil von CEACAM1 (CC1-zyto), der auch im Yeast-Two-Hybrid-Assay als Köder diente, wurde in Affinitätspräzipitationen nur durch GST-Poldip2, nicht aber durch GST gebunden (Abb. 41A). Keines der beiden GST-Konstrukte hat das Kontrollprotein gebunden. Die Affinitätspräzipitation *vice versa* mit immobilisierten His-getagten Proteinen

durchzuführen, war - wie bereits beschrieben - nicht möglich, da alle GST-Konstrukte Interaktionen mit der Nickel-NTA-Matrix zeigten und gebunden wurden (ohne Abbildung).

Außerdem konnte eine Bindung von CEACAM1 aus Zelllysaten durch GST-Poldip2 mittels Affinitätspräzipitationen gezeigt werden. Es wurden verschieden transfizierte RBE-Zellen (*Rat Brain Endothelial cells*) verwendet. Für die Affinitätspräzipitation wurden GST und GST-Poldip2 an Glutathion-Sepharose gebunden und mit den Zelllysaten aus CEACAM1-L- bzw. CEACAM1-S-transfizierten RBE-Zellen inkubiert. Beide CEACAM1-Isoformen wurden durch GST-Poldip2, nicht aber durch GST alleine gebunden (Abb. 41B). Ob die Bindung von CEACAM1-S an Poldip2 direkt war oder über Adapterproteine vermittelt wurde muß noch untersucht werden.

Messung und Berechnung der Bindungskonstanten der Interaktion zwischen CEACAM1-L und Poldip2 durch SPR-basierte Analyse

Um die in den Affinitätspräzipitationen gefundene direkte Interaktion von CEACAM1-L und Poldip2 zu bestätigen und um eine quantitative Aussage über die Bindung zu erhalten, wurden Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (SPR-) basierte Messungen der Bindung mit einem BIAcore2000-Gerät durchgeführt. Der bereits für die SPR-Analyse der Filamin A-Bindung beschriebene CM5-Chip mit den immobilisierten zytoplasmatischen Domänen von CEACAM1-L (CC1-zyto-His) und von $\alpha 3$ -Integrin ($\alpha 3$ -zyto-His, Kontrolle) wurde auch für diese Messungen benutzt. Verschiedene Konzentrationen von GST-Poldip2 wurden appliziert und deren Bindung an die beiden immobilisierten Proteine gemessen.

Die primären Sensogramme für die Bindung von 75 nM GST-Poldip2 an CC1-zyto und an die Kontrolle sind in Abb. 42A dargestellt. Der spontane Anstieg des Signals bei Beginn der Injektion (bei 100 s), der auch in der Kontrollzelle zu erkennen ist, ist wiederum auf den sog. Puffersprung zurückzuführen, d.h., die Inhaltsstoffe des GST-Poldip2-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 zu verzeichnen und das Sensoramm geht auf die Nulllinie zurück, während das Sensogramm der CC1-zyto beschichteten Zelle eine deutliche Bindung zeigt. In Abb. 42B sind die Sensogramme für die Bindungskinetik von 30, 45, 60 und 75 nM GST-Poldip2 mit abgezogenem Hintergrund dargestellt. 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 konzentrationsabhängige Bindung von GST-Poldip2 an CC1-zyto. Eine Sättigung der Bindung wurde nicht erreicht.

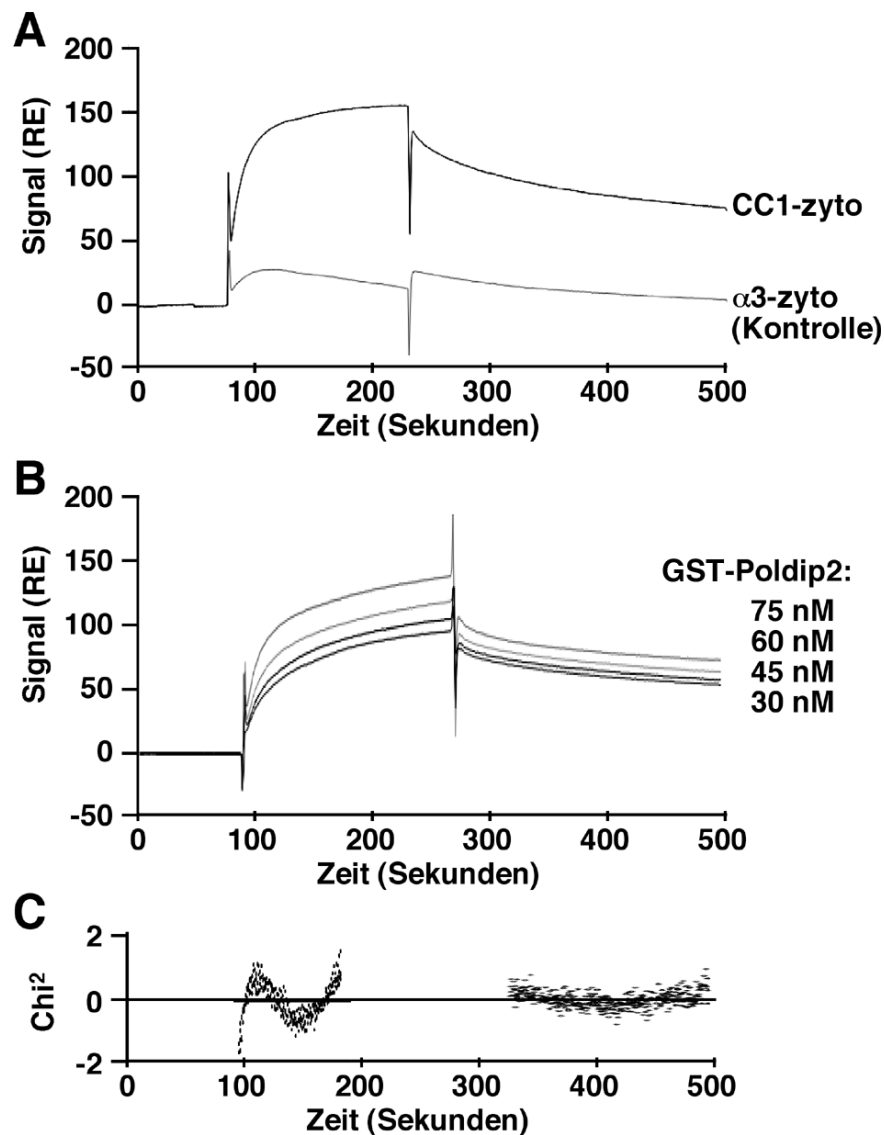


Abb. 42: Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-basierte Bindungskinetiken von Poldip2 (GST-Poldip2) an die immobilisierte zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L (CC1-zyto-His). (A) Primäre Sensogramme der Echtzeit-Bindung von 75 nM GST-Poldip2 an die mit CC1-zyto-His-beschichtete Durchflusszelle bzw. an die mit α 3-Cyto-His-beschichtete (Kontroll-) Durchflusszelle. (B) Repräsentative Sensogramme der Echtzeit-Bindung verschiedener Konzentrationen von GST-Poldip2 an CC1-zyto-His mit abgezogenem Hintergrund (entsprechende Werte der Kontrollzelle). Es wurden die folgenden Konzentrationen GST-Poldip2 eingesetzt: 30, 45, 60 und 75 nM (von unten nach oben). RE, Relative Einheit (C) Abweichungen der in (B) gezeigten Sensogramme im Vergleich zu den theoretischen Sensogrammen einer 1:1-Langmuir-Bindung mit entsprechenden Molekulargewichten und Konzentrationen, dargestellt als Chi^2 . Die gezeigten Abweichungen umfassen die für die Berechnungen der Bindungskonstanten k_{on} und k_{off} verwendeten Bereiche 100 s - 200 s und 350 s - 500 s auf der X-Achse.

Wie bereits für die SPR-Messungen des GST-Filamin-Konstruktes, war auch hier die Berechnung der Bindungskonstanten kompliziert, da die Bindung von GST-Poldip2 an CC1-zyto ebenfalls über einige Bereiche nicht einer 1:1-Bindung entspricht. Wie bereits für die Filamin-Bindung besprochen, könnte die Ursache hierfür eine zweite Bindungsstelle sein oder

aber eine Multimerisierung des GST-Poldip2. Es wurden wiederum nur die Bereiche der Sensogramme von 100 bis 200 s und von 350 bis 500 s auf der X-Achse zur Berechnung der Bindungskonstanten benutzt, welche hochsignifikante Übereinstimmungen mit dem Langmuir-Modell einer 1:1-Bindung zeigten.

Wie in Abb. 42C gut zu erkennen ist, treten sehr geringe, aber systematische Abweichungen (dargestellt als χ^2) für die Bindung von GST-Poldip2 an CC1-zyto auf. Von allen in der BIAevaluation-Software vorgegebenen Bindungsmodellen kam im ausgewählten Bereich die 1:1-Bindung unseren Messungen am nächsten. Die Berechnungen ergaben die folgenden Werte für die Bindung von GST-FLNa an CC1-zyto:

$$k_{\text{on}} = 4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\chi^2=0,362)$$

$$k_{\text{off}} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \quad (\chi^2=0,034)$$

$$K_D = 2 \times 10^{-9} \text{ M} \quad (K_A = 4,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1})$$

Diese Werte liegen im Bereich der für Fiamin A bestimmten Konstanten und stimmen auch mit anderen durch SPR-basierte Messungen erfasste Interaktionen von CEACAM1, wie z.B. mit Calmodulin oder Annexin, überein [Edlund et al., 1996; Kirshner et al., 2003].

Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen Poldip2

Nachdem die Immunisierung einer Maus und zweier Kaninchen mit dem (Maus-) Poldip2-GST-Fusionsprotein nicht erfolgreich war, wurde die Firma Pineda (Berlin) mit der Immunisierung durch Peptide beauftragt. Mittels computerunterstützter Analyse zur Bestimmung der Antigenizität wurde das in Abb. 43A dargestellte Peptid für die Immunisierung ausgewählt. Das Serum des Kaninchens wurde auf eine Interaktion mit Poldip2 untersucht. Nach ersten positiven Befunden wurde IgG aus dem Serum gereinigt und der gereinigte polyklonale Antikörper (D8R2) genauer charakterisiert.

D8R2 erkannte in RBE-Zelllysaten und CHO-Zelllysaten zwei Banden von ca. 38 kDa und 75 kDa (Abb. 43B). Die untere Bande entspricht der für Poldip2 beschriebenen Größe: Poldip2 läuft bei ca. 38 kDa und nicht bei den berechneten 42 kDa [Liu et al., 2003]. Wurde mit D8R2 immunpräzipitiert, konnte im Western-Blot nur noch die (angereicherte) Bande bei 38 kDa detektiert werden. Dies bedeutet einerseits, dass D8R2 sowohl natives als auch denaturiertes Poldip2 erkennt. Andererseits taucht die kreuzreaktive Bande bei 75 kDa nach einer Immunpräzipitation nicht wieder auf, so dass diese als unspezifisch angesehen werden muss und nur denaturierte Proteine betrifft.

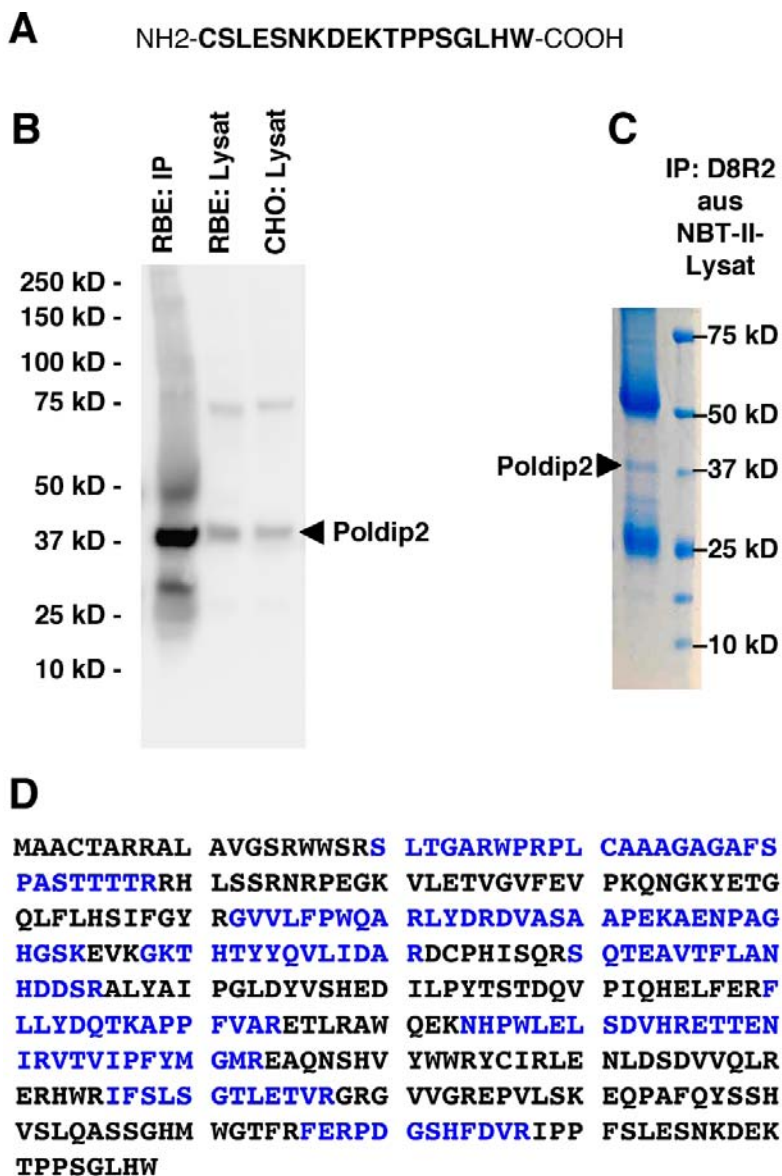


Abb. 43: Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen anti-Poldip2-Antikörpers D8R2.

(A) Sequenz des für die Immunisierung verwendeten Poldip2-Peptides. (B) Eine Immunpräzipitation mit 5 µg D8R2 aus RBE-Zellen (linke Spur) und Zelllysate von RBE- und CHO-Zellen wurden geblottet und mit D8R2 entwickelt.

(C) Coomassie-gefärbtes Lämmli-Gel einer Immunpräzipitation mit 5 µg D8R2 aus NBT-II-Zellen. Die markierte Bande bei 38 kDa wurde ausgeschnitten, Trypsin-verdaut und für eine MALDI-TOF MS-Analyse verwendet. (D) Vergleich der Peptid-Massen der MALDI-TOF MS-Analyse mit Massen aus dem theoretischen Trypsin-Verdau. Poldip2 wurde mit 14 übereinstimmenden Peptid-Massen identifiziert, die 47% der Sequenz abdeckten (blau) ($p < 0,02$).

Um die Spezifität des D8R2 und die Identität der 38 kDa-Bande zu verifizieren, wurde nach einer Immunpräzipitation aus NBT-II-Zellen die 38 kDa-Bande aus einem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten (Abb. 43C), Trypsin-verdaut und einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte zunächst mithilfe der über das Internet nutzbaren Suchmaschine Mascot [Perkins et al., 1999]. Für die Suche wurden bis zu zwei Fehlschnittstellen und eine Abweichung der Massen von $\pm 0,1$ Da bzw. ± 50 ppm erlaubt und keine Modifikationen angegeben. Es wurde ohne Einschränkung auf Spezies in der nicht redundanten (nr) NCBI-nr-Datenbank gesucht.

Die erhaltenen Datensätze mit hoher Übereinstimmung entsprachen alle entweder dem humanen oder dem murinen Poldip2. Die aus der MALDI-TOF MS-Analyse erhaltenen Peptid-Massen wurden anschließend mit den aus einem theoretischen Trypsin-Verdau

erhaltenen Massen verglichen. Poldip2 konnte mit 14 übereinstimmenden Peptid-Massen, die 47% der Sequenz abdeckten, mit hoher Signifikanz ($p < 0,02$) identifiziert werden (Abb. 43D). Somit wurde die Spezifität des polyklonalen Antikörpers D8R2 für Poldip2 verifiziert und D8R2 für weitere Versuche eingesetzt.

CEACAM1 interagiert mit Poldip2 *in vivo*

Um die in Affinitätspräzipitationen gefundene Interaktion von CEACAM1-L und Poldip2 *in vivo* zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitationen in RBE-Zellen durchgeführt.

Als Kontrolle wurden mit leerem Vektor transfizierte RBE ("Mock") verwendet und Präzipitationen mit Präimmunsereum-IgG (ohne Abbildung) durchgeführt. Um zu testen, ob die Bindung von der CEACAM1-L-Tyrosinphosphorylierung abhängt, wurden neben CEACAM1-L-transfizierten RBE auch mit verschiedenen CEACAM1-L-Tyrosin-Mutanten transfizierte RBE verwendet (Y488,513F; Y488F; Y513F). Da alle CEACAM1-L-Varianten von Poldip2 kopräzipitiert wurden (Abb. 44), scheint die Tyrosinphosphorylierung für die Interaktion keine Rolle zu spielen.

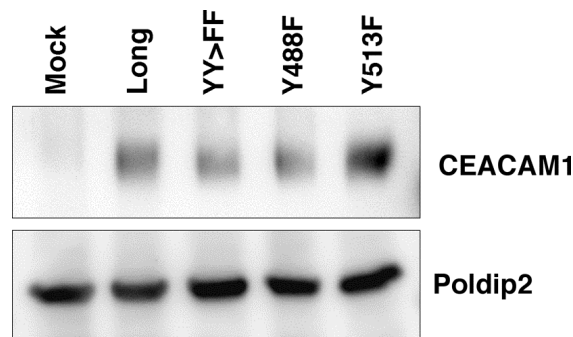


Abb. 44: CEACAM1 interagiert mit Poldip2 *in vivo*. RBE-Zellen transfiziert mit Leervektor ("Mock"), CEACAM1-L ("Long"), CEACAM1-L-Y488,513F ("YY>FF"), CEACAM1-L-Y488F ("Y488F") und CEACAM1-L-Y513F ("Y513F") wurden mit Protein-G-Sepharose und 4 μ g D8R2-Antikörper inkubiert. Blot: D8R2 (anti-Poldip2); Be9.2 (anti-CEACAM1).

Poldip2-Lokalisation im Zytoplasma und im Kern von RBE-Zellen

Da Poldip2 als Polymerase δ - und PCNA-interagierendes Protein beschrieben wurde [Liu et al., 2003], sollte untersucht werden, ob Poldip2 tatsächlich im Kern lokalisiert ist. Hierzu sollten Kern-Zytosol-Fraktionierungen durchgeführt werden. Es wurden Ratten-Endothelzellen (RBE) verwendet, die im Northern-Blot ein deutliches Poldip2-mRNA-Signal zeigten (Abb. 39).

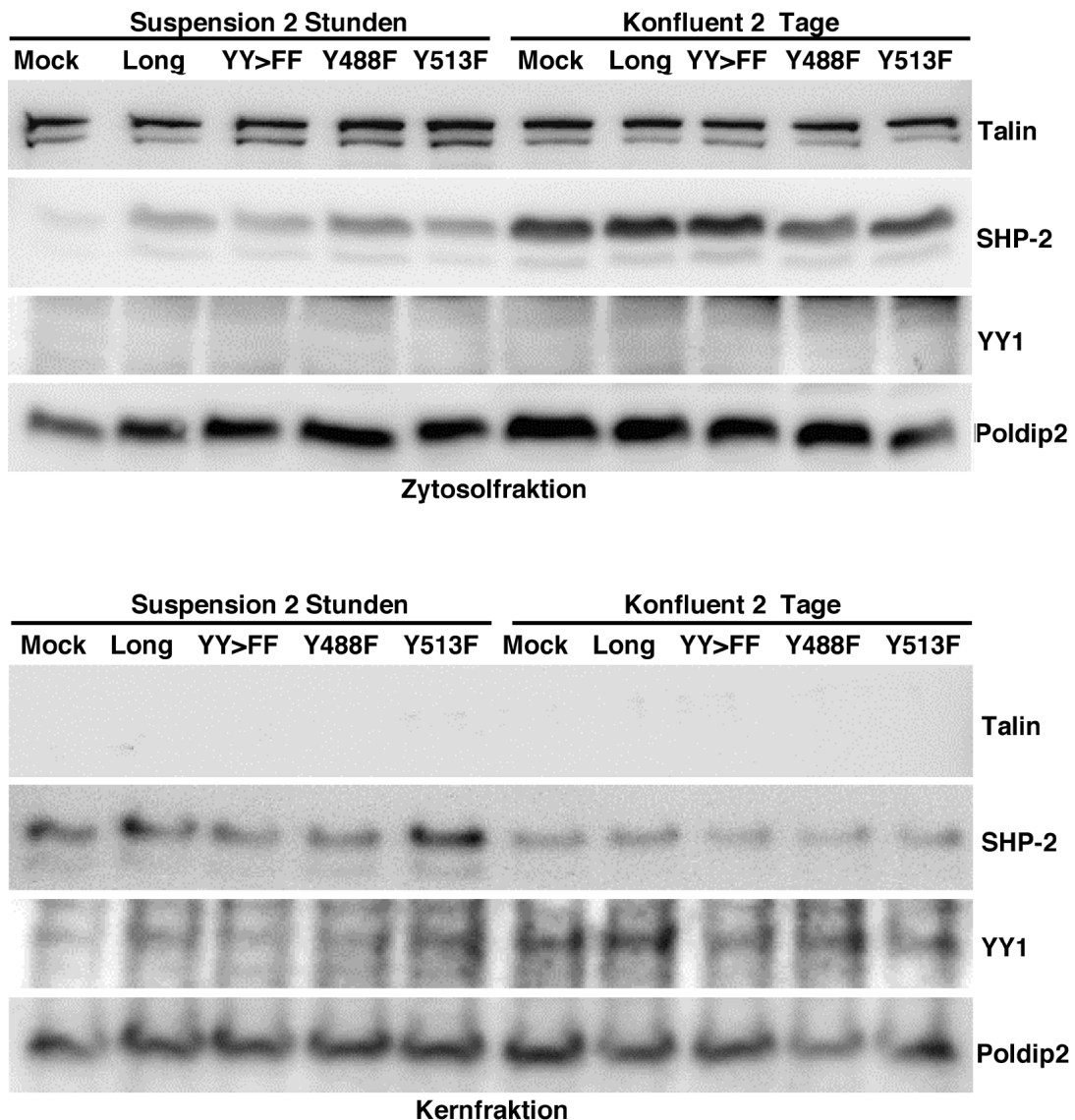


Abb. 45: Lokalisation verschiedener Proteine in Kern- und Zytosolfractionen von RBE-Zellen. RBE-Zellen transfiziert mit Leervektor ("Mock"), CEACAM1-L ("Long"), CEACAM1-L-Y488,513F ("YY>FF"), CEACAM1-L-Y488F ("Y488F") und CEACAM1-L-Y513F ("Y513F") wurden entweder 2 Tage konfluent kultiviert, oder anschließend für 2 h in Suspension gehalten. Die Kern- und Zytosolfractionen wurden getrennt. Blot: anti-Talin (zytoplasmatischer Marker); anti-SHP-2; anti-YY1 (Kern-Marker); anti-Poldip2 (D8R2).

Es wurden Vektor-transfizierte RBE (Mock), CEACAM1-L-transfizierte RBE (Long) und RBE transfiziert mit verschiedenen Tyrosin-Mutanten der langen Isoform (Y488,513F; Y488F; Y513F) eingesetzt, um einen Einfluss von CEACAM1-L auf die Poldip2-Lokalisation zu untersuchen. Für die Versuche wurden 7×10^6 Zellen entweder zwei Tage konfluent kultiviert oder anschließend 2 h in Suspension gehalten (Abb. 45). Die Fraktionen wurden getrennt und geblottet, wobei die Kernfraktion erheblich weniger Protein enthielt als die Zytosolfraktion (deutlich unter 10%). Eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration war aufgrund des Glycerins im Kernpuffer nicht möglich.

Die Reinheit der Fraktionen wurde durch die Abwesenheit von Talin in den Kernfraktionen und vom Transkriptionsfaktor YY1 in den Zytoplasmafraktion im Blot sichergestellt. Neben der Lokalisation von Poldip2 wurde auch die Verteilung der Phosphatase SHP-2 untersucht. SHP-2 interagiert mit CEACAM1 und ist eines der wenigen Signalmoleküle, dessen Interaktion mit CEACAM1 gut belegt ist [Huber et al., 1999]. SHP-2 wurde aber auch als im Zellkern aktiv beschrieben [Wu et al., 2002].

In Abb. 45 ist gut zu erkennen, dass Talin nur in den Zytosolfractionen und YY1 nur in den Kernfraktionen vorhanden war. Poldip2 war in beiden Fraktionen vorhanden, wobei der Hauptanteil in der Zytoplasmafraktion vorlag. In der Zytoplasmafraktion von konfluenten RBE-Zellen war eine größere Menge Poldip2 als in der Zytoplasmafraktion von suspendierten Zellen. Dies spiegelte sich allerdings nicht in einer Veränderung der im Kern befindlichen Poldip2-Menge wider. SHP-2 zeigte einen noch deutlicheren Unterschied in der Verteilung. Während in konfluenten RBE-Zellen viel SHP-2 im Zytoplasma und wenig im Kern vorhanden war, kehrte sich dieses Verhältnis in suspendierten Zellen um. Die Überexpression von CEACAM1-L oder den CEACAM1-L-Phosphotyrosin-Mutanten hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von Poldip2 und von SHP-2.

Die intrazelluläre Verteilung von Poldip2 in NBT-II-Zellen wird durch den Grad der Konfluenz verändert

Um die Lokalisation in einem für CEACAM1 endogenen System zu untersuchen, wurden NBT-II-Zellen verwendet. Dies sind epitheliale Zellen aus einem chemisch-induzierten Ratten-Blasen-Karzinom. Sie sind ein gut beschriebenes, für CEACAM1 endogenes, epitheliales Zellsystem [Hunter et al., 1994]. NBT-II-Zellen exprimieren die lange und auch die kurze CEACAM1-Isoform. Sie verlieren ihren epithelialen Phänotyp und nehmen mesenchymale Eigenschaften an, wenn sie durch die Behandlung mit EGF oder aFGF in die sog. epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) getrieben werden.

Die NBT-II-Zellen wurden entweder nicht weiter behandelt oder mit EGF bzw. aFGF kultiviert. Außerdem wurden die Zellen entweder 2 Tage konfluent kultiviert oder anschließend 2 h in Suspension gehalten (Abb. 46). Es wurden wieder Talin und YY1 als Kontrollen für die Reinheit der Fraktionen verwendet. In den Kernfraktionen der suspendierten Zellen ist eine geringe Menge Talin zu erkennen, ansonsten sind die Fraktionen sauber getrennt und YY1 ist nur in der Kernfraktion zu finden. Poldip2 ist in konfluenten Zellen zum Großteil in der Zytosolfraktion und in etwas geringer Menge in der Kernfraktion zu finden. Wurden die Zellen in Suspension gehalten, verschob sich das Verhältnis. In der Zytosolfraktion wurde die Poldip2-Menge verringert, während in der Kernfraktion eine erhöhte Menge an Poldip2 zu finden war.

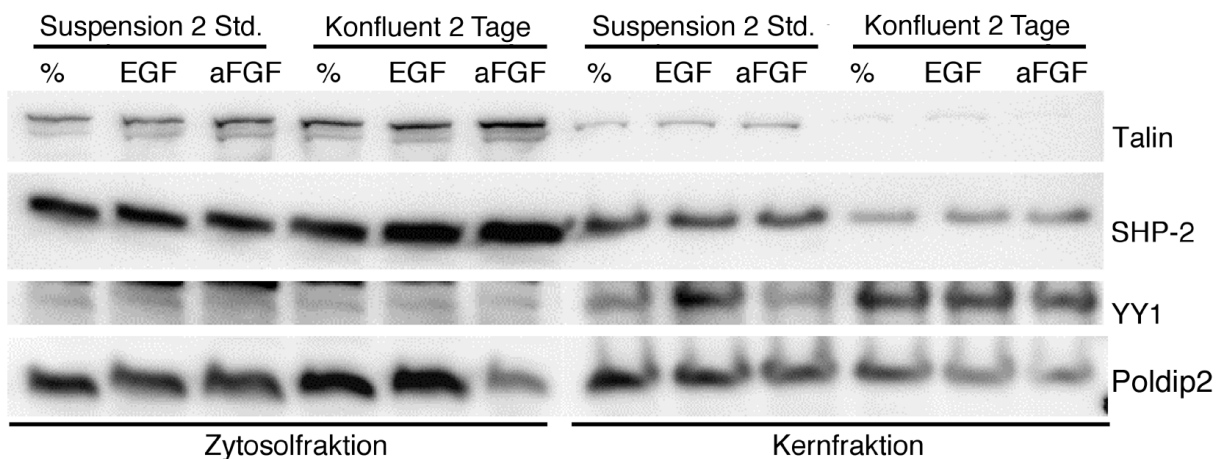


Abb. 46: Lokalisation verschiedener Proteine in Kern- und Zytosolfractionen von NBT-II-Zellen mit epithelialelem oder mesenchymalem Phänotyp. NBT-II-Zellen wurden entweder 2 Tage konfluent kultiviert oder für 2 h in Suspension gehalten. Die Zellen wurden entweder nicht weiter behandelt oder mit 10 ng/ml EGF oder aFGF inkubiert. Die Kern- und Zytosolfractionen wurden getrennt. Blot: anti-Talin (zytoplasmatischer Marker); anti-SHP-2; anti-Poldip2, anti-YY1 (Kern-Marker); anti-Poldip2 (D8R2).

Die Behandlung mit EGF oder aFGF schien keinen Einfluss zu haben. Nur das Signal der aFGF-behandelten Zytosolfraktion der konfluenten Zellen erschien sehr schwach im Verhältnis zu den anderen vergleichbaren Signalen. Die Phosphatase SHP-2 zeigte eine dem Poldip2 analoge konfluenzabhängige Verteilung. Wie in RBE-Zellen haben konfluente NBT-II-Zellen viel SHP2 im Zytosol und wenig im Kern, während suspendierte NBT-II-Zellen eine verringerte Poldip2-Menge im Zytosol und eine erhöhte Poldip2-Menge im Kern aufweisen. Auch auf die Verteilung der SHP-2 hatte die Behandlung mit EGF oder aFGF keinen Einfluss.

Der Verlust der CEACAM1-Expression hat keinen Einfluss auf die Kern-Zytosol-Verteilung von Poldip2 in NBT-II-Zellen

Um in NBT-II-Zellen den Einfluss von CEACAM1 auf die Verteilung von Poldip2 zu untersuchen, wurden CEACAM1-negative NBT-II-Zellen verwendet. Die Zellen wurden durch den Einsatz von siRNA im Labor von Björn Öbrink (Stockholm, Schweden) hergestellt. Der völlige Verlust der CEACAM1-Expression wurde durch RT-PCR und FACS-Analyse bestätigt (persönliche Mitteilung Björn Öbrink und Bernhard B. Singer, Berlin).

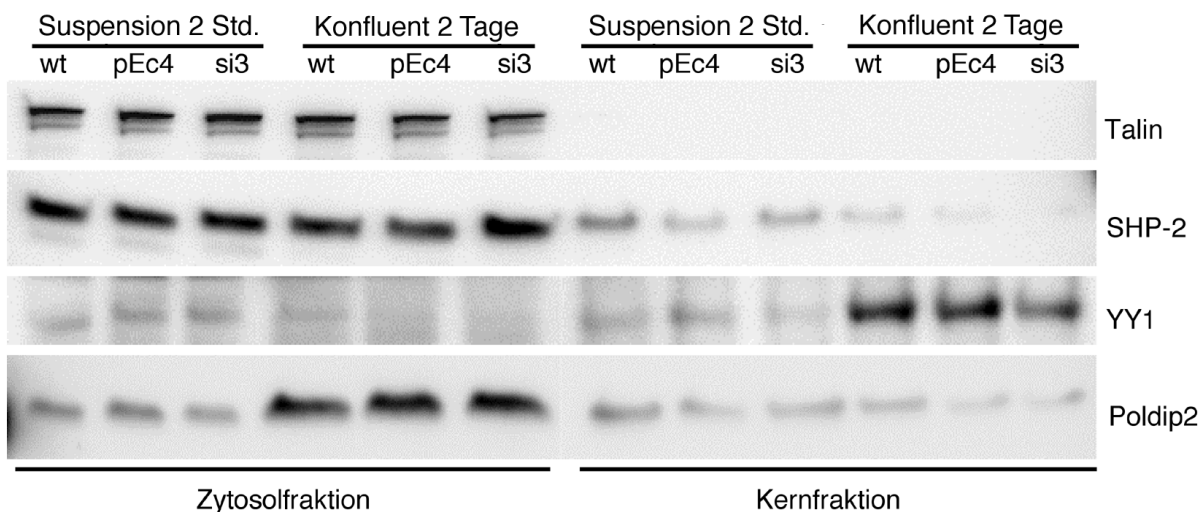


Abb. 47: Lokalisation verschiedener Proteine in Kern- und Zytosolfractionen von NBT-II-CEACAM1-Knockdown Zellen (siRNA-vermittelt). NBT-II-Zellen (wt), Vektor-transfizierte NBT-II-Zellen (Kontrolle, pEc4) und CEACAM1-siRNA-transfizierte NBT-II-Zellen (si3) wurden entweder 2 Tage konfluent kultiviert oder für 2 h in Suspension gehalten. Die Kern- und Zytosolfractionen wurden getrennt. Blot: anti-Talin (zytoplasmatischer Marker); anti-SHP-2; anti-YY1 (Kern-Marker); anti-Poldip2 (D8R2).

Die NBT-II-Wildtyp-Zellen (wt) sowie die Vektortransfektanten (pEc4) und die CEACAM1-siRNA-transfizierte Zelllinie (si3) wurden entweder 2 Tage konfluent kultiviert oder anschließend 2 h in Suspension gehalten (Abb. 47). Die Kern- und Zytosolfractionen wurden getrennt und auf das Vorhandensein von Talin und YY1 im Blot getestet. Talin war nur in den Zytosolfractionen und YY1 bis auf geringe Spuren nur in den Kernfractionen vorhanden.

In den Zytosolfractionen konfluenter Zellen war deutlich mehr Poldip2 vorhanden als in den Zytosolfractionen suspendierter Zellen. In den Kernfractionen war nur ein sehr schwacher Unterschied zu erkennen, wobei suspendierte Zellen etwas mehr Poldip2 im Kern enthielten als konfluente Zellen. Für die Phosphatase SHP-2 war kein Unterschied in den Zytosolfractionen erkennbar, jedoch war in den Kernfractionen von suspendierten Zellen wieder deutlich mehr SHP-2 vorhanden als in konfluenten Zellen. Der Verlust der CEACAM1-Expression hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von Poldip2 oder SHP-2.

Poldip2-Lokalisation in NBT-II-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisation von Poldip2 in NBT-II-Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Die Färbung für die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit dem polyklonalen D8R2-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle wurde Präimmenserum-IgG eingesetzt, welches eine kaum erkennbare diffuse Hintergrundfärbung ergab (ohne Abbildung).

Die Verteilung des Poldip2 wurde in NBT-II-Zellen durch verschiedene Parameter beeinflusst. Nach 48 h Kultur war in konfluenten NBT-II-Zellen eine punkartige, gleichmäßig über die ganze Zelle verteilte Färbung zu erkennen und es befand sich kein Poldip2 in den Zell-Zell-Kontakten (Abb. 48A). In nicht konfluent gewachsenen Zellen war hingegen eine ausgeprägte Färbung der Zell-Zell-Kontakte (Pfeile) zu finden und auch die Zellkerne wiesen eine leichte Färbung auf. Poldip2 schien im Zytoplasma über den ganzen Zellkörper verteilt zu sein und war auch in Filopodien und Zellfortsätzen zu finden. Teilweise war Poldip2 in der Peripherie der Zelle angereichert.

Wurden die konfluenten NBT-II-Zellen mit EGF behandelt, so schien sich Poldip2 in und um den Zellkern zu konzentrieren. Im Vergleich zu nicht EGF-behandelten konfluenten Zellen waren die äußeren Bereiche der Zelle ausgespart. Wo genau Poldip2 hier lokalisiert ist, muss durch konfokale Aufnahmen von D8R2-Antikörper-Färbungen gezeigt werden. In nicht konfluenten, EGF-behandelten Zellen ging mit der Annahme des mesenchymalen, motilen Phänotyps der Verlust der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von Poldip2 einher (Pfeile). Es war

jedoch immer noch ein erheblicher Anteil von Poldip2 in der Zellperipherie zu finden. Poldip2 zeigte eine über den ganzen Zellkörper verteilte, Punkt- bis Strich-artige Färbung. Ob diese Färbung mit bestimmten Zellorganellen oder Membranformationen (*membrane ruffles*) kolokalisiert, muss noch geklärt werden. Auch im und um den Zellkern sowie in den Filopodien (Pfeilspitze) war eine Färbung zu erkennen.

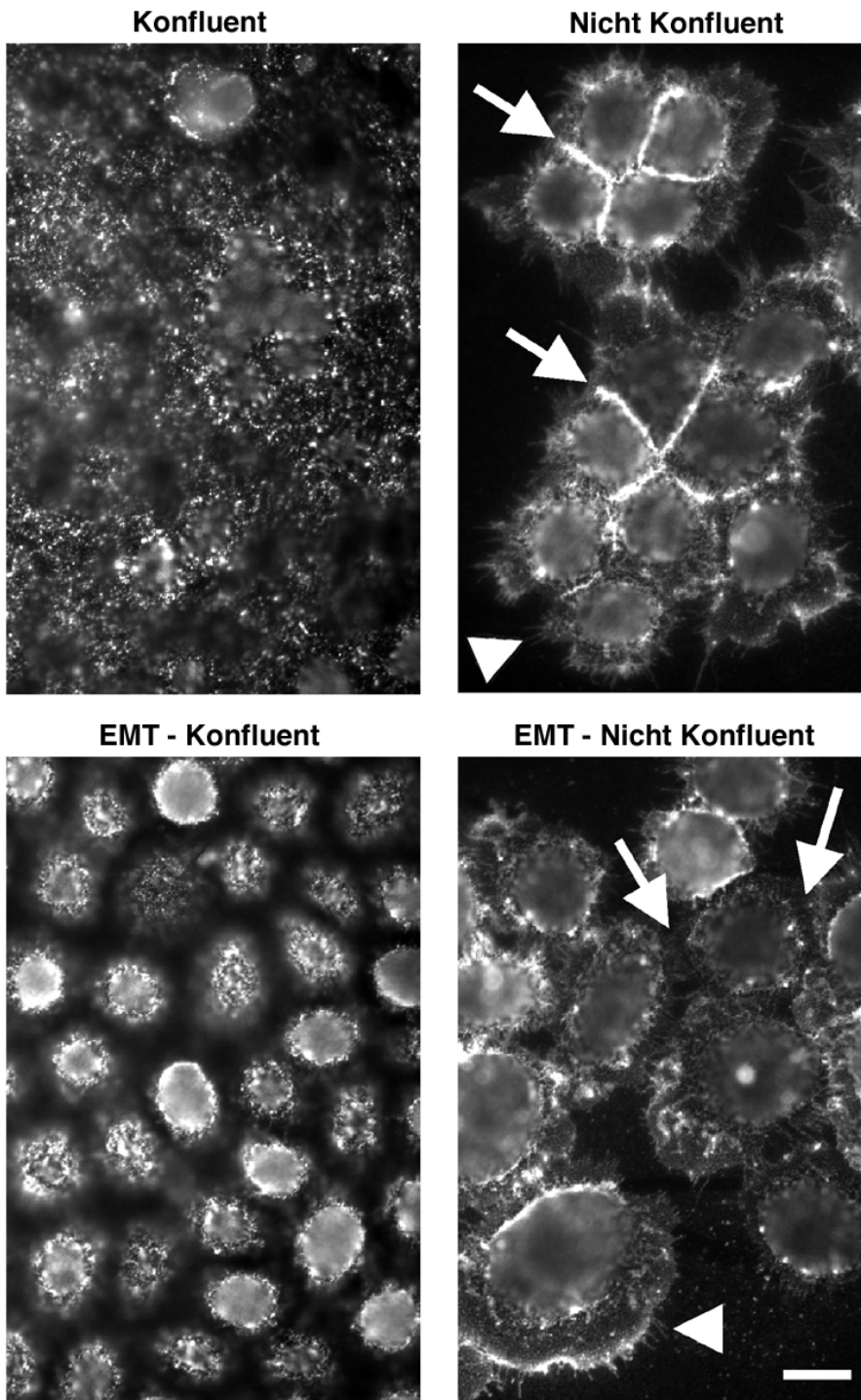


Abb. 48: Poldip2-Lokalisation in NBT-II-Zellen. NBT-II-Zellen wurden 48 h entweder konfluent oder nicht konfluent wachsen gelassen. Die Zellen wurden entweder nicht weiter behandelt oder mit 10 ng/ml EGF inkubiert. Die Zellen wurden PFA-fixiert und mit D8R2-Antikörper gefärbt. Die Pfeile deuten auf Zell-Zell-Kontakte, Pfeilspitzen auf Zellausläufer (Filopodien). Balken: 10 μ m.

Poldip2 scheint also abhängig von der Zelldichte und vom epithelialen bzw. mesenchymalen Phänotyp in den Zell-Zell-Kontaktbereichen, im Zytoplasma (mehr oder weniger deutlich in bestimmten Strukturen organisiert) und im Zellkern lokalisiert zu sein. Dass die intrazelluläre Lokalisation von Poldip2 beeinflussbar ist, stimmt mit den Daten der vorab beschriebenen Studien der Kern-Zytosol-Trennungen überein, welche zeigen, dass die zweistündige Inkubation verschiedener Zelllinien eine Reduktion der Poldip2-Menge in der Zytosolfraktion induzierte.