

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde Filamin A als neuer intrazellulärer Interaktionspartner von CEACAM1-L identifiziert. Die Bindung erfolgte über den C-Terminus von Filamin A. Sie war direkt und phosphorylierungsunabhängig, wie in Affinitätspräzipitationen und SPR-Studien gezeigt wurde. Das die Bindung auch in endogenen Systemen stattfindet, wurde in Koimmunpräzipitationen gezeigt. Um die funktionelle Auswirkung der Interaktion von CEACAM1-L und Filamin A zu untersuchen, wurde ein humanes Melanom-Zellsystem etabliert, das die Filamin A- und CEACAM1-L-negativen wt-M2-Zellen und die daraus durch Transfektion entstandenen Filamin A-exprimierenden A7-Zellen [Cunningham et al., 1992] zur Grundlage hatte. Beide Zelllinien wurden mit CEACAM1-L transfiziert, so dass die Zelllinien M2-CC1 und A7-CC1 entstanden. Filamin A und CEACAM1-L lagen also jeweils einzeln exprimiert und koexprimiert vor. Mit diesem Zellsystem konnte in Transwell-Migrations- und -Invasions-Assays sowie in Monolayer-Wundheilungs-Assays gezeigt werden, dass die alleinige Expression von CEACAM1-L die Zellstreuung und die Migration erhöhte, aber keinen Einfluss auf die Invasion hatte. Die alleinige Expression von Filamin A hatte keinen Einfluss auf die Zellstreuung, erhöhte aber die Migration und die Invasion. CEACAM1 und Filamin A schienen verschiedene Mechanismen für ihre pro-migratorische Funktion zu nutzen, da sie unterschiedliche Auswirkungen auf die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Phosphorylierung von Integrin-abhängigen Adhäsionen hatten. Die Koexpression der beiden Proteine führte nicht zu einem synergistischen Effekt in Bezug auf die Erhöhung der Migration, sondern bewirkte im Gegenteil die völlige Inhibition der Zellstreuung sowie eine starke Reduktion der Migration und der Filamin A-induzierten Invasion. Die Reduktion der Migration war besonders ausgeprägt, wenn die Zellen im Zellverband verblieben (Monolayer-Wundheilungs-Assay) und nicht als vereinzelte Zellen untersucht wurden (Transwell-Migrations-Assay). Als möglichen Mechanismus für diese Auswirkungen konnten Veränderungen im Turnover der fokalen Adhäsionen in A7-CC1-Zellen identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CEACAM1-L und Filamin regulierbar ist und dass die Bindung von CEACAM1-L und Filamin A dessen Interaktion mit der kleinen GTPase RalA stört. Migration und Adhäsion verstärkten die Bindung von CEACAM1-L und Filamin A.

Der zweite identifizierte Interaktionspartner von CEACAM1-L ist das Poldip2. In Affinitätspräzipitationen und SPR-Studien konnte eine phosphorylierungsunabhängige und direkte Bindung des C-Terminus von Poldip2 an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L gezeigt werden. Es wurde ein Poldip2-spezifischer Antikörper hergestellt und Koimmunpräzipitationen zeigten, dass CEACAM1-L und Poldip2 auch *in vivo* interagieren.

In Kern-Zytosol-Trennungen konnte eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation von Poldip2 in endothelialen und epithelialen Zellen gezeigt werden. Wurden die Zellen in Suspension gehalten, verringerte sich die im Zytoplasma vorhandene Poldip2-Menge. In indirekten Immunfluoreszenzen wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Lokalisation von Poldip2 in NBT-II-Zellen durch die Zelldichte und durch die Behandlung mit EGF beeinflussbar war. In nicht konfluenten Zellen wurde Poldip2 an die Zell-Zell-Kontakte rekrutiert, während es in superkonfluenten Zellen eine punkrtartige, zytoplasmatische Färbung aufwies. Die Behandlung von nicht konfluenten Zellen mit EGF verhinderte die Rekrutierung von Poldip2 an die Zell-Zell-Kontakte und bewirkte eine Lokalisation im kortikalen Bereich. In konfluenten Zellen führte die EGF-Behandlung zu einer Lokalisation von Poldip2 in und um den Zellkern.

Für strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Mitgliedern der CEA-Familie wurden eine Reihe verschiedener CEACAM-Fc-Konstrukte kloniert und exprimiert. Dazu wurden die extrazellulären Domänen der humanen CEACAMs 1, 5, 6 und 8 sowie des Ratten-CEACAM1 mit der konstanten Region der schweren Kette eines humanen IgG fusioniert. Die löslichen Fusionsproteine wurden unter anderem in funktionellen Studien als physiologische Stimulatoren von Zellen anstelle von anti-CEACAM-Antikörpern eingesetzt. Erstmals wurde die Hinge-Region des Fc-Anteils auf einen möglichen Einfluss auf die Funktionalität von Fc-Fusionsproteinen untersucht und Studien mit Fc-CEACAM1-Fusionsproteinen mit deletierter bzw. mit vorhandener Hinge-Region zeigten, dass die Flexibilität der fusionierten CEACAM-Proteinanteile verändert war. Im Fall von Ratten-CEACAM1 hat die durch die Hinge-Region vermittelte erhöhte Flexibilität die homophile Bindung der extrazellulären Domäne von CEACAM1 *in trans* reduziert.

## Summary

Here, filamin A was identified as a novel cytoplasmic CEACAM1-L interacting protein. The filamin A C-terminus bound CEACAM1-L directly and phosphorylation independent, as shown by SPR-analysis and affinity precipitation. Interaction of CEACAM1-L and filamin A in endogenous systems was shown by coimmunoprecipitation. For functional studies on the CEACAM1-L-filamin A interaction, a human melanoma cell system was established. The CEACAM1-L- and filamin A-negative M2 cells and the derived, filamin A-rescued A7 cells [Cunningham et al., 1992] were both transfected with CEACAM1-L cDNA. The resulting cell lines were named M2-CC1 and A7-CC1. Thus, the cell system included CEACAM1-L- and filamin A-single transfectants and one cotransfectant. In monolayer wound-healing assays and in transwell migration and invasion assays CEACAM1-L was shown to enhance cell scattering and migration when expressed solely, while it had no effect on invasion. Filamin A enhanced migration and invasion when expressed solely but had no effect on cell scattering. CEACAM1-L and filamin A seemed to use different pathways to exert their promigratory functions, since they diversely influenced the organization of the actin cytoskeleton and the phosphorylation of integrin-based adhesions. Coexpression of CEACAM1-L and filamin A did not result in a synergistic effect on migration. In contrast, double-transfectants exhibited virtually no cell scattering and showed a decreased motility and a reduced filamin A induced invasivity. The reduction in migration was notably stronger when cells remained in a layer (monolayer wound-healing assay) instead of being separated (transwell assay). The disturbed focal adhesion turnover in A7-CC1 cells represents a possible mechanism for the reduction in migration. Additionally, binding of CEACAM1-L to filamin A was dynamic and interfered with the filamin A-RalA interaction. Migration and adhesion resulted in enhanced binding of CEACAM1-L to filamin A.

The second interaction partner of CEACAM1-L identified here, was poldip2. The poldip2 C-terminus bound directly and phosphorylation independent to the cytoplasmic domain of CEACAM1-L, as shown by SPR-analysis and affinity precipitation. A poldip2-specific polyclonal antibody was produced and the interaction of CEACAM1-L and poldip2 was confirmed by coimmunoprecipitation *in vivo*. Cellular fractionation revealed a cytoplasmic and nuclear localisation of poldip2 in endothelial and epithelial cells. Keeping the cells in suspension reduced the cytoplasmic amount of poldip2. The intracellular localization of poldip2 in NBT-II cells was affected by confluency and by the treatment with EGF, as shown by indirect immunofluorescence. In sparsely grown cells, poldip2 was recruited to sites of cell-cell contact. EGF treatment prevented this recruitment and resulted in a cortical

localization. In confluent cells, poldip2 showed a punctate, cytoplasmic staining. EGF treatment of confluent cells resulted in a localization of poldip2 in or near the nucleus.

Several CEACAM-Fc fusion constructs were cloned and expressed to be used in functional and structural studies on members of the CEA-family. The extracellular domains of rat CEACAM1 and human CEACAMs 1, 5, 6 and 8 were fused to the constant region of a human IgG heavy chain. Soluble Fc-fusionproteins were used as cell-stimulatory agents in functional studies instead of anti-CEACAM-antibodies. For the first time, the hinge region of the Fc-portion was tested for its influence on the functionality of Fc-fusionproteins. Studies using Fc-fusionproteins with deleted or present hinge regions revealed a modified flexibility of the CEACAM-portion of the fusionprotein. The hinge-induced enhanced flexibility reduced the homophilic binding capacity of the CEACAM1 extracellular domain *in trans*.