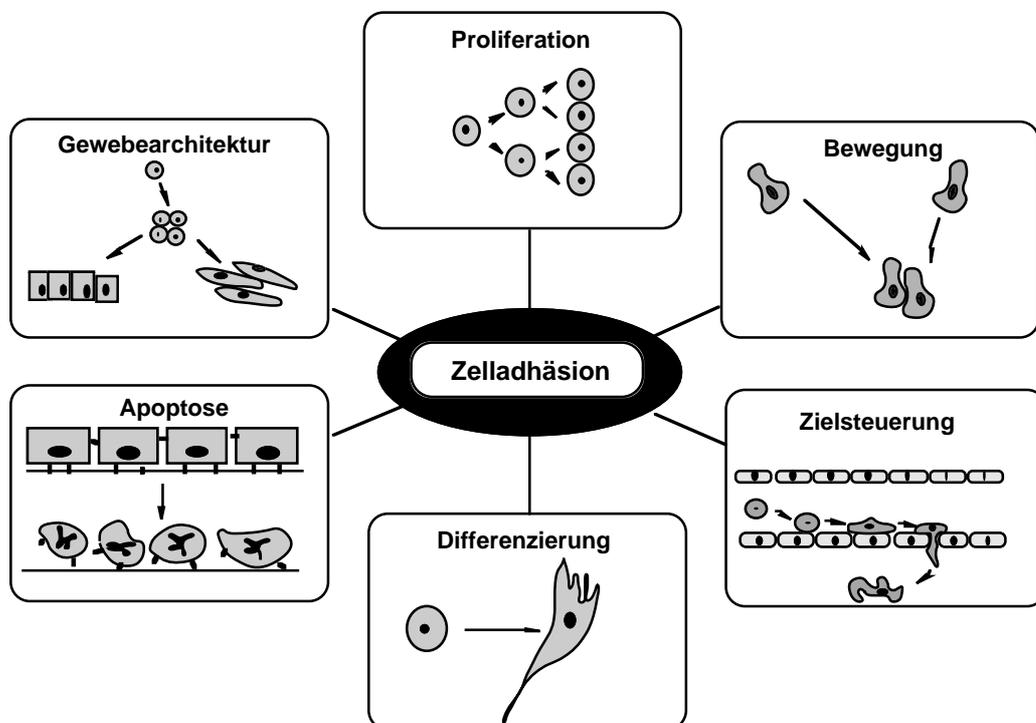


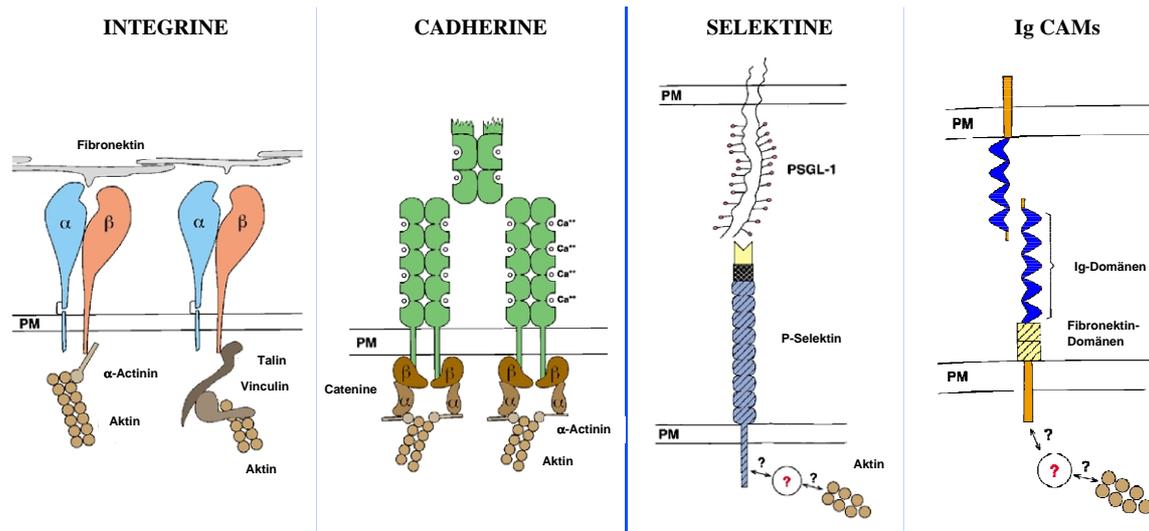
# 1. Einleitung

## 1.1. Die Zelladhäsion

Zelladhäsion ist sowohl für die Erzeugung und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Strukturen als auch für die Regulation einer Vielzahl von Funktionen von Geweben von zentraler Bedeutung (Ruoslahti & Obrink, 1996) (Abb. 1). Zelladhäsionsrezeptoren sind in der Regel Transmembranmoleküle, die die Bindung an die extrazelluläre Matrix oder an Gegenrezeptoren auf anderen Zellen vermitteln (Edelman, 1988). Diese Moleküle bestimmen die Spezifität der Zell-Zell- oder der Zell-Matrix-Interaktion. Zelladhäsionsrezeptoren sind aber nicht nur statische Bauelemente. Sie sind vielmehr dynamische Einheiten, die Signale aus der äußeren Umgebung aufnehmen, verarbeiten und weiterleiten können. Diese Signale beeinflussen verschiedene zentrale Prozesse der Zelle, einschließlich Genexpression, Zellzyklus und Apoptose.



**Abbildung 1: Die zentrale Bedeutung der Zelladhäsion für multizelluläre Prozesse**  
(modifiziert nach Ruoslahti und Öbrink, 1996)



**Abbildung 2: Die Familien der Zelladhäsionsmoleküle**

Nach (Aplin et al., 1998)

Daher ist die Bezeichnung „Rezeptor“ für diese Klasse von Molekülen gerechtfertigt. Die Zelladhäsionsrezeptoren werden in verschiedene Familien eingeteilt, deren wichtigste die Cadherine, die Integrine, die Selektine und die Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie darstellen (Aplin et al., 1998) (Abb. 2).

Die **Cadherine** stellen eine Superfamilie transmembranärer Glykoproteine dar, die in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup> homophile Adhäsion zwischen Zellen vermitteln. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien werden die Cadherine in zwei Familien unterteilt (Takeichi, 1993; Takeichi, 1995): 1. Die Cadherine mit vier repetitiven Elementen, zu denen bisher fünf Gruppen gehören, u.a. die klassischen Cadherine und die desmosomalen Cadherine, sowie 2., die Cadherine mit mehr als vier Domänen und einem individuellen zytoplasmatischen Teil, z.B. das LI-Cadherin (Berndorff et al., 1994). Die Cadherine einer Zelle liegen als cis-Homodimere vor und verbinden sich mit den entsprechenden Homodimeren einer anderen Zelle. Die Bindung erfolgt in der N-terminalen Domäne. Sie bilden eine dreidimensionale Netzstruktur aus, die oft als Cadherin-Reißverschluss bezeichnet wird. Die klassischen Cadherine besitzen untereinander etwa 50% Identität. Sie umfassen mindestens 15 Moleküle, wie zum Beispiel das N-, C-, P- und das E-Cadherin (Takeichi, 1995). Das E-Cadherin, erstmals als L-CAM auf Leberzellen von Hühnerembryonen beschrieben (Bertolotti et al.,

1980), ist das dominante Zell-Zell-Adhäsionsmolekül in den meisten Epithelien (Shimoyama et al., 1989). Die klassischen Cadherine konzentrieren sich in Zonulae adhaerentes, wo sie intrazellulär über Adapterproteine, die Catenine, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Die desmosomalen Cadherine sind dagegen intrazellulär über das  $\gamma$ -Catenin (auch Plakoglobin) mit den Intermediärfilamenten verbunden (Koch & Franke, 1994).

Die Familie der **Selektine** umfaßt nur drei Mitglieder, L-, E- und P-Selektin. L-Selektin wurde erstmals auf Leukozyten, E-Selektin auf Endothelzellen und P-Selektin auf Thrombozyten (Platelets) identifiziert (Rosen & Bertozzi, 1994; Springer, 1994; Lasky, 1995). Selektine vermitteln maßgeblich den ersten Kontakt zirkulierender Leukozyten und Thrombozyten mit dem Endothel. Diese Interaktion bewirkt das sog. Rollen der Leukozyten entlang des Endothels bis zu Entzündungsherden, wo dann durch andere Mechanismen die feste Adhäsion und schließlich die Extravasation der Leukozyten stimuliert werden. Selektine binden über ihre N-terminale Lektindomäne mit hoher Spezifität an fucosylierte und sulfatierte Oligosaccharidstrukturen wie das Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und das Sialyl-Lewis<sup>a</sup> (Brandley et al., 1990). Ihr folgt eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnliche Domäne und zuletzt eine variierende Anzahl von zwei bis neun repetitiven Komplement-Regulatorprotein-ähnlichen Elementen. Nach dem transmembranären Segment schließt sich eine kurze zytoplasmatische Domäne an (Tedder et al., 1995; Aplin et al., 1998). Auch Selektine stehen mit dem Zytoskelett in Kontakt. So konnte gezeigt werden, dass L-Selektin an der Spitze der Mikrovilli über  $\alpha$ -Aktinin mit dem Aktinkortex verknüpft ist (Pavalko et al., 1995).

Eine phylogenetisch sehr alte und im Tierreich sehr weit verbreitete Klasse von Zelladhäsionsmolekülen stellen die **Integrine** dar (Clark & Brugge, 1995). Sie fungieren entweder als Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle oder als heterophile Zell-Zelladhäsionsmoleküle. Diese Transmembranmoleküle assemblieren lateral in der Plasmamembran als nicht kovalente  $\alpha,\beta$ -Heterodimere. Es sind zur Zeit mindestens 18 verschiedene  $\alpha$ - und mindestens acht  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die theoretisch über 100 Heterodimere bilden könnten. Aus bisher ungeklärten Gründen assoziieren aber nicht alle

$\beta$ -Untereinheiten mit allen  $\alpha$ -Untereinheiten; bislang sind lediglich 24 unterschiedliche Heterodimere bekannt (Albelda & Buck, 1990). Die Integrin-Dimere werden anhand ihrer  $\beta$ -Untereinheit in Klassen eingeteilt, da diese häufig die ungefähre Substratspezifität festlegt, obwohl beide Untereinheiten an der Ligandenbindung beteiligt sind. Die Klasse der  $\beta_1$ -Integrine bindet z.B. an die Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Kollagen oder Laminin. Hierbei spielt häufig die Bindung der Integrine an die konservierte Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp, das sog. RGD-Motiv, in den Liganden eine wichtige Rolle (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Die  $\beta_2$ -Integrine, die auf Leukozyten gefunden werden, binden dagegen an Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF), wie I-CAM-1 bis -5, oder das V-CAM (Diamond et al., 1991).

Ein wichtiges Strukturelement bei der Interaktion von Zellen mit der umgebenden Matrix besteht in der Organisation der Integrine zu Clustern in den Fokalkontakten. (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Dort sind die Integrine extrazellulär mit den Proteinen der extrazellulären Matrix und intrazellulär mit zytoplasmatischen Struktur- und Signalproteinen assoziiert. Eine direkte Assoziation gehen sie mit Talin (Horwitz et al., 1986; Tapley et al., 1989) und  $\alpha$ -Aktinin (Otey et al., 1990) ein, die wiederum mit weiteren Strukturproteinen verbunden sind, wie Vinculin, Paxillin und Tensin, die dann an Aktinfilamente binden. Die Fokalkontakte bewirken damit sowohl die Erzeugung von mechanischer Spannung in der Zelle, als auch den Ursprung und die Modulation von Signalen, die die Proliferation, Differenzierung und Migration der Zelle betreffen (Howe et al., 1998).

Man kennt neben den Integrinen aber auch noch eine Reihe weiterer Liganden für die EZM. Die Syndecane sind transmembranäre Proteoglykane, die durch Heparansulfatketten an die EZM binden (Carey, 1997). Die biologische Relevanz des Dystroglykan-Dystrophin-Systems wird durch die Existenz von Muskeldystrophien bewiesen. Die extrazelluläre Bindung des Dystroglykans an Laminin wird durch das intrazelluläre Dystrophin an das Aktin-Zytoskelett vermittelt (Rybakova et al., 1996).

Das zuordnende gemeinsame Merkmal der Proteine der **Immunglobulin-Superfamilie** (IgSF) ist die Immunglobulin (Ig)-Domäne. Dieses Proteinfaltungsmotiv umfasst ca. 100 AS und besteht aus zwei übereinander liegenden  $\beta$ -Faltblättern in antiparalleler Anordnung (Williams & Barclay, 1988). Häufig wird die dreidimensionale Struktur dieser Domäne durch eine Disulfidbrücke stabilisiert. Von der Grundform der Ig-Domäne existieren zwei Subtypen: die IgV-Domäne mit Homologie zu den variablen Domänen der Immunglobuline besteht aus 108 bis 110 AS und besitzt in der Mitte der Grundeinheit eine zusätzliche Schleife. IgC-Domänen sind mit 86-96 AS etwas kleiner, weisen Homologien zu den konstanten Ig-Domänen auf und gehören entweder zum C1-Typ, der dem klassischen Typ einer konstanten Domäne entspricht, oder zum C2-Typ, der ein Faltungsmuster zwischen dem V- und dem C1-Typ aufweist (Bork et al., 1994). Der extrazelluläre Bereich aller Mitglieder der IgSF enthält mindestens eine Ig-Domäne. Viele Mitglieder der IgSF sind Membranproteine. Es existieren sowohl Transmembranformen mit zytoplasmatischer Domäne als auch Moleküle, die über einen GPI-Anker an die Membran gebunden sind. Das Vorliegen eines intrazellulären Anteils ermöglicht sowohl die Verknüpfung der betreffenden Moleküle mit dem Zytoskelett der Zelle, als auch die Ausübung von Signalfunktionen. Wie die Immunglobuline selbst haben auch viele weitere Mitglieder der IgSF Erkennungs-, Adhäsions-, und Rezeptorfunktionen. Zu dieser Gruppe gehören Moleküle des Immunsystems wie der B-Zell-Rezeptor (BZR), der T-Zell-Rezeptor (TZR), seine Korezeptoren CD4 und CD8 und die MHC-Moleküle Klasse I und II (Edelman, 1987). Auch im Nervensystem, z.B. bei der Wegfindung der Axone von Neuronen, spielen Proteine der IgSF eine wichtige Rolle. Hier sind z.B. das neurale Zelladhäsionsmolekül N-CAM, das Nr-CAM, sowie Neurofascin und L1 zu nennen (Crossin & Krushel, 2000).

Die Ig-Domäne stellt eine strukturell autarke Faltungseinheit dar und eignet sich deshalb sehr gut für den modularen Aufbau von Proteinen. Tatsächlich existieren von vielen Proteinen der IgSF mehrere Spleißvarianten, die sich häufig in der Anzahl der extrazellulären Ig-Domänen unterscheiden (Owens et al., 1987). Vom DSCAM aus *Drosophila* können durch

unterschiedliche Kombination von homologen Exons für einzelne Ig-Domänen theoretisch sogar mehr als 38000 Spleißvarianten gebildet werden (Schmucker et al., 2000).

### **1.2. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und die CEA-Familie**

Das CEA ist das namensgebende Mitglied der CEA-Familie innerhalb der IgSF. Die Benennung des CEA resultiert aus der Erstbeschreibung dieses Proteins als ein onkofetales Antigen: exprimiert im Embryo, nicht vorhanden in gesunden Erwachsenen und wieder auftauchend in Tumoren (Gold & Freedman, 1965). Heute weiss man aber, dass dieses Konzept nicht zutrifft, auch im gesunden adulten Organismus findet sich CEA. Es handelt sich um ein Glykoprotein mit ca. 50% Zuckeranteil und einem Molekulargewicht von ungefähr 180 k. Extrazellulär ist es aus sieben Ig-ähnlichen Domänen aufgebaut und wird mit der Plasmamembran über einen GPI-Anker verbunden (Coligan et al., 1972; Boehm et al., 1996). Es wird auf Zylinderepithel und auf Becherzellen des Colons, auf dem Plattenepithel der Zunge, des Ösophagus und der Cervix sowie auf dem sekretorischen Epithel der Schweißdrüsen, dem Übergangsepithel der Harnblase und auf dem Prostataepithel exprimiert (Nap et al., 1992; Prall et al., 1996). Auf Colonepithelzellen wird CEA nur auf der apikalen Oberfläche exprimiert. Von dort wird es abgespalten und erscheint in den Faeces, wobei der Mensch pro Tag 50-70 mg CEA verliert. Beim colorectalen Carcinom können die entarteten Zellen die Basalmembran durchwandern und sich im umliegenden Gewebe infiltrativ ausbreiten. Das abgespaltene CEA kann hier über Blutgefäße und Lymphbahnen vom Gewebe in die Blutbahn gelangen, wo seine Serumkonzentration mit der Größe des Tumors gut korreliert. CEA ist nicht tumorspezifisch, kann aber als Tumormarker zur postoperativen Verlaufskontrolle, insbesondere beim kolorektalen-, beim Bronchial- und beim Mamma-Karzinom, bestimmt werden [Go, 1976 #2322; Shani, 1978 #2323; Lunde, 1982 #2324; (Graham et al., 1998; Carriquiry & Pineyro, 1999).

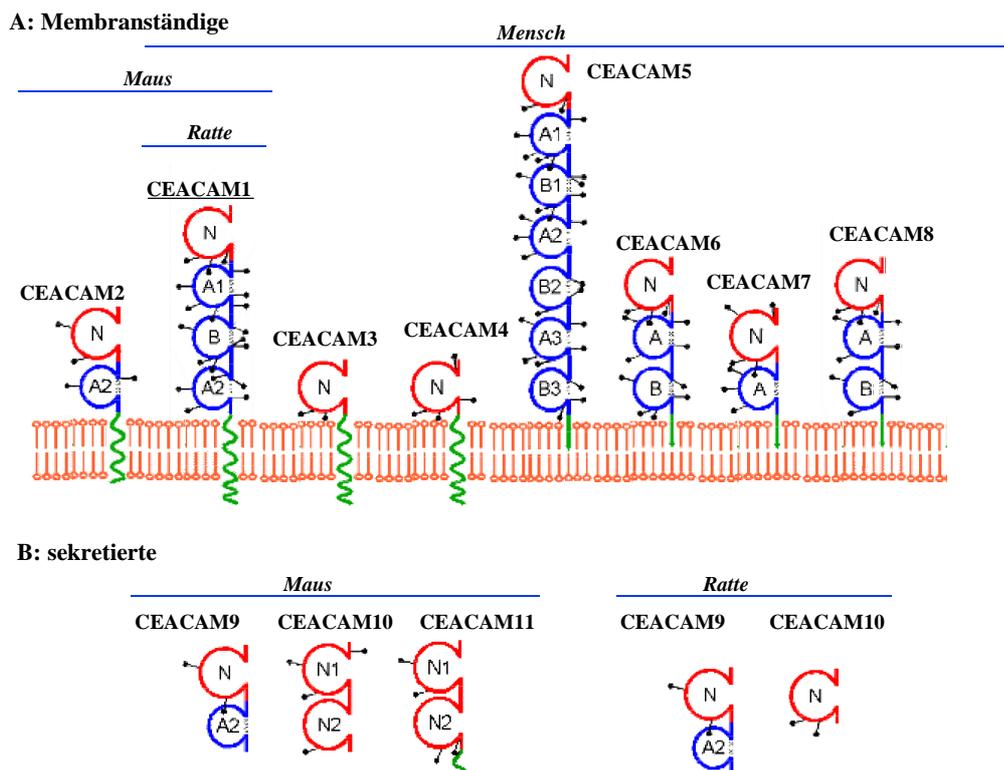
Auf der Grundlage von Antikörperkreuzreaktivitäten und nach der Klonierung des CEA auch durch Sequenzhomologien wurden im Laufe der Zeit etliche verwandte Moleküle identifiziert,

die in der CEA-Gen-Familie zusammengefasst werden. Gegenwärtig sind wenigstens 29 Gene und Pseudogene dieser Familie in verschiedenen Spezies bekannt (Beauchemin et al., 1999). Nur in den Organismen Mensch, Maus und Ratte ist die CEA-Familie bisher relativ gut charakterisiert. Darüber hinaus sind aber auch in verschiedenen Primaten und im Meerschweinchen schon einzelne Mitglieder der CEA-Familie beschrieben worden (Zhou & Hammarstrom, 2001; Zhou et al., 2001). Es darf daher erwartet werden, dass die Anzahl der Mitglieder der CEA-Familie noch steigen wird. Die Nomenklatur der CEA-Familie wurde 1999 vereinheitlicht und ersetzt seither die unübersichtliche und unstrukturierte alte Namengebung (Beauchemin et al., 1999). In dieser Arbeit wird ausschließlich die neue Nomenklatur verwendet. Auf Verweise auf die alten Bezeichnungen der jeweiligen Moleküle wird verzichtet.

Die CEA-Familie wird in die CEACAM- (CEA-related cell adhesion molecule) und die PSG- (pregnancy-specific glycoprotein) Gruppe unterteilt. Im Menschen existiert darüber hinaus noch eine Gruppe von 11 Pseudogenen (*CEACAM-ps1-11*), die bezogen auf Sequenz-ähnlichkeiten zwischen der CEACAM- und der PSG-Gruppe steht (Teglund et al., 1994).

Die CEACAM-Gruppe besteht beim Menschen aus sieben Genen, deren vollständige Genprodukte Transmembranproteine (*CEACAM1*, *CEACAM3* und *CEACAM4*) bzw. GPI-verankerte Moleküle (*CEACAM5* bis *CEACAM8*) darstellen (Olsen et al., 1994). *CEACAM5* ist hierbei der systematische Name für das Gen des CEA-Proteins. In der Maus existiert neben dem *Ceacam1* noch das *Ceacam2* (Nedellec et al., 1994), das ebenfalls für ein Transmembranprotein codiert, sowie mit *Ceacam9* bis *Ceacam11* Gene, aus denen sekretierte Proteine entstehen (Keck et al., 1995; Kataoka et al., 2000). In der CEACAM-Gruppe der Ratte codiert nur das *Ceacam1* für ein Membranprotein, während aus *Ceacam9* und *Ceacam10* sekretierte Proteine entstehen (Kodelja et al., 1989; Earley et al., 1996; Blomberg et al., 1997) (Abb. 3). Alle Mitglieder der CEACAM-Gruppe weisen eine gemeinsame Domänenstruktur auf: einem N-terminalen Signalpeptid folgt stets eine IgV-Domäne, sowie eine variable Anzahl von IgC-Domänen (null bis sechs). Ein Transmembransegment und ein zytoplasmatischer Teil bilden bei einigen Mitgliedern den C-Terminus. Die PSG-Gruppe (11

Mitglieder beim Menschen, 14 bei der Maus, 5 bei der Ratte) beinhaltet sekretierte Proteine, die im Unterschied zu den Vertretern der CEACAM- Gruppe häufig mehrere IgV-Domänen besitzen (Teglund et al., 1994). Die PSGs werden vor allem in der Plazenta während der Schwangerschaft exprimiert. Ihre Funktion besteht wahrscheinlich in der Regulation und Aufrechterhaltung des privilegierten Immunstatus der Plazenta während der Schwangerschaft (Wessells et al., 2000). Die Vielfalt der CEA-Familie wird auf Ebene der Proteine noch durch alternatives Spleißen der jeweiligen Gene erhöht. So sind bislang 13 verschiedene Isoformen des humanen CEACAM1 charakterisiert (Barnett et al., 1993). Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Ig-Domänen und der Länge des zyttoplasmatischen Anteils. Diese Komplexität erschwert die Aufklärung der Funktionen der Mitglieder CEA-Familie.



**Abbildung 3: Die CEACAM-Gruppe der CEA-Familie aus Mensch, Maus und Ratte.**

### 1.3. CEACAM1: Struktur und Expression

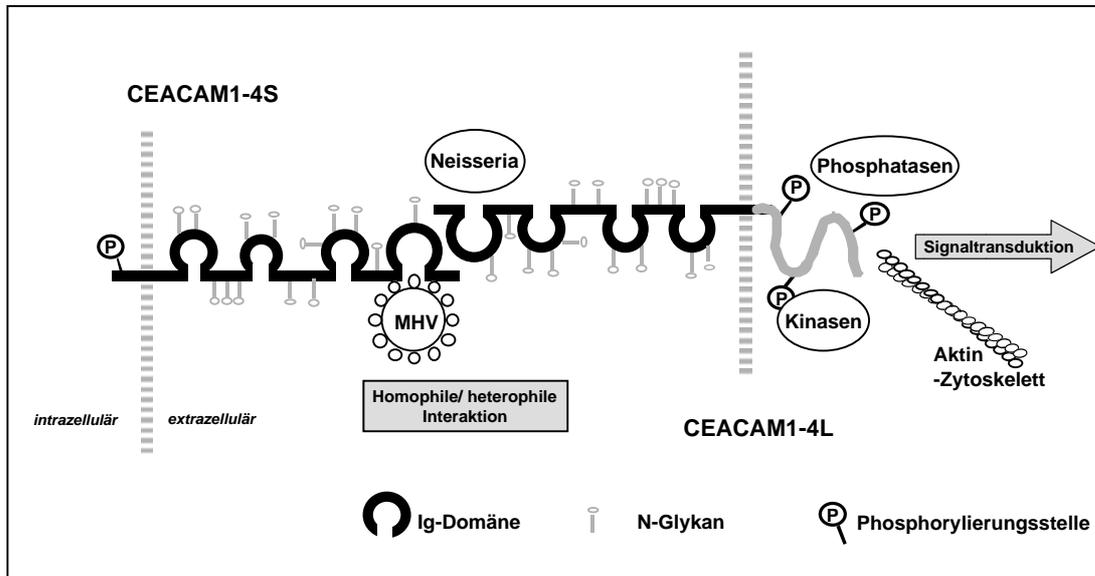
Das CEACAM1 ist das einzige Mitglied der CEA-Familie, das in allen drei untersuchten Spezies, Mensch, Maus und Ratte, zu finden ist. Diese Tatsache, sowie Sequenzvergleiche lassen vermuten, dass das CEACAM1 der evolutionär älteste Vertreter der CEA-Familie ist, aus dem die anderen Mitglieder durch Genduplikation und –Diversifikation entstanden sind (Obrink, 1997). Zur Untersuchung der Funktion des CEACAM1 bietet sich die Ratte als besonders einfacher Modellorganismus an, da hier das CEACAM1 das einzige Membranprotein innerhalb der Familie darstellt. Das CEACAM1 der Ratte besteht aus einer 34 AS langen abspaltbaren Signalsequenz, einem 389 AS langen extrazellulären Bereich, gegliedert in vier Ig-Domänen, gefolgt von einem hydrophoben Transmembransegment von 25 AS und einem zytoplasmatischen Anteil von 71 AS (Lin & Guidotti, 1989). Zu Beginn dieser Arbeit waren auf Proteinebene nur zwei Spleißvarianten mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Domänen bekannt (Najjar et al., 1993) (Genauerer siehe Ergebnisteil). Gemäß der Nomenklatur der CEA-Familie werden diese beiden Proteine als CEACAM1-4L und CEACAM1-4S bezeichnet (4 Ig-Domänen und langer, bzw. kurzer (short) zytoplasmatischer Anteil). Im Darm ist noch ein weiteres mRNA-Transkript des *Ceacam1* mit einem nicht gespleißten Intron beschrieben worden, diese Form wird jedoch nicht translatiert (Cheung et al., 1993a). In der Leber wurden außerdem verschiedene hochmolekulare Formen des CEACAM1 detektiert, die aber nicht näher charakterisiert sind (Baum et al., 1995). Es sind darüber hinaus zwei Rattenstamm-abhängige Allele des *Ceacam1*-Gens mit Variationen im extrazellulären Bereich beschrieben worden, die als *Ceacam1<sup>a</sup>* und *Ceacam1<sup>b</sup>* bezeichnet werden (Edlund et al., 1993). Alle weiteren Ausführungen und Untersuchungen beziehen sich immer auf die allelische Variante CEACAM1<sup>a</sup>, ohne dass dies extra erwähnt wird.

CEACAM1 ist ein hochglykosyliertes Protein mit 15 potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Die starke und heterogene Glykosylierung bewirkt in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht (Mr), das je nach Organ von 105 k (Leber) bis 180 k (Seminalflüssigkeit) variieren kann (Becker, 1989). Das scheinbare Mr des Proteingerüsts der langen Isoform beträgt dagegen nur 48 k (Becker et al., 1993). Die Glykosylierung des CEACAM1 weist als

Besonderheit eine Übersialylierung auf: in etwa 20% der N-Glykane finden sich mehr Sialinsäuren als terminale Verzweigungen der Oligosaccharidstruktur, die sogenannten Antennen. Normalerweise findet sich dagegen nur maximal eine Sialinsäure pro Antenne als terminaler Zucker (Kannicht et al., 1999).

CEACAM1 wird auf verschiedenen Epithelien, auf dem Gefäßendothel, auf neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und auf einigen Lymphozyten-Subpopulationen nachgewiesen. Die Expression ist in der Leber und im Bürstensaum des Gastro-Intestinal-Traktes am stärksten. Im Muskel- und im Nervengewebe konnte es nicht nachgewiesen werden (Odin & Obrink, 1987; Odin & Obrink, 1988; Becker et al., 1989; Mowery & Hixson, 1991; Godfraind et al., 1995; Prall et al., 1996). Während der Embryonalentwicklung und der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wird die Expression des CEACAM1 reguliert, was eine Funktion des CEACAM1 in der Embryo- und Organogenese vermuten lässt (Hixson et al., 1985; Odin & Obrink, 1986). Die molekulare Regulation der CEACAM1-Expression wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gewährleistet, für die Bindestellen innerhalb des CEACAM1-Promotors nachgewiesen werden konnten. Dort binden z.B. die Faktoren USF (Upstream-Stimulatory-Factor), HNF-4 (Hepatocyte-Nuclear-Factor 4) und Sp1 (Takahashi et al., 1993; Hauck et al., 1994). Die Induktion der CEACAM1-Expression in Kolonkarzinomzellen durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) wird durch die Bindung des Interferon-sensitive-Response-Element (ISRE) an den CEACAM1-Promotor bewirkt (Chen et al., 1996). Die CEACAM1-Expression auf Prostataepithel wird unter anderem durch Androgen reguliert, das im Komplex mit dem Androgenrezeptor (AR) diesen zur DNA-Bindung befähigt (Phan et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Bindung des Bakteriums *Neisseria gonorrhoeae* (siehe unten) an Epithel- und Endothelzellen die Expression des CEACAM1 über einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Weg stimuliert (Muenzner et al., 2000; Muenzner et al., 2001). In verschiedenen Zellen des Immunsystems wird CEACAM1 darüber hinaus nach Stimulation der Zellen verstärkt auf der Oberfläche exprimiert (Moller et al., 1996; Morales et al., 1999).

### 1.4. Funktionen des CEACAM1



**Abbildung 4: Struktur und Interaktionen von CEACAM1**

#### 1.4.1. Zelladhäsion

Wie einige andere Mitglieder der CEA-Familie fungiert CEACAM1 als homophiles und heterophiles Zelladhäsionsmolekül (Oikawa et al., 1992). Eine frühe Charakterisierung des CEACAM1 erfolgte anhand der Fähigkeit von anti-CEACAM1-Antikörpern, die Zellaggregation von Hepatozyten zu inhibieren (Ocklind et al., 1980; Becker et al., 1993). Die homophile Interaktion zwischen zwei CEACAM1-Molekülen auf benachbarten Zellen erfolgt über die N-terminale Ig-Domäne (Cheung et al., 1993b). Die homophile CEACAM1-Interaktion konnte auch *in vitro* in verschiedenen Systemen gezeigt werden. Die Expression von CEACAM1 befähigte z.B. CHO-Zellen und Sf9-Insektenzellen zur Aggregation in Suspensionen (Cheung et al., 1993c; Lucka et al., 1995). An der Interaktion ist ausschließlich der Proteinanteil des CEACAM1 beteiligt, nicht aber die N-Glykane. Die für die Bindung wichtigen Bereiche des CEACAM1 konnten auf die nichtglykosylierte GFCC'C''-Fläche der IgV-Domäne eingegrenzt werden (Watt et al., 2001). Die Funktion der Glykane könnte unter anderem in der Bereitstellung der Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Liganden für das E-Selektin bestehen, für das die heterophile Interaktion mit CEACAM1 in humanen Granulozyten nachgewiesen wurde

(Kuijpers et al., 1992). Das CEACAM1 der Rattenleber trägt dagegen keine Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Einheiten (Kannicht et al., 1999).

#### 1.4.2. Rezeptor für Bakterien und Viren

Verschiedene Mitglieder der CEA-Familie, vor allem das CEACAM1, sind als zelluläre Rezeptoren für verschiedene Pathogene identifiziert worden. Die human-pathogenen, gramnegativen Bakterien *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* kolonisieren vor allem die Schleimhäute des Urogenitaltraktes. Hierzu sind sie durch die Expression verschiedener Adhesine in der Lage, unter ihnen die Gruppe der opa- (opacity-associated) Proteine. Einige der opa-Proteine, unter ihnen das opa<sub>52</sub>, binden an CEACAM1, was die Bakterien zur Adhäsion an und zum Einschleusen in epitheliale und endotheliale Zellen befähigt, aber auch die Opsonisierungs-unabhängige Phagozytose durch Granulozyten ermöglicht (Virji et al., 1996; Gray-Owen et al., 1997; Wang et al., 1998). Darüber hinaus binden verschiedene Stämme von *Haemophilus influenzae* an CEACAM1, allerdings ist hier das interagierende Molekül das phasenvariable Oberflächenprotein P5 (Virji et al., 2000; Hill et al., 2001). Da aber P5-negative *Haemophili* teilweise immer noch in der Lage sind, an CEACAM1 zu binden, wurde die Existenz weiterer bakterieller Bindungspartner für CEACAM1 vermutet. Ein nicht bakterielles Pathogen, das ebenfalls das CEACAM1 für den Eintritt in die Wirtszelle nutzt, ist das murine Hepatitisvirus (MHV) aus der Gruppe der Coronaviren. Hier erfolgt die Bindung über das spike-Glykoprotein des Virus an CEACAM1 (Dveksler et al., 1991). Alle beschriebenen Interaktionen finden mit der N-terminalen Ig-V-Domäne des CEACAM1 statt. Die gute sterische Erreichbarkeit dieser am weitesten von der Zelle entfernten Domäne und die Abschirmung großer Teile des restlichen Proteins durch die starke Glykosylierung des CEACAM1 lassen diese Befunde aber plausibel erscheinen. Lediglich bei der Interaktion mit dem MHV scheinen auch noch die anderen Ig-Domänen eine Rolle zu spielen, wie die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener löslicher CEACAM1-Mutanten zur Neutralisierung der MHV-Infektion zeigt (Zelus et al., 1998).

### 1.4.3. Tumorsuppression

Eine weitere wichtige Funktion des CEACAM1 wurde aus der Analyse der CEACAM1-Expression im Zuge der malignen Transformation von Zellen abgeleitet: in verschiedenen Karzinomen, wie dem Hepatom (Becker et al., 1985), dem Prostata-, Kolon-, Blasen- und Endometrialkarzinom, ist CEACAM1 im Vergleich zum Ursprungsgewebe vermindert exprimiert. Die Verminderung der CEACAM1-Expression wird als ein frühes Ereignis bei der Tumorgenese angesehen, da die Expression bei der Prostata-Hyperplasie bereits vermindert ist (Kleinerman et al., 1995). Die funktionelle Bedeutung zu dieser Beobachtung wurde bald danach geklärt: Hsieh et al. (Hsieh et al., 1995) und Kleinerman et al. (Kleinerman et al., 1996) konnten CEACAM1 durch Transfektionsstudien als Tumorsuppressor identifizieren. Dabei wurde die humane Prostata-Carcinom-Zelllinie PC-3 mit der langen CEACAM1-Isoform transfiziert und in Nacktmäuse injiziert. Diese transfizierten Zellen wiesen, verglichen mit Kontrollzellen eine signifikant niedrigere Wachstumsrate und Malignität auf. Ferner wurde die benigne, nicht tumorigene Prostataepithel-Zelllinie NbE mit einem CEACAM1-Antisense-Konstrukt transfiziert und somit die CEACAM1-Expression herunterreguliert. Diese Zellen waren nun in der Lage, in Nacktmäusen Tumoren zu erzeugen. Auch das Wachstum der humanen Blasen-Carcinom-Zelllinie 253J B-V konnte durch Transfektion mit CEACAM1 in Nacktmäusen gehemmt werden. Diesen Befunden stehen aber die Beobachtungen entgegen, dass die CEACAM1-Expression in einigen Tumoren, wie dem Magenkarzinom oder dem Plattenepithelkarzinom der Lunge, erhöht ist (Tsutsumi et al., 1990; Ohwada et al., 1994).

### 1.4.4. Regulation der Zellproliferation und der Differenzierung

Die wachstumshemmende Wirkung des CEACAM1 konnte dann auch in verschiedenen anderen Zellsystemen unabhängig von der Tumorentstehung dargestellt werden: In den epithelialen Zelllinien NbE und NBT II wird die Proliferation durch das Verhältnis der Isoformen CEACAM1-L und CEACAM1-S reguliert. Die Gabe von anti-CEACAM1

Antikörpern zu ruhenden kontaktinhibierten Zellen bewirkte die Aufhebung der CEACAM1-vermittelten Kontaktinhibition und den Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus (Singer et al., 2000); die Expression von CEACAM1 in NIH3T3 Fibroblasten hemmte deren Proliferation nach Stimulation mit Insulin (Poy et al., 2002a). Mehrere Studien zeigten einen Einfluß der Stimulation von CEACAM1 auf die Funktion von T-Zellen, auf deren Oberfläche CEACAM1 aktivierungsabhängig exprimiert wird. Hier bewirkte CEACAM1 die Inhibition der zytolytischen Funktion von intestinalen intraepithelialen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Morales et al., 1999). Die Stimulation von CEACAM1 mit Antikörpern hemmte außerdem die Proliferation von anti-CD3-stimulierten T-Zellen (Nakajima et al., 2002). Eine mögliche Bedeutung der CEACAM1-vermittelten Inhibition von T-Zellen kann in der Regulation der Immunantwort durch *Neisseria* liegen: Nach Infektion mit *Neisseria* bleibt häufig die spezifische antikörpervermittelte Immunantwort und die Induktion des immunologischen Gedächtnisses aus. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit *Neisseria* die Aktivierung und Proliferation dieser zentralen Regulatoren des Immunsystems hemmt, was zu einer überwiegend inflammatorischen Immunantwort führt (Boulton & Gray-Owen, 2002).

Ähnlich wie bei der Tumorsuppression, wo in Abhängigkeit vom untersuchten System entweder eine verstärkte oder eine verringerte CEACAM1-Expression gemessen wurde, gibt es auch hier Beispiele für die entgegengesetzte Wirkung des CEACAM1: Kammerer et al. (Kammerer et al., 1998) beobachteten eine Stimulation von T-Zellen durch anti-CEACAM1 Antikörper, ähnlich wie Donda et al. (Donda et al., 2000), die nach gleicher Stimulation gesteigerte Lymphokinfreisetzung beobachteten. Deshalb erscheint es noch verfrüht, CEACAM1 als ein generell inhibitorisches Molekül zu betrachten, obwohl die meisten Daten in diese Richtung weisen.

In direktem Zusammenhang mit der Zellproliferation steht häufig die Differenzierung: wenn eine sich teilende Vorläuferzelle in eine reife funktionale Zelle umgewandelt werden soll, muss dafür zuerst die Zellteilung eingestellt werden. Deshalb passt die inhibitorische Wirkung des CEACAM1 auf die Zellproliferation gut zu dem fördernden Einfluß, den es auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen hat. So konnte eine essentielle Rolle für CEACAM1

bei der Differenzierung von MCF10F-Brustdrüsen-Epithelzellen gezeigt werden (Huang et al., 1999). Diese Zellen reifen *in vitro* bei Wachstum in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix zu tubulären Strukturen unter Ausbildung einer apikal-basolateralen Polarisierung. Ein ähnliches System der Zellpolarisierung stellt die Angiogenese, d.h. die Entstehung von Blutgefäßen aus Endothelzellen, dar (Folkman & D'Amore, 1996). Dieser Prozess konnte durch lösliches CEACAM1 stimuliert werden. CEACAM1 war hier ähnlich effektiv, wie der vaskulär-endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), einer der potentesten angiogenetischen Stoffe (Ergun et al., 2000). Auch die Reifung von dendritischen Zellen ist CEACAM1-abhängig. Diese antigenpräsentierenden Zellen aus dem Thymus sekretieren nach Stimulation mit anti-CEACAM1 verschiedene Zytokine, wie MIP 1 $\alpha$ , MIP2 und MCP, und exprimieren verstärkt kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD54, CD80 und CD86 (Kammerer et al., 2001).

CEACAM1 wurde auch als Substrat der Tyrosinkinase des Insulinrezeptors (IR) identifiziert (Perrotti et al., 1987). Nach Stimulation mit Insulin phosphoryliert der IR Tyrosin 488 des CEACAM1. Im folgenden konnte dann gezeigt werden, dass die Bedeutung dieser Interaktion in der Regulation der Insulininternalisierung durch CEACAM1 liegt (Poy et al., 2002b). Darüber hinaus reguliert CEACAM1 die mitogene Funktion des Insulins.

### **1.5. Signaltransduktion**

Die Signaltransduktion der Zelladhäsionsrezeptoren (und anderer Proteine) umfasst zwei besonders relevante Bereiche: die reversible Proteinphosphorylierung und die Interaktion mit zytoplasmatischen Signalproteinen (Hunter, 2000). Die Phosphorylierung von Proteinen wird durch die Familie der Proteinkinasen bewirkt. Diese Enzyme können die terminale Phosphatgruppe aus dem ATP auf die Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin übertragen. Die Hydrolyse dieser Bindung und die Freisetzung des Phosphates wird durch die Proteinphosphatasen katalysiert. Beide Enzymklassen können, basierend auf ihrer katalytischen Spezifität, in Serin/Threonin- und Tyrosin-spezifische Gruppen unterteilt werden. Proteintyrosinkinasen werden hauptsächlich in *Metazoa* gefunden, was nahe legt, dass die Tyrosinphosphorylierung besonders für die Regulation der multizellulären Kommunikation und Entwicklung wichtig ist (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Die Sequenzierung des humanen Genoms ergab, dass etwa 20% der ca. 32.000 menschlichen Gene mit der Signaltransduktion zu tun haben. Unter ihnen finden sich mehr als 520 Proteinkinasen und 130 Phosphatasen. (Robinson et al., 2000).

Die Auswirkungen der Proteinphosphorylierungen sind vielfältig. Schon lange ist bekannt, dass die Enzymaktivität durch Phosphorylierung reguliert wird (Krebs & Beavo, 1979). Darüber hinaus wird durch Phosphorylierung auch die Interaktion von Proteinen reguliert. Es existieren verschiedene Proteindomänen, die spezifisch an phosphorylierte Aminosäuren in Proteinen binden. Die Bindung an Phosphotyrosin wird vor allem durch zwei Arten vermittelt, die SH2- (src-Homology 2) und die PTB (Phosphotyrosine-Binding)-Domäne (Pawson & Gish, 1992; van der Geer & Pawson, 1995). Beide Domänen binden Phosphotyrosin aber nur in bestimmten Sequenzzusammenhängen, wodurch die Spezifität der Interaktionen gewährleistet wird. Phosphoserin (P-Ser)- und Phosphothreonin (P-Thr) bindende Proteinmodule sind weniger gut charakterisiert. Untergruppen der WW- und der WD40 Domänen können P-Ser/P-Thr –Motive erkennen, ebenso die Proteine der 14-3-3-Familie (Yaffe & Cantley, 1999). Ein wesentlicher Schritt der Aktivierung vieler

Signaltransduktionskaskaden besteht in der Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an die Membran durch die Bindung an phosphorylierte Rezeptoren. Dieser Mechanismus erhöht die lokale Konzentration der Proteine und erleichtert so die Ausbildung funktioneller Signalkomplexe. An der Membran können die Proteine ihrerseits phosphoryliert werden, oder selbst auf andere membrangebundene Ziele wirken (Hunter, 2000).

### 1.5.1 Signaltransduktion des CEACAM1

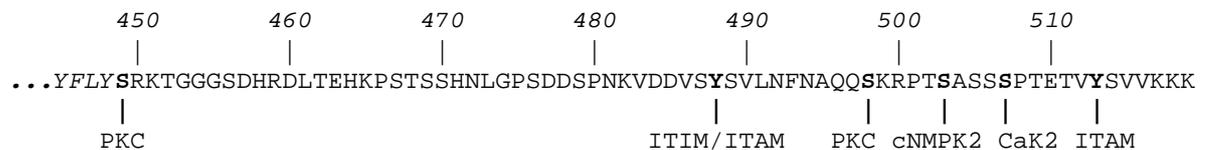
Zur Ausübung der meisten der oben angesprochenen Funktionen (Tumorsuppression, Regulation von Zellproliferation- und Differenzierung, Insulininternalisierung) muss das CEACAM1 in der Lage sein, Signale zu empfangen, zu modulieren und weiterzuleiten. Die zytoplasmatische Sequenz des CEACAM1 enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Abb. 5). Im CEACAM1-S liegt nur das Serin 449 in einer Konsensus-Sequenz für die Proteinkinase C (PKC), die auch benutzt wird (Edlund et al., 1998).

CEACAM1-L besitzt mehrere Serin- und Threoninreste, die phosphoryliert werden können, aber nur über das Ser503 liegen Erkenntnisse vor. Die Phosphorylierung dieser AS, die in einer Konsensus-Sequenz für die Proteinkinase A (PKA) liegt, ist beschrieben worden. Ser503 soll außerdem die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 regulieren (Najjar et al., 1995). Möglicherweise erklärt dies die Notwendigkeit des Ser503 für die CEACAM1-vermittelte Tumorsuppression und die Regulation der Insulin-Internalisierung (Estrera et al., 2001; Fournes et al., 2001).

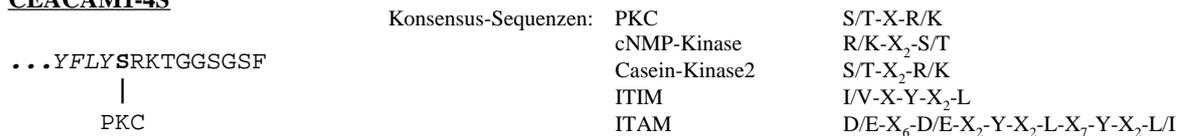
Zusätzlich weist CEACAM1-L noch zwei Tyrosine auf. Das membranproximale Tyrosin 488 liegt in einem sogenannten Immunoreceptor-Tyrosine-Based-Inhibitory-Motiv (ITIM), mit der Konsensus-Sequenz I/VxYxxL/V. Zusammen mit dem distalen Tyrosin 513 bildet es ein modifiziertes „Immunoreceptor-Tyrosine-based-Activation-Motiv“ (ITAM, Konsensus-Sequenz D/Ex<sub>6</sub>D/Ex<sub>2</sub>Yx<sub>2</sub>Lx<sub>7</sub>Yx<sub>2</sub>L/I). Allerdings ist der Abstand mit 25 AS größer als die 10 AS, die im klassischen ITAM gefunden werden (Beauchemin et al., 1997). Es sollte erwähnt werden, dass im humanen CEACAM1 auch das distale Tyrosin ein ITIM bildet. ITIMs und

ITAMs werden in einer Vielzahl von Membranrezeptoren gefunden, wie dem T-Zell-Rezeptor, dem B-Zell-Rezeptor, Fc $\gamma$ RIIB, CD22, Interleukinrezeptoren, und Killer-Cell-Ig-Like-Receptors (KIRs). Nach ihrer Phosphorylierung binden ITAMs und ITIMs an Proteinkinasen bzw. -phosphatasen, deren Aktivierung zur Stimulation oder Termination von Signalwegen führt, die die Zellproliferation regulieren (Daeron et al., 1995; Burshtyn et al., 1997; Obrink, 1997). Das Tyr488 des CEACAM1-L wird durch die Tyrosinkinase des Insulinrezeptors und die Kinasen der src-Familie, c-src, lyn und hck, phosphoryliert (Margolis et al., 1990; Brummer et al., 1995; Skubitz et al., 1995). Daten über die Phosphorylierung des Tyrosin 513 liegen dagegen nicht vor. Nach seiner Tyrosinphosphorylierung kann CEACAM1 eine Reihe von Substraten binden. Hier sind vor allem die Proteinkinasen c-src, lyn und hck und die Proteinphosphatasen SHP1 und SHP2 zu nennen (Brummer et al., 1995; Skubitz et al., 1995; Beauchemin et al., 1997; Huber et al., 1999). Darüber hinaus ist noch die Bindung der Adapterproteine Shc und Paxillin, sowie des  $\beta_3$ -Integrins an den zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L in Abhängigkeit von dessen Tyrosinphosphorylierung beschrieben worden (Ebrahimnejad et al., 2000; Brummer et al., 2001; Poy et al., 2002a).

**CEACAM1-4L**



**CEACAM1-4S**



**Abbildung 5: Potentielle Phosphorylierungsstellen im zytoplasmatischen Bereich von CEACAM1-L und CEACAM1-S der Ratte.**

Die funktionelle Bedeutung der Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1 wurde in mehreren Studien untersucht: Chen et al. konnten zeigen, dass der zytoplasmatische Teil des CEACAM1-L den BZR-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in der DT40-B-Zelllinie inhibieren kann. Nach Mutation des Tyrosins im ITIM zum strukturell ähnlichen, aber nicht phosphorylierbaren Phenylalanin fiel der Effekt weg (Chen et al., 2001). Die Bindung des Adapterproteins Shc an phosphoryliertes Tyrosin 488 des CEACAM1-L ist für den inhibitorischen Effekt des CEACAM1 auf die Stimulation der Zellproliferation durch Insulin verantwortlich gemacht worden (Poy et al., 2002a). In die gleiche Richtung geht der Befund, dass die Fähigkeit des CEACAM1 zur Tumorsuppression ebenfalls von Tyr488 abhängt (Izzi et al., 1999). Obwohl die Bedeutung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung für verschiedene Funktionen des CEACAM1 also sehr klar gezeigt wurde, ist die *in vivo*-Regulation der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung dagegen nur äußerst unzureichend verstanden.

Auch bei der Bindung und Endozytose von *Neisseria* spielt die CEACAM1-vermittelte Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Die Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid an den TLR-4 (Toll-Like-Receptor 4) auf Epithel- und Endothelzellen induziert über einen NF $\kappa$ B-abhängigen Weg die Expression von CEACAM1 auf den Zellen (Muenzner et al., 2000; Muenzner et al., 2001). Auf professionellen Phagozyten wie neutrophilen Granulozyten ist für die dann folgende CEACAM1-vermittelte Phagozytose die Aktivierung eines Signalweges über src-Kinasen, die kleine GTPase Rac1, sowie die Serin-Threonin-Kinase PAK nötig, der in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun mündet (Hauck et al., 1998). Außerdem konnte für die saure Sphingomyelinase die Beteiligung an der Regulation der CEACAM1-vermittelten Endozytose von *Neisseria* gezeigt werden (Hauck et al., 2000).

Ziel vieler Signalwege ist das Zytoskelett, das vielfältige Aufgaben in der Zelle ausübt. In diesem Zusammenhang ist besonders seine Beteiligung an der Endozytose zu nennen (Jeng & Welch, 2001).

## 1.6 Das Zytoskelett

Alle eukaryontischen Zellen besitzen ein intrazelluläres Netzwerk von Proteinfasern, das als Zytoskelett bezeichnet wird. Es verleiht der Zelle aufgrund seiner dynamischen Eigenschaften u.a. die Fähigkeit, die Form zu wechseln, sowie gezielte und koordinierte Bewegungen zu realisieren: Muskelkontraktion, Zellmigration, Transport von Organellen durch das Zytoplasma, sowie die Trennung der Chromosomen während der Mitose sind hier zu nennen (Alberts et al., 1995). Die unterschiedlichen Funktionen des Zytoskeletts werden von drei Arten von Proteinfilamenten vermittelt: den Mikrotubuli, den Intermediärfilamenten (IF) und den Aktinfilamenten. Alle drei Filamenttypen können über komplementäre Selbstbindungen zu spiraligen Fasern polymerisieren sowie über die Wechselwirkung mit zahlreichen anderen Proteinen miteinander interagieren (Cooper, 1997).

Die **Mikrotubuli** weisen eine Tunnel-ähnliche Struktur mit einem Durchmesser von 25 nm auf die sich aus 13 Protofilamenten aufbaut. Jedes dieser Protofilamente besteht wiederum aus mehreren Tubulindimeren, die sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zusammensetzen. Die Mikrotubuli weisen eine Polarität auf, sodass ihr zur Zellperipherie gerichtetes Ende (Plusende) schneller als das zum Zentrosom, dem Ursprungsort der Mikrotubuli, gerichtete Minusende wächst, bzw. wieder abgebaut wird. Diese Eigenschaft ist für den kontinuierlichen Auf- und Abbau der Mikrotubuli, die in Zellen eine Halbwertszeit von nur einigen Minuten haben, verantwortlich (Mitchison & Kirschner, 1984; Cleveland, 1993).

Während der Mitose bilden Mikrotubuli mitotische Spindeln aus, die für die Verteilung jeweils eines Chromosoms an einen der beiden Spindelpole sorgen. Die Mikrotubuli sind außerdem an der Verteilung des Zytoplasmas, von Organellen und Membranvesikeln beteiligt. Die Bewegung von Organellen und Vesikeln entlang der Mikrotubuli wird durch Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, wie den Kinesinen und den Dyneinen, vermittelt (Dabora & Sheetz, 1988; Lee et al., 1989).

Die **Intermediärfilamente** (IF) sind kräftige und dauerhafte Proteinfasern, die sich im Zytoplasma nahezu aller Eukaryontenzellen finden. Ihr Durchmesser beträgt 10-12 nm. IF

kommen besonders dort vor, wo mechanische Kräfte wirken, z.B. in Epithelzellen, in denen die IF an den Desmosomen-Verbindungsstellen zwischen den Zellen angreifen. Im Gegensatz zu den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten bestehen die IF aus einem heterogenen Spektrum an Proteinen, anhand derer man sie in vier Klassen einteilt: 1. die aus sauren, neutralen und basischen Keratinen bestehenden IF vom Typ I, die in Epithelzellen vorkommen, 2. die Typ II-IF aus Vimentin, welche von vielen mesenchymalen Zellen exprimiert werden, bzw., aus Desmin, die in Muskel- und Gliazellen vorkommen, 3. Die Typ III-Neurofilamente der Neuronen, und 4. Die aus Lamin bestehenden IF des Nukleoplasmas (Fuchs & Weber, 1994).

Bezüglich der funktionellen Bedeutung der IF gibt es noch viele offene Fragen, zumal auch Vertebraten-Zellen ohne IF wachsen können (Venetianer et al., 1983; Colucci-Guyon et al., 1994). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Ausübung von Stütz- und Schutzfunktionen gegen mechanische Belastungen (Coulombe et al., 2000).

Die **Mikrofilamente**, bestehend aus filamentösem F-Aktin, entstehen durch Polymerisation aus monomerem, globulärem G-Aktin. Aktin wird in allen eukaryontischen Zellen gefunden und gehört hier zu den am stärksten konservierten Proteinen (Vandekerckhove & Vancompernelle, 1992). Alle sechs bekannten Isoproteine des Aktin, die in Säugetieren gefunden werden, weisen ein Mr von 42 k auf (Pollard & Cooper, 1986). Die Filamente mit einer doppelhelikalen Struktur des Aktins haben einen Durchmesser von 7 bis 9 nm. Da sich alle Aktinmonomere bei der Polymerisation in die gleiche Richtung orientieren, weisen die Filamente eine Polarität auf, die Enden werden als spitzes Ende („pointed“) und bärtiges Ende („barbed“) bezeichnet. *In vivo* richten sich die Mikrofilamente mit ihrem bärtigen (Plus-) Ende zur Plasmamembran hin, während die Spitze zum Zellinneren zeigt. *In vitro* wächst das bärtige Ende schneller als das spitze Ende, da sich Aktinmonomere bevorzugt vom Minusende ablösen und an das Plusende anlagern, was als Tretmühlenmechanismus bezeichnet wird (Pollard & Mooseker, 1981; Brenner & Korn, 1983). *In vivo* wird die Polymerisation und auch die Verzweigung des F-Aktins genau reguliert. Von besonderer

Bedeutung ist hier der Arp2/3-Komplex, ein Verbund von fünf Proteinen, der die Sprossung neuer Aktinfilamente seitlich von bereits bestehenden kontrolliert (Higgs & Pollard, 1999; Mullins & Pollard, 1999).

Obwohl Aktin im ganzen Zytoplasma verteilt vorkommt, besitzen die meisten tierischen Zellen direkt unter der Plasmamembran ein dichtes Geflecht von F-Aktin, mit dem weitere Proteine assoziiert sind (Aktin-Kortex). Dieser Komplex bleibt bei der Extraktion der Plasmamembranproteine mit dem Detergens Triton X-100 als Detergens-unlösliches Pellet zurück (Luna & Hitt, 1992). Durch seine Wechselwirkung mit der Plasmamembran bestimmt der Aktinkortex einerseits die Zellform und reguliert andererseits dynamische Prozesse, wie Phagozytose, Zytokinese, Zell-Motilität, Zell-Adhäsion und Endozytose. Durch die Interaktion mit Membranproteinen können Signale in das Zellinnere übertragen werden. Die Interaktion zwischen Plasmamembranproteinen und dem kortikalen Zytoskelett kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Indirekte Bindungen werden durch zahlreiche Aktin-bindende Proteine (ABP) vermittelt, von denen etwa 60 verschiedene bekannt sind (Pollard et al., 1994). Die Ezrin-Radixin-Moesin- (ERM) Familie der ABPs bewirkt beispielsweise die Bindung der IgSF-Mitglieder ICAM-1 bis -3 und des PSGL-1 an das Aktin-Zytoskelett (Yonemura et al., 1998; Alonso-Lebrero et al., 2000; Serrador et al., 2002).

### **1.7 Zielsetzung**

Ausgehend von der beobachteten Expression des CEACAM1 in PC12-Zellen, sollten zuerst die hier exprimierten Isoformen des CEACAM1 molekularbiologisch und proteinchemisch charakterisiert werden.

Im Hauptteil dieser Arbeit sollte dann die Beteiligung von CEACAM1 an Signaltransduktionsprozessen untersucht werden, besonders im Hinblick auf die Regulation der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung, da sie für die Signaltransduktion des CEACAM1 zwar von zentraler Bedeutung, ihre Regulation aber nur unzureichend verstanden ist. Es sollte geprüft werden, ob und ggf. wie sich die Interaktion von CEACAM1 mit zytoplasmatischen Liganden, besonders dem Aktin-Zytoskelett, durch Applizieren eines CEACAM1-spezifischen extrazellulären Stimulus modulieren lässt. Die sich aus dieser Stimulation ergebenden Signale sollten charakterisiert werden. Des Weiteren sollten die Ergebnisse zur Signaltransduktion des CEACAM1 in den gegebenen zellulären Kontext eingeordnet werden, besonders im Hinblick auf die neuronale Differenzierung der PC12-Zellen.