

3. Diskussion

3.1. CEACAM1-Expression in PC12-Zellen

3.1.1. Transmembranäre CEACAM1-Isoformen

In der vorliegenden Arbeit wurde die endogene Expression von CEACAM1 in der Pheochromozytom-Zelllinie PC12 der Ratte gezeigt (Greene & Tischler, 1976). CEACAM1 konnte hier also zum ersten Mal in einer neuroendokrinen Zelllinie nachgewiesen werden. Dies ist besonders im Hinblick auf den induzierbaren neuronalen Phänotyp der PC12-Zellen bemerkenswert, da CEACAM1 in Neuronen selbst nicht vorkommt. Während der Embryonalentwicklung des Rattenhirns konnte lediglich die Expression auf Endothelzellen von Mikrogefäßen, auf Perizyten und Astrozyten gezeigt werden (Sawa et al., 1994).

In den PC12-Zellen werden, wie in allen anderen CEACAM1-positiven Geweben und Zellen, beide membranständigen Isoformen, CEACAM1-L und CEACAM1-S, exprimiert. Anhand der Ergebnisse der RT-PCR (siehe Ergebnisteil, Abb. 8) lässt sich ein Verhältnis der beiden Isoformen von ca. 1:1 abschätzen. Die Signale der Immunblotanalyse scheinen auf einen höheren Anteil der langen Isoform hinzudeuten, allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die beiden zur Immunpräzipitation verwendeten Antiseren möglicherweise unterschiedliche Affinitäten für ihr jeweiliges Antigen aufweisen. Deshalb kann auf der Grundlage dieser Analysen keine genaue Aussage über die Anteile der CEACAM1-Isoformen getroffen werden. Der relativ hohe Anteil von CEACAM1-L in den PC12-Zellen ist für die Funktion des CEACAM1 von Bedeutung, da diese Isoform wegen ihrer zytoplasmatischen Domäne als die eigentlich Signalaktive Form angesehen wird. Deshalb sollten diese Zellen ein gut geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen zur Signaltransduktion des CEACAM1 darstellen. In den meisten Organen, vor allem in den exokrinen Drüsen und der Leber, dominiert dagegen die kurze Isoform (Baum et al., 1996). Das Verhältnis der Isoformen ist für die Funktion des CEACAM1 von Bedeutung. So findet die Suppression des Wachstums von Kolon-Tumoren nur innerhalb einer bestimmten Bandbreite des CEACAM1-

L:S-Verhältnisses statt. Wird dieses über- oder unterschritten, findet keine Inhibition mehr statt (Turbide et al., 1997). Wie die Regulation des Isoformenverhältnisses stattfindet, ist nicht bekannt.

3.1.2. Neue sekretierte CEACAM1-Isoformen

Es konnten außerdem zwei neue Spleißvarianten des CEACAM1 charakterisiert werden. Entsprechend der Nomenklatur der CEA-Familie wurden diese Proteine als CEACAM1-4C1 und CEACAM1-4C2 bezeichnet. Da diesen beiden Formen das für den Transmembranteil kodierende Exon 6 fehlt, sollten diese Proteine sekretiert werden. Tatsächlich gelang es, lösliches CEACAM1-4C2 im Zellkulturüberstand von PC12-Zellen zu identifizieren. Die Unterscheidung zu CEACAM1-4C1 sowie eventuell proteolytisch freigesetzten Ektodomänen von CEACAM1 konnte anhand der Identifizierung über den (ursprünglich zytoplasmatischen) C-Terminus des CEACAM1-4C2 erfolgen. Die Bedeutung der neuen Isoformen wird auch durch die Identifikation von CEACAM1-4C2 in den Ratten-Zelllinien MTC und Mtl α 3 unterstrichen (Michely, 2000; Budt et al., 2002). CEACAM1-4C1 konnte dagegen bisher nur in PC12-Zellen als mRNA nachgewiesen werden. Der Nachweis des CEACAM1-4C2 konnte *in vivo* aus Rattenserum reproduziert werden. Durch diesen Befund ist sichergestellt, dass es sich bei den neuen Isoformen nicht nur um ein Zellkulturartefakt handelt. Darüber hinaus konnte die pathologische Relevanz der sekretierten CEACAM1-Isoformen gezeigt werden: Im Serum von Tieren mit wachsendem Morris-Hepatom 7777 in den Hinterschenkeln konnte eine Erhöhung der CEACAM1-4C2-Konzentration (Budt et al., 2002), wie auch der anderen CEACAM1-Formen gezeigt werden (Lucka et al., 1998). Das Morris-Hepatom wird als Modellsystem für Lebertumoren verwendet (Morris & Slaughter, 1977). Die Erhöhung der Menge von sekretiertem CEACAM1 im Serum hepatomtragender Ratten steht deshalb mit dem vermuteten Ursprung des sekretierten CEACAM1 aus der Leber in gutem Einklang. Beim Menschen findet sich eine deutlich höhere Konzentration von CEACAM1 in der Gallenflüssigkeit (ca. 10 mg/l, (Svenberg, 1976)), in die es über die Gallenkanalikuli der

Leber gelangt, als im Serum (etwa 10-20 -fach niedriger, (Svenberg et al., 1979)). Nach pathologischem Gallengangverschluss durch Gallensteine oder Pankreastumore stieg die Konzentration von CEACAM1 auch im Serum deutlich an (Draberova et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach experimenteller Gallengangligatur in Ratten erzielt (Lucka et al., 1998).

Welche Funktion dem löslichen CEACAM1 im Serum zukommt, und ob es funktionelle Unterschiede zwischen regulär sekretiertem CEACAM1 und dem Proteolyseprodukt gibt, ist nicht geklärt. Sekretierte Formen des CEACAM1 sind bisher nur im humanen System beschrieben. Hier sind drei Varianten bekannt, die aber nicht den hier beschriebenen Isoformen entsprechen (Kuroki et al., 1991). Es existieren aber auch in der Ratte schon einige andere lösliche Mitglieder der CEA-Familie: Die Gene *Ceacam9* und *Ceacam10* codieren generell für lösliche Proteine, ebenso die Gene der PSG-Gruppe, *Psg 36-40* (Kodelja et al., 1989; Rebstock et al., 1990; Earley et al., 1996; Blomberg et al., 1997). Die massive, Plazenta-spezifische Expression der PSGs während der Schwangerschaft ist als Erklärungsansatz für die Suppression des mütterlichen, spezifischen Immunsystems herangezogen worden, die nötig ist, um das Abstoßen des immunologisch teilfremden Embryos zu verhindern (Hammarström et al., 1993). Die PSGs könnten so zur Regulation des Immunsystems beitragen. Als ein Beleg für diese These ist gezeigt worden, dass PSG 18 die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin 10 (IL-10) durch murine Makrophagen stimuliert (Wessells et al., 2000). IL-10 wird während der Schwangerschaft hoch exprimiert und trägt zur Erhaltung des Immunstatus der Mutter bei, z.B. in dem es die Produktion der inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF α lokal verringert (Rivera et al., 1998). Die Fähigkeit der CEA zur Bindung an Pathogene wie *Neisseria*, *Haemophilus* und den MHV kann außerdem zu deren Neutralisierung beitragen, wodurch den löslichen CEA-Familien-Mitgliedern eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr zukommt. Im Widerspruch zur potentiell immunprotektiven Funktion von CEACAM1 steht aber die Beobachtung, dass lösliches CEACAM1 die Ausbreitung von MHV von nicht infizierten auf

infizierte Zellen erleichtert (Taguchi & Matsuyama, 2002). CEACAM1 bindet an das Spike-Glykoprotein des Virus und überführt es so in eine Fusions-kompetente Form.

Kürzlich ist eine 85 kd-Form des CEACAM1 in Gallenflüssigkeit als das hauptsächlich Cholesterol-kristallisierende Protein beschrieben worden, was für die Entstehung von Gallensteinen von Bedeutung ist (Jirsa et al., 2001). Im Kulturmedium von HDMEC-Endothelzellen konnten zwei CEACAM1-Isoformen von 50 kd und 120 kd nachgewiesen werden, die, ebenso wie aus Granulozyten gereinigtes transmembranäres CEACAM1, in der Lage waren, die Angiogenese von Endothelzellen zu induzieren (Ergun et al., 2000). Die genauen Sequenzen dieser löslichen Formen unterschiedlichen Molekulargewichtes sind aber unbekannt. Ob die unterschiedlichen Größen durch differentielles Spleißen, durch Proteolyse oder durch variierende Glykosylierung entstehen, ist noch ungeklärt.

Die Erzeugung löslicher Formen von Transmembranrezeptoren kann verschiedene Funktionen haben. Zum einen kann durch die Proteolyse und Freisetzung des extrazellulären Teils die Konzentration aktiver Rezeptoren auf einer Zelle verringert und so deren Ansprechbarkeit auf den Liganden dieses Rezeptors vermindert werden. Zweitens kann ein löslicher Rezeptor mit der zellulären Form in Konkurrenz um die Bindung des Liganden treten, was ebenfalls zur Verringerung der Wirkung des Liganden führt. In diesem Fall hätten durch Proteolyse oder durch alternatives Spleißen entstandene lösliche Formen eines Rezeptors wahrscheinlich die gleiche Wirkung. Eine dritte allgemeine Möglichkeit zur Erklärung der Funktion der Proteolyse von Transmembranrezeptoren besteht in der Entkopplung des intrazellulären, signalübertragenden Anteils vom regulatorischen Einfluss der extrazellulären Domäne. So ist für das PECAM1 – ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül der IgSF – gezeigt worden, dass die durch Metallomatrixproteasen vermittelte Spaltung einen extrazellulären Teil und einen Rest, bestehend aus Transmembrandomäne und intrazellulärem Anteil, erzeugt. Letzterer wirkt dann als konstitutiv aktives Signalmolekül mit deutlich stärkerem Einfluss auf z.B. die Zellproliferation, als das für das vollständige Molekül der Fall war (Ilan et al., 2001). Da zwischen dem PECAM1 und dem CEACAM1 einige strukturelle (extrazelluläre Ig-Domänen, intrazelluläre ITIM-Motive) und funktionelle (homophile

Interaktion, Bindung von SHP1 und SHP2, Einfluss auf die Zellproliferation) Parallelen bestehen, wäre es wissenswert, ob auch für das CEACAM1 ein ähnlicher Regulationsmechanismus besteht.

3.2. CEACAM-Tyrosinphosphorylierung und –Signaltransduktion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 und deren Modulation durch extrazelluläres Quervernetzen. Aus der Stimulation resultiert ein Signal, das die Lokalisation und Aktivität intrazellulärer Proteine moduliert.

Die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 konnte nur nach Inhibition intrazellulärer Tyrosinphosphatasen durch den Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Pervanadat war kein weiterer Stimulus nötig, um CEACAM1 in tyrosinphosphorylierter Form zu erhalten. Sehr wohl ist aber trotz Gegenwart des Inhibitors eine weitere Steigerung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung möglich, wie etwa gezeigt durch Serum. Das spricht gegen eine artifizielle Induktion der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung durch das Pervanadat. Diese Ergebnisse lassen sich als konstitutive, aber sehr Phosphatase-sensitive CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung deuten. CEACAM1 wäre demnach in der Zelle der Aktion von Tyrosinkinase und –Phosphatasen ausgesetzt, die ein beständiges konstantes Niveau der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung bewirken. Sobald durch den Aufschluß der Zelle während der Probenaufarbeitung die Bedingungen geändert werden, scheint in Abwesenheit des Inhibitors die Dephosphorylierung die Überhand zu gewinnen.

Die an der Regulation der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung beteiligten Kinasen und Phosphatasen sind nur zum Teil bekannt. Die src-Kinase kann CEACAM1 *in vitro* phosphorylieren, ebenso die Insulinrezeptorkinase nach Stimulation mit Insulin in Hepatozyten der Ratte (Accili et al., 1986; Brummer et al., 1995). Für die SH2-Domänen-enthaltenden Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 konnte im humanen und murinen System die Interaktion mit CEACAM1 gezeigt werden (Beauchemin et al., 1997; Huber et al., 1999).

In dem hier vorliegenden Fall kommt besonders SHP2 als Kandidat für die Dephosphorylierung des CEACAM1 in Frage, da die Interaktion der beiden Moleküle und die CEACAM1-Tyrosindephosphorylierung nach Stimulation korrelierten.

Die Tyrosinphosphatase SHP2 wird ubiquitär exprimiert und weist einen modularen Aufbau mit zwei N-terminalen SH2-Domänen, gefolgt von einer C-terminalen katalytischen Domäne, auf (Stein-Gerlach et al., 1998). Im inaktiven Zustand liegt SHP2 in einer geschlossenen Konformation vor, in der die N-terminale SH2-Domäne intramolekular an die C-terminale katalytische Domäne bindet, und diese so inhibiert. Durch Bindung der SH2-Domänen an tyrosinphosphorylierte Peptide öffnet sich das Enzym. In dieser offenen Konformation ist die katalytische Domäne frei vom inhibitorischen Einfluß und das Enzym wird aktiv. SHP2 wird also durch Substratbindung aktiviert (Hof et al., 1998). Einen ähnlichen Schaltermechanismus mit Übergang zwischen inaktiver geschlossener und aktiver offener Konformation zeigen auch andere Moleküle, wie die Mitglieder der src-Familie der Tyrosinkinase (Sicheri et al., 1997; Williams et al., 1997).

In Abbildung 38 ist ein Modell zur Veranschaulichung der Vorgänge am CEACAM1 in Abhängigkeit von der makromolekularen Verteilung gezeigt. Im Grundzustand liegt CEACAM1 zumindest teilweise tyrosinphosphoryliert vor. SHP2 kann CEACAM1 über seine SH2-Domänen binden und liegt so in aktiver Form an der Membran vor. Ein einzelnes CEACAM1 kann aber nicht gleichzeitig als Aktivator und Substrat der SHP2 fungieren, da die Phosphotyrosine des CEACAM1 durch die Bindung der SH2-Domänen der SHP2 blockiert sind. Erst wenn durch Quervernetzen die lokale Konzentration der CEACAM1-Moleküle erhöht wird, steht der SHP2 weiteres CEACAM1 als Substrat bereit und es wird dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung steht aber wiederum weniger CEACAM1 als Rezeptor für die SHP2 bereit und es kommt – im Gleichgewicht – zu einer Reduktion der Bindung. SHP2 wird wieder freigesetzt und durch intramolekulare Bindung inaktiviert. Dadurch gewinnt der Einfluß einer nicht bekannten Kinase die Überhand und CEACAM1 wird wieder rephosphoryliert. Vermutlich stellt sich dann im CEACAM1-Aggregat ein

Gleichgewicht der Einwirkung zwischen anwesenden Kinasen und Phosphatasen ein, sodass ein kontinuierliches Niveau der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung erhalten bleibt. Dieser Mechanismus lässt aber natürlich noch Fragen offen. Zum Beispiel ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, die Cluster-induzierte CEACAM1-Tyrosindephosphorylierung in verschiedenen transfizierten Zelllinien, die jeweils nur CEACAM1-L enthielten, zu reproduzieren. Dies wirft die Frage auf, ob der in den PC12-Zellen beobachtete Effekt auf der Anwesenheit der kurzen Isoform beruht, analog zu der Bedeutung des CEACAM1-S bei der Regulation der Tumorsuppression.

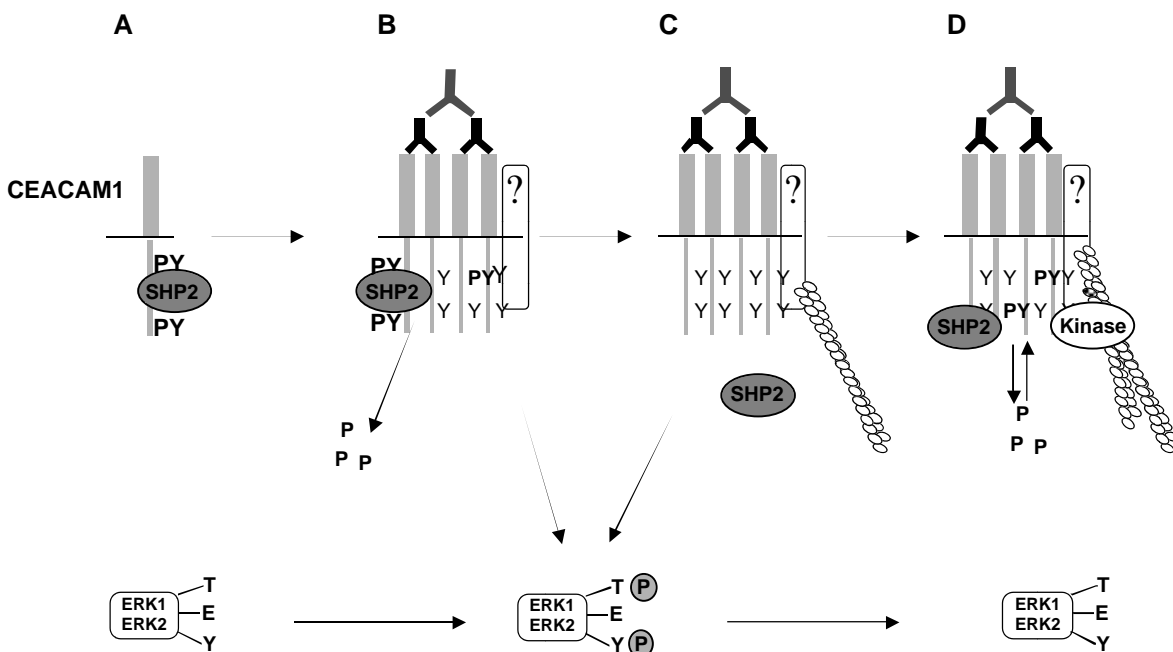


Abbildung 38: Modell der CEACAM1-Signaltransduktion während der makromolekularen Reorganisation.

A: CEACAM1 liegt konstitutiv an Tyrosin phosphoryliert und im Komplex mit der Tyrosinphosphatase SHP2 vor. **B:** Durch die Konzentration von CEACAM1 in makromolekularen Aggregaten wird der SHP2 weiteres CEACAM1 als Substrat zugeführt. CEACAM1 wird dephosphoryliert. **C:** Durch die Dephosphorylierung kommt es im Gleichgewicht zur verringerten Bindung der SHP2. **D:** Im Aggregat stellt sich dann vermutlich ein Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung ein.

Gleichzeitig findet, vermutlich über einen Adapter, die Bindung an das Aktin-Zytoskelett statt (**B-D**). Die frühen Ereignisse bewirken außerdem eine transiente Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (unten).

Die Bedeutung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung ist in verschiedenen Studien untersucht worden. Zum Beispiel hängt die Bindung intrazellulärer Partner an das CEACAM1 von dessen Tyrosinphosphorylierung ab. Dies wurde für die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2, die Tyrosinkinase c-src, die Adapterproteine Shc und Paxillin, sowie das β 3-Integrin gezeigt (Brummer et al., 1995; Huber et al., 1999; Ebrahimnejad et al., 2000; Poy et al., 2002a). Auch für die Funktionalität des CEACAM1 in verschiedenen Systemen konnte die Bedeutung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden. Trotz der Vielzahl dieser Untersuchungen, die mehr oder weniger indirekt die Funktion der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung betrachten (siehe Einleitung), existierte bisher nur ein singulärer Befund zu deren zellulärer Regulation: Die Stimulation von humanen neutrophilen Granulozyten mit anti-CEACAM1-Antikörpern bewirkte eine schnelle und kurzfristige Zunahme der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung (Skubitz et al., 1996), hatte also den genau entgegengesetzten Effekt, wie in den PC12-Zellen. In beiden Fällen ist die Einwirkung sowohl von Proteinkinasen als auch Phosphatasen auf CEACAM1 nötig. Lediglich die chronologische Reihenfolge der Aktion der Enzyme ist umgekehrt. Welche Faktoren die Auswirkung der Stimulation bestimmen, ist nicht geklärt. Sicherlich spielt aber das unterschiedliche Repertoire an Kinasen und Phosphatasen in beiden Zellsystemen eine Rolle: So werden einige Proteinkinasen der src-Familie nur in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert, zu denen auch die Granulozyten, nicht aber die PC12-Zellen gehören. Evtl. ist auch die Dosierung des Stimulus von Bedeutung. In der hier vorliegenden Studie war das Quervernetzen der anti-CEACAM1-Antikörper mit einem sekundären Antikörper nötig, um eine Veränderung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung zu bewirken. In Granulozyten reichte dagegen die alleinige Gabe von anti-CEACAM1-Antikörpern aus. Möglicherweise deutet diese Tatsache darauf hin, dass CEACAM1 in Granulozyten auch im unstimulierten Zustand im Komplex mit anderen Molekülen vorliegt. So ist z.B. in Analogie zum TZR und BZR die Bildung eines multimeren Komplexes aus den auf Granulozyten exprimierten Mitgliedern der CEA-Familie, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6 und CEACAM8 vorgeschlagen worden (Grunert et al., 1998).

Die Stimulation von CEACAM1 durch Clustern bewirkte in PC12-Zellen außerdem noch eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. Dieser Befund steht scheinbar im Widerspruch zu der inhibitorischen Wirkung des CEACAM1 auf NIH 3T3-Fibroblasten (Poy et al., 2002a). Nach Expression des Insulinrezeptors reagierten diese Zellen mit Proliferation und MAPK-Aktivierung auf Stimulation mit Insulin. Die Koexpression von CEACAM1 hob die mitogene Wirkung des Insulins wieder auf. Dieser Befund wurde durch die Bindung des CEACAM1 an das Adapterprotein Shc erklärt, wodurch letzteres nicht mehr in ausreichendem Maße für die Signalweiterleitung am Insulinrezeptor zur Verfügung stehen soll. Eine mögliche Erklärung für die gegensätzliche Wirkung des CEACAM1 in diesen beiden Systemen besteht darin, dass die MAPK-Inhibition alleine durch Expression des CEACAM1 erreicht wurde, während die Stimulation des endogen exprimierten CEACAM1 die MAPK-Aktivierung bewirkte. Möglicherweise stellt das CEACAM1 also einen konstitutiv inhibitorischen Rezeptor dar, und die vermeintliche Aktivierung durch Clustern ist vielmehr eine Aufhebung der Inhibition. Eine dominant negative Wirkung übt CEACAM1 auch bei der Tumorsuppression aus: auch hier ist die Expression von CEACAM1 ausreichend für die Inhibition der Proliferation, eine zusätzliche Stimulation ist nicht nötig (Hsieh et al., 1995).

Basierend auf der Zugehörigkeit zur IgSF und dem Vorhandensein eines ITIM in der zytoplasmatischen Domäne ist CEACAM1 in eine Familie von koinhibitorischen Rezeptoren innerhalb des Immunsystems klassifiziert worden (Sinclair, 1999). Die Funktion dieser Rezeptoren besteht in der Beendigung von Signalen, die durch meist ITAM-tragende, aktivierende Rezeptoren ausgelöst werden. Die koinhibitorischen Rezeptoren entfalten ihre Wirkung durch Ko-Clustern mit den Aktivatoren, wodurch die mit den inhibitorischen Rezeptoren assoziierten Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 in räumliche Nähe zu ihren Substraten gebracht werden, und z.B. durch Dephosphorylierung von Phosphotyrosinresten in ITAMs das Abschalten von Signalen bewirken können. Als gut charakterisiertes Beispiel für derartige Wirkung ist der FcRIIB zu nennen, ein Rezeptor für die konstanten Fragment von Immunglobulinen (Fc=„fragment constant“ oder „fragment crystallizable“) der durch

Antikörper-Antigen Komplexe mit dem BZR koaggregiert wird und dann dominant inhibitorisch wirkt (Coggeshall, 1998).

Ein generelles Motiv, das sich in vielen durch Zelladhäsion induzierten Signalwegen wiederholt, ist die Stimulation von Zelladhäsionsrezeptoren durch das Erzeugen großer Aggregate (Abb. 39). In allen Familien der Zelladhäsionsrezeptoren finden sich Beispiele für solches Verhalten: Die Integrine clustern nach Bindung ihrer Liganden der extrazellulären Matrix in den Fokalkontakten, wo sie mit einer Vielzahl von Proteinen in Wechselwirkung treten und verschiedene Signale auslösen (Petit & Thiery, 2000). Die Cadherine liegen ebenfalls in großen Komplexen an den Zellkontakten vor. Auch hier werden an der Innenseite der Membran Signal- und Adaptermoleküle rekrutiert, die für die Weiterleitung des Cadherin-Signals sorgen (Katz et al., 1998). Das Quervernetzen von L-Selektin bewirkt die Aktivierung von Integrinen und fördert die durch sie vermittelte Zelladhäsion (Sikorski et al., 1996). Die Mitglieder der IgSF zeigen ein ähnliches Verhalten: so wird das PECAM-1 durch Oligomerisierung aktiviert. Dies kann analog zum hier angewendeten Verfahren durch Antikörper, oder durch andere multivalente extrazelluläre Liganden geschehen (Chiba et al., 1999; Ohmori et al., 2001). In einer sehr eleganten Studie wurde gezeigt, dass die Oligomerisierung alleine tatsächlich für die Aktivierung des PECAM-1 ausreicht, das also etwa Konformationsänderungen nach Ligandenbindung keine Rolle spielen: Nach Fusion des intrazellulären Teils des PECAM-1 mit einer oder mehrerer Kopien des FKBP (FK506 binding protein) und Aggregation mit dessen bivalenten Liganden AP1510 konnte die Aktivierung des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins ähnlich wie nach Stimulation des PECAM-1 mit Antikörpern verzeichnet werden (Zhao & Newman, 2001).

Auch über die durch Quervernetzen induzierte Signaltransduktion des ICAM-1 liegen einige Befunde vor. Zur Stimulation wurden hier entweder Antikörper, fixierte, β_2 -Integrin-positive Zellen, oder auch multivalentes Fibrinogen eingesetzt. Je nach untersuchtem Zellsystem konnte die gesteigerte Tyrosinphosphorylierung unterschiedlicher zytoplasmatischer Signalmoleküle gezeigt werden, unter ihnen p53/56 lyn, c-src, cortactin, FAK, Paxillin, CAS.

Die Zellen reagierten z.B. mit gesteigerter MAPK-Aktivität, Zytokinsekretion oder gesteigerter Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, wie MHC II, VCAM-1, oder ICAM-1 selbst (Hubbard & Rothlein, 2000).

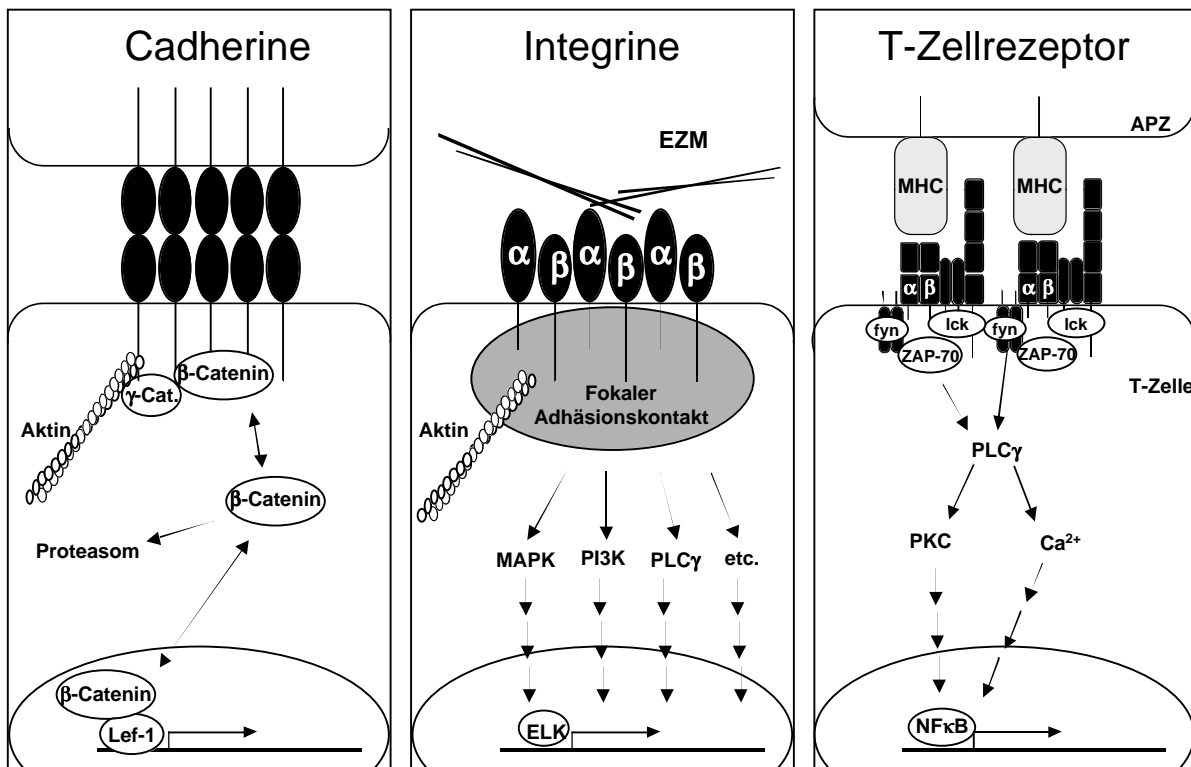


Abbildung 39: Regulation von Zelladhäsionsmolekülen durch Clustern.

In einer früheren Studie konnten wir zeigen, dass auch bei der Stimulation des CEACAM1 die Verwendung von Antikörpern ihr physiologisches Korrelat hat: In transfizierten CHO-Zellen wurde durch CEACAM1-vermittelte Zelladhäsion, ebenso wie durch Quervernetzen von CEACAM1 mit Antikörpern die CEACAM1-Phosphorylierung reduziert (Lucka et al., 1999). Allerdings wurde im Unterschied zur hier betrachteten Tyrosinphosphorylierung in den CHO-Zellen die gesamte Phosphorylierung des CEACAM1, gemessen durch radioaktive Markierung der Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat, untersucht. Eine Tyrosinphosphorylierung des CEACAM1 war, allerdings auch in Abwesenheit des wichtigen Tyrosinphosphatase-

Inhibitors Pervanadat, nicht nachweisbar. Diese Studie unterstreicht aber die Bedeutung der homophilen Adhäsion für die CEACAM1-induzierte Signaltransduktion.

In vivo wird CEACAM1 in den meisten polarisierten Epithelien und Endothelien auf der apikalen, also dem Lumen zugeordneten Domäne exprimiert, also auf einen Bereich, in dem es nicht zum Kontakt mit anderen Zellen kommt. Die apikale Lokalisation von CEACAM1 wird auch als Marker für die Zellpolarisation, z.B. von Hepatozyten, verwendet (Danielpour, 1999; Tuma et al., 1999). Wie lässt sich diese Lokalisation mit der beschriebenen Funktion von CEACAM1 als homophiles Zelladhäsionsmolekül in Einklang bringen?

Eine mögliche Erklärung kann aus der Korrelation zwischen Zellpolarisation einerseits und CEACAM1-Verteilung und -Expression andererseits abgeleitet werden: Im Zuge der Tumorentstehung von Zellen kommt es häufig sehr früh zu einem Verlust der CEACAM1-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der CEACAM1-Expression mit dem Verlust der Zellpolarität zeitlich korreliert (Busch et al., 1999). Es wäre demnach denkbar, dass das vom apikal konzentrierten CEACAM1 ausgehende Signal für die Aufrechterhaltung der Differenzierung sorgt und eine Wiederaufnahme der Zellproliferation verhindert. An Zellkontakten kann das CEACAM1 dagegen homophile Interaktionen eingehen. Der Übergang der CEACAM1-Verteilung vom lateralen zum apikal begrenzten Zustand könnte demnach ein verändertes Signal bewirken (Abb. 40). Aus der Untersuchung der CEACAM1-Verteilung in polarisierten MDCK-Zellen wurde abgeleitet, dass CEACAM1 in zwei unterschiedlichen Arten von Komplexen vorliegen kann: einerseits in Form eines trans-Dimers mit einem CEACAM1 einer Nachbarzelle, oder andererseits in einem cis-dimeren oder oligomeren Komplex mit weiteren CEACAM1-Molekülen auf der Membran einer Zelle. Hier wird CEACAM1 sowohl apikal, als auch lateral an den Zellkontakten gefunden, in beiden Verteilungszuständen waren aber jeweils unterschiedliche Epitope des CEACAM1 maskiert (Sundberg & Obrink, 2002). Für die Existenz zweier unterschiedlicher Organisationsformen des CEACAM1 spricht auch die in dieser Arbeit gefundene Abhängigkeit der Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett von der

zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1 an Zellkontakten in Barbe-Endothelzellen, nicht aber nach Stimulation durch Clustern.

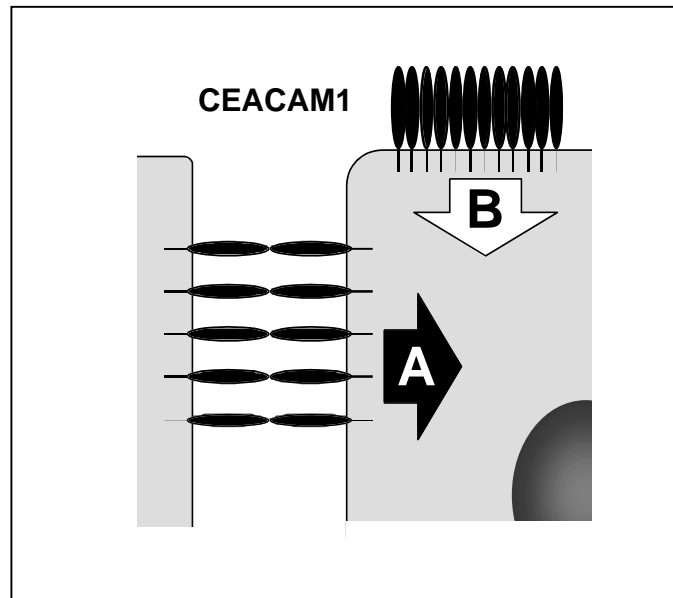


Abbildung 40: Bewirkt die homophile trans- oder cis- Interaktion von CEACAM1 ein verändertes Signal?

CEACAM1 ist in polarisierten Zellen, z.B. Epithelzellen, sowohl auf der apikalen Domäne, als auch lateral, an den Kontaktstellen zwischen den Zellen exprimiert. Nach Sundberg et al. kann CEACAM1 in zwei unterschiedlichen Komplexen vorliegen, entweder als trans-Homodimer mit einem CEACAM1 auf benachbarter Zelle, oder als cis-Dimer oder -Oligomer mit CEACAM1 auf der gleichen Zelle. Die Bedeutung der makromolekularen Organisation für die Signaltransduktion des CEACAM1 legt die Möglichkeit nahe, dass aus den beiden Zuständen unterschiedliche Signale resultieren.

3.3. Die Interaktion von CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett

In dieser Arbeit wurde die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett charakterisiert. Diese Interaktion war auf verschiedenen Wegen induzierbar, sowohl durch Quervernetzen mit Antikörpern auf der Zelloberfläche, als auch durch die Konzentration von CEACAM1 an Zellkontakten in Barbe-Endothelzellen. Die durch Clustern induzierte Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett war in transfizierten CHO-Zellen unabhängig von seiner zytoplasmatischen Domäne, denn auch CEACAM1-S und die Deletionsmutante CEACAM1- Δ C ohne zytoplasmatischen Teil waren nach Stimulation partiell unlöslich. Ebenso zeigte sich

auch kein Einfluß der intrazellulären Tyrosinreste des CEACAM1 auf dessen zytoskelettale Interaktion. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine indirekte Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett über einen lateralen, ebenfalls membranständigen Assoziationspartner deuten. Dieser muss CEACAM1 in der Transmembran- oder extrazellulären Domäne binden und den intrazellulären Kontakt mit dem Aktin-Zytoskelett herstellen. Kandidaten für ein solches Molekül sind nicht bekannt. Das einzige Transmembranprotein, dessen laterale Interaktion mit CEACAM1 gezeigt wurde, ist das β 3-Integrin. In diesem Fall erfolgt die Bindung aber an die zytoplasmatische Domäne des CEACAM1 (Brummer et al., 2001), nicht an den extrazellulären Teil. Im humanen System ist in Analogie zum T-Zellrezeptor, der aus mehreren Untereinheiten der IgSF besteht, verschiedentlich die Existenz eines Multiple-Ig-Recognition-Receptor (MIRR) vorgeschlagen worden, der aus mehreren Mitgliedern der CEA-Familie bestehen soll (Grunert et al., 1998). So könnte z.B. auch ein Kontakt der hier existierenden GPI-verankerter Moleküle wie CEACAM6 und CEACAM8 in das Zellinnere hergestellt werden. Die CHO-Zellen exprimieren zwar kein mit Antikörpern und Nukleinsäuresonden gegen CEACAM1 der Ratte kreuzreagierendes Molekül, wie mit verschiedenen proteinchemischen und molekularbiologischen Methoden sichergestellt wurde. Ob aber endogene Mitglieder der CEA-Familie im chinesischen Hamster, dem Stammorganismus der CHO-Zellen, existieren, ist nicht bekannt. Falls dies der Fall wäre, könnten diese eventuell die Verknüpfung des transfizierten CEACAM1 der Ratte mit dem Zytoskelett im Zellinneren vermitteln. Denn die Fähigkeit des CEACAM1, auch ohne spezielle Stimulation laterale Dimere zu bilden, ist bekannt (Hunter et al., 1996). Nicht geklärt ist aber, in welchem Bereich des CEACAM1-Moleküls die Dimerisierung stattfindet. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass CEACAM1 in seinem Transmembranbereich das Motiv GxxxG, das für die Oligomerisierung von Transmembranhelices verantwortlich ist (Russ & Engelman, 2000), gleich in mehrfacher Ausführung trägt. Das CEACAM1 der Ratte und der Maus weisen vier Glycinreste auf, die jeweils durch drei Aminosäuren getrennt sind, das humane CEACAM1 immerhin noch drei Glycinreste (Abb. 41). In der höchstwahrscheinlich α -helikalen Konformation der

Transmembrandomäne liegen die Glycinreste nahezu übereinander, was eine sehr enge Packung der Reste ermöglicht. Zusätzliche Signifikanz wird diesem Motiv durch die Anwesenheit von β -verzweigten Aminosäuren (I, L, V) an den benachbarten Positionen verliehen. Es ist vorgeschlagen worden, dass diese relativ großen Reste sich gut in die von den Glycinen gebildeten Taschen einpassen können (Senes et al., 2000). Auffällig ist auch die nahezu perfekte Homologie zwischen den drei Spezies in der ersten Hälfte der Sequenz, in der das GxxxG-Motiv liegt. Im hinteren Teil des Transmembranbereiches finden sich dagegen Insertionen einzelner Aminosäuren, die zu einer Unterbrechung der Homologie führen. Da die evolutionäre Konservierung eines Bereiches in einem Protein als Hinweis auf seine funktionelle Bedeutung angesehen werden kann, steht diese Beobachtung in Einklang mit der Vermutung, dass der Transmembranbereich des CEACAM1 für die laterale homophile oder heterophile Interaktion von Bedeutung sein könnte.

```

hum  CC1-TM: ...GAIAGIVIGVVALVALIAVALACF...
mus  CC1-TM: ...GAIAGIVIGVVAGVALIAGLAYFL...
rat  CC1-TM: ...GAIAGIVIGSVAGALIAALAYFLY...
GxxxG-Motiv:   GxxxGxxxGxxxG

```

Abbildung 41: Der Transmembranbereich von CEACAM1 beinhaltet mehrfach das Oligomerisierungsmotiv GxxxG

Die Transmembranbereiche (TM) von CEACAM1 (CC1) aus Mensch (hum), Maus, (mus), und Ratte (rat) sind zusammen mit dem GxxxG- Motiv gezeigt.

Unabhängig von dieser Hypothese bleibt aber festzuhalten, dass die Vermittlung der Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett erst nach Induktion der makromolekularen CEACAM1-Aggregate zustande kommt. Dies spricht dafür, dass erst durch eine Vielzahl von schwachen Bindungen ein stabiler Komplex mit dem Zytoskelett entsteht.

Im Gegensatz zur von der Isoform unabhängigen Interaktion mit dem Zytoskelett nach Quervernetzen konnte die Kolo-kalisation mit Aktin an Zellkontakten in Barbe-Endothelzellen nur für CEACAM1-L gezeigt werden. Die saubere Darstellung der Lokalisation des

filamentösen F-Aktins in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie machte die Behandlung der Zellen mit Detergens nötig. Hierdurch wurden aber CEACAM1-S und CEACAM1- Δ C nahezu vollständig aus den Präparaten ausgewaschen, während CEACAM1-L an den Zellkontakten erhalten blieb. Dieser Befund legt nahe, dass nur CEACAM1-L an die Zellgrenzen dirigiert wird, und dort eine feste Bindung mit Aktin eingeht. Es ist zu vermuten, dass die homophile Interaktion mit CEACAM1 auf der Nachbarzelle für die Verankerung des Komplexes an den Kontaktstellen verantwortlich ist. Dies wurde auch durch Studien von Sadekova et al. (2000) bestätigt, die zeigen konnten, dass nach Mikroinjektion von CEACAM1-cDNA ähnliche Komplexe von CEACAM1-L im Verbund mit Aktin an Zellgrenzen nur dann entstanden, wenn zwei benachbarte Zellen injiziert wurden, wenn also transzelluläre, homophile CEACAM1-CEACAM1-Interaktion stattfinden konnte.

Die Frage, ob CEACAM1 direkt an Aktin binden kann, ist widersprüchlich beantwortet worden, scheint sich aber zu bestätigen: als erste zeigten Da Silva et al. (1999) in unserer Arbeitsgruppe die direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1-L mit F-Aktin in einem *in vitro*-Kosedimentationsassay mit gereinigtem Aktin aus der Dünndarmmukosa der Ratte. Dieses Ergebnis konnte von Sadekova et al. (2000) und Schumann et al. (2001) nicht bestätigt werden, was aber vermutlich an der Verwendung kommerzieller Aktinpräparationen aus Kaninchenmuskel in beiden Studien lag. Letztere Arbeit zeigte dagegen eine Bindung von CEACAM1-S an F-Aktin und, mittels Biacore® (Surface-Plasmon-Resonance) -Studien eine ebenfalls direkte Bindung von monomerem G-Aktin an sowohl CEACAM1-L als auch CEACAM1-S.

Die direkte Bindung eines Transmembranproteins an Aktin ist bisher nur in wenigen Fällen beobachtet worden, nämlich für den EGF-Rezeptor, für Ponticulin und das α_2 -Integrin (den Hartigh et al., 1992; Hitt et al., 1994; Leung-Hagesteijn et al., 1994). Sehr häufig wird die Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle mit dem Zytoskelett dagegen durch klassische Aktin-bindende Proteine, wie α -Aktinin, Tropomyosin, Filamin oder die Mitglieder der ERM-Familie, Ezrin, Radixin und Moesin, bewerkstelligt. Über letztere binden z.B. die Mitglieder

der IgSF ICAM-1 bis ICAM-3 an das Aktin-Zytoskelett (Serrador et al., 1997; Yonemura et al., 1998; Serrador et al., 2002).

3.4. Einfluss der neuronalen Differenzierung auf die CEACAM1-Stimulation

Die Stimulation von CEACAM1 wurde durch die NGF-induzierte, neuronale Differenzierung der PC12-Zellen moduliert. Die Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett war in differenzierten Zellen nach Stimulation mehr als doppelt so stark zu beobachten wie in nicht differenzierten Zellen. Die durch Quervernetzen induzierte Tyrosin-Dephosphorylierung von CEACAM1 wurde dagegen durch die Differenzierung aufgehoben. Diese Befunde zeigen einen Zusammenhang von CEACAM1 mit der zellulären Differenzierung der PC12-Zellen.

Die verstärkte Bindung an das Zytoskelett steht im Einklang mit der beschriebenen Funktion der Mikrofilamente während der neuronalen Differenzierung der PC12-Zellen: Die Expression von β - und γ -Aktin wird durch die Behandlung mit NGF transient erhöht (Henke et al., 1991). Außerdem bewirkt die Gabe von NGF eine schnelle Reorganisation des F-Aktins (Paves et al., 1988). Die Bildung der Wachstumskegel erfolgt an Aggregationspunkten von F-Aktin, und auch für deren Vortrieb sind die Mikrofilamente mit verantwortlich (Sano & Iwanaga, 1992). Die veränderte Morphologie des Aktin-Zytoskeletts in differenzierten PC12-Zellen könnte also die verstärkte Rekrutierung von CEACAM1 erklären. Von Bedeutung erscheint in diesem Zusammenhang auch die verstärkte Expression und Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins Paxillin während der PC12-Zell-Differenzierung (Leventhal & Feldman, 1996). Denn die direkte Bindung von Paxillin an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L (Ebrahimnejad et al., 2000) stellt einen potenziellen Verknüpfungspunkt mit dem Aktin-Zytoskelett dar.

Die Tyrosinphosphatase SHP2 spielt eine wichtige Rolle während der neuronalen Differenzierung der PC12-Zellen. Dabei ist sowohl ihre Tyrosinphosphataseaktivität von Bedeutung (Wright et al., 1997), wie auch die Fähigkeit, als Adapterprotein zu fungieren:

SHP2 kann nach Stimulation und Autophosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie dem NGF-Rezeptor TrkA entweder direkt oder indirekt an deren zytoplasmatische Domänen binden (Ong et al., 2000). Dann bindet an den ebenfalls phosphorylierten C-Terminus das Adapterprotein Grb2, was über die Rekrutierung des Guanylnukleotidaustauschfaktors Sos zur Aktivierung der MAPK-Kaskade führen kann. Ähnliche Interaktionen sind für SHP2 auch nach Stimulation des Insulin- oder des PDGF-Rezeptors gezeigt worden (Li et al., 1994; Noguchi et al., 1994). Die Rekrutierung von SHP2 an Wachstumsfaktorrezeptoren könnte bedeuten, dass die Phosphatase nach Stimulation mit NGF nicht mehr für die Interaktion mit CEACAM1 zur Verfügung steht, was das Fehlen der CEACAM1-Dephosphorylierung nach Clustern in differenzierten PC12-Zellen erklären könnte. NGF bewirkt ebenfalls eine kurzfristige Steigerung der katalytischen Aktivität der SHP2 im Minutenbereich. Es wäre demnach aufschlussreich zu untersuchen, ob die Stimulation mit NGF einen Einfluß auf die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung hat.

3.5. Ausblick

Die Bedeutung der CEACAM1-SHP2-Interaktion für die Funktion des CEACAM1 soll auf verschiedenen Wegen näher untersucht werden. Durch molekularbiologische Fusion der katalytischen Domäne des SHP2 mit dem zytoplasmatischen Teil des CEACAM1 kann eine konstitutive Interaktion der beiden Moleküle simuliert werden. Alternativ kann durch Überexpression von katalytisch inaktiver SHP2 (durch Austausch des katalytisch aktiven Cysteins gegen Serin) oder ihrer isolierten SH2-Domänen die funktionelle Interaktion gestört werden. Die Auswirkung dieser Konstrukte auf die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung, die CEACAM1-induzierte Signaltransduktion und die zelluläre Proliferation bzw. Differenzierung in Abhängigkeit von CEACAM1 soll dann in verschiedenen Transfektionssystemen untersucht werden.

Die relevanten Bereiche des CEACAM1 für die durch Quervernetzen induzierte Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett sollen durch CEACAM1-Deletionsmutanten weiter eingegrenzt

werden. Da der zytoplasmatische Teil bereits als hier nicht notwendig charakterisiert ist, bieten sich die extrazellulären Ig-Domänen und besonders der Transmembranbereich an. Der Austausch der Oligomerisierungsmotive (GxxxG) soll darüber hinaus in Bezug auf die Fähigkeit des CEACAM1 zur Dimerisierung untersucht werden.

Zwei Aspekte dieser Arbeit, Signaltransduktion und sekretierte Isoformen des CEACAM1, sollen auf eine mögliche Verbindung untersucht werden. Es sollen verschiedene rekombinante Varianten von sekretiertem CEACAM1 zur Stimulation von zellulärem CEACAM1 eingesetzt werden. Diese Konstrukte können außerdem zur Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Identifizierung von extrazellulären Liganden des CEACAM1 dienen.