

Aus dem
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Charité-Universitätmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Leiter: Prof. Dr. Werner Reutter
AG: PD Dr. Lothar Lucka

**Biochemische und funktionelle Untersuchungen zur
Signaltransduktion des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM1
exprimiert auf endothelialen Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Mario Müller
aus Berlin

Berlin, Dezember 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter

2. Gutachter: Prof. Dr. V. Haucke

Tag der Disputation: 27. März 2006

Meinen Eltern gewidmet

*"Jeder Versuch, eine Idee praktisch
bis in ihre letzte Konsequenz durchzuführen,
ist ein Beweis, dass man sie selber
nicht ganz verstanden hat."*

ARTHUR SCHNITZLER

*"Nichts schmerzt so sehr wie fehlgeschlagene Erwartungen,
aber gewiss wird auch durch nichts
ein zum Nachdenken fähiger Geist
so lebhaft wie durch sie erweckt."*

BENJAMIN FRANKLIN

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG.....	1
Blutgefäßsystem, Vaskulogenese und Angiogenese	1
Endothelzellen und Angiogenese.....	2
Lösliche Faktoren kontrollieren die Angiogenese.....	5
Adhäsive Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen und deren Funktionen.....	6
<u>Die Zell-Matrix-Adhäsion.....</u>	<u>7</u>
Basalmembran und extrazelluläre Matrix.....	7
Integrine	8
<u>Zell-Zell-Adhäsion.....</u>	<u>11</u>
Endotheliale Zell-Junctions.....	11
Adhäsionsmoleküle außerhalb der Junctions	14
Andere Zell-Zell-Erkennungssysteme	14
CEA-Familie	16
CEACAM1	20
Signaltransduktion von CEACAM1	22
CEACAM1 auf dem Gefäßendothel.....	25
ZIELSETZUNG.....	27
ERGEBNISSE.....	28
CEACAM1 wird <i>in vivo</i> auf angiogenetisch-aktivem Gefäßendothel der Ratte exprimiert.....	28
Generierung einer endothelialen Zelllinie: <i>Rat-Brain-Endothelial (RBE)-Cells</i>	30
Expression von CEACAM1 im adulten Gehirn der Ratte und in Zelltypen des Gehirns	30
RBE-Zellen exprimieren endogen kein CEACAM1.....	33
Transfektion der RBE-Zellen und Transfektionsanalyse.....	34
Transmembranäres CEACAM1 beeinflusst in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix die Morphologie und Migration von RBE-Zellen	35
CEACAM1-Expression fördert die <i>in vitro</i> -Angiogenese auf Matrigel	35

Erhöhte Migration nach Monolayer-Verletzung	37
Die CEACAM1-Expression beeinflusst nicht die Zell-Matrix-Adhäsion	39
Veränderte Zellmorphologie während der Zell-Matrix-Adhäsion	41
Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts während der Adhäsion	42
Verteilung von CEACAM1 während der Zell-Matrix-Adhäsion.....	44
Einfluss des Clusters von CEACAM1-Molekülen auf der Plasmamembran	45
Die spontane, ungerichtete Zellwanderung auf Laminin-1	47
Unveränderte Zell-Proliferation / spontane Apoptoseraten auf Matrixproteinen	49
Die Zellmorphologie während der Adhäsion auf Laminin-1 ist abhängig vom Aktivierungs- zustand kleiner GTPasen der Rho-familie	50
Aktivität und Modulation der kleinen GTPase Rho während des Anheftens auf Laminin-1	50
Die Morphologie während des Anheftens auf Laminin-1 ist Rac1-abhängig	53
Beeinflussung Integrin-vermittelter Signaltransduktion auf Laminin-1	55
Verringerte Ausbildung von Paxillin-positiven fokalen Adhäsionskomplexen	55
Tyrosinphosphorylierung der <i>Fokalen-Adhäsionskinase</i> (FAK) während des Anheftens.....	58
MAPK-Aktivität während der Adhäsion auf Laminin-1	59
Expression von fokalen Adhäsionskomplex-assoziierten Proteinen.....	60
Zytoskelettale Assoziation von CEACAM1-long und Interaktion mit Talin.....	61
CEACAM1-long assoziiert während des Spreitens mit dem Zytoskelett.....	61
CEACAM1-long assoziiert mit Talin während der Adhäsion auf Fibronectin	62
Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne haben keine Funktion bei der Assoziation mit dem Zyto- skelett und der Interaktion mit Talin	63
Lokalisation an Zell-Zell-Kontaktbereichen und Kolo-kalisation mit F-Aktin.....	66
CEACAM1-long lokalisiert in konfluenten Zellen an Zellkontakten	66
Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten während der Netzwerk-Formation	67
Kolo-kalisation mit F-Aktin an Zell-Zell-Kontakten und Detergenz-Unlöslichkeit.....	68
Aktinzytoskelett-unabhängige CHAPS-Unlöslichkeit.....	71
Erhöhte CHAPS-Solubilisierbarkeit durch Temperaturerhöhung.....	73
Clustering von CEACAM1-Molekülen verstärkt die CHAPS-Unlöslichkeit.....	74
CEACAM1 assoziiert mit Membranmikrodomänen	74
CEACAM1-Fraktionierung nach isopyknischer Gradientenzentrifugation.....	74
Oberflächen-Lokalisation von Membranmikrodomänen-assoziiertem CEACAM1	78

CEACAM1 geringer Dichte assoziiert mit pelletierbarem, partikulärem Material	79
Beeinflussung der CHAPS-Unlöslichkeit durch Cholesterin-Depletion.....	80
Cholesterin-Depletion reduziert das Aufschwimmen im Dichtegradienten.....	82
Kolokalisation mit GM1 in intrazellulären Vesikeln	84
Darstellbarkeit der Membranmikrodomänen-Assoziation mit anderen Detergenzien	85
Unlöslichkeit nach Solubilisation mit verschiedenen Detergenzien	85
Verhalten im Dichtegradienten nach Solubilisation mit unterschiedlichen Detergenzien	87
Differierende Komplexgrößen in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz	88
Große Komplexe nach CHAPS-Solubilisation und Gelfiltration im Dichtegradienten	90
Identifizierung CEACAM1-bindender Proteine nach unterschiedlicher Detergenz-Solubilisation	91
Cholesterin-Depletion-induzierte Proteolyse von CEACAM1.....	92
Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 in endogenen Systemen.....	94
<i>In vivo</i> -Mikrodomänen-Assoziation in Rattenleber und Morris-Hepatom-7777.....	95
Verteilung humaner CEA-Familienmitglieder im Dichtegradienten	96
Interaktion von CEACAM1-long und SHP-2 an Zell-Zell-Kontakten	98
Transiente Tyrosinphosphorylierung während der Zellkontakt-Formation	98
Beteiligung von Tyrosinkinase der src-Familie bei der Zellkontakt-vermittelten Phosphorylierung.....	101
Zellkontakt-vermittelte Phosphorylierung an den Tyrosinresten Y488 und Y513.....	102
Tyrosinphosphorylierung von Membranmikrodomänen-assoziiertem CEACAM1	103
Cholesterin-Depletion reduziert die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung	105
Koimmunpräzipitation von SHP-2 und Kolokalisation in konfluenten Zellen.....	106
Cholesterin-Abhängigkeit der CEACAM1-long / SHP-2-Interaktion	109
CEACAM1-abhängige Inhibition der Zellproliferation nach TGF-β-Stimulation.....	111
Einfluss von CEACAM1 auf die Proliferation unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen.....	111
Konzentrations-Abhängigkeit der CEACAM1-abhängigen TGF- β -vermittelten Proliferationshemmung...	112
Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long nach TGF- β -Stimulation.....	113
Proliferationshemmung nach Deletion der zytoplasmatischen Domäne und TGF- β -Stimulation.....	115
Zytosol-Kern-Translokation von SMAD-Proteinen nach TGF- β -Stimulation.....	117
Regulation der p27 ^{Kip} -Protein-Expression nach TGF- β -Stimulation	119
Morphologische Veränderungen von RBE-Zellen induziert durch TGF- β	119
DISKUSSION.....	121

CEACAM1 auf Gefäßendothel der Ratte.....	121
CEACAM1 auf Mikrogliazellen.....	122
CEACAM1-abhängige Beeinflussung der Matrixprotein-bedingten Zellmorphologie, Migration und Regulation Integrin-vermittelter Signalwege	123
Assoziation von CEACAM1 mit Membranmikrodomänen	129
Zellkontakt-Lokalisation und Interaktion mit SHP-2	134
Beeinflussung von TGF-β-Signalwegen	138
ZUSAMMENFASSUNG.....	142
SUMMARY.....	145
MATERIAL UND METHODEN.....	148
Materialien.....	148
Eukaryontenzelllinien	153
Methoden	155
Zellbiologische Methoden	155
Proteinchemische Methoden.....	165
Molekularbiologische Methoden.....	175
LITERATURVERZEICHNIS.....	180
ANHANG	199
Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion	199
Peer-reviewed Originalpublikationen.....	199
Vorträge auf internationalen Kongressen.....	200
Buchkapitel, Posterbeiträge, Abstracts.....	200
Lebenslauf.....	202
Abkürzungsverzeichnis	203
Danksagung	205
Förderung	207