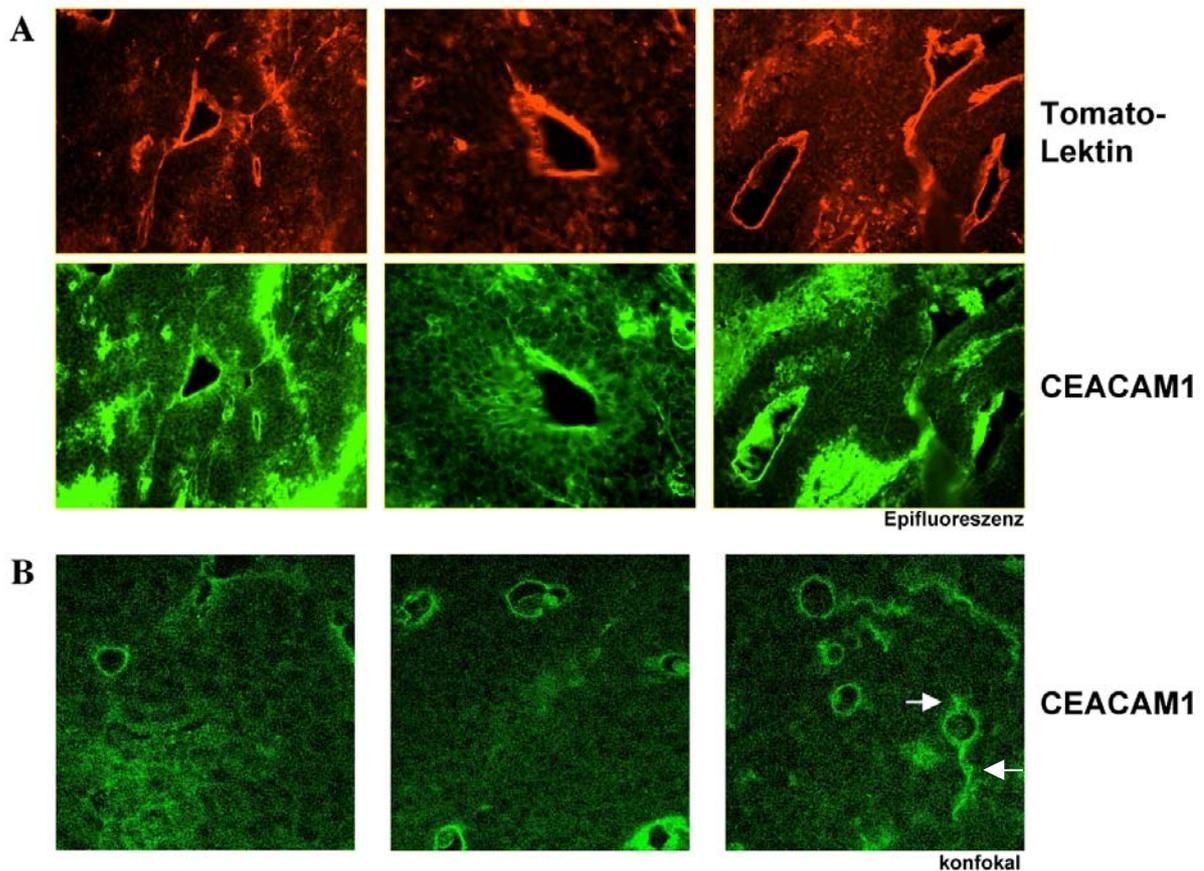


## Ergebnisse

### **CEACAM1 wird *in vivo* auf angiogenetisch-aktivem Gefäßendothel der Ratte exprimiert**

Eine Reihe von Zelloberflächenrezeptoren auf Endothelzellen wird nur unter angiogenetischen Bedingungen exprimiert, während sich die Expression anderer Zelloberflächenproteine nicht, oder kaum, ändert. In früheren Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen wurde CEACAM1 als Oberflächenmarker von Blutgefäßen verschiedener Organe und Gewebe in adulten, und sich entwickelnden, Ratten beschrieben. Eine Expression von CEACAM1 in angiogenetisch aktiven Geweben der Ratte wurde bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht untersucht oder beschrieben. Um eine mögliche CEACAM1-Expression unter angiogenen Bedingungen zu detektieren, wurden Tumor-tragende Ratten, denen das transplantierte Morris-Hepatom-7777 im Oberschenkel heranwächst, untersucht. Kirschgroße Tumore wurden nach Perfusion entnommen und in kleinere Gewebestücke zerteilt. Stark nekrotisches Gewebe wurde entfernt und die resultierenden Präparate für die Immunfluoreszenz vorbereitet. An Hand von 20 µm dicken Cryo-Schnitten des Hepatomgewebes konnte die CEACAM1-Expression analysiert werden. Blutgefäße wurden durch die spezifische Reaktion des *Lycopersicon Esculentum* (Tomato-) Lektins mit glykosylierten Oberflächenstrukturen auf Endothelzellen sichtbar gemacht (Abb. 8A, obere Reihe). Indirekte Immunfluoreszenz zeigt eine starke CEACAM1-Expression auf Gefäßendothel des Hepatomgewebes. Große Gefäße mit mehr als 40 µm Durchmesser, aber auch kleinere Gefäße und Kapillaren mit Durchmessern kleiner als 10 µm, konnten deutlich mit dem anti-CEACAM1 spezifischen monoklonalen Antikörper Be9.2 angefärbt werden (Abb. 8A, untere Reihe). Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte die CEACAM1-Expression vereinzelt auch auf Aussprossungen von Endothelzellen aus bestehenden Endothelzellverbänden (Abb. 8B, weißer Pfeil) detektiert werden. Solche Aussprossungen von existierenden Gefäßen werden nur in angiogenetisch aktiven Geweben gefunden. Ob es sich hierbei um einen einzigen langen Zellfortsatz (Protrusion oder Lamaellipodium) oder um einen Zell-Zell-Kontakt zwischen Endothelzellen handelt, konnte jedoch an Hand der vorliegenden Gewebeschnitte nicht geklärt werden. Die Expression von CEACAM1 ist im untersuchten Morris-Hepatom-7777 jedoch nicht allein auf das Gefäßendothel beschränkt, sondern konnte auch auf Zellen des Hepatoms selbst detektiert werden. CEACAM1



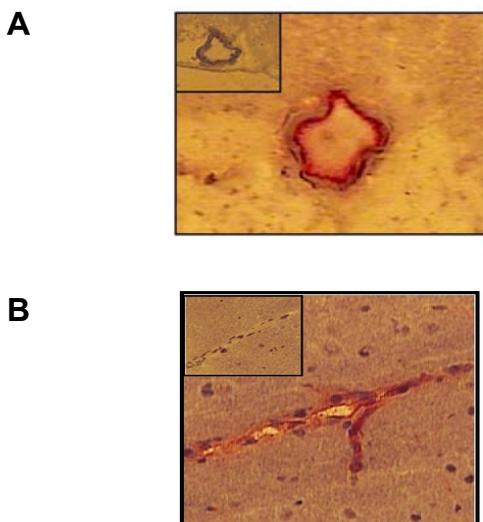
**Abb. 8: CEACAM1-Expression auf angiogenetisch aktiven Blutgefäßen *in vivo*-Darstellung im Morris-Hepatom-7777.** Darstellung der CEACAM1-Expression in 20 µm dicken Gefrierschnitten von frisch isoliertem Morris-Hepatom-7777 in der indirekten Immunfluoreszenz. **(A)** Doppelfärbung von nicht permeabilisierten Gewebeschnitten: rot - AlexaFluor594-gekoppeltes Lycopersicon Esculentum (Tomato-) Lectin; grün - CEACAM1-Färbung (mAb Be9.2 und Cy2-gekoppelte anti-Maus sekundär-Antikörper). Originalvergrößerung x 400, x 600 (mittlere Aufnahmen). **(B)** Darstellung der CEACAM1-Expression wie in (A) in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Pinhole 20, Originalvergrößerung x 600). Der Pfeil deutet auf eine CEACAM1-positive Aussprossung aus einer vorhandenen Kapillare.

im Morris-Hepatom-7777 ist membranständig, zeigt jedoch keine polare Verteilung, wie sie in normalen Hepatozyten (apikal, gallekanalikulär gelegen) zu finden ist. Frühere Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen beschrieben das vorliegende Morris-Hepatom-7777, wie auch andere untersuchte Hepatome der Ratte, ursprünglich als CEACAM1-negativ. Aus diesen Befunden wurde damals abgeleitet, dass CEACAM1 ein Transformations-sensitiver Oberflächenmarker der Leber ist, dessen Expression früh während der Tumorentstehung verloren geht. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass es durchaus zu einer Reexpression von CEACAM1 im Tumorgewebe kommen kann. Deren Mechanismus und Auswirkungen sind jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. Im Folgenden soll vielmehr das CEACAM1, exprimiert auf Endothelzellen, biochemisch charakterisiert und hinsichtlich angiogenetischer Prozesse *in vitro* funktionell untersucht werden.

## **Generierung einer endothelialen Zelllinie: Rat-Brain-Endothelial (RBE)-Cells**

### **Expression von CEACAM1 im adulten Gehirn der Ratte und in Zelltypen des Gehirns**

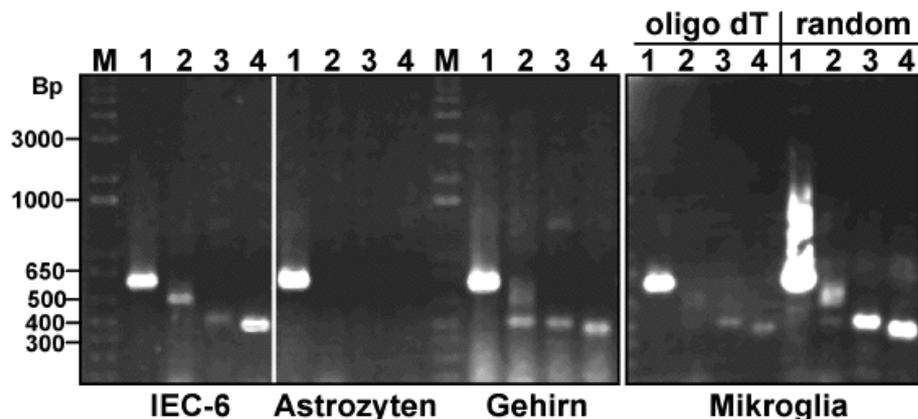
Um die CEACAM1-Expression auf Gefäßendothel funktionell zu charakterisieren, wurde zunächst ein geeignetes Spenderorgan zur Generierung von primären Endothelzellen aus der Ratte gesucht. Sawa et al. untersuchten 1994 die CEACAM1-Expression in Geweben der Ratte und, im Speziellen, des sich entwickelnden Rattengehirns (Sawa et al., 1994). Diese Arbeiten zeigten, dass die CEACAM1-Expression im Gehirn auf das Gefäßendothel beschränkt ist; Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zeigten dagegen keine Immunreaktion mit CEACAM1-spezifischen Antikörpern. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt und auf adulte Tiere ausgeweitet werden. Immunhistochemische Untersuchungen von Gehirnschnitten adulter männlicher Wistar-Ratten mit dem mAb Be9.2 zeigten eine CEACAM1-Expression auf Gefäßendothelien der Hirnhaut als auch auf Kapillaren anderer Gehirnbereiche (Abb. 9).



**Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung der CEACAM1-Expression im Gefäßendothel des Rattengehirns.** 5 µm dicke Gefrierschnitte von frisch präparierten Rattengehirnen wurden auf Glasobjektträgern fixiert und BSA-blockiert. Endogene Alkalische-Phosphatase wurde mit Levamisole inhibiert. Zur Darstellung der CEACAM1-Expression wurden die Schnitte mit dem mAb Be9.2 und anschließend mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten sekundär-Antikörpern inkubiert. Das rote Präzipitat zeigt die indirekte Färbung von CEACAM1-Molekülen auf Gefäßendothel der Hirnhaut. (A) Gefäße der Hirnhaut, (B) Gefäße in inneren Gehirnstrukturen. Eingefügte Abbildung oben links: negativ Kontrolle (keine Färbung) mit anti-Rabbit Isotyp-IgGs und sekundären AP-konjugiertem Antikörpern. Originalvergrößerung x10.

In Zusammenarbeit mit der AG Kettenmann, MDC-Berlin, konnten ferner weitere Zelltypen des adulten Rattengehirns an Hand primärer Zellkulturen von Oligodendrozyten, Astrozyten sowie von Mikroglia durch RT-PCR auf CEACAM1-mRNA Produktion untersucht werden. Während im adulten Hirngewebe sowohl die lange (CEACAM1-long) als auch die kurze

(CEACAM1-short) Isoform detektiert werden konnten, waren Oligodendrozyten (nicht dargestellt) und Astrozyten für beide Isoformen negativ. Dagegen waren nicht aktivierte Mikroglia positiv für beide Isoformen (Abb. 10). Des Weiteren konnte mit dem Primerpaar R/L eine zusätzliche Bande bei 500 Bp in mRNA-Präparationen aus dem adulten Gehirn und in Mikroglia nachgewiesen werden. Bei dieser CEACAM1-Isoform handelt es sich wahrscheinlich um eine lösliche Variante des CEACAM1, die bereits in den Ratten-Zelllinien MTC (Rattenbrust Adenokarzinom) und PC12-Zellen (Pheochromozytom) gefunden und beschrieben wurde (Budt et al., 2002b). Auf eine genauere strukturelle Untersuchung dieser Isoform wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit jedoch verzichtet.

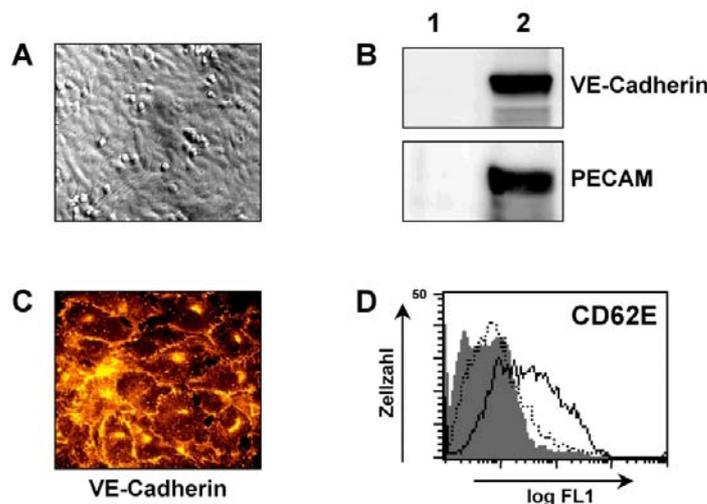


**Abb. 10: Nachweis von CEACAM1-Isoformen im Rattengehirn und Mikroglia durch RT-PCR.** Aus frisch isolierten Rattengehirn bzw. Astrozyten und Mikroglia in 7 Tage alter Primärkultur und epithelialen Zellen (IEC-6, positiv Kontrolle) wurde RNA präpariert und mit oligo-dT- (Mikroglia auch random-) Erststrangprimer in cDNA umgeschrieben. Nachweis von CEACAM1-Isoformen nach Amplifikation durch PCR, Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung: M-Marker, 1-GAPDH, 2-CEACAM1-spezifische Primerkombination R/L, 3-CEACAM1-long spezifische Primerkombination L/9, 4-CEACAM1-short spezifische Primerkombination R/22.

### Generierung und Charakterisierung von primären Ratten-Endothelzellen

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Björn Öbrink (*Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*) wurden nach einer Methode von J. Folkman (Folkman et al., 1979) primäre Endothelzellen aus leptomeningealen Blutgefäßen des adulten Rattengehirns erzeugt, die im Folgenden in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert wurden. Die generierten Zellen, *rat-brain-endothelial cells*, RBE-Zellen, zeigten ein homogenes Erscheinungsbild und eine pflastersteinartige Morphologie, typisch für primäre Endothelzellen in Kultur (Abb. 11A). Die Zell-Population wuchs im Monolayer und zeigte eine Kontakt-vermittelte Inhibition der Proliferation nach Erreichen der Konfluenz.

Endothelzellen exprimieren Zelltyp-spezifische Proteine, sog. Markerproteine. Dazu gehören das Vaskuläre-Endotheliale Cadherin (VE-Cadherin, CD144), das Plättchen-Endothel-spezifische Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (PECAM, CD31) sowie das für Entzündungsreaktionen wichtige E-Selektin (CD62E, ELAM). Die Expression dieser Markermoleküle in den erzeugten RBE-Zellen wurde im Western-Blot oder in der Durchflusszytometrie (FACS) überprüft. RBE-Zellen, nicht aber epitheliale IEC-6-Zellen aus dem Ratten-Dünndarm, exprimieren VE-Cadherin und PECAM-1, wie im Western-Blot gezeigt (Abb. 11B).

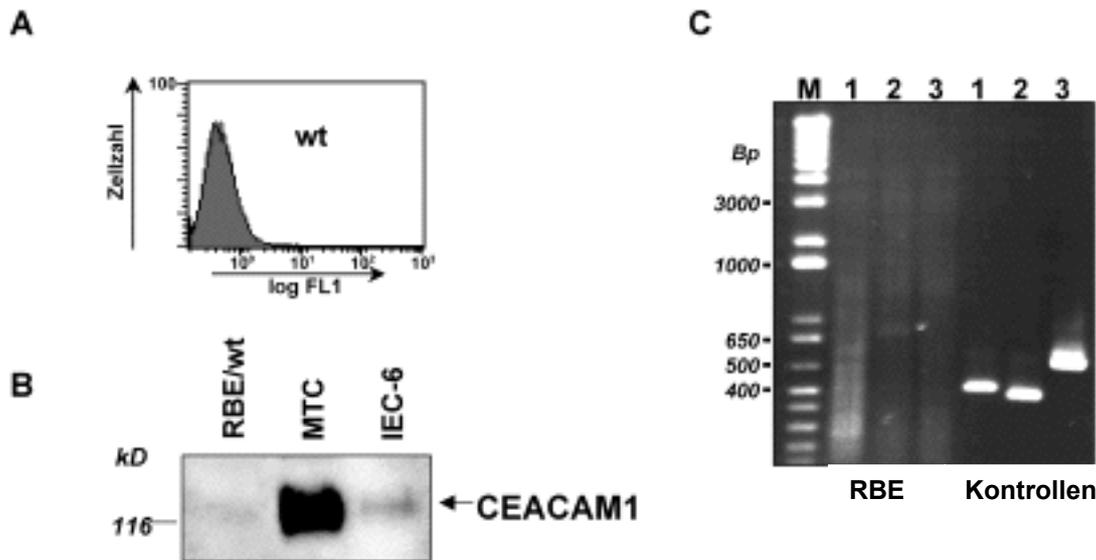


**Abb. 11: Charakterisierung von RBE-Zellen nach Isolation und Passagieren in Zellkultur. (A)** Phasenkontrastaufnahme von RBE-Zellen nach Erreichen der Konfluenz. **(B)** Expression von Endothel-spezifischen Markerproteinen im Western-Blot. Nachweis von VE-Cadherin und PECAM-1 in Zelllysaten. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein von (1) IEC-6-Zellen (negativ Kontrolle) und (2) RBE-Zellen geladen. **(C)** Darstellung der Lokalisation von VE-Cadherin an Zell-Zell-Kontakten in konfluenten RBE-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz. **(D)** Induktion und Nachweis der Expression von E-Selektin auf RBE-Zellen nach Inkubation mit 10 µg/ml TNF-α (20 h). Unbehandelte (gepunktete Linie) und TNF-α-behandelte RBE-Zellen (durchgezogene Linie) wurden mit anti-E-Selektin- oder mit IgG-Isotyp-Antikörpern (grau schattierter Bereich) inkubiert und nach Färbung mit FITC-konjugierten sekundär-Antikörpern in der Durchflusszytometrie analysiert.

Indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchungen an konfluenten RBE-Zellen zeigten ferner eine für VE-Cadherin typische Lokalisation an Zell-Zell-Kontaktregionen (Abb. 11C). Die Expression von CD62E konnte dagegen nur nach Aktivierung der RBE-Zellen mit dem Entzündungsmediator Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α, 10 ng/ml, 20 h) auf der Oberfläche nachgewiesen werden (Abb. 11D). Diese Regulation durch TNF-α ist charakteristisch für Endothelzellen in der Zellkultur und ein wichtiges Indiz für die endotheliale Identität der RBE-Zellen. Diese Befunde zeigen weiterhin, dass die generierten Zellen biologisch funktionell und Endothel-spezifisch auf externe Stimuli reagieren können.

### RBE-Zellen exprimieren endogen kein CEACAM1

Des Weiteren wurde die Expression von CEACAM1 in RBE-Zellen überprüft. Obwohl das Gefäßendothel des Rattenhirns eine starke CEACAM1-Expression *in vivo* in immunhistochemischen Untersuchungen zeigte, konnte die CEACAM1-Expression in den generierten RBE-Zellen weder durch RT-PCR auf mRNA, noch durch Western-Blot und FACS-Analyse auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 12A-C).



**Abb. 12: RBE-Zellen exprimieren kein CEACAM1.** (A) RBE-Zellen in Kultur zeigen keine CEACAM1-Expression auf der Oberfläche. Nach dem Ablösen wurden RBE-Zellen mit CEACAM1-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Be9.2) (durchgezogene Linie) oder Isotyp-Kontrollantikörpern (grau schattierter Bereich) inkubiert, mit FITC-markierten sekundär-Antikörpern gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. (B) In Zellkulturüberständen von RBE-Zellen sind keine abgeschilfert oder sekretierten löslichen CEACAM1-Isoformen detektierbar. 5 ml Zellkulturüberstände von RBE-Zellen, MTC-Zellen oder IEC-6-Zellen wurden mit polyklonalem anti-CEACAM1-Serum/Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert und anschließend im Western-Blot mit dem mAb Be9.2 auf CEACAM1-Anwesenheit im Präzipitat hin untersucht. (C) RBE-Zellen enthalten keine CEACAM1-spezifischen Transkripte. In RBE-Zellen (RBE-Zellen) konnten keine mRNAs für CEACAM1-Isoformen durch RT-PCR nachgewiesen werden, während Vektor-CEACAM1-cDNA (Kontrollen, positiv Kontrollen) für die Primerkombinationen R/L, R/9 (CEACAM1-long) und R/22 (CEACAM1-short) eine Reaktion zeigte.

Ein identisches Ergebnis, der nicht mehr vorhandenen CEACAM1-Expression nach Generieren von primären Endothelzellen der Ratte nach der Methode von J. Folkman, wurde ebenfalls nach erneutem Erzeugen von Ratten-Endothelzellen des Gehirns und nach Gewinnung von Endothelzellen aus anderen Geweben der Ratte, wie Pankreas und Fettgewebe, erhalten (nicht gezeigt). Der Verlust der CEACAM1-Expression in der Zellkultur scheint daher ein

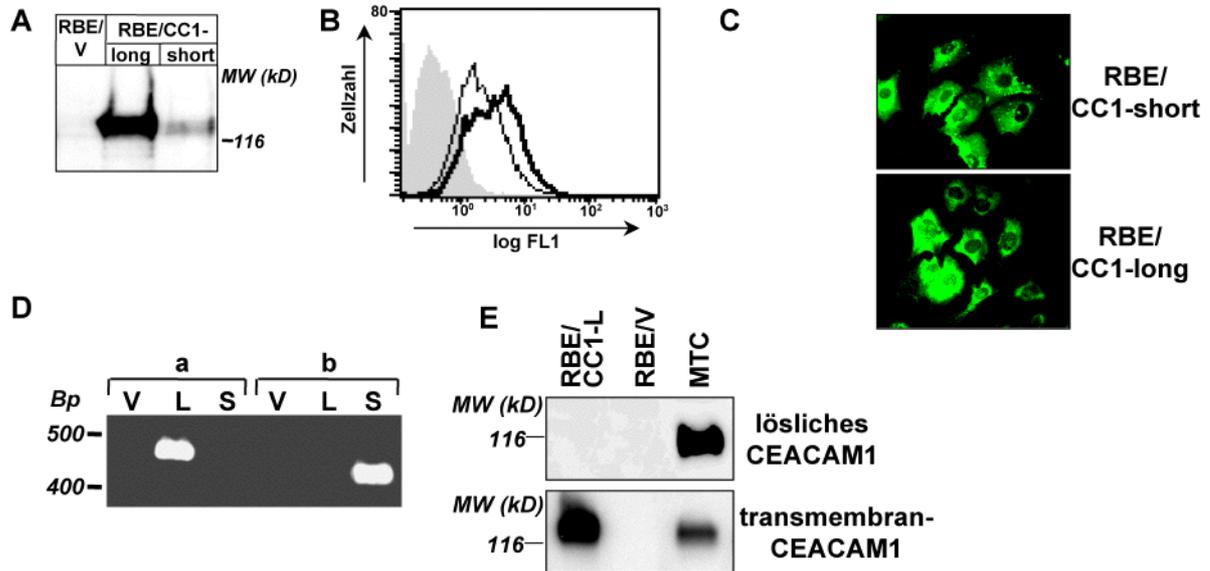
verbreitetes Phänomen primärer Endothelzellen der Ratte zu sein, da es nicht allein in den oben charakterisierten RBE-Zellen beobachtet wurde.

### **Transfektion der RBE-Zellen und Transfektionsanalyse**

Um die Funktion der CEACAM1-Expression auf Endothelzellen zu studieren, wurden die erzeugten CEACAM1-negativen RBE-Zellen mit cDNA sowohl für die lange CEACAM1-Isoform, als auch für die kurze Isoform transfiziert. CEACAM1-exprimierende Zellen wurden nach Selektion durch limitierte Verdünnung kloniert. Für spätere Kontrollexperimente wurden RBE-Zellen zusätzlich mit leerem Expressionsvektor (pRC/CMV) transfiziert und selektiert. Die so entstandenen Zelllinien wurden RBE/Vektor, RBE/CEACAM1-long (Transfektanten mit der cDNA für die lange CEACAM1-Isoform) bzw. RBE/CEACAM1-short (Transfektanten mit der cDNA für die kurze CEACAM1-Isoform) benannt.

Die Expression von CEACAM1 in RBE-Zellen wurde nach Klonieren genauer untersucht. Beide Isoformen werden in den Zellen exprimiert und konnten im Western-Blot detektiert werden (Abb. 13A). In der SDS-Gelelektrophorese und im Immunblot erscheinen sie bei einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 120 k (lange Isoform) und ca. 110 k (kurze Isoform). Dieses Molekulargewicht von CEACAM1, exprimiert auf Endothelzellen, ähnelt dem für andere Gewebe- und Zelltypen der Ratte beschriebenen zwischen 105 und 130 kD. Das Molekulargewicht von CEACAM1 kann, je nach Zelltyp, auf Grund der starken, oft heterogenen Glykosylierung stark schwanken (der Proteinanteil beträgt theoretisch nur 48 kD). FACS-Analysen der selektierten Klone zeigten, dass beide Isoformen auf die Oberfläche von RBE-Zellen gelangen (Abb. 13B). Die Oberflächenexpression konnte ebenfalls durch indirekte Immunfluoreszenz von nicht permeabilisierten Transfektanten bestätigt werden. Dabei zeigten beide Isoformen eine eher zufällige Verteilung von CEACAM1-Molekülen auf der Oberfläche (Abb. 13C), wenn die Zellen vereinzelt wuchsen. RT-PCR-Analysen zeigten ferner eine Isoformen-spezifische Expression von CEACAM1-long und CEACAM1-short in den jeweiligen Transfektanten (Abb. 13D). Da lösliche Isoformen des CEACAM1 von Ergün et al. als pro-angiogenetisch beschrieben wurden (Ergün et al., 2000), wurden Zellkulturüberstände von 4 Tage alten Kulturen abgenommen und auf lösliche Isoformen hin untersucht. Nach Immunpräzipitation mit polyklonalem anti-CEACAM1-Serum konnte im Zellkulturüberstand von RBE/CEACAM1-Zellen jedoch weder proteolytisch abgespaltenes, noch sekretiertes CEACAM1 durch Immunblot detektiert werden (gezeigt für CEACAM1-long, Abb.

13E). Epitheliale Mammakarzinom (MTC)-Zellen, die lösliches CEACAM1-4C1 sekretieren, zeigten dagegen ein deutlich positives Signal.



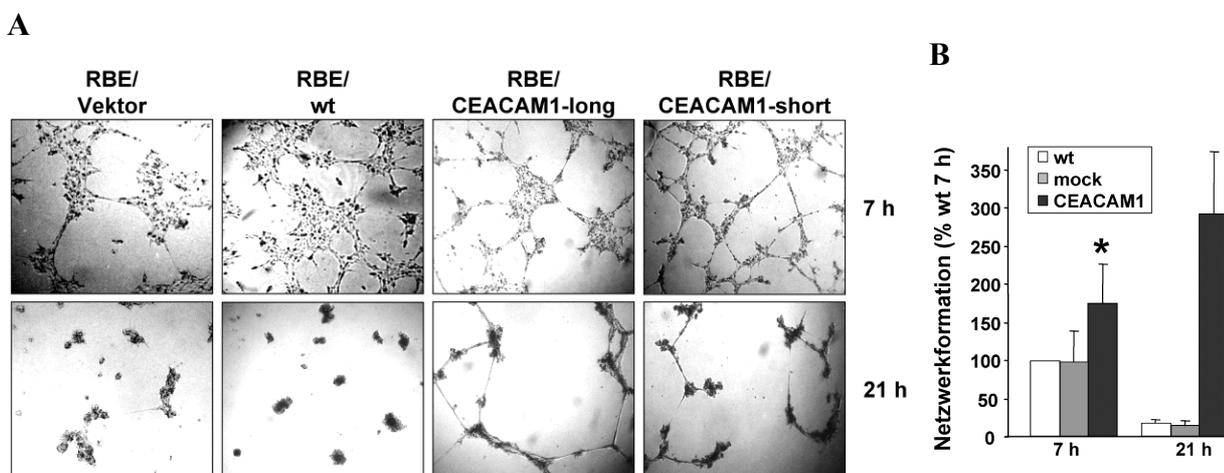
**Abb. 13: CEACAM1-Expression in RBE-Zellen nach Transfektion und Klonierung.** Darstellung der CEACAM1-long- und CEACAM1-short (Oberflächen)-Expression mit dem monoklonalen Antikörper Be9.2 (**A**) im Western-Blot in Zelllysaten von RBE/Vektor (RBE/V)- oder RBE/CEACAM1 (RBE/CC1) -long- bzw. -short-Transfektanten, (**B**) in der Durchflusszytometrie (grau schattierter Bereich RBE/Vektor, dicke Linie RBE/CEACAM1-long, dünne Linie CEACAM1-short) -gefärbt mit FITC-gekoppelten anti-Maus sekundär-Antikörpern, (**C**) oder in der indirekten Immunfluoreszenz von RBE/CEACAM1-short (CC1-short) oder RBE/CEACAM1-long (CC1-long) nach Färbung mit Cy2-gekoppelten anti-Maus sekundär-Antikörpern. (**D**) Nachweis der Isoform-spezifischen Expression nach Transfektion mit CEACAM1-long (L)- bzw. CEACAM1-short (S)- Expressionsvektoren oder RBE/Leervektor-transfizierten Zellen (V) in der RT-PCR mit CEACAM1-long (L/9) und CEACAM1-short (L/22) detektierenden Primerkombinationen. (**E**) Western-Blot zum Nachweis membranständiger CEACAM1-Isoformen in Zelllysaten (unten) oder von löslichen Isoformen nach Immunpräzipitation aus Zellkulturüberständen (oben) von RBE/CEACAM1-long (RBE/CC1-L)- und RBE/Vektor (RBE/V)-Transfektanten bzw. MTC-Zellen.

### Transmembranäres CEACAM1 beeinflusst in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix die Morphologie und Migration von RBE-Zellen

#### **CEACAM1-Expression fördert die *in vitro*-Angiogenese auf Matrigel**

Matrigel ist ein Gel-artiges Gemisch aus extrazellulären Matrixproteinen wie Lamininen, Kollagenen, Nidogen und Proteoglykanen und einer Anzahl von anhaftenden Wachstumsfaktoren. Matrigel polymerisiert bei 37°C und stellt in diesem Zustand eine Art künstliche

Basalmembran dar. Endothelzellen und Epithelzellen verschiedener Gewebe vermögen sich selbst zu netzartigen Strukturen zu organisieren, wenn sie auf diese Matrix aufgebracht werden. Für Endothelzellen ist diese Selbstorganisation eine wichtige Voraussetzung für angiogenetische Prozesse, wenn die Zellen sich vom bestehenden Gefäßendothel ablösen, die darunterliegende Basalmembran penetrieren und sich zu neuen Gefäßen anordnen. Die ausgebildeten netzartigen Strukturen können sich in der Zellkultur vereinzelt durch Lumenformung zwischen zwei Zellen, oder innerhalb einer Zelle, zu sog. 'tubes' oder 'tube-like structures' (Röhren) weiterentwickeln.



**Abb. 14: Die Ausbildung von netzartigen Strukturen auf Matrigel wird von CEACAM1 positiv beeinflusst.** (A) Einzelsuspensionen von  $3 \times 10^4$  RBE/wt-Zellen, RBE/Vektor-, RBE-CEACAM1-long- oder -short-Transfektanten wurden auf mit Matrigel beschichteten 96well-Platten ausplattiert und kultiviert. Zu gegebenen Zeitpunkten (7 und 21 h) nach dem Ausplattieren wurde das Fortschreiten der Netzwerkbildung durch Fotografieren im Phasenkontrast dokumentiert (Originalvergrößerung  $\times 10$ ). (B) Quantifizierung der Netzwerkbildung von RBE/wt-Zellen, RBE/Vektor- und RBE/CEACAM1-long-Transfektanten. Hierzu wurden die Längen der kettenartigen Zellverbände zwischen Zellclustern zu den Zeitpunkten 7 und 22 h vermessen und zu den Ergebnissen von RBE/wt-Zellen in Relation gesetzt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen in doppelter Ausführung,  $*= p < 0,01$ .)

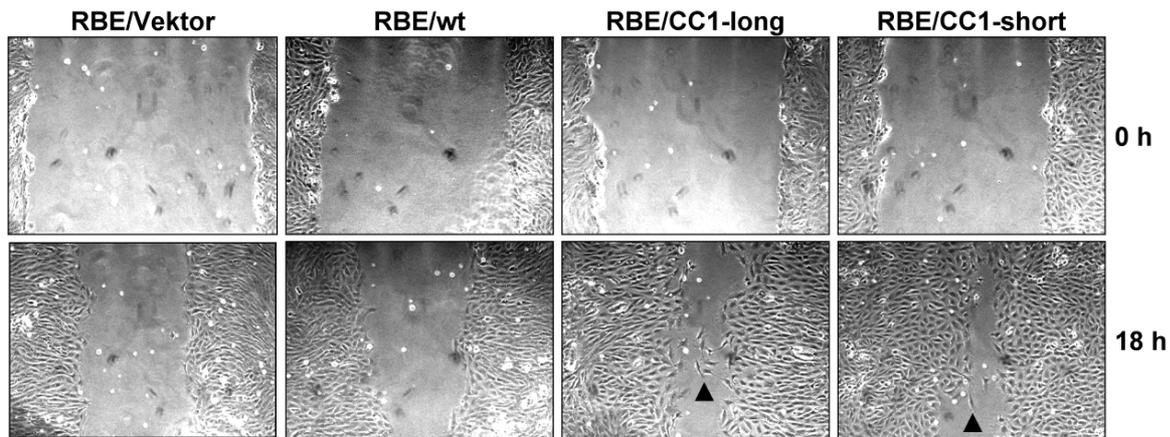
Lumenformation wurde jedoch weder bei RBE-Zellen noch bei einer als Kontrollzelllinie fungierenden Ratten-Dünndarmepithel-Zelllinie (IEC-6) im Phasenkontrast beobachtet und im Folgenden nicht weiter untersucht. RBE-Zellen, auf polymerisiertem Matrigel ausplattiert, adhärten auf der Matrix und spreiteten. Nach ca. 3 h begannen sie, sich zu formieren. Die Zellen zeigten dabei eine langgestreckte Morphologie und einige Zellen begannen sich mit Nachbarzellen zu kleinen, miteinander verbundenen Zellsträngen zu organisieren. Zu diesem

Zeitpunkt konnte kein Einfluss der CEACAM1-Expression beobachtet werden. 7 h nach dem Ausplattieren zeigten sowohl wt-RBE-Zellen als auch Vektor- und CEACAM1-Transfektanten eine netzartige Struktur, mit zahlreichen Zellansammlungen, die untereinander mit Zellsträngen verbunden sind. CEACAM1-exprimierende Zellen zeigten dabei eine mehr gestreckte, langgezogenere Morphologie und erreichten zu diesem Zeitpunkt ein fortgeschrit- tenees Netzwerk als wt-RBE-Zellen und Vektor-Transfektanten (Abb. 14A), das charakte- risiert war durch größere zusammenhängende Matrigelbereiche ohne Zellen und längeren Zellsträngen zwischen Ansammlungen. Nach 21 h Inkubation zeigten nur noch RBE/CEA- CAM1-Transfektanten ein Netzwerk, während die Strukturen von wt- und Vektor-transfizier- ten Zellen zu dieser Zeit bereits zusammengebrochen war und in großen Zellaggregaten auf der Matrigeloberfläche resultierte (Abb. 14A). Die netzartigen Strukturen der CEACAM1-ex- primierenden Zellen waren dagegen bis zu 36 h stabil, zeigten danach jedoch, ähnlich den wt- und Vektor-Zellen, einen Zusammenbruch der Netzstruktur. Das Vermögen der Zellen, sich selbst zu organisieren, nahm, unabhängig von der CEACAM1-Expression, mit fortschrei- tender Passagierung der Zellen ab und zeigte außerdem Schwankungen in Abhängigkeit von der verwendeten *Batch-Nr.* sowie vom Hersteller des Matrigels. IEC-6-Zellen zeigten eben- falls eine Abnahme der Selbstorganisation mit fortschreitenden Passagieren, die gebildeten Strukturen blieben aber länger als für RBE-Zellen beobachtet, über mehrere Tage hinaus sta- bil. Weder RBE/CEACAM1-Transfektanten noch die endogen CEACAM1-exprimierenden IEC-6-Zellen zeigten eine detektierbare Beeinflussung der Reorganisation auf Matrigel nach Zugabe des CEACAM1-spezifischen, die homophile Adhäsion blockierendem mAb Be9.2 (10 µg/ml, nicht gezeigt).

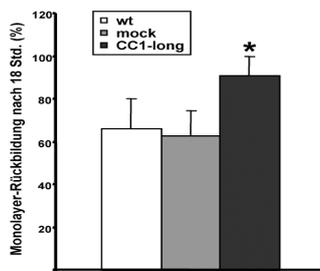
### **Erhöhte Migration nach Monolayer-Verletzung**

Um zu klären, ob die Zunahme der Selbstorganisation von CEACAM1-exprimierenden Zellen bei der Differenzierung auf Matrigel in Zusammenhang mit einer erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit (der sog. Zell-Migration) der CEACAM1-transfizierten RBE- Zellen steht, wurde die Beweglichkeit der Zellen in Monolayer-Rückbildungsversuchen nach Verletzung gemessen. Dazu wurden RBE-Zellen in identischer Anzahl ausplattiert und für drei Tage kultiviert.

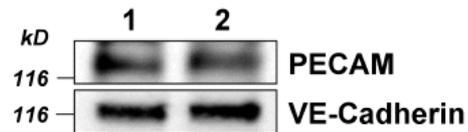
**A**



**B**



**C**



**Abb. 15: Die Zellmigration wird nach Verletzung von konfluenten Monolayern durch die CEACAM1-Expression erhöht.** (A) RBE/wt-Zellen, RBE/Vektor- oder CEACAM-1-long- und -short-Transfektanten wurden in gleicher Anzahl ausplattiert und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Monolayer wurden durch Abkratzen von Zellen mit einer Pippettenspitze verletzt (Zeitpunkt t=0) und weiterkultiviert. 18 h nach Verletzung wurde die Migration der Zellen in den zuvor zellfreien Bereich durch Fotografieren im Phasenkontrast dokumentiert (Originalvergrößerung x 25). Vom Zellverband abgelöste, als Einzelzellen migrierende Zellen sind durch Pfeilspitzen in CEACAM1-long und -short transfizierten Zellen (nach 18 h) markiert. (B) Quantifizierung der Zellmigration. Die Weite der zellfreien Areale wurde zum Zeitpunkt t=0 und t=18 h vermessen, und der relative "Wundverschluss", die Monolayer-Rückbildung, in Relation zu RBE/wt-Zellen bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 8 mit unterschiedlichen Weiten zum Zeitpunkt t = 0, \*= p < 0,01). (C) Nachweis der unveränderten Expression von VE-Cadherin und PECAM-1 nach CEACAM1-Transfektion am Beispiel von (1) RBE/wt- und (2) RBE/CEACAM1-long-Zellen im Immunblot. Gezeigt ist ein Western-Blot von Zellen gleicher Zelldichte.

Zu diesem Zeitpunkt bildeten alle untersuchten Zelllinien einen homogenen, dichten Zellrasen, den sog. Monolayer (Stadium der Konfluenz) mit vergleichbarer Zellzahl (Coulter-Counter, nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Monolayer durch Abschaben verletzt und abgelöste Zellen durch einmaliges Waschen entfernt. Die Geschwindigkeit des Zuwachsens dieser frisch erzeugten "Wunde" wurde durch fotografieren markierter Bereiche dokumentiert (Abb. 15A). 18 h nach Verletzung zeigten beide CEACAM1-Transfektanten

eine erhöhte Zellmigration gegenüber wt- und Vektor-transfizierten RBE-Zellen. Dies resultierte in einer fast vollständigen (91% CEACAM1-long und 86% CEACAM1-short) Bedeckung des zuvor zellfreien Bereichs, während wt- (67%) und Vektor-Kontrollzellen (63%) die entstandenen Wunden nur zu zwei Drittel verschließen konnten. Interessanter Weise zeigten wt- und Vektor-Zellen ein anderes Bewegungsmuster als CEACAM1-Transfektanten. Während wt- und Vektorzellen während des Einwanderns in den verwundeten Bereich mit ihren Nachbarzellen in engen Kontakt blieben, lösten sich CEACAM1-Transfektanten häufig von ihren Nachbarzellen, verließen den Zellverband und wanderten als Einzelzellen in den Wundbereich ein.

Die Expression von CEACAM1-Molekülen auf der Oberfläche von RBE-Zellen führt, unabhängig von der Länge der zytoplasmatischen Domäne, zu einer deutlich erhöhten Wandergeschwindigkeit von Endothelzellen in Monolayer-Rückbildungsversuchen.

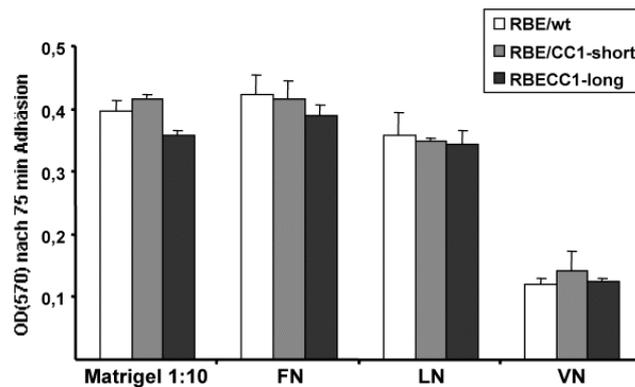
Die beobachtete Einzelzell-Migration von RBE/CEACAM1-Transfektanten kann zur Zeit nicht mechanistisch geklärt werden. Es wurden keine Veränderungen in der Expression von proadhäsiv wirkenden Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, wie PECAM-1 und VE-Cadherin, nach Transfektion der RBE-Zellen mit CEACAM1-cDNA detektiert (Abb. 15C), und CEACAM1, als homophiler Adhäsionsrezeptor, sollte eine eher gegenteilige Funktion, eine Erhöhung der zellulären Adhäsivität vermitteln.

### **Die CEACAM1-Expression beeinflusst nicht die Zell-Matrix-Adhäsion**

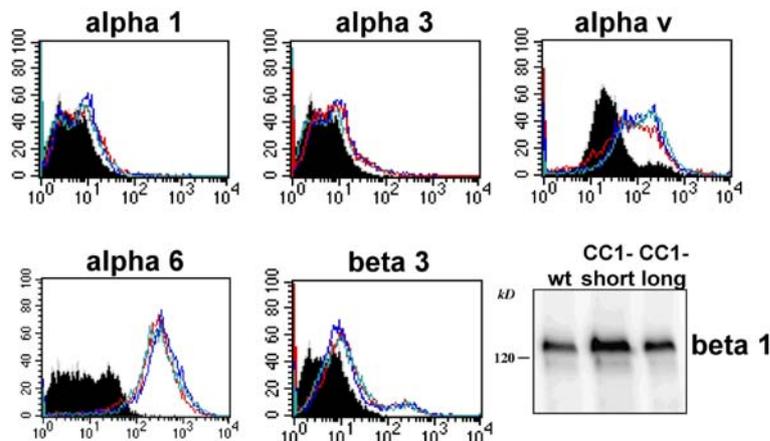
Die Adhäsion, Migration und Reorganisation auf Matrigel wird durch Zell-Matrix-Anheftungsproteine, den Integrinen, reguliert. Integrine sind heterodimere Rezeptoren aus einer alpha- und einer beta-Kette. Durch verschiedenartige Kombinationen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten entstehen Adhäsionsrezeptoren mit unterschiedlicher Bindungsspezifität und -affinität für Proteine der extrazellulären Matrix. Im Folgenden wurde untersucht, ob die CEACAM1-Expression auf RBE-Zellen die Anheftung von RBE-Zellen an Matrigel beeinflusst bzw., da Matrigel eine komplexe Mischung verschiedener extrazellulärer Matrixproteine ist, ob die CEACAM1-Expression die Zell-Matrix-Adhäsion auf gereinigten, käuflich erworbenen Matrixproteinen verändert. Zu diesem Zweck wurden RBE-Zellen in Serum-freiem Medium auf zuvor mit extrazellulären Matrixproteinen beschichteten Zellkulturgefäßen ausplattiert und bei 37°C für verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Alle untersuchten RBE-Zelllinien zeigten dabei ein gutes Anheftungsvermögen an Beschichtungen von verdünntem Matrigel, Laminin-

1 und Fibronektin. Eine etwas geringere Adhärenz wurde auf Vitronektin beobachtet und eine nur schwache Adhäsion wurde auf Kollagen I und Kollagen IV detektiert. Einen Einfluss der CEACAM1-Expression auf die Adhäsivität von RBE-Zellen konnte auf keiner Matrixprotein-Beschichtung detektiert werden. Auch die Zugabe des CEACAM1-spezifischen mAb Be9.2 zeigte keine Auswirkung auf die Zell-Matrix-Adhäsion von RBE/CEACAM1-Transfektanten (Abb. 16A).

**A**



**B**

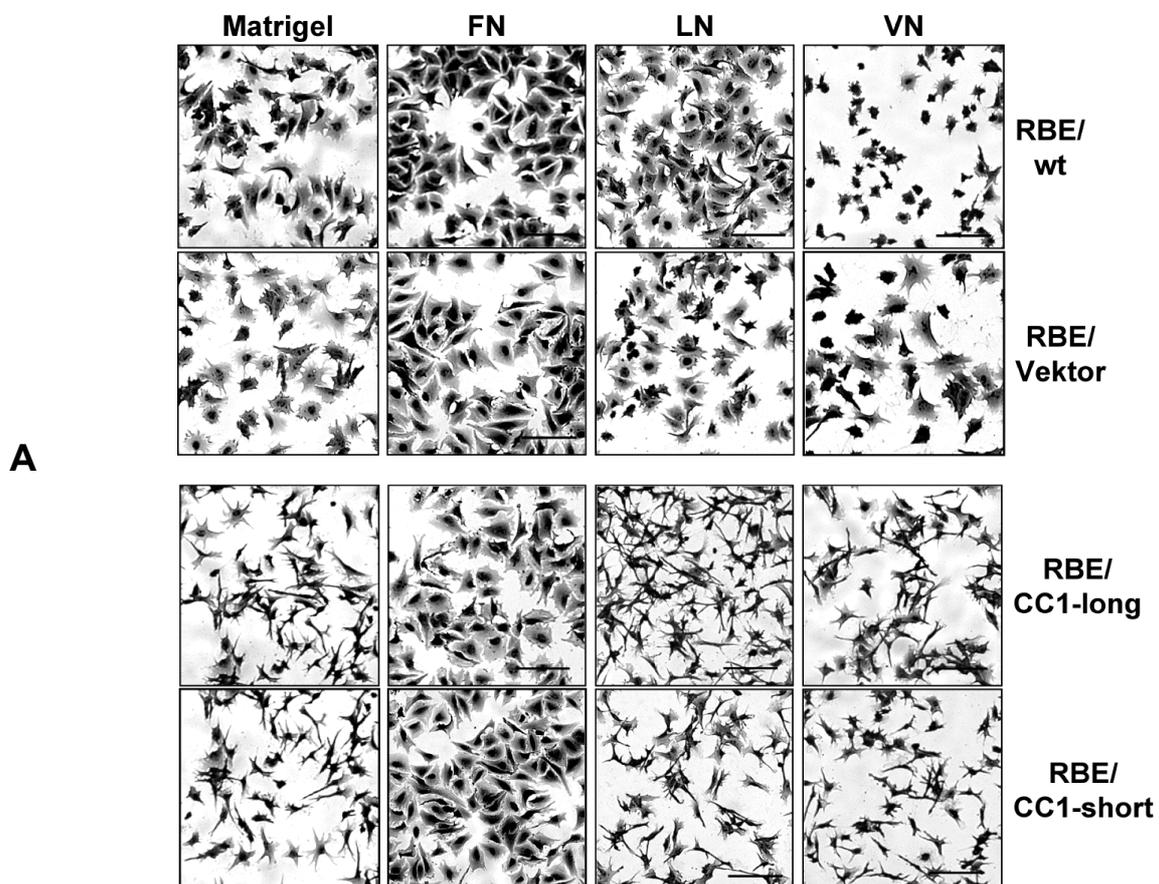


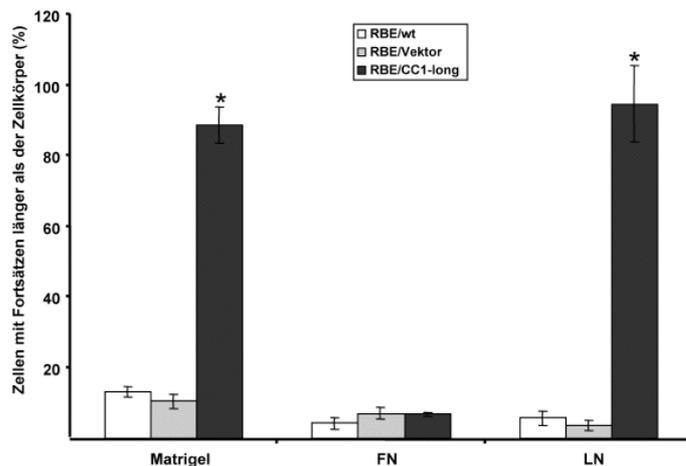
**Abb. 16: Die CEACAM1-Expression in RBE-Zellen beeinflusst nicht die Zell-Matrix-Adhäsion und nicht die Expression von Integrin-Untereinheiten. (A)** Quantifizierung der Zell-Matrix-Adhäsion von  $3 \times 10^4$  RBE/wt-Zellen (weiße Balken), RBE/CEACAM1-short- (RBE/CC1-short, hell graue Balken) und RBE/CEACAM1-long- (RBE/CC1-long, dunkel graue Balken)-Transfektanten nach 75 min Anheftung auf Matrigel-, Fibronektin (FN)-, Laminin-1 (LN)- und Vitronektin (VN)-Beschichtungen. Zellen wurden PFA-fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und bei 570 nm vermessen. **(B)** Die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 3$  wurde in der Durchflusszytometrie von RBE/wt (rote Linie), RBE/CEACAM1-short (blaue Linie) und RBE/CEACAM1-long (türkise Linie) quantitativ erfasst. Schattierte Bereiche zeigen die Färbung mit unspezifischen Isotyp-Kontrollantikörpern. Die Expression der  $\beta 1$ -Untereinheit wurde im Western-Blot von RBE/wt- (wt), RBE-CEACAM1-short (CC1-short)- und -long (CC1-long)-Zelllysaten nachgewiesen. Ein repräsentativer Immunblot ist gezeigt.

In Übereinstimmung mit den ermittelten Zell-Matrix-Adhäsionsdaten von RBE/wt-Zellen und CEACAM1-Transfektanten wurden auch keine Veränderungen im Integrin-Expressionsmuster von RBE-Zellen gefunden. Western-Blot-Analysen und Durchflusszytometrie ergaben für die untersuchten Integrinuntereinheiten  $\alpha 1$ -,  $\alpha 3$ -,  $\alpha 6$ -,  $\alpha V$ -,  $\beta 3$ - und  $\beta 1$ -Integrin gleiche Expressionsmengen auf wt- und CEACAM1-exprimierenden Zellen (Abb. 16B).

### Veränderte Zellmorphologie während der Zell-Matrix-Adhäsion

Während der Adhäsion auf Proteinen der extrazellulären Matrix müssen Zellen ihr Zytoskelett neu zu organisieren, um eine möglichst große Anheftungsfläche mit der Matrix zu bilden. Dabei wechselt das Erscheinungsbild der Zellen von einem runden, kugeligen zu einem flachen, gespreiteten Phänotyp. Obwohl die CEACAM1-Expression in RBE-Zellen keine Auswirkungen auf das Integrin-vermittelte Anheftungsvermögen hatte, zeigten sich, in Abhängigkeit von der verwendeten Matrix, auffällige Änderungen in der Zellmorphologie während des Spreitens.



**B**


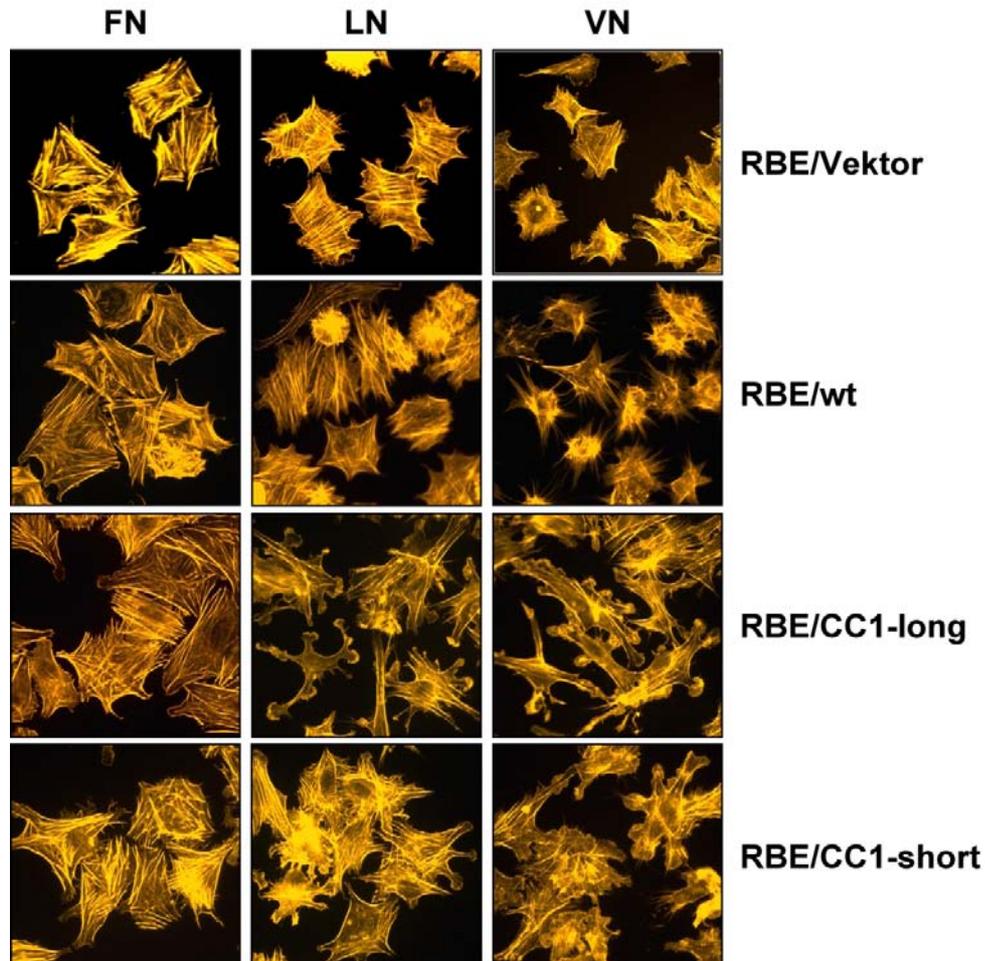
**Abb. 17: Zellmorphologie von RBE/wt-Zellen und RBE/CEACAM1-Transfektanten während des Anheftens an extrazelluläre Matrixproteine.** (A)  $3 \times 10^4$  Serum-starvierte RBE/wt-Zellen, RBE/Vektor-, RBE/CEACAM1-long (CC1-long)- oder -short (CC1-short)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium auf Matrigel-, Fibronectin (FN)-, Laminin-1 (LN)- oder Vitronectin (VN)-Beschichtungen plattiert und für 75 min kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch waschen entfernt und adhärenente Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. (Originalvergrößerung  $\times 100$ ). (B) Quantifizierung der unterschiedlichen Zellmorphologien von RBE/wt-Zellen (weiße Balken), RBE/Vektor-Transfektanten (hell graue Balken) und RBE/CEACAM1-long-Transfektanten auf Matrigel, Fibronectin (FN) und Laminin-1 (LN). Zur Unterscheidung wurden Zellen mit mind. einem Zellfortsatz länger als der Zellkörper mit der Gesamtheit der betrachteten Zellen in Relation gesetzt. Angabe in % (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $*$  =  $p < 0,001$ ).

RBE/wt- und RBE/Vektor-Zellen spreiteten auf Fibronectin, Matrigel, Laminin-1 und etwas langsamer auch auf Vitronectin. Dies resultierte 75 min nach dem Ausplattieren in einer abgeflachten, polygonalen Zellform. Eine den wt-Zellen entsprechende Zellmorphologie wurde beobachtet, wenn RBE/CEACAM1-long oder RBE/CEACAM1-short exprimierende Zellen auf Fibronectin spreiteten. Im Unterschied dazu zeigten die CEACAM1-Transfektanten auf Laminin-1 und Vitronectin eine längliche, oft auch sternförmige Morphologie, die durch lange Zellfortsätze an der Peripherie des Zellkörpers charakterisiert waren (Abb. 17A, Kristallviolett-Färbung). Die gleiche Morphologie wurde beobachtet, wenn CEACAM1-Transfektanten auf Matrigel-Beschichtungen adhärirten, was wahrscheinlich auf den hohen Anteil an Laminin-1 in Matrigelpräparationen zurückzuführen ist.

### Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts während der Adhäsion

F-Aktin-Färbungen mit Phalloidin-TRITC von PFA-fixierten, adhäririerenden RBE/wt- und RBE/Vektor-Zellen zeigten, dass es in beiden Zelllinien, 75 min nach dem Ausplattieren, zu

einer deutlichen Ausbildung von Aktin-Stressfasern kam (Abb. 18). Die Stressfaserbildung war auf allen getesteten Matrixproteinen von etwa gleicher Intensität, nur etwas abgeschwächt auf Vitronektin, zu finden. Eine ähnlich starke Ausprägung von Aktin-Stressfasern wurde auch bei CEACAM1-exprimierenden Zellen auf Fibronektin gefunden.



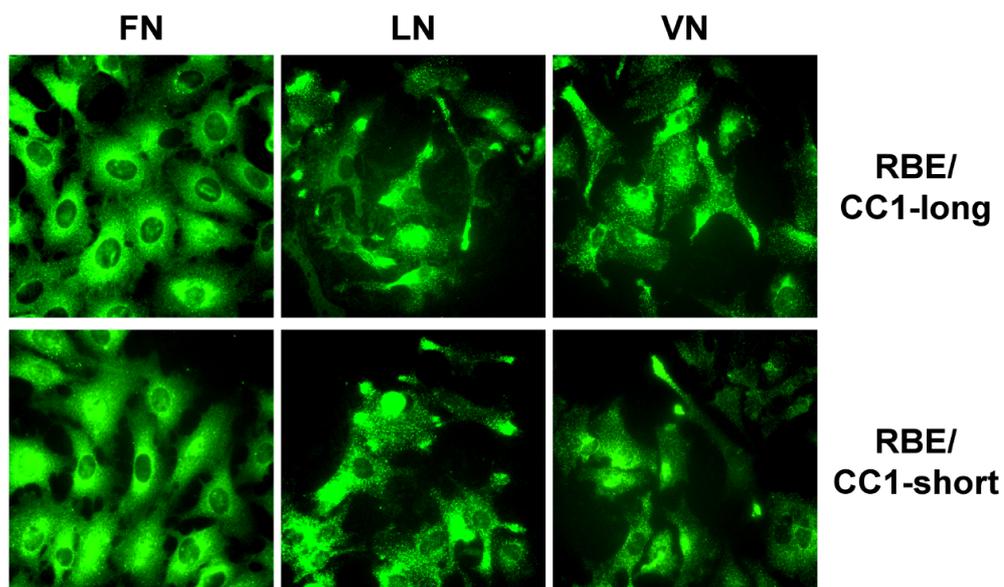
**Abb. 18: Organisation des Aktin-Zytoskeletts von RBE-Zellen während des Anheftens auf extrazellulären Matrixproteinen.**  $3 \times 10^4$  Serum-starvierte RBE/wt-Zellen, RBE/Vektor-, RBE/CEACAM1-long-(CC1-long) oder -short (CC1-short)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium auf Fibronektin (FN)-, Laminin-1 (LN)- oder Vitronektin (VN)-Beschichtungen plattiert und für 75 min kultiviert. Nach dem Fixieren mit PFA wurde das Aktin-Zytoskelett (F-Aktin) mit Hilfe von Phalloidin-TRITC visualisiert. (Originalvergrößerung x 400).

Dagegen zeigten die CEACAM1-transfizierten Zellen während der Adhäsion auf Laminin-1, Vitronektin und auch auf Matrigel (nicht gezeigt) eine geringere Tendenz zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern. Die wenigen, verbliebenen Stressfasern in CEACAM1-Transfektanten zeigten einen parallelen Verlauf zu den langen Zellfortsätzen, während nur wenige bis gar keine Stressfasern im Zellkörper angefärbt werden konnten. In adhärierenden CEACAM1-

positiven Zellen war außerdem die Färbung von kortikalem Aktin an der Spitze der langen Zellausläufer auffällig, was auf die Ausbildung von Lamaellipodia an den Fortsätzen hindeutet. Lamaellipodia wurden jedoch nicht nur an den Spitzen der Zellausläufer gefunden, sondern auch an anderen Stellen der Fortsätze, was den Zellen eine verzweigte, sternförmige Morphologie verlieh. Stimulation mit dem CEACAM1-spezifischen mAb Be9.2 hatte erneut keine Auswirkung auf die Zellmorphologie.

### Verteilung von CEACAM1 während der Zell-Matrix-Adhäsion

Die Verteilung von CEACAM1-Molekülen auf der Oberfläche von adhärierenden RBE-Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz von nicht permeabilisierten Zellen untersucht (Abb. 19).



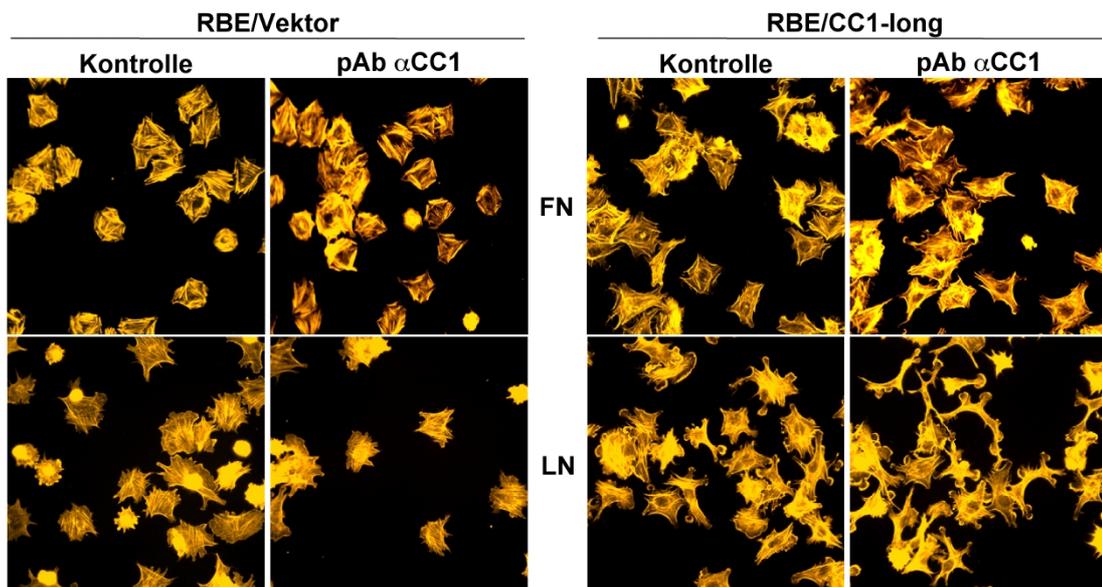
**Abb. 19: Verteilung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche von RBE-Zellen während des Anheftens auf extrazellulären Matrixproteinen.**  $3 \times 10^4$  Serum-starvierte RBE/CEACAM1-long (CC1-long)- oder RBE/CEACAM1-short (CC1-short)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium auf Fibronectin (FN)-, Laminin-1 (LN)- oder Vitronectin (VN)-Beschichtungen plattiert und für 75 min kultiviert. Nach dem Fixieren mit PFA wurden die nicht permeabilisierten Zellen zur Darstellung der CEACAM1-Lokalisation in der indirekten Immunfluoreszenz mit mAb Be9.2 und Cy2-gekoppelten anti-Maus sekundär-Antikörpern inkubiert. (Originalvergrößerung x 400).

Dabei zeigte sich, dass CEACAM1 während der Adhäsion auf Fibronectin eine eher zufällige, über die gesamte Zelloberfläche verteilte Lokalisation zeigte. Im Unterschied dazu war die Verteilung von CEACAM1-short- und CEACAM1-long-Molekülen während der Adhäsion

auf Laminin-1, Vitronektin und Matrigel (nicht gezeigt) ungleichmäßig. CEACAM1 zeigte eine spezielle, punktierte Anhäufung in den Zellausläufern, während nur wenige Moleküle auf dem Zellkörper angefärbt werden konnten. Zusätzlich waren die kortikalen Spitzen der Zellfortsätze, die Lamaellipodium-artigen Bereiche, mit starker Aktinfärbung von CEACAM1 ausgespart. Dahinter jedoch akkumulierte das CEACAM1 in den Zellfortsätzen.

### Einfluss des Clusters von CEACAM1-Molekülen auf der Plasmamembran

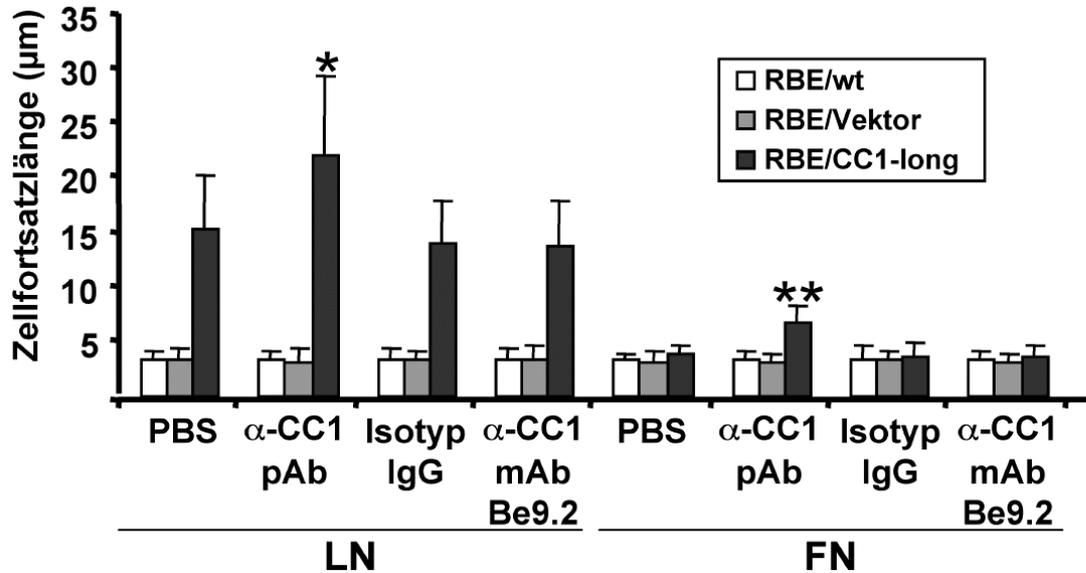
Während die Zugabe von anti-CEACAM1-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Be9.2 und 5.4) während der Adhäsion von RBE-Zellen keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie zeigte, führte die Zugabe von CEACAM1-spezifischen, polyklonalen Kaninchen-IgGs dagegen zu einer deutlichen Zunahme der durchschnittlichen Zellfortsatzlänge von CEACAM1-positiven Zellen auf Laminin-1 um 45% (von  $15 \pm 5 \mu\text{m}$  auf  $22 \pm 7 \mu\text{m}$ , gezeigt für CEACAM1-long, Abb. 20 und Quantifizierung in Abb. 21).



**Abb. 20: Anti-CEACAM1-Antikörper-induzierte Änderungen des Aktin-Zytoskeletts während der Adhäsion auf Fibronektin und Laminin-1.**  $3 \times 10^4$  Serum-starvierte RBE/Vektor- oder RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium mit  $50 \mu\text{g/ml}$  gereinigten, polyklonalen Kaninchen-anti-CEACAM1-IgGs (pAb  $\alpha\text{CC1}$ ) oder Kaninchen-Kontrollantikörpern (Kontrolle) auf Fibronektin (FN)-, Laminin-1 (LN)-Beschichtungen plattiert und für 75 min kultiviert. Nach dem Fixieren mit PFA wurde das Aktin-Zytoskelett mit Hilfe von Phalloidin-TRITC visualisiert. (Originalvergrößerung x 400).

Zusätzlich konnten durch diese Antikörperstimulation kurze Fortsätze mit Lamaellipodium-artigen kortikalem Aktin während der Adhäsion von RBE/CEACAM1-Zellen auf Fibronektin

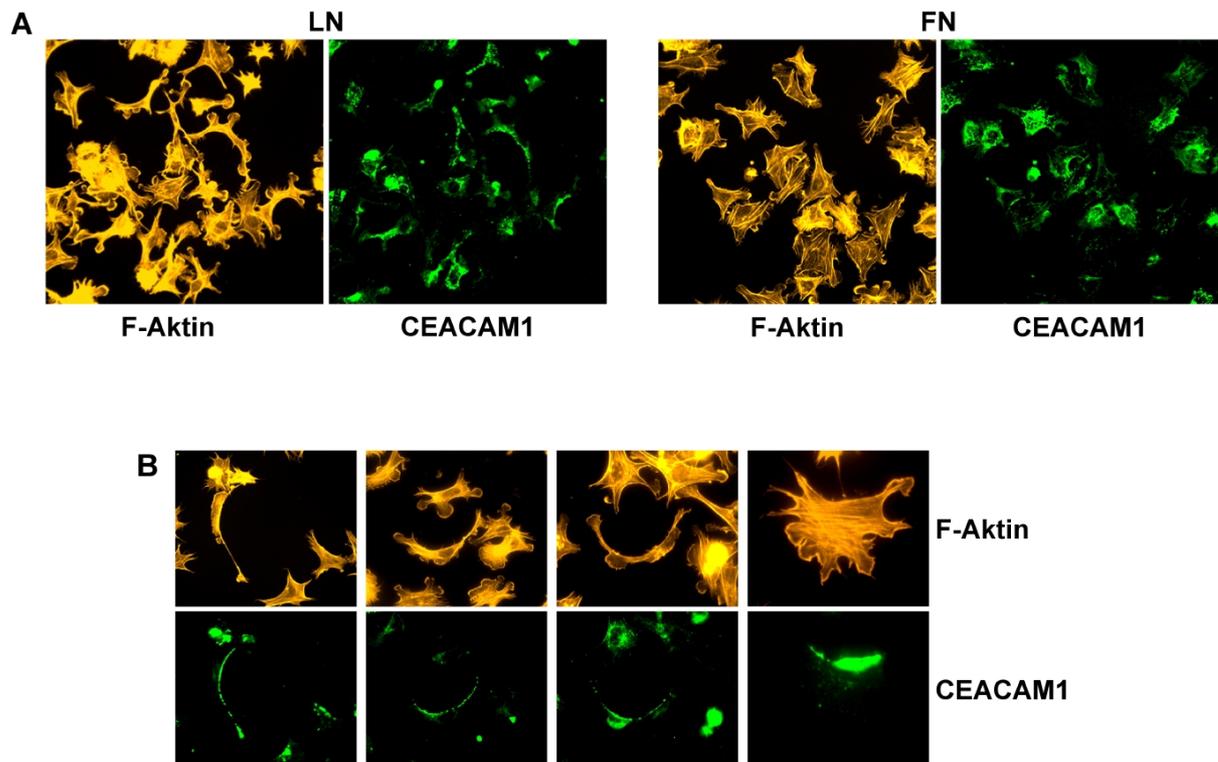
induziert werden, was auch hier zu einer Zunahme der durchschnittlichen Zellausläuferlänge führte (um 100% im Fall von CEACAM1-long, von  $3 \pm 1 \mu\text{m}$  auf  $6 \pm 1 \mu\text{m}$ ). Keine Veränderung der Zellmorphologie und damit auch keine Induktion von Zellausläufern wurden durch die polyklonalen Antikörper bei wt- und Vektor-Zellen beobachtet, was die CEACAM1-Spezifität der gereinigten polyklonalen Kaninchen-IgGs beweist.



**Abb. 21: Quantifizierung der Zellfortsatzlängen von RBE-Zellen während des Anheftens auf extrazellulären Matrixproteinen.** Mit Hilfe der ZeissVision-Software wurden die Zellfortsatzlängen von adhätierenden RBE-Zellen nach Phalloidin-TRITC-Färbung vermessen. Aufgetragen sind die Fortsatzlängen (in  $\mu\text{m}$ ) von adhätierenden RBE/wt-Zellen (weiße Balken), RBE/Vektor-(hell graue Balken) und RBE/CEACAM1-long-(dunkel graue Balken) Transfektanten in Abhängigkeit des verwendeten Matrixproteins (Fibronektin, FN und Laminin-1, LN) und der Zugabe von anti-CEACAM1-polyklonalen Kaninchen-IgGs ( $\alpha\text{CC1 pAb}$ ), Kontroll-Kaninchen-IgGs (Isotyp-IgG) bzw. mAb Be9.2 ( $\alpha\text{CC1 mAb Be9.2}$ ) während des Anheftens. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen, \* =  $p < 0,005$ , \*\* =  $p < 0,001$ ).

Durch indirekte Immunfluoreszenz konnte ferner eine Beeinflussung der CEACAM1-Verteilung auf den Zellen durch Antikörperstimulation beobachtet werden. Unabhängig von der verwendeten Matrix zeigten CEACAM1-Moleküle eine clusterartige Ansammlung auf der Oberfläche nach Stimulation mit den polyklonalen Kaninchen-IgGs (Abb. 22). Wahrscheinlich werden mehrere Epitope des CEACAM1 von den Antikörpern gleichzeitig erkannt, was zu einer Vernetzung der CEACAM1-Moleküle auf der Zelloberfläche führt. Waren diese induzierten CEACAM1-Cluster nicht zufällig auf der Plasmamembran verteilt, sondern häuften sie auf einer Seite der adhätierenden RBE-Zellen, so induzierte dies besonders stark ausgeprägte, lange Zellfortsätze. Bereiche mit besonders starken Anhäufungen von geclusterten CEACAM1-Molekülen zeigten ferner eine deutliche Aussparung bei der Aussprossung von

Zellausläufern. Dadurch kam es häufig zu einer unsymmetrischen, konkaven Ausformung der Zellmembran an diesen Stellen und einer von den CEACAM1-Molekülen weggerichteten, unsymmetrischen Verteilung kortikalen Aktins.

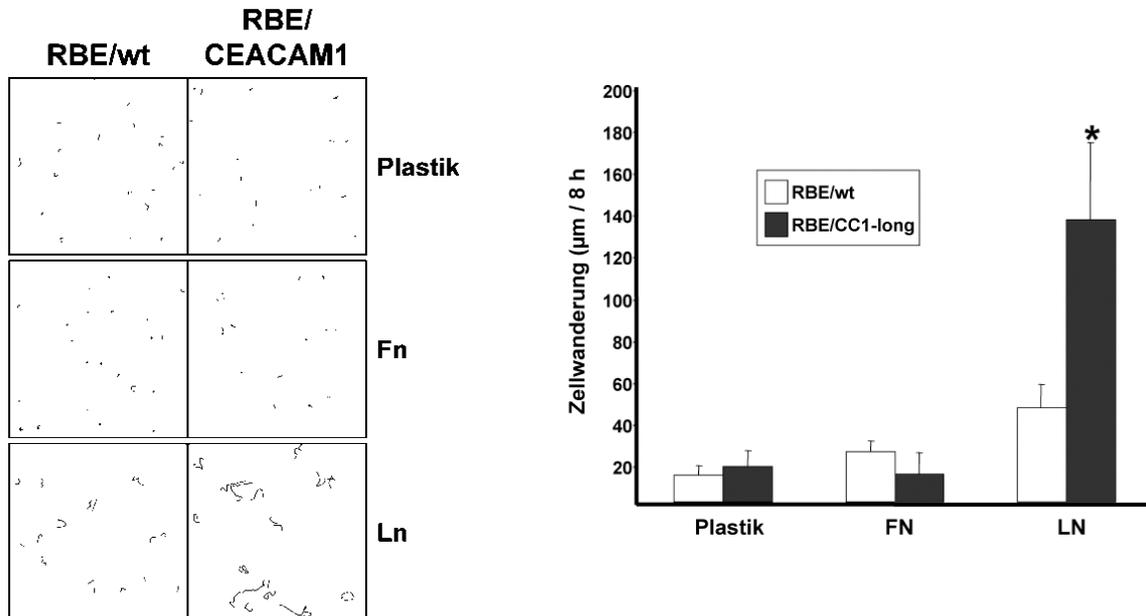


**Abb. 22: Verteilung von CEACAM1 nach Zugabe von polyklonalen anti-CEACAM1-Antikörpern während der Zell-Matrix-Adhäsion.**  $3 \times 10^4$  Serum-starvierte RBE/CEACAM1-long (CEACAM1)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium mit gereinigten, polyklonalen anti-CEACAM1-Antikörpern (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf Fibronectin (FN)-, Laminin-1 (LN)-Beschichtungen plattiert und für 75 min kultiviert. Nach dem Fixieren mit PFA wurde das Aktin-Zytoskelett mit Hilfe von Phalloidin-TRITC visualisiert und die Lokalisation von CEACAM1 durch Cy2-gekoppelte anti-Kaninchen sekundär-Antikörper nachgewiesen. (A) Originalvergrößerung x 400, (B) Zellen auf Laminin-1, Originalvergrößerung x 600).

### Die spontane, ungerichtete Zellwanderung auf Laminin-1

Aufgrund der beobachteten promigratorischen Zellmorphologie der CEACAM1-exprimierenden Zellen auf Laminin-1, Vitronectin und Matrigel mit zahlreichen Zellausläufern und Lamaellipodia an den Spitzen der Ausläufer wurde die Zellwanderung von RBE-Zellen auf Proteinen der extrazellulären Matrix mit Hilfe von digitaler Videomikroskopie und Zeitrafferaufnahmen verfolgt. Dazu wurden Serum-starvierte Zellen in FCS-freiem Medium auf Laminin-1- oder Fibronectin-beschichtete Zellkulturflaschen ausplattiert, für eine Stunde adhäre-

ren gelassen und danach für weitere 8 h unter dem Mikroskop gefilmt. (Schematische Verläufe in Abb. 23).



**Abb. 23: Die willkürliche, spontane Migration von RBE-Zellen auf Laminin-1 wird durch CEACAM1-Expression erhöht.** (A)  $2 \times 10^5$  Serum-starvierte RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long (RBE/CEACAM1)-Transfektanten wurden in Serum-freiem Medium in Zellkulturflaschen (25 ml) plattiert, die nicht (Plastik), Fibronectin (FN) oder Laminin-1 (LN) beschichtet wurden. Nach einer Anheftungsphase von 60 min wurde die anschließende Zellmigration durch digitale Zeitrafferaufnahmen in 20 min Intervallen über eine Zeitspanne von 8 h am Mikroskop verfolgt. Gezeigt sind repräsentative Pfade von beobachteten Zellen eines jeweiligen Versuchs im Blickfeld der Kamera. (Originalvergrößerung  $\times 20$ ). (B) Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit anhand der zurückgelegten Wegstrecken ( $\mu\text{m} / 8 \text{ h}$ ) von RBE/wt-(weiße Balken) und RBE/CEACAM1-long-Transfektanten (graue Balken) mit Hilfe der AxioVision-Software. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils zwei verschiedenen Versuchen,  $* = p < 0,0001$ ).

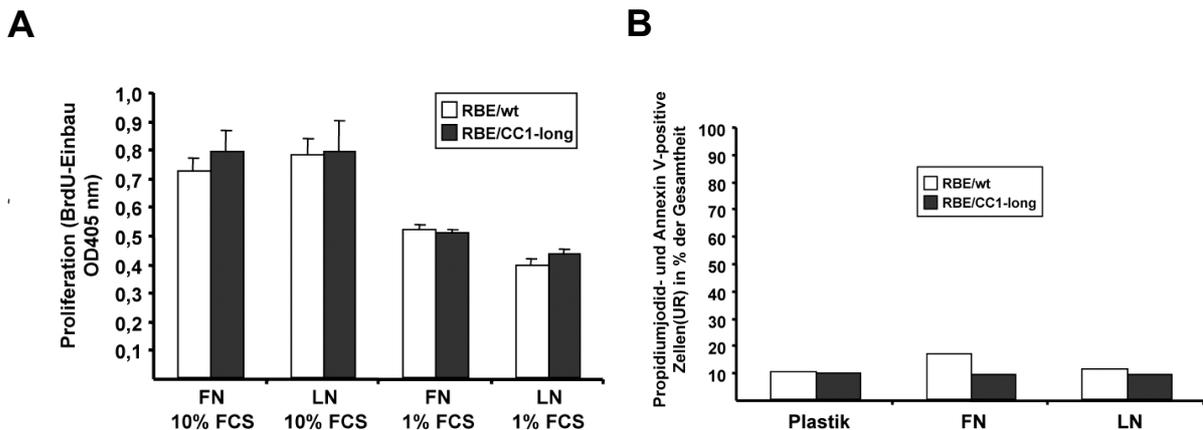
RBE/wt- und auch CEACAM1-exprimierende Zellen zeigten unter diesen experimentellen Bedingungen nur eine geringfügige, spontane Beweglichkeit auf Plastik. Eine etwas höhere Beweglichkeit konnte für alle Zelllinien auf Fibronectin beobachtet werden, ohne das signifikante Unterschiede detektiert wurden. Auf Laminin-1 zeigten die wt-Zellen dagegen eine deutlich erhöhte Beweglichkeit, die in einer mittleren Wanderungsgeschwindigkeit von  $45 \pm 12 \mu\text{m} / 8 \text{ h}$  resultierte. CEACAM1-long- und CEACAM1-short-Transfektanten (nicht gezeigt) auf Laminin-1 zeigten im Vergleich zu den wt-Zellen eine nochmals gesteigerte, hohe Wanderungsgeschwindigkeit von  $134 \pm 37 \mu\text{m} / 8 \text{ h}$ . Die Bewegung der Zellen war dabei ungerichtet, willkürlich und von zahlreichen Richtungswechseln begleitet.

Diese Studien zeigen, dass Laminin-1, als essentieller Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basalmembran von Gefäßen, ein für die Migration von Endothelzellen entscheidender

Anheftungsfaktor ist. Die promigratorischen Signale von Laminin-1-Matrices waren unabhängig von der CEACAM1-Expression detektierbar, konnten jedoch durch die CEACAM1-Expression noch deutlich gesteigert werden.

### Unveränderte Zell-Proliferation / spontane Apoptoseraten auf Matrixproteinen

Die extrazelluläre Matrix steuert eine Reihe von zellulären Funktionen. Nicht nur die Adhäsionsmorphologie oder die Migration werden von der Beschaffenheit und Zusammensetzung der Matrix beeinflusst, sondern auch das Zellwachstum (Proliferation), das Überleben bzw. der kontrollierte Selbstmord (Apoptose) von Zellen werden durch extrazelluläre Signale reguliert. RBE-Zellen lassen sich auch in Serum-freiem Medium über mehrere Tage auf Fibronectin kultivieren, teilen sich sogar noch mehrmals, ehe sie absterben. Während Fibronectin das Überleben der Zellen ohne weitere Wachstumsfaktoren ermöglicht, sterben die Zellen auf Laminin-1 bereits nach 24 h ab, wenn sie ohne Serumzugabe kultiviert werden. Daher wurde die Proliferation und die spontane Apoptoserate von RBE-Zellen im Folgenden unter Serum-haltigen Zellkulturbedingungen ermittelt.



**Abb. 24: Vergleich der Proliferation und Apoptoseraten von RBE-Zellen auf Proteinen der extrazellulären Matrix. (A)** Quantifizierung der Zell-Proliferation von RBE/wt-Zellen (weiße Balken) und CEACAM1-long-Transfektanten (RBE/CC1-long, graue Balken) auf Fibronectin (FN)- oder Laminin-1 (LN)-Beschichtungen durch BrdU-Einbau unter hohen (10%) oder niedrigen Konzentrationen (1%) FCS. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils zwei verschiedenen Versuchen in vierfacher Ausführung). **(B)** Darstellung der Apoptoseraten von RBE/wt-Zellen (weiße Balken) und RBE/CEACAM1-long-Transfektanten (RBE/CC1-long, graue Balken) nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen (Plastik) oder Adhäsion auf Fibronectin (FN) bzw. Laminin-1 (LN). Hierzu wurde die Propidiumiodid und Annexin-V-positive Zellpopulation (UR, *upper right*) der Gesamtheit aller Zellen in der Durchflusszytometrie ermittelt und quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Unter normalen Zellkulturbedingungen (10% Serum) zeigten CEACAM1-exprimierende Zellen keine veränderte Proliferationsrate im Vergleich zu RBE/wt-Zellen. Auch auf Fibronectin