

oder Laminin-1 konnte unter diesen Bedingungen kein Unterschied gemessen werden. Wurde der Serumanteil auf 1% reduziert, so zeigte sich eine deutliche Verlangsamung der Proliferationsrate, jedoch war weiterhin kein Einfluss der CEACAM1-Expression detektierbar (Abb. 24A).

Parallel zu den Proliferationsmessungen wurde die spontane Apoptoserate der RBE-Zellen auf Fibronectin oder Laminin-1 und, zum Vergleich, auch auf Plastik unter 10% Serum-Bedingungen bestimmt. Dabei zeigten sich jeweils gleiche Apoptoseraten (6-10%) für RBE/wt-Zellen und CEACAM1-Transfektanten, unabhängig, ob sie auf Plastik, Fibronectin oder Laminin-1 kultiviert wurden (Abb. 24B).

Die Zellmorphologie während der Adhäsion auf Laminin-1 ist abhängig vom Aktivierungszustand kleiner GTPasen der Rho-familie

Aktivität und Modulation der kleinen GTPase Rho während des Anheftens auf Laminin-1

Kleine GTPasen der Rho-Familie, wie Rho, Rac und CDC42, spielen eine entscheidende, übergeordnete Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts während dynamischer Prozesse wie der Zell-Matrix-Adhäsion, der Zell-Zell-Adhäsion, der Migration oder auch der Endozytose. Rho und Rho-ähnliche GTPasen gehören zur ras-Superfamilie kleiner GTPasen, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln. Während Rac für die Formation von Lamellipodia und '*membrane ruffles*' essentiell ist, ist CDC42 für das Ausbilden von Filopodien und deren Verlängerung notwendig. Rho-Aktivierung dagegen führt zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern (Hall, 1998). Eine wichtige Funktion hierbei besitzt ein Rho-Effektor, die Serin/Threonin Kinase ROCK (*Rho-associated Kinase, p160*). ROCK wird nach Rho-Aktivierung und Bindung selbst aktiviert, wodurch es zur Phosphorylierung von Zielproteinen kommt (z.B. von Myosin-I an der leichten Kette (MLC), und der Myosin-Phosphatase, die dadurch inhibiert wird), was für die Aktin/ Myosin-abhängige Kontraktion und auch für Stressfaserbildung essentiell ist. Rho kann durch extrazelluläre Faktoren und durch vielfältige Signalwege aktiviert werden. So induziert der physiologische Aktivator LPA (*lysophosphatidic acid*, Lysophosphatidsäure)

einen Austausch von GDP nach GTP an Rho und damit dessen Aktivierung. Auch noch unbekannte Faktoren aus dem Serum können Rho-GTP-Beladung in Endothelzellen stimulieren.

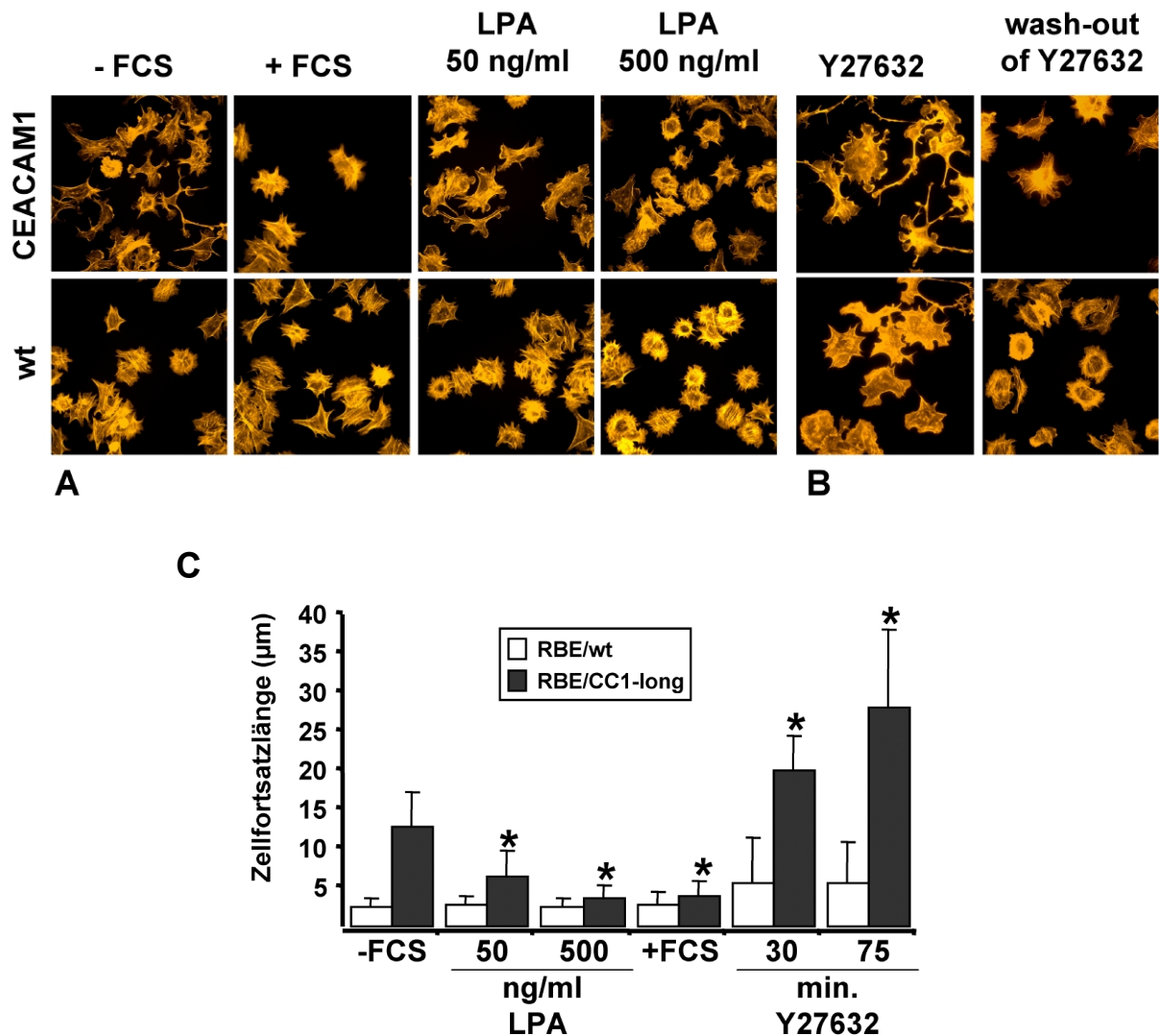


Abb. 25: Einfluss der Aktivierung der kleinen GTPase Rho bzw. der Inhibition der Rho-Effektor kinase ROCK auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts von RBE-Zellen während des Anheftens auf Laminin-1. 3×10^4 Serum-starvierte RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long (RBE/CEACAM1)-Transfektanten wurden (A) in Serum-freiem (-FCS) oder Serum-haltigem (10%, +FCS) Medium oder mit 50 bzw. 500 ng/ml Lysophosphatidsäure (LPA) oder (B) mit ROCK-Inhibitor Y27632 (10 μM) oder in frischem, Serum-freiem Medium nach 1 h Vorinkubation mit Y27632 (*wash-out* Y27632) auf Laminin-1-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). (C) Quantifizierung der Zellfortsatzlänge (in μm) in A und B mit Hilfe der AxioVision-Software von RBE/wt- (weiße Balken) und RBE/CEACAM1-long (graue Balken)-Zellen unter Kontrollbedingungen (-FCS) bzw. nach unterschiedlichen LPA-Konzentrationen, FCS und verschiedenen Inkubationszeiten (30 und 75 min) mit ROCK-Inhibitor Y27632. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei verschiedenen Versuchen, * = $p < 0,0001$ Änderung gegenüber der Kontrolle).

Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Aktivierung von Rho bei der Adhäsion von RBE-Zellen auf Laminin-1 eine entscheidende Rolle einnimmt und ob eine extern herbei-

geführte Aktivierung von Rho zu einer Veränderung der beobachteten Adhäsionsmorphologien von RBE/wt- oder RBE/CEACAM1-long-Zellen führt (Abb. 25A und 25B). Hierzu wurden Serum-starvierte RBE-Zellen mit 50 oder 500 ng/ml LPA während der Adhäsion auf Laminin-1 stimuliert. Diese Behandlung führte in RBE/wt-Zellen zu einer Konzentrations-abhängigen, verstärkten Ausbildung von Stressfasern aber zu keiner wesentlichen Veränderung der beobachtbaren Adhäsionsmorphologie. Demgegenüber zeigten CEACAM1-long-exprimierende RBE-Zellen eine deutlich veränderte Morphologie nach LPA-Stimulierung. Die Zellausläufer verkürzten sich mit zunehmender LPA-Konzentration und Lamaellipodien waren nicht länger zu beobachten. Stattdessen nahmen die RBE/CEACAM1-long-Zellen eine polygonale Morphologie an, zeigten ähnlich den wt-Zellen eine Zunahme an Aktin-Stressfasern und waren bei einer Konzentration von 500 ng/ml LPA nur noch schwer von RBE/wt-Zellen zu unterscheiden.

Auch die Zugabe von 10% Serum während der Adhäsion auf Laminin-1 induzierte in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme an Stressfasern und eine drastische Veränderung der CEACAM1-long-Morphologie hin zu einem wt-ähnlichen Erscheinungsbild.

Die Rho-Effektor-Kinase ROCK kann mit dem spezifischen Inhibitor Y27632 an der Phosphorylierung von Zielproteinen gehindert werden. Zugabe des Inhibitors während der Adhäsion von RBE-Zellen auf Laminin-1 verhinderte in beiden Zelltypen (wt und CEACAM1-long) die Ausbildung von Stressfasern. Mit Zunahme der Inkubationszeit wurden immer weniger Stressfasern beobachtet, was in CEACAM1-long-exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Verlängerung der Zellfortsätze führte. Diese erschienen jetzt außerdem dünner und zeigten vermehrt Verzweigungen. Reversibilität der ROCK-Inhibition durch Y27632 konnte durch Vorinkubation der Zellen während der einstündigen Starvierungsphase und durch Auswaschen des Inhibitors vor dem Replattieren gezeigt werden.

Zusammengefasst beweisen diese Ergebnisse, dass Rho und ROCK während der Zell-Matrix-Adhäsion von RBE/wt-Zellen und von RBE/CEACAM1-Zellen auf Fibronectin stark, aber in geringerem Ausmaß in RBE/CEACAM1-Zellen auf Laminin-1, aktiviert werden. Eine zusätzliche Rho-Aktivierung durch externe Stimuli in RBE/CEACAM1-Zellen auf Laminin-1 kann den zuvor beobachteten Phänotyp zu einen wt-ähnlichen Phänotyp verändern. Die alleinige Inhibition von Rho führt dagegen in RBE/wt-Zellen weder zur Ausbildung von Zellfortsätzen noch zur Formation von Lamaellipodien, wie es für RBE/CEACAM1-Zellen beobachtet wurde. Während der Adhäsion von CEACAM1-exprimierenden Zellen verstärkt die Rho-Inhibition jedoch die Zellfortsatzausbildung. Die Morphologie von RBE/CEACAM1-

Zellen auf Laminin-1 ist also nicht allein nur eine Konsequenz verringerter Rho-Aktivierung im Vergleich zu wt-Zellen, die Zellausläuferbildung in CEACAM1-Zellen ist aber sehr wohl Rho-abhängig modulierbar.

Die Morphologie während des Anheftens auf Laminin-1 ist Rac1-abhängig

Da sich die Morphologie von RBE/wt-Zellen während der Adhäsion auf Laminin-1 durch Inhibition von Rho allein nicht in einen CEACAM1-RBE-Zellen-Phänotyp umwandeln ließ, lag die Vermutung nahe, dass auch andere GTPasen bei der Reorganisation des Zytoskeletts von adhätierenden RBE/CEACAM1-Zellen auf Laminin-1 beteiligt sind. Die Ausbildung von Lamaellipodien in CEACAM1-positiven Zellen auf Laminin-1 wies weiterhin auf eine Beteiligung von aktivierten Rac hin. Dies wurde nun durch transiente Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac1- (L61Rac), dominant-negativen Rac1- (N17Rac) oder wt-Rac1-Konstrukten überprüft. Hierzu wurden wt-RBE-Zellen und CEACAM1-long-exprimierende Zellen 8 h vor dem Readhätieren mit je 2 µg DNA / $1 \cdot 10^6$ Zellen mit dem jeweiligen Rac1-Konstrukt durch Nucleofektion transfiziert. Die Expression der Rac1-Konstrukte zum Zeitpunkt der Readhäsion 8 h nach der Transfektion, konnte im Western-Blot durch den Nachweis des an Rac1 fusionierten myc-Epitops nachgewiesen werden (Abb. 26A). Die Überexpression der Rac1-Konstrukte hatte zu diesem Zeitpunkt keine Auswirkung auf die endogene Rac-Expression in RBE-Zellen. F-Aktin-Färbungen mit Phalloidin-TRITC und indirekte Immunfluoreszenzen mit anti-myc-Antikörpern zum Nachweis der Expression der Rac1-Konstrukte 75 min nach dem Ausplattieren auf Laminin-1 (Abb. 26B) zeigten, dass die Überexpression von wt-Rac1 in RBE/wt- und CEACAM1-exprimierenden Zellen keine morphologischen Veränderungen induzierte. Weder die Ausbildung von Aktin-Stressfasern in wt-Zellen, noch die Formation oder Länge der Zellfortsätze mit Lamaellipodia in RBE/CEACAM1-Zellen waren verändert. Dagegen erzeugte die Überexpression von konstitutiv aktiven Rac1 sowohl in wt-Zellen als auch in CEACAM1-Transfektanten kreisförmige Zellen mit einem großen, runden, den ganzen Zellumfang umstreckenden Lamaellipodium. Ein ganz ähnlicher Phänotyp wurde nach L61-Rac1-Transfektion auch für Zellen, die auf Fibronektin adhätierten, gefunden. Die Überexpression von dominant negativen Rac1 hatte in wt-Zellen dagegen keine morphologisch auffälligen Auswirkungen. Im Gegensatz dazu zeigten sich RBE/CEACAM1-Zellen sensitiv gegenüber der Inhibition von Rac1. CEACAM1-positive Zellen, die mit N17Rac1 transfiziert wurden, zeigten nunmehr keine Tendenz zur Formation von Zellausläufern an der Zellperipherie, wenn sie auf Laminin-1 spreiteten. Auch die Formation

von Lamaellipodia an Ausläuferspitzen konnte nicht länger beobachtet werden. Insgesamt vermitteln die N17Rac1-Zellen jedoch einen gespreiteten Eindruck, wenn sie auch etwas kleiner als nicht transfizierte RBE/CEACAM1-Zellen blieben. Insgesamt glich die Morphologie von N17Rac1-CEACAM1-Zellen auf Laminin-1 nun sehr stark der von N17Rac1-wt-RBE-Zellen auf Laminin-1, was darauf hinweist, dass Rac1 eine übergeordnete Funktion beim Spreiten auf Laminin-1 zufällt.

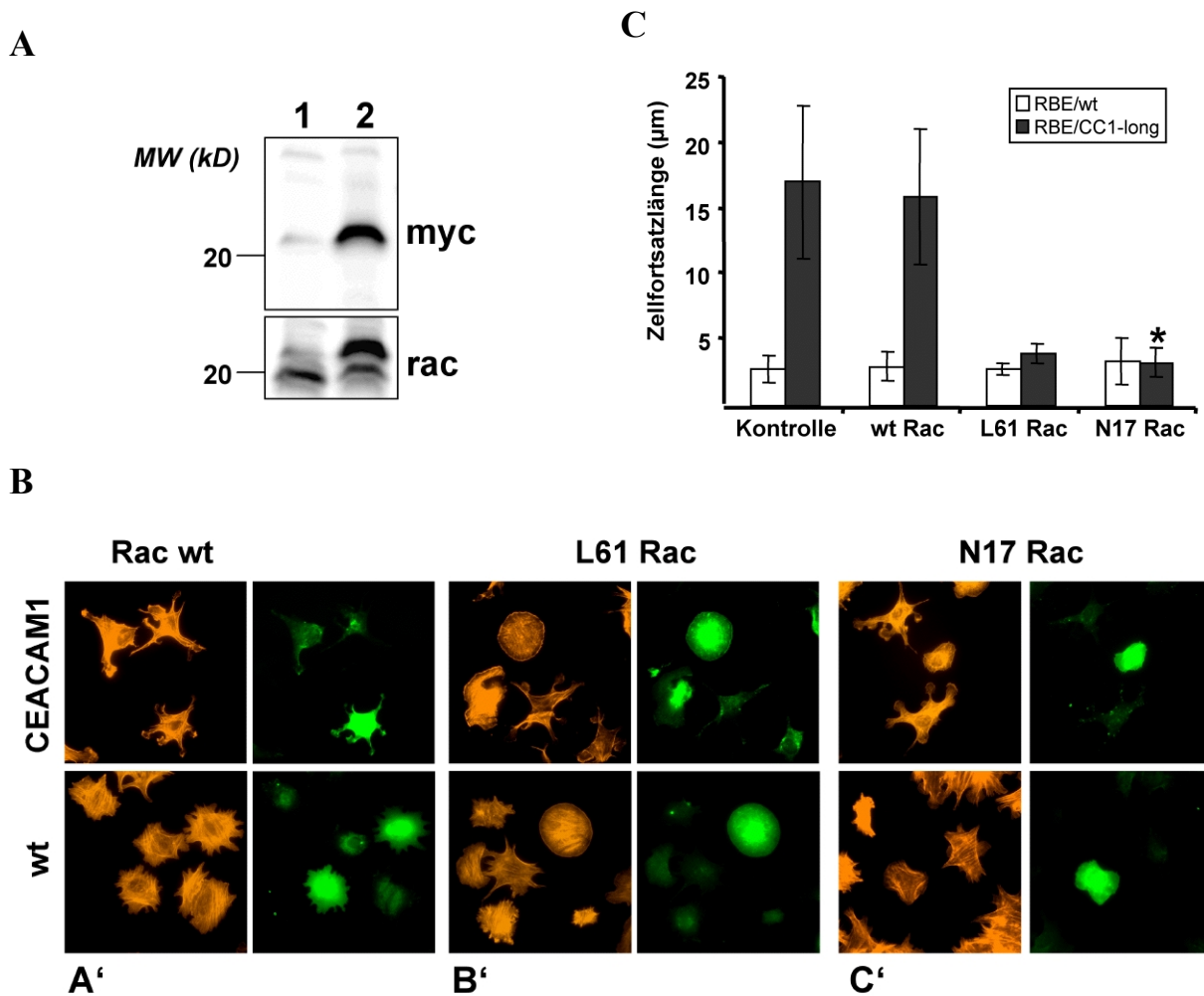


Abb. 26: Einfluss der kleinen GTPase Rac1 auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts von RBE-Zellen während des Anheftens auf Laminin-1. RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden 8 h vor Ausplattieren mit c-myc-fusionierten Rac1-Konstrukten (Rac1 wt; L61Rac1, dominant-aktives Rac1; N17Rac1, dominant-negatives Rac1) durch Nucleofektion transfiziert. Die Expression der Konstrukte ist beispielhaft für RBE/wt-Zellen 8 h nach Nucleofektion mit dominant-negativen Rac1 unter Verwendung eines anti-myc-Epitop-erkennenden Antikörpers im (A) Western-Blot gezeigt (oben). Die Überexpression beeinflusst nicht die endogen exprimierte Menge Rac (unten). (B) RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long (RBE/CEACAM1)-Transfektanten wurden 7 h nach der Transfektion für 1 h Serum-starviert, abgelöst und für 75 min auf Laminin-1 plattiert. Nach dem Fixieren wurde das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin-TRITC visualisiert und die Rac1-Konstrukt-überexprimierenden Zellen mit anti-myc-Antikörpern und Cy2-gekoppelten sekundär-Antikörpern gefärbt. (Originalvergrößerung x 400). (C) Quantifizierung der Zellfortsatzlänge (in µm) von Rac1-Konstrukt (Rac wt, L61Rac und N17Rac)-überexprimierenden RBE/wt-(weiße Balken) und RBE/CEACAM1-long (graue Balken)-Zellen auf Laminin-1 mit Hilfe der AxioVision-Software. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils zwei verschiedenen Versuchen, * = $p < 0,0001$)

Änderung gegenüber der Kontrolle).

Durch die Überexpression von dominant negativen Rac1 konnte gezeigt werden, dass die Morphologie von CEACAM1-RBE-Zellen auf Laminin-1 abhängig ist von der Aktivierbarkeit von Rac1. Ohne die Möglichkeit der Rac-Aktivierung kommt es nicht zur Ausbildung von Lamaellipodiae und auch nicht zur Bildung von Zellfortsätzen. Die Bildung eines großen, die ganze Zelle umspannenden Lamaellipodiums durch konstitutiv-aktives Rac1 während der Adhäsion auf Laminin-1 zeigt ferner, dass die Aktivierung von Rac1 während der Adhäsion auf Laminin-1 in CEACAM1-RBE-Zellen räumlich und zeitlich strengen Einschränkungen unterliegt.

Beeinflussung Integrin-vermittelter Signaltransduktion auf Laminin-1

Verringerte Ausbildung von Paxillin-positiven fokalen Adhäsionskomplexen

Die Integrin-vermittelte Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix spielt eine bedeutende Rolle während der Entwicklung und Aufrechterhaltung höherer Organismen und reguliert zahlreiche zelluläre Funktionen. Die Bindung von Integrin-Liganden an die entsprechenden heterodimeren Rezeptoren führt zum Clustern der Rezeptoren in sog. fokalen Adhäsionen, die intrazellulär eine Reihe zytoplasmatischer Signalproteine rekrutieren und sich zu makromolekularen Proteinkomplexen organisieren. Verschiedene Proteine wie Paxillin spielen dabei eine strukturelle Rolle, indem sie als Adaptoren für weitere Proteine dienen, während Proteine wie Talin, Vinculin oder α -Actinin eine Anbindung der Integrine an das Aktinzytoskelett vermitteln. Proteine mit enzymatischer Aktivität wie Kinasen, Phosphatasen oder GTPasen können ebenfalls rekrutiert und in ihrer Aktivität Integrin-abhängig aktiviert werden, wodurch sie Morphologie, Proliferation, Apoptose oder Überleben der Zellen regulieren können. Eine Vielzahl von Integrinen vermittelt die Adhäsion von Zellen auf Laminin. Das Integrin α 6/ β 1 wird dabei als der Hauptrezeptor für Laminin-1 angesehen, aber auch α 1/ β 1, α 2/ β 1, α 3/ β 1, α 6/ β 4 oder α V/ β 3 können Laminine binden. Um nicht jede Integrinkombination für sich testen zu müssen, wurde das von Integrinen vermittelte Clustern von Paxillin während der Adhäsion der RBE-Zellen auf Fibronectin und Laminin-1 verglichen (Abb. 27A). Indirekte Immunfluoreszenzen von Paxillin (75 min nach dem Ausplattieren) auf Fibronectin zeigten gut entwickelte fokale

Komplexe an der Peripherie und große fokale Adhäsionen im Inneren von RBE/wt- und RBE/CEACAM1-Zellen. Auf Laminin-1 dagegen entwickelten nur RBE/wt-Zellen ausgeprägte fokale Komplexe und fokale Adhäsionen, ähnlich der Adhäsion auf Fibronektin. CEACAM1-exprimierende Zellen dagegen entwickelten nur selten zentral gelegene Paxillin-positive fokale Adhäsionen, und Paxillin-enhaltene fokale Komplexe an der Peripherie waren zahlenmäßig stark reduziert, lokalisierten am Saum der Zellfortsätze und waren zumeist klein oder pfeilspitzenförmig. Kleine fokale Kontakte wurden auch nach phospho-Tyrosin-Färbungen an adhätierenden Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz beobachtet (Abb. 27B).

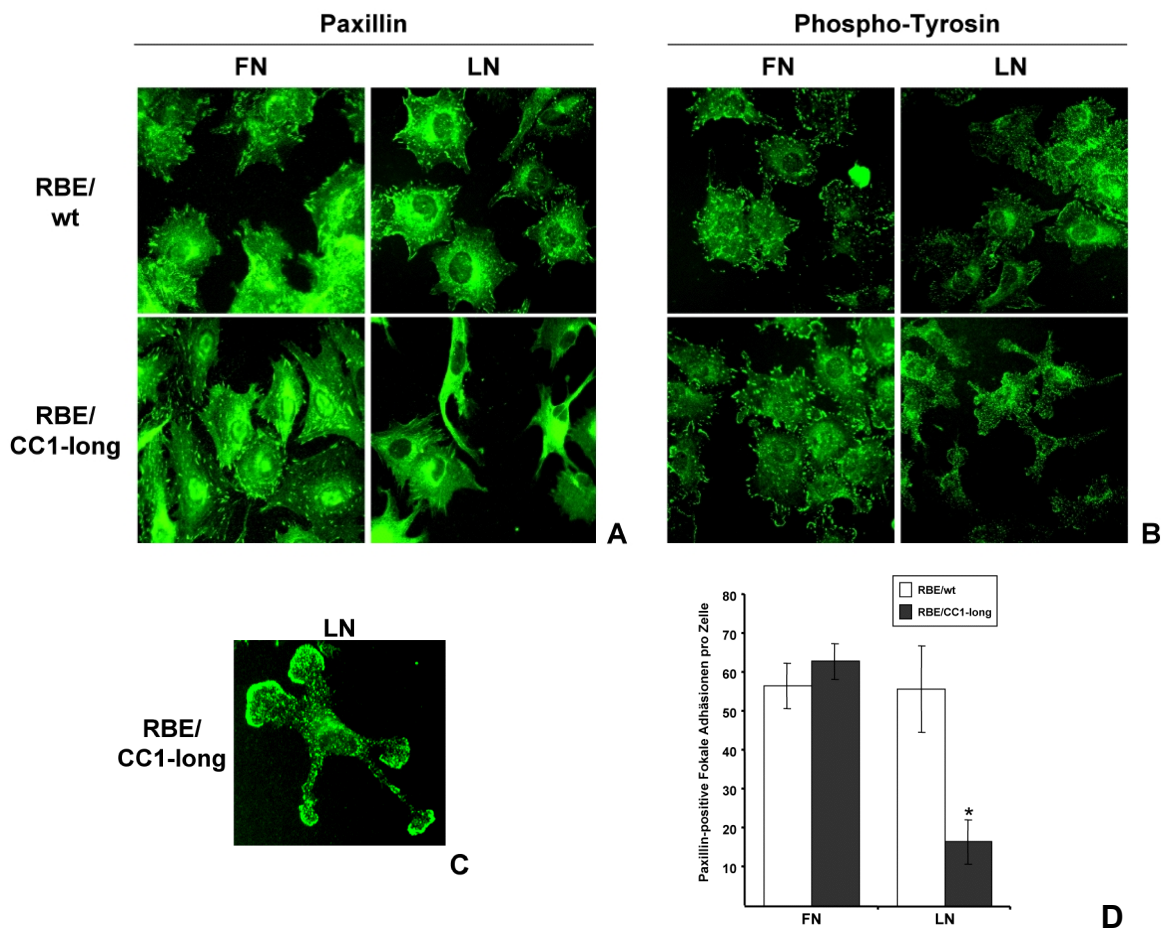


Abb. 27: Die CEACAM1-Expression in RBE-Zellen führt zu einer Reduktion Paxillin-positiver fokaler Adhäsionskomplexe auf Laminin-1. 3×10^4 Serum-starvierte RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long (RBE/CC1-long)-Transfektanten wurden für 75 min auf Fibronektin (FN) oder Laminin-1 (LN) plattiert, fixiert und permeabilisiert. Fokale Adhäsionskomplexe bzw. -kontakte wurden durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen anti-Paxillin-Antikörpern (A) oder (B) anti-phospho-Tyrosin-Antikörpern und Cy2-gekoppelten sekundär-Antikörpern angefärbt. (Originalvergrößerung x 400). (C) 600-fache Vergrößerung einer mit anti-phospho-Tyrosin Antikörpern angefärbten RBE/CEACAM1-long (RBE-CC1-long)-exprimierenden Zelle während des Anheftens auf Laminin-1. (D) Quantifizierung Paxillin-positiver Adhäsionskomplexe in RBE/wt (weiße Balken) und RBE/CEACAM1-long (RBE/CC1-long, graue Balken) nach 75 min Adhäsion auf Fibronektin (FN) und Laminin-1 (LN) pro Zelle. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils zwei verschiedenen Versuchen mit > 20 Zellen, $*= p < 0,0001$ Änderung gegenüber RBE/wt-Zellen).

Dabei zeigte sich im Gegensatz zur Paxillin-Färbung jedoch kein zahlenmäßiger Unterschied zwischen CEACAM1-Transfektanten oder wt-Zellen, egal auf welcher Matrix. Auffällig stark mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörpern markiert war der Lamaellipodiae-artige Bereich in CEACAM1-exprimierenden Zellen auf Laminin-1 (Abb. 27C). Während der Aktin-Umorganisation und Ausbildung des kortikalen Aktinsaums sind in diesen Bereichen viele Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert. Ihre Identität ist nicht bekannt und auch nicht weiter untersucht worden.

Rho-Aktivierung führt in mehreren Zellsystemen zu einer verstärkten Ausbildung von Stressfasern, aber auch zu einem gesteigerten Aufbau von fokalen Adhäsionskomplexen. Da zuvor deutlich die Rho-Abhängigkeit der beobachteten Morphologie von RBE/CEACAM1-Transfektanten auf Laminin-1 gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob die verringerte Anzahl gereifter, Paxillin-positiver fokaler Adhäsionskomplexe auf die im Vergleich zu wt-Zellen verringerte Aktivität von Rho und ROCK zurückzuführen ist. Um dies zu testen, wurden CEACAM1-long-Transfektanten während der Adhäsion auf Laminin-1 mit 10% FCS stimuliert.

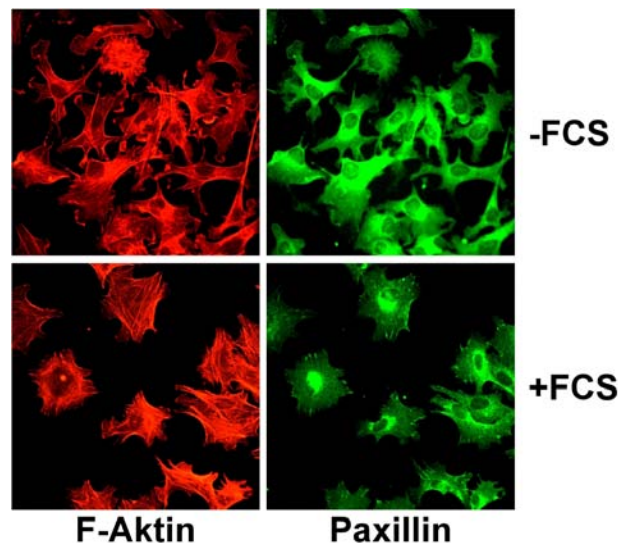


Abb. 28: Zugabe von FCS während der Adhäsion von RBE/CEACAM1-Zellen auf Laminin-1 erhöht die Anzahl Paxillin-positiver fokaler Adhäsionskomplexe. 3×10^4 Serum-starvierte RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden unter Serum-freien (-FCS) oder Serum-haltigen Bedingungen (10%, +FCS) für 75 min auf Laminin-1 plattiert, fixiert und permeabilisiert. Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC (F-Aktin) visualisiert und fokale Adhäsionskomplexe wurden durch indirekte Immunfluoreszenz von Paxillin dargestellt. (Originalvergrößerung x 400).

Erneut waren die morphologischen Veränderungen deutlich zu beobachten (Abb. 28) und diese waren begleitet von einer Zunahme an Paxillin-beinhaltenen fokalen Adhäsionen, die aber nicht die für wt-Zellen beobachtbare Anzahl erreichten. Die verminderte Rho-Aktivität

in CEACAM1-exprimierenden Zellen während der Adhäsion auf Laminin-1 scheint daher ein Faktor zu sein, der die beobachtete geringe Anzahl Paxillin-enthaltender fokaler Komplexe verursacht. Da FCS aber eine große Anzahl von Signalwegen aktiviert, sind auch andere Szenarien, z.B. über Wachstumsrezeptor-vermittelte Regulationen von Integrin-Signalwegen, möglich. Der im FCS morphologisch wirksame Faktor, der auch die Bildung von fokalen Adhäsionskomplex erhöht, ist zur Zeit nicht bekannt. Es zeigt sich aber, dass die CEACAM1-vermittelten Effekte durch FCS-Stimulation modulierbar sind.

Tyrosinphosphorylierung der *Fokalen-Adhäsionskinase (FAK)* während des Anheftens

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK, *Focal Adhesion Kinase*) spielt ähnlich dem Paxillin eine übergeordnete Rolle bei der Reifung von fokalen Adhäsionskomplexen, indem sie durch Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten neue Andockstellen für weitere Proteine schafft oder Effektor-Signalmoleküle durch Phosphorylierung aktiviert. Die FAK selbst wird durch Ligandenbindung an Integrine aktiviert und dabei, wahrscheinlich von Kinasen der src-Familie, an Tyrosinresten phosphoryliert. Der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus der FAK kann daher als Aktivierungskriterium der Kinase angesehen werden und wurde im Folgenden untersucht.

RBE/wt-Zellen zeigten einen rapiden Anstieg der FAK-Tyrosinphosphorylierung schon kurz nach dem Ausplattieren auf Laminin-1 (15 min) und nur eine geringe Abschwächung während des untersuchten Zeitrahmens von 60 min. CEACAM1-exprimierende Zellen offenbarten dagegen über den gesamten Zeitraum hinweg eine bis zu 3-fach geringere FAK-Tyrosinphosphorylierung verglichen mit wt-Zellen. Außerdem zeigte sich die Phosphorylierung der FAK in CEACAM1-Zellen auf Laminin-1 als sehr kurzlebig, was in einer transienten Aktivierung, die bereits nach 60 min deutlich schwächer detektierbar war, resultierte (Abb. 29A).

Ein Unterschied in der FAK-Tyrosinphosphorylierung von RBE/wt- und RBE/CEACAM1-long-Zellen auf Fibronectin konnte dagegen nicht gefunden werden (nicht gezeigt), was mit der beobachteten ungestörten Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen in beiden Zelllinien einhergeht.

MAPK-Aktivität während der Adhäsion auf Laminin-1

Die Integrin-vermittelte Anheftung von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix führt unter anderem auch zur Phosphorylierung und Aktivierung von extrazellulär regulierten/Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) die durch Phosphorylierung weiterer Proteine Signale bis in

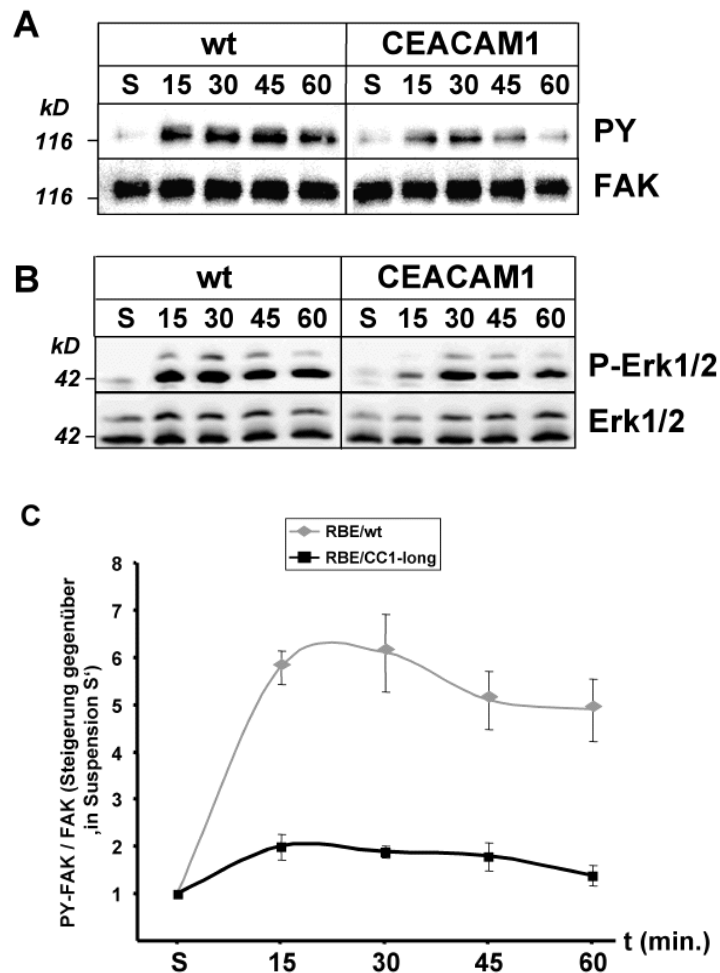


Abb. 29: Phosphorylierung von Integrin-aktivierten Signalmolekülen während der Adhäsion von RBE-Zellen auf Laminin-1. Serum-starvierte RBE/wt-Zellen (wt) oder RBE/CEACAM1-long (CEACAM1)-Transfektanten wurden nach Ablösen in Suspension (S) gehalten oder für 15, 30, 45 und 60 min auf mit Laminin-1-beschichteten 6 cm (FAK-Aktivierung) oder 3,5 cm Zellkulturschalen (Erk1,2-Aktivierung) ausplattiert und in Lysispuffer solubilisiert (A) oder direkt mit kochendem Probenpuffer geerntet (B). **(A)** Tyrosinphosphorylierung von FAK während der Adhäsion auf Laminin-1 (oben) nach Immunpräzipitation und Western-Blot, dargestellt mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörpern (PY99) und Reblot mit anti-FAK mAbs nach stripfen (unten). **(B)** Aktivierung von Erk1/2 (oben) dargestellt durch phospho-Thr202/Tyr204-spezifische Antikörper im Western-Blot und Reblot (unten) mit Erk1/2-spezifischen Antikörpern. **(C)** Quantifizierung der Aktivierung von FAK während der Adhäsion von RBE/wt-Zellen (helle Linie) oder RBE/CEACAM1-long (CC1-long, dunkle Linie) auf Laminin-1. Dargestellt ist die Steigerung der Tyrosinphosphorylierung während des Anheftens gegenüber Zellen, die in Suspension gehalten wurden. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen).

den Zellkern übermitteln und die Genexpression entscheidend beeinflussen können. Es wurde daher, exemplarisch für CEACAM1-long-Zellen, untersucht, ob die Expression von CEACAM1-Molekülen auf der Oberfläche von RBE-Zellen die Integrin-abhängige MAPK-Aktivierung auf Laminin-1 beeinflusst.

Dazu wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 während des Spreitens auf Laminin-1 durch Aktivitäts-spezifische Antikörper im Western-Blot untersucht (Abb. 29B). Bereits 15 min nach dem Ausplattieren von wt-Zellen konnte, im Gegensatz zu wt-Zellen, die in Suspension gehalten wurden, eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung an ERK1/2 detektiert werden. Diese Phosphorylierung blieb im beobachteten Zeitraum von 60 min in wt-Zellen nahezu konstant. CEACAM1-exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu wt-Zellen eine etwas verzögerte ERK1/2-Aktivierung, die jedoch bereits 30 min nach dem Ausplattieren einen mit wt-Zellen vergleichbare Phosphorylierungsstärke erreichten und beibehielten.

Expression von fokalen Adhäsionskomplex-assoziierten Proteinen

Die Expression von CEACAM1 in den RBE-Zellen beeinflusste nicht die Integrin-vermittelte Adhäsion der RBE-Zellen auf Laminin-1 und auch nur unmerklich post-Ligandeneffekte wie die MAPK-Aktivierung. Da sich die CEACAM1-Expression aber auf das Clustering von intrazellulären Proteinen und auf die Bildung fokaler Adhäsionen bzw. Komplexe auswirkte, wurde nun kontrolliert, ob die Expressionsmengen von fokalen Adhäsionskomplex-assoziierten Proteinen durch die CEACAM1-Expression verändert war. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression von alpha6/beta1-Integrinuntereinheiten, Paxillin, Talin, Vinculin oder der FAK in wt- oder CEACAM1-RBE-Zellen gefunden werden (Abb. 30).

Die verringerte Anzahl von fokalen Adhäsionskomplexen lässt sich zur Zeit am einfachsten durch die verringerte Aktivierung/Tyrosinphosphorylierung der FAK erklären. Eine generelle Störung im Aufbau von fokalen Komplexen / Kontakten in RBE/CEACAM1-Zellen liegt zumindest nicht vor, da auf Fibronectin eine den wt-Zellen entsprechende Anzahl von Komplexen / Kontakten gefunden wurde. Da für die Zellwanderung der ständige Auf- und Abbau, d.h., ein erhöhter "turnover" von fokalen Kontakten nötig ist, steht die Verringerung an fokalen Adhäsionen in CEACAM1-positiven Zellen im Einklang mit der beobachteten erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit auf Laminin-1.

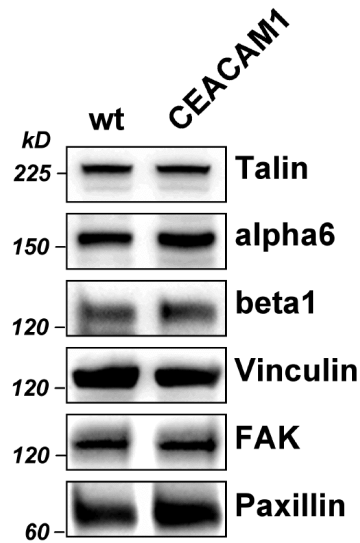


Abb. 30: Die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ sowie intrazellulär Integrin-assoziiierter Proteine wird durch die CEACAM1-Expression nicht beeinflusst. Die Expression von Talin, $\alpha 6$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin, Vinculin, FAK und Paxillin wurde in konfluenten RBE/ wt-Zellen (wt) und RBE/ CEACAM1-long (CEACAM1)-Transfektanten im Immun-blot von Zelllysaten durch spezifische Antikörper untersucht. (Repräsentative Western-Blots von zwei Versuchen.)

Zytoskelettale Assoziation von CEACAM1-long und Interaktion mit Talin

CEACAM1-long assoziiert während des Spreitens mit dem Zytoskelett

Zelloberflächenrezeptoren, die Zell-Matrix-Kontakte oder Zell-Zell-Kontakte vermitteln, sind häufig mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert, wodurch die Zellen Zugspannungen über die Plasmamembran aufbauen können, die für die Formgebung, für die Zell-Matrix-Adhäsion und für die Zell-Migration essentiell sind. Da eine Anbindung von CEACAM1-long an das Aktin-Zytoskelett von Zellen in der Literatur bereits beschrieben wurde, wurde im Folgenden untersucht, ob CEACAM1-long während des Adhäsionsprozesses auf extrazellulären Matrixproteinen assoziiert mit dem Aktin-Zytoskelett vorliegt. Zytoskelettale und Zytoskelett-assoziierte Proteine bilden einen Hauptbestandteil des unlöslichen zellulären Materials nach Triton X-100-Extraktion bei 4°C. Um eine mögliche Assoziation von CEACAM1-long mit dem Aktin-Zytoskelett zu detektieren, wurde diese Triton X-100-unlösliche Zellfraktion auf das Vorkommen von CEACAM1 im Immunblot getestet. Während CEACAM1-long aus nicht-adhätierenden, in Suspension gehaltenen RBE-Zellen fast zu 100% Triton X-100-löslich war und nur ein geringer Anteil in der unlöslichen Fraktion zu detektieren war, zeigte sich nach Adhäsion eine deutliche Zunahme an unlöslichem CEACAM1 (Abb. 31A). 75 min nach dem

Ausplattieren auf Fibronectin wurde, verglichen mit RBE/CEACAM1-long-Zellen in Suspension, 3,9 Mal mehr CEACAM1-long in der unlöslichen Fraktion gefunden.

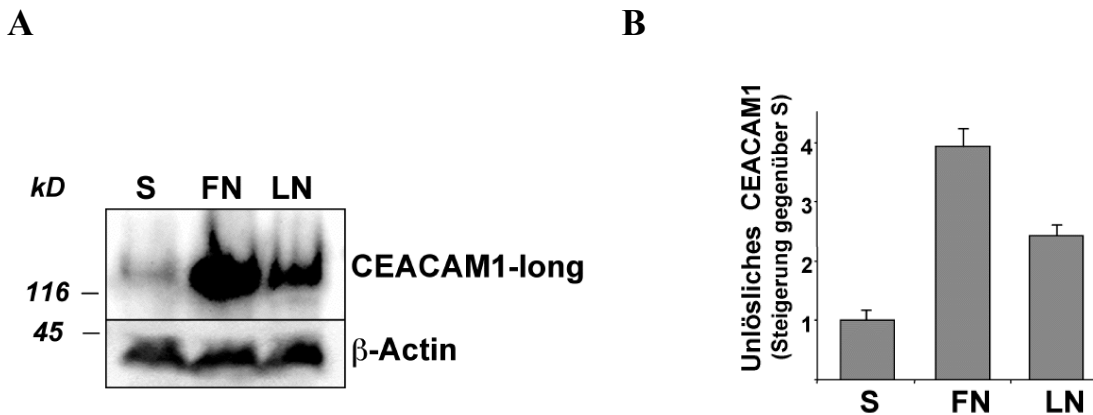


Abb. 31: Translokation von CEACAM1 in die TX-100 unlösliche, zytoskelettale Fraktion während der Adhäsion und des Spreitens. Serum-starvierte RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden nach Ablösen in Suspension (S) gehalten oder für 60 min auf mit Fibronectin (FN) oder Laminin-1 (LN)-beschichteten 6 cm ausplattiert und in 0,5% TX-100 Lysispuffer solubilisiert. **(A)** CEACAM1-long in der TX-100-unlöslichen Fraktion wurde durch Immunblot mit mAb Be9.2 analysiert (oben). Nachweis von β -Aktin in der unlöslichen Fraktion als Ladekontrolle (unten). **(B)** Quantifizierung der CEACAM1-long TX-100-Unlöslichkeit. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen).

Auch auf Laminin-1 konnte eine Zunahme um das 2,4-fache an Zytoskelett-assoziiertem CEACAM1 detektiert werden. CEACAM1-long ist also tatsächlich während des Zell-Matrix-Adhäsionsprozess mit dem Zytoskelett assoziiert. Diese Interaktion ist Matrixprotein-unabhängig, korreliert aber mit der Menge an ausgebildeten Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen von RBE/CEACAM1-long-Zellen auf Fibronectin und Laminin-1.

CEACAM1-long assoziiert mit Talin während der Adhäsion auf Fibronectin

Da die Expression von CEACAM1 in RBE-Zellen die Organisation des Aktin-Zytoskeletts während der Adhäsion auf Laminin-1 beeinflusste und CEACAM1-long selbst Zytoskelett-assoziiert war, wurde nun untersucht, ob CEACAM1 mit Proteinen, die bekanntermaßen mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren, während der Zell-Matrix-Adhäsion eine Bindung eingeht. Dazu wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt, bei denen CEACAM1-long nach Triton X-100-Solubilisierung mit spezifischen polyklonalen Kaninchen-IgGs aus Zellen immunpräzipitiert wurde (Abb. 32). Dazu wurden die Zellen in Suspension gehalten oder für 60 min auf Fibronectin oder Laminin-1 adhären gelassen. Im Immunblot wurde anschließend untersucht, ob mit CEACAM1 andere Proteine kopräzipitiert wurden. Tatsächlich konnte in Präzipi-

taten von RBE/CEACAM1-long-Zellen, die auf Fibronectin adhärerten, ein signifikanter Anteil von Talin mit CEACAM1-long kopräzipitiert werden. Eine Interaktion mit Talin während der Adhäsion auf Laminin-1 oder in nicht adhärierenden Zellen konnte dagegen nicht beobachtet werden. Kontrollpräzipitationen mit IgG-Isotyp-Kontrollantikörpern oder Präzipitationen aus RBE/wt-Zellen waren ebenfalls Talin negativ. Auch aus konfluenten und subkonfluenten RBE/CEACAM1-long-Kulturen konnte kein Talin mit CEACAM1 kopräzipitiert werden (nicht gezeigt), was auf eine spezifische Interaktion der beiden Proteine während des Adhäsionsprozesses auf Fibronectin spricht. Andere Zytoskelett- und/oder Integrin-assoziierte Proteine, wie Vinculin, α -Actinin und Paxillin, konnten nicht im CEACAM1-Präzipitat nachgewiesen werden (nicht gezeigt), was die Spezifität der CEACAM1-Interaktion mit Talin herausstellt.

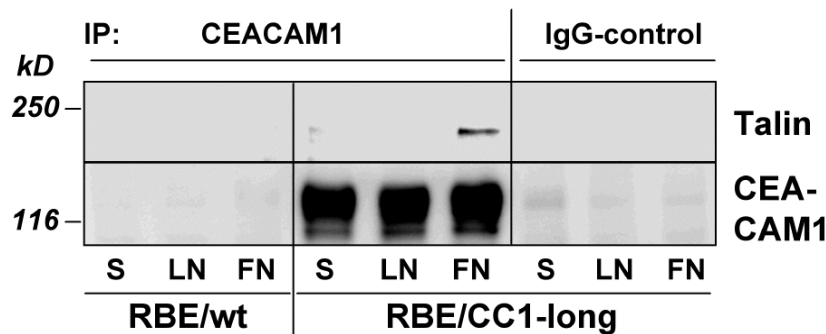


Abb. 32: Koimmunpräzipitation von Talin mit CEACAM1-long aus adhärierenden RBE-Zellen auf Fibronectin. Serum-starvierte RBE/wt-Zellen oder RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden nach Ablösen in Suspension (S) gehalten oder für 60 min auf mit Fibronectin (FN)- oder Laminin-1 (LN)-beschichteten 10 cm Zellkulturgefäßen ausplattiert und in 1% TX-100-Lysispuffer solubilisiert. Aus der löslichen Fraktion wurde mit mAb Be9.2 CEACAM1-long immunpräzipitiert und im Immunblot auf kopräzipitierendes Talin mit mAb 8D4 hin untersucht (oben). CEACAM1-long im Immunpräzipitat wurde mit Be9.2 detektiert. Immunpräzipitationen mit Isotyp-Kontroll-IgGs (IgG-control) aus RBE/CEACAM1-long-Solubilisaten bzw. Immunpräzipitationen mit mAb Be9.2 aus RBE/wt-Zellsolubilisaten zeigten keine anti-Talin- oder anti-CEACAM1-Immunreaktivität im Western-Blot. Ein repräsentativer Blot von dreien ist gezeigt.

Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne haben keine Funktion bei der Assoziation mit dem Zytoskelett und der Interaktion mit Talin

Da für CEACAM1-long kürzlich gezeigt werden konnte, dass es die Migration von Melanozyten und Melanom-Zelllinien unter der Voraussetzung phosphorylierbarer Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil erhöht (Ebrahimnejad et al., 2004), wurden zusätzliche Varianten von CEACAM1-long durch gerichtete Mutagenese generiert. Unter anderem wurde eine Tyrosin-

Doppelmutante hergestellt RBE/CEACAM1-longY488:513F, Tyrosin-Einzelmutanten RBE/CEACAM1-longY488F und RBE/CEACAM1-longY513F sowie eine CEACAM1-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne RBE/CEACAM1- Δ Cyto. (Für Daten zur Oberflächenexpression: siehe Methodenteil, Generierung von Mutanten des CEACAM1-long). Da ferner eine in Adenokarzinomzellen Tyrosinphosphorylierungs-abhängige zytoskelettale Assoziation von CEACAM1-long nach Pervanadat-Stimulation beschrieben wurde (Schumann et al., 2001), wurde nun untersucht, ob auch die Tyrosin-Doppelmutante CEACAM1-longY488:513F, während der Zell-Matrix-Adhäsion mit dem Zytoskelett-assoziiert vorliegt.

Tatsächlich konnte nach Adhäsion und Triton X-100-Solubilisation ein signifikanter Anteil der Tyrosin-Doppelmutante nach Adhäsion auf Fibronectin in der unlöslichen Pelletfraktion gefunden werden (Abb. 33C). Zusätzlich konnte auch nach Adhäsion auf Fibronectin in CEACAM1-long Y488:513F-Immunpräzipitaten Talin kopräzipitiert und im Immunblot detektiert werden (Abb. 33B).

Die Tyrosin-Doppelmutante verhält sich also in adhätierenden RBE-Zellen ganz wie die wt-CEACAM1-long-Isoform; Translokation in die Zytoskelett-assoziierte Zellfraktion und die Bindung von Talin sind nicht abhängig von der Phosphorylierbarkeit der zytoplasmatischen Tyrosinreste. Auch die Zellmorphologie während der Adhäsion von RBE/CEACAM1-longY488:513F-Zellen auf Fibronectin und Laminin-1 war ganz ähnlich der, wie sie für RBE/CEACAM1-Zellen oben bereits beschrieben wurde (Abb. 33A), mit der Einschränkung, dass die Lamaellipodien am Saum der Zellausläufer etwas weniger deutlich ausgeprägt waren.

Zugabe des polyklonalen CEACAM1-spezifischen Kaninchen-Antiserums während der Adhäsion von RBE/CEACAM1-longY488:513F auf Fibronectin und Laminin-1 führte, wie bereits bei CEACAM1-long-Transfektanten beschrieben, zu einer Verlängerung der Zellfortsätze.

Wurden die Koimmunpräzipitationsversuche von adhätierenden RBE-Zellen mit RBE/CEACAM1-short und RBE/CEACAM1- Δ Cyto Zellen durchgeführt, so zeigte sich, dass die Kopräzipitation von Talin auch mit der CEACAM1-short-Isoform gelang (Abb. 33A). Die Interaktion von CEACAM1-short mit Talin war aber deutlich schwächer und nicht immer detektierbar.

Da die zytoplasmatischen Domänen von CEACAM1-short und CEACAM1-long im membranproximalen Teil identisch sind, könnten beide Isoformen über diese Aminosäuresequenz (YSRKTGGGS) mit Talin interagieren. Das Tyrosin453 dieser membranproximalen Sequenz

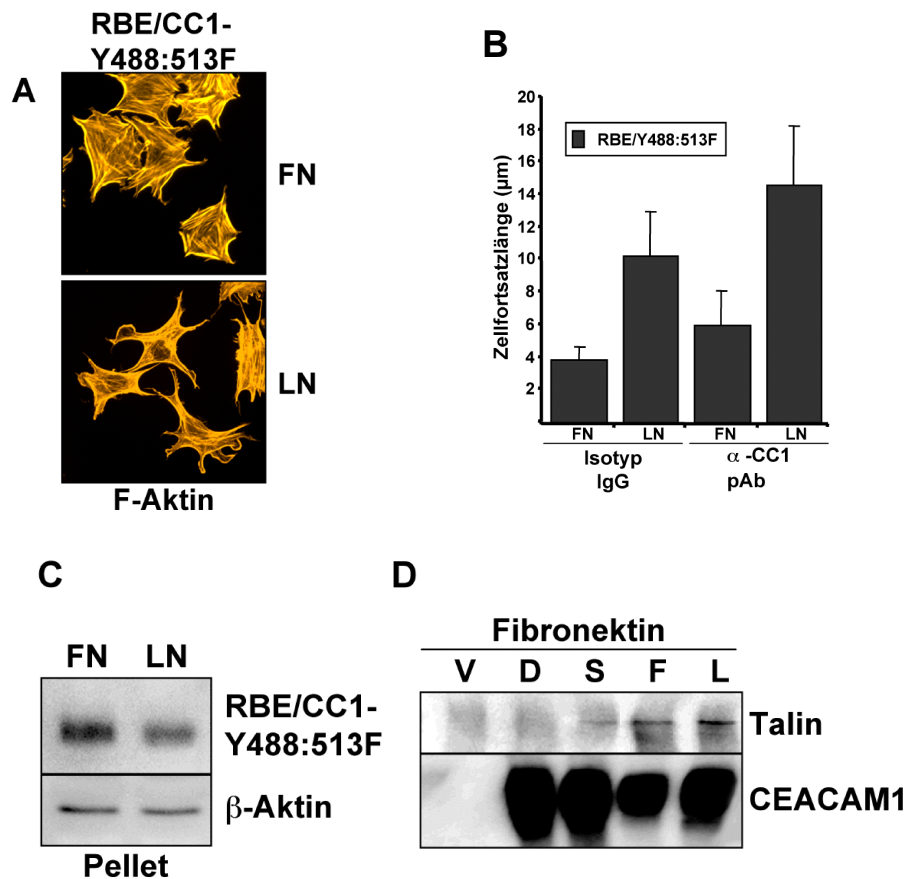


Abb. 33: Die Y488:513F-Mutagenese der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-long hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie, die Unlöslichkeit oder die Koimmunpräzipitation von Talin. Serum-starvierte RBE/CEACAM1-longY488:513F-Zellen (RBE/CC1-Y488:513F) wurden unter Serum-freien Bedingungen auf Fibronectin (FN)- oder Laminin-1 (LN)-Beschichtungen plattiert und **(A)** fixiert und mit Phalloidin-TRITC (F-Aktin) gefärbt. **(B)** Quantifizierung der CEACAM1-longY488:513F-Zellfortsatzlängen (µm) nach Zugabe von anti-CEACAM1 polyklonalen Kaninchen-IgGs (50 µg/ml, αCC1 pAb) bzw. Isotyp-Kontrollantikörpern (Isotyp-IgG) (Mittelwerte ± Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen). **(C)** Adhärierende Zellen wurden nach einer Stunde in 0,5% TX-100 solubilisiert und die unlösliche Fraktion (Pellet) mit mAb Be9.2 im Immunblot auf CEACAM1-longY488:513F-Gehalt hin untersucht (oben). Der Nachweis von β-Aktin in der unlöslichen Fraktion ist zusätzlich gezeigt (unten, Ladekontrolle). **(D)** Nachweis von Talin (oben) nach CEACAM1-Immünpräzipitation (polyklonale Kaninchen-IgGs) aus auf Fibronectin adhärierenden Zellen (60 min, RBE/Vektor (V), CEACAM1-ΔCyto (D), -CEACAM1-short (S), -CEACAM1-long-Y488:513F (F) und -CEACAM1-long (L) Zellysaten) im Immunblot. Nachweis von immunpräzipitierten CEACAM1 durch Reblot mit mAb Be9.2 (unten).

wurde noch nie als phosphoryliert beschrieben, und es ist auch nicht sicher, dass es aus der Lipidschicht herausreicht. Auch unterschiedliche Bindungsepitope am Talin oder eine indirekte, über zytoplasmatische oder membranständige Proteine vermittelte Interaktion mit Talin sind denkbar. Für letztere Möglichkeit spricht weiterhin, dass selbst in Immunpräzipitationen mit der ΔCyto-Isoform gelegentlich kopräzipitierendes Talin gefunden wurde (nicht gezeigt), während die RBE/Vektor-Kontrolle immer Talin-negativ war.