

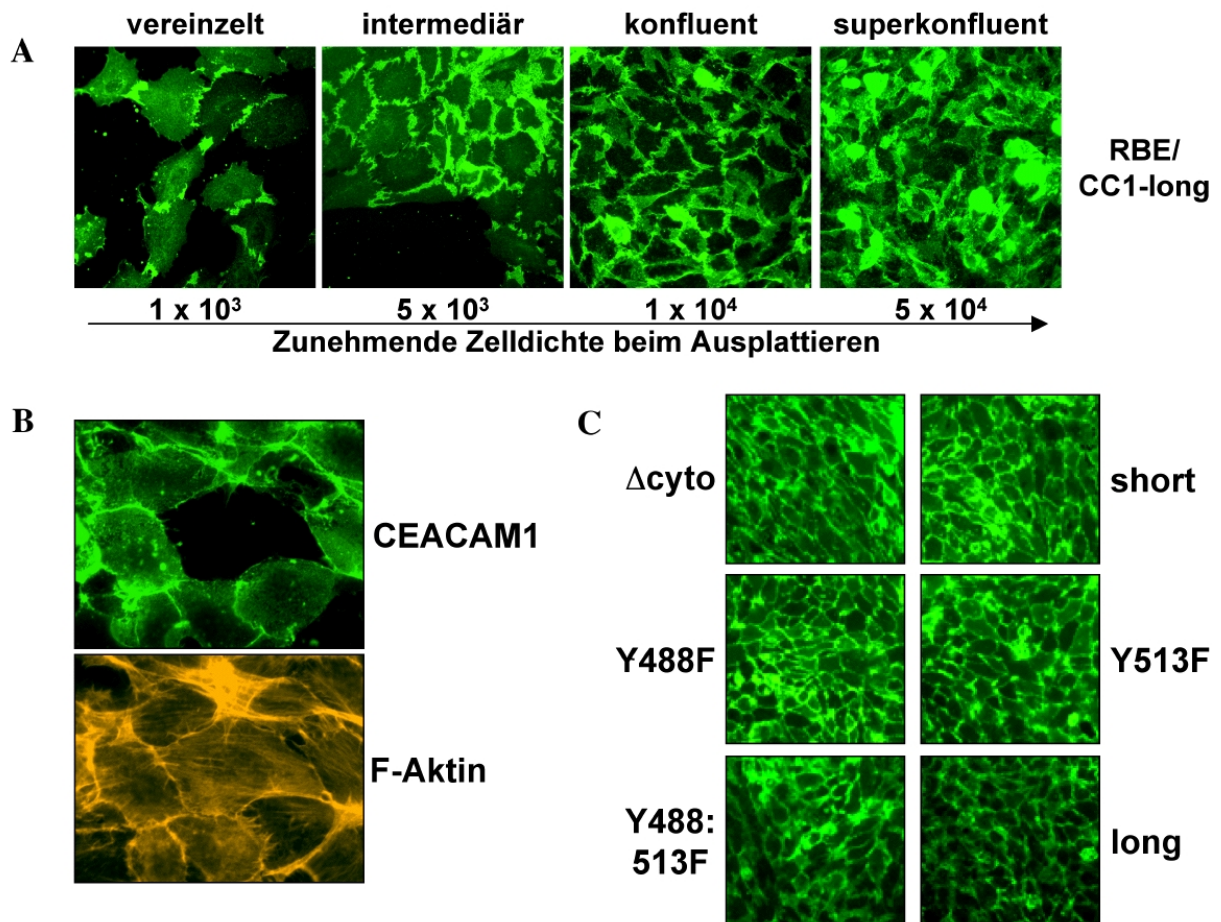
## **Lokalisation an Zell-Zell-Kontaktbereichen und Kolokalisation mit F-Aktin**

### **CEACAM1-long lokalisiert in konfluenten Zellen an Zellkontakten**

CEACAM1-long auf RBE-Zellen zeigt *in vitro*, in der Zellkultur, eine frühe Akkumulation in Zell-Zell-Kontaktbereichen (Abb. 34A). Bereits spärlich ausplattierte Zellen zeigten eine deutliche Anhäufung von CEACAM1-Molekülen in Kontaktbereichen von sich berührenden Zellausläufern. Mit zunehmender Konfluenz änderte sich diese Lokalisation nicht, sondern war eher verstärkt vorzufinden, wenn auch nie zu 100% ausgeprägt. Geringe Mengen CEACAM1 waren zusätzlich auch apikal auf der Plasmamembran zu finden. Erst im post-konfluenten Zustand der Zellen (superkonfluent) ist die Lokalisation von CEACAM1 eher diffus und nicht mehr nur auf Zellkontaktzonen beschränkt.

Die Lokalisation an Zellkontaktarealen konnte dagegen nicht beobachtet werden, wenn angrenzende Zellen (RBE/wt oder RBE/Vektor-Zellen) kein CEACAM1 auf der Oberfläche exprimierten (Abb. 34B). Dies deutet auf eine durch homophile Bindung verursachte, durch die extrazellulären Domänen vermittelte, Akkumulation an Zell-Zellgrenzen von Endothelzellen hin. Antikörper-Behandlung (mit dem die homophile Adhäsion blockierenden mAb Be9.2) für längere Zeiträume führte jedoch nicht zu einer veränderten Lokalisation, sondern zur Internalisierung des CEACAM1 (nicht gezeigt).

Ein Einfluss der zytoplasmatischen Domäne auf die CEACAM1-Lokalisierung konnte dagegen nicht beobachtet werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten Isoformen und Mutanten zeigten eine deutliche Anreicherung in Zellkontaktbereichen von konfluenten RBE-Zellen (Abb. 34C). Eine Verringerung der CEACAM1-Akkumulation an Zell-Zellgrenzen durch Translokation zur apikalen Membran nach Aktivierung der kleinen GTPase Rho (durch LPA) oder Inhibition der Rho-Effektorkinase ROCK oder durch Wortmanin-vermittelte Inhibition der PI3-Kinase wie sie in Kolon-Epithelzellen und polarisierten MDCK-Zellen gezeigt werden konnte (Fournes et al., 2003; Sundberg et al., 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit in Endothelzellen nicht gefunden (nicht gezeigt).

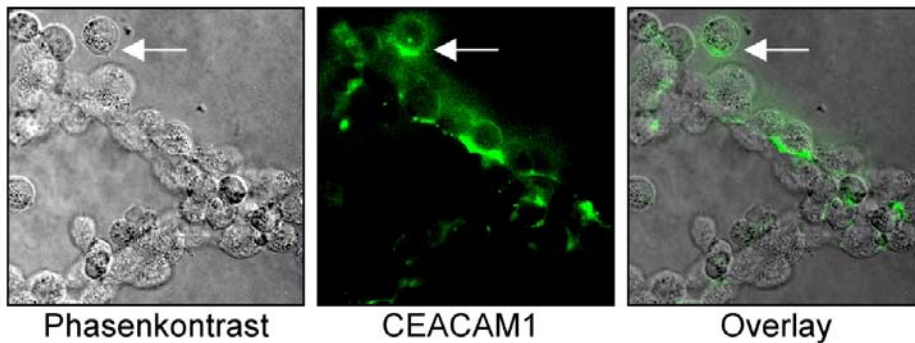


**Abb. 34: Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung der CEACAM1-Lokalisation in RBE-Zellen.** (A) RBE/CEACAM1-long-Zellen (CC1-long) wurden in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und für zwei Tage inkubiert. Nach Fixieren wurden die Zellen mit mAb Be9.2 und Cy2-gekoppelten sekundär-Antikörpern gefärbt. (B) RBE/CEACAM1-long- und RBE/Vektor-Zellen wurden im Verhältnis 50:1 gemischt, in hoher Zelldichte ausplattiert und 24 h kultiviert. Nach Fixieren wurden CEACAM1-Moleküle wie in (A) angefärbt und das Aktinzytoskelett (F-Aktin) mit Phalloidin-TRITC visualisiert. (C) Konfluente RBE/CEACAM1-long, -short, - $\Delta$ Cyto, -Y488F, -Y513F, -488:513F-Zellen wurden fixiert und wie unter (A) beschrieben gefärbt.

### Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten während der Netzwerk-Formation

Während der Selbstorganisation von Endothelzellen in ein netzartiges Gefüge auf Matrigel spielen nicht nur die Zell-Matrix-Adhäsion-vermittelnden Integrine eine bedeutende Rolle, sondern auch Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren wie das VE-Cadherin, N-Cadherin oder PECAM. Um zu untersuchen, ob CEACAM1 auch während dynamischer Vorgänge, wie der Netzwerk-Formation auf Matrigel an Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert, wurden Zellen während des Differenzierungsvorganges fixiert und für indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Tatsächlich konnte ein Großteil der CEACAM1-Moleküle an Kontaktstellen zwischen sich

berührenden Endothelzellen lokalisiert werden (Abb. 35). Nur vereinzelt zeigten Zellen, die sich bereits im Verbund befanden, eine zur Matrix hin gerichtete CEACAM1-Verteilung. Isolierte Zellen auf der Geloberfläche zeigten dagegen eine polare Verteilung von CEACAM1 auf RBE-Zellen, wie sie zuvor schon auf Matrigel- oder Laminin-1-Beschichtungen beobachtet wurde (siehe Pfeil). Während der Reorganisation der Zellen befindet sich CEACAM1 in den Zell-Zell-Kontaktstellen, wenn diese kabelartige Zellverbände bildeten.



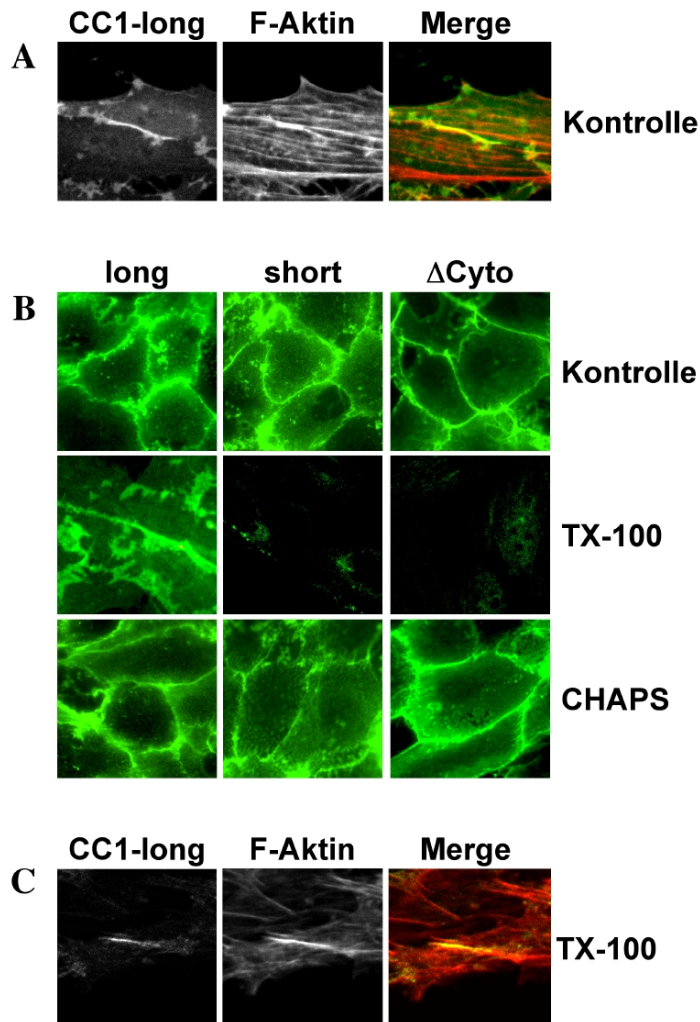
**Abb. 35: CEACAM1-Lokalisation während der *in vitro*-Angiogenese auf Matrigel.** 30.000 RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden als Einzelzellsuspension auf polymerisiertes Matrigel aufgebracht und für 6 h inkubiert. Während der Ausbildung netzartiger Strukturen wurden die Zellen fixiert und mit mAb Be9.2 und Cy2-gekoppelten sekundär-Antikörpern zur Darstellung der CEACAM1-Lokalisation angefärbt. Links: Phasenkontrastaufnahme; Mitte: Cy2-Fluoreszenz (CEACAM1); rechts: Überlagerung beider Bilder mit Hilfe der Photoshop™-Software. (Epifluoreszenz, Originalvergrößerung x 100). Der **Pfeil** deutet auf eine vereinzelt RBE/CEACAM1-long-Zelle, die eine starke Polarisation der CEACAM1-Oberflächenverteilung zeigt.

### Kolokalisation mit F-Aktin an Zell-Zell-Kontakten und Detergenz-Unlöslichkeit

In epithelialen Zelllinien ist CEACAM1 mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Die Bindung an Aktin kann direkt oder durch Aktin-bindende Proteine vermittelt werden und lässt sich durch Kolokalisation mit Aktinfilamenten an Zell-Zell-Kontakten darstellen. Eine Kolokalisation von Aktinfilamenten und CEACAM1-long in Zellkontaktbereichen konfluenter RBE-Zellen konnte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie auch in endothelialen Zellen dargestellt werden (Abb. 36A).

Eine Verankerung von Membranrezeptoren mit dem kortikalen Aktinzytoskelett kann durch Unlöslichkeit von Membranproteinen in TX-100 dargestellt werden. Um die mögliche Assoziation von CEACAM1 und Aktinfilamenten weiter zu charakterisieren, wurden konfluente RBE-Zellen kurzzeitig mit geringen Mengen Detergenz behandelt (0,1%), anschließend fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Diese Behandlung unfixierter RBE/CEACAM1-Zellen mit eiskaltem TX-100 führte zur vollständigen Extraktion der CEA-

CAM1-short-Isoform und auch der CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Mutante. Allein die CEACAM1-long-Isoform war gegenüber der TX-100-Solubilisierung teilweise unempfindlich, in der Immunfluoreszenz immer noch detektierbar (Abb. 36B) und kollokalisierte weiterhin mit F-Aktin (Abb. 36C).

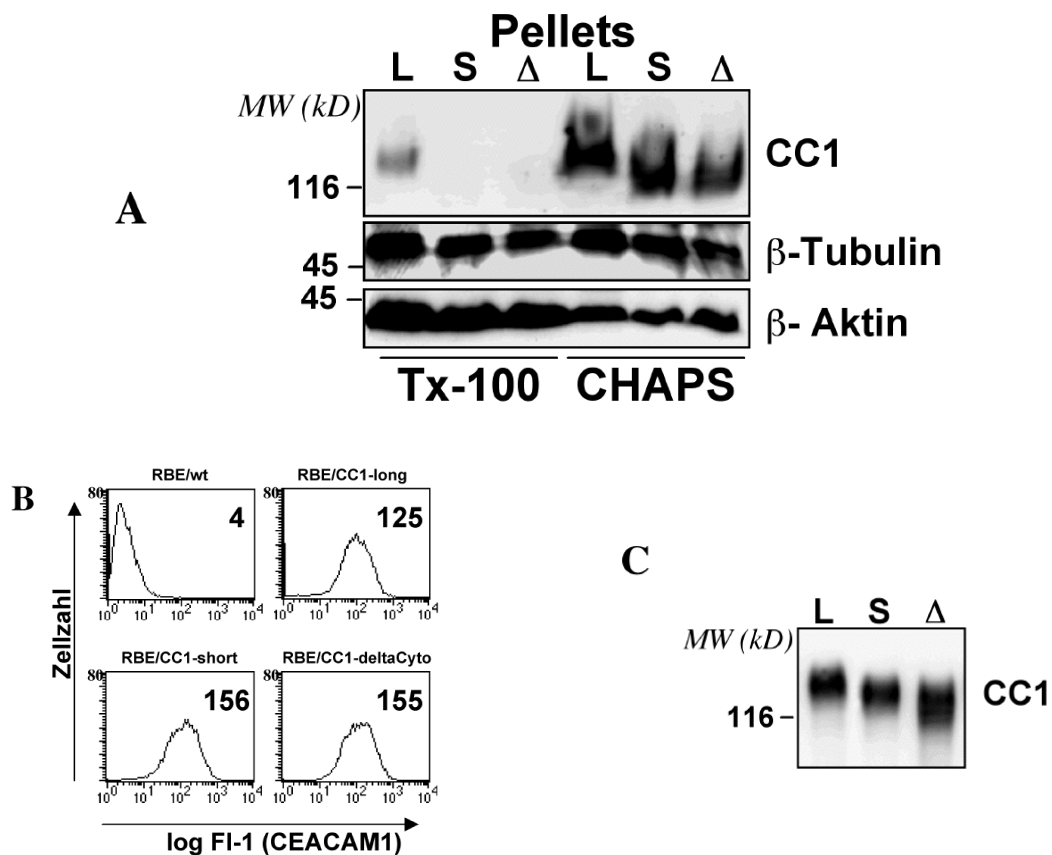


**Abb. 36: CEACAM1-long kollokalisiert mit Aktinfilamenten an Zell-Zell-Kontakten.** RBE/CEACAM1-long-, -short- oder - $\Delta$ Cyto-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, fixiert und mit mAb Be9.2 (B) oder mAb Be9.2 und Phalloidin-TRITC (A) und (C) gefärbt. (A) Indirekte Immunfluoreszenz von CEACAM1-long (CC1-long, linkes Bild) und Aktinfilamenten (Actin, mittleres Bild) aufgenommen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Pinhole = 20) und deren Überlagerung (Merge, rechts) zur Visualisierung der Kollokalisierung an Zell-Zell-Kontakten. (B) Indirekte Immunfluoreszenz von CEACAM1-long, -short und - $\Delta$ Cyto in konfluenten, unbehandelten (Kontrolle) oder für 1 min mit 0,1% TX-100 (Mitte, TX100) oder 0,1% CHAPS-behandelten (CHAPS, unten) Zellen. (C) Kollokalisierung von CEACAM1-long und Aktinfilamenten wie in (A) nach 1 min 0,1% TX-100-Behandlung.

Nicht extrahierbare CEACAM1-long-Moleküle lokalisierten weiterhin an den Zell-Zell-Kontakten, wo sie, wie zuvor, mit Aktinfilamenten kollokalisieren. Da die CEACAM1-short- und - $\Delta$ Cyto-Isoformen beide nahezu vollständig extrahierbar waren, kann die verbleibende CEACAM1-long-Immunreaktivität nicht allein auf eine unzureichende Solubilisierung der Zellkontaktstellen aufgrund von räumlicher Hinderung zurückzuführen sein. Vielmehr beschreibt diese TX-100-Unlöslichkeit eine CEACAM1-long spezifische Eigenschaft, die eine starke Anbindung an das Aktinzytoskelett widerspiegeln könnte. Eine kurzzeitige Behandlung unfixierter Zellen mit dem zwitter-ionischen Detergenz CHAPS ergab dagegen ein völlig anderes Ergebnis: Hier zeigten sich alle drei CEACAM1-Isoformen als partiell

CHAPS-resistent und wurden nur zu geringfügigen Mengen aus der Membran extrahiert (Abb. 36B).

Aufgrund dieser mikroskopischen Befunde wurde die Unlöslichkeit bzw. die Solubilisierung von CEACAM1-Isoformen durch TX-100 und CHAPS im Western-Blot untersucht und quantifiziert. Auch hier zeigte sich, dass TX-100 (1% v/v) die CEACAM1-Isoformen short und  $\Delta$ Cyto sehr effektiv zu solubilisieren vermag, wogegen ein geringer, aber signifikanter Anteil von 5-10% an CEACAM1-long-Molekülen immer unlöslich war (siehe unlösliches Material Abb. 37A, TX-100).



**Abb. 37: Expression und Unlöslichkeit von CEACAM1-long, -short und - $\Delta$ Cyto in TX-100 oder CHAPS.** (A) Konfluente RBE/CEACAM1-long (L)-, -short (S)- oder - $\Delta$ Cyto ( $\Delta$ )-Zellen wurden in 1% TX-100/HBSM (TX-100) oder 1% CHAPS/HBSM geremmt und für 1 h solubilisiert. Nach Zentrifugation bei 17.000 x g wurde das unlösliche Material gewaschen, aufgekocht und im Immunblot auf CEACAM1 (CC1)-,  $\beta$ -Tubulin- oder  $\beta$ -Aktin-Gehalt hin untersucht. (B) FACS-Analyse der CEACAM1-Oberflächenexpression auf RBE/wt-, RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-, -short (CC1-short)- und - $\Delta$ Cyto (CC1- $\Delta$ Cyto)-Zellen mit mAb Be9.2 und FITC-gekoppelten sekundär-Antikörpern. Die Zahlen oben rechts geben die relativen Durchschnittswerte (MFI, *Mean Fluorescent Intensity*) der CEACAM1-Expression an. (C) Western-Blot-Analyse zur CEACAM1-Expression in RBE-Zellen. Konfluente RBE/CEACAM1-long (L)-, CEACAM1-short (S)- und CEACAM1- $\Delta$ Cyto ( $\Delta$ ) Zellen wurden mit 1% TX-100 + 0,2% SDS solubilisiert und auf gleiche CEACAM1 (CC1)-Expressionsraten hin untersucht.

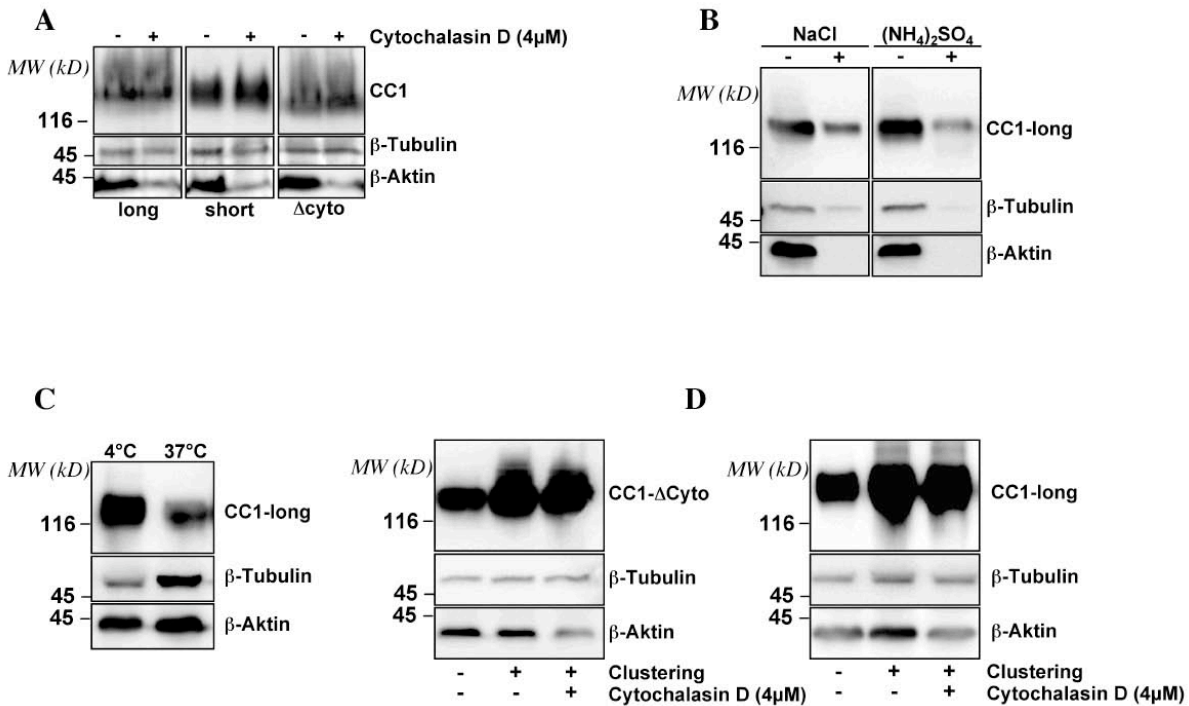
In CHAPS waren alle drei CEACAM1-Isoformen zu gleichen Anteilen (20-30%) unlöslich, was auf eine vom TX-100 mechanistisch zu unterscheidende Unlöslichkeit hinweist. Zusätzlich zeigte sich eine Abnahme der Menge unlöslichen F-Aktins, wenn CHAPS anstelle von TX-100 zur Solubilisation verwendet wurde, was als ein erstes Indiz hinsichtlich einer Zytoskelett-unabhängigen Unlöslichkeit von CEACAM1 in CHAPS-Puffer gilt. Abb. 37B zeigt, dass die untersuchten Zelllinien zu gleichen Mengen CEACAM1-Moleküle auf der Oberfläche und auch im Allgemeinen (Abb. 37C) exprimieren.

Eine Erhöhung der CHAPS-Konzentration auf 4% (w/v) hatte keine steigernde Wirkung auf die Solubilisation von CEACAM1 (siehe Abb. 47). Die kritische micellare Konzentration (CMC), deren Erreichen eine Voraussetzung für erfolgreiches Solubilisieren von Membranproteinen ist, liegt für CHAPS bei 0,25% (w/v oder 4 mM) in Wasser und wurde in jedem Fall überschritten. Auch Veränderungen des Protein-Seife-Verhältnisses (SPV) im Bereich von ca. 0,5 - ca. 4 hatten keinen Einfluss auf die Löslichkeit der CEACAM-Isoformen. Um ferner zu testen, ob die Zellkontakt-Lokalisation von CEACAM1-Molekülen eine Ursache für die CHAPS-Unlöslichkeit ist, wurden die Zellen trypsinisiert, in Suspension gehalten und anschließend CHAPS-solubilisiert. Aber auch unter diesen Bedingungen zeigten sich alle untersuchten CEACAM1-Isoformen partiell CHAPS-unlöslich (nicht gezeigt).

### **Aktinzytoskelett-unabhängige CHAPS-Unlöslichkeit**

Im Weiteren wurde die CHAPS-Unlöslichkeit der CEACAM1-Isoformen hinsichtlich einer durch zytoskelettale Verankerung hervorgerufenen möglichen Pelletierbarkeit näher untersucht. Dazu wurden konfluente RBE-Zellen mit dem membranpermeablen Pilzgift Cytochalasin-D behandelt, wodurch es durch die Bindung von Cytochalasin-D an "Plus-Enden" von Aktinfilamenten zu einer gestörten Polymerisation und einer Nettoabnahme an Aktinfilamenten kommt. Durch die verwendete, hohe Konzentration rundeten sich die Zellen während der Inkubationszeit ab und es kam zu einer teilweisen Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte, während die Zell-Matrix-Adhäsion gerade noch erfolgen konnte. Wie in Abb. 38A gezeigt, bewirkte die Depolymerisation von Aktinfilamenten unter Einfluss von Cytochalasin-D eine Abnahme des in RBE-Zellen pelletierbaren F-Aktins in der CHAPS-unlöslichen Zellfraktion. Dies führte jedoch in keiner untersuchten Zelllinie zu einer Reduktion der Unlöslichkeit der jeweiligen CEACAM1-Isoform.

Um eine mögliche, Zytoskelett-bedingte CHAPS-Unlöslichkeit weiter auszuschließen, wurde die Solubilisierung der RBE/CEACAM1-Transfektanten unter hohen Salzkonzentrationen



**Abb. 38: Modulation der CEACAM1-CHAPS-Unlöslichkeit.** Unlöslichkeit von CEACAM1, (CC1), β-Tubulin oder β-Aktin im Immunblot nach CHAPS-Solubilisierung und Pelletieren bei 17.000 x g. **(A)** Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts: RBE-CEACAM1-long -short und -ΔCyto wurden mit (+) oder ohne (-) 4 μM Cytochalasin-D für 30 min vorinkubiert. **(B)** Abhängigkeit der Unlöslichkeit von RBE/CEACAM1-long (CC1-long) von hohen Ionenstärken: Zellen wurden ohne (-) oder mit (+) 1 M NaCl oder 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in CHAPS-Puffer solubilisiert **(C)** Unlöslichkeit von CEACAM1-long (CC1-long) nach CHAPS-vermittelter Solubilisierung auf Eis (4° C) oder 37 °C **(D)** Clustering-bedingte Effekte: RBE/CEACAM1-long- oder -ΔCyto-Zellen wurden 20 min bei 4°C ohne (-) oder mit (+) mAb Be9.2 vorinkubiert, markierte CEACAM1-Moleküle mit sekundär-Antikörpern für 20 min quervernetzt (Clustering) und mit (+) oder ohne (-) Cytochalasin-D (4 μM) behandelt.

durchgeführt. Hohe Salzkonzentrationen oder generell hohe Ionenstärken beeinflussen Protein-Protein-Interaktionen, indem sie Wechselwirkungen zwischen polaren und geladenen Aminosäuren beeinträchtigen oder zerstören. Nur Wechselwirkungen zwischen unpolaren, hydrophoben Aminosäureresten werden hierdurch nicht gestört, oder werden sogar verstärkt. Die verwendeten Konzentrationen an Natriumchlorid (1 M) und des anti-chaotropen Salzes Ammoniumsulfat (250 mM) waren ausreichend, um in MDCK-Zellen das Zytoskelett vollständig zu zerstören (Fey et al., 1984). Auf RBE-Zellen angewendet, führten beide Salzkonzentrationen zu einer starken Reduktion des unlöslichen Materials nach Solubilisierung und Zentrifugation (17.000 x g), was primär auf die Zerstörung der Zellkerne zurückzuführen ist. Unter beiden Versuchsbedingungen konnten Aktinfilamente in der CHAPS-unlöslichen Fraktion nicht mehr nachgewiesen werden (Immunblot, β-Aktin) und auch β-Tubulin war

nach nur noch in Spuren nachzuweisen. Dagegen war die Menge an unlöslichem CEACAM1-long nur wenig reduziert und weiterhin deutlich in der Pelletfraktion detektierbar (Abb. 38B). Zusammengefasst deuten die Befunde der Cytochalasin-D-Behandlung sowie die Solubilisierungsexperimente unter hohen Ionenkonzentrationen darauf hin, dass die Unlöslichkeit von CEACAM1 in CHAPS-Puffer nicht allein auf eine Interaktion mit dem Aktinzytoskelett zurückzuführen ist. Vielmehr implizieren sie einen weiteren Mechanismus, der nicht auf hydrophilen Protein-Protein-Interaktionen beruht.

### **Erhöhte CHAPS-Solubilisierbarkeit durch Temperaturerhöhung**

Eine Erhöhung der Temperatur im Allgemeinen oder eine Erhöhung der Solubilisierungstemperatur im Speziellen bewirkt eine erhöhte laterale Mobilität der Fettsäureketten in der Lipiddoppelmembran. Damit schwindet die Tendenz horizontaler unpolarer Wechselwirkungen zwischen langkettigen Fettsäureresten, besonders zwischen langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, die Bereiche hoher Ordnung und dichter Packung in der Membran darstellen. Diese Abnahme und die damit verbundene lockere Packung ungesättigter Fettsäuren kann die Ausbeute an Detergenz-unlöslichen Membranmaterial reduzieren (Schroeder et al., 1994), da das Detergenz unter diesen Bedingungen nun auch in diese Bereiche eindringen kann.

Wurde die Solubilisierung der RBE-Zellmembranen mit CHAPS bei 37 °C durchgeführt, so kam es zu einer deutlichen Reduktion der im Immunblot detektierbaren unlöslichen CEACAM1-long-Menge (Abb. 38C). Eine Reduktion von pelletierbaren Aktinfilamenten wurde durch die Temperaturerhöhung jedoch nicht beobachtet, was erneut auf eine Aktin-unabhängige CEACAM1-Unlöslichkeit hinweist. Bezüglich der pelletierten, im Western-Blot detektierbaren,  $\beta$ -Tubulinmenge ergab sich sogar eine geringe Zunahme nach Temperaturerhöhung, was auf eine unkontrolliert ablaufende Polymerisation der Mikrotubuli im Solubilisierungspuffer hinweist.

Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die CHAPS-Unlöslichkeit von CEACAM1 auf das unpolare Membranmikromilieu zurückzuführen ist, wobei Interaktionen zwischen Transmembranbereich und Lipiden, aber auch Wechselwirkungen mit Transmembrandomänen anderer Proteine, möglich erscheinen. Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett tragen dagegen nur geringfügig zur CHAPS-Unlöslichkeit, und im Speziellen zur Unlöslichkeit von CEACAM1-long, bei.



## **Clustering von CEACAM1-Molekülen verstärkt die CHAPS-Unlöslichkeit**

Antikörper-induziertes Quervernetzen (Supercrosslinken) von Oberflächenantigenen bewirkt eine Akkumulation der vernetzten Membranproteine auf einem kleinen Areal der Plasmamembran. Sind die membranständigen Proteine von Cholesterin oder von Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren umgeben, so bewirkt das Clustern der Proteine auch ein Zusammenfließen der Lipide und es kommt zur Ausbildung einer großen Membranmikrodomäne, die sich physikalisch von der Umgebung unterscheiden kann.

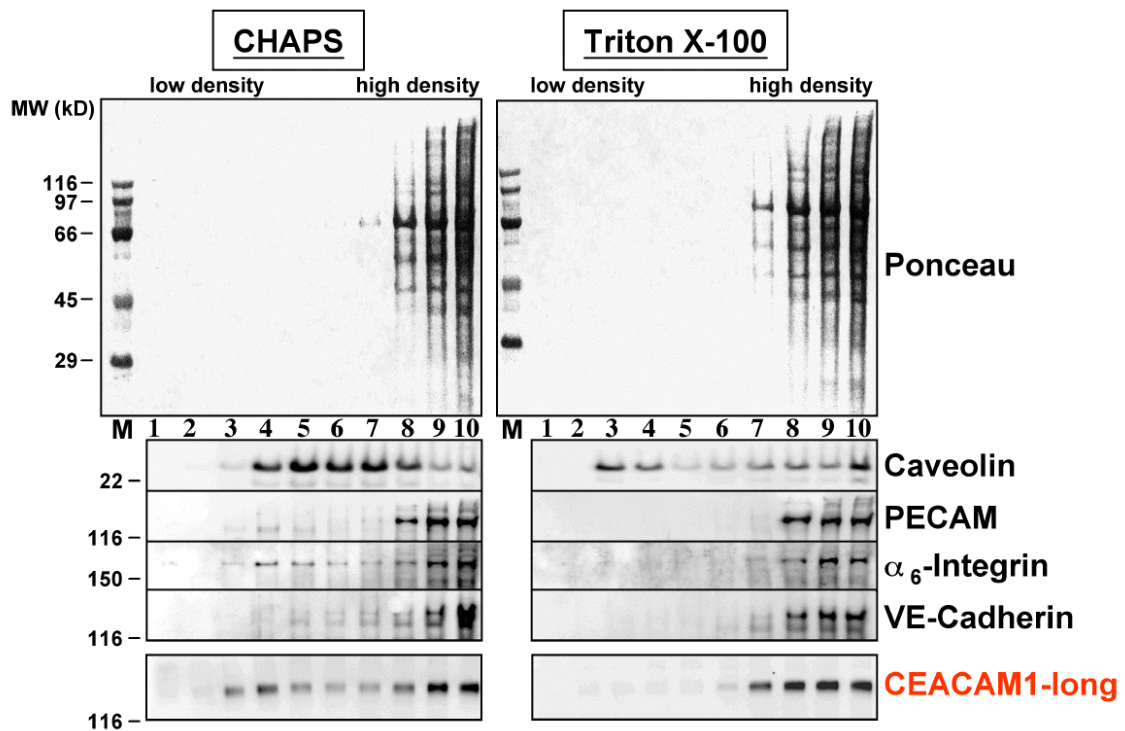
Dies kann zu einer Erhöhung der Konzentration dieser Komplexe in der Detergenz-unlöslichen Pelletfraktion führen und somit die Löslichkeit des quervernetzten Oberflächenproteins negativ beeinflussen. Wurde CEACAM1-long oder CEACAM1- $\Delta$ Cyto auf der Oberfläche von RBE-Zellen mit mAk Be9.2 und sekundären Antikörpern quervernetzt, so führte dies zu einer rasanten Clusterbildung von CEACAM1-Molekülen, die in der Immunfluoreszenz leicht zu visualisieren war (nicht gezeigt). Dieses Antikörper-induzierte Clustering bewirkte eine weitere Verschlechterung der CEACAM1-long- und auch der CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Löslichkeit in CHAPS-Puffer (Abb. 38D), hatte aber keinerlei Auswirkungen auf die Aktin- oder Tubulin-Löslichkeit. Die erschwerte Solubilisation von CEACAM1-Molekülen nach Quervernetzen konnte auch beobachtet werden, wenn zuvor das Aktinzytoskelett mit Cytochalasin-D zerstört wurde. Da die  $\Delta$ Cyto-Mutante ohnehin nicht mit dem Zytoskelett interagieren kann, sind die beschriebenen Resultate allein auf Interaktionen innerhalb der Membran oder auf andere unpolare, nicht durch hohe Ionenstärken beeinflussbare Wechselwirkungen zurückzuführen.

## **CEACAM1 assoziiert mit Membranmikrodomänen**

### **CEACAM1-Fraktionierung nach isopyknischer Gradientenzentrifugation**

Um eine mögliche Assoziation von CEACAM1-Isoformen mit Membranmikrodomänen zu überprüfen, wurde die Verteilung von CEACAM1-Molekülen nach isopyknischer Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation untersucht. Membranmikrodomänen-assoziierte Proteine, d.h., Proteine, die eine hohe Affinität zu Cholesterin, Sphingolipiden oder anderen Membrankomponenten mit erhöhter Tendenz zur Ausbildung geordneter Membrandomänen besitzen, haben aufgrund des sie umgebenden, schwer zu solubilisierenden Lipidanteils, eine

geringere Dichte als vollständig solubilisiert vorliegende Membranproteine. Durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation können Membranmikrodomänen im Bereich geringer Dichte des Gradienten angereichert werden, während vollständig solubilisiertes Material und zytoplasmatische Proteine in den Fraktionen mit hoher Dichte verbleiben. Verschiedene Detergenzien zeigen dabei unterschiedliche Effektivitäten, Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen anzureichern; TX-100 und CHAPS sind hierfür aber sehr gut geeignet (Schuck et al., 2003).

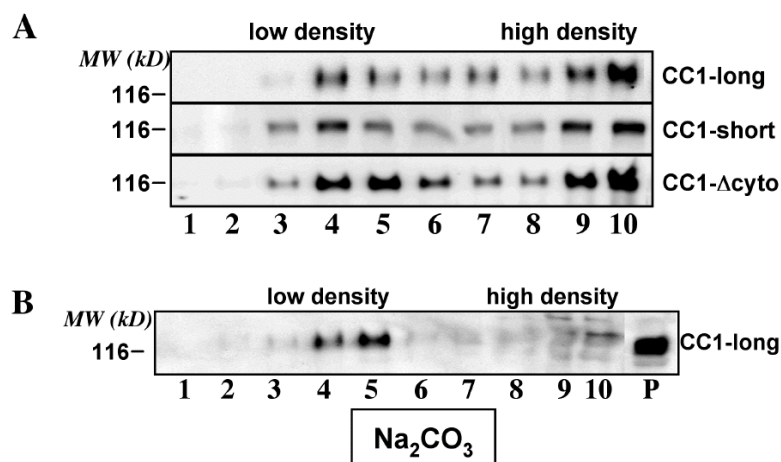


**Abb. 39: Rekrutierung und Darstellung von CEACAM1 in Membranmikrodomänen geringer Dichte.** RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden mit CHAPS- oder TX100-Puffer solubilisiert und die erhaltenen Lysate mit Hilfe isopyknischer, diskontinuierlicher Zuckergradientenzentrifugation aufgetrennt. Zehn 500 µl Fraktionen des Gradienten wurden von oben (niedrige Dichte) bis unten (hohe Dichte) gesammelt und im Immunblot auf ihren Proteingehalt (Ponceau S) und die Verteilung von Caveolin, PECAM-1,  $\alpha_6$ -Integrinuntereinheit, VE-Cadherin und CEACAM1-long hin untersucht.

Dichtegradienten von TX-100 und CHAPS-solubilierten RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden nach 16 h Ultrazentrifugation von oben her fraktioniert und im Immunblot auf die CEACAM1-Verteilung hin analysiert (Abb. 39). Nach TX-100-Solubilisation von RBE-Zellmembranen zeigte sich, dass in den Fraktionen geringer Dichte (1-5), die die Membranmikrodomänen enthalten, kein CEACAM1 detektiert werden konnte. Die Mehrheit der CEACAM1-Moleküle war in Fraktionen hoher Dichte zu finden und nur eine geringe Menge war unlöslich und wurde in der Pelletfraktion nachgewiesen (nicht gezeigt). Eine dem CEACAM1-ähnliche

Verteilung im Dichtegradienten unter TX-100-Bedingungen zeigten die Adhäsionsrezeptoren VE-Cadherin, PECAM-1 und die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit. Nur das in speziellen Membranmikrodomänen vorkommende, Caveolae-assoziierte Protein Caveolin zeigte unter TX-100-Bedingungen eine deutliche Anreicherung in Fraktionen geringer Dichte und diente als Markerprotein für die Anreicherung von Membranmikrodomänen.

Wurde aber CHAPS anstelle von TX-100 zur Solubilisation von RBE-Zellen verwendet, so zeigte sich sehr deutlich, dass sich CEACAM1-Moleküle in Fraktionen geringer Dichte anreichern lassen. 25-35% des CEACAM1 konnte in den Fraktionen 1-5 nachgewiesen werden (mit einem Maximum in Fraktion 3 und 4, an der 5% / 35% Zuckergrenzfläche). Dies entspricht der Menge CEACAM1-long, die zuvor CHAPS-unlöslich im 17.000 x g Pellet nachgewiesen werden konnte. VE-Cadherin und PECAM-1 zeigten unter den CHAPS-Bedingungen, wie schon zuvor unter TX100-Bedingungen, keine Anreicherung in den Fraktionen geringer Dichte. Die alpha6-Integrinuntereinheit zeigte dagegen in Übereinstimmung mit der Literatur (Baron et al., 2003; Gagnoux-Palacios et al., 2003) eine deutliche Anreicherung in den Fraktionen niedriger Dichte (2-5). Auch der Membranmikrodomänen-Marker Caveolin konnte unter CHAPS-Bedingungen in Fraktionen geringer Dichte detektiert werden. Caveolin war deutlich anders verteilt, als CEACAM1 oder alpha6-Integrin, was zeigt, dass die CHAPS-resistenten Membranmikrodomänen heterogener Natur sind.



**Abb. 40: Die Verteilung von CEACAM1-long, -short und -ΔCyto nach Dichtegradientenzentrifugation. (A)** RBE/CEACAM1-long (CC1-long), -short (CC1-short) und -ΔCyto (CC1-ΔCyto) Zellen wurden mit CHAPS-Puffer lysiert und nach Fraktionierung von Dichtegradienten auf die CEACAM1-Verteilung hin untersucht. **(B)** Darstellung der Mikrodomänen-Assoziation von CEACAM1-long-Molekülen im Dichtegradienten durch Detergenz-freie (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, siehe Methodenteil) Membranmikrodomänen-Gewinnung.

Auch zeigte sich eine verschiedenartige Caveolin-Verteilung unter CHAPS-Bedingungen im Vergleich zu TX-100-Bedingungen. Die benutzten Detergenzien bewirkten also eine unterschiedliche Formation von Caveolin-positiven Komplexen, was auf Unterschiede in Größe und / oder Zusammensetzung der Caveolin-enthaltenen Detergenz-unlöslichen Partikel hinweist.

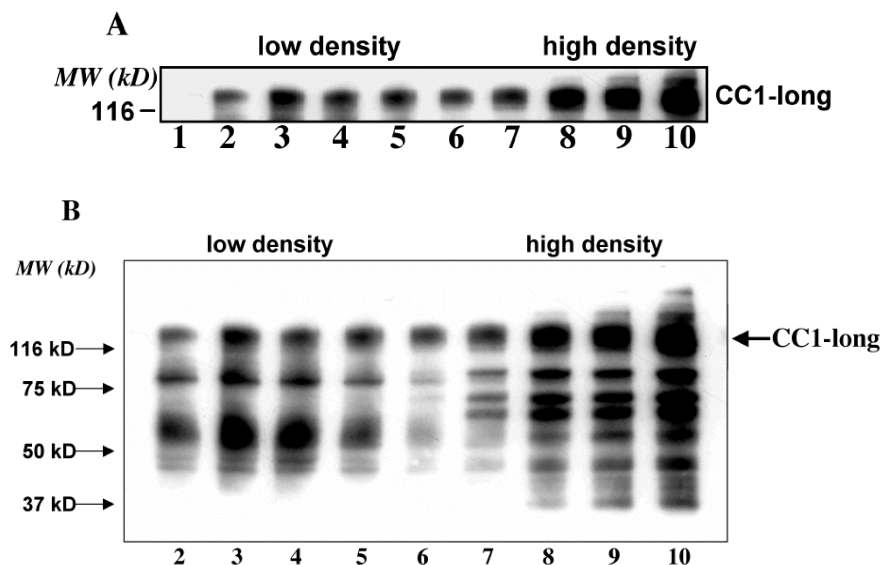
Die Membranmikrodomänen-Assoziation wurde im Folgenden auch für die CEACAM1-Isoformen short und  $\Delta$ Cyto gefunden und bestätigt (Abb. 40A). Dabei zeigte sich eine sehr ähnliche Verteilung aller drei Isoformen nach Dichtegradientenzentrifugation, was auf eine Mikrodomänen-Assoziation, unabhängig von der Länge oder des Vorhandenseins der zytoplasmatischen Domäne, hinweist.

Um die Assoziation von CEACAM1 mit Membranmikrodomänen zu verifizieren, wurde außerdem eine Detergenz-freie Methode nach Song et al. (Song et al., 1996) angewendet. Hierbei werden Zellen in alkalischem Karbonat-Puffer abgekratzt und die Membranen anschließend unter Ultraschallbehandlung fragmentiert. Dabei bilden sich Vesikel verschiedener Lipidzusammensetzungen, z.B. auch aus Cholesterin-reichen Membranmikrodomänen, die die Umgebung von Membranproteinen zum Zeitpunkt der Ultraschall-abhängigen Separation widerspiegeln. Wenn Membranmikrodomänen und die mit ihnen assoziiert vorliegenden Membranproteine nach dieser Methode gewonnen werden und im Dichtegradienten zu Fraktionen geringer Dichte aufschwimmen, so gilt dies als ein Indiz für eine *in vivo*-Membranmikrodomänen-Assoziation.

Angewendet auf RBE/CEACAM1-long-Zellen zeigte sich, dass nach Abschaben, Ultraschallbehandlung und Dichtegradientenzentrifugation tatsächlich CEACAM1-long-Moleküle in Fraktionen niedriger Dichte nachweisbar waren (Immunblot, Abb. 40B). Dagegen war in den Fraktionen hoher Dichte kein CEACAM1 detektierbar, dafür aber verstärkt im unlöslichen Pellet nach Dichtegradientenzentrifugation. Dies lässt darauf schließen, dass es bei dieser Methode tatsächlich nicht zur Solubilisation einzelner CEACAM1-Moleküle kommt, sondern nur zur Ausbildung von CEACAM1-haltigen Vesikeln geringer und hoher Dichte, die sich aufgrund ihrer Zusammensetzung in der Dichtegradientenzentrifugation trennen lassen. Diese Methode unterstützt damit die Befunde aus den Experimenten mit CHAPS-Solubilisaten.

### Oberflächen-Lokalisation von Membranmikrodomänen-assoziiertem CEACAM1

Da Membranmikrodomänen an einer Vielzahl von Zellfunktionen wie z.B. Endozytose, Exozytose, Cholesterin- und Vesikeltransport, apikale-Sortierung sowie bei Signalprozessen beteiligt sein können, wurde nun überprüft, ob das Mikrodomänen-assoziierte CEACAM1 auf der Zelloberfläche oder nur in intrazellulären Vesikeln vorliegt. Zu diesem Zweck wurden Oberflächenstrukturen von RBE-Zellen mit einem für primäre Aminogruppen spezifischen Biotinylierungsreagenz biotinyliert. Nach CHAPS-Solubilisation der Zellen und Dichtegradientenzentrifugation wurde fraktioniert und CEACAM1 aus den einzelnen Fraktionen mit Hilfe des mAb Be9.2 immunpräzipitiert. Immunpräzipitiertes CEACAM1 wurde anschließend im Western-Blot mit Streptavidin-HRP auf Biotinylierung hin untersucht. Wie in Abb. 41A deutlich zu erkennen ist, liegt CEACAM1 in den Fraktionen geringer wie auch in Fraktionen hoher Dichte biotinyliert vor. D.h., sowohl Mikrodomänen-assoziiertes CEACAM1 als auch durch CHAPS-solubilisierbares CEACAM1 sind zeitgleich auf der Oberfläche von RBE-Zellen lokalisiert und bilden dort zwei unterschiedliche, biochemisch voneinander zu trennende Populationen, die sich in ihrem Lipid-Umfeld unterscheiden.



**Abb. 41: Membranmikrodomänen-assoziiertes CEACAM1 ist auf der Oberfläche von RBE-Zellen lokalisiert.** (A) RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-Zellen wurden im konfluenten Zustand mit einem Aminogruppen-reaktiven Biotinylierungsreagenz für 20 min biotinyliert, anschließend mit CHAPS solubilisiert und durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. CEACAM1-Moleküle wurden nach Zugabe von 0,2% SDS mit dem mAb Be9.2 immunpräzipitiert und anschließend, nach Western-Blot, mittels Streptavidin-HRP auf Biotin-Inkorporation hin untersucht. (B) Darstellung von biotinylierten Proteinen verschiedener Molekulargewichte, die aus einzelnen Fraktionen wie unter (A) mit CEACAM1-Molekülen kopräzipitieren.

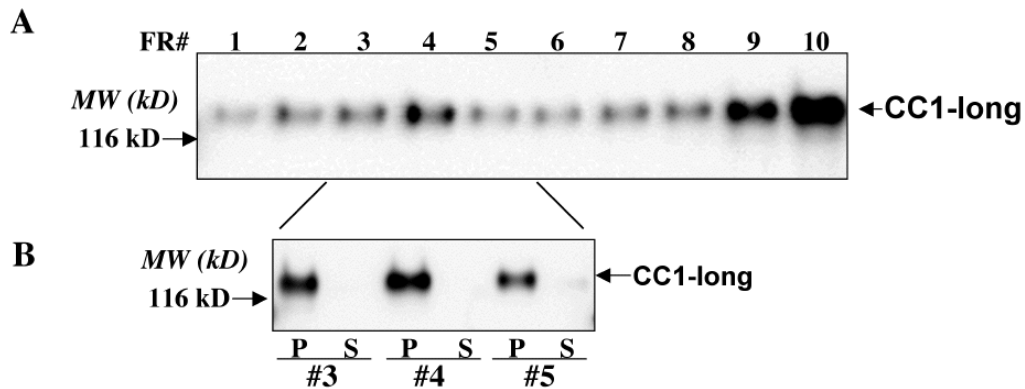
Die Analyse der Western-Blots hinsichtlich mit CEACAM1 kopräzipitierender, biotinylierter Proteine ergab ebenfalls außerordentliche Unterschiede (Abb. 41B). So wurden aus den Fraktionen hoher Dichte biotinylierte Proteinbanden mit Molekulargewichten von 150 kD, 80 kD, 70 kD und 68 kD detektiert, während CEACAM1 aus Fraktionen niedriger Dichte signifikante Mengen biotinylierter Proteine mit Molekulargewichten von 78 kD und 60 kD kopräzipitierte. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die zwei auf RBE-Zellen darstellbaren CEACAM1-Populationen unterscheiden und sich nicht nur in der Lipidkomposition sondern auch in der Proteinzusammensetzung voneinander abgrenzen lassen. Die Identität der kopräzipitierenden Proteine ist zur Zeit leider nicht bekannt, ist aber Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Zu keinem Zeitpunkt und aus keiner Fraktion konnte in dem mit CEACAM1 kopräzipitierenden Material Caveolin im Immunblot detektiert werden, was erneut auf die Unterschiedlichkeit von Caveolin-positiven und CEACAM1-enthaltenden Membranmikrodomänen hinweist (nicht gezeigt).

### **CEACAM1 geringer Dichte assoziiert mit pelletierbarem, partikulärem Material**

Dass es sich bei dem CEACAM1-positiven Material, das zu Fraktionen geringer Dichte aufschwimmt, tatsächlich um CHAPS-resistentes partikuläres Membranmaterial handelt, konnte in folgenden Experimenten gezeigt werden. Dazu wurden die Fraktionen 3, 4 und 5, denen zuvor eine Teilprobe zur späteren Analyse entnommen wurde (Abb. 42A), mit HEPES-Puffer 1:10 verdünnt und erneut in der Ultrazentrifuge für 1 Stunde bei 120.000 x g zentrifugiert. Durch den Verdünnungsfaktor sollte sich in allen drei Fraktionen eine mit wässriger Lösung vergleichbare Dichte ergeben, was zum Pelletieren des zuvor schwebenden Materials führen sollte. Tatsächlich konnte CEACAM1 in anschließenden Western-Blots ausschließlich in den Zentrifugationspellets, nicht aber in den Überständen (auch nicht nach Immunpräzipitation) detektiert werden (Abb. 42B). CHAPS-resistentes CEACAM1 in Fraktionen niedriger Dichte hat somit partikulären Charakter, das durch Vesikelbildung aus Mikrodomänen nach Detergenz-vermittelter Solubilisation erklärt werden kann. Vesikelbildung nach Solubilisation von Zellmembranen mit TX-100 oder Lubrol wurde in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von (Röper et al., 2000) gezeigt. In dieser Arbeit wurde ferner beschrieben, dass sich je nach verwendeten Detergenz Vesikel unterschiedlicher Größe sowie multilamellare Vesikel bilden können, die dass Aufschwimmverhalten von Membranproteinen unterschiedlich be-

einflussen können. Das Aufschwimmen von CEACAM1 in der Dichtegradientenzentrifugation kann jedoch nicht auf einen simplen Einschluss von solubilisierten CEACAM1-Molekülen in Vesikeln geringer Dichte zurückgeführt werden, da dies dann auch unter TX-100-Bedingungen hätte beobachtet werden müssen.



**Abb. 42: CEACAM1-positives Material geringer Dichte hat partikulären Charakter.** (A) Nachweis von CEACAM1-long (CC1-long) im Immunblot in Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation nach CHAPS-Solubilisierung. (B) Immunblot zur Darstellung der Verteilung von pelletierten (P) oder löslichen (S) CEACAM1-long (CC1-long) nach 1:10 Verdünnung der Dichtegradienten-Fraktionen 3, 4 und 5, Ultrazentrifugation (1 h, 100.000 x g) und Separation in unlösliches Material sowie in Überstände, aus denen zur Aufkonzentration CEACAM1 immunpräzipitiert wurde.

### Beeinflussung der CHAPS-Unlöslichkeit durch Cholesterin-Depletion

Membranmikrodomänen oder *'lipid rafts'* sind komplexe Strukturen aus Proteinen und Lipiden, die reich an Glykosphingolipiden und Cholesterin sind. Dies ist bedingt durch die Affinität von Cholesterin zu gesättigten Fettsäuren, wie sie besonders häufig in Glykosphingolipiden vorkommen (Mukherjee und Maxfield, 2004). Außerdem bieten die Glykanstrukturen der Sphingolipide eine Schutzfunktion gegenüber dem extrazellulären wässrigen Milieu, was dem nur gering hydrophilen Cholesterin entgegenkommt, um es gegen das polare extrazelluläre Milieu abzusichern (Huang und Feigenson, 1999). Die Akkumulation von Cholesterin in Mikrodomänen ist gleichzeitig eine unabdingbare Voraussetzung für die Stabilität und das Aufschwimmen von Membranmikrodomänen im Dichtegradienten. Pharmaka und Chemikalien, die die Cholesterin-Homöostase von Zellen beeinflussen, und besonders die Membranverfügbarkeit von Cholesterin beeinträchtigen, sollten somit auch gezielt die Stabilität und das Vorkommen von Membranmikrodomänen verändern.

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD, modifizierte Cyclo-Heptaamylose) ist aufgrund substituierter Seitengruppen eine wasserlösliche, ringförmige Substanz, die in ihrer 3-dimensionalen Konformation eine unpolare, hydrophobe Aushöhlung bildet. Durch die räumlichen Beschaffen-

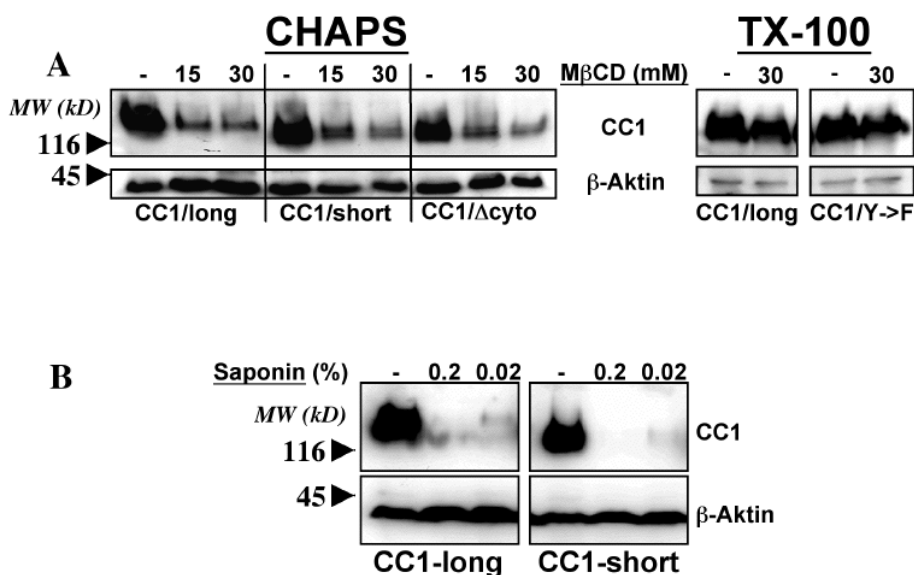
heit der Höhle besitzt M $\beta$ CD eine hohe Bindungsaffinität zu Cholesterin und Cholesterinderivaten. Diese können mit Hilfe des M $\beta$ CD als Cyclodextrin-Komplex im wässrigen Milieu in Lösung gebracht und auch transportiert werden. Unbeladenes M $\beta$ CD ist ferner in der Lage Cholesterin aus Zellmembranen herauszulösen, was in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration zu einer mehr oder weniger starken Cholesterin-Depletion der Zellmembranen führt. Weiterhin vermögen extern verabreichte Proteine wie das Filipin, aber auch komplexe Protein- / Zuckerstrukturen, wie einige Saponine, Cholesterin in der äußeren Lipiddoppelschicht zu aggregieren. Auch Auswirkungen der Hemmung der Cholesterinbiosynthese durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, wie den Statinen, wurden untersucht und zeigten deutliche Effekte auf das biochemische Verhalten von Mikrodomänen-assoziierten Proteinen in Dichtegradienten. Jedoch erwiesen sich diese Störungen als vielfältig und konnten nicht allein auf Cholesterin-Depletion in der Membran zurückgeführt werden (Wolozin, 2002). Mit Hilfe von M $\beta$ CD und Saponin sollte im Folgenden die Cholesterin-Abhängigkeit der CHAPS-Unlöslichkeit und des Aufschwimmverhaltens im Dichtegradienten von CEACAM1 untersucht werden.

Cholesterin-Depletion der Plasmamembran mit M $\beta$ CD führte zu einer Konzentrations-abhängigen Erhöhung der CHAPS-Löslichkeit von CEACAM1-long, -short und - $\Delta$ Cyto (Abb. 43A). Die Menge des unlöslichen F-Aktins und somit die Integrität des Aktinzytoskelett wurde durch diese Behandlung dagegen nicht beeinträchtigt. Erst höhere Konzentrationen von 50 mM M $\beta$ CD und mehr oder Depletionen bei 37 °C (20 mM M $\beta$ CD, länger als 30 min) führten zu einem Abrunden der Zellen und auch zu einer Verringerung des Aktins im 17.000 x g Pellet (nicht gezeigt). Dagegen fanden sich keine Auswirkungen der Cholesterin-Depletion (30 mM M $\beta$ CD) auf die Pelletierbarkeit (17.00 x g) der langen CEACAM1-Isoform unter TX-100-Solubilisationsbedingungen. Dies unterstreicht noch einmal grundlegend die Verschiedenartigkeit der CEACAM1-long-Resistenz gegenüber TX-100- oder CHAPS-vermittelter Extraktion.

Wurde das Cholesterin der Plasmamembran mit Hilfe von geringen Mengen Saponin (die noch nicht Cholesterin entziehen (Cerneus et al., 1993)) geclustert, so wurde, ähnlich wie nach M $\beta$ CD-Behandlung, eine erhöhte Solubilisierbarkeit von CEACAM1 durch CHAPS nachgewiesen. (Gezeigt für CEACAM1-short und CEACAM1-long, Abb. 43B). Die Saponin-Behandlung hatte dagegen keine Auswirkungen auf das Sedimentationsverhalten (17.000 x g) von Aktinfilamenten. Interessanterweise wurde nach Saponin-Behandlung keine erhöhte CEACAM1-Unlöslichkeit beobachtet, wie sie nach den Antikörper-Quervernetzungsver-



suchen eigentlich erwartet wurde. Es konnte jedoch nicht überprüft werden, ob Saponin das Cholesterin in der Plasmamembran von RBE-Zellen wirklich zu clustern vermag. Sollte dies jedoch der Fall sein, so ist davon auszugehen, dass CEACAM1, aufgrund der zunehmenden Löslichkeit, aus diesen Cholesterin-Saponin-Clustern ausgeschlossen wird. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Saponin-Behandlung von Zellmembranen verschiedene Membranproteine unterschiedlich in ihrer Detergenz-Löslichkeit beeinflussen kann. Es bleibt daher festzustellen, dass sich die Saponin Behandlung von RBE-Zellen auf die CHAPS-Löslichkeit von CEACAM1-Molekülen auswirkt, was wahrscheinlich auf eine Beeinträchtigung der Cholesterin-Verfügbarkeit in der Plasmamembran zurückzuführen ist.

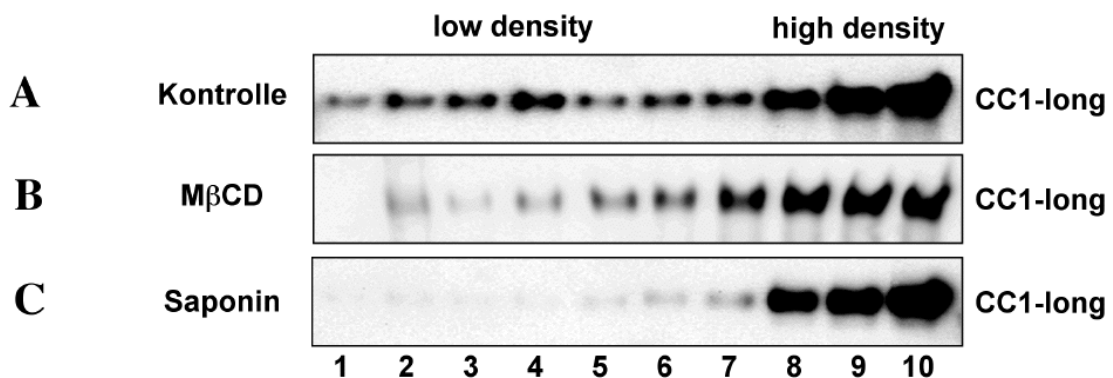


**Abb. 43: Einfluss von Cholesterin-Depletion und Cholesterin-Aggregation auf die CEACAM1-Unlöslichkeit in CHAPS und TX-100 (A)** RBE/CEACAM1-long (CC1/long)-, -short (CC1/short)- und -ΔCyto (CC1/ΔCyto)-Zellen wurden ohne (-) oder nach Behandlung mit 15 oder 30 mM Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) in 1% CHAPS solubilisiert und unlösliches Material auf CEACAM1- (CC1) und β-Aktin Gehalt hin im Immunblot untersucht. Zusätzlich (rechter Teil) wurde der Einfluss der Vorinkubation mit MβCD (30 mM) auf die TX-100-Unlöslichkeit von RBE/CEACAM1-long (CC1/long) oder der Tyrosin-Doppelmutante CEACAM1-longY488:513F (CC1/Y->F) untersucht. **(B)** Darstellung der CEACAM1-long (CC1-long)- und CEACAM1-short (CC1-short)- und β-Aktin-Unlöslichkeit ohne (-) oder mit Vorinkubation der Zellen mit 0,02% oder 0,2% Saponin.

### Cholesterin-Depletion reduziert das Aufschwimmen im Dichtegradienten

Um die Cholesterin-Abhängigkeit der CEACAM1-Mikrodomänenassoziation näher zu charakterisieren, wurde im Weiteren untersucht, ob unter Bedingungen der Cholesterin-Depletion mit MβCD oder der Cholesterin-Aggregation durch Saponin das Aufschwimmen von CEA-

CAM1-Molekülen in der Dichtegradientenzentrifugation verändern lässt. Dazu wurden RBE-Zellen mit M $\beta$ CD oder Saponin inkubiert, anschließend mit CHAPS-Puffer solubilisiert, einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen und im Immunblot analysiert. Nach Cholesterin-Depletion mit M $\beta$ CD war die detektierbare Menge an CEACAM1 in den Fraktionen geringer Dichte deutlich reduziert (Abb. 44B) und nach Saponin-Behandlung kaum mehr nachweisbar (Abb. 44C). Die Assoziation von CEACAM1-Molekülen mit CHAPS-resistenten Membranmikrodomänen ist daher vom Vorhandensein und der Verfügbarkeit von Cholesterin abhängig. Diese Cholesterin-Abhängigkeit findet sich auch bei Membranproteinen, die mit klassischen "lipid rafts" (TX-100-unlöslich) assoziiert vorliegen, aber auch bei Lubrol- oder Brij-resistenten Membranmikrodomänen.

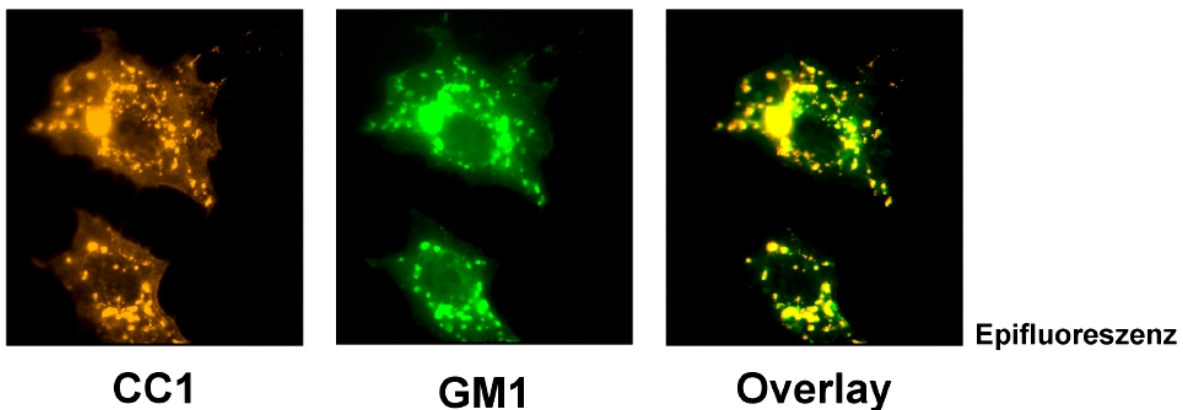


**Abb. 44: Einfluss der Cholesterin-Depletion und Cholesterin-Aggregation auf die Verteilung von CEACAM1-Molekülen in der Dichtegradientenzentrifugation.** RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-Zellen wurden im konfluenten Zustand (A) ohne Behandlung (Kontrolle) oder durch Vorinkubation mit (B) 30 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) oder mit (C) 0,2% Saponin in der Cholesterin-Verfügbarkeit verändert, mit CHAPS-solubilisiert und im Western-Blot nach Dichtegradientenzentrifugation auf die CEACAM1-Verteilung hin untersucht.

Zusammengefasst ergibt sich aus den bis hierher gezeigten Ergebnissen, dass ca. ein Drittel des auf RBE-Zellen exprimierten CEACAM1 mit CHAPS-resistenten Membranmikrodomänen assoziiert vorliegt. Diese Mikrodomänen ähneln in ihrem biochemischen Charakter, d.h., Unlöslichkeit nach Solubilisation bei 4°C, verringerte Unlöslichkeit durch Temperaturerhöhung, Aufschwimmen im Dichtegradienten zu Fraktionen geringer Dichte und besonders der Cholesterin-Abhängigkeit, den traditionellen Membranmikrodomänen, mit Ausnahme ihrer vollständigen Löslichkeit in TX-100.

### Kolokalisation mit GM1 in intrazellulären Vesikeln

Ein traditioneller Membranmikrodomänen-Marker ist das Gangliosid GM1 (Badizadegan et al., 2000). Viele Mikrodomänen-assoziierte Proteine der Plasmamembran lassen sich mit diesem Glykolipid nach Antikörper-induziertem Quervernetzen kolokalisieren. Wurde die GM1-Verteilung in RBE-Zellen mit FITC-markiertem Cholera-Toxin-B dargestellt und CEACAM1 mit Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz angefärbt, so zeigte sich bereits in der Epifluoreszenz eine starke Überlagerung beider Signale in intrazellulären Vesikeln (Abb. 45). Diese angefärbten Vesikel waren von unterschiedlicher Größe und zeigten keine spezifische Lokalisation innerhalb der Zelle. Es ist zur Zeit nicht geklärt, welcher Art (z.B. endotheliale Weibel-Palade-Bodies) oder zu welchem Kompartiment diese Vesikel gehören. Deutlich ist aber die fehlende Kolokalisation von GM1 und CEACAM1 auf der Plasmamembran festzustellen.

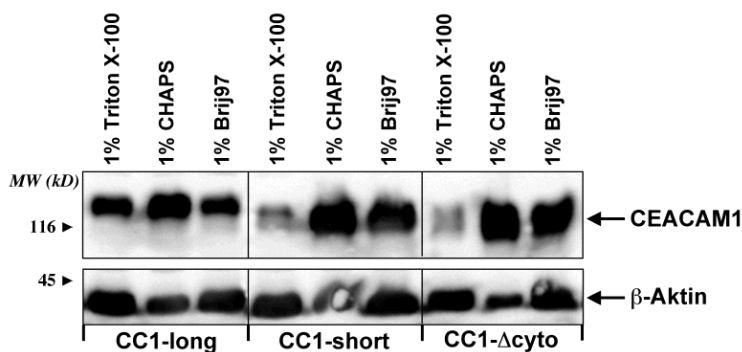


**Abb. 45: Gleichartige Verteilung von CEACAM1-long und GM1 in intrazellulären Vesikeln.** Indirekte Immunfluoreszenz (Epifluoreszenz) von fixierten und permeabilisierten RBE/CEACAM1-long-Zellen. Färbung mit anti-CEACAM1-spezifischen mAb Be9.2 und RhodamineRed-X-gekoppelten sekundär-Antikörpern (links), Cholera-Toxin-B (Mitte) und Darstellung der Überlagerung beider Färbungen mit Hilfe der Photoshop™-Software (rechts, Overlay). (Originalvergrößerung x400)

## Darstellbarkeit der Membranzymdomänen-Assoziation mit anderen Detergenzien

### Unlöslichkeit nach Solubilisation mit verschiedenen Detergenzien

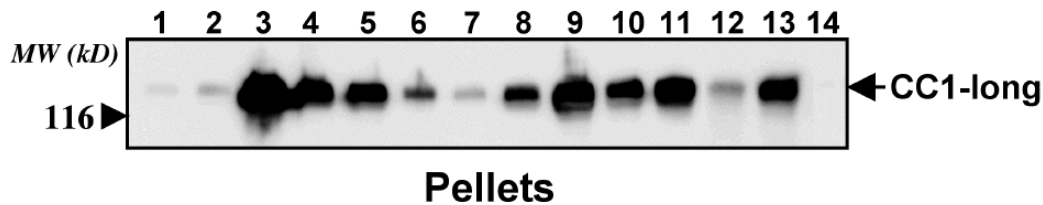
Mit Brij98/99 wurde ein weiteres, nicht-ionisches Detergenz zur Untersuchung der CEACAM1-Löslichkeit in RBE-Zellen verwendet. Verglichen mit dem Solubilitätsverhalten von TX-100 und CHAPS zeigte Brij98/99 ein dem CHAPS-Resultat ähnliches, schlechtes CEACAM1-Solubilitätsvermögen, was in einer beträchtlichen Unlöslichkeit der natürlich vorkommenden Isoformen CEACAM1-long und -short wie auch der  $\Delta$ Cyto-Mutante resultierte (Abb. 46).



**Abb. 46: Vergleich der CEACAM1-Unlöslichkeit in TX-100, CHAPS und Brij96/97.** CEACAM1-long (CC1-long)-, -short (CC1-short)- und  $\Delta$ Cyto (CC1- $\Delta$ Cyto)-exprimierende RBE-Zellen wurden in 1% TX-100, 1% CHAPS und 1% Brij96/97 solubilisiert und nach Zentrifugation auf CEACAM1-Unlöslichkeit hin im Immunblot analysiert. Die Unlöslichkeit von  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Für Solubilitätsversuche wurden nun auch weitere Detergenzien der Brij-Reihe, andere, auf Polyoxyethylen-Kopfgruppen basierende Detergenzien (TX-114), weitere zwitterionische Detergenzien (Zwittergent 3-12 und CHAPSO), ein Glucamid (MEGA-10) sowie aus der Gruppe der Alkylglycoside das n-octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid getestet (alle 1% w/v bzw. v/v und oberhalb der CMC). Auf Gallensäurederivate wie Deoxycholat musste verzichtet werden, da diese mit zweiwertigen Metallionen im verwendeten HBSM-Puffer präzipitierten. Die Unlöslichkeit von CEACAM1-long in Abhängigkeit des verwendeten Detergenz ist in Abb. 47 (Immunblot) exemplarisch gezeigt. Aus den erhaltenen Daten ergibt sich, dass die beobachtete Unlöslichkeit von CEACAM1-long auch bei der Verwendung anderer Detergenzien verschiedener Klassen auftritt. Die am stärksten solubilisierende Wirkung, bezogen auf CEACAM1, zeigten Zwittergent 3-12, n-octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid und MEGA-10. Mit MEGA-10 musste jedoch bei Raumtemperatur solubilisiert werden, da der Wolkenpunkt dieses Deter-

genz bei 4 °C unterschritten ist und das Detergenz in wässriger Lösung ausfällt. Die Gruppe der nicht-ionischen Detergenzien erwies sich als sehr unterschiedlich effektiv in ihrer CEACAM1-solubilisierenden Wirkung. Während Brij97 und TX-114 ähnlich gute Resultate wie TX-100 lieferten, zeigten die anderen Vertreter der Brij-Reihe eine geringere Tendenz CEACAM1 zu solubilisieren (Brij58 > Brij96/97 > Brij76 > Brij35). Auch Tween20 zeigte sich wenig geeignet CEACAM1-long aus RBE-Zellmembranen zu extrahieren. Dass die detektierbaren Unlöslichkeiten nicht, wie bei TX-100 beobachtet, durch eine zytoskelettale Assoziation der CEACAM1-Isoformen verursacht wurden, sondern rein auf die solubilisierende Wirkung der Detergenzien zurückzuführen sind, zeigte sich an Hand von vergleichenden Versuchen mit CEACAM1-short und -ΔCyto. Hier konnten aber keine weiteren Unterschiede beobachtet werden (nicht gezeigt).

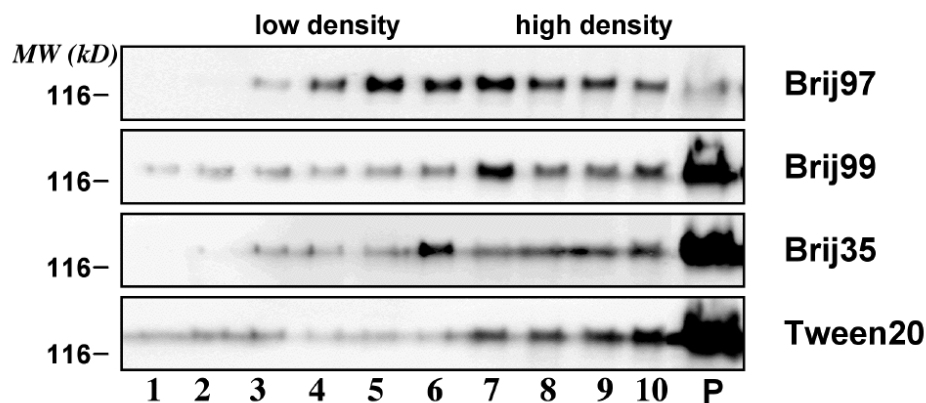


**Abb. 47: Unlöslichkeit von CEACAM1 in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz.** Darstellung der Unlöslichkeit von CEACAM1-long (CC1-long) im Immunblot nach Solubilisation der Zellmembranen mit unterschiedlichen Detergenzien. 1: 1% n-octyl-β-D-Glucopyranosid, 2: 1% Zwittergent 3-12, 3: 1% Tween20, 4: 4% CHAPS, 5: 1% CHAPS, 6: 1% Triton X-100, 7: 1% Triton X-114, 8: CHAPSO, 9: 1% Brij35, 10: Brij58, 11: Brij76, 12: Brij96/97, 12: Brij98/99, 13: MEGA-10.

Die Ergebnisse aus diesen Solubilisierungsexperimenten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Bezüglich der nicht-ionischen Detergenzien lässt sich eine klare Tendenz für die erfolgreiche CEACAM1-Extraktion erkennen: Mit Zunahme der Größe der polaren Kopfgruppe (der Polyoxyglycol-Einheit) nahm auch die Unlöslichkeit des CEACAM1 zu (zum Vergleich 17.000 x g Pellets: Löslichkeit von CEACAM1-long in Brij96/97 C18,1-E10 >> Brij98/99 C18,1-E20). Daraus lässt sich ableiten, dass nicht-ionische Detergenzien mit einem hohen HLB (*Hydrophobic-Lipophilic Balance*)-Wert (Umbreit und Strominger, 1973) wie Brij35 (HLB 16,9) oder Tween20 (HLB 16,7) viel weniger effizient CEACAM1 solubilisieren als Detergenzien mit einem kleineren HLB-Wert, wie z.B. TX-100 (HLB 13,5), TX114 (HLB 12,4) oder n-octyl-β-D-glucopyranosid (HLB 12,4). Bezüglich der Detergenzklassen konnte keine Gesetzmäßigkeit festgestellt werden, da aus jeder Gruppe mindestens ein Detergenz eine sehr gute solubilisierende Wirkung bezüglich CEACAM1 besaß.

## Verhalten im Dichtegradienten nach Solubilisation mit unterschiedlichen Detergenzien

Für einige ausgewählte Detergenzien wurde nun überprüft, ob die in den Solubilisationsexperimenten beobachtete CEACAM1-Unlöslichkeit (17.000 x g Bedingungen) mit einer Membranmikrodomänen-Assoziation im Zusammenhang steht. Dazu wurden Solubilisate von Brij98/99-, Brij96/97-, Brij35- und Tween20-extrahierten RBE/CEACAM1-long-Zellen der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen, fraktioniert und im Western-Blot hinsichtlich der CEACAM1-Verteilung analysiert (Abb. 48). Unter Einbeziehung der Zentrifugationspellets zeigt sich, dass nach Verwendung von Brij98/99 und Brij35 nur ein geringer Teil der CEACAM1-Moleküle überhaupt solubilisiert vorliegt (Fraktionen 8-10), der größere Anteil aber pelletiert mit unlöslichem Material. Ein geringer Anteil findet sich außerdem in Fraktionen mittlerer Dichte (Fraktionen 6 und 7), die aber nur ein geringes Aufschwimmpotential offenbaren. Nach Tween20-Solubilisation zeigt sich eine ähnlich schlecht extrahierende Wirkung (schwache Immunreaktivität in den Fraktionen 8-10) und ein Aufschwimmen von CEACAM1-long-Molekülen ist gar nicht zu beobachten. Alle drei hier untersuchten Detergenzien vermögen CEACAM1-Moleküle daher kaum oder nicht aus RBE-Zellmembranen zu solubilisieren. Des Weiteren sind sie zur Darstellung einer möglichen Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 nicht geeignet.



**Abb. 48: Die CEACAM1 Verteilung nach Dichtegradientenzentrifugation in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz.** RBE/CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Zellen wurden im konfluenten Zustand mit Brij96/97, Brij98/99, Brij35 oder Tween20 solubilisiert und nach Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Die CEACAM1-Verteilung in Fraktionen unterschiedlicher Dichte und im Pellet (P) wurde im Immunblot analysiert.

Brij96/97-Solubilisate zeigten dagegen ein deutliches Aufschwimmen von CEACAM1, obwohl zuvor kaum unlösliches CEACAM1 in 17.000 x g -Pellets detektiert wurde (vgl. hierzu

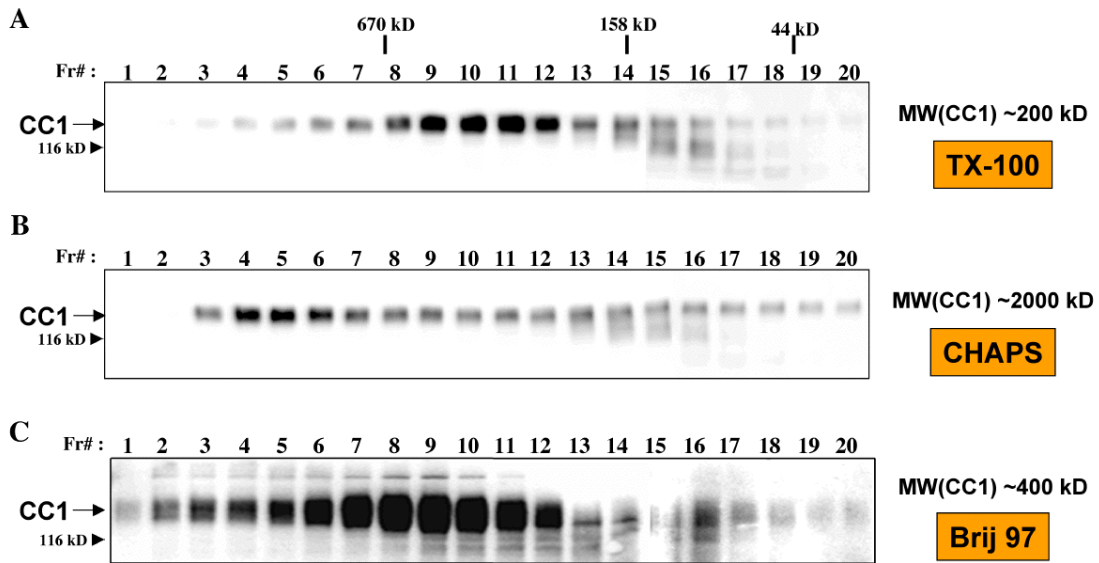
Abb. 47). Die Verteilung der CEACAM1-Moleküle im Dichtegradienten nach Brij96/97-Extraktion ist jedoch anders, als sie unter CHAPS-Bedingungen gefunden wurde. Während es bei der Verwendung von CHAPS zu einem CEACAM1-Verteilungsminimum in den Fraktionen 5, 6 und 7 und zwei Maxima (Fraktionen 3 und 4, bzw. 8-10) kam, zeigte sich unter Verwendung von Brij96/97 gerade in den Fraktionen mittlerer Dichte (5,6 und 7) eine Anhäufung von CEACAM1-Molekülen. Auch die Abnahme von CEACAM1 in Fraktionen zunehmender Dichte, in denen sich vollständig solubilisierte Moleküle befinden sollten, ist auffällig. Dieser Befund lässt vermuten, dass CEACAM1 durch Brij96/97 nicht vollständig solubilisiert wird, sondern in verschieden großen Vesikeln bzw. Komplexen vorliegt, die sich durch die oben angewendete, 10 min Zentrifugation bei 17.000 x g nicht pelletieren lassen.

### **Differierende Komplexgrößen in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz**

Um zu überprüfen, ob sich nach Solubilisation tatsächlich CEACAM1-positive, größere Komplexe oder Vesikel bilden, wurden Gelfiltrationen von RBE/ $\Delta$ Cyto-Zellen nach Solubilisation der Plasmamembranen durchgeführt. Hierzu wurden Zellmembranen für eine Stunde solubilisiert und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 17.000 x g von unlöslichen Bestandteilen, die die FPLC-Säule verstopfen könnten, befreit. Der klare Überstand wurde danach in der Gelfiltration eingesetzt, automatisch aufgetrennt und in 500  $\mu$ l-Aliquots gesammelt. Im Immunblot zeigte sich, dass, je nach verwendetem Detergenz, CEACAM1- $\Delta$ Cyto zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der Säule eluiert, d.h., in unterschiedlich großen Komplexen zu finden ist (Abb. 49). Unter TX-100-Bedingungen eluiert CEACAM1 in den Fraktionen 9-12. Dieses Elutionsverhalten entspricht, verglichen mit den Eichstandards, einem Molekulargewicht von ca. 200 kD, was genau zwischen dem scheinbaren Molekulargewicht eines Monomers, wie man es in der SDS-Gelelektrophorese findet, und der Größe eines Dimers liegt.

Da in beiden Fällen, der SDS-Gelelektrophorese und auch in der Gelfiltration, Komplexe aus Protein, Seife und Membranlipiden analysiert werden, also keine exakten Proteingrößen und Molekulargewichte ermittelt werden können, ist zur Zeit nicht bekannt, welcher Zustand tatsächlich vorliegt. Beide Zustände, Monomer und Dimer sind in NBT-II-Zellen beschrieben worden (Hunter et al., 1996). Da aber nur ein Peak im Elutionsprofil gefunden wurde, liegen nicht beide Zustände gleichzeitig vor, und die Masse von ca. 200 kD lässt vermuten, dass es sich eher um CEACAM1-Monomere (plus Seife und Lipide) handelt. Unter CHAPS-Bedin-

gungen eluiert der Großteil an CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Molekülen bereits in den Fraktionen 4, 5 und 6.



**Abb. 49: Nach TX-100-, CHAPS- oder Brij97-Solubilisation liegt CEACAM1 in Komplexen unterschiedlicher Größe vor.** Solubilisate von RBE/CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Zellen wurden durch Zentrifugation (17.000 x g) von unlöslichen Bestandteilen befreit und durch Gelfiltration (FPLC-unterstützt) in Komplexe unterschiedlicher Größe fraktioniert. Teilproben der gesammelten Fraktionen wurden auf CEACAM1-Gehalt hin im Immunblot analysiert. Detektion von CEACAM1 (CC1) nach Solubilisation mit (A) TX-100, (B) CHAPS und (C) Brij97

Unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen Größenverhältnis und Elutionsvolumen, entspricht dies einem Molekulargewicht von ca. 2000 kD. Jedoch muss davon ausgegangen werden, dass im vorderen, frühen Elutionsbereich der Säule kein linearer Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Elutionsvolumen besteht, so dass das durch Extrapolation ermittelte Molekulargewicht auch bedeutend höher sein könnte. Unter Verwendung von Brij96/97 eluiert CEACAM1- $\Delta$ Cyto deutlich später, als nach CHAPS-Extraktion, aber früher als unter TX-100-Bedingungen. Die Hauptmenge eluiert in den Fraktionen 7-11, mit einem Scheitelpunkt bei Fraktion 9, was einem Molekulargewicht von ca. 400 kD entspricht.

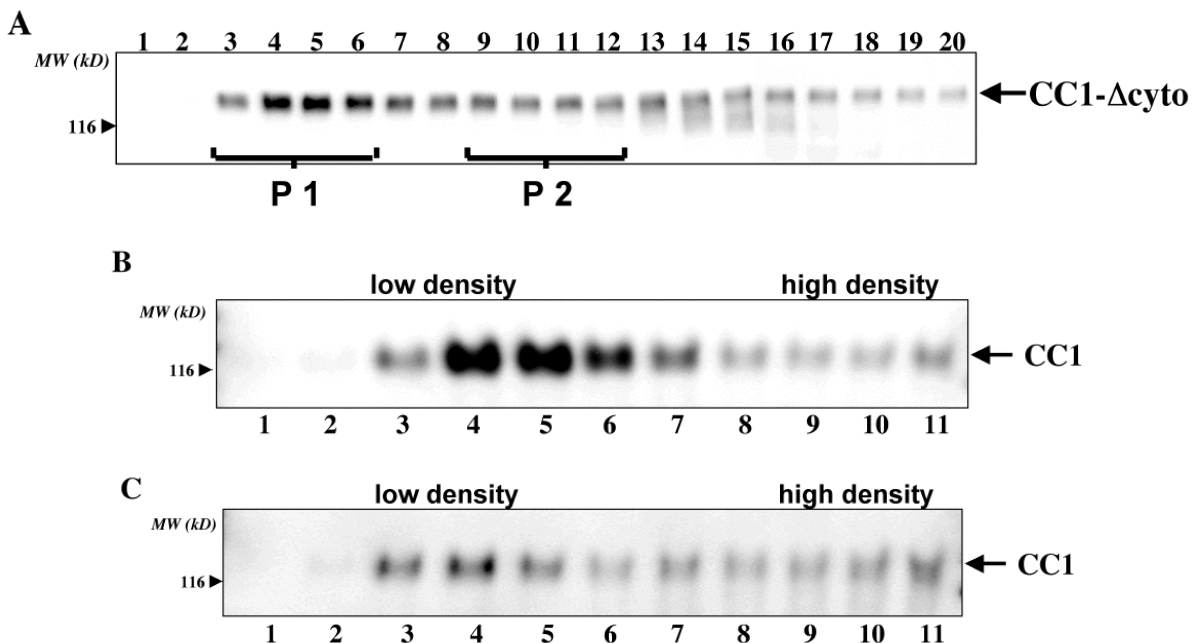
Nach Solubilisation mit CHAPS oder Brij96/97 zeigt CEACAM1- $\Delta$ Cyto definierte, scharfe Elutionspeaks, was auf eine homogene Zusammensetzung der Partikel schließen lässt. Das mittlere Mizellare Gewicht von Detergenzien der Brij-Serie kann sehr hohe Werte von bis zu 48.000 (Brij35) oder 79.000 (Brij58) annehmen. Ginge man davon aus, dass CEACAM1 in eine solche Mizelle eingebettet vorliegt, so ergebe dies allein aber noch nicht das ermittelte Gewicht von ungefähr 400 kD. Das Molekulargewicht einer CHAPS-Mizelle dagegen beträgt



nur 6150 Da, was 10 Molekülen CHAPS pro Mizelle entspricht. Selbst unter der Voraussetzung, dass mehrere Moleküle CEACAM1 in eine solche CHAPS-Mizelle eingebaut werden können, erklärt dies noch nicht die gefundenen, sehr großen Molekulargewichte von CEACAM1-positiven Komplexen unter CHAPS-Bedingungen. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass unter CHAPS-Bedingungen Zellmembran-eigene Bestandteile die Hauptursache für die große Vesikel sind.

### Große Komplexe nach CHAPS-Solubilisation und Gelfiltration im Dichtegradienten

Im Weiteren wurde untersucht, ob die unter CHAPS-Bedingungen gefundenen, früh von der Gelfiltrationssäule eluierenden, CEACAM1-positiven Komplexe in der Lage sind, in der Dichtegradientenzentrifugation aufzuschwimmen. Hierzu wurden die Fraktionen 3-6 und 9-12 einer Gelfiltration eines RBE/CEACAM1- $\Delta$ Cyto/CHAPS-Lysats jeweils zusammengefasst und in der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation analysiert.



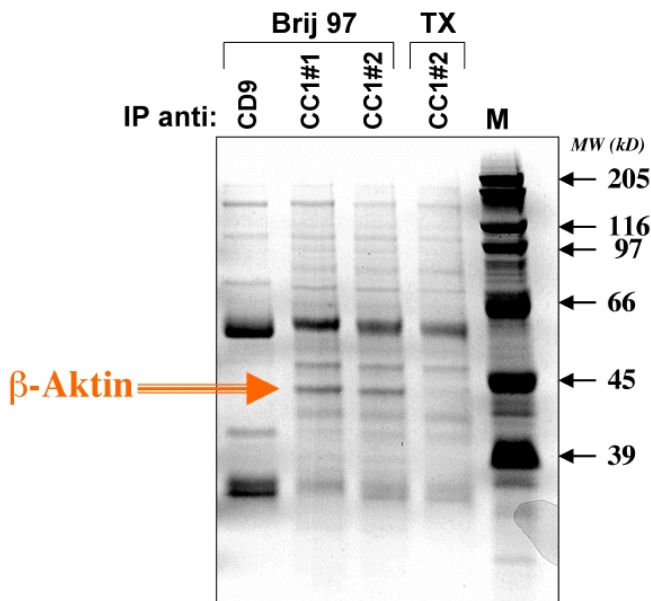
**Abb. 50: CEACAM1 komplexiert in großen Molekülaggagaten nach CHAPS-Solubilisation, die in Dichtegradienten zu Fraktionen geringer Dichte aufsteigen.** (A) Immunblot von CEACAM1- $\Delta$ Cyto (CC1- $\Delta$ Cyto) in Fraktionen der Gelfiltration nach CHAPS-Solubilisation von RBE/CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Zellen. Die Fraktionen 3,4,5 und 6 (P1) und 9,10,11 und 12 (P2) wurden zusammengefasst und in der Dichtegradientenzentrifugation aufgrund ihrer Dichte aufgetrennt. Erneut wurde in Fraktionen der Gradienten P1 (B) und P2 (C) die CEACAM1-Verteilung (CC1- $\Delta$ Cyto) im Immunblot analysiert.

Wie sich herausstellte, befanden sich sämtliche CEACAM1-Moleküle des Pools 1 (Fraktionen 3-6 nach Gelfiltration, Abb. 50A) anschließend ausschließlich in den Fraktionen niedriger Dichte des Zuckergradienten (Abb. 50B). Dagegen ließen sich nur wenige Moleküle in den Fraktionen hoher Dichte nachweisen. Auch die gepoolten Fraktionen 9-12 zeigten noch eine geringe Tendenz zum Aufschwimmen, zeigten aber auch eine deutliche Anhäufung in den Fraktionen hoher Dichte.

Das Erstaunliche dieser Ergebnisse ist, dass, obwohl die Lysate vor der Gelfiltration bei 17.000 x g abzentrifugiert wurden, auch im Überstand Mikrodomänen-assoziiertes, vesikuläres CEACAM1 gefunden wurde. Das bedeutet, dass die CHAPS-unlösliche 17.000 x g Pelletfraktion von CEACAM1-Molekülen nicht unbedingt dieselbe Fraktion darstellt, die nach Dichtegradientenzentrifugation in den Fraktionen niedriger Dichte gefunden wird.

### **Identifizierung CEACAM1-bindender Proteine nach unterschiedlicher Detergenz-Solubilisation**

Da sich die Detergenzien TX-100, Brij96/97 und CHAPS in ihrem Solubilisationsvermögen gegenüber membranständigen CEACAM1-Molekülen unterschieden, bestand die Möglichkeit, dass sich mögliche laterale oder auch zytosolische Bindungspartner des CEACAM1 nur nach Solubilisation mit einem bestimmten Detergenz darstellen lassen. Um dies zu überprüfen, wurden aktivierte humane Granulozyten, die viel endogenes CEACAM1-long exprimieren, *ex vivo* mit TX-100 oder Brij96/97 lysiert und CEACAM1 mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die erhaltenen Präzipitate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung analysiert. Deutlich erkennbar sind in allen Präzipitaten die Antikörperbanden (schwere Ketten bei 54-56 kD) sowie unspezifische, kontaminierende Proteinbanden (Abb. 51). Nur eine Bande bei 42-44 kD zeigte sich als CEACAM1-spezifisch kopräzipitierend und war besonders deutlich unter Brij96/97-Solubilisationsbedingungen darstellbar. Diese 42-44 kD Proteinbande wurde ausgeschnitten, für eine MALDI-TOF-Analyse vorbereitet und tryptisch in Peptide gespalten. Durch die massenspektrometrische Analyse ließ sich dieses Protein anhand seines Peptid-Fingerprints als  $\beta$ -Aktin identifizieren (Sequenz-Abdeckung 29%).  $\beta$ -Aktin wurde bereits als Bindungspartner von CEACAM1-long und auch von CEACAM1-short in epithelialen Zellen beschrieben, eine Interaktion in Granulozyten jedoch noch nicht.



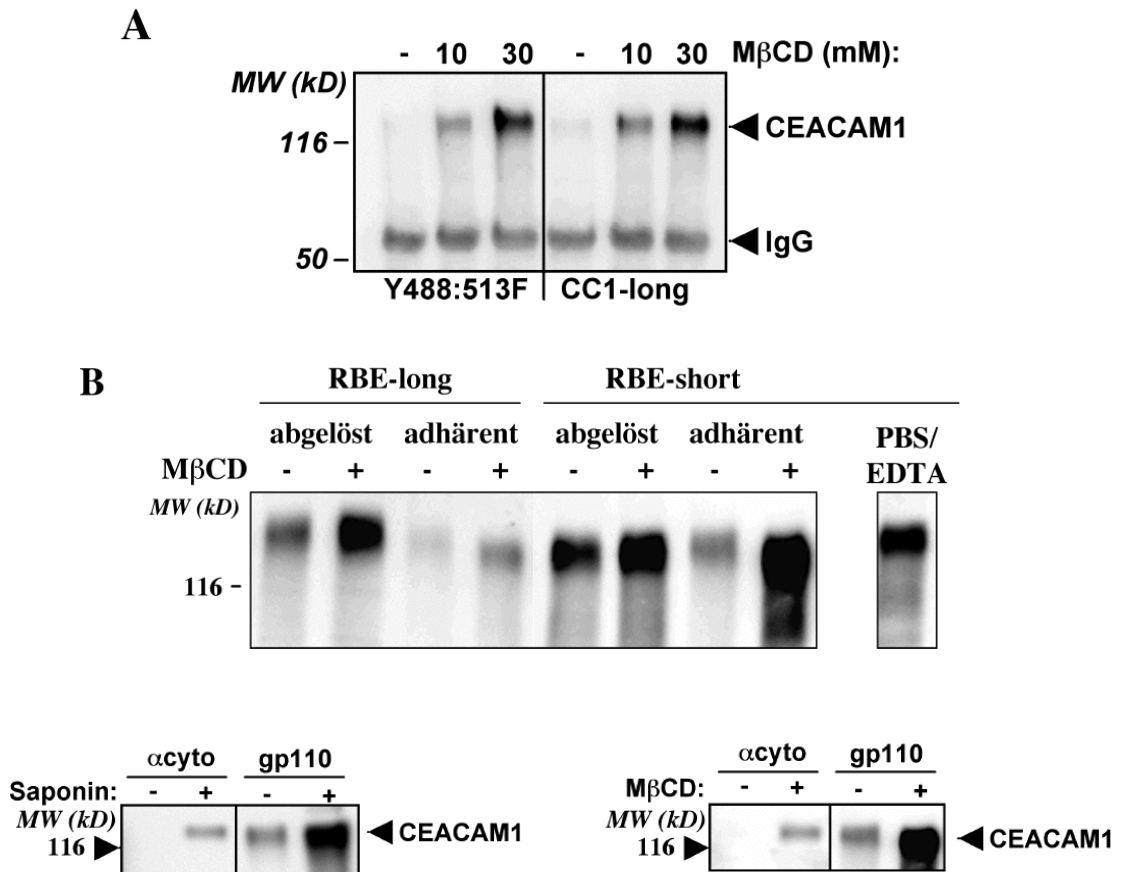
**Abb. 51: Koimmunpräzipitation von  $\beta$ -Aktin mit CEACAM1 aus humanen Granulozyten nach Brij96/97-Solubilisation.**  $30 \times 10^6$  frisch isolierte, gereinigte und fMLP-aktivierte Granulozyten wurden mit Brij96/97 oder TX-100 solubilisiert und mit anti-CD9 oder anti-CEACAM1-Antikörpern (CC1#1 und CC2#2 = unterschiedliche Chargen des mAb 18/20) immunpräzipitiert. Präzipitate wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande bei 42 kD wurde für MALDI-TOF-Analyse aufbereitet, Trypsin-verdaut und vermessen. Der Fingerprint-Datenbankabgleich ergab eine signifikante Übereinstimmung mit Peptiden von humanem  $\beta$ -Aktin (Sequenz-Abdeckung: 29%).

Zusammengefasst zeigt sich, dass verschiedene Detergenzien unterschiedlich geeignet sind Protein-Protein-Interaktionen von Membranproteinen darzustellen.

### Cholesterin-Depletion-induzierte Proteolyse von CEACAM1

Für einige Mikrodomänen-assoziierte Membranproteine, wie den Tetraspaninen, konnte gezeigt werden, dass sie proteolytisch auf der extrazellulären Seite der Membran abgespalten werden, wenn die Plasmamembran Cholesterin-depletiert wird (Claas et al., 2001). Um zu analysieren, ob CEACAM1 ebenfalls ein Substrat von durch Cholesterin-Depletion-aktivierbaren Proteasen ist, wurden RBE-Transfektanten mit unterschiedlichen Konzentrationen M $\beta$ CD für 30 min inkubiert und anschließend wurden CEACAM1-Fragmente durch Immunpräzipitation und Immunblot im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Es zeigte sich, dass nach M $\beta$ CD-Behandlung von RBE/CEACAM1-long- und RBE/CEACAM1-short-Zellen lösliches CEACAM1 in Zellkulturüberständen nachweisbar war. Eine Zunahme an proteolytisch degradierten CEACAM1-Fragmenten wurde mit steigenden M $\beta$ CD-Konzentrationen (Abb. 52A) oder durch Behandlung der Zellen in Suspension (Abb. 52B) beobachtet. In allen Versuchen wurde dabei mit dem N-Domänen-spezifischen anti-CEACAM1-Antikörper Be9.2 eine Hauptbande, kurz unterhalb der ursprünglichen Molekulargewichtsbande von ca. 120 kD (long) bzw. 110 kD (short), beobachtet, was auf eine Abspaltung des CEACAM1-Moleküls kurz ober-, unter- oder innerhalb der Membran hindeutet. Nur in verschwindend geringen Mengen wurden weitere CEACAM1-Degradationsprodukte mit intakter N-Domäne und kleineren Molekulargewichten im Western-Blot detektiert. Ob weitere proteolytische Isoformen

ohne N-Domäne entstanden, konnte nicht geklärt werden, da keine Antikörper zur Detektion von N-Domäne-negativen Molekülen zur Verfügung standen. Eine geringe Proteolyse von CEACAM1 wurde durch PBS/EDTA-Behandlung induziert, was die basalen Mengen an CEACAM1-Degradationsprodukten in abgelösten, nicht M $\beta$ CD-behandelten Zellen erklärt.



**Abb. 52: Detektion löslicher CEACAM1-Isoformen in Zellkulturüberständen nach Veränderung des verfügbaren Cholesteringehalts der Plasmamembran.** (A) RBE/CEACAM1-long (CC1-long)- oder RBE/CEACAM1-longY488:513F (Y488:513F)-Zellen wurden ohne (-) oder mit 15 oder 30 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) für 30 min inkubiert. Zellkulturüberstände (4 ml) dieser Zellen wurden mit anti-CEACAM1 pAb und über Nacht immunpräzipitiert. Präzipitiertes CEACAM1 wurde anschließend im Immunblot detektiert. (B) RBE/CEACAM1-long (RBE-long)- oder -short (RBE-short)-Zellen wurden im adhären (adhärent) oder im abgelösten (abgelöst) Zustand ohne (-) oder mit (+) 30 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) inkubiert (30 min) oder nur mit PBS/EDTA (Trypsin-frei) abgelöst. Aus den resultierenden Zellkulturüberständen wurden CEACAM1-Isoformen immunpräzipitiert und im Immunblot detektiert. (C) RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden wie in (B) behandelt und mit pAb anti-zytoplasmatischen CEACAM1-long-Anteil ( $\alpha$ cyto) oder mit Antikörpern gegen das gesamte Molekül (gp110) immunpräzipitiert und im Western-Blot auf CEACAM1 hin analysiert.

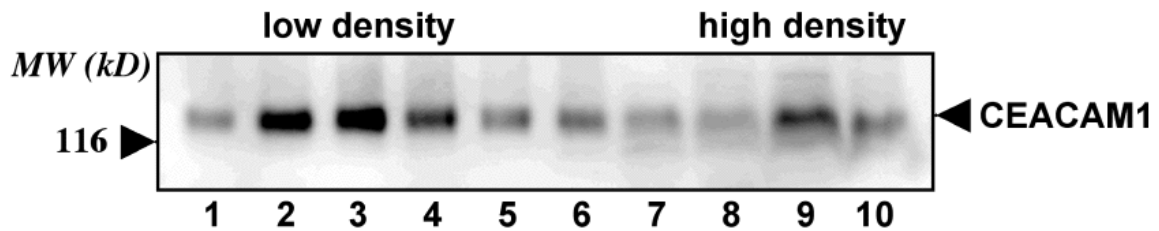
Ferner wurden nach Cholesterin-Depletion CEACAM1-long-Moleküle mit einem für die zytoplasmatische Domäne spezifischen Antiserum aus dem Zellkulturüberstand präzipitiert und als scheinbar intakte Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kD im Western-

Blot dargestellt. Saponin-Behandlung von RBE-CEACAM1-long-Zellen zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 52C). M $\beta$ CD und Saponin lösen daher intaktes CEACAM1-long aus der Plasmamembran heraus. Ob dieses Phänomen spezifisch für CEACAM1-Moleküle ist oder ob auch andere Membranmikrodomänen-assoziierte Proteine betroffen sind, oder ob nur Mikrodomänen-assoziierte Proteine aus der Membran herausgelöst werden, ist zur Zeit nicht bekannt. Auch hier standen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung. Derartige Untersuchungen könnten aber aufzeigen, dass die durch Cholesterin-Depletion "solubilisierbaren" Membranproteine im Vergleich zu nicht-M $\beta$ CD-solubilisierbaren Proteinen, eine erhöhte Affinität zu Cholesterin besitzen, was die Voraussetzung für die beobachtete Membranmikrodomänen-Assoziation darstellen kann.

Ultrazentrifugationen von Zellkulturüberständen nach M $\beta$ CD-Behandlung zeigte, dass es sich bei dem CEACAM1-positiven Material nicht um pelletierbare Vesikel oder andere partikuläre Zellmembranbestandteile handelt. D.h., CEACAM1 wurde tatsächlich vollkommen solubilisiert (CEACAM1 konnte im Immunblot nur im Überstand, nicht aber im Pellet detektiert werden, nicht gezeigt).

### **Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 in endogenen Systemen**

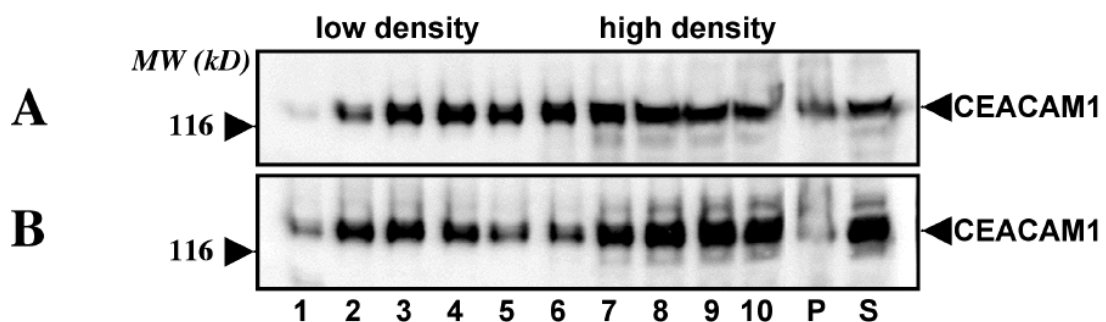
Um das biochemische Verhalten von CEACAM1 auf andere Systeme auszuweiten, wurden nun verschiedene Ratten-Zelllinien (IEC-6, NBT-II und PC12), die humane Kolon-Karzinomzelllinie HT29 sowie frisch isoliertes Rattenleber- und Hepatom-7777-Gewebe untersucht. Exemplarisch für die untersuchten Ratten-Zelllinien ist das Aufschwimmverhalten CHAPS-extrahierter CEACAM1-Moleküle aus IEC-6-Zellen gezeigt. Nach Dichtegradientenzentrifugation befanden sich CEACAM1-Moleküle fast ausschließlich in den Fraktionen geringer Dichte 2, 3 und 4. Nur eine geringe Immunreaktivität wurde in Fraktionen hoher Dichte (9 und 19) festgestellt (Abb. 53). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für NBT-II- und PC12-Zellen gefunden. Die Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 ist somit nicht auf Zellen endothelialen Ursprungs beschränkt, und zeigt ferner, dass es sich nicht um ein Transfektionsartefakt nach Überexpression von CEACAM1 auf RBE-Zellen handelt.



**Abb. 53: CEACAM1-Verteilung nach CHAPS-Solubilisation von Ratten-Dünndarm-Epithelzellen (IEC-6) und Dichtegradientenzentrifugation.** Endogen CEACAM1-exprimierende Ratten-Dünndarm-Epithelzellen (IEC-6) wurden im konfluenten Zustand CHAPS-solubilisiert und im Dichtegradienten aufgetrennt. Nach TCA-Präzipitation der erhaltenen Fraktionen wurde die CEACAM1-Verteilung im Immunblot analysiert.

### ***In vivo*-Mikrodomänen-Assoziation in Rattenleber und Morris-Hepatom-7777**

Mit Hilfe von CHAPS ließ sich die Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 auch in Organen der Ratte darstellen. Nach Dichtegradientenzentrifugation und Western-Blot frischer Leber-Solubilisate zeigte sich ein signifikanter Anteil an CEACAM1 in den Fraktionen geringer Dichte (Abb. 54A).

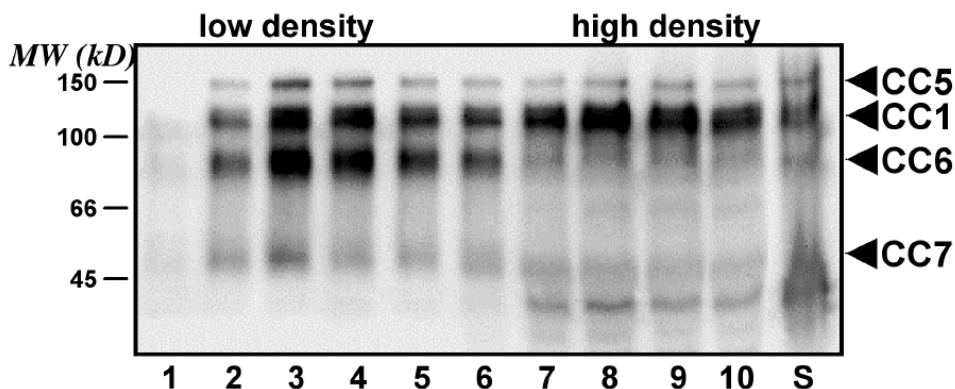


**Abb. 54: CEACAM1-Verteilung nach CHAPS-Solubilisation von frisch präparierten Rattenlebern sowie Morris-Hepatom-7777-Gewebe und Dichtegradientenzentrifugation.** PBS-perfundierte Organe wurden mit Ultra-Turrax zerkleinert und Membranen in CHAPS-Puffer solubilisiert. Die CEACAM1-Verteilung nach isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation wurde im Immunblot bestimmt. (A) Leber, (B) Hepatom.

Auch CEACAM1 aus Morris-Hepatom-7777 zeigte dieses Aufschwimmverhalten (Abb. 54B). Da das Hepatomgewebe keine Polarisierung in apikale, Gallenkanal-ähnliche Strukturen aufwies, ist eine apikale, polare Verteilung von CEACAM1 auf Hepatozyten keine Voraussetzung für die Mikrodomänen-Assoziation.

### Verteilung humaner CEA-Familienmitglieder im Dichtegradienten

HT29 exprimieren mehrere CEACAM-Isoformen: CEACAM1, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 und CEACAM7. Die Analyse von Dichtegradienten-Fractionen nach CHAPS-Lyse konfluenter Zellen mit dem kreuzreaktiven monoklonalen Antikörper 2D3 sowie polyklonalen anti-CEA-Kaninchen-IgGs zeigten im Immunblot reaktive Banden mit den Molekulargewichten 160 kD, 120 kD, 95 kD und 50 kD (Abb. 55). Dabei handelt es sich um die CEACAM-Isoformen (in absteigender Reihenfolge des Molekulargewichts) CEACAM5 (CEA) 160 kD, CEACAM1-4L/S 120 kD, CEACAM1-3L/S und/oder CEACAM6 95 kD und wahrscheinlich um CEACAM7, 50 kD. Die Identität dieser schwachen Bande konnte bisher jedoch nicht genau belegt werden, da CEACAM7-spezifische Antikörper nicht zur Verfügung standen.



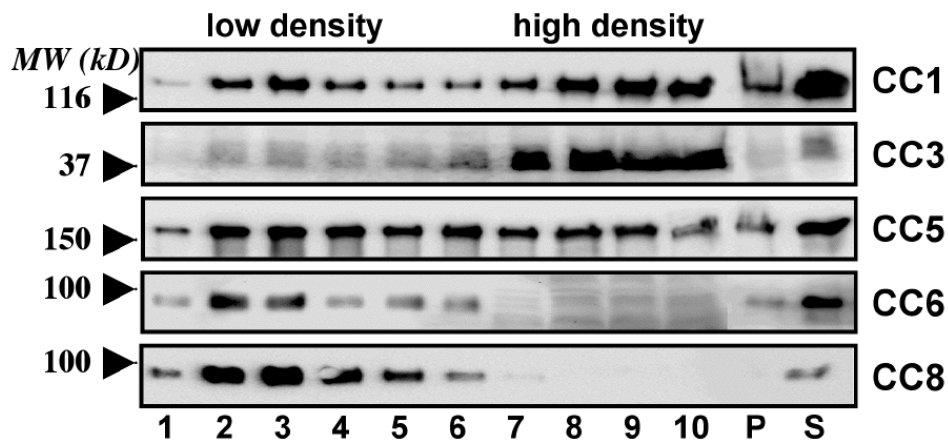
**Abb. 55:** Verteilung humaner CEA-Familienmitglieder endogen exprimiert auf epithelialen Kolon-Karzinomzellen (HT-29) nach CHAPS-Solubilisation und Dichtegradientenzentrifugation. Konfluente, IFN- $\gamma$ -behandelte (2 Tage, 100 ng/ml) HT-29-Zellen wurden in CHAPS-Puffer solubilisiert und anschließend im Dichtegradienten fraktioniert. Die Verteilung von CEACAM5, CEACAM1 und CEACAM6 wurde im Immunblot mit mAb 2D3 analysiert, (S = Solubilisat).

Alle CEA-Familienmitglieder konnten in den Fraktionen geringer Dichte detektiert werden, unterschieden sich aber zum Teil deutlich hinsichtlich ihrer Verteilung. Während CEACAM5 und CEACAM1 aus HT29 zwei Maxima erkennen ließen (eins in den Fraktionen geringer Dichte, eins in Fraktionen hoher Dichte), befand sich CEACAM6 (95 kD) ausschließlich in den Fraktionen geringer Dichte, also vollständig Membranmikrodomänen-assoziiert. Damit unterschieden sich die beiden GPI-verankerten Vertreter der CEACAM-Familie CEACAM5 und CEACAM6 überraschend deutlich hinsichtlich ihres Aufschwimmverhaltens im Dichtegradienten.

Festzustellen bleibt aber, dass auch humanes CEACAM1 partielles Aufschwimmen zeigt und somit Membranmikrodomänen-assoziiert vorliegt. Eine solche Reaktion ist wegen der

evolutionären Diversifikation der CEACAM-Familie im humanen Systems mit mehreren GPI-verankerten Vertretern, die CEACAM1-vermittelte, Mikrodomänen-unterstützte Signalprozesse übernommen haben könnten, nicht unbedingt erwartet worden.

Ein dem HT-29 entsprechendes Ergebnis wurde auch für CEACAM-Moleküle, ektopisch auf HeLa-Zellen exprimiert, gefunden (Abb. 56). Im HeLa-System zeigten die GPI-verankerten Vertreter CEACAM5, CEACAM6 und auch CEACAM8 eine deutliche Anreicherung in den Fraktionen niedriger Dichte (2-5). CEACAM5 zeigte aber erneut eine verstärkte Tendenz zu Fraktionen hoher Dichte. Ähnlich wie CEACAM1 zeigte CEACAM5 eine zweigeteilte Auftrennung in Fraktionen mit geringer Dichte (2-4) und hoher Dichte (8-10). CEACAM1 und CEACAM5 zeigten zudem beide eine partielle Unlöslichkeit und pelletierten nach Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Im Gegensatz zu den anderen CEACAM-Vertretern, zeigte CEACAM3, ein transmembranäres Molekül mit nur einer Ig-ähnlichen extrazellulären Domäne, keine Tendenz zum Aufschwimmen in Dichtegradienten und scheint daher, im Gegensatz zu allen anderen getesteten Vertretern der CEA-Familie, nicht Membranmikrodomänen-assoziiert vorzuliegen.



**Abb. 56: Verteilung humaner CEACAMs, ektopisch exprimiert in HeLa-Zellen, nach CHAPS-Solubilisation und Dichtegradientenzentrifugation.** Konfluente HeLa-Transfektanten wurden solubilisiert (CHAPS) und mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und fraktioniert. Im Immunblot wurde die Verteilung von CEACAM1 (CC1) und CEACAM5 (CC5) mit mAb 2D3, von CEACAM3 (CC3) mit mAb Col-1, von CEACAM6 (CC6) mit mAb 16H10 und von CEACAM8 (CC8) mit mAb 80H3 in den Fraktionen (1-10) und Pellets (P) der Gradienten und im Solubilisat (S) detektiert.