

Interaktion von CEACAM1-long und SHP-2 an Zell-Zell-Kontakten

Transiente Tyrosinphosphorylierung während der Zellkontakt-Formation

Wie oben beschrieben lokalisiert CEACAM1 in RBE-Zellen unter konfluenten Kulturbedingungen an Zell-Zell-Kontaktbereichen. Diese Akkumulation an Zellgrenzen erfolgte aber nur unter Bedingungen, die die homophile Interaktion von CEACAM1-Molekülen *in trans* mit benachbarten Zellen gewährleisteten, d.h., nur wenn Nachbar-Zellen CEACAM1-Moleküle exprimierten. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die homophile Bindung von CEACAM1-Molekülen an Zellkontakten eine Signal-erzeugende Wirkung besitzt. Im Speziellen wurde untersucht, ob die extrazelluläre Interaktion zu einer detektierbaren Phosphorylierung an Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1-long führt.

Zu diesem Zweck wurden RBE/CEACAM1-long-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert oder 24 h vor dem Ernten auf ein 7x größeres Areal umgesetzt, um die Ausbildung von Zellkontakten zu verhindern. Nach Zellyse, Immunpräzipitation von CEACAM1 und anschließenden Western-Blots ergab sich ein detektierbarer Unterschied in der CEACAM1-long-Tyrosinphosphorylierung in konfluent oder spärlich-ausgesät wachsenden Zellen (Abb. 57A). Unter Wachstumsbedingungen, die nur wenige Zell-Zell-Kontakte erlaubten, konnte eine schwache Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long nachgewiesen werden. Diese Tyrosinphosphorylierung war im konfluenten Zustand der Zellen aber sehr viel stärker ausgeprägt, und gut sichtbar detektierbar. Da es sich hierbei um ein CEACAM1-spezifisches phospho-Tyrosin-Signal handelt, konnte mit Hilfe von Kontroll-Immunpräzipitationen aus Vektor-Zellen bzw. Tyrosin-Doppelmutanten (RBE/CEACAM1-Y488:513F-Mutanten) gezeigt werden, die keine detektierbare Tyrosinphosphorylierung im Immunblot aufwiesen (Abb. 57B). Kontroll-Entwicklungen der selben Blots mit CEACAM1-spezifischem Be9.2-Antikörper zeigten nach Strippen gleiche Mengen präzipitierter CEACAM1-Moleküle in allen Ansätzen.

Aus den gleichen Zellsolubilisaten wurde zusätzlich das homophile Zell-Zell-Adhäsionsmolekül VE-Cadherin präzipitiert, das, wie aus der Literatur bekannt ist, in jüngst konfluent gewordenen Endothelzellen ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert vorliegt (Lampugnani et al., 1997). Wie in Abb. 57C zu sehen ist, liegt in frisch konfluenten RBE-Zellen auch das VE-Cadherin Tyrosin-phosphoryliert vor.

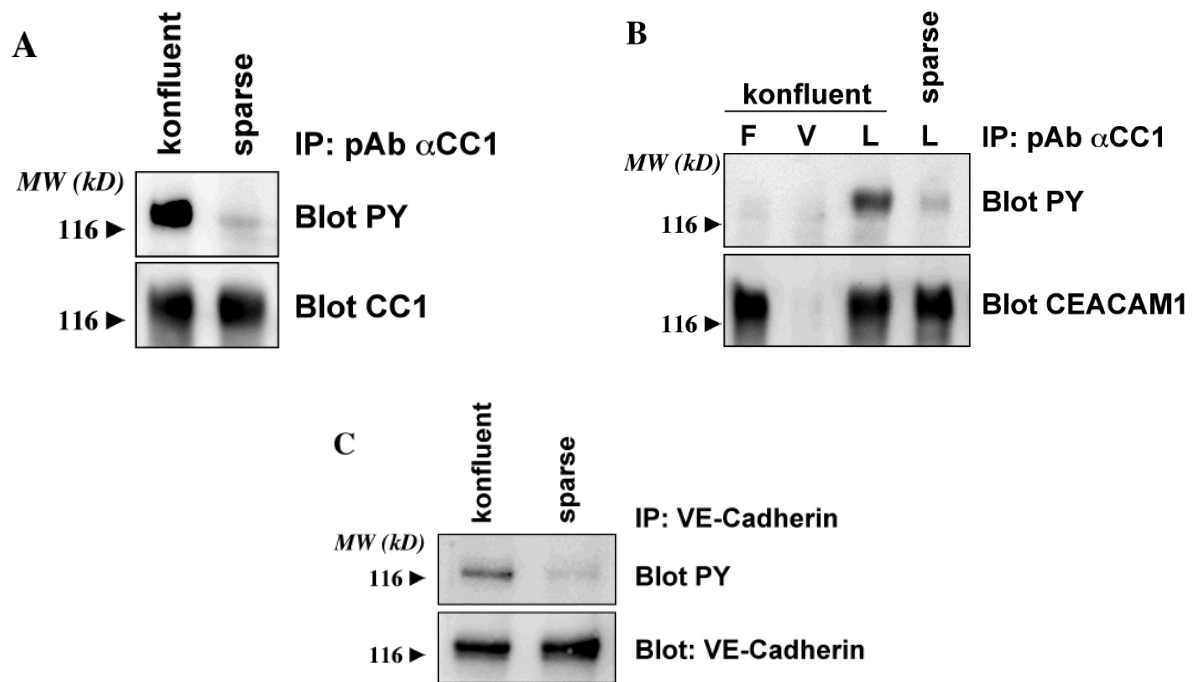


Abb. 57: In frisch konfluenten RBE-Zellen ist VE-Cadherin sowie CEACAM1-long Tyrosinphosphoryliert. (A) RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden im Zustand der frisch erreichten Konfluenz oder im spärlich ausgesähten Zustand (sparse) solubilisiert, mit pAb anti-CEACAM1 (pAb α CC1) immunpräzipitiert und im Immunblot auf Tyrosinphosphorylierung (PY-Blot, oben) bzw. nach Strippen auf die präzipitierte CEACAM1-Menge (unten) hin untersucht. (B) Darstellung der Spezifität des in (A) beobachteten phospho-Tyrosin-Signals. Als Negativkontrolle wurden konfluente Tyrosin-Doppelmutanten (RBE/CEACAM1-longY488:513F-Zellen) (F) RBE/Vektor-Zellen (V) sowie spärlich (sparse)- oder konfluent wachsende RBE/CEACAM1-long (L)-Zellen wie in (A) lysiert, präzipitiert und im Western-Blot analysiert. (C) Aus den selben Zelllysaten wie in (A) wurde VE-Cadherin immunpräzipitiert und im Immunblot auf Tyrosinphosphorylierung (PY-Blot, oben) hin untersucht. Nach Strippen wurde die präzipitierte VE-Cadherin-Gesamtmenge im Western-Blot bestimmt.

Um die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung beider Moleküle bestimmen zu können, wurden über eine Woche verteilt jeden Tag 700.000 Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale gleichmäßig verteilt ausgesetzt und bis zum Ernten kultiviert. Um die Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von der Zelldichte im besonderen darzustellen, wurde 24 h vor dem Ernten die gleiche Menge Zellen auf unterschiedlich große (3,5, 10 oder 15 cm Durchmesser) Zellkulturschalen ausplattiert. Zum Zeitpunkt der Solubilisation befanden sich alle Kulturen, die länger als zwei Tage wachsen konnten, im Zustand der Konfluenz. Zwei Tage alte Kulturen waren fast konfluent und nur die Zellen, die einen Tag zuvor plattiert wurden, zeigten eine spärliche Besiedelung mit nur wenigen Zellkontakt-Formationen. Zell-Zell-Kontakte waren noch seltener in den 10 und 15 cm Schalen zu beobachten, während die 3,5 cm Schale bereits nach nur einem Tag vollständig besiedelt und die Zellen im engen Kontakt zueinander waren. Wie sich an Hand von Immunpräzipitationen und Western-Blots deutlich erkennen liess, lag

CEACAM1-long am dritten Tag nach dem Aussähen stark Tyrosin-phosphoryliert vor (Abb. 58A und B). Diese Tyrosinphosphorylierung war transient und bereits am vierten Tag kaum mehr detektierbar und auch am Tag zuvor, Tag 2 nach dem Absetzen, war die CEACAM1-long Tyrosinphosphorylierung nur schwach ausgeprägt. Die geringe Tyrosinphosphorylierung, die sich am Tag 1 detektieren liess, war weiter reduziert, wenn den Zellen ein noch größeres Areal zum Absetzen geboten wurde, d.h., wenn noch weniger Zell-Zell-Kontakte ausgebildet wurden. Nur in der dicht besiedelten, 24 h alten Kultur der 3,5 cm Schale konnte wieder eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long nachgewiesen werden.

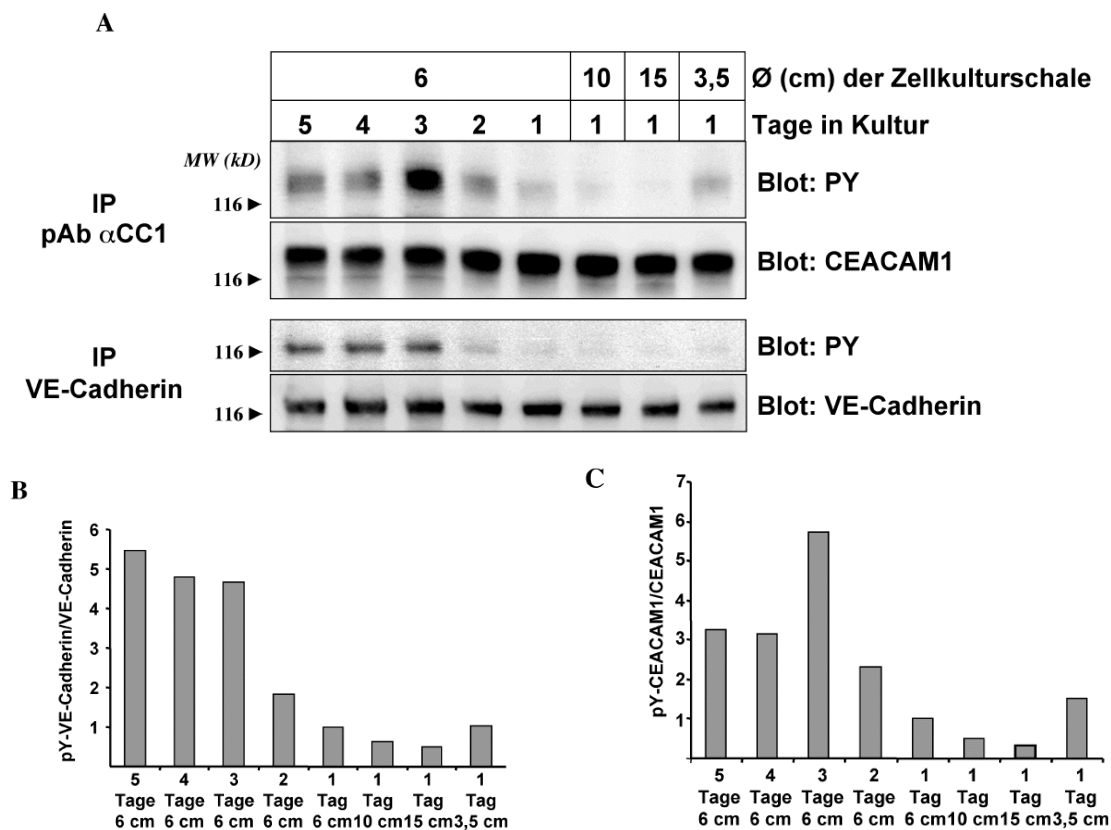


Abb. 58: Kinetik und Zelldichte-Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung an CEACAM1-long und VE-Cadherin. 700.000 RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden jeden Tag in 6 cm Durchmesser Zellkulturschalen ausplattiert und kultiviert. Am letzten Tag wurden die Zellen zusätzlich auf 3,5, 10 oder 15 cm Zellkulturschalen plattiert. Die Zellen wurden in Lysispuffer geerntet und mit pAb anti-CEACAM1 (pAb αCC1) bzw. mit pAb anti-VE-Cadherin immunpräzipitiert. Nach Präzipitation und Waschen wurde die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long (oben) und VE-Cadherin (unten) im Immunblot (PY-Blot) mit mAb 4G10 dargestellt. Nach Strippen wurde die präzipitierte Gesamtmenge CEACAM1-long (CEACAM) bzw. VE-Cadherin detektiert. Quantifizierung der relativen Tyrosinphosphorylierung an **(B)** CEACAM1-long und **(C)** VE-Cadherin.

Dies bestätigt die Vermutung, dass die Phosphorylierung von CEACAM1-long an Tyrosinres-
ten in konfluenten Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte erfolgt. Es zeigte sich aber, dass

die Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long streng reguliert und daher nur transient zu detektieren war. Nur zum Zeitpunkt der Organisation sich neu ausbildender Zell-Zell-Kontakte war eine starke Tyrosinphosphorylierung nachweisbar, was mit den Befunden am VE-Cadherin korreliert, das auch erst an Tag 3 Tyrosin-phosphoryliert vorlag (Abb. 58A und C). Im Gegensatz zur CEACAM1-Phosphorylierung ist die Tyrosinphosphorylierung am VE-Cadherin jedoch nicht transient, sondern auch drei Tage nach Erreichen der Konfluenz noch in gleicher Stärke nachweisbar. (Vgl. hierzu auch Quantifizierung Abb.58 A und B).

Beteiligung von Tyrosinkinasen der src-Familie bei der Zellkontakt-vermittelten Phosphorylierung

CEACAM1-long kann durch Tyrosinkinasen der src-Familie und auch durch einige Rezeptor-tyrosinkinasen (IR, EGFR) phosphoryliert werden (siehe Einleitung). Um eine Beteiligung von Tyrosinkinasen der src-Familie bei der durch Zellkontakt-Formation hervorgerufenen Tyrosinphosphorylierung des CEACAM1-long nachzuweisen, wurden im Folgenden spezifische Kinase-Inhibitoren verwendet. Unlängst konfluent gewordene RBE-Zellen wurden für eine Stunde Serum-starviert, anschließend für 30 min mit src-Kinase-Inhibitoren behandelt und im Immunblot, nach Immunpräzipitation, auf Tyrosinphosphorylierung am VE-Cadherin und am CEACAM1-long hin untersucht (Abb. 59A und B). Die Behandlung der RBE-Zellen mit Genistein, einem Tyrosin-Kinasehemmer mit breitem Wirkungsspektrum, führte zu einer deutlichen Verringerung der nachweisbaren Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long, um ca. 60%. Im Vergleich zu Genistein war der src-Familie-spezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 deutlich wirksamer und konnte die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung bis auf unter 10% der Ausgangswerte reduzieren. Auch VE-Cadherin zeigte unter Verwendung von PP2 eine deutliche Verringerung der detektierbaren Tyrosinphosphorylierung (Abb. 59C und D), jedoch nur um bis zu 60%, so dass davon ausgegangen werden muss, dass nicht alle Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne des VE-Cadherins von src-Kinasen-abhängig phosphoryliert werden. Aber auch ein langsamerer Turnover der VE-Cadherin-Tyrosinphosphorylierung könnte, verglichen mit der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung, für die noch zu detektierende Phosphorylierung entscheidend sein.

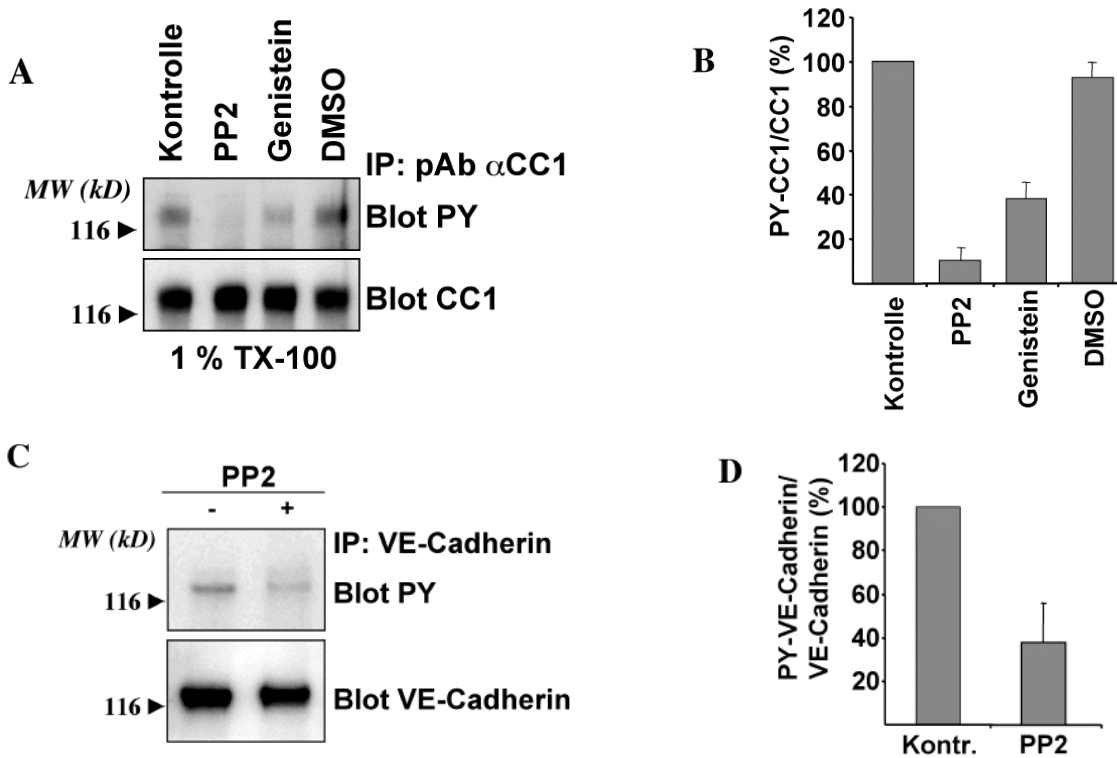


Abb. 59: Die Beteiligung von Tyrosinkinasen der src-Familie bei der Phosphorylierung von CEACAM1-long und VE-Cadherin. Darstellung der Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long in konfluenten RBE/CEACAM1-long-Zellen im Immunblot (A) und relativer Quantifizierung (B). Die Zellen wurden nicht (Kontrolle), mit 5 μ M PP2, 10 μ M Genistein oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt (30 min, 37°C) und lysiert. CEACAM1 wurde immunpräzipitiert (pAb α CC1) und im Immunblot auf phospho-Tyrosin (PY)- und präzipitierter CEACAM1-Gesamtmenge hin untersucht. (C) Darstellung und (D) Quantifizierung der VE-Cadherin-Tyrosinphosphorylierung in konfluenten RBE/CEACAM1-long-Zellen ohne (-) oder mit (+) PP2-Vorbehandlung, wie in (A). (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen)

Zellkontakt-vermittelte Phosphorylierung an den Tyrosinresten Y488 und Y513

Die CEACAM1-long-Isoform der Ratte besitzt zwei phosphorylierbare Tyrosinreste in ITIM-Sequenzmotiven, die zusammen ein imperfektes ITAM oder ITSM-Motiv bilden. Um zu testen, welches der beiden Tyrosine Zelldichte-abhängig phosphoryliert wird, wurden die Tyrosin-Einzelmutanten Y488F und Y513F während der Zellkontaktformation auf Tyrosinphosphorylierung hin getestet. (Alle CEACAM1-Isoformen und Mutanten konnten, wie zuvor gezeigt, in konfluenten RBE-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz an den Zellgrenzen lokalisiert werden, siehe Abb. 34). Im Immunblot, nach Lyse konfluenten Zellen und Immunpräzipitation der CEACAM1-Moleküle, zeigten beide Tyrosin \rightarrow Phenylalanin-Mutanten eine detektierbare Phosphorylierung an Tyrosinresten (Abb. 60A). Die Stärke der phospho-Tyrosinsignale der Einzelmutanten betrug, verglichen mit dem Signal der langen, beide phosphorylierbaren Tyrosine enthaltenden CEACAM1-long-Isoform, je nur ca. 50% (Abb.

60B). Daraus lässt sich ableiten, dass beide Tyrosine während der Zellkontakt-Formation phosphoryliert werden und beide zu gleichen Teilen zur beobachteten CEACAM1-long Tyrosinphosphorylierung beitragen. (Für diese Untersuchungen wurden gleichstark CEACAM1-exprimierende Klone gewählt). Auch ließ sich die Tyrosinphosphorylierung beider Mutanten durch Vorinkubation mit dem src-Familie-spezifischen Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 ohne Unterscheidung deutlich reduzieren.

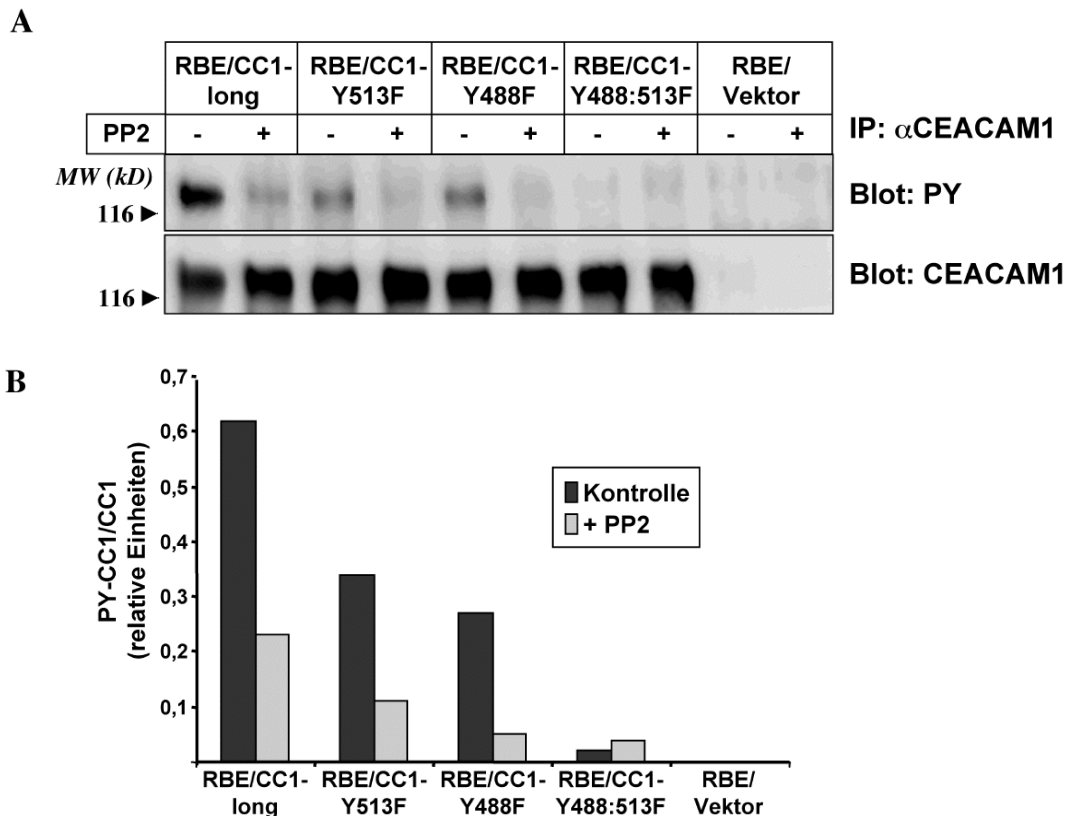


Abb. 60: Zellkontakt-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long an Tyr488 und Tyr513. Darstellung der PP2-inhibierbaren Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long und CEACAM1-long-Tyrosineinzelmutanten. Konfluente RBE/CEACAM1-long (RBE/CC1-long)-, RBE/CEACAM1-longY488F (RBE/CC1-Y488F)-, RBE/CEACAM1-longY513F (RBE/CC1-Y513F)-, RBE/CEACAM1-longY488:513F (RBE/CC1-Y488:513F)- oder RBE/Vektor-Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) PP2 vorinkubiert (5 μ M, 30 min, 37°C) und anschließend lysiert. CEACAM1 wurde immunpräzipitiert und im Immunblot (A) auf Tyrosinphosphorylierung (PY, mAb 4G10) bzw. nach Strippen auf die präzipitierte CEACAM1-Gesamtmenge hin untersucht. (B) Quantifizierung der relativen Tyrosinphosphorylierung aus (A).

Tyrosinphosphorylierung von Membranmikrodomänen-assoziiertem CEACAM1

Tyrosinkinasen der src-Familie sind N-terminal durch eine Myristyl- oder Palmityl-Fettsäureacylkette posttranslational modifiziert und durch diesen hydrophoben Anteil in zellulären Membranen verankert (Resh, 1994). Diese Modifikation wird als Hauptursache für die be-

scharbene Membranmikrodomänen-Lokalisation von Familienmitgliedern der src-Kinase angesehen. Da für die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung während der Zellkontakt-Formation die Aktivität von src-Kinasen eine unabdingbare Voraussetzung war, bestand die Möglichkeit, dass die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 direkt durch src-Kinasen in Membranmikrodomänen erfolgte. Um dies zu testen, wurde untersucht, ob CEACAM1-long-Moleküle nach Zelllyse in CHAPS-Puffer, Dichtegradientenzentrifugation und Immunpräzipitation aus den Fraktionen geringer oder hoher Dichte unterschiedlich phosphoryliert vorliegen. Dazu wurden die Fraktionen 1 bis 5 zu einer Population geringer Dichte und die Fraktionen 6-10 zu einer Population hoher Dichte zusammengefasst (Abb. 61A).

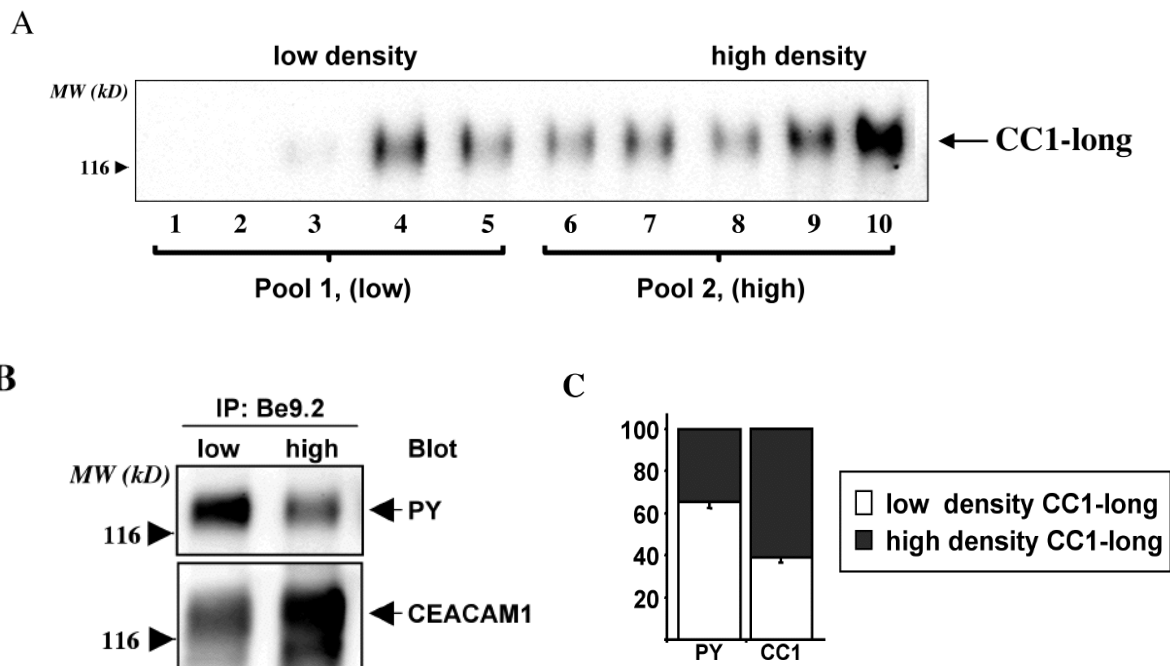


Abb. 61: Mikrodomänen-assoziiertes CEACAM1-long ist stark Tyrosin-phosphoryliert. Konfluente RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden mit CHAPS solubilisiert und durch Dichtegradientenzentrifugation in Fraktionen niedriger und hoher Dichte aufgetrennt. Eine Teilprobe wurde in (A) durch Immunblot hinsichtlich der CEACAM1-Verteilung analysiert. Fraktionen geringer Dichte (1-5, *low density*, low) wurden in der Population 1 (Pool1) und Fraktionen hoher Dichte (6-10, *high density*, high) in der Population 2 (Pool2) zusammengefasst und mit mAb Be9.2 immunpräzipitiert. Präzipitiertes CEACAM1-long aus low und high density Pools wurde anschließend im Immunblot (B) auf Tyrosinphosphorylierung (PY, mit mAb 4G10) und CEACAM1-Gehalt hin überprüft. (C) Quantifizierung der Ergebnisse aus (B). Darstellung als low und high density-assoziiertes phospho-Tyrosin (PY) bzw. CEACAM1 der insgesamt detektierbaren PY- bzw. CEACAM1-Menge in % (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen).

Nach Zugabe von 0,2% SDS zur Zerstörung möglicher vesikulärer Strukturen wurden CEACAM1-Moleküle immunpräzipitiert und im Western-Blot analysiert. Die Detektion mit phospho-Tyrosin- und CEACAM1-spezifischen Antikörpern ergab, dass die CEACAM1-long-Population aus Fraktionen geringer Dichte nur etwa ein Drittel der detektierbaren

Gesamtmenge an CEACAM1 ausmacht. Diese "*low density*"-CEACAM1-Population ist jedoch, verglichen mit der CEACAM1-long Population aus Fraktionen höherer Dichte, viel stärker an Tyrosinresten phosphoryliert (Abb. 61B).

Eine Quantifizierung von drei verschiedenen Versuchen ist in Abb. 61C gezeigt. Obwohl nur ein Drittel der CEACAM1-long-Moleküle Mikrodomänen-assoziiert vorliegen, zeigte sich, dass diese zwei Drittel der detektierbaren phospho-Tyrosinsignale auf sich vereinigen (Abb. 61C). Die Tyrosinphosphorylierung per se, ist jedoch kein Kriterium für die Rekrutierung oder Lokalisation in Membranmikrodomänen, da auch außerhalb dieser speziellen Membranbereiche Tyrosin-phosphoryliertes CEACAM1 gefunden werden konnte (nicht aufschwimmendes CEACAM1-long). Weiterhin hatte auch die Stärke der Tyrosinphosphorylierung oder die Phosphorylierbarkeit keinen Einfluss auf die Menge an aufschwimmenden CEACAM1-long-Molekülen, was in Versuchen mit Pervanadat-behandelten Zellen (führt zu einer Tyrosinphosphorylierung von fast 100% der in RBE-Zellen exprimierten CEACAM1-long-Moleküle) oder mit CEACAM1-long-Tyrosindoppelmutante Y488:513F-Zellen getestet wurde (nicht gezeigt).

Cholesterin-Depletion reduziert die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung

Wenn die beobachtbare Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long nach Zellkontakt-Formation durch Kinasen der src-Familie in Membranmikrodomänen erfolgte, so sollte die M β CD-vermittelte Cholesterin-Depletion der Plasmamembran zu einer Beeinträchtigung der in Mikrodomänen-ablaufenden enzymatischen Reaktionen (wie z.B. der Tyrosinphosphorylierung) führen. Um dies zu überprüfen, wurden frisch konfluente RBE/CEACAM1-long-Zellen mit steigenden Konzentrationen M β CD inkubiert. Nach Solubilisation der Zellen in 1% n-Octyl- β -D-glucopyranosid und darauf folgender Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse zeigte sich eine Konzentrations-abhängige Reduktion der detektierbaren Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long (Abb. 62A und B). Während niedrige M β CD-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long zeigten, war ab einer Konzentration von 20 mM eine starke Reduktion der Tyrosinphosphorylierung detektierbar und betrug nach Inkubation mit 30 mM nur noch 8% der nicht behandelten Kontrolle. Verglichen mit der verminderten Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1 zeigte sich die Tyrosinphosphorylierung am VE-Cadherin (dass, wie oben gezeigt, nicht Membranmikrodomänen-assoziiert vorliegt) nur geringfügig durch steigende Konzentrationen M β CD beeinflusst (Abb. 62C und D). Da zur Darstellung der VE-Cadherin- und CEACAM1-long-Tyro-

sosphorylierung dieselben Zellysate verwendet wurden, deutet die verschiedenartige Beeinflussung durch Cholesterin-Depletion auf unterschiedliche Phosphorylierungsmechanismen am VE-Cadherin und CEACAM1-long an Zell-Zell-Kontakten hin. Während CEACAM1 nach Erreichen der Zellkonfluenz in Membranmikrodomänen Cholesterin- und src-Kinasen-abhängig Tyrosin-phosphoryliert wird, ist die Zelldichte-abhängige Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin unabhängig von Membranmikrodomänen, unbeeinflusst vom Cholesterin-Entzug und nur teilweise durch die Inhibierung von src-Kinasen vermindert.

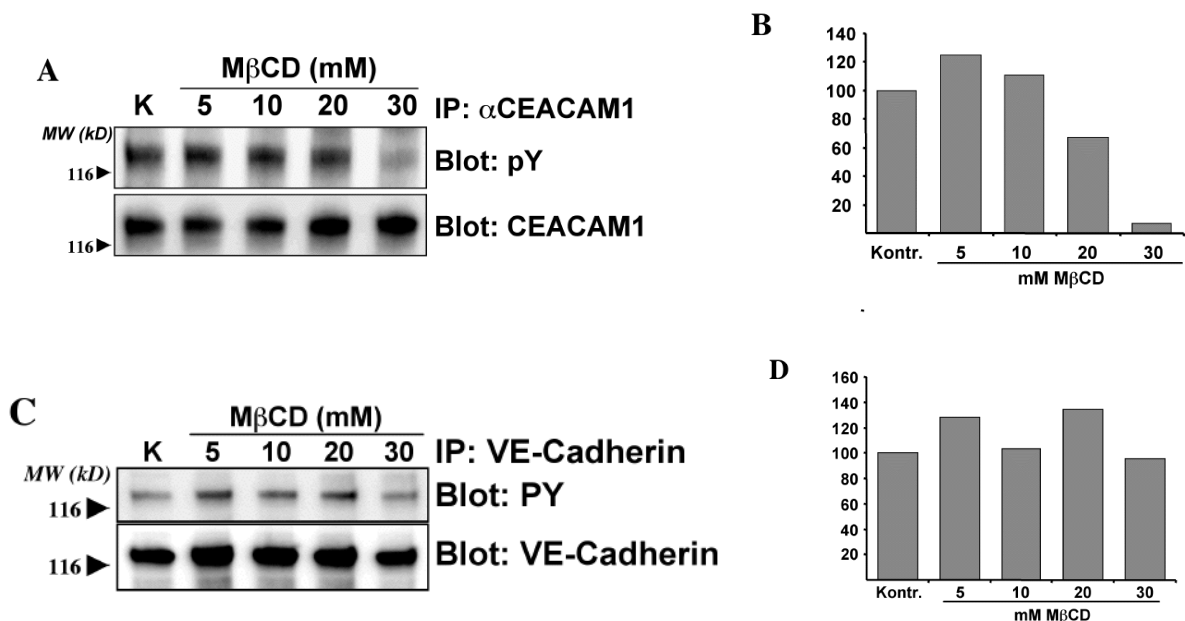


Abb. 62: Cholesterin-Abhängigkeit der Zellkontakt-vermittelten CEACAM1-long- und VE-Cadherin-Tyrosinphosphorylierung. RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, ohne (Kontrolle, K) oder mit 5, 10, 20 oder 30 mM Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) vorbehandelt (20 min, 37°C) und lysiert. Aus denselben Solubilisaten wurden CEACAM1- oder VE-Cadherin-Moleküle präzipitiert und im Immunblot auf Tyrosinphosphorylierung (PY, oben) am CEACAM1-long (A) oder am VE-Cadherin (C) oder auf die Gesamtmenge (unten) präzipitierter CEACAM1- bzw. VE-Cadherin-Proteine hin untersucht. Graphische Darstellung der relativen Tyrosinphosphorylierung an (B) CEACAM1-long und an VE-Cadherin (D) an Hand eines ausgewählten, repräsentativen Versuchs.

Koimmunpräzipitation von SHP-2 und Kolokalisation in konfluenten Zellen

Ein relativ gut charakterisierter Bindungspartner des Tyrosin-phosphorylierten CEACAM1-long ist die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 (PTP1D). In *in vitro*-Bindungsstudien konnte die Bindung und Aktivierung von SHP-2 durch CEACAM1-long auf die Interaktion der beiden SH2-Domänen der Phosphatase mit phosphorylierten Tyrosinresten Y488 und Y513 der

zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1-long gezeigt werden (Huber et al., 1999). Voraussetzung für die erfolgreiche SHP-2-Bindung war jedoch die Phosphorylierbarkeit beider Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil. Bereits die Mutation eines Tyrosinrestes in Phenylalanin genügte, um die SHP-2-Bindung zu verhindern. Unter den oben beschriebenen Bedingungen der Zellkontakt-Formation wurden beide Tyrosinreste des CEACAM1-long src-Kinase-abhängig phosphoryliert. Daher bestand die Möglichkeit, dass eine Interaktion von CEACAM1-long und SHP-2 an RBE-Zellgrenzen erfolgen konnte.

Dies wurde nun durch Koimmunpräzitationen getestet. Wie im Immunblot gezeigt, konnte in Immunpräzitationen von CEACAM1-Molekülen aus frisch konfluenten RBE/CEACAM1-long-Zellen eine signifikante Menge SHP-2 kopräzipitiert nachgewiesen werden (Abb. 63A). Die Kopräzipitation von SHP-2 war spezifisch für CEACAM1-long und konnte nicht in Immunpräzipitaten der Tyrosin-Einzelmutanten Y488F oder Y513F, der Tyrosin-Doppelmutante Y488:513F, RBE/Vektor-, CEACAM1/short- oder RBE/ Δ Cyto-Zellen detektiert werden (Abb. 63B).

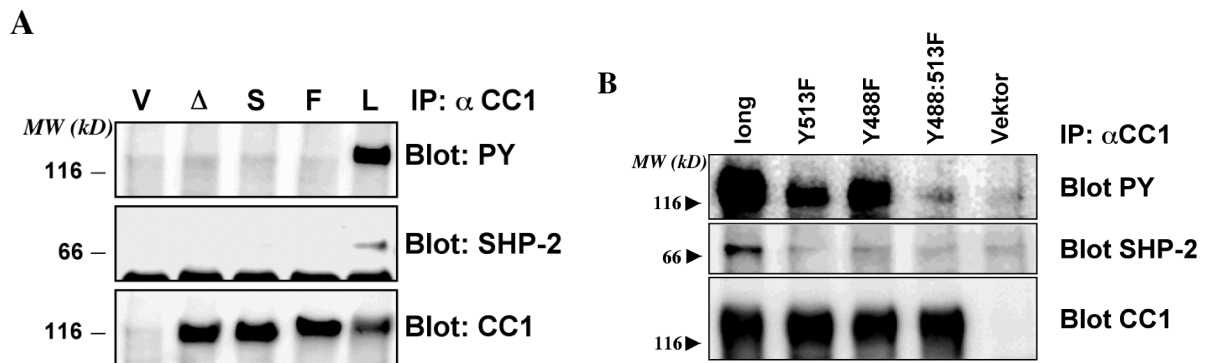


Abb. 63: In konfluenten Zellen bindet Tyrosin-phosphoryliertes CEACAM1-long die phospho-Tyrosin-abhängige Proteinphosphatase SHP2 (PTP-1D). RBE/CEACAM1-Transfektanten (long (L), short (S), Δ Cyto (Δ), longY488:513F (F) longY488F und longY513F) oder RBE/Vektor-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und in 1% TX-100 lysiert. CEACAM1 wurde anschließend mit pAb anti-CEACAM1 (α CC1) immunpräzipitiert und im Western-Blot auf Tyrosinphosphorylierung (PY, mAb 4G10) und kopräzipitierende SHP-2-Moleküle hin analysiert. Zusätzlich wurde die präzipitierte Menge CEACAM1 (CC1, mAb Be9.2) bestimmt.

Indirekte Immunfluoreszenzen von SHP-2 und CEACAM1-long in gerade konfluent gewordenen RBE-Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zeigten ferner eine deutliche Kolokalisation beider Moleküle in Zellkontaktbereichen (Abb. 64A und B). Jedoch konnte die Kolokalisation beider Proteine nicht in 100% aller Zellkontakte beobachtet werden; gelegentlich konnte kein SHP-2 in CEACAM1-positiven Zellgrenzen lokalisiert werden,

sondern war diffus im Zytosol verteilt. Eine diffuse zytoplasmatische SHP-2-Verteilung konnte auch in superkonfluenten Präparaten, die bereits mehr als drei Tage konfluent waren, beobachtet werden. In spärlich ausgesähten Zellen konnte ebenfalls keine Kolokalisation beider Proteine nachgewiesen werden, obwohl CEACAM1-long bereits in den Zellkontaktarealen aufzufinden war. SHP-2 befand sich zu diesem Zeitpunkt aber erneut diffus im Zytosol verteilt, oder wurde gelegentlich im Zellkern angefärbt.

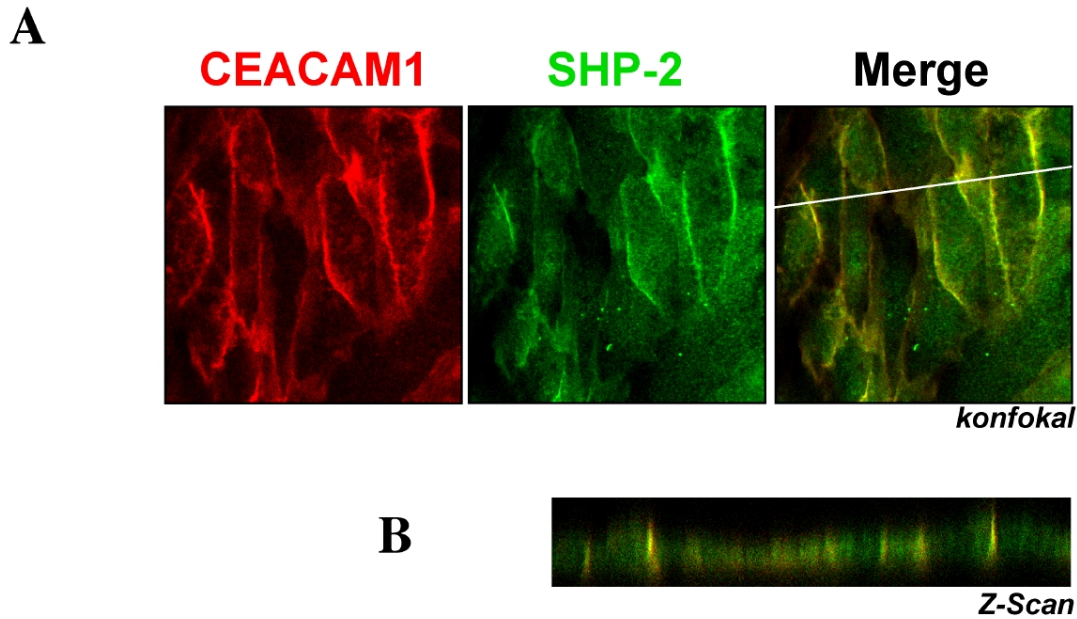


Abb. 64: Kolokalisation von SHP-2 und CEACAM1 an Zellkontaktarealen in RBE-Zellen. (A) Frisch konfluente RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden fixiert und permeabilisiert. Die CEACAM1-Verteilung wurde mit Hilfe von pAb anti-CEACAM1 und RhodaminRed-X-gekoppelten anti-Kaninchen sekundär-Antikörpern und die SHP-2 Lokalisation mit mAb anti-SHP-2 Antikörpern und Cy2-gekoppelten anti-Maus sekundär-Antikörpern in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Pinhole = 20) ermittelt und durch Überlagerung der Bilder (Merge) dargestellt. Gelbe Bereiche zeigen die Kolokalisation beider Moleküle. **(B)** Z-Scan durch den in (A, rechtes Bild) mit weißer Linie gekennzeichneten Bereich zur Darstellung der Kolokalisation beider Proteine an Zell-Zell-Kontakten.

Die Lokalisation von SHP-2 in Zellkontakten von RBE-Zellen konnte zum Zeitpunkt der Konfluenz aber auch unabhängig von der CEACAM1-long-Expression beobachtet werden, was durch indirekte Immunfluoreszenz von Vektor- oder CEACAM1-short-Transfektanten gezeigt werden konnte (nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass SHP-2 sowohl mit PECAM als auch mit VE-Cadherin an Zellkontakten interagieren kann.

Cholesterin-Abhängigkeit der CEACAM1-long / SHP-2-Interaktion

Eine Behandlung frisch konfluent gewordener RBE/CEACAM1-long-Zellen mit 15 mM M β CD zeigte eine deutliche Verringerung der mit CEACAM1-long kopräzipitierbaren Menge SHP-2 (Abb. 65A). Quantifizierung der im CEACAM1-long-Präzipitat detektierbaren SHP-2-Moleküle zeigte, dass nach Cholesterin-Depletion 50% weniger SHP-2 nachgewiesen werden konnte, obwohl die Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1 mit 95% der Kontrolle fast vollständig erhalten blieb (Abb. 65B).

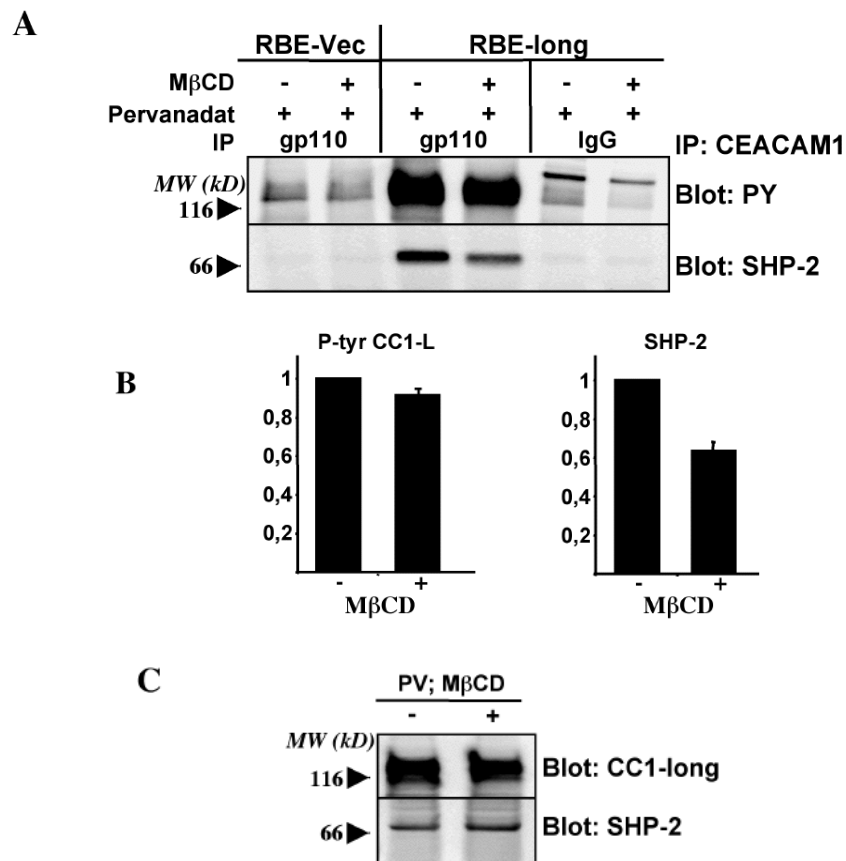


Abb. 65: Cholesterin-Abhängigkeit der SHP-2/CEACAM1-long-Interaktion. Konfluente RBE/-CEACAM1-long (RBE-long)- oder RBE/Vektor (RBE-Vec)-Zellen wurden für 20 min mit 15 mM (+) oder ohne (-) Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) inkubiert und zusätzlich für 5 min mit Pervanadat (PV) behandelt. CEACAM1 wurde mit pAb anti-CEACAM1 immunpräzipitiert und (A) im Immunblot auf Tyrosinphosphorylierung (PY) und kopräzipitierende SHP-2-Moleküle hin untersucht. Gereinigte IgGs (IgG) aus Prä-Immuneserum dienten zur Kontrolle. (B) Quantifizierung der Ergebnisse in (A) Tyrosinphosphorylierung des CEACAM1-long (P-Tyr-CC1-L) sowie der kopräzipitierbaren Mengen SHP-2 (SHP-2) mit (+) und ohne (-) M β CD-Behandlung. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen). (C) Western-Blot-Analyse der in (A) verwendeten Lysate zur Detektion gleicher Proteinmengen an CEACAM1-long und SHP-2 mit (+) und ohne (-) M β CD-Behandlung und Pervanadat-Stimulation (PV; M β CD).

Zur Quantifizierung der Ergebnisse mussten die Zellen jedoch mit Pervanadat vorstimuliert werden, um miteinander vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Diese Vorbehandlung von RBE/CEACAM1-long-Zellen führt jedoch auch in spärlich ausplattierten Zellen zu einer deutlich detektierbaren Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1-long und folglich auch zur Koimmunpräzipitation von SHP-2-Molekülen.

Unter diesen Bedingungen kann daher nicht mehr nur die durch Zellkontakt-Formation ausgelöste Tyrosinphosphorylierung und Interaktion von CEACAM1-long mit SHP-2 dargestellt werden, sondern es wird die maximal koimmunpräzipitierbare Menge an SHP-2-Molekülen dargestellt. Hierauf hat die Cholesterin-Depletion aber eine deutlich negative Wirkung, was nicht durch veränderte Mengen an CEACAM1 und SHP-2 nach Pervanadat-Behandlung in den löslichen Überständen der Zelllysate erklärt werden kann (siehe Western-Blot Abb. 65C). Da unter CHAPS-Bedingungen nur CEACAM1-long in der Lage war, SHP-2-Moleküle zu binden, kann auch eine Assoziation beider Moleküle in derselben Membranmikrodomäne ausgeschlossen werden. Vielmehr zeigte sich nach indirekter Immunfluoreszenz, dass die M β CD-Behandlung konfluenten RBE-Zellen eine Translokation von SHP-2, weg von Zell-Zell-Kontakten ins Zytosol, zur Folge hatte (nicht gezeigt). Die Cholesterin-Depletion führt daher zu einer räumlichen Trennung beider Moleküle, wodurch die kopräzipitierbare Menge stark reduziert wird.

CEACAM1-abhängige Inhibition der Zellproliferation nach TGF- β -Stimulation

Einfluss von CEACAM1 auf die Proliferation unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

In epithelialen Zellkultursystemen und auch in Tumoren besitzt die lange Isoform des CEACAM1, in Abhängigkeit vom Mengenverhältnis beider natürlich vorkommender transmembranärer Isoformen, eine wachstumsinhibierende Funktion, deren funktioneller Mechanismus zur Zeit nicht geklärt ist. Endothelzellen sind im ruhenden Zustand wachstumsinhibiert, können während angiogenetischer Phasen jedoch kurzzeitig proliferativ aktiv werden. Da CEACAM1 der Ratte sowohl in ruhenden als auch in angiogenetisch aktiven Endothelzellen exprimiert wird, lag die Vermutung nahe, dass CEACAM1 auch in Endothelzellen regulierend auf das Zellwachstum einwirken kann.

Um den Einfluss der CEACAM1-Expression auf die Proliferation von Endothelzellen zu analysieren, wurden RBE/wt-Zellen und RBE/CEACAM1-long-Transfektanten unter normalen Zellkulturbedingungen (+10% FCS) oder unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren sowie Faktoren die die Immunantwort von Endothelzellen regulieren können, getestet (Abb. 66). Durch BrdU-Einbau in die zelluläre DNA konnte das proliferative Verhalten der Zellen quantifiziert werden und die für RBE/wt-Zellen ermittelten Werte mit denen für RBE/CEACAM1-long-Zellen verglichen werden. Unter normalen Zellkulturbedingungen zeigten RBE/wt-Zellen und RBE/CEACAM1-long-Zellen vergleichbare Proliferationsraten mit einer Verdopplungsgeschwindigkeit von ungefähr 24 h (Coulter-Counter, nicht gezeigt). Die Teilungsrate beider Zelllinien konnte durch Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF oder VEGF, durch Stimulation mit ATP oder durch den immunmodulatorisch wirkenden Cocktail TNF α / IFN γ gesteigert werden. Auswirkungen der CEACAM1-long-Expression konnten jedoch nicht beobachtet werden. Ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluss auf die Teilungsrate von RBE-Zellen zeigten die Faktoren aFGF, lösliches CEACAM1 aus CHO-Zellkulturüberständen (CHO 51) sowie Insulin oder TNF α . Beide Zelllinien zeigten durch die verwendete PMA-Konzentration eine leichte Reduktion der Proliferation, wahrscheinlich infolge einer zu hohen Dosierung des PMA und dadurch bedingten Zelltod. Nur unter dem Einfluss von TGF- β zeigte sich eine Diskrepanz der Teilungsraten von RBE/wt- und CEACAM1-exprimierenden Zellen. Während RBE/wt-Zellen kaum durch TGF- β -Stimulation beeinflusst wurden, zeigten RBE/CEACAM1-long-Zellen

eine deutliche Reduktion der unter 10% FCS-Einfluss ermittelten Teilungsrate. Verglichen mit unstimulierten RBE/CEACAM1-long-Kontrollzellen zeigten TGF- β behandelte CEACAM1-long-Zellen eine Inhibition der Proliferation um 50%. Wt-Zellen waren in manchen Versuchen mit TGF- β gar nicht und in anderen Versuchen nur gering wachstumsinhibiert (bis zu 20%), zeigten aber nie eine mit CEACAM1-long-exprimierenden Zellen vergleichbar starke Inhibition der Zellproliferation.

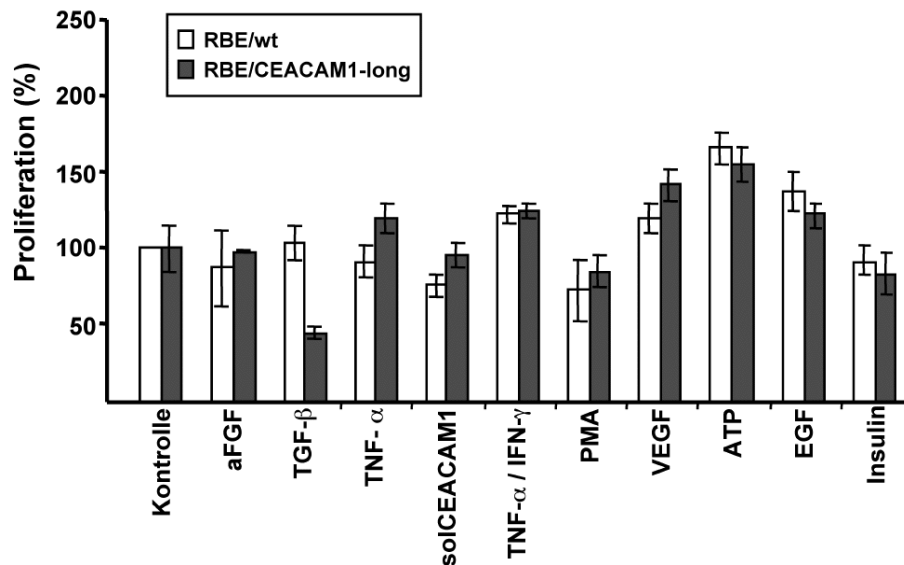


Abb. 66: Auswirkung der CEACAM1-long-Expression in RBE-Zellen auf die Zell-Proliferation. RBE/wt-Zellen (weiße Balken), bzw. RBE/CEACAM1-long-Transfektanten (graue Balken) wurden bis zur Konfluenz kultiviert, abgelöst und je 10.000 Zellen pro Loch einer 96well-Platte plattiert. Die Zellen wurden sofort mit Wachstumsfaktoren oder anderen Stimuli behandelt, über Nacht inkubiert und anschließend für 6-8 h in frischem Medium mit neuen Wachstumsfaktoren oder anderen Stimuli mit BrdU inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und der Einbau von BrdU im ELISA bei 405 nm vermessen. Darstellung der Proliferation in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (RBE/wt, 100%). (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen in dreifacher Ausführung). (Kontrolle: Standardkulturbedingungen (RPMI +10% FCS), aFGF: azidischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (25 ng/ml), TGF- β : Transformierender-Wachstumsfaktor- β 1 (500 pg/ml), TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α (10 ng/ml), solCEACAM1: lösliches CEACAM1, IFN- γ : Interferon- γ (100 ng/ml), PMA: 12-myristyl-13-acetyl-Phorbol-13-acetat (10 nM), VEGF: Vaskular-Endothelialer-Wachstumsfaktor (10 ng/ml), ATP: Adenosintriphosphat (100 μ M), EGF: Epidermaler-Wachstumsfaktor (100 ng/ml))

Konzentrations-Abhängigkeit der CEACAM1-abhängigen TGF- β -vermittelten Proliferationshemmung

TGF- β wirkt bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (unterer Pikogramm-Bereich) Proliferations-hemmend auf Epithelzellen und auch auf Endothelzellen. Jedoch sind auch Proliferations-fördernde Wirkungen, in Abhängigkeit von der TGF- β -Konzentration, für Endothelzellen beschrieben worden (Myoken et al., 1990). Im Folgenden wurde nun eine Konzentrations-

Abhängigkeit für die durch TGF- β -Stimulation erzeugte Wachstumsinhibition ermittelt (Abb. 67). RBE-Zellen zeigten unter den gewählten Bedingungen (+10% FCS) und den verabreichten Konzentrationen (62,5-2000 pg/ml) keinen 2-phasigen Wirkungsverlauf, sondern in allen Ansätzen eine Inhibition der Zellproliferation. Eine inhibitorische Wirkung konnte in beiden Zelllinien bereits durch Zugabe von 62,5 pg/ml TGF- β festgestellt werden, fiel aber bereits bei Verwendung dieser geringen Konzentration deutlich stärker in CEACAM1-exprimierenden Zellen aus (Reduktion von 20% in wt-Zellen gegenüber 55% in CEACAM1-long-Zellen). Eine Erhöhung der TGF- β -Konzentration führte in beiden Zelllinien zu einer Konzentrations-abhängigen verstärkten Inhibition der Zellproliferation, die sich in wt-Zellen in einer bis 30%igen Hemmung der Teilungsrate auswirkte (2000 pg/ml), und sich in RBE/CEACAM1-long-Zellen sogar bis zu einer 75%igen Reduktion der Proliferation steigern ließ.

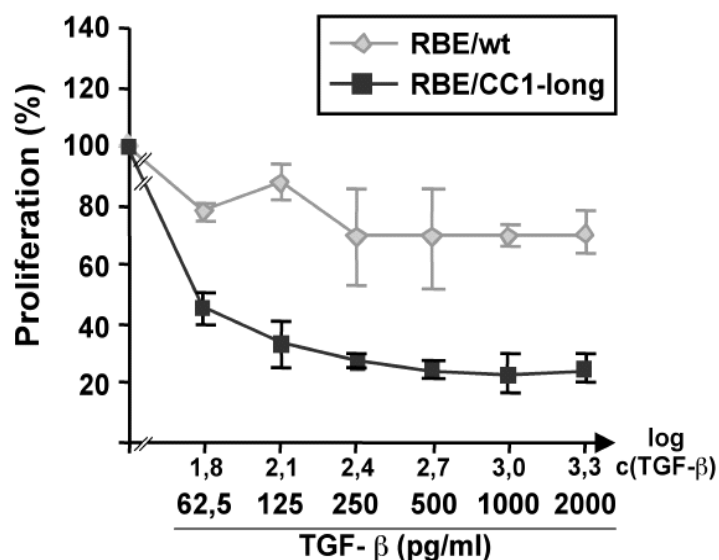


Abb. 67: Konzentrations-Abhängigkeit der CEACAM1-abhängigen, TGF- β -vermittelten Inhibition der Proliferation. 1×10^4 RBE/ wt-Zellen (hellgraue Linie) oder RBE/CEACAM1-long (dunkelgraue Linie) exprimierende Zellen wurden in 96well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen (62,5 -2000 pg/ml) oder ohne TGF- β über Nacht inkubiert und anschließend mit neuem Medium ohne, oder mit TGF- β , und mit BrdU für 6-8 h markiert. Der Einbau von BrdU wurde im ELISA-Platten-Reader bei 405 nm vermessen und die Werte zur unbehandelten Kontrolle (100%) in Bezug gesetzt. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei verschiedenen Versuchen in dreifacher Ausführung).

Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long nach TGF- β -Stimulation

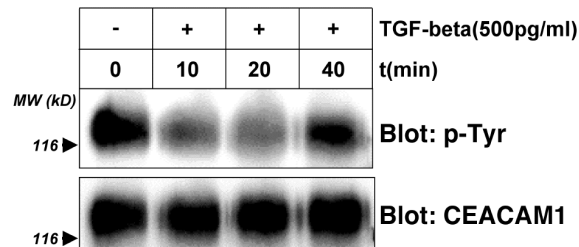
Während TGF- β -vermittelte Signale hauptsächlich über zytosolische Proteine der SMAD-Familie weitergeleitet werden, die nach Aktivierung in den Zellkern translozieren und die transkriptionelle Aktivität einer Vielzahl von Genen regulieren, sind auch kurzfristige, Phosphorylierungs-abhängige Signalkaskaden beschrieben worden. Diese können die Aktivität von src-

Kinasen oder auch der kleinen GTPase Ras regulieren (Mulder, 2000). Dies führte zur Hypothese, dass CEACAM1-long in Abhängigkeit von der TGF- β -Stimulation unterschiedlich Tyrosin-phosphoryliert vorliegen, und durch Rekrutierung phospho-Tyrosin-spezifischer Effektoren in die Wachstumsregulation von RBE-Zellen eingreifen könnte. Um dies zu testen, wurde die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung nach TGF- β -Stimulation in einer Kinetik untersucht. Dazu wurden Serum-starvierte RBE/CEACAM1-long-Zellen für 10, 20 oder 40 min mit 500 pg/ml TGF- β stimuliert, innerhalb der letzten 5 min jeweils zusätzlich mit Pervanadat behandelt, und lysiert. Nach Immunpräzipitation von CEACAM1-Molekülen wurde im Western-Blot unter Verwendung phospho-Tyrosin-spezifischer Antikörper untersucht, ob CEACAM1 unterschiedlich phosphoryliert vorlag. Unstimulierte Zellen zeigten unter diesen Bedingungen eine deutliche Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long, die aber bereits nach 10 min Inkubation mit TGF- β reduziert und nach 20 min sehr stark verringert war (Abb. 68A). Erst 40 min nach Zugabe von TGF- β zeigte sich die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung erholt und erreichte wieder die Signalstärke der unbehandelten Vergleichswerte. Die Menge an präzipitierten CEACAM1-Molekülen zeigte sich in Reblots in allen Proben identisch. Dies zeigt, dass die TGF- β -Stimulation von RBE-Zellen eine Auswirkung auf die Aktivität intrazellulärer Tyrosinkinase oder Tyrosin-abhängiger Phosphatasen hat, die sich auch auf die messbare Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long niederschlägt. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob es zu einer verringerten Phosphorylierung oder einer verstärkten Dephosphorylierung von CEACAM1-long kommt. Da durch die Pervanadat-Zugabe jedoch primär zelluläre Phosphatasen inhibiert werden, ist eine verringerte Tyrosinphosphorylierung eher wahrscheinlich.

Unter ähnlichen Bedingungen wurde nun untersucht, ob beide Tyrosinreste, Y488 und Y513, der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1 nach TGF- β -Stimulation dephosphoryliert vorliegen (Abb. 68B). Dabei zeigte sich, dass 15 min nach TGF- β -Stimulation nur CEACAM1-long und die CEACAM1-longY513F-Mutante eine unterschiedliche Tyrosinphosphorylierung aufwiesen. Die Tyrosinphosphorylierung der Y488F-Mutante änderte sich im untersuchten Zeitrahmen dagegen nicht. Eine Phosphorylierung der Tyrosin-Doppelmutante Y488:513F konnte dagegen auch unter Pervanadat-Bedingungen nicht nachgewiesen werden, was die Spezifität des phospho-Tyrosin-Signals am CEACAM1 hervorhebt. Leider konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen (spärlich wachsende RBE-Zellen) kaum eine Tyrosinphosphorylierung am CEACAM1 nachgewiesen werden, wenn auf Pervanadat verzichtet wurde. Es bleibt aber festzustellen, dass sich vor allem die Phosphorylierung am Tyrosin

Y488 durch TGF- β regulieren lässt, was auf eine mechanistisch unterschiedliche Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste des CEACAM1-long hinweist, die sich mechanistisch deutlich von der Zellkontakt-vermittelten Tyrosinphosphorylierung unterscheidet.

A



B

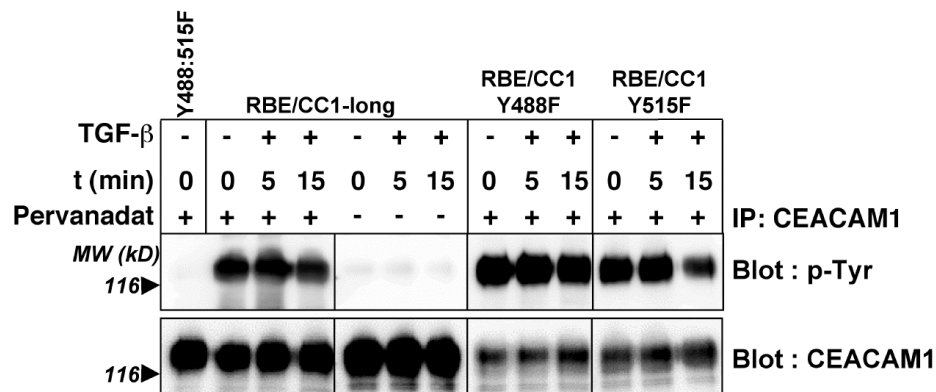


Abb. 68: Verringerte Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 nach TGF- β -Stimulation. (A) RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden nicht (t = 0) oder für 10, 20 bzw. 40 min mit 500 pg/ml TGF- β stimuliert. Zusätzlich wurden alle Zellen 5 min vor dem Solubilisieren mit Pervanadat (100 μ M) inkubiert. CEACAM1-long wurde mit pAb anti-CEACAM1 immunpräzipitiert und anschließend im Western-Blot auf Tyrosinphosphorylierung (mAb PY99) (oben) bzw. nach Strippen mit Be9.2 auf die präzipitierte Menge CEACAM1 (unten) hin untersucht. (B) RBE/CEACAM1-long (RBE/CC1-long)-Zellen oder Tyrosin-Einzelmutanten RBE/CEACAM1-longY488F (RBE/CC1-Y488F) bzw. -Y513F (RBE/CC1-Y513F) oder die Tyrosin-Doppelmutante RBE/CEACAM1-longY488:513F (Y488:513F) wurden nicht, oder für 5 bzw. 15 min mit TGF- β (500 pg/ml) stimuliert und zusätzlich mit Pervanadat behandelt (5 min). Nach Solubilisierung der Zellen wurde mit pAb anti-CEACAM1 immunpräzipitiert und im Western auf Tyrosinphosphorylierung (mAb PY99) (oben) bzw. nach Strippen auf die präzipitierte CEACAM1-Menge (unten) hin untersucht.

Proliferationshemmung nach Deletion der zytoplasmatischen Domäne und TGF- β -Stimulation

Nachdem die veränderte Tyrosinphosphorylierung an Tyr488 nach TGF- β -Stimulation gemessen wurde, wurde nun untersucht, welche Bedeutung die zytoplasmatische Domäne auf die Proliferations-hemmende Wirkung von TGF- β besitzt. Dazu wurden RBE/CEACAM1-

Δ Cyto-Zellen hinsichtlich ihrer durch TGF- β -Gabe vermittelten Inhibition der Zellproliferation mit RBE/wt- und CEACAM1-long-exprimierenden Zellen verglichen (Abb. 69). Wie schon für CEACAM1-long-Zellen gezeigt, waren überraschend auch CEACAM1- Δ Cyto-Zellen Konzentrations-abhängig durch TGF- β -Stimulation wachstumshemmt. Während die Inhibition der wt-Zellen, wie oben beschrieben, nur ca. 20% betrug, waren CEACAM1- Δ Cyto-exprimierende RBE-Zellen bereits durch 0,5 ng/ml um 45% bzw. bei 1 ng/ml um 55% im Wachstum inhibiert und zeigten eine mit CEACAM1-long-Zellen vergleichbare, wenn auch etwas geringer ausfallende, Wachstumshemmung (55% bei 0,5 ng/ml und 70% bei 1 ng/ml TGF- β). Ähnliche Resultate wie für Δ Cyto-Zellen wurden auch für CEACAM1-short-exprimierenden Zellen, mit Tyrosin-Einzelmutanten sowie der Tyrosin-Doppelmutante erhalten (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die CEACAM1-abhängige Inhibition der Proliferation nach TGF- β -Stimulation nicht von der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1 ausgeht. Vielmehr zeigt sich, dass allein die Oberflächenexpression von CEACAM1-Molekülen auf RBE-Zellen ausreichend ist, um die gegenüber wt-Zellen beobachtete, verstärkte Inhibition zu verursachen.

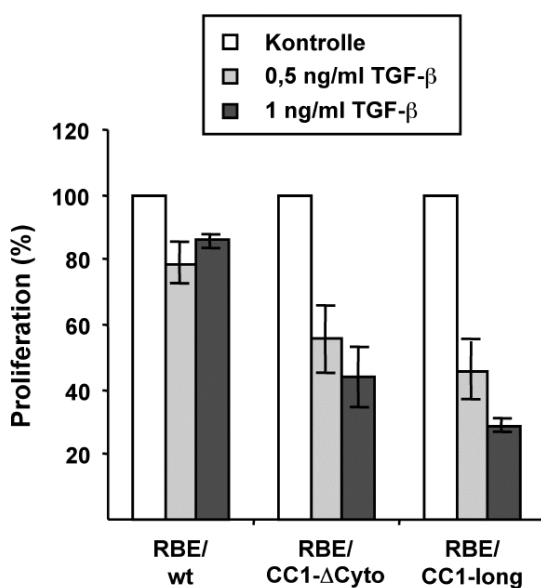


Abb. 69: Die CEACAM1-abhängige TGF- β -vermittelte Inhibition der Proliferation ist unabhängig von der Präsenz der zytoplasmatischen Domäne. 1×10^4 RBE/wt-, RBE/CEACAM1-long (CC1-long)- oder RBE/CEACAM1- Δ Cyto (CC1- Δ Cyto)- Zellen wurden über Nacht ohne (Kontrolle, weiße Balken), mit 0,5 ng/ml (hell graue Balken) oder 1 ng/ml TGF- β stimuliert, am nächsten Tag restimuliert und mit BrdU markiert. Die Inhibition durch TGF- β ist dargestellt als Abnahme der Zellproliferation in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (100%) der jeweiligen Zelllinie. (Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei verschiedenen Versuchen in dreifacher Ausführung).

Ob CEACAM1 mit TGF- β -Rezeptoren in einem Komplex auf RBE-Zellen vorliegt, oder ob deren Anzahl und/oder Affinität zu TGF- β durch die CEACAM1-Expression erhöht ist, ist zur Zeit nicht bekannt. TGF- β -Rezeptoren auf RBE-Zellen konnten mit käuflich erworbenen Antikörpern nicht im Immunblot detektiert werden (auch nicht nach Präzipitation), da sie wahrscheinlich in zu geringer Anzahl exprimiert werden. Auch eine mögliche Bindung von

CEACAM1 an Endoglin oder eine direkte Interaktion von TGF- β mit extrazellulären Domänen des CEACAM1 ist noch nicht weiter untersucht worden.

Zytosol-Kern-Translokation von SMAD-Proteinen nach TGF- β -Stimulation

Aufgrund der Problematik bei der Darstellung der TGF- β -Rezeptoren auf der RBE-Zelloberfläche und die damit verbundenen fehlenden funktionellen und mechanistischen Daten wurde die Signaltransduktion ausgehend von aktivierten TGF- β -Rezeptoren an Hand der Rezeptor-SMAD-Aktivierung (R-SMADs) untersucht. Auf Endothelzellen werden zeitgleich zwei unterschiedliche TGF- β -Rezeptoren des Typ-I exprimiert. Es handelt sich hierbei um die Aktivin-ähnlichen Rezeptoren (*Activin-Like-Kinases*, ALK) ALK1 und ALK5 (Goumans et al., 2002). Während ALK5 im Zusammenspiel mit TGF- β -Rezeptoren des Typ-II (TGF β R-II) vornehmlich für die Inhibition der Zellproliferation verantwortlich gemacht wird, wird dem ALK/TGF β R-II-Komplex auf Endothelzellen eine eher differenzierende Wirkung zugeschrieben (Goumans et al., 2003b). Aktivierte ALK1/TGF β R-II-Dimere induzieren die spezifische Serin-Phosphorylierung und Aktivierung von SMAD1 und SMAD5, während die Aktivierung von ALK5 die SMAD2- und SMAD3-Phosphorylierung induziert. Aufgrund der Zytosol-Kern-Translokation nach Phosphorylierung der SMADs konnte die Aktivierung beider Signalwege durch indirekte Immunfluoreszenz nach TGF- β -Stimulation verfolgt und analysiert werden (Abb. 70A und B). Wurde die SMAD2/3-Verteilung in RBE-Zellen nach TGF- β -Zugabe analysiert, so zeigte sich, dass bereits nach 15 min eine deutliche Anhäufung von SMAD-2/3-Proteinen im Zellkern messbar war, die nach 30 min Inkubation noch zunahm. Eine differenzielle Aktivierung von SMAD2/3-Proteinen in RBE/Vektor- oder RBE/CEACAM1-long-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Ein etwas anderes Bild zeigte sich hinsichtlich der SMAD1/5-Aktivierung durch den möglichen ALK1-Rezeptor-Signalweg. Während CEACAM1-long-Zellen weder vor noch nach Stimulation mit TGF- β eine Akkumulation von SMAD1 oder -5 im Zellkern zeigten, war in RBE/Vektor-Zellen bereits vor der Stimulation eine Anreicherung von SMAD1/5 im Kern zu beobachten. Diese ließ sich jedoch durch TGF- β -Zugabe nicht weiter modulieren.

Die Befunde deuten darauf hin, dass der ALK5/TGF β R-II-Signalweg in beiden Zelllinien funktioniert, d.h., sowohl RBE/Vektor- als auch RBE/CEACAM1-long-Zellen exprimieren die hierfür erforderlichen Rezeptoren und SMAD-Proteine. Der ALK1/TGF β R-II-Signalweg

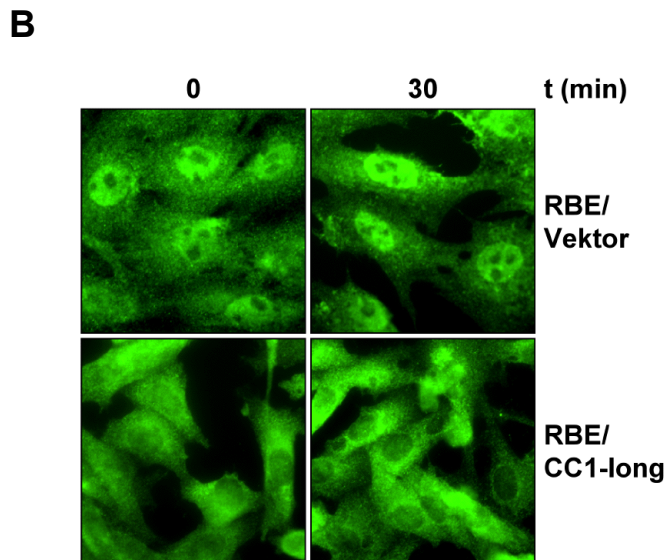
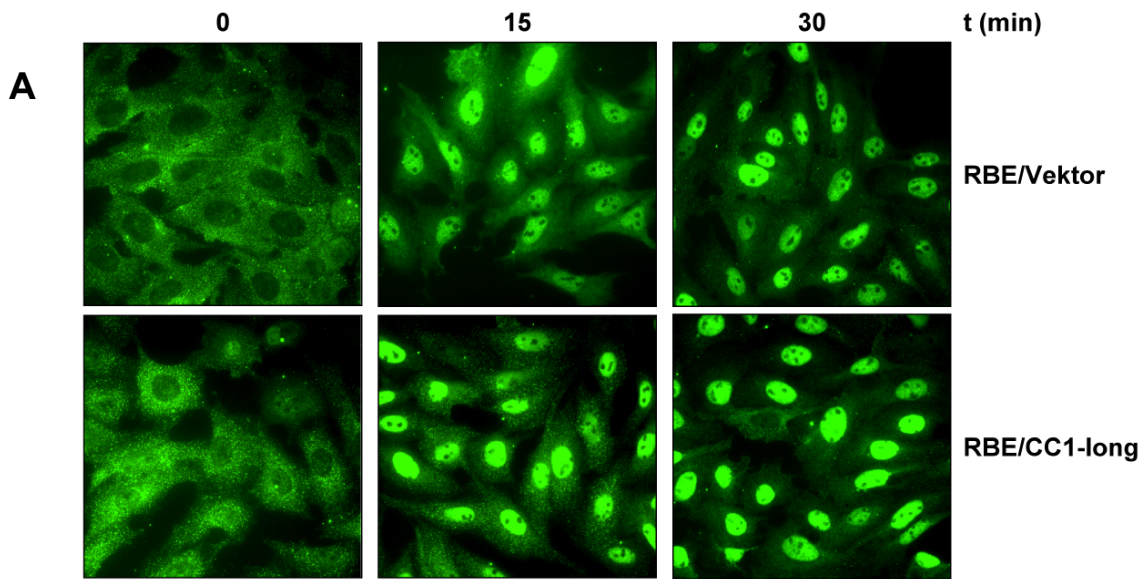


Abb. 70: Zytosol-Kern-Translokation von SMADs in RBE-Zellen nach TGF- β -Stimulation. RBE/Vektor- oder RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-Zellen wurden im nicht konfluenten Zustand nicht ($t=0$) oder mit 500 pg/ml TGF- β für 15 oder 30 min (**A**) oder nur 30 min (**B**) stimuliert, mit PFA fixiert und permeabilisiert. Die Lokalisation von SMAD-2/3- (**A**) und SMAD1/5-Proteinen (**B**) wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe von mAb anti-SMAD und Cy2-gekoppelten Sekundär-Antikörpern dargestellt. (Originalvergrößerung: x 400 (A) bzw. x 600 (B)).

scheint dagegen aber nur in RBE/Vektor-Zellen funktionell zu sein, ließ sich aber durch extrazelluläre Zugabe von TGF- β nicht zusätzlich aktivieren. Die CEACAM1-Expression in RBE-Zellen scheint daher eher ALK5-Signalwege nach TGF- β -Stimulation zu begünstigen, was mit der beobachteten Inhibition der Proliferation konform geht. Quantitative Analysen zur Aktivierung der SMAD-Proteine durch Kern-Zytosol-Trennungen könnten hier weitere Anhaltspunkte liefern.

Regulation der p27^{Kip}-Protein-Expression nach TGF- β -Stimulation

Einen weiteren Hinweis auf die ungestörte Signalweiterleitung, ausgehend von aktivierten ALK5-Rezeptoren in beiden Zelllinien, lieferte die Analyse der veränderten Proteinexpression von SMAD2/3-regulierten Genen. TGF- β -Stimulation von Endothelzellen erhöht, unter anderem, die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p27^{Kip}. Immunblots von RBE/wt-Zellen oder CEACAM1-long-Transfektanten, die für 16 h mit TGF- β stimuliert wurden, zeigten beide eine verstärkte Expression von p27^{Kip} auf Proteinebene. Diese nahm im Vergleich zu unstimulierten Zellen um den Faktor 4,5 (wt-Zellen) bzw. 2,5 (CEACAM1-long-Zellen) zu (Abb. 71). Eine stärkere Expression des Inhibitors in wt-Zellen war aufgrund der Proliferationsdaten nicht unbedingt erwartet worden. Für die Zellzykluskontrolle ist aber nicht nur ein Inhibitor ausschlaggebend, sondern vielmehr das Zusammenspiel vieler Zellzyklus-regulierender Kinasen und deren Aktivatoren sowie Inhibitoren. Bisher konnten andere Zellzyklus-Inhibitoren aber noch nicht untersucht werden.

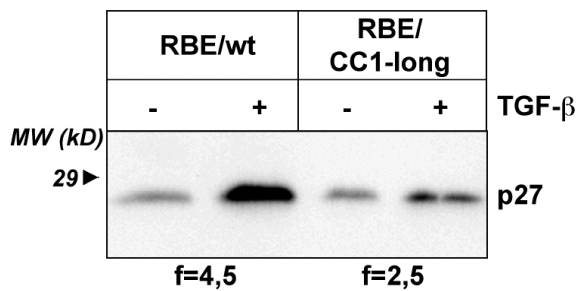


Abb. 71: Zunahme der p27^{Kip}-Expression in RBE-Zellen nach Behandlung mit TGF- β . RBE/wt- und RBE/CEACAM1-long (CC1-long)-Zellen wurden nicht (-) oder mit (+) 500 pg/ml TGF- β stimuliert und nach Zellyse (1% TX-100, 0,3% SDS, 500 mM NaCl) im Western-Blot auf die Expression von p27^{Kip} (p27) hin untersucht. f= 4,5 (RBE/wt) und f=2,5 (RBE/CC1-long) zeigen die Steigerung der Expression zur jeweiligen un-behandelten Probe an.

Morphologische Veränderungen von RBE-Zellen induziert durch TGF- β

Die Inkubation von RBE/wt- oder RBE/CEACAM1-Zellen mit TGF- β über längere Zeiträume (3 Tage) führte in beiden Zelllinien zusätzlich zu einer veränderten Zellmorphologie. Während dieser Inkubationsdauer erreichten unstimulierte Zellen den Zustand der Konfluenz und zeigten eine pflastersteinartige Morphologie. TGF- β -behandelte Zellen zeigten dagegen eine eher spindelartige, fibroblastoide Morphologie, die in CEACAM1-exprimierenden Zellen viel stärker ausgeprägt erschien als in wt-RBE-Zellen. Aber auch RBE/wt-Zellen zeigten eine deutliche morphologische Veränderung (Abb. 72).

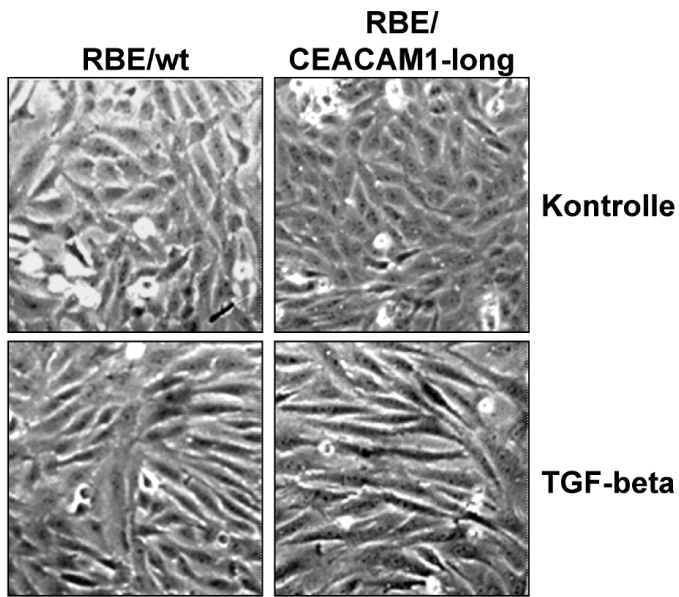


Abb. 72: Morphologische Veränderungen nach TGF-beta Stimulation. RBE/wt- oder RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden 3 Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen (Kontrolle) oder im spärlichen Zustand für drei Tage mit TGF- β (500 pg/ml) stimuliert. Zellmorphologien wurden durch Fotografieren im Phasenkontrast dokumentiert. (Originalvergrößerung: x 100).