

## Diskussion

### CEACAM1 auf Gefäßendothel der Ratte

Während der Vaskulogenese und Angiogenese müssen Endothelzellen koordiniert auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen reagieren, darunter Signale von löslichen Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix-Kontakt-vermittelte Signale, und Signale, ausgelöst durch die Formation von Zell-Zell-Kontakten (Bazzoni et al., 1999; Friedlander et al., 1995; Gale und Yancopoulos, 1999; Yang et al., 1999). Kürzlich konnte eine Beteiligung des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM1 während angiogenetischer Prozesse *in vitro* und *in vivo* in Studien mit löslichen CEACAM1-Isoformen aufgezeigt werden (Ergün et al., 2000). Zusätzlich zu löslichen Isoformen, die im Serum verstärkt nach pathologischen Veränderungen gefunden werden (Budt et al., 2002b; Draberova et al., 2000), sind auf Endothelzellen der Ratte, der Maus und des Menschen auch transmembranäre CEACAM1-Isoformen exprimiert. Während in der Maus und in der Ratte die beiden Hauptisoformen (CEACAM1-short und CEACAM1-long) konstitutiv auf großen Gefäßen und Kapillaren exprimiert werden, zeigt CEACAM1 im humanen System eine eingeschränkte Expression, begrenzt auf angiogenetisch aktives Gefäßendothel der Kapillaren (Becker et al., 1989; Prall et al., 1996).

Dass CEACAM1 auf angiogenetisch aktiven Gewebe exprimiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit an Hand von Gewebeschnitten des wachsenden Morris-Hepatom-7777 bestätigt und somit auf die Spezies Ratte ausgeweitet werden. Allerdings wurde zusätzlich, wie erwartet, die CEACAM1-Expression auch im ruhenden Gefäßendothel des adulten Tieres (Ratten-Hirn) gefunden.

Bis Heute ist es Niemandem gelungen CEACAM1 exprimierende Primärkulturen von Maus- oder Ratten-Endothelzellen anzulegen, so dass die Funktion dieses Moleküls, exprimiert auf diesem Zelltyp, bis zu diesem Zeitpunkt schwer zu analysieren war. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren alle Endothelzellen, die nach der Methode von J. Folkman aus unterschiedlichen Geweben der Ratte oder der Maus (Fettgewebe, Pankreas, Gehirn) generiert wurden, CEACAM1-negativ. Trotz intensiver Bemühungen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Matrices konnte die endogene Expression von CEACAM1 auf RBE-Zellen auch nicht wieder hergestellt werden.

Die Schwierigkeit der kontinuierlichen Isolierung primärer Endothelzellen aus Rattengewebe, und die damit verbundenen Schwankungen in Reinheit, Unterschiedlichkeit und verschiedenartiger Funktionalität von frisch isolierten Endothelzell-Primärkulturen (Lang et al., 2003), wurde durch stabile Transfektion mit CEACAM1-cDNA umgangen. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise war die Möglichkeit der Analyse unterschiedlicher Mutanten von CEACAM1, wodurch die Spezifität der beobachteten Ergebnisse bekräftigt werden konnte. Da Endothelzellen ihren einzigartigen Charakter in der Zellkultur aufgrund fehlender Stimuli (lösliche Faktoren oder Blutstrom im Allgemeinen) aber recht schnell verlieren können (Hewett und Murray, 1993), sollten die vorliegenden Ergebnisse als *in vitro*-Resultate angesehen werden. Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der zellbiologischen Konsequenz der Expression von transmembranären CEACAM1-Isoformen auf Endothelzellen hinsichtlich dynamischer, Angiogenese-ähnlicher Prozesse, die in zukünftigen Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden müssen.

Da die Endothelzellen-Gewinnung aus dem Rattengehirn als besonders einfach beschrieben wurde, wurden die ersten Versuche der Primärzellen-Generierung mit diesem Gewebe durchgeführt. Endothelzellen des Gehirns sind jedoch als einzigartig anzusehen, da sie, im Gegensatz zu Endothelzellen anderer Organe, besonders stabil ausgeprägte Tight-Junctions besitzen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden. Daher wurde versucht, Endothelzellen der Hirnhaut zu generieren, die diese Art der Spezialisierung nicht zeigen. Eine Kontamination mit Endothelzellen aus inneren Gehirnbereichen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### **CEACAM1 auf Mikrogliazellen**

In den Vorarbeiten zur Gewinnung von CEACAM1-positiven Endothelzellen aus dem Gehirn adulter Ratten konnte im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer Zelltyp des Gehirns als CEACAM1-exprimierend dargestellt werden. Die Mikrogliazellen aus Kokulturen/Primärkulturen mit Ratten-Astrozyten konnten erstmalig durch RT-PCR-Analyse als CEACAM1-positiv dargestellt werden. Sowohl CEACAM1-long- als auch CEACAM1-short-Transkripte und mindestens eine weitere, vermutlich eine lösliche Isoform, konnten auf mRNA-Ebene dargestellt werden. Erste FACS-Analysen zur Oberflächenexpression von CEACAM1 auf Mikrogliazellen zeigten ebenfalls ein positives Ergebnis (nicht gezeigt). Auf Proteinebene erwies sich die CEACAM1-Expression auf Mikroglia aber nur schwach ausgeprägt. Daher

könnte es sein, dass die Darstellung der CEACAM1-Expression auf Mikroglia in Gewebeschnitten aufgrund der geringen Antigenkonzentration und des geringen Vorkommens dieses Zelltyps bisher misslang. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass Mikroglia im ruhenden, sog. ramifizierten Zustand, sehr lange Zellausläufer in das umliegende Gewebe aussenden, wodurch die Zelloberfläche über ein weiträumiges Areal verteilt, d.h., die lokale Antigenkonzentration weiter verringert wird. Da die Zellen aber bereits mehrere Tage in Primärkultur wuchsen und während der Präparation mechanischen Reizen ausgesetzt waren, könnte es auch zu einer unabsichtlichen Aktivierung der Mikroglia gekommen sein. Aktivierte Mikroglia differenzieren innerhalb kurzer Zeit zu phagozytierenden Gewebemakrophagen. Dabei ändern sie das Expressionsmuster ihrer Oberflächenantigene durch Protein-Neusynthese, z.B. ihr Repertoire an Adhäsionsmolekülen (Hailer et al., 1997). CEACAM1 könnte daher auch ein Aktivierungs-spezifischer Mikrogliamarker sein. Diese Möglichkeit wurde in den bisherigen Versuchen aber nicht überprüft und sollte in zukünftigen Untersuchungen genauer analysiert werden.

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit konnte die Expression von CEACAM1 auf Mikroglia der Maus bestätigt und ferner eine CEACAM1-abhängige Infiltration des Mäusegehirns durch Maus-Hepatitis-Viren über Mikroglia-Zellen aufgezeigt werden (Nakagaki und Taguchi, 2005).

### **CEACAM1-abhängige Beeinflussung der Matrixprotein-bedingten Zellmorphologie, Migration und Regulation Integrin-vermittelter Signalwege**

Die dargestellten Befunde, dass CEACAM1 einen motilen Phänotyp von Endothelzellen auf Matrigel und den gereinigten extrazellulären Matrixproteinen Laminin-1 und Vitronektin (aber nicht Fibronektin) vermittelt, sind von besonderer biologischer Bedeutung, da Laminine wesentliche Bestandteile der endothelialen Basalmembran sind und Vitronektin-reiche Matrices vorwiegend während angiogenetischer Vorgänge beobachtet werden (Clark et al., 1996). Die präsentierten Ergebnisse deuten daher auf eine mögliche Beteiligung von CEACAM1 während angiogenetischer Vorgänge und im Besonderen während der Aktivierungsphase von Endothelzellen hin, wenn Zellen die Basalmembran degradieren, penetrieren und in das darunterliegende hypoxische Gewebe einwandern.

Über den Mechanismus der in Monolayer-Wundheilungsversuchen ermittelten gesteigerten Migration nach CEACAM1-Transfektion und die beobachtete Dissoziation von Zellen kann zur Zeit nur spekuliert werden. Alle CEACAM1-Isoformen, unabhängig von der Länge oder des Vorhandenseins der zytoplasmatischen Domäne, lokalisierten jedoch an Zell-Zell-Kontaktregionen, so dass eine mögliche, von CEACAM1-Molekülen-abhängige Modulation der Stabilität endothelialer Zell-Zellverbindungen, wie den Tight- und/oder Adherens-Junctions, durchaus vorstellbar wäre. In der vorliegenden Arbeit wurde die genaue Lokalisation von CEACAM1 in Zellkontaktarealen nicht weiter untersucht, aber epithelialen, vollständig polarisierten MDCK-Zellen konnten Sundberg et al. eine zumindest partielle Kolokalisation von CEACAM1-Molekülen mit E-Cadherin in Adherens-Junctions demonstrieren. Die Auswirkungen der CEACAM1-Lokalisation in Adherens-Junctions sind zur Zeit nicht untersucht, aber Effekte auf die Organisation desmosomaler Cadherine und gestörte Desmosomen-Stabilität nach CEACAM1-Transfektion konnten gezeigt werden (Sundberg et al., 2004). Ob eine Kolokalisation mit VE-Cadherin in Adherens-Junctions von RBE-Zellen vorliegt, muss derweil noch untersucht werden.

Eine Verringerung der endothelialen Zell-Zell-Adhäsion widerspricht auch nicht der Funktion von CEACAM1, als homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül zu fungieren. Vielmehr zeigt es die Möglichkeit einer Zellstatus-spezifischen Regulation und Modulation der adhäsiven Eigenschaften von CEACAM1 auf. Dies korreliert mit den Befunden der Arbeitsgruppe von Björn Öbrink, die die CEACAM1-Verteilung in sich entwickelnden Ratten-Gehirnen untersuchte (Sawa et al., 1994). In diesen Studien zeigte sich, dass die CEACAM1-Expression auf Endothelzellen nicht automatisch zu einer Anhäufung an Zellkontakten führte, sondern, je nach Entwicklungsphase, eine Lokalisation an Kontaktstellen zu Perizyten oder eine luminale Ausrichtung zu beobachten war. Die CEACAM1-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion kann *in vivo* also nur zu bestimmten Phasen der endothelialen Morphogenese, während der Vaskulogenese oder Angiogenese, beobachtet werden. Außerdem korreliert die in der vorliegenden Arbeit dargestellte, nach CEACAM1-Transfektion gefundene, erhöhte Motilität der RBE-Zellen mit Befunden mit epithelialen NBT-II-Zellen. NBT-II-Zellen zeigen nach einer Wachstumsfaktor-hervorgerufenen epithelialen-mesenchymalen-Transition (EMT) eine erhöhte Expression von CEACAM1 (Hunter et al., 1994), aber auch ein verstärktes Zell-Scattering und eine drastische Zunahme der Motilität. Für Endothelzellen wird eine EMT-ähnliche Transition während der Aktivierungsphase der Angiogenese von einigen Forschergruppen proklamiert, die sich an Hand morphologischer Unterschiede von spärlich-wachsenden oder konfluenten Endothelzel-

len ausmachen lässt (Dejana, 2004) und ähnlich auch nach Verwundung des Monolayers gefunden wird.

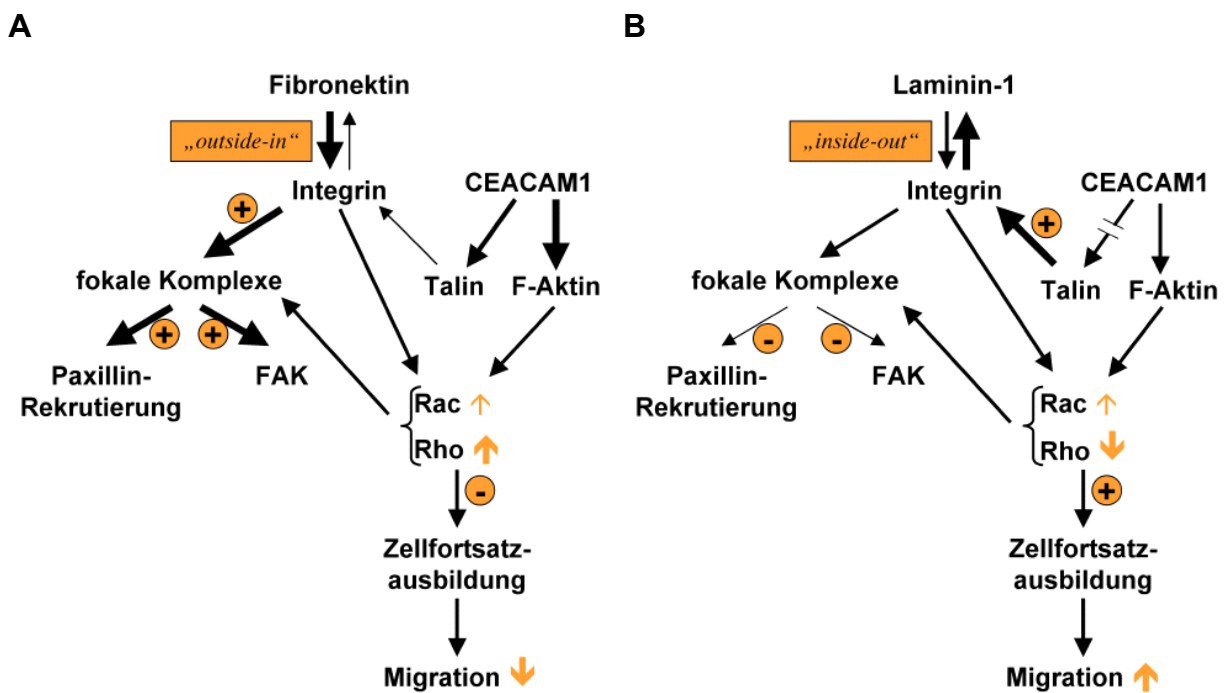
Eine erhöhte Zellmigration wurde ebenfalls nach Transfektion von Melanozyten oder Melanomzelllinien mit CEACAM1-long-cDNA gefunden. Hier zeigte sich aber eine Abhängigkeit des migratorischen Verhaltens von der Phosphorylierbarkeit des Tyr488 (Ebrahimnejad et al., 2004) oder eine Abhängigkeit von der Expressionsrate des Aktin-bindenden Proteins Filamin. Eine Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long konnte in migrierenden RBE-Zellen nicht detektiert werden. Auch zeigte CEACAM1-short eine ähnliche Erhöhung der Motilität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in RBE-Zellen eine Steigerung der Migration erfolgt, die unabhängig von der Phosphorylierbarkeit von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne ist. Die Expression von Filamin bzw. dessen Interaktion mit CEACAM1-Molekülen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Jedoch können CEACAM1-long und CEACAM1-long-Tyrosindoppelmutanten mit Filamin aus RBE-Zellen koprizipitiert werden (pers. Mitteilung E. Klaile, AG Lucka), so dass die erhöhte Migration vielleicht mit einer Filamin-Interaktion im Zusammenhang steht.

Adhäsion und Migration von Zellen auf extrazellulären Matrixbestandteilen sind vornehmlich abhängig von der Expression und Funktion von Integrinen. Diese Tatsache und die beobachteten Effekte der CEACAM1-Expression auf die Adhäsions-vermittelte Zellmorphologie und Migration deuten stark auf eine funktionelle Überschneidung, einen sog. "*Cross-Talk*", zwischen Integrin-Signalwegen und CEACAM1-vermittelten Signalen in endothelialen Zellen hin. Ein möglicher "*Cross-Talk*" des CEACAM1 zu Integrinen wurde bereits von mehreren Forschergruppen nach Befunden mit unterschiedlichen Zellsystemen postuliert: So beeinflussen anti-CEACAM1-Antikörper die Funktion von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen in neutrophilen Granulozyten und B-Zellen (Greicius et al., 2003; Nair und Zingde, 2001; Skubitz et al., 2000). Eine direkte Interaktion *in cis* von Tyrosin-phosphoryliertem CEACAM1-long mit  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheiten sowie Paxillin wurde in Granulozyten, epithelialen Zellen, HUVECs oder invasiv einwachsenden Trophoblasten beobachtet (Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2000). Zusätzlich hierzu ist Tyrosin-phosphoryliertes CEACAM1-long in der Lage, mit Tyrosin-Kinasen der src-Familie und den Protein-Tyrosin-Phosphatasen-1C und -1D (SHP-1 und SHP-2) zu interagieren (Brümmer et al., 1995; Huber et al., 1999; Skubitz et al., 1995), die essentiell an Integrin-vermittelten Signalkaskaden beteiligt sind (Cary et al., 2002; Felsenfeld et al., 1999; Oh et al., 1999; Yu et al., 1998). In Granulozyten konnte zusätzlich, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, eine Interaktion mit Talin durch Koimmunpräzipitation

dargestellt werden (Ebrahimnejad et al., 2000). Die Interaktion von CEACAM1-long und Talin in suspendierten Granulozyten ließ sich nach Aussage der Autoren aber nur schwach ausgeprägt darstellen. Dies entspricht den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, dass sich die Interaktion mit Talin nur in adhätierenden Zellen nicht aber in Zellen in Suspension finden lässt.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zur CEACAM1-vermittelten Beeinflussung von Integrin-abhängigen Signalwegen in dieser und anderen Arbeiten zeigt sich, dass es in Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps, des analysierten Integrins bzw. der verwendeten Matrixproteine mechanistische Unterschiede des "CEACAM1-Integrin-Cross-Talks" gibt. Da RBE-Zellen kaum detektierbare Mengen an  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheiten exprimieren und  $\beta$ 3-Integrine nicht die Adhäsion zu Lamininen (aber möglicherweise zu Fibronektin) vermitteln (van der Flier und Sonnenberg, 2001), scheint die Beeinflussung der Integrin-Signalwege in RBE-Zellen unabhängig vom  $\beta$ 3-Integrin zu geschehen. Auch eine Assoziation mit Paxillin während des Anheftens konnte zu keiner Zeit und auf keiner Matrix beobachtet werden. Dafür wurde in RBE-Zellen eine zytoskelettale Assoziation von CEACAM1-long-Molekülen während der Zell-Matrixprotein-Adhäsion detektiert. Die Zytoskelett-Assoziation *per se* ist aber nicht der entscheidende Parameter, der die Integrine und die Zellmorphologie von RBE-Zellen beeinflusst, da sie sowohl auf Laminin-1 als auch Fibronektin beobachtet wurde. Vielmehr deutet alles darauf hin, dass die nur während der Adhäsion auf Fibronektin darstellbare Assoziation von CEACAM1 und Talin für den "Cross-Talk" entscheidend ist. Talin ist für die "inside-out"-Aktivierung von Integrinen ein wichtiger Bestandteil (Calderwood et al., 2004). Die fehlende Assoziation von CEACAM1- und Talin während der Adhäsion auf Laminin-1 und Laminin-1-reichen Matrices wie Matrigel könnte daher der Auslöser für eine verstärkte Interaktion von Talin mit zytoplasmatischen Domänen von  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten und deren Aktivierung sein. Dies könnte, im Zusammenspiel mit der Aktivität Zytoskelett-regulierender GTPasen der Rho-Familie, eine lokale und zeitliche Veränderung der Integrin-Aktivitätsmuster bewirken und zu verringerter "Reifung" primärer fokaler Kontaktstellen führen. Diese Annahme würde mit den Befunden der gleichartigen phospho-Tyrosin-Färbung von fokalen Adhäsionen, der verringerten Anzahl Paxillin-enthaltender fokaler Komplexe sowie der verringerten Aktivität der *Fokalen Adhäsionskinase* (FAK) in CEACAM1-exprimierenden Zellen übereinstimmen. Zusammen mit der Rekrutierung von Aktin in Lamaellipodium-artige Strukturen könnte es dann zur Zellfortsatz-Formation und somit zu gesteigerter Zellmotilität auf Laminin-1 kommen. Anders dagegen das Szenario auf Fibronektin, wenn ein

Teil des Talins von CEACAM1 gebunden wird: Im Zusammenspiel mit der verstärkten Aktivierung von Rho kommt es während der Adhäsion zu einer vornehmlich "outside-in"-Aktivierung der Integrine, begleitet von einer "Reifung" fokaler Komplexe mit starker Paxillin-Rekrutierung, anhaltender FAK-Tyrosinphosphorylierung und dominierender Aktin-Stressfaser-Ausbildung.



**Abb. 73: Modell der Beeinflussung Matrixprotein-vermittelter Signalwege durch CEACAM1.** Adhäsion von RBE/CEACAM1-Zellen auf (A) Fibronectin und (B) Laminin-1. (Erläuterungen siehe Text.)

Für zukünftige Untersuchungen bleibt zu klären, ob Talin direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 interagieren kann oder ob es indirekt über andere zytoplasmatische Proteine in einen CEACAM1-enthaltenen Komplex rekrutiert wird. Da die CEACAM1/Talin-Interaktion in RBE-Zellen nur während der Zell-Matrix-Adhäsion gefunden wurde, und CEACAM1 zu diesem Zeitpunkt auch mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert vorlag, könnten F-Aktin-bindende Proteine eine indirekte Interaktion vermitteln. Dies könnte auch für die Talin/CEACAM1-short-Interaktion zutreffen, denn eine zytoskelettale Anbindung wurde auch für die kurze Isoform beschrieben (Sadekova et al., 2000). Ein interessanter Kandidat hierfür wäre das Filamin, das sowohl direkt mit CEACAM1 (Klaile et al., 2005) als auch mit dem Zytoskelett, GTPasen der Rho-Familie und ebenfalls mit  $\beta$ -Untereinheiten der Integrine interagieren kann (Calderwood et al., 2001).

Bezüglich der GTPasen Rho und Rac1, die für die auf Aktin-basierende Motilität von Zellen zwingend notwendig sind (Hall, 1998), zeigt sich, dass in Abhängigkeit der verwendeten Matrix und der CEACAM1-Expression unterschiedliche Aktivitäten bzw. lokal unterschiedliche Aktivitätsmuster in RBE-Zellen gefunden wurden. Die für CEACAM1-positive Zellen gefundene Rho-Inaktivierung und nötige Rac1-Aktivierbarkeit auf Laminin-1- und Matrigel-Beschichtungen sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Gruppen: So ist die koordinierte Aktivierung und Deaktivierung von Rho und ROCK sowie die temporäre Aktivierung von Rac1 entscheidend für die Adhäsionsmorphologie von HUVECs auf extrazellulären Matrixproteinen. Geringe Rho-Aktivität ist ferner essentiell für die Migration und Chemotaxis von HDMECs und ist unabdingbar für die frühe Netzwerk-Gestaltung auf Matrigel (Cascone et al., 2003; Connolly et al., 2002). Die Rho-Inaktivierung in RBE/CEACAM1-Zellen war vor allem ausschlaggebend für die Zellfortsatz-Formation auf Laminin-1-reichen Matrices und ähnelt damit dem Neuriten-Auswachsen, das ebenfalls von geringer Rho-Aktivierung abhängig ist (Jalink et al., 1994). Für die Zellfortsatz-Formation bedurfte es aber zusätzlich einer zeitlichen und lokalen Aktivierung von Rac1 in Lamaellipodien. Erst dadurch kam es zur Aktinpolymerisation und dem beobachteten motilen Phänotyp. Mutation der Tyrosinreste war für die Zellausläufer-Formation und Rho-Regulierung unerheblich, führte aber zu einer geringfügig veränderten Zellmorphologie, mit deutlich weniger Lamaellipodien. Die CEACAM1-gesteuerte Modulation von Rac1- und Rho-Aktivitäten geschieht daher auf unterschiedlichen Wegen, von denen die Rac1-Modulation Tyrosin-abhängig zu sein scheint. Da allerdings auch CEACAM1-short einen motilen Phänotyp auf Laminin-1 zeigte, können sowohl CEACAM1-long, als auch CEACAM1-short Rac- und Rho-modulierende Signalwege regulieren. Ob sie dies mechanistisch gleichartig oder auf verschiedene Weisen tun, ist zur Zeit nicht bekannt. Mechanistisch gleiche Prinzipien scheinen aufgrund der für beide Isoformen beschriebenen zytoplasmatischen Interaktionen wie zytoskelettale Verankerung, Calmodulin-Bindung oder Assoziation mit Talin zumindest denkbar, aber ein direkter Zusammenhang zur Modulation von Aktivitäten kleiner GTPasen lässt sich zur Zeit nicht erkennen.

Eine weitere ungelöste Frage ist, wie CEACAM1 während der Zell-Matrix-Adhäsion aktiviert wird bzw. in die Integrin-Signaltransduktion involviert wird. Das beobachtete Clustering von CEACAM1-Molekülen auf Laminin-1- oder Matrigel-Beschichtungen könnte hierfür verantwortlich sein, jedoch ist bisher nicht geklärt, ob das Clustering von Außen oder von Innen, z.B. durch die zytoskelettale Verankerung, induziert wird. Daher könnten die Signalmodulierenden Eigenschaften von CEACAM1 auch auf extrazellulärer Seite ihren Ausgangspunkt haben. Während über heterophile Protein-Interaktionen von CEACAM1 *in trans* oder



zu lateralen Bindungspartnern *in cis* wenig bekannt ist, sind die Zuckerstrukturen und Zucker-abhängigen Bindungspartner von CEACAM1 mittlerweile gut untersucht. Zuckerstrukturen wie Lewis<sup>X</sup>, dessen Träger CEACAM1 ist, können die endotheliale Morphogenese auf extrazellulären Matrices ganz entscheidend beeinflussen: so sind Zuckerstrukturen z.B. für die Netzwerk-Formation auf Matrigel essentiell (Nguyen et al., 1993), wobei sie *in cis*-Interaktionen zwischen lateralen Glykoproteinen vermitteln können oder *in trans* über Galektine der extrazellulären Matrix (Nangia-Makker et al., 2000) wirken können. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass sowohl in Matrigel-Päparationen als auch in den käuflich erworbenen, gereinigten Laminin-1-Präparationen hohe Konzentrationen des CEACAM1-bindenden Galektin-3 (Feuk-Lagerstedt et al., 1999) in Western-Blot-Analysen gefunden wurden, während die verwendeten Fibronectin-Präparationen alle Galektin-3-negativ waren. (Dafür aber große Mengen humaner IgGs enthielten).

### **Assoziation von CEACAM1 mit Membranmikrodomänen**

Biologische Membranen bestehen aus einer überraschend großen Anzahl unterschiedlicher Lipide. Diese Heterogenität wäre nicht von Nöten, wenn die Lipiddoppelmembran nur als hydrophobe Barriere zwischen dem extrazellulären und intrazellulären wässrigen Millieu oder als "Lösungsmittel" für Membranproteine fungierte. Vielmehr impliziert diese Mannigfaltigkeit, dass einzelne Lipide der Membran biologische Funktionen ausüben oder durch ihre biophysikalischen Eigenschaften Reaktionen in räumlicher Nähe zur Membran beeinflussen können. Mehrere Befunde mit zellulären Membranen oder Modell-Membran-Systemen deuten an, dass die Vielseitigkeit und Unterschiedlichkeit von Lipiden zur Ausbildung von speziellen Membranmikrodomänen führt. Auf Grund von verschiedenen Affinitäten der Lipide zueinander können sich die Lipidkompositionen im Innern von Mikrodomänen stark von der äußeren Umgebung unterscheiden. Solch eine Kompartimentierung weniger, ausgewählter Lipide in Membranmikrodomänen führt dadurch unweigerlich zu einer lokalen Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der Lipid-Mikrodomäne, verglichen mit den biophysikalischen Eigenschaften der restlichen Membran. Solche lokalen Lipid-Ansammlungen ausgewählter Lipide könnten die biologische Funktion der Lipiddoppelschicht oder von Membranproteinen beeinflussen (Mukherjee und Maxfield, 2004; Schuck et al., 2003).

Biologische Membranen bilden eine flüssige Phase, in der einzelne Lipide ungehindert in zwei Dimensionen lateral diffundieren können (*Fluid-Mosaic-Model*, Singer und Nicolson, 1972). Dieser Zustand bzw. diese Phase wird auch die flüssig-ungeordnete (*liquid-disordered*  $l_D$ ) Phase genannt. Daneben zeigen aber einige Lipide die Neigung, eher mit ihres Gleichen als mit anderen Lipiden zu interagieren, sich also aus der  $l_D$ -Phase zu separieren und Mikrodomänen zu bilden. Zu diesen Lipiden gehören vornehmlich das Cholesterin und Sphingolipide mit ihren langen, gesättigten Fettsäureketten. Die horizontalen Wechselwirkungen der gesättigten, hydrophoben Anteile der Fettsäuren und die starre Konformation des Cholesteringerüsts tendieren dazu, dicht gepackt, geordnet zu aggregieren, während ungesättigte Fettsäureketten aufgrund ihrer gewinkelten Struktur (*gauche*-Konformation der Doppelbindung) zu einer eher lockeren Packung neigen. Cholesterin und Sphingolipide können daher in Modellmembranen eine geordnete Phase bilden, die sog. flüssig-geordnete (*liquid-ordered*  $l_O$ )-Phase, die eine Grundvoraussetzung für Membranmikrodomänen darstellen könnte (Dietrich et al., 2001). Die Eventualität, dass  $l_O$ -Phasen auch in biologischen, zellulären Membranen existieren und ihre Größe bzw. Heterogenität werden zur Zeit viel und kritisch diskutiert (Lichtenberg et al., 2005; Munro, 2003; Pike, 2003; Pike, 2004). Gerade bezüglich ihrer Größe zeigen sich Schwierigkeiten, Mikrodomänen mit gebräuchlichen biochemischen oder biophysikalischen Methoden auf lebenden Zellen darzustellen (Douglass und Vale, 2005; Kenworthy et al., 2004), so dass davon ausgegangen werden muss, dass Mikrodomänen sehr klein (submikroskopisch klein, nur wenige Moleküle groß) sind (Pralle et al., 2000) oder sehr dynamische Aggregate darstellen, die nur transient, mit sehr kurzen Halblebenszeiten existieren (Kusumi et al., 2004). Zahlreiche Befunde zeigen jedoch, dass Cholesterin-Moleküle innerhalb der Membran, und daher theoretisch auch Cholesterin-reiche Mikrodomänen, für die Funktion ausgewählter Proteine von entscheidender Bedeutung sind. So modulieren Cholesterin-reiche Domänen die Signaltransduktion einiger Proteine (Dykstra et al., 2003), vermitteln spezielle Arten der Endozytose (Le Roy und Wrana, 2005), regulieren die Organisation des Zytoskeletts (Oliferenko et al., 1999), sind am Aufbau der Zellpolarität während der Migration (Gomez-Mouton et al., 2001) und dem Sortieren von Membranproteinen beteiligt (Schuck und Simons, 2004), beeinflussen Veränderungen während der Alzheimer-Pathogenese (Cordy et al., 2003) oder die Pathogen-Internalisierung (Manes et al., 2003).

Membranmikrodomänen werden traditionell auch als Detergenz-resistente Membranen (DRMs), Cholesterin-reiche Membranen (*Cholesterin-Enriched Membranes*, CEMs) oder Detergenz-unlösliche Membranen reich an Glykosphingolipiden (*detergent insoluble membranes enriched in glycosphingolipids*, DIGs) bezeichnet. Es gibt immer mehr Hinweise

darauf, dass DRMs nicht zwangsläufig Membranmikrodomänen der intakten Plasmamembran widerspiegeln müssen (Lichtenberg et al., 2005) oder erst durch das verwendete Detergenz erzeugt werden (London und Brown, 2000). Da nur in Modellmembranen die Solubilisationkinetik sowie alle thermodynamischen Parameter des jeweiligen Detergenz/Membransystems bekannt sind, ist es bis heute auch nicht eindeutig bewiesen, dass DRMs  $l_0$ -Phasen der intakten Zellmembran, vor der Zugabe des Detergenz, darstellen. CEACAM1-positive DRMs, die im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Detergenzien dargestellt wurden, zeigten in Dichtegradientenzentrifugationen auch nicht in allen Fällen eine Zugehörigkeit zu Membranmikrodomänen niedriger Dichte. Eine Regel bezüglich der Solubilisierbarkeit von CEACAM1 ließ sich hinsichtlich des HLB-Wertes nicht-ionischer Detergenzien aufstellen, nach der CEACAM1 mit Detergenzien, deren HLB-Wert kleiner 13,5 ist, gut solubilisierbar ist. Mit nicht-ionischen Detergenzien höherer HLB-Werte (Brij35 oder Tween20) war CEACAM1 partiell unlöslich (17.000 x g), zeigte jedoch nach Darstellung von Membranmikrodomänen im Dichtegradienten keine Zugehörigkeit zu Cholesterin-reichen, Sphingolipid-reichen Domänen. Dies deutet daher eher auf eine unvollständige Solubilisation durch Tween20 oder Brij35 aufgrund von kinetischen Bedingungen oder zu geringen Detergenz-Konzentrationen hin. Dagegen ließ sich CEACAM1 unter Verwendung von Brij96/97 und Zentrifugation bei 17.000 x g nicht den DRMs zuordnen, zeigte aber ein deutliches Aufschwimmen im Dichtegradienten. Außerdem zeigte sich, dass die CHAPS-resistente CEACAM1-Population, die für Gelfiltrationsstudien durch Zentrifugation bei 17.000 x g abgetrennt wurde, nicht, oder nicht allein, die aufschwimmende Population in anschließenden Dichtegradienten darstellte. Dies zeigt, dass nach CHAPS-Solubilisation zumindest zwei unterschiedliche CEACAM1-positive DRMs existieren, von denen eine zu Fraktionen geringer Dichte aufzuschwimmen vermag, die andere aber auch nach Dichtegradientenzentrifugation mit anderem unlöslichen Material pelletiert. Bei beiden DRMs handelt es sich um partikuläres Material, aber wohl von unterschiedlicher Größe und/oder Lipidzusammensetzung. Ferner konnte nach CHAPS-Solubilisation von IEC-6-Zellen überhaupt keine CEACAM1-Unlöslichkeit bei 17.000 x g detektiert werden, aber fast 90% aller CEACAM1-Moleküle befanden sich nach der Dichtegradientenzentrifugation in Fraktionen geringer Dichte, in Membranmikrodomänen. Dies zeigt, dass die Verwendung der Bezeichnung DRM als Synonym für Mikrodomänen falsch ist (zumindest nach CHAPS-Solubilisation) und nicht länger verwendet werden sollte.

Da die CEACAM1- $\Delta$ Cyto-Mutante, für die keine lateralen oder zytoplasmatischen Interaktionspartner bekannt sind, in den meisten Untersuchungen ähnlich den CEACAM1-

short- und -long-Isoformen unlöslich war, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der CHAPS-Unlöslichkeit tatsächlich um ein durch Membrankomponenten vermitteltes Charakteristikum handelt. Die Versuche nach Cholesterin-Depletion (M $\beta$ CD- oder Saponinbehandlung) bzw. nach Clustern von CEACAM1-Molekülen bestätigen diese Annahme und sind in Übereinstimmung mit Befunden anderer Forschergruppen über Mikrodomänen-assoziierte Proteine wie CD44, Prominin oder Tetraspanine (Claas et al., 2001; Oliferenko et al., 1999; Röper et al., 2000).

Zur Zeit ist nicht bekannt, ob die CEACAM1-positiven DRMs, wenn sie denn darstellbar waren, Lipidaggregate in  $l_0$ -Phasen verkörpern. Dies wurde aber auch in vielen anderen Arbeiten über Mikrodomänen nicht gezeigt und ist ein großer Kritikpunkt der "*lipid raft*"-Theorie im Allgemeinen (Lichtenberg et al., 2005). Wenn sich Membranmikrodomänen im  $l_0$ -Zustand mit verschiedenen Detergenzien unterschiedlich gut oder, wie im vorliegenden Fall der CEACAM1-Mikrodomänen mit TX-100, gar nicht darstellen lassen, muss es chemisch-physikalische Parameter geben, die dieses Phänomen erklären können. Die Theorie der  $l_0$ -Phase reicht hierfür jedoch nicht aus (Lichtenberg et al., 2005). In systematischen Studien konnten Schuck et al. aber zeigen, dass sich DRMs bzw. Mikrodomänen, dargestellt durch Solubilisation mit unterschiedlichen Detergenzien und Dichtegradientenzentrifugation, quantitativ und qualitativ in ihrem Lipid- und Proteingehalt unterscheiden (Schuck et al., 2003). Cholesterin und Sphingolipide ließen sich in dieser Arbeit durch CHAPS- und TX-100-Solubilisation bis zu fünffach in DRMs und Mikrodomänen anreichern, während andere Detergenzien bezüglich der Cholesterin-Anreicherung weniger effizient waren (CHAPS = Triton X-100 > Brij98/99 = Brij96/97 > Lubrol-WX = Bri58 > Tween20 (Schuck et al., 2003). Diese Ergebnisse kann man unter der Annahme, dass es nur einen, aus immer den gleichen Lipid-Komponenten aufgebauten  $l_0$ -Zustand gibt, dahingehend deuten, dass aufgrund der unterschiedlichen Anreicherung von Mikrodomänen-Komponenten die Verwendung von Detergenzien zur Darstellung der Mikrodomänen nicht geeignet ist, da sie die *in vivo*-Bedingungen vor Detergenz-Behandlung der Membran nicht widerspiegeln (Lichtenberg et al., 2005). Dagegen zeigen aber Arbeiten anderer Gruppen, dass "*lipid rafts*" oder Mikrodomänen auch *in vivo* unterschiedliche Komponenten enthalten können: so segregieren GM1 und GM3 während der gerichteten T-Zell-Migration in Richtung Uropod und Zellfront (*Leading-edge*). Beide Ganglioside sind aber weiterhin in Mikrodomänen geringer Dichte zu finden (Gomez-Mouton et al., 2001). Und auch GPI-verankerte Zelloberflächenproteine lassen sich in unterschiedlichen Mikrodomänen darstellen (Madore et al., 1999). Zusätzlich zu Cholesterin und Sphingolipiden gibt es daher wahrscheinlich weitere Lipid-Komponenten

oder vielleicht sogar Komponenten auf Protein-Ebene, die die  $l_0$ -Phase chemisch-physikalisch verändern und in mehrere unterschiedliche  $l_0$ -Zustände aufspalten können. Dies wäre mit ein Grund für die differierende Darstellbarkeit von Membranmikrodomänen in Abhängigkeit des verwendeten Detergenz, da diese aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften verschiedenartige Membranbereiche unterschiedlich gut zu solubilisieren vermögen. Diese Hypothese muss jedoch experimentell bestätigt werden.

Die Annahme, dass DRMs und Mikrodomänen durch einfache, ungerichtete Koaleszenz von schwer-solubilisierbaren Membranbereichen zu Cholesterin-reichen, makroskopisch-sichtbaren Vesikeln geringer Dichte herrühren, ist zudem eine zu einfache Mutmaßung, wiewohl Koaleszenz mit Sicherheit stattfindet (Mayor und Maxfield, 1995). Unter dieser Voraussetzung müssten alle in Mikrodomänen vorhandenen Proteine miteinander kopräzipitierbar sein, was aber in dieser Arbeit mit Caveolin und CEACAM1 nicht gelang und auch von anderen Arbeitsgruppen mit anderen Proteinen nicht bestätigt werden konnte (Claas et al., 2001; Röper et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1-Molekülen zusätzlich eine funktionelle Relevanz hinsichtlich der Signaltransduktion aufgedeckt werden, was als weiteres Argument für die Existenz von Membranmikrodomänen angesehen werden kann. In Abhängigkeit von der Mikrodomänen-Assoziation und einem von Tyrosin-Kinasen der src-Familie-abhängigen Signalweg wurde CEACAM1-long an Tyrosinresten phosphoryliert, was sich in einem erhöhtem phospho-Tyrosingehalt von CEACAM1-long in Fraktionen geringer Dichte darstellte. Zusätzlich war die Tyrosinphosphorylierung und die phospho-Tyrosin-abhängige Interaktion mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase-1D (SHP-2) durch Cholesterin-Depletion der Plasmamembran inhibierbar. Die Membranmikrodomänen-Zugehörigkeit teilt damit die Gesamtheit der CEACAM1-Moleküle auf der Plasmamembran in zwei unterschiedliche Populationen, die sich im phospho-Tyrosingehalt, und dadurch wahrscheinlich in ihrer Signaltransduktion, unterscheiden.

Ob Membranmikrodomänen eine ähnliche Bedeutung für die Signaltransduktion der kurzen Isoform (CEACAM1-short) besitzen, konnte bisher nicht gezeigt werden. Da CEACAM1-short mit Annexin-II (einem  $Ca^{2+}$ -abhängig Membranen- und F-Aktin-bindenden Protein, mit hoher Affinität zu Membranmikrodomänen) interagieren kann, könnte die Mikrodomänen-Assoziation von CEACAM1-short aber tatsächlich von biologischer Bedeutung sein, mit möglichen Auswirkungen auf die Organisation des Aktinzytoskeletts (Babiychuk und Draeger, 2000; Kirshner et al., 2003b).

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine Cholesterin-Abhängigkeit der Maus-Hepatitis-Virus- und Afa/Dr-Adhäsion-positiven *E.coli*-Bakterien-Internalisierung gefunden (Berger et al., 2004; Thorp und Gallagher, 2004). Beide Pathogene können CEACAM1 als Rezeptor benutzen und eine "lipid raft"-Assoziation von CEACAM1-Molekülen wurde von beiden Gruppen postuliert. Ferner ist eine Kolo-kalisation von CEACAM1-long mit dem Mikrodomänen-Marker GM1 nach T-Zell-Rezeptor- und IL-2-Stimulierung in Jurkatzellen, berichtet worden (Chen und Shively, 2004), und die laterale/apikale Translokation von CEACAM1-Molekülen nach Aktivierung kleiner GTPasen der Rho-Familie in Epithelzellen konnte funktionell auf die CEACAM1-Transmembrandomäne eingegrenzt werden (Fournes et al., 2003).

Für weitere Untersuchungen bleibt festzustellen, dass die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long und damit verbunden auch einige Signaltransduktionsmechanismen wie die SHP-2-Rekrutierung von der Verfügbarkeit des Cholesterins in der Plasmamembran abhängt. Ob diese Abhängigkeit das Vorkommen von CEACAM1-positiven Membranmikrodomänen auf lebenden Zellen *in vivo* widerspiegelt, werden zukünftige biochemische oder biophysikalische Messmethoden zeigen.

### **Zellkontakt-Lokalisation und Interaktion mit SHP-2**

Während CEACAM1 *in vivo* auf Epithelien und Gefäßendothel hauptsächlich apikal lokalisiert gefunden wird, zeigt sich in Zellkultur eine massive Anhäufung transmembranärer CEACAM1-Moleküle in Kontaktregionen epithelialer Zellen. In polarisierten MDCK-Zellen konnten dabei Isoform-spezifische Unterschiede bezüglich der Lokalisationen beobachtet werden, die durch Inhibition der PI3-Kinase oder Pervanadat-induzierte Tyrosinphosphorylierung beeinflusst wurde (Sundberg et al., 2004). In Fibroblasten und Kolon-Karzinom-Zelllinien konnte ferner eine Abhängigkeit der CEACAM1-Lokalisation von der Aktivität kleiner GTPasen der Rho-Familie gezeigt werden (Fournes et al., 2003). Diese veränderten die CEACAM1-Lokalisation über einen bisher nicht näher geklärten Mechanismus, der allein die Transmembrandomäne des CEACAM1-Moleküls benötigte. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Membranmikrodomänen-Assoziation des CEACAM1 könnte hierfür mögliche mechanistische Anhaltspunkte liefern, zumal auch Evidenzen für eine Membranmikrodomänen-Assoziation von GTPasen der Rho-Familie gefunden wurden (Guan, 2004). Bislang sind hierzu aber keine Untersuchungen durchgeführt worden, da die

Zellkontakt-Lokalisation von CEACAM1-Isoformen in RBE-Zellen unabhängig von der Länge oder der Gegenwart der zytoplasmatischen Domäne gefunden wurde und sie sich durch Inhibition der PI3-Kinase oder der Rho-Effektor-Kinase ROCK bzw. durch LPA-vermittelte Aktivierung von Rho nicht verändern ließ. Ob die beobachtete, in Zellkultur vorrangig laterale Lokalisation des CEACAM1 an Zellkontaktregionen durch ungenügende Polarität konfluenter Zellen herrührt, ist zur Zeit weder für Endothel- noch für Epithelzellen untersucht. Für einige Zellpolarität-steuernde Proteine wie LKB1 (Par-4) oder STRAD konnte aber gezeigt werden, dass sie in intestinalen Epithelzellen direkt die Lokalisation von CEA und anderen Proteinen, unabhängig von der Konfluenz der Zellen, regulieren können (Baas et al., 2004). Ferner ist bekannt, dass die Zellkontakt-Lokalisation und Adhäsion von CEACAM1 ein sehr frühes Ereignis während der Zellkontakt-Formation primärer Hepatozyten und anderer Zelltypen ist. Zu diesem Zeitpunkt kann Zellpolarität, d.h., eine Unterscheidung von apikaler und baso-lateraler Ausrichtung, aber kaum beobachtet werden (Tingstrom et al., 1990; Tingstrom und Öbrink, 1989). Weitere Funktionen neben der Zell-Zell-Adhäsion sind für Zellkontaktareal-lokalisiertes CEACAM1 bisher nicht bekannt. Untersuchungen von Sundberg et al. konnten zwar eine partielle Kolo-kalisation mit E-Cadherin in Adherens-Junctions darstellen (Sundberg et al., 2004), deren biologische Funktion ist aber unklar. Auch die CEACAM1-vermittelte Desorganisation von epithelialen Desmosomen ist mechanistisch ungeklärt (Sundberg et al., 2004). Ob CEACAM1 während der endothelialen Zellkontakt-Formation mit Proteinen der Adherens-Junctions oder Tight-Junctions assoziieren kann, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Koimmunpräzipitationen von VE-Cadherin und CEACAM1-Molekülen zeigten bisher kein positives Ergebnis und Kolo-kalisations-Studien von VE-Cadherin mit CEACAM1 in RBE-Zellen wurden bis jetzt noch nicht durchgeführt.

Die Zellkontakt-Lokalisation und Funktionen der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 sind dagegen schon länger bekannt. SHP-2 wird in konfluenten Zellen nach osmotischem oder mechanischem Stress in Zellkontakte rekrutiert (Masuda et al., 1997; Osawa et al., 2002). Aber auch während der Zellkontakt-Formation endothelialer Zellen wird SHP-2 an Zellgrenzen gefunden (Burkart et al., 2003), wo sie mit Adhäsionsrezeptoren wie PECAM1 (Masuda et al., 1997) oder mit zytoplasmatischen Proteinen wie  $\beta$ -Catenin (Ukropec et al., 2000) interagieren kann.

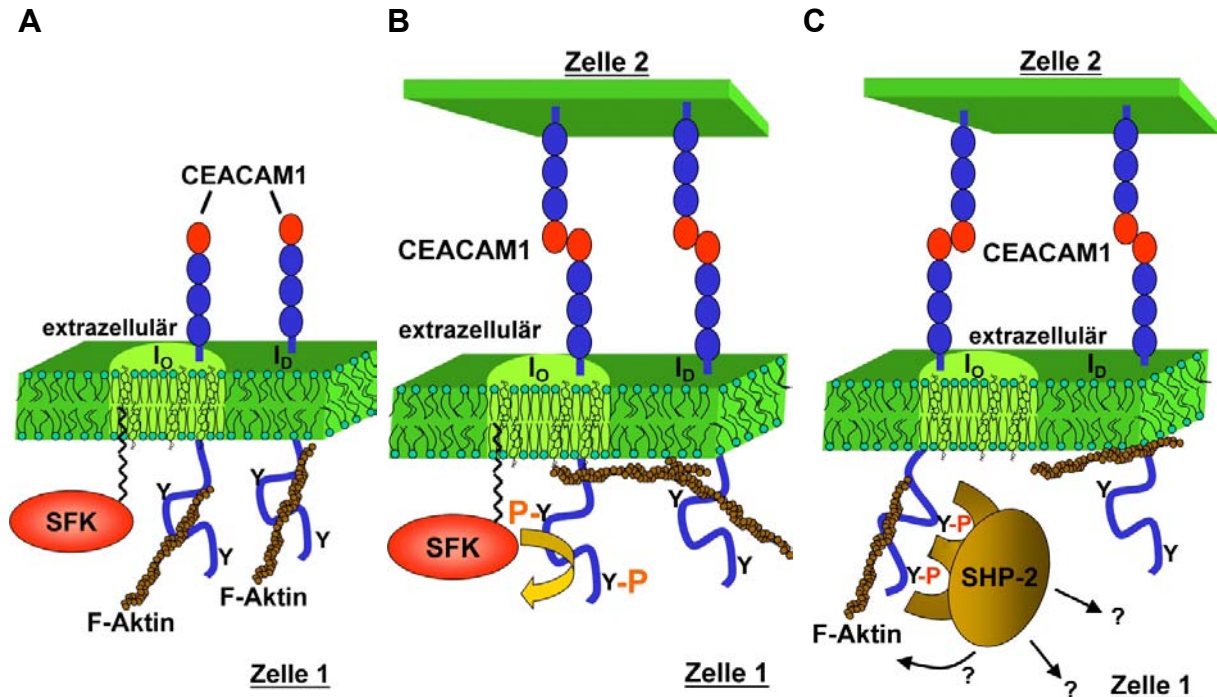
Mit CEACAM1-long wurde in dieser Arbeit ein neuer SHP-2-Bindungspartner an Zellkontaktregionen von Endothelzellen dargestellt. Wie PECAM1 besitzt auch CEACAM1 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne ITIM-Sequenzmotive, über die beide Moleküle nach Tyrosinphosphorylierung dieser Reste SHP-2 rekrutieren können. Eine Funktion der SHP-2-

CEACAM1-long-Interaktion in Kontaktarealen von Endothelzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht aufgezeigt werden. In Arbeiten der Gruppe von N. Beauchemin konnte im Zusammenhang mit der CEACAM1-long/SHP-2-Assoziation eine Proliferations-hemmende Wirkung des CEACAM1-long in Epithelzellen dargestellt werden (Izzi et al., 1999). In diesen Arbeiten waren die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne essentiell für die CEACAM1-long-vermittelte Proliferationsinhibition. Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste der langen CEACAM1-Isoform hatten weiterhin eine stimulierende Wirkung auf die Enzymaktivität von SHP-2 (Huber et al., 1999). Jedoch war die Anwesenheit N-terminaler Ig-Domänen von CEACAM1 für die Proliferations-inhibierende Wirkung nicht essentiell, d.h., homophile Bindung von CEACAM1-Molekülen auf Epithelzellen *in trans* war keine Voraussetzung für die Tyrosinphosphorylierung und SHP-2-Interaktion. Eine CEACAM1-Mutante ohne N-terminale Ig-Domäne stand im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Da aber die Zellkontakt-Lokalisation von CEACAM1-Molekülen nur beobachtet werden konnte, wenn auf benachbarten Zellen ebenfalls CEACAM1 exprimiert wurde und die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long Zelldichte-abhängig detektierbar war, kann davon ausgegangen werden, dass sich die SHP-2-Rekrutierung in Epithelzellen von der in Endothelzellen unterscheidet. Ferner wurde eine Proliferations-hemmende Wirkung von CEACAM1-long in RBE-Zellen nur nach TGF- $\beta$ -Stimulation beobachtet aber nicht unter normalen Kulturbedingungen. Untersuchungen zur Zellproliferation nach Erreichen der Konfluenz, d.h., zum Zeitpunkt der detektierbaren Interaktion von CEACAM1-long und SHP-2, stellten sich als recht schwierig dar, da sie zum Teil recht hohe Abweichungen ohne signifikante Ergebnisse lieferten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem mit stabilen Transfektanten gearbeitet. So kann es möglich sein, dass die CEACAM1-exprimierenden Klone, die nach der Selektion heranwuchsen, die Proliferations-inhibierende Wirkung der langen Isoform verloren bzw. mechanistisch überwunden hatten. Klone, die diese mögliche inhibitorische Wirkung nicht überwinden konnten, wuchsen im Vergleich zu anderen Zellen vielleicht langsamer und könnten dadurch während des Klonierens verloren gegangen sein. Es ist also nicht auszuschließen, dass CEACAM1-long, im Zusammenspiel mit SHP-2, die Endothelzellen-Proliferation inhibieren kann und einen Beitrag zur Kontakt-vermittelten Wachstumsinhibition leistet. Zukünftige transiente Kotransfektions-Versuche mit CEACAM1-long und SHP-2 in RBE/wt-Zellen könnten daher eine mögliche Beteiligung des CEACAM1-long-SHP-2-Komplexes bei der Regulation der Zellproliferation aufzeigen.

Die mögliche CEACAM1-vermittelte Wachstumsinhibition könnte auch ein Grund für die fehlende CEACAM1-Expression in allen untersuchten Endothelzellen nach Primär-Zellkultur



sein. Im Vergleich zu CEACAM1-negativen oder nur schwach exprimierenden Zellen könnten CEACAM1-positive Zellen im Wachstum benachteiligt gewesen und mit fortschreitender Kultivierung verloren gegangen sein.



**Abb. 74: Modell der Zellkontakt-Formation-vermittelten CEACAM1-long-Tyrosinphosphorylierung und SHP-2 Bindung.** (A) Im nicht-konfluenten Zustand befinden sich CEACAM1-Moleküle auf der Oberfläche von RBE-Zellen sowohl in flüssig-ungeordneten ( $l_D$ )-, als auch in Cholesterin-reichen, flüssig-geordneten ( $l_O$ )-Phasen, in denen auch Tyrosinkinasen der src-Familie (SFK) durch ihre Fettsäureacyl-Modifikation lokalisieren. Zytoplasmatisch ist CEACAM1 nicht an Tyrosinresten (Y) phosphoryliert, bindet aber z.B. an Aktinfilamente (F-Aktin). (B) Im Zustand der Konfluenz (angedeutet durch Zelle 2) kommt es durch homophile Interaktionen der N-Domänen zur Akkumulation von CEACAM1-Molekülen an Zellkontaktarealen. Nach Zellkontakt-vermittelter Aktivierung von SFKs wird CEACAM1 Cholesterin-abhängig in  $l_O$ -Phasen an Tyrosinresten phosphoryliert. (C) Tyrosin-phosphoryliertes CEACAM1 rekrutiert die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 an Zellkontaktareale. Potentielle Zielproteine von SHP-2, wie z.B. F-Aktin-organisierende Proteine, sind durch ? gekennzeichnet.

Während über die direkten Substrate der SHP-2 nur wenig bekannt ist, ist neben der Proliferations-Inhibition auch eine Beteiligung dieser Phosphatase an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts gut charakterisiert. So waren Adhäsionsvorgänge und Zellmigration gestört, wenn Kinase-inaktive Mutanten oder SHP-2-defiziente Zellen analysiert wurden (Fernstrom et al., 2005; Inagaki et al., 2000). Eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung und Inhibierung der Rho-GTPase wurde ebenfalls gezeigt (Schoenwaelder et al., 2000). Da SHP-2 mit  $\beta$ -Catenin assoziiert und Proteine der Adhärenz-Junctions dephosphorylieren kann, wird eine regulatorische Wirkung auf die zytoskelettale Organisation während der Zell-Zell-Kontakt-Forma-

tion oder während Umbauvorgängen an den Zellkontakten postuliert (Osawa et al., 2002; Ukropec et al., 2000). Die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin und den Cateninen ist Zelldichte-abhängig reguliert (Lampugnani et al., 1997) und steht ferner in einem direktem Zusammenhang mit der Permeabilität der endothelialen Monolayer (Nawroth et al., 2002).

Interessanterweise ist die Zelldichte- und SHP-2-abhängige Regulation der Catenin-Tyrosinphosphorylierung auch von der Verfügbarkeit des membranären Cholesterins abhängig (Burkart et al., 2003), und eine SHP-2-Assoziation mit Membranmikrodomänen konnte ebenfalls gezeigt werden (Lacalle et al., 2002). Da in den analysierten Dichtegradienten der vorliegenden Arbeit weder PECAM1 noch VE-Cadherin in Membranmikrodomänen lokalisierten, ist CEACAM1-long ein interessanter Kandidat für die Rekrutierung und Aktivierung von SHP-2 in Membranmikrodomänen. Hierfür spricht außerdem der Befund, dass nach Cholesterin-Depletion eine verringerte Interaktion beider Moleküle beobachtet wurde. Da CEACAM1 an Zellkontakten gleichzeitig mit dem Aktinzytoskelett assoziiert vorlag, ist eine mögliche Beteiligung des CEACAM1-long/SHP-2-Komplexes an der Organisation des Aktinzytoskeletts denkbar. Auch wurde eine Interaktion von SHP-2 mit Annexin-II an Zellkontakten beschrieben (Burkart et al., 2003), einem weiteren Regulator des Aktinzytoskeletts, der mit Mikrodomänen assoziieren kann und als Interaktionspartner von CEACAM1-short (Kirshner et al., 2003b) beschrieben wurde.

Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung des CEACAM1- und SHP-2-beinhaltenden Komplexes an Zellkontaktregionen mit möglichen Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett werden zukünftige Untersuchungen weitere Hinweise erbringen. Auch die Suche nach der für die CEACAM1-Phosphorylierung verantwortlichen Tyrosinkinase der src-Familie sowie Untersuchungen zum Zelldichte-abhängigen Aktivierungsmechanismus dieser Kinase könnten zum genaueren Verständnis der CEACAM1-Funktion an endothelialen Zellkontakten beitragen.

### **Beeinflussung von TGF- $\beta$ -Signalwegen**

TGF- $\beta$  beeinflusst als multifunktionelles Zytokin die Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben verschiedener Zelltypen. Drei Isoformen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3) mit zum Teil redundanten Funktionen sind beschrieben worden. Sie werden als latente, inaktive Vorstufen sezerniert und erst nach proteolytischer Spaltung können die aktiven Formen an spezifische Typ-I- und Typ-II-Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen binden und eine

Oligomerisierung der Rezeptoren induzieren. In Endothelzellen sind bisher ein TGF- $\beta$ -Typ-II-Rezeptor (TGF $\beta$ R-II) und zwei TGF- $\beta$ -Typ-I-Rezeptoren (TGF $\beta$ R-I), der Endothel-spezifische ALK1 (*Activin-Like Kinase 1*) und der ubiquitär exprimierte ALK5 gefunden worden. Beide Rezeptoren leiten das Signal der Ligandenbindung und Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch Phosphorylierung von intrazellulären Effektoren, sog. R(Rezeptor)-SMADs, über die Membran auf die zyttoplasmatische Seite weiter, aber auch MAP-Kinase-Aktivitätsänderungen und Aktivierungen kleiner GTPasen, wie Ras, wurden beschrieben. Während ALK1 die Phosphorylierung von SMAD1, SMAD5 und SMAD8 vermittelt und pro-migratorisch und Proliferations-aktivierend wirken kann, phosphoryliert ALK5 die R-SMADs 2 und 3, wodurch ALK5 die endotheliale Proliferation und Migration zu inhibieren vermag. Phosphorylierte R-SMADs translozieren als Heterodimere mit SMAD4 (Co-SMAD) in den Zellkern, wo sie die Transkription von Zielgenen regulieren. Studien mit dominant-aktiven oder -inaktiven Rezeptoren sowie Knock-out-Mäusen von TGF- $\beta$ -Isoformen, TGF- $\beta$ -Rezeptoren und Effektor-Proteinen haben signifikante und zum Teil essentielle Beteiligungen der TGF- $\beta$ -Signalwege bei der Vaskularisierung des Embryos oder der Angiogenese im Adulten aufgezeigt (zusammengefasst in Goumans et al., 2003a; Lebrin et al., 2005).

Die sowohl Proliferations-inhibierenden als auch aktivierenden Wirkungen von TGF- $\beta$  auf Endothelzellen in Zellkultur oder *in vivo* waren längere Zeit unverstanden und auf unterschiedliche Kulturbedingungen oder unterschiedliche Endothelzellpopulationen zurückgeführt worden. Mit der Entdeckung von ALK1 auf Endothelzellen zeigte sich aber bald, dass Endothelzellen auf eine TGF- $\beta$ -Stimulation mit der Aktivierung beider Signalwege (ALK1 und ALK5) reagieren, die untereinander fein abgestimmt sind (Goumans et al., 2002) und sich gegeneinander beeinflussen können (Goumans et al., 2003b). Unter Einbeziehung der akzesorischen Typ-III-Rezeptoren Betaglycan und, für endotheliale Zellen von besonderer Bedeutung, Endoglin wird die Regulation der TGF- $\beta$ -vermittelten Signalwege noch komplexer. Während Betaglycan eine besonders hohe Affinität zu TGF- $\beta$ 2 besitzt und die geringe Affinität von Typ-II-Rezeptoren zu TGF $\beta$ 2 ausgleichen kann, bindet Endoglin TGF- $\beta$ -Liganden erst, wenn es mit Typ-II-Rezeptoren in einem Komplex vorliegt. Dabei zeigt Endoglin eine Spezifität zu Typ-II- und ALK5-Rezeptoren, mit denen es direkt interagieren und von diesen phosphoryliert werden kann. Ektopische Expression von Endoglin konnte in verschiedenen Zellsystemen die Proliferations-inhibierende Wirkung von TGF- $\beta$  reduzieren und auch in einem Mausmodell wurden ähnliche Effekte in Endoglin-exprimierenden Tumoren beobachtet (Lastres et al., 1996; Quintanilla et al., 2003). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Endo-

glin ein Negativ-Regulator des ALK5-Signalwegs ist. Aber auch Auswirkungen auf den ALK1-Signalweg wurden nach Variation der Endoglinexpression auf Endothelzellen beobachtet (Lebrin et al., 2004). TGF- $\beta$ -Signalwege induzieren zudem sehr schnell nach Aktivierung der Rezeptoren inhibitorische SMADs (I-SMADs, SMAD6 und SMAD7), die die Signalwege durch Konkurrieren um die Rezeptorbindungsstelle, Rekrutierung von Phosphatasen oder Ubiquitin-Ligasen zum Rezeptor und nachfolgender Dephosphorylierung oder proteasomaler Degradation der Rezeptoren abschwächen und beenden können.

Auf welcher Ebene dieser komplex regulierten Signalweiterleitung CEACAM1 in TGF- $\beta$ -vermittelte Signalwege eingreift, ist zur Zeit nicht bekannt. Die verringerte Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1-long wenige Minuten nach TGF- $\beta$ -Stimulation zeigt, dass CEACAM1 ein indirektes Zielprotein der TGF- $\beta$ -Signalkaskade darstellt. Jedoch ist zur Zeit noch nicht geklärt ob es sich bei der beobachteten Reduktion des Phosphorylierungssignals um eine Dephosphorylierung oder um verringerte Phosphorylierung handelt. Zelltyp-abhängig wurde sowohl eine Aktivierung als auch eine Inaktivierung von Tyrosinkinasen der src-Familie nach TGF- $\beta$ -Stimulation beobachtet (Atfi et al., 1994; Fukuda et al., 1998). Eine Veränderung von Phosphatase-Aktivitäten konnte dagegen bisher nicht gezeigt werden. Durch *de novo*-Proteinsynthese können Tyrosinphosphatasen aber verstärkt exprimiert werden (Choudhry et al., 2001). Für die CEACAM1-abhängige Verstärkung der TGF- $\beta$ -vermittelten Proliferations-Inhibition war die Modulation der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung jedoch nicht nötig, da alle untersuchten CEACAM1-Isoformen, auch die  $\Delta$ Cyto-Mutante, gegenüber wt- und Vektor-transfizierten Zellen stark verringerte Proliferationsraten nach TGF- $\beta$ -Gabe zeigten. Dies deutet daraufhin, dass die Signalmodulierende Eigenschaft von CEACAM1 in der Transmembrandomäne oder extrazellulär zu suchen ist. Die Koimmunpräzipitation von TGF $\beta$ R-II-Rezeptoren mit CEACAM1-Molekülen gelang aufgrund der nicht detektierbaren Mengen an TGF $\beta$ R-II-Rezeptoren auf RBE-Zellen bisher nicht. Weitere Koimmunpräzipitationen mit Endoglin oder SMAD-Proteinen sind bisher noch nicht unternommen worden. Da Endoglin ein negativer Regulator des ALK5/SMAD2/3-Signalweges ist und dieser für die Proliferations-Inhibition endothelialer Zellen verantwortlich ist, könnte CEACAM1 durch Regulation der Endoglin-Expression oder der Endoglin/TGF $\beta$ R-Interaktion in den Signalweg eingreifen. Endoglin moduliert ferner die Balance zwischen ALK1- und ALK5-Signalwegen, indem es die ALK1-Signaltransduktion begünstigt. Gerade dieser Signalweg war in RBE/Vektor-Zellen, aber nicht in RBE/CEACAM1-Zellen aktiv (gezeigt durch die nukleäre Lokalisation von SMAD1/5). Im

Zusammenhang mit Endoglin hat die Gruppe um C. Hauck erst kürzlich entdeckt, dass die Bindung und Internalisierung von *Neisseria spec.* durch CEACAMs eine Induktion der Endoglin-Expression auf Epithelzellen bewirken konnte (Muenzner et al., 2005). Daher könnte die Expression von Endoglin durch die CEACAM1-Expression auf RBE-Zellen beeinflusst worden sein. Dieses bedarf aber der Klärung in zukünftigen Studien.

Kürzlich konnten Di Guglielmo et al. zeigen, dass TGF- $\beta$ -Rezeptoren nach Ligandenbindung sowohl durch Clathrin-vermittelte Endozytose als auch über einen Cholesterin-abhängigen "lipid raft"/Caveolae-vermittelten Weg internalisiert werden können (Di Guglielmo et al., 2003). Während der Clathrin-vermittelten Endozytose eine Beteiligung bei der R-SMAD-Phosphorylierung zugeschrieben werden konnte, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Cholesterin-abhängigen Internalisierungsweg und der Rezeptordegradation zum schnellen Beenden des Signals. Obwohl zur Zeit nicht bekannt ist, ob ALK1 oder ALK5 unterschiedliche Internalisierungswege bevorzugen, könnte durch die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Mikrodomänen-Assoziation von CEACAM1 ein Zusammenhang mit dem Cholesterin-abhängigen TGF- $\beta$ -Rezeptor-Turnover postuliert werden. Jedoch müssen hinsichtlich dieser Arbeitshypothese für zukünftige Studien funktionierende Antikörper gegen TGF- $\beta$ -Rezeptoren zur Verfügung stehen.

Schon länger ist bekannt, dass die Expression von CEA und CEACAMs in intestinalen Epithelzellen durch TGF- $\beta$ -Gabe erhöht werden kann (Chakrabarty et al., 1990). Jedoch war und ist die Bedeutung dieser Regulation auf transkriptionaler Ebene unklar. Einen möglichen Zusammenhang zwischen der CEACAM1-Expression und TGF- $\beta$ -Signalwegen postulierten erstmals Comegys et al. nach Untersuchungen von Prostata-Tumormodellen (Comegys et al., 1999). In ihren Studien fanden die Autoren nach Injektion CEACAM1-positiver und -negativer PC-3-Zellen in Nackt-Mäuse ein verringertes Tumorwachstum und eine starke Verkapselung von CEACAM1-positiven Tumoren, das begleitet war von morphologischen Veränderungen und einem differenzierteren Erscheinungsbild. Northern-Blot-Analysen ergaben jedoch keine Veränderungen bezüglich der Transkription von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 3, TGF $\beta$ R-I und TGF $\beta$ R-II durch die CEACAM1-Expression im Tumorgewebe.

Für die verstärkte Neusynthese von Matrixkomponenten nach TGF- $\beta$ -Stimulation ist, zumindest zu großen Teilen, der ALK5-Signalweg verantwortlich (Itoh et al., 2003). Daher erscheint es möglich, dass CEACAM1 nicht nur in endothelialen Zellen ALK-vermittelte Signalkaskaden begünstigt, sondern auch in epithelialen Zellen. Zukünftige Untersuchungen sollten hierzu interessante Ergebnisse bringen.