

Zusammenfassung

Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle beeinflussen die Funktionen von Endothelzellen während der Vaskulo- und Angiogenese. Das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül CEACAM1 wird, u.a., auf Kapillarendothel und angiogenetischen Gefäßen als transmembranäres Protein exprimiert. Die Funktion transmembranärer CEACAM1-Isoformen auf der Oberfläche von Endothelzellen war jedoch bis heute weitgehend unklar. Die vorliegende Arbeit beschreibt in *in vitro*-Studien biochemische und funktionelle Eigenschaften der CEACAM1-Signaltransduktionsmechanismen. Hierzu wurden endotheliale Zellen aus dem Ratten-Hirn isoliert, charakterisiert und für funktionelle Studien mit CEACAM1-Isoformen transfiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte CEACAM1 auf Endothelzellen des Gehirns adulter Ratten und auf angiogenetisch-aktivem Ratten-Gefäßendothel des wachsenden Morris-Hepatom-7777 immunhistochemisch detektiert werden. Zusätzlich gelang durch RT-PCR-Analysen von verschiedenen Rattenhirn-Zelltypen in Primärkultur die erstmalige Detektion von CEACAM1-auf Mikroglia-Zellen.

In *in vitro*-Angiogenese-Versuchen auf Matrigel konnte eine stimulierende Wirkung von CEACAM1-Molekülen auf die Netzwerk-Formation von RBE-Zellen beobachtet werden. Ferner konnte eine erhöhte Zellmigration von CEACAM1-positiven gegenüber CEACAM1-negativen RBE-Zellen in "Monolayer-Wundheilungsversuchen" und auf Laminin-1 gemessen werden.

Matrixprotein-abhängig beeinflusste die CEACAM1-Expression das Spreiten von Zellen. Dabei zeigten CEACAM1-positive Zellen eine veränderte Zellmorphologie, die durch eine andersartige Organisation des Aktinzytoskeletts verursacht wurde. CEACAM1-transfizierte Zellen zeigten lange Zellfortsätze mit ausgeprägten Lamaellipodien an den Spitzen der Ausläufer und eine stark verringerte Stressfaserformation. Diese Veränderungen waren sensitiv gegenüber Rho-Aktivierung bzw deutlicher ausgeprägt nach Inhibition der Rho-Effektorkinase ROCK. Desweiteren waren die beobachteten zytoskelettalen Unterschiede abhängig von der Aktivierbarkeit von Rac1. Weiterhin konnte ein "Cross-talk" zu Integrinen bzw. Integrin-vermittelten Signalwegen während der Zell-Matrix-Adhäsion dargestellt werden: CEACAM1-positive Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine reduzierte Tyro-

sinphosphorylierung der *Fokalen Adhäsionskinase* (FAK) und eine verringerte Anzahl gereifter, Paxillin-enhaltender fokaler Komplexe auf Laminin-1.

Während der Zell-Matrix-Adhäsion konnte zusätzlich eine Assoziation von CEACAM1-long mit dem Aktinzytoskelett gezeigt werden, und Matrixprotein-abhängig konnte eine Interaktion von CEACAM1-Molekülen mit Talin, einem wichtigen Regulator der Integrinfunktion, dargestellt werden.

Durch Detergenz-Unlöslichkeitsstudien, Manipulationen während der Zellyse sowie isopyknische Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Assoziation von CEACAM1 und Membranmikrodomänen aufgezeigt. Diese Assoziation ließ sich durch CHAPS oder Detergenzien der Brij-Serie, nicht aber mit Triton X-100, dem traditionellen Detergenz zur "lipid raft"-Beschreibung, darstellen. Die Membranmikrodomänen-Assoziation von CEACAM1-Molekülen war unabhängig von der Länge der zytoplasmatischen Domäne und ließ sich auch durch eine Detergenz-unabhängige Methode im Dichtegradienten darstellen. Veränderungen der Cholesterin-Verfügbarkeit in der Plasmamembran durch Cholesterin-Depletion oder -Aggregation zeigten, dass die CEACAM1-positiven Mikrodomänen, wie die klassischen "lipid rafts", auf Cholesterin basieren. Ferner zeigte sich, dass Mikrodomänen-assoziiertes CEACAM1-long stärker an Tyrosinresten phosphoryliert ist als das nicht-Mikrodomänen-assoziierte CEACAM1-long. Daher wurde eine Beteiligung von Membranmikrodomänen an der durch CEACAM1-vermittelten Signaltransduktion postuliert und auch bestätigt.

CEACAM1-Isoformen lokalisierten unabhängig von der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne oder der Phosphorylierbarkeit von Tyrosinresten an Zell-Zell-Kontaktarealen. Zelldichte-abhängig wird CEACAM1-long während der Formation von Zellkontakten transient zytoplasmatisch an Tyrosinresten (Y488 und Y513) phosphoryliert. Durch Verwendung von spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung von der Aktivität der Kinasen der src-Familie abhängig war. Tyrosin-phosphoryliertes CEACAM1-long interagiert an Zellkontakten mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase-1D (SHP-2), wie durch Koimmunpräzipitationen und Kolokalisationsstudien gezeigt werden konnte. Ferner führte die Cholesterin-Depletion der Plasmamembran konfluenter Zellen zu einer Reduktion der detektierbaren CEACAM1-long-Tyrosinphosphorylierung, was von einer Verminderung der kopräzipitierbaren Menge SHP-2 begleitet war.

Proliferationsstudien mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und CEACAM1-positiven bzw. -negativen Zellen offenbarten ein unterschiedliches Ansprechverhalten auf TGF- β -Stimulation. Während TGF- β die Proliferation von CEACAM1-negativen Zellen kaum hemmte, zeigten sich CEACAM1-Transfektanten stark Proliferations-inhibiert. Diese Wachstumshemmung war Konzentrations-abhängig, aber unabhängig vom Vorhandensein der zytosplasmatischen Domäne am CEACAM1. Zusätzlich zeigte CEACAM1-long nach TGF- β -Stimulation eine transiente Reduktion der Phosphorylierung am Tyr488. Studien mit SMAD-Proteinen ergaben, dass in CEACAM1-positiven Zellen die Zytosol-Kern-Translokation von SMAD1/5-Proteinen nach TGF- β -Stimulation gestört ist.

Summary

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1/CD66a), expressed on leukocytes, epithelia and endothelia, mediates homophilic cell adhesion. It plays an important role in cell morphogenesis and recently, soluble CEACAM1-isoforms have been implicated in angiogenesis. The aim of the present study was to determine the biological functions of transmembrane CEACAM1 isoforms expressed in cultured rat brain endothelial cells. The main focus of the presented data was the analysis of functional and biochemical impact of CEACAM1-mediated signaling during dynamic processes like cell adhesion, cell migration and contact formation of endothelial cells.

Immunohistochemistry showed that CEACAM1 is expressed in brain capillaries of adult rats as well as on endothelial cells of angiogenic microvessels in growing Morris-Hepatoma-7777. Additionally, using RT-PCR-analysis, it was shown for the first time, that microglia cells from rat brain taken into primary culture express CEACAM1. CEACAM1-long, CEACAM1-short and at least one more isoform were detected with isoform-specific primersets.

During *in vitro* angiogenesis assays, expression of CEACAM1-L promotes network formation of endothelial cells on basement membrane Matrigel and increased cell motility after monolayer injury. During cell-matrix adhesion, CEACAM1-L translocated into the Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and affected cell spreading and cell morphology on Matrigel and laminin-1 but not on fibronectin. On laminin-1, CEACAM1 expressing cells developed protrusions with lamellipodia and showed less stress fiber formation. CEACAM1-mediated morphological alterations were sensitive to RhoA activation via LPA treatment and depended on Rac1 activation. Analyses of integrin-mediated signaling pathways revealed a functional cross talk of CEACAM1 and integrins which led to reduced FAK tyrosine phosphorylation and decreased the formation of mature focal adhesions on laminin-1, resulting in high motility. Furthermore, a matrix protein-dependent association of CEACAM1 and talin, an important regulator of integrin function, was detected.

Recent literature suggests that cell signaling does not occur randomly over the cell surface but is integrated within cholesterol-enriched membrane microdomains, termed lipid rafts. Furthermore, studies dissecting pathogen entry mechanisms via CEACAM1 molecules found a

requirement for cholesterol during the infection process suggesting that CEACAM1 may be associated with membrane microdomains. Solubilization experiments with RBE cells over-expressing CEACAM1-isoforms showed a partial insolubility of CEACAM1-L in Triton X-100 lysis buffer, revealing a strong anchorage to the actin cytoskeleton of this isoform. Using CHAPS, we found CEACAM1 in detergent-insoluble complexes insensitive to cytochalasin D pretreatment and unaffected by the deletion of the cytoplasmic domain or high salt concentrations during cell lysis. Moreover, CHAPS-insolubility of CEACAM1-isoforms was abrogated after cholesterol depletion with methyl- β -cyclodextrin (M β CD). An association of CEACAM1 with lipid raft-like membrane microdomains was further analysed by equilibrium sucrose density gradient centrifugation. Solubilization of membranes with CHAPS but not with Triton X-100 showed that CEACAM1 molecules floated to low density fractions, demonstrating an association of CEACAM1 with CHAPS-insoluble lipid raft-like membrane microdomains. Additionally, immunoprecipitated CEACAM1-L from low density fractions was stronger tyrosine phosphorylated compared to CEACAM1-L from high density fractions, indicating an importance of lipid raft-like microdomains in CEACAM1-mediated phosphorylation.

Immunofluorescence studies showed that rat CEACAM1 is located at intercellular contact areas of transfected RBE-cells when the cells reached confluence in cell culture. Like VE-Cadherin, CEACAM1-4L undergoes a transient, cell density dependent phosphorylation on tyrosine residues (Y488 and Y513) and tyrosine phosphorylation of both, VE-Cadherin and CEACAM1-L, was strongly reduced by inhibiting src-family tyrosine kinases (SFKs) with PP2. Furthermore, cholesterol depletion of cellular membranes with M β CD impeded tyrosine phosphorylation of CEACAM1-L molecules but did not alter the tyrosine phosphorylation level of VE-Cadherin indicating different mechanisms of tyrosine phosphorylation for both molecules. Finally, immunoprecipitations of tyrosine phosphorylated CEACAM1-L from recently confluent RBE cells brought down a significant amount of PTP-1D/SHP-2 revealing an association of CEACAM1-L and SHP-2 at cell-cell contact areas that was also confirmed by confocal microscopy.

Proliferation studies with CEACAM1-positive and -negative cells indicated a differential response upon TGF- β stimulation. While CEACAM1-negative cells displayed only marginal TGF- β -mediated inhibition of cell proliferation, CEACAM1-expressing cells were strongly inhibited. This inhibitory effect was independent from the length or the existence of the CEA-

CAM1 cytoplasmic domain. Nevertheless, phosphorylation studies upon TGF- β stimulation revealed a transient reduction of the phosphorylation level of Tyr488 within the cytoplasmic domain of CEACAM1-L. In addition, CEACAM1 positive cells displayed a dysfunction in ALK-1-mediated signaling, revealed by a lack of nuclear translocation of SMAD1/5-proteins upon TGF- β -stimulation.