

Einleitung

Zelladhäsion und Migration

Anfang des 19. Jahrhunderts entwickelte Henri Dutrochets eine Theorie, die besagte, dass alle Gewebe aus kleinen Zellen verschiedener Gestalt und Struktur zusammengesetzt sind. "Kohäsionskräfte" sollten die Zellen zusammenhalten. Diese Grundaussagen sind bis heute gültig und die Adhäsion der Zellen gilt als Voraussetzung mehrzelliger Lebens.

Außer der Vermittlung des Zusammenhaltes von Zellen und Geweben ermöglicht die Adhäsion auch die Migration von Zellen. Die Migration ist ein essentieller Vorgang während der Embryonalentwicklung, aber auch im Leben eines adulten Organismus, wo sie z.B. für eine effektive Immunantwort oder die Wundheilung notwendig ist. Andererseits ist die Migration auch für verschiedene pathologische Zustände, wie z.B. entzündliche Erkrankungen oder die Metastasierung von Tumoren, verantwortlich [Derycke und Bracke, 2004].

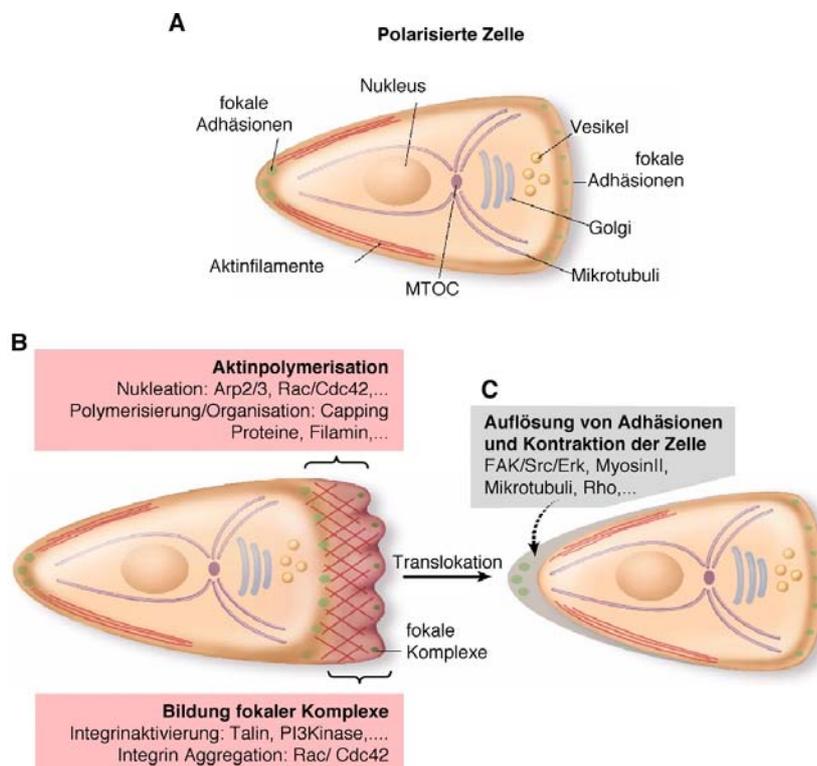


Abb. 1: Schritte in der Zellmigration. (A) Polarität ist eine Voraussetzung für die Migration. In den meisten Zellen ist die Polarität durch gerichteten Vesikeltransport zur Zellfront, der Organisation von Mikrotubuli und die Ausrichtung des Golgi-Apparates vor den Nukleus gekennzeichnet. (B) Der Migrationszyklus beginnt mit der Bildung von Ausstülpungen durch die Induktion der Aktinpolymerisation und von Aktinverzweigungen an bestehenden Aktinfilamenten.

Die Ausstülpungen werden durch die Bildung neuer fokaler Adhäsionen, den fokalen Komplexen, stabilisiert. Dieser Prozess benötigt die Aktivierung und Aggregation von Integrinen sowie die Rekrutierung von Struktur- und Signalkomponenten an die entstehenden fokalen Komplexe. (C) Am hinteren Ende der Zelle werden Adhäsionen gelöst und die Zelle zieht sich zusammen. Verändert nach: [Ridley et al., 2003].

Grundsätzlich kann die Migration in die Einzelzellmigration (amöboide oder mesenchymale Migration) und die kollektive Migration als Zelllage (*sheet*), Zellstrang (*strand*), Röhre (*tube*) oder Zellhaufen (*cluster*) unterteilt werden [Friedl und Wolf, 2003b]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch immer derselbe [Ridley et al., 2003]. Als erste Voraussetzung muss die Zelle polarisiert sein (Abb. 1). Die Migration durch Gewebe resultiert dann aus einem kontinuierlichen Zyklus voneinander abhängiger Schritte. Zunächst bildet die Zelle F-Aktinreiche Ausstülpungen (Filopodien, Lamellipodien) in der gewünschten Richtung. Dann folgen Zell-Matrix-Interaktionen und fokale Komplexe werden gebildet. Die Zelle kontrahiert durch Aktivierung des Aktin-Myosin-Netzwerkes und schließlich wird der hintere Teil der Zelle vom Substrat gelöst. Die extrazelluläre Matrix (EZM) stellt nicht nur ein Substrat, sondern auch eine Barriere für die migrierende Zelle dar. Wenn die Zelle durch die EZM hindurchwandern will, werden Matrix-Metalloproteasen (MMP) rekrutiert und die EZM wird durch Proteolyse degradiert [Friedl und Wolf, 2003a].

Im Folgenden wird im Hinblick auf die vorliegende Arbeit insbesondere auf die pathologischen Aspekte der Adhäsion und der Zellmigration eingegangen.

Integrine und die extrazelluläre Matrix

Die meisten adhärennten Zellen stehen, auch wenn sie gespreitet sind, unter Spannung, welche durch Integrine aufrechterhalten wird, indem diese das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbinden. Die EZM besteht aus einer komplexen Mischung verschiedener Proteine und Proteoglycane. Als Substrat für Integrine dienen z.B. Kollagene, Laminine, Fibronectin oder Vitronectin. Jede Zelle exprimiert eine spezifische Mischung an Integrinen, welche dann bestimmte Bestandteile der EZM erkennen (Abb. 2). Integrine sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit, und jede $\alpha\beta$ -Kombination hat ihre eigene Substratspezifität und Signaleigenschaften [Hynes, 2002]. Jede Integrin-Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einfach die Membran durchspannenden Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne.

Die Affinität der Integrine für ihr Substrat ist regulierbar, indem die Konformation der extrazellulären Domäne durch intrazelluläre Signale von Adapterproteinen verändert wird (*inside-out signaling*). Andererseits kann auch die Bindung an ihr Substrat die Integrine aktivieren, indem die räumliche Nähe der intrazellulären Domänen und damit deren Bindungsverhalten zu interagierenden Proteinen verändert wird (*outside-in signaling*) [Hynes, 2002].

Integrine haben grundlegenden Einfluss auf fast alle Funktionen einer Zelle. Sie bestimmen, ob eine Zelle proliferiert, ob sie überleben darf oder in den Tod gehen muss (Apoptose, Anoikis), welche Form sie annimmt und ob sie migrieren kann [Giancotti und Ruoslahti, 1999; Lee und Juliano, 2004].

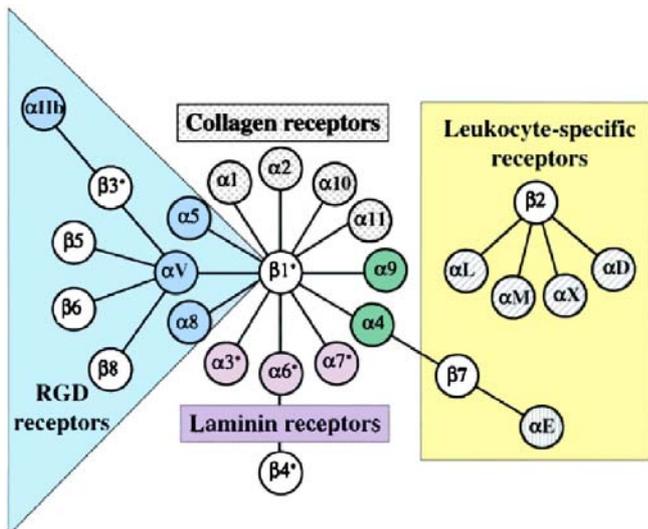


Abb. 2: Integrine und ihre Substrate. Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere. Hier sind die Säugetier-Untereinheiten und deren bisher beschriebene $\alpha\beta$ -Assoziationen sowie die bekannten Ligandspezifitäten gezeigt. 8 β -Untereinheiten können mit 18 α -Untereinheiten 24 verschiedene Integrine bilden. Diese werden aufgrund von evolutionärer Verwandtschaft (Farbgebung der α -Untereinheiten), Ligandspezifität und, im Fall von $\beta 2$ - und $\beta 7$ - Integrinen, durch die ausschließliche Expression auf Leukozyten, in Unterfamilien aufgeteilt. Das RGD-Motiv enthält z.B. Fibronektin, Vitronektin und Fibrinogen. Aus: [Hynes, 2002]

Die Integrin-basierten Kontaktpunkte des Aktinzytoskeletts mit der EZM werden als fokale Adhäsionen bezeichnet und enthalten eine Vielzahl an Adapter- und Signalproteinen, von denen einige in Abb. 3 dargestellt sind. Hier seien exemplarisch nur einige genannt. Filamin A, Talin und α -Aktinin gehören zu den F-Aktin-organisierenden Proteinen, d.h., sie bestimmen die dreidimensionale Struktur des verknüpften F-Aktins als Faserbündel oder als Netzwerk. Andere in der fokalen Adhäsion lokalisierte Proteine sind Kinasen oder deren Regulatoren und beteiligen sich direkt an der Kontrolle verschiedener Signalwege, wie z.B. FAK (*Focal Adhesion Kinase*), ILK (*Integrin Linked Kinase*), PAK1 (*p21 Aktivated Kinase*) oder Kinasen der Src-Familie [Petit und Thiery, 2000].

In motilen Zellen bleiben die fokalen Adhäsionen an Ort und Stelle, während die Zelle sich darüber hinweg bewegt, und die Verankerungen zum Aufbau von Zugkräften nutzt. In ruhenden Zellen wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass die fokalen Adhäsionskomplexe sich abhängig von der Stärke der durch das Aktin-Myosin-Netzwerk in der Zelle aufgebauten Spannung in Richtung der Zellmitte bewegten. Die fokalen Adhäsionen stehen also in motilen wie auch in unbeweglichen Zellen unter Spannung [Smilenov et al., 1999].

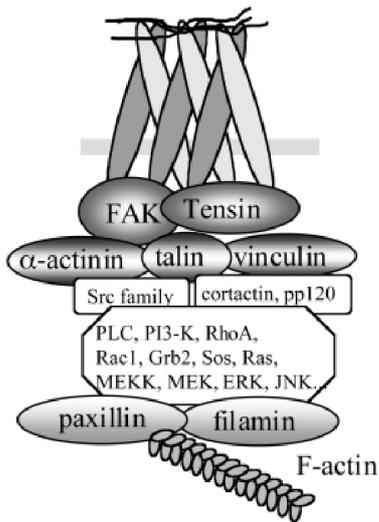


Abb. 3: Integrin-basierte Zell-Matrix-Adhäsionen. (A) In fokalen Adhäsionen verbinden Integrine Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) mit dem Aktinzytoskelett. Über ihre zytoplasmatischen Domänen rekrutieren die Integrine Struktur- und Signalmoleküle, die den Adhäsionskomplex bilden und Signale erzeugen und weiterleiten können. Die molekulare Zusammensetzung der fokalen Adhäsionen variiert und kann durch verschiedene exogene Faktoren beeinflusst werden. Details sind dem Review [Petit und Thiery, 2000] zu entnehmen.

GTPasen der Rho-Familie und fokale Adhäsionen

In Säugetierzellen wird die Generierung fokaler Adhäsionen durch kleine GTPasen der Rho-Familie reguliert [Bishop und Hall, 2000]. Die Rho-GTPasen gehören der Superfamilie der GTPasen an, welche in Säugerzellen mindestens 60 Mitglieder hat und in 5 Familien unterteilt wird: die Ras-, Rho-, Rab-, Arf- und Ran-GTPasen. GTPasen regulieren außer den im Folgenden erläuterten Aktinzytoskelett-assoziierten Signalwegen auch solche, die die Zellpolarität, die Transkription, die G1-Zellzyklusprogression, die Mikrotubulidynamik, den vesikulären Transport und die Endozytose/Phagozytose betreffen. GTPasen sind molekulare Schalter, die zelluläre Prozesse mit einer simplen biochemischen Strategie kontrollieren. Sie wechseln zwischen zwei Zuständen: dem GTP-gebundenen ("aktiven") und dem GDP-gebundenen ("inaktiven"), und sie können GTP zu GDP hydrolysieren. Im aktiven Zustand können GTPasen Zielproteine (Effektoren) erkennen und ein Signal erzeugen, bis die Hydrolyse des GTP die GTPase inaktiviert (Abb. 4).

Die Aktivierung der kleinen GTPasen erfolgt durch GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*), welche den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Die Inaktivierung erfolgt durch GAPs (*GTPase-Activating Proteins*), die die GTP-Hydrolyse stimulieren und durch GDIs (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*), welche inaktive GTPasen von der Membran extrahieren und den GDP-gebundenen Zustand stabilisieren. Alle bisher charakterisierten kleinen GTPasen sind durch einen posttranslational angehefteten Fettsäurerest (Farnesyl-, Geranyl-, Myristyl- oder Palmitylrest) mit Membranen assoziiert [Seabra, 1998]. Allein für Rho-GTPasen sind über 60 Effektorproteine, über 60 GEFs, mehr als 70 GAPs und 4 GDIs bekannt.

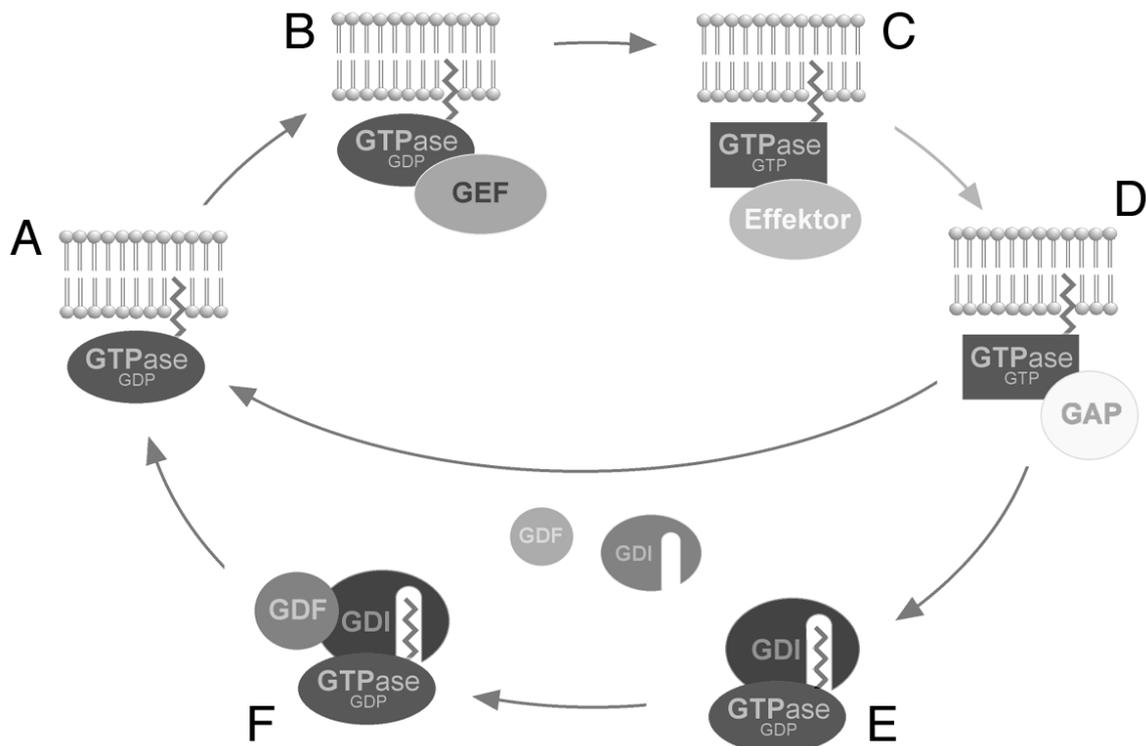


Abb. 4: Der Zyklus der kleinen GTPasen. Kleine GTPasen wechseln zwischen dem GTP-gebundenen ("aktiven") und dem GDP-gebundenen ("inaktiven") Zustand, und können GTP zu GDP hydrolysieren. Im aktiven Zustand erkennen GTPasen Effektorproteine. Die Aktivierung erfolgt durch GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*), die Inaktivierung durch GAPs (*GTPase-Activating Proteins*) und durch GDIs (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*). Die Dissoziation des GTPase-GDI-Komplexes wird durch GDFs (*GDI Dissociation Factors*) katalysiert. Aus: http://de.wikipedia.org/wiki/Kleine_GTPase

Zwei Mitglieder der Rho-Familie, Rac und Cdc42, nehmen eine Schlüsselstellung in der Kontrolle der Ausbildung von Zellfortsätzen und Adhäsionen in der Zellperipherie ein [Wehrle-Haller und Imhof, 2003]. Die Aktivierung von Cdc42 stimuliert die Polymerisation von F-Aktin, um an der Zellfront dünne, lange Ausläufer zu bilden (Filopodien), während die Aktivierung von Rac die Polymerisation von F-Aktin stimuliert und breitere Ausstülpungen induziert (Lamellipodien). Auch die Bildung neuer fokaler Adhäsionen, fokale Komplexe genannt, wird durch Rac kontrolliert. Das Wachstum und die Reifung dieser Kontaktpunkte zu fokalen Adhäsionen wird durch Rho-abhängige Prozesse bestimmt. Die kleine GTPase Rho reguliert auch die Organisation von Aktin in Bündeln und die Stärke der aufzubauenden Spannung in der Zelle sowie die Retraktion der hinteren Zellausläufer während der Migration. Das Schlüsselement in der Migration ist also die reziproke Regulation von Rac, welches an der Zellfront aktiv ist, wo neue Ausstülpungen und fokale Komplexe gebildet werden, und Rho, welches im Zellkörper die Spannung aufbaut und die fokalen Adhäsionen stabilisiert.

Die richtige Regulation des Turnover von fokalen Komplexen und fokalen Adhäsionen ist kritisch für die Migration. Während die Kontaktpunkte am hinteren Ende der Zelle ständig

abgebaut werden müssen, erfolgt an der Zellfront ein Neuaufbau. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen einzelner Komponenten der fokalen Adhäsionen, z.B. Kinasen der Src-Familie [Klinghoffer et al., 1999], der fokalen Adhäsionskinase (FAK) [Sieg et al., 1999] und Paxillin [Hagel et al., 2002] sowie Calpain [Huttenlocher et al., 1997], zu massiven Störungen der Migration führt. Diese Störungen scheinen auf einem defekten Turnover der Adhäsionen zu beruhen, da in keinem Fall die Bildung der Kontaktpunkte gestört ist, und stets besonders stark ausgebildete fokale Adhäsionen in der Zellperipherie vorhanden sind. Eine mögliche Erklärung ist, dass die vorhandenen fokalen Adhäsionen immer weiter organisiert und verstärkt werden, aber kein Umbau mehr stattfindet und keine Komponenten zur Wiederverwendung zur Verfügung stehen, so dass keine neuen fokalen Komplexe gebildet werden können. Eine Störung oder Veränderung im molekularen Aufbau der fokalen Adhäsionen, und damit der Zell-Matrix-Adhäsion, ist oft Bestandteil einer malignen Transformation von Zellen [Haass et al., 2005].

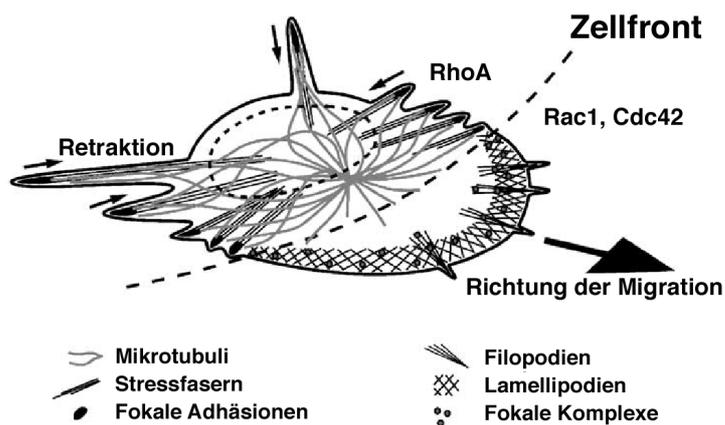


Abb. 5: Kleine GTPasen der Rho-Familie kontrollieren die Migration. Rac1 und Cdc42 sind an der Zellfront aktiv, wo sie die Bildung von Lamellipodien und Filopodien sowie den Aufbau von fokalen Komplexen steuern. Rho reguliert im Zellkörper die Bildung von Stressfasern und die Kontraktion der Zelle, inklusive der Retraktion der hinteren Ausläufer. Aus: [Wehrle-Haller und Imhof, 2003].

Epithelial-mesenchymale Transition und Zellstreuung

Phänotyptransitionen, die die Zell-Zell-Adhäsionen betreffen, treten sowohl in physiologischen (Embryonalentwicklung) als auch in pathologischen (Tumorprogression) Situationen auf. Ein Mechanismus, der eine solche Veränderung auslösen kann, ist die so genannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [Savagner, 2001].

Die EMT tritt z.B. in der Embryonalentwicklung während der Gastrulation, der Neuralrohrbildung und der Somitogenese auf. Epitheliale Subpopulationen regulieren ihre Zell-Zell-Adhäsionssysteme aktiv herunter und verlassen ihren angestammten Platz, um in eine neue Umgebung zu wandern und dort möglicherweise sogar zu einem anderen Zelltyp zu

differenzieren. Epitheliale Zellen sind polarisiert und besitzen Keratinfilamente sowie spezialisierte Zell-Zell-Kontaktpunkte wie Desmosomen und Adherens-Junctions. Nach der Induzierung der EMT verlieren sie diese epithelialen Eigenschaften und eignen sich mesenchymale Charakteristika an; so wird z.B. die Zellform flacher und Vimentinfilamente bilden den Hauptanteil an Intermediärfilamenten. Die Zellen können migrieren und auch einen invasiven Phänotyp ausbilden, der ihnen erlaubt durch die Basalmembran zu wandern, indem die notwendigen Proteinase gebildet werden. Am Zielort können die embryonalen Zellen dann in verschiedene Zelltypen differenzieren. Dies beinhaltet auch die Möglichkeit, wieder zur epithelialen Zelle zu werden. Die durch die EMT induzierten Veränderungen werden erreicht, indem Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle transkriptionell oder genomisch sowie durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Ubiquitinierung) herunterreguliert werden. Außerdem werden Zell-Zell-Adhäsion-erhaltende Signalwege gestört und Adhäsionen aktiv durch Proteolyse abgebaut [Savagner, 2001].

Auch in der Entstehung von Krebserkrankungen treten genetische und epigenetische Veränderungen von zellulären Phänotypen auf. Diese Veränderungen können unter anderem durch die unkontrollierte Reaktivierung der EMT induziert werden und haben besonders dramatische Auswirkungen, wenn die Zellen invasive Eigenschaften erlangen, das organisierte Epithelium verlassen und Metastasen bilden.

Cadherine und Melanomentstehung

Unter normalen Bedingungen bestimmt die Homöostase in der Haut, ob eine Zelle im Ruhezustand verbleibt, proliferiert, differenziert oder apoptotisch zugrunde geht. Die Melanozyten befinden sich nahe der Basalmembran und bilden eine „epidermale Melanin-Einheit“, die aus einem Melanozyten und fünf bis acht Keratinozyten besteht. In dieser Homöostase kontrollieren die Keratinozyten das Wachstum und das Verhalten der Melanozyten durch ein komplexes System parakriner Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen.

Melanozyten entkommen der Kontrolle durch drei Hauptmechanismen (Abb. 6): (1) die Herunterregulierung wichtiger Rezeptoren für die Kommunikation, z.B. E-Cadherin, (2) die Hochregulierung von Rezeptoren, die nicht auf Keratinozyten exprimiert werden, aber wichtig für eine Interaktion mit anderen Melanomzellen oder mit Fibroblasten sind, z.B. N-Cadherin, und (3) den Verlust der Verankerung an der Basalmembran mittels einer veränderten Expression von Mitgliedern der Integrinfamilie, welche Proteine der extrazellulären Matrix binden [Haass et al., 2005]. Eine Zelle wird also kanzerogen, indem sie

grundlegende Veränderungen ihrer molekularen Eigenschaften erfährt. Diese veränderten Eigenschaften ermöglichen der Zelle ein uneingeschränktes Wachstum durch die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen und die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen sowie die Fähigkeit, dem programmierten Zelltod (Apoptose, Anoikis) zu entkommen. Außerdem wird häufig die Fähigkeit entwickelt, Angiogenese zu induzieren und im fortschreitenden Stadium der Entartung nimmt die Zelle einen invasiven, metastasierenden Phänotyp an.

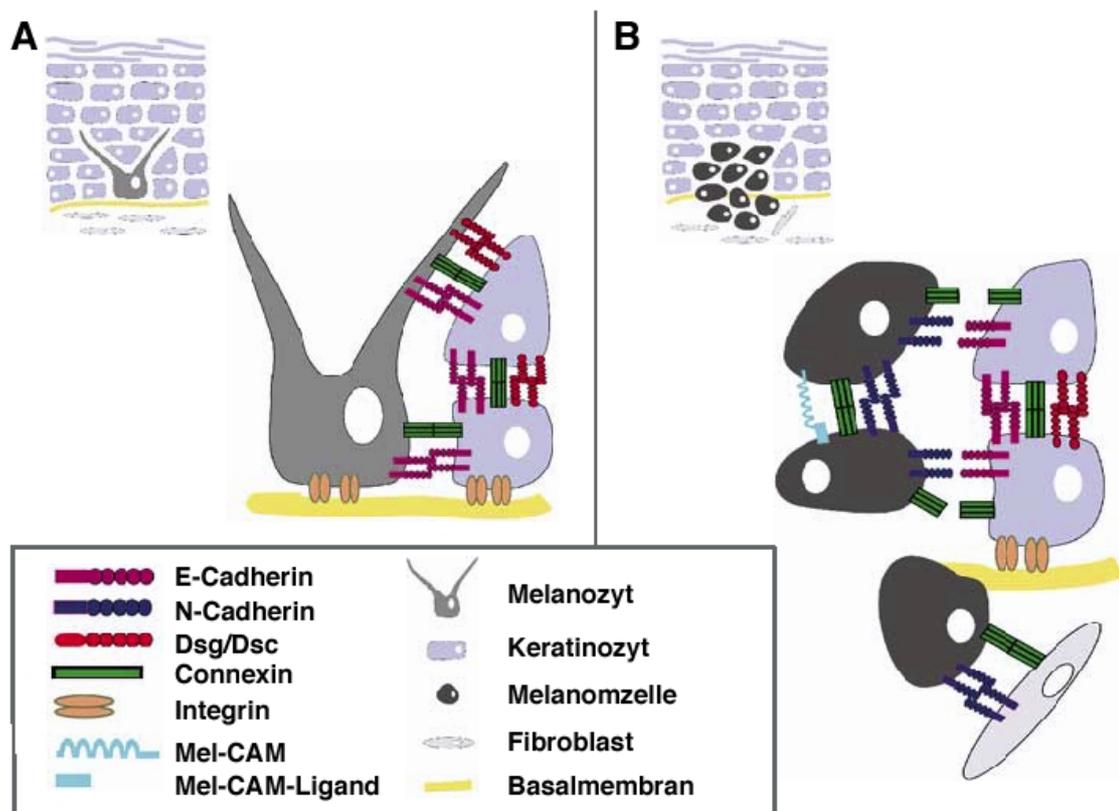


Abb. 6: Interzelluläre Interaktionen unter normalen und unter pathologischen Umständen während der Melanomentwicklung. (A) Melanozyten interagieren mit Keratinozyten durch E-Cadherin, Desmoglein und Connexine. Diese Interaktion ist für die Kontrolle von Wachstum und Phänotyp der Melanozyten durch die Keratinozyten notwendig. (B) Der Wechsel von der E-Cadherin- zur N-Cadherin-Expression befreit die Zellen nicht nur von der Bindung an - und damit von der Kontrolle durch - die Keratinozyten, er bietet auch neue adhäsive Eigenschaften. So können Melanomzellen mit Fibroblasten, Endothelzellen und angrenzenden Melanomzellen interagieren. Dsg: Desmoglein; Dsc: Desmocollin. Aus: [Li et al., 2003].

In Melanomzellen kontrollieren hauptsächlich die Cadherine eine Balance zwischen der Suppression und der Promotion der Invasion [Li et al., 2002]. Cadherine bilden eine Familie Ca^{2+} -abhängiger, transmembranärer Adhäsionsrezeptoren, die homophile Bindungen mit Cadherinen benachbarter Zellen eingehen und so stabile Zell-Zell-Kontakte, die *Adherens-*

Junctions, bilden. E-Cadherin fungiert als Suppressor der Invasion und ist in den meisten Karzinomzellen herunterreguliert, während N-Cadherin als Invasions-Promotor häufig hochreguliert ist. In *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass die Expression von N-Cadherin in epithelialen Zellen Veränderungen in der Morphologie der Zelle hin zu einem mesenchymalen Phänotyp induziert [Derycke und Bracke, 2004].

Ig-CAMs und Tumorprogression

Neben Cadherinen und Integrinen spielt eine dritte Familie von Zelladhäsionsrezeptoren eine wichtige Rolle in der Tumorprogression: die Ig-CAMs (*Immunoglobulin super family of Cell Adhesion Molecules*) [Juliano, 2002]. Sie sind Mitglieder der Immunglobulin-Supergenfamilie (IgSF) und besitzen alle eine oder mehrere konservierte, extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, welche eine Selbstbindung oder die Bindung anderer Interaktionspartner in *cis* und in *trans* vermitteln können. Mitglieder der IgSF haben Erkennungs-, Adhäsions-, und Rezeptorfunktionen in der Aufrechterhaltung des Immunsystems (z.B. B- und T-Zell-Rezeptor, MHC-Moleküle Klasse I und II) [Hawke et al., 1999], aber auch in der Entstehung des Nervensystems, z.B. N-CAM, Neurofascin, L1-CAM [Crossin und Krushel, 2000].

Viele Mitglieder dieser heterogenen und hochglykosylierten Proteinfamilie wurden mit der malignen Transformation und der Progression metastatischer Erkrankungen in Verbindung gebracht [Johnson, 1991]. So wurde in Kolonkarzinomen die verringerte Expression von DCC (*Down regulated in Colon Carcinoma*) und die Hochregulation von CEA (*Carcinoembryonic Antigen*, CEACAM5) beschrieben; letztere korrelierte mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung. CEA wird weltweit insbesondere bei der Nachsorge von Kolonkarzinomen als Tumormarker verwendet. In Hirntumoren wurde eine erhöhte Expression von Nr-CAM (Neuron-glia-related CAM) gefunden [Sehgal et al., 1998]. Außer der falschen Regulation von Ig-CAMs zeigen viele Tumoren eine *de novo*-Expression von nicht zelltypspezifischen Ig-CAMs. So wurde z.B. die Expression von NCAM (*Neuronal CAM*), ICAM-1 (*Intercellular CAM-1*) und PECAM (*Platelet-Endothelial CAM*) in Karzinomen beschrieben [Tang und Honn, 1994]. Die Expression von Mel-CAM (*Melanoma CAM*) und dem neuronalen Adhäsionsrezeptor L1-CAM steht in engem Zusammenhang mit der Progression von Melanomen [Li et al., 2002].

Ein weiteres Mitglied der Ig-CAMs, das CEACAM1 (*Carcinoembryonic Antigen-related CAM 1*), deutet durch seine je nach Zelltyp unterschiedlichen Auswirkungen die Komplexität aller regulierenden Mechanismen an. So scheint CEACAM1 in Kolonkarzinomen die Funktion eines Tumorsuppressors zu haben [Izzi et al., 1999; Kunath et al., 1995] und ist in

diesen Tumoren oft herunterreguliert [Neumaier et al., 1993]. Im Gegensatz dazu ist die *de novo*-Expression von CEACAM1 in Melanomen mit einer erhöhten Metastasierungsrate und einer schlechten Prognose verbunden [Brümmer et al., 2001; Thies et al., 2002].

Die CEA-Proteinfamilie

Das CEA ist namensgebendes Mitglied der Familie der CEA-verwandten Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs, *Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecules*). Diese Familie enthält drei Untergruppen: die CEA-Proteinfamilie, die PSG-Proteinfamilie (*Pregnancy-Specific Glycoproteins*) und die nicht transkribierten Pseudogene [Beauchemin et al., 1999]. Im Folgenden soll die CEA-Proteinfamilie näher vorgestellt werden. Die Nomenklatur der Mitglieder wurde der Übersicht halber 1999 reformiert und wird in dieser Arbeit wie vorgeschlagen verwendet [Beauchemin et al., 1999].

Die CEA-Proteinfamilie wächst beständig, und kürzlich wurden 10 neue Mitglieder auf mRNA-Ebene beschrieben [Zebhauser et al., 2005]. Die alten und neuen CEACAMs sind in Abb. 7 dargestellt. Die CEA-Proteinfamilie besteht beim Menschen aus 13 Genen, deren vollständige Genprodukte 7 Transmembranproteine bzw. 4 GPI-verankerte Moleküle sowie ein lösliches Protein darstellen [Olsen et al., 1994; Zebhauser et al., 2005]. Die vier GPI-verankerten Proteine stellen eine Besonderheit des Menschen dar, da bisher in keiner anderen Art GPI-verankerte CEACAMs gefunden wurden. Sie scheinen also eine eher "neue Erfindung" der Evolution zu sein. In der Maus werden 6 transmembranäre CEACAMs [Nedellec et al., 1994; Zebhauser et al., 2005] und 8 sekretierte CEACAMs exprimiert [Kataoka et al., 2000; Keck et al., 1995; Zebhauser et al., 2005]. In der Ratte wurde CEACAM1 als einziges transmembranäres Molekül auf Proteinebene nachgewiesen, jedoch sind unter den auf mRNA-Ebene neu beschriebenen CEACAMs vier weitere potentielle transmembranäre Proteine zu finden. Außerdem besitzt die Ratte 7 lösliche CEACAMs [Blomberg et al., 1997; Earley et al., 1996; Kodelja et al., 1989; Zebhauser et al., 2005]. Die Vielfalt der CEA-Familie wird in allen Spezies auf Ebene der Proteine noch durch (teilweise mehrfaches) alternatives Spleißen der jeweiligen mRNA erhöht. Diese Vielfalt macht es oft schwer, spezifische Aussagen treffen zu können, vor allem, da die meisten Antikörper mit mehreren CEACAMs kreuzreagieren.

Die extrazellulären Domänen aller Mitglieder der CEA-Proteinfamilie sind aus unterschiedlich vielen Ig-ähnlichen Domänen zusammengesetzt (Abb. 7). Die Ig-Domäne stellt eine strukturell autarke Faltungseinheit dar und eignet sich deshalb sehr gut für den modularen Aufbau von Proteinen [Williams und Barclay, 1988]. Von der Grundform der Ig-

Domäne existieren zwei Subtypen: (1) Die IgV-Domäne weist Homologien zu den variablen Domänen der Immunglobuline auf und besteht aus 108 bis 110 Aminosäuren, (2) IgC-Domänen sind mit 86-96 Aminosäuren etwas kleiner und weisen Homologien zu den konstanten Ig-Domänen auf. Sie gehören entweder zum C1- bzw. A-Typ, der dem klassischen Typ einer konstanten Domäne entspricht, oder zum C2- bzw. B-Typ, der ein Faltungsmuster zwischen dem V- und dem C1-Typ aufweist [Bork et al., 1994].

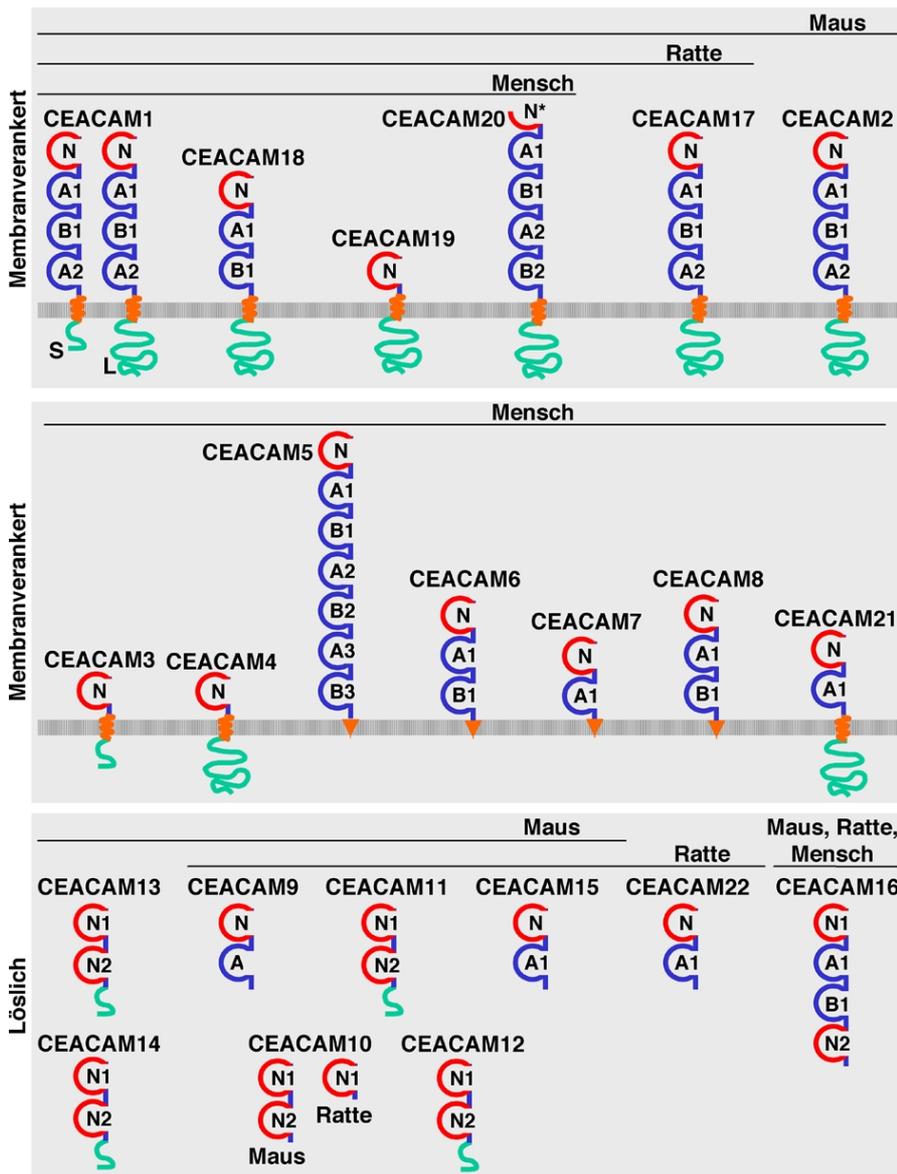


Abb. 7:
Schematische Darstellung der Mitglieder der CEA-Proteinfamilie.

N: Ig-ähnliche Domänen des variablen Typs; A und B: Ig-ähnliche Domänen des konstanten Typs. GPI-Anker sind als orange Dreiecke dargestellt. L und S bezeichnen die lange und die kurze Spleißvariante von CEACAM1. CEACAM20 besitzt eine verkürzte N-Domäne (N*). Viele der für die hier gezeigten Proteine kodierenden Gene liefern durch alternatives Spleißen zusätzliche Varianten, die hier nicht dargestellt sind. Die CEACAMs 12 bis 20 wurden bisher nur auf mRNA-Ebene beschrieben. Nach: [Zebhauser et al., 2005].

CEACAM1: Struktur und extrazelluläre Interaktionen

Die beiden am häufigsten exprimierten Isoformen von CEACAM1 besitzen 4 extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen und eine Transmembrandomäne. Durch alternatives Spleißen besteht die zytoplasmatische Domäne entweder aus 10 Aminosäuren (S, *short*) oder aus 73 Aminosäuren (L, *long*). Insgesamt sind bislang 13 verschiedene Isoformen des humanen CEACAM1 charakterisiert worden, die für diese Arbeit jedoch keine Rolle spielen [Barnett et al., 1993]. CEACAM1 ist ein hochglykosyliertes Protein mit 15 potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Der Zuckeranteil macht mindestens der Hälfte seines Molekulargewichtes aus. Die Glykosylierung ist heterogen und das apparente Molekulargewicht kann je nach Organ und Spezies stark variieren (105 bis 180 kDa) [Becker et al., 1989]. CEACAM1 wird auf Zellen epithelialen, endothelialen und hematopoietischen Ursprungs exprimiert. In Muskel- und Nervengewebe konnte es nicht nachgewiesen werden [Becker et al., 1989; Godfraind et al., 1995; Mowery und Hixson, 1991; Odin et al., 1988; Odin und Öbrink, 1987; Prall et al., 1996].

CEACAM1 kann durch seine extrazelluläre Domäne homophile und heterophile Interaktionen eingehen. Besonders detailliert wurden die homophilen Wechselwirkungen, die CEACAM1 in *cis* und in *trans* eingehen kann, beschrieben [Tingstrom et al., 1990; Watt et al., 2001; Wikstrom et al., 1996]. Die Stärke der homophilen Wechselwirkungen in *trans* scheint regulierbar zu sein, und zwar durch die Homodimerisierung in *cis* auf der Membran [Hunter et al., 1996] und durch die Apoptose-induzierte Abspaltung der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-L durch die Caspase3 [Houde et al., 2003]. In die homophile wie auch in die heterophile Bindung sind insbesondere die N-terminalen Ig-Domänen des V-Typs involviert. CEACAM1 kann verschiedene andere Mitglieder der CEA-Familie, z.B. CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8, binden [Oikawa et al., 1992]. Neueste Daten zeigen, dass CEACAM1 auf Tumorzellen mit CEACAM5 auf natürlichen Killerzellen (NK) interagiert und so die Tötung der Tumorzelle verhindern kann [Stern et al., 2005]. Außerdem kann CEACAM1 von verschiedenen bakteriellen und viralen Pathogenen als Rezeptor rekrutiert werden [Dveksler et al., 1991; Virji et al., 2000; Virji et al., 1996].

Wie oben beschrieben, ist das humane System aufgrund der vielen membrangebundenen CEACAMs und ihrer Isoformen sehr komplex. Die Ratte ist daher der Organismus der Wahl für Untersuchungen an CEACAM1. Bisher wurde in der Ratte nur CEACAM1 als transmembranäres Mitglied der CEA-Familie auf Proteinebene nachgewiesen. Sollten zukünftig auch die anderen membrangebundenen CEACAMs auf Proteinebene gefunden werden, würde auch hier die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Außerdem ist bei der Übertragung der Daten vom Rattensystem auf das humane System generell besondere Vorsicht geboten, da sich aufgrund der unterschiedlichen Kombination an koexprimierten

CEACAMs die Funktionen von CEACAM1 in der Ratte und im Menschen in denselben Zellen sehr unterscheiden kann, wie z.B. für Granulozyten gezeigt wurde [Singer et al., 2002].

CEACAM1: Funktionen

Eine ständig wachsende Zahl von Publikationen deutet darauf hin, dass unter dem Oberbegriff "Regulation der Differenzierung" die Hauptfunktion von CEACAM1 zu finden ist. So konnte eine essentielle Rolle für CEACAM1 bei der Differenzierung oder der Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus verschiedener Zelltypen gezeigt werden. MCF10F-Brustdrüsen-Epithelzellen reifen in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix CEACAM1-abhängig zu tubulären Strukturen unter Ausbildung einer apikal-basolateralen Polarisierung [Huang et al., 1999]. Auch in der Angiogenese, d.h., der Entstehung von Blutgefäßen aus Endothelzellen [Folkman, 2003], spielt CEACAM1 eine Rolle [Müller et al., 2005], und die Angiogenese konnte durch lösliches CEACAM1 stimuliert werden [Ergün et al., 2000]. Auch die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen, und damit die frühe Immunantwort, wird durch CEACAM1 beeinflusst [Kammerer et al., 2001].

In einigen Zellsystemen konnte für CEACAM1 eine Wachstums-hemmende (antiproliferative und proapoptotische) Wirkung beobachtet werden. Die Expression von CEACAM1 in NIH3T3-Fibroblasten hemmte deren Proliferation nach Stimulation mit Insulin [Poy et al., 2002] und die Behandlung mit anti-CEACAM1-Antikörpern hemmte die Proliferation von anti-CD3-stimulierten T-Zellen [Nakajima et al., 2002]. In den epithelialen Zelllinien NbE und NBT-II vermittelte CEACAM1 die Kontaktinhibition der Proliferation [Singer et al., 2000]. Auch diese Daten deuten auf eine Rolle von CEACAM1 in der terminalen Differenzierung von Zellen hin, die für gewöhnlich mit der Einstellung der Proliferation einhergeht. *In vivo* wird die Expression von CEACAM1 während der Ausbildung der Leber in der Embryonalentwicklung und der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie herunterreguliert [Odin und Öbrink, 1986]. Erst nach Beendigung der Entwicklung/Regeneration wird die Expression von CEACAM1 auf den "normalen" adulten Expressionslevel erhöht. Eine proapoptotische Wirkung von CEACAM1 konnte unter anderem *in vivo* in Kolonkarzinomzellen und *in vitro* in Jurkat- und in HT29-Zellen beobachtet werden [Nittka et al., 2004]. Allerdings gibt es auch für diese Eigenschaft gegenteilige Befunde. So konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Apoptose-verzögernde Wirkung von CEACAM1 in Granulozyten gezeigt werden [Singer et al., 2005].

Die epithelialen NBT-II-Zellen (Nara-Bladder-Tumor) sind ein für CEACAM1 endogenes und gut beschriebenes Zell-System [Hunter et al., 1994]. Sie wurden aus einem chemisch

induzierten Ratten-Blasen-Karzinom isoliert und exprimieren die lange und auch die kurze CEACAM1-Isoform. Der Expressionslevel der beiden Isoformen wird durch die Dichte der in Kultur gehaltenen Zellen beeinflusst. Konfluente NBT-II-Zellen exprimieren nur die Hälfte der CEACAM1-Menge von nicht konfluenten NBT-II-Zellen [Singer et al., 2000]. Außerdem verändert sich das Verhältnis von kurzer (S) zu langer (L) Isoform. Die Ratio steigt auf mRNA-Ebene von ungefähr S:L=5 in nicht konfluenten auf etwa S:L=10 in hyperkonfluenten Zellen an und ist vermutlich für die Kontaktinhibition der Zellen zumindest mitverantwortlich. In subkonfluent kultivierten NBT-II-Zellen kann die EMT innerhalb weniger h (4-16) durch verschiedene Stimuli indiziert werden, z.B. durch die Kultivierung auf Kollagen, oder die Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (*Epithelial Growth Factor*), aFGF (*acidic Fibroblast Growth Factor*), TGF α (*Transforming Growth Factor α*) und SF/HGF (*Scatter Factor, Hepatocyte Growth Factor*) [Savagner, 2001; Thiery und Chopin, 1999]. Konfluente sowie nicht konfluente NBT-II-Zellen zeigen nach der Induktion der EMT eine deutlich stärkere Expression der langen CEACAM1-Isoform [Hunter et al., 1994]. NBT-II-Zellen, bei denen die EMT induziert wurde, verlassen den ansonsten sehr engen und hochorganisierten Zellverband der Kolonien, verändern ihr Aussehen und wandern als Einzelzellen umher (*cell scattering*, Zellstreuung). Sind die NBT-II-Zellen konfluent, können sie nicht streuen und reagieren auf EGF- oder aFGF- Behandlung mit Proliferation, was darauf hindeutet, dass je nach Zelldichte verschiedene Signalwege aktiviert werden.

CEACAM1: Signaltransduktion und intrazelluläre Interaktionen

Um die vielen obengenannten, wie auch die hier nicht näher besprochenen Funktionen ausüben zu können, muss CEACAM1 in der Lage sein, Signale zu empfangen (oder zu erzeugen), zu modulieren und weiterzuleiten. Die Signaltransduktion von CEACAM1 umfasst einerseits die reversible Proteinphosphorylierung, und andererseits die Interaktion mit Adapter- sowie Struktur- und Signalproteinen (Abb. 8).

CEACAM1 enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen. In der kurzen Isoform, CEACAM1-S, die keine Tyrosine in der zytoplasmatischen Domäne besitzt, wird das Serin 449 von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert [Edlund et al., 1998]. In der langen Isoform, CEACAM1-L, wird das Serin 503 phosphoryliert [Najjar et al., 1995]. CEACAM1-L besitzt außerdem zwei Tyrosine, die beide phosphoryliert werden. Das Tyr488 des CEACAM1-L wird durch die Kinasen der src-Familie (c-src, lyn, hck) phosphoryliert [Brümmer et al., 1995; Margolis et al., 1990; Skubitz et al., 1995]. Nach seiner

Tyrosinphosphorylierung kann CEACAM1 eine Reihe von Substraten binden, wie z.B. die Proteinphosphatasen SHP1 und SHP2 [Beauchemin et al., 1997; Huber et al., 1999]. Auch die Adapterproteine Shc und Paxillin sowie β_3 -Integrin binden den zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L in Abhängigkeit von dessen Tyrosinphosphorylierung [Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2000; Poy et al., 2002].

Das membranproximale Tyrosin 488 liegt in einem so genannten *Immunoreceptor-Tyrosine-Based-Inhibitory-Motiv* (ITIM). Zusammen mit dem distalen Tyrosin 513 bildet es ein modifiziertes *Immunoreceptor-Tyrosine-based-Activation-Motiv* (ITAM). Allerdings ist der Abstand mit 25 AS größer als die 10 AS, die im klassischen ITAM gefunden werden [Beauchemin et al., 1997]. Im humanen CEACAM1 bildet auch das distale Tyrosin ein ITIM. ITIMs und ITAMs werden in einer Vielzahl von Membranrezeptoren gefunden, wie dem T-Zell-Rezeptor, dem B-Zell-Rezeptor, Fc γ RIIB, CD22, Interleukinrezeptoren und KIRs (*Killer-cell-Ig-like-Receptors*). Nach ihrer Phosphorylierung binden ITAMs und ITIMs an Proteinkinasen bzw. -phosphatasen, deren Aktivierung zur Stimulation oder Termination von Signalwegen führt, die die Zellproliferation regulieren [Daeron et al., 1995; Öbrink, 1997].

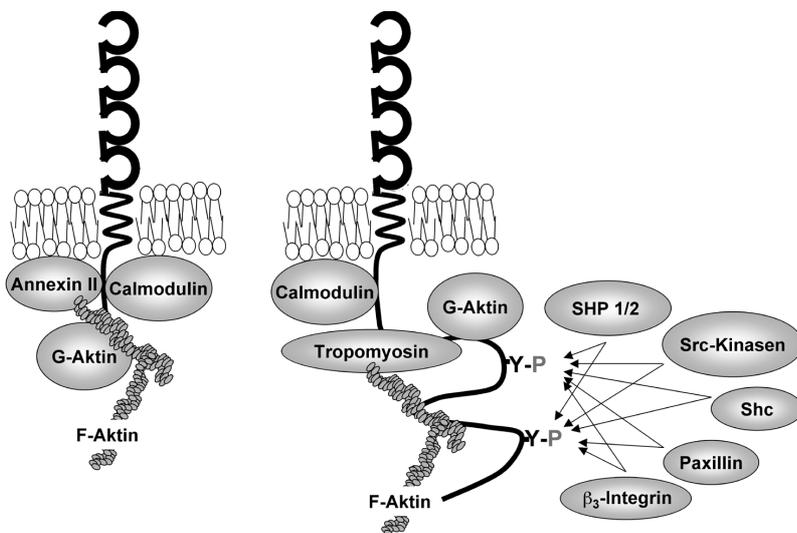


Abb. 8: Intrazelluläre Bindungspartner von CEACAM1. Die lange und die kurze Isoform von CEACAM1 können mit verschiedenen Struktur- und Signalproteinen interagieren. Die lange Isoform bindet einige - aber nicht alle - Interaktionspartner abhängig von der Phosphorylierung der Tyrosine 488 und 513.

Es wurden aber auch verschiedene phosphorylierungsunabhängige Interaktionen mit CEACAM1 beschrieben. So ist die Bindung von CEACAM1-L bzw. CEACAM1-S an Calmodulin [Edlund und Öbrink, 1993], Tropomyosin [Schumann et al., 2001], Annexin [Kirshner et al., 2003], G-Aktin und F-Aktin [Da Silva-Azevedo und Reutter, 1999; Schumann et al., 2001] scheinbar nicht vom Phosphorylierungsstatus abhängig.

Filamin A: ein Gerüstprotein

Nicht nur direkte Veränderungen des Phosphorylierungszustandes, sondern auch die Bindung von Adapter- und Signalproteinen erlaubt die Weiterleitung oder Modulation von Signalen. Grundsätzlich scheinen die meisten Signalwege in Signalkomplexen organisiert zu sein, die eine fein abgestimmte Regulation ermöglichen [Hunter, 2000]. Neben Kinasen und Phosphatasen sind auch kleine GTPasen sowie nicht-signalisierende Proteine in den Komplexen vorhanden. Diese können als Ankerprotein (räumliche Regulation), als Gerüstprotein (Bindung mehrerer Komponenten) oder als Adapterprotein (Rekrutierung einzelner Komponenten) in die Signaltransduktion eingreifen.

Ein bereits früh als Gerüst (*scaffold*) beschriebenes Protein ist das Filamin A [Stossel et al., 2001; van der Flier und Sonnenberg, 2001]. Humanes Filamin A hat eine berechnete Größe von 280 kDa und ist stabähnlich aufgebaut. Es besteht aus der N-terminal gelegenen Aktin-Bindungsdomäne (ABD), 24 Filamin-Repeats von 96 Aminosäuren Länge und zwei Hinge-Regionen (Abb. 9B, 11A). In Repeat 24 liegt der Bereich, der die Dimerisierung von Filamin A ermöglicht [Pudas et al., 2005].

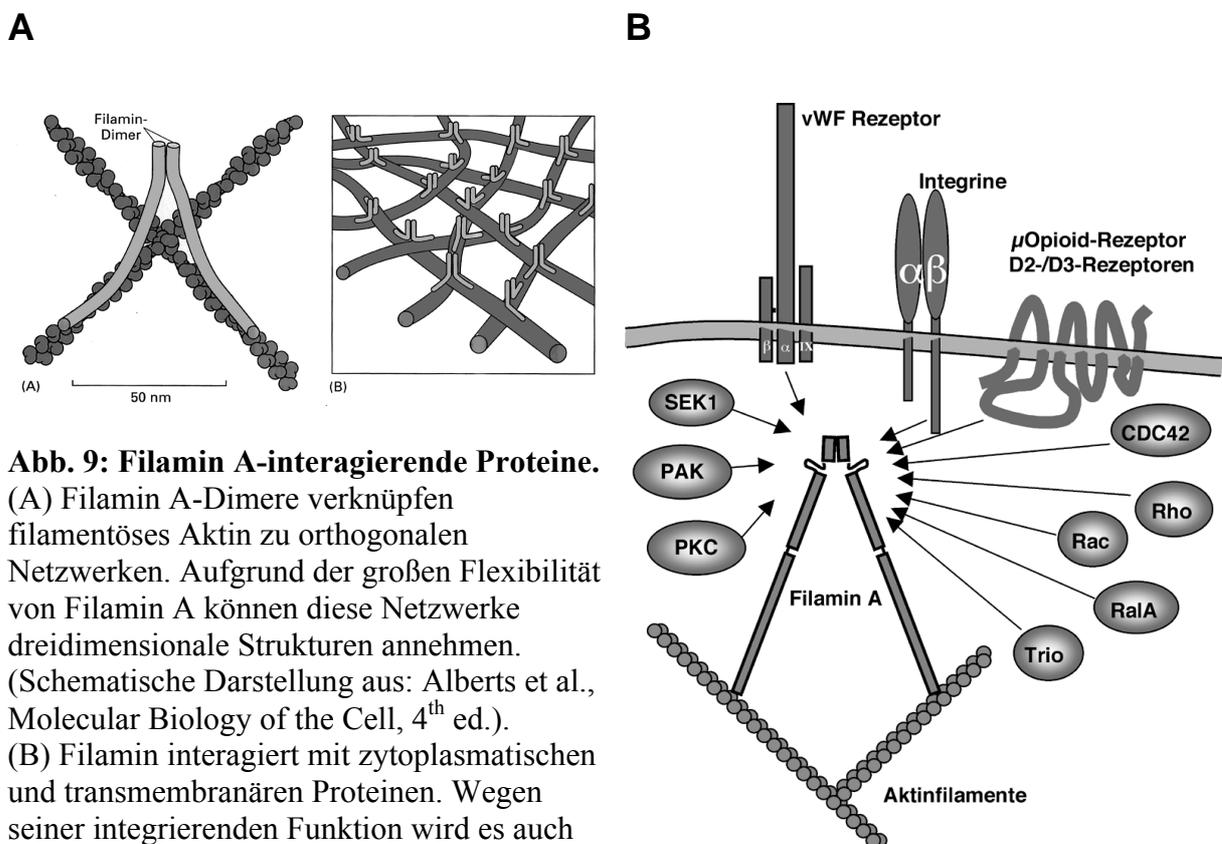


Abb. 9: Filamin A-interagierende Proteine. (A) Filamin A-Dimere verknüpfen filamentöses Aktin zu orthogonalen Netzwerken. Aufgrund der großen Flexibilität von Filamin A können diese Netzwerke dreidimensionale Strukturen annehmen. (Schematische Darstellung aus: Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed.). (B) Filamin interagiert mit zyttoplasmatischen und transmembranären Proteinen. Wegen seiner integrierenden Funktion wird es auch als Gerüstprotein bezeichnet.

Die Y-artig aussehenden, sehr flexiblen Filamin A-Dimere sind für die Organisation filamentösen Aktins in dreidimensionale, orthogonale Netzwerke verantwortlich (Abb. 9A) und verankern eine Vielzahl von membrangebundenen Proteinen am Aktinzytoskelett (Abb. 9B). Dazu gehören z.B. verschiedene Integrine [Loo et al., 1998; Sharma et al., 1995], der von-Willebrand-Rezeptor [Meyer et al., 1997], Tissue Factor [Ott et al., 1998], die Dopaminrezeptoren D2/3 [Li et al., 2000], der μ Opioid-Rezeptor [Onoprishvili et al., 2003], verschiedene Kaliumkanäle [Petrecca et al., 2000; Sampson et al., 2003] und Caveolin [Stahlhut und van Deurs, 2000]. Auch viele Signalmoleküle, wie z.B. PKC α [Tigges et al., 2003], PAK [Vadlamudi et al., 2002], SEK1 [Marti et al., 1997], Smad5 und Smad2 [Sasaki et al., 2001] sowie die kleinen GTPasen Rac1, Rho1, Cdc42 und RalA [Ohta et al., 1999], können an Filamin A binden. Bis heute sind mindestens 14 zytoplasmatische und 22 membrangebundene direkte Interaktionspartner für Filamin A beschrieben worden. Je nach Zelltyp, intrazellulärer Lokalisation und Zeitpunkt ist Filamin A mit unterschiedlichen Proteinen oder Proteinkomplexen assoziiert.

Filamin A ist also sowohl mechanisch, durch seine F-Aktin-organisierende Eigenschaft, als auch durch seine Gerüstfunktion in Signalkomplexen in die Regulation Aktin-abhängiger Vorgänge, wie z.B. der Migration, involviert. Dies wurde durch *in vitro* wie auch *in vivo* erhaltene *loss-of-function*-Daten belegt. So ist die Migration und Phagozytose von Filamin A-defizienten amöboiden Dictiostelien ebenso gestört [Cox et al., 1992; Cox et al., 1996], wie die Migration von Drosophila-Follikelzellen [Sokol und Cooley, 2003] und humanen Melanomzellen [Cunningham et al., 1992]. Mutationen im Filamin A-Gen sind auch Ursache für die humane periventrikuläre Heterotopie, eine Hirnfehlbildung. Diese X-chromosomal assoziierte Krankheit ist für männliche Nachkommen fast immer *in utero* tödlich. Weibliche Patienten zeigen ein Versagen der neuronalen Migration in den Cortex und erleiden epileptische Anfälle, die auf Ansammlungen neuronaler Zellkörper entlang der Ventrikel zurückzuführen sind.

Die kleine GTPase RalA

Ein Interaktionspartner von Filamin A, der viele der Fehlfunktionen in Filamin A-defizienten Zellen erklären könnte, ist die kleine GTPase RalA. Die beiden nah verwandten Ral-Proteine RalA und RalB (85% Übereinstimmung) gehören zur Ras-Familie der kleinen GTPasen und sind mit 58% Identität zu H-Ras, N-Ras und K-Ras die Proteine mit der größten Ähnlichkeit zu Ras [Feig, 2003]. Ral zog das wissenschaftliche Interesse auf sich, als deutlich wurde, dass die Aktivierung von Ral unter anderem über Ral GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange*

Factors) erfolgt, die wiederum Ras-abhängig aktiviert werden [Feig et al., 1996]. Ras-Proteine (H-Ras, K-Ras und N-Ras) werden in 15% aller menschlichen Tumoren in einer mutierten, konstitutiv aktiven Form vorgefunden. Mittlerweile gibt es immer mehr Hinweise, dass aktivierte Ral-GTPasen einen wesentlichen Teil der Ras-induzierten Transformation von Zellen vermitteln.

Es zeigte sich jedoch, dass Ral auch unabhängig vom Ras-Signalweg aktiviert werden kann. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Ral auch Ras-unabhängige Funktionen ausübt. So ist Ral beispielsweise an der Endozytose von Transmembranrezeptoren beteiligt, einem Mechanismus, der essentiell für die Herunterregulation von aktivierten Signalwegen in der Zelle ist [Feig, 2003]. Auch bei der Exozytose scheint Ral eine regulatorische Rolle zu übernehmen: so wurde Ral als Bestandteil des so genannten Exozyst-Komplexes nachgewiesen, einem Protein-Komplex, der sich an Vesikeln bildet, deren Inhalt durch Verschmelzung mit der Zellmembran aus der Zelle ausgeschleust werden soll [Camonis und White, 2005]. Diese Lokalisation im Exozyst-Komplex scheint ebenso wie die Interaktion mit Filamin A die Filopodienbildung zu regulieren [Ohta et al., 1999; Sugihara et al., 2002]. Als einzige GTPase interagiert RalA nur in GTP-gebundener Form mit Filamin A und reguliert so die Cdc42-induzierte Filopodienbildung in Swiss 3T3-Zellen und in A7-Melanomzellen. Weitere Hinweise für die Beteiligung von RalA an der Regulation der Migration lieferte die Expression von aktiviertem RalA in skelettalen Myoblasten, deren Motilität so erhöht wurde [Suzuki et al., 2000] und die Expression einer dominant-negativen RalA-Form in epithelialen Drosophila-Zellen, wodurch deren Migration verringert wurde [Lee et al., 1996].