

IV. CEACAM-Fc-Fusionsproteine

Klonierung und Expression

Um Studien zur Funktion wie auch zur Struktur von CEACAM1 und anderen Mitgliedern der CEA-Familie zu ermöglichen, wurden verschiedene Fc-Fusionsproteine kloniert und exprimiert (Abb. 49). Der Fc-Teil einer humanen IgG-gamma-Kette soll zur leichten Reinigung der Fusionsproteine über Protein-G-Sepharose dienen, er kann aber auch zum Kreuzvernetzen oder zur Detektion durch einen sekundären Antikörper verwendet werden. Die Reinigung wird außerdem dadurch erleichtert, dass die Fusionsproteine in den Zellkulturüberstand sezerniert werden. Es war nicht bekannt, ob die Hinge-Region, welche im Antikörper die beiden schweren Ketten über Disulfid-Brücken miteinander verbindet, einen Einfluss auf das Verhalten des Fusionsproteins hat. Daher wurden die unten genauer beschriebenen Ratten-CEACAM1-Konstrukte einmal mit (FcH) und einmal ohne (FcO) die Hinge-Region des Fc-Teils kloniert. Die ersten Daten aus FACS-Analysen mit Ratten-CEACAM1-FcH- und Ratten-CEACAM1-FcO-Fusionsproteinen ergaben, dass das FcH-Konstrukt nach der Reinigung mit zunehmender Lagerungszeit an homophiler Bindungskapazität eingebüßt hat, während die FcO-Konstrukte weiter stabil in ihrer Bindung waren (Abb. 50). Daher wurden alle anderen Konstrukte (humanes CEACAM1-4L, CEACAM1-4L- Δ N, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8) ausschließlich als FcO-Fusionsproteine hergestellt. Vom Ratten-CEACAM1 wurden zusätzlich zur gesamten extrazellulären Domäne (raCC1-ExD) die folgenden Fragmente als FcH- bzw. als FcO-Fusionsprotein hergestellt: raCC1-N/A1/B, raCC1-N/A1, raCC1-N und raCC1- Δ N. Diesen Konstrukten fehlen jeweils eine oder mehrere Ig-ähnliche Bereiche der extrazellulären Domäne. Die Bezeichnungen der Konstrukte setzen sich aus den vorhandenen Ig-ähnlichen Domänen von CEACAM1 (N, A1, B, A2; von N- nach C-terminal) und der Bezeichnung der Fc-Variante (FcO für die Variante ohne, FcH für die Variante mit Hinge-Region) zusammen. Alle beschriebenen Konstrukte sind in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ kloniert worden. Alle Klonierungsstrategien sind detailliert im Material-und-Methoden-Abschnitt aufgeführt. In Abb. 49 sind alle klonierten Konstrukte schematisch dargestellt.

Alle Fusionsproteine werden sezerniert und können somit einfach aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen gereinigt werden. Die Sezernierung der Fusionsproteine in den Zellkulturüberstand wird durch das N-terminale CEACAM1-Export-Signalpeptid vermittelt. Für die Ratten- und die humane CEACAM1- Δ -N-Mutante wurde daher das Ratten-CEACAM1-Signalpeptid vor die restliche Sequenz der extrazellulären Domäne kloniert.

HEK293-Zellen wurden mit allen Konstrukten transfiziert und subkloniert. Die am besten exprimierenden Klone wurden mithilfe von ELISA-Screenings und darauf folgender Western-Blot-Analyse identifiziert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in serumfreiem Medium. Die Fusionsproteine wurden über Protein-G-Sepharose aus dem Zellkulturüberstand gereinigt.

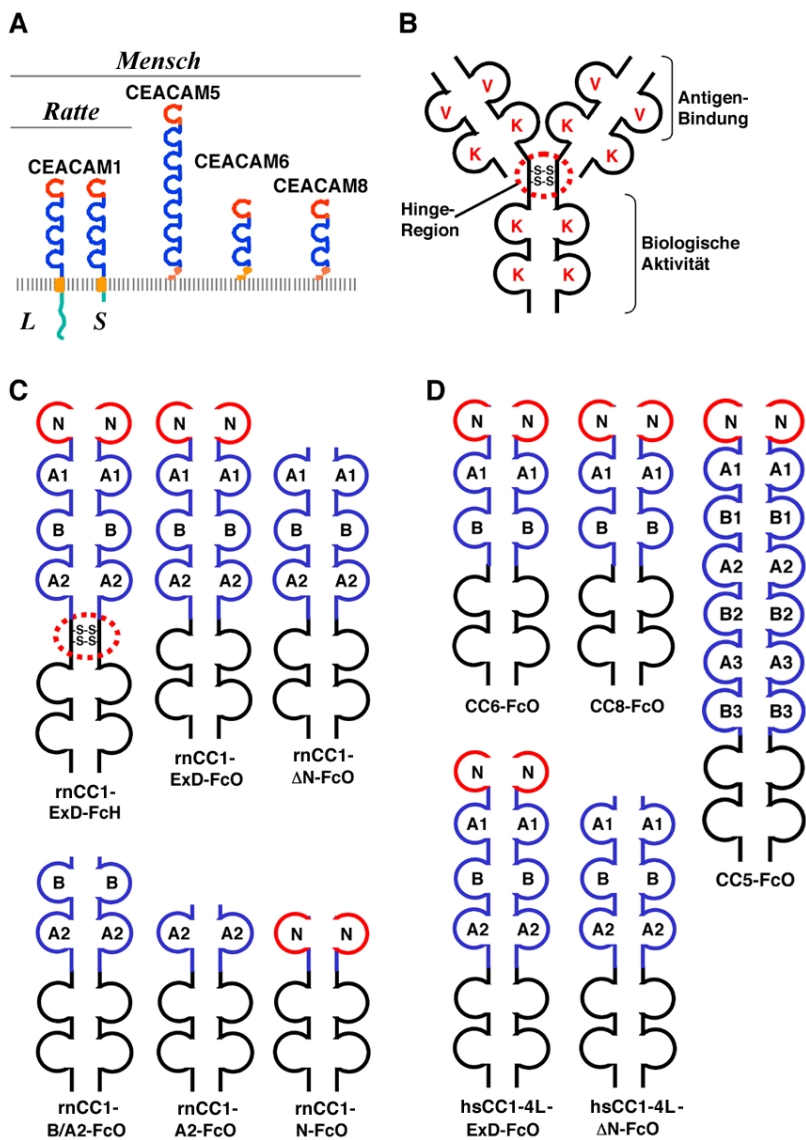


Abb. 49: Schematische Darstellung der CEACAM-Fc-Fusionsproteine und ihrer Ausgangsproteine.

(A) Für Fc-Fusionskonstrukte verwendete Mitglieder der CEA-Familie (B) IgG-Molekül aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. V: variable Region, K: Konstante Region. Der biologisch aktive Bereich der schweren Kette (Fc) eines humanen IgG γ 3 wurde als Variante mit (FcH) und ohne (FcO) die Hinge-Region verwendet. (C) Ratten-CEACAM1-Fc-Fusionsproteine. Alle gezeigten Deletionsmutanten sind auch als FcH-Fusionsprotein vorhanden. (D) Fc-Fusionsproteine mit den extrazellulären Domänen des humanen CEACAM1-4L, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8. Das humane CEACAM1-4L wurde auch als Δ N-Mutante hergestellt. N, A und B bezeichnen die entsprechenden Ig-ähnlichen Domänen der jeweiligen CEACAMs (vgl. Abb. 7).

Die gereinigten Fusionsproteine mit und ohne Hinge-Region im Fc-Anteil lagen wie erwartet als Dimere vor, wobei die Fusionsproteine mit Hinge-Region kovalent verknüpft waren, was durch native bzw. nicht-reduzierende und reduzierende Gelelektrophorese gezeigt wurde (ohne Abbildung).

rnCC1-ExD-Fc bindet Ratten-CEACAM1 auf der Zelloberfläche

CEACAM1 ist in der Lage über die extrazelluläre Domäne andere CEACAM1-Moleküle zu binden [Tingstrom et al., 1990; Wikstrom et al., 1996]. Eine spezifische Bindung des raCC1-ExD-Fc-Konstruktes an Ratten-CEACAM1 konnte im FACS-Assay gezeigt werden. Dazu wurden CEACAM1-L-transfizierte RBE-Zellen mit raCC1-ExD-Fc- und Kontroll-Fc-Fusionsproteinen inkubiert und die gebundenen Fusionsproteine durch einen FITC-gekoppelten anti-human-Fc-Antikörper detektiert. Das raCC1-ExD-Fc-Fusionsprotein, jedoch nicht die Kontrolle, hat die CEACAM1-positiven RBE-Zellen gebunden (Abb. 50).

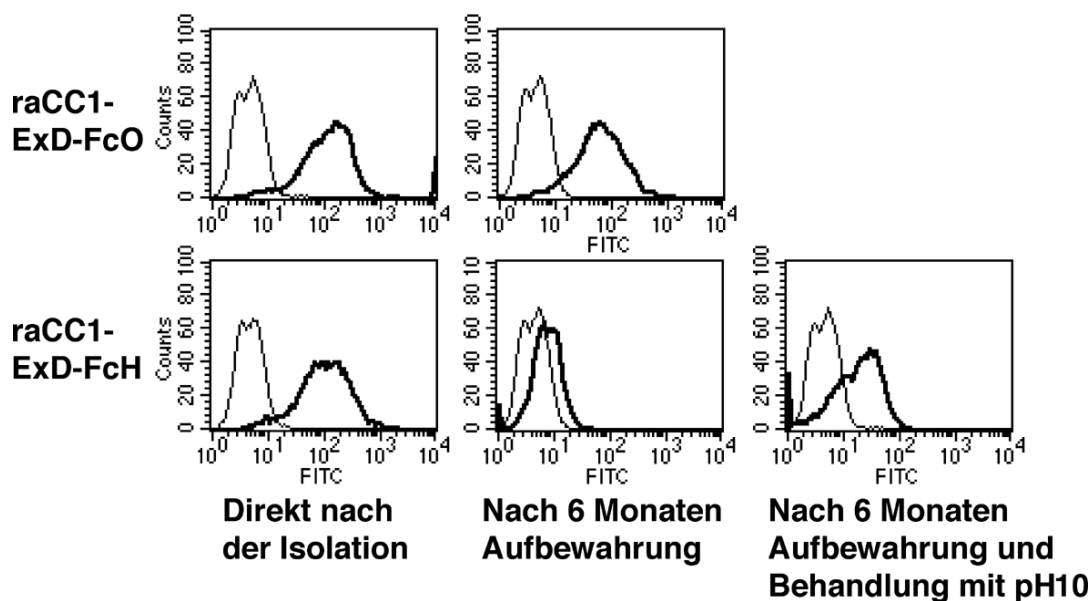


Abb. 50: Spezifische Bindung der Ratten-CEACAM1-Fc-Konstrukte an membranständiges Ratten-CEACAM1. FACS-Analyse: CEACAM1-transfizierte RBE-Zellen wurden mit 50 µg/ml raCC1-ExD-Fc-Fusionsprotein (dicke Linie) und mit einem Fc-Kontroll-Fusionsprotein (dünne Linie) inkubiert und anschließend gemessen. Teilweise wurde der pH-Wert der Fusionsproteine direkt vor der Inkubation mit den RBE-Zellen kurz auf pH 10 gebracht und sofort wieder neutralisiert. Die Positivkontrolle mit CEACAM1-spezifischem Be9.2 zeigte eine Färbung auf den benutzten Zellen (ohne Abbildung).

In anderen Versuchsreihen wurde sichergestellt, dass CEACAM1-negative RBE-wt-Zellen nicht durch das raCC1-ExD-Fc-Fusionsprotein erkannt werden (ohne Abbildung). Bei einer Antikörper-Bindung können die erhaltenen Werte um ein vielfaches höher sein als die Bindung der Fusionsproteine. Eine so starke Bindung ist für die Fusionsproteine allerdings auch nicht zu erwarten. Für humanes CEACAM haben Yamanaka und Mitarbeiter durch Bindungs-Assays mit löslichen Isoformen gezeigt, dass homophile Bindungen von CEACAM1-4L eher schwach sind [Yamanaka et al., 1996].

Der Fc-Anteil beeinflusst die Bindungskapazität von Fc-Fusionsproteinen

Die interessanteste Aussage der in Abb. 50 gezeigten FACS-Analysen ist die Tatsache, dass der Fc-Fusionsanteil einen erheblichen Einfluss auf die Bindungskapazität der gereinigten Proteine besitzt. Nach längerer Lagerung bei 4°C verloren die Fusionsproteine, deren Fc-Anteil die Hinge-Region besaß, die Fähigkeit, CEACAM1-L-transfizierte RBE-Zellen zu binden. Im Gegensatz dazu behielten Fusionsproteine ohne Hinge-Region ihre Bindungsfähigkeit. Die Bindung der Hinge-Region-haltigen Fusionsproteine konnte durch eine kurze Behandlung mit pH 10 wiederhergestellt werden. Eine Möglichkeit, dieses Verhalten zu erklären, liegt im Selbstbindungsverhalten der extrazellulären Domäne von CEACAM1. Es ist bekannt, dass CEACAM1 sowohl in *cis* als auch in *trans* interagieren kann [Hunter et al., 1996] und es wird spekuliert, dass die Dimerisierung auf der Zellmembran eine Bindung von CEACAM1-Molekülen auf benachbarten Zellen unterbindet und somit reguliert. Übertragen auf die hier vorliegenden Bindungsdaten, könnte die zusätzliche Hinge-Region, und damit eine erhöhte Flexibilität, den Fusionsproteinen ermöglichen, ihr Gegenstück im Dimer in *cis* zu binden. So würden die Fusionsproteine dann ihre Fähigkeit verlieren, membranständiges CEACAM1 in *trans* zu binden und erst die denaturierende Behandlung mit pH 10 würde die einzelnen Fusionsproteine voneinander lösen. Nach dem Neutralisieren des pH-Wertes könnten die grundsätzlich sehr stabilen Ig-ähnlichen Domänen wieder ihre native Faltung einnehmen und die Fusionsproteine wieder membranständiges CEACAM1 binden. Auf jeden Fall ist eine genauere Untersuchung dieser Fusionsproteine für CEACAM1 und über das CEACAM1-Feld hinaus interessant.

Die gereinigten Fusionsproteine wurden in verschiedenen Kooperationen sowohl für funktionelle Studien an verschiedenen hematopoietischen Zellen (Bernhard B. Singer, Berlin) wie auch für Strukturanalysen (Björn Öbrink, Stockholm, Schweden) erfolgreich eingesetzt. Teile dieser Arbeiten wurden bereits veröffentlicht [Singer et al., 2005], andere Arbeiten werden in den Laboren in Berlin und in Stockholm fortgeführt.

V. Suche nach CEACAM1-Zielgenen mittels cDNA-Arrays

Ein Projekt, welches den Beginn dieser Arbeit prägte, sollte der Auffindung von Zielgenen des CEACAM1-Signalweges dienen. Es sollten Proteine identifiziert werden, die nach einer Stimulierung von CEACAM1 in ihrer Expression reguliert werden.

Als Zellsystem wurden PC12-Zellen ausgewählt, da Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe die PC12-Zellen als endogen CEACAM1-exprimierende Zelllinie beschrieben haben. Sie konnten zeigen, dass das Kreuzvernetzen von CEACAM1 mit spezifischen monoklonalen Primärantikörpern (Be 9.2.) und sekundären anti-Maus-Antikörpern unter Pervanadat-Bedingungen zu einem vorübergehenden Verlust der Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1 und der transienten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 führte [Budt et al., 2002a].

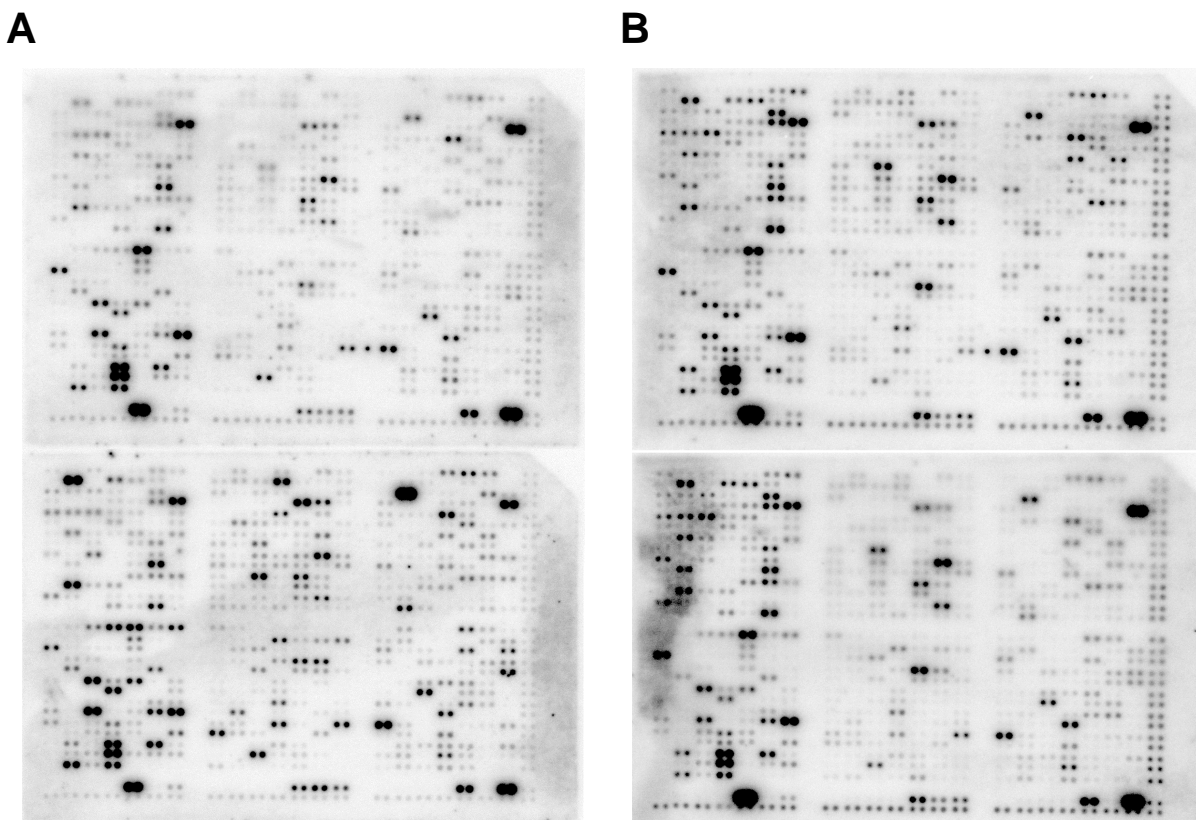


Abb. 51: Ratten-Macro-Array: Der 'Atlas Rat Expression Array' (BD Clontech) wurde mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Diese wurde aus Total-RNA von PC12-Zellen hergestellt, die entweder nicht behandelt wurden (Kontrolle, jeweils oben) oder mit anti-CEACAM1-(BE.9.2.-) Antikörpern und sekundären anti-Maus-Antikörpern behandelt wurden (jeweils unten). (A) und (B) stellen zwei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche dar. Die Auswertung erfolgte mit dem Phospho-Imager.

Eine Methode zur Darstellung einer differentiellen Genexpression ist der Array, auch "reverser Northern-Blot" genannt. Dazu wird eine Nylonmembran, auf die bekannte cDNAs gespottet sind, mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert, die aus Total-RNA von stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen hergestellt wird. Anhand der Intensität der Hybridisierungssignale erhält man einen Überblick darüber, wie stark bestimmte Gene in den untersuchten Zellen exprimiert werden. Später können die Ergebnisse dann im Northern-Blot und auf Proteinebene verifiziert werden. Hier sollten RNAs von PC12-Zellen verglichen werden, die entweder nicht behandelt wurden (Kontrolle) oder solche, die mit anti-CEACAM1-(Be 9.2.-)Antikörpern und sekundären anti-Maus-Antikörpern behandelt wurden, um ein Clustern und somit eine Aktivierung von CEACAM1 zu erreichen [Budt et al., 2002a].

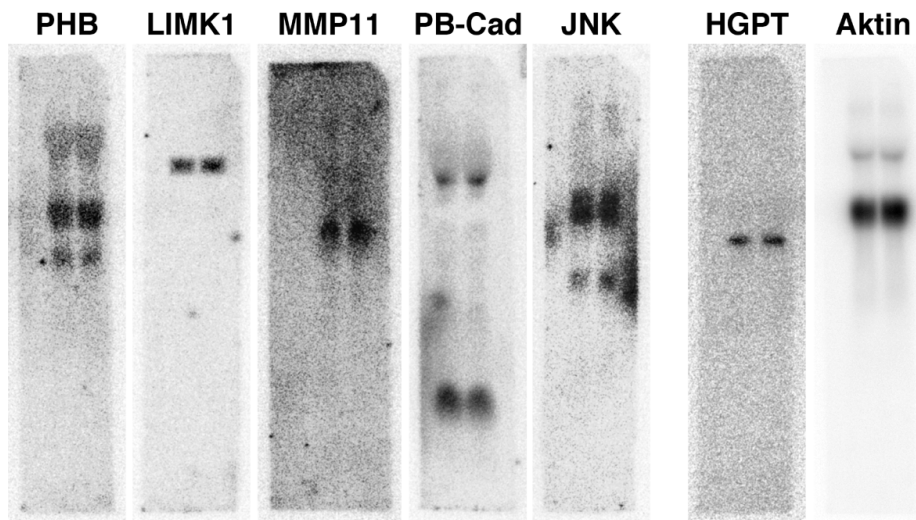


Abb. 52: Northern-Blot-Analyse der mRNA von Prohibitin (PHB), *LIM Domain-Kinase 1* (LIMK1), Stromelysin 3 (MMP11), PB-Cadherin (PB-Cad) und c-jun N-Terminale Kinase (JNK) sowie der Kontrollen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und β -Aktin in unbehandelten (jeweils linke Spur) und mit Be9.2/anti-Maus-IgG inkubierten PC12-Zellen (jeweils rechte Spur). Es wurden je 10 μ g Gesamt-RNA einer Präparation aufgetragen. Die Sonden wurden aus RT-PCR-Produkten mit den im Material-und-Methoden-Abschnitt dargestellten Primern und Gesamt-RNA aus unbehandelten PC12-Zellen hergestellt und radioaktiv-markiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Phospho-Imager.

Bei einem Vergleich der in Abb. 51 gezeigten 'Atlas Rat Expression Arrays' (BD Clontech) mit 588 gespotteten cDNAs fallen vereinzelt, sich etwas in ihrer Signalstärke unterscheidende, cDNAs auf. Mehrere Wiederholungen dieses Versuches unter gleichen Bedingungen ergaben aber jeweils verschiedene, also keine spezifischen, Veränderungen in dem Expressionsmuster der behandelten Zellen. Die Negativkontrolle ergab jedesmal ein

gleiches Expressionsmuster, was bedeutet, dass die einzelnen Arbeitsschritte korrekt durchgeführt wurden.

Dennoch wurden sicherheitshalber einige auffällige Kandidaten auf Northern-Blot-Ebene verglichen (Abb. 52). Es wurden die folgenden mRNAs untersucht: Prohibitin, LIM Domain-Kinase 1 (LIMK1), Stromelysin 3 (ST3, SL3, MMP11), PB-Cadherin (short type, CDH22) und c-jun N-Terminale Kinase (JNK, SAPK). Als Kontroll-mRNA wurden die "Haushalts-Proteine" Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und β -Aktin gewählt. Sowohl die Kontrollsonden wie auch alle anderen untersuchten Sonden zeigten eine gleiche Verteilung in unbehandelten PC12-Zellen (Kontrolle) und "kruzvernetzten" PC12-Zellen.

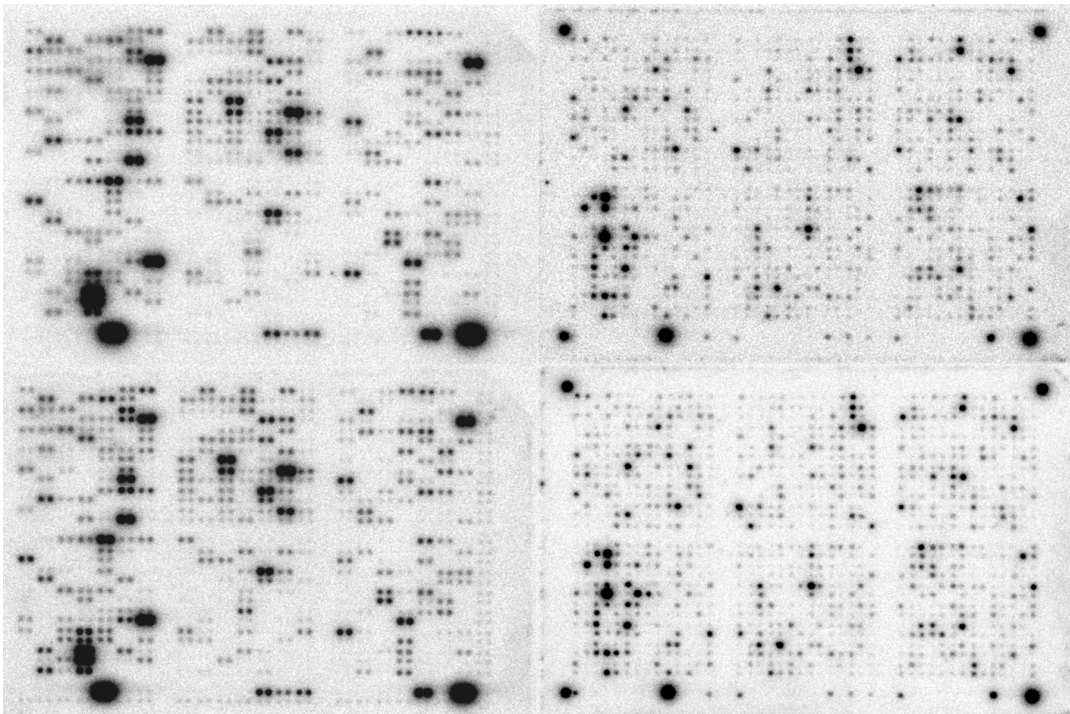


Abb. 53: Ratten-Macro-Array: Der 'Atlas Rat 1.2 II Array' (bestehend aus 2 Membranen, BD Clontech) wurde mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Diese wurde aus Total-RNA von PC12-Zellen hergestellt, die entweder nicht behandelt wurden (Kontrolle, oben) oder mit anti-CEACAM1-(BE.9.2.-) Antikörpern und sekundären anti-Maus-Antikörpern behandelt wurden (unten). Die Auswertung erfolgte mit dem Phospho-Imager.

Außer dem 'Atlas Rat Expression Array' wurde auch der 'Atlas Rat 1.2 II Array' (bestehend aus 2 Membranen, BD Clontech) mit 1176 gespotteten cDNAs verwendet (Abb. 53). Für die Auswertung dieser Arrays stand mir die BD AtlasImage 2.7 Software zur Verfügung. Die computerunterstützte Analyse bestätigte die Daten der vorangegangenen Arrays und wies keine potentiell in ihrer mRNA-Expression veränderte Kandidaten aus.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass das PC12-Zellsystem nicht geeignet ist, um Zielgene von CEACAM1 zu suchen. CEACAM1 scheint in diesen Zellen trotz der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges keinerlei Veränderungen auf mRNA-Ebene hervorzurufen. Dies ist insofern nicht überraschend, da CEACAM1, abgesehen von den biochemischen Daten aus PC12-Zellen [Budt et al., 2002a], bisher nie mit einer Funktion in neuroendokrinen Zellen in Verbindung gebracht wurde.

Auch wenn dieser Ansatz in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde, bleibt der Array eine Methode, die zur Aufklärung von Zielproteinen beitragen kann. Einflüsse von CEACAM1 auf Zellfunktionen wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung, welche mit großer Wahrscheinlichkeit Veränderungen im Expressionsmuster hervorrufen, wurden in Zellen epithelialen, endothelialen und hematopoietischen Ursprungs gezeigt. Kilic *et al.* konnten so z.B. in endothelialen Zellen die Regulation verschiedener angiogener Faktoren durch CEACAM1-Aktivierung auf mRNA-Ebene zeigen und diese teilweise auch auf Proteinebene nachvollziehen.

Die vorhandenen Arrays können in der Zukunft mit einem anderen Zellsystem noch erfolgversprechend eingesetzt werden. Hier würden sich vor allem bereits beschriebene Zellen, wie z.B. die NBT-II-Zellen, anbieten, für die gezeigt wurde, dass die Behandlung konfluenter Zellen mit anti-CEACAM1-Antikörper zur Aufhebung der Kontaktinhibition der Proliferation und zum Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus führt. Hier könnte auch ein zusätzlicher Einsatzbereich der eben vorgestellten CEACAM-Fc-Fusionsproteine liegen, die eine Alternative zum Einsatz von Antikörpern als Stimulus darstellen können. Die meisten Blutzellen eignen sich wahrscheinlich weniger für diese Versuche obwohl sie in Bezug auf die Expression und Funktion von CEACAMs sehr detailliert charakterisiert wurden. Differenzierte Blutzellen betreiben kaum eine Protein-Neusynthese und verändern ihre Proteinausstattung bei Aktivierung eher durch alternative Mechanismen, wie z.B. der Degranulation.