

## Diskussion

Die direkte Umgebung der Zelle, welche die extrazelluläre Matrix (EZM) und benachbarte Zellen einschließt, vermittelt Signale, die die Zellmorphologie, die Migration und das Überleben der Zelle beeinflussen. Diese Signale werden häufig von Komponenten der Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Adhäsionen, wie z.B. Integrinen, Ig-CAMs und Cadherinen, vermittelt [McGary et al., 2002]. Die zugrunde liegenden Mechanismen beinhalten häufig die Fähigkeit, die Bildung organisierter Strukturen oder Gerüste (*scaffolds*) zu initiieren, welche dann eine effiziente Signalweiterleitung ermöglichen [Juliano, 2002]. Außer der Vermittlung von Signalen durch die räumliche Ansammlung von Komponenten des jeweiligen Signalweges können Adhäsionskomplexe auch direkt in die Weiterleitung von Signalen zwischen zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten involviert sein. Eines der ersten Beispiele hierfür ist das  $\beta$ -Catenin, das einerseits Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten ist, und andererseits im Nukleus als Kofaktor für Transkriptionsfaktoren dient [Harris und Peifer, 2005].

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gerüstprotein Filamin A als neuer Interaktionspartner für den Zelladhäsionsrezeptor CEACAM1-L identifiziert und funktionelle Aspekte dieser Interaktion charakterisiert werden. Zudem konnte für CEACAM1-L erstmals die Fähigkeit der Inhibition der Migration beschrieben werden. Bisher wurden ausschließlich promigratorische Eigenschaften beobachtet [Ebrahimnejad et al., 2004; Müller et al., 2005]. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal die Interaktion von CEACAM1-L mit dem ubiquitär exprimierten Poldip2 gefunden. Poldip2 bewegt sich zwischen der Plasmamembran, dem Zytosol und dem Nukleus und könnte somit direkt an der Signalweiterleitung von CEACAM1 beteiligt sein.

### **CEACAM1 und Filamin A beeinflussen Integrin-abhängige Signale**

Die Adhäsion und die Migration von Zellen wird unter anderem durch die Modulation Integrin-basierter Zell-Matrix-Verbindungen reguliert. Integrin-abhängige Signalwege verschiedener Zelltypen werden sowohl durch Filamin A als auch durch CEACAM1 moduliert. Filamin A verbindet das Aktinzytoskelett mit Integrinen [Loo et al., 1998; Sharma et al., 1995] und interagiert mit verschiedenen Signalmolekülen, wie z.B. FILIP (*Filamin A Interacting Protein*), der ribosomalen S6-Kinase, der Proteinkinase C $\alpha$  und GTPasen der Rho- und Ras-Familie, welche Filamin A so in die Modulation der Zellform und Integrin-abhängiger Adhäsion und Motilität einbeziehen [Nagano et al., 2002; Ohta et al., 1999; Tigges et al., 2003; Woo et al., 2004]. Für Filamin A wurde gezeigt, dass es in Fibroblasten

und Melanomzellen für die Integrin-abhängige Mechanoprotektion und Aktinreorganisation verantwortlich ist [Glogauer et al., 1998]. Außerdem wurde in *in vitro*-Studien gefunden, dass eine zu starke Bindung von Filamin A an eine  $\beta$ -Integrin-Untereinheit zur Reduktion der Integrin-vermittelten Migration führt [Calderwood et al., 2001]. Für CEACAM1 wurde gezeigt, dass anti-CEACAM1-Antikörper die adhäsive Funktion von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen in neutrophilen Granulozyten und in B-Lymphozyten beeinflussen [Greicius et al., 2003; Nair und Zingde, 2001; Skubitz et al., 2000]. Außerdem hat unsere Arbeitsgruppe kürzlich beschrieben, dass CEACAM1-L an Talin bindet und Integrin-abhängige Signalwege in Endothelzellen beeinflusst [Müller et al., 2005]. In Melanomzellen wurde gezeigt, dass die Interaktion von CEACAM1 und  $\beta$ 3-Integrin die Migration und Invasion erhöht [Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2004]. Da das in dieser Arbeit verwendete Zellsystem kein  $\beta$ 3-Integrin besitzt, beschreiben die gewonnenen Daten einen neuen CEACAM1-vermittelten Mechanismus, der die Integrin-abhängige Migration beeinflusst und der durch Filamin A verändert werden kann.

Die Assoziation von CEACAM1-L und Filamin A wurde im Yeast-Two-Hybrid-Assay gefunden und durch *in vitro*- und *in vivo*-Bindungs-Assays bestätigt. Eine Möglichkeit, wie CEACAM1 Integrin-Signalwege beeinflussen könnte, wäre eine Veränderung der räumlichen und temporären Eigenschaften Filamin A-gebundener Integrin-Signalkomplexe oder deren Aktivierung durch die Regulation anderer Signalmoleküle (Kinasen/Phosphatasen). Dass insbesondere CEACAM1-L in den hier untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Integrin-abhängige Adhäsion und Migration ausübt, zeigt sich deutlich an der Wund-induzierten Erhöhung der Phosphorylierung der fokalen Adhäsionen im Allgemeinen und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin im Besonderen. Ob diese Phosphorylierung jedoch Melanomzell-spezifisch ist oder auch in andere Zellarten auftritt muss noch genauer untersucht werden. In Ratten-Endothelzellen wurde z.B. keine Verstärkung sondern die Reduktion der FAK-Phosphorylierung nach der Expression von CEACAM1-L beobachtet [Müller et al., 2005].

Die Koexpression von Filamin A hat keinen modulierenden Einfluss auf die kurzfristige Phosphorylierung bzw. Aktivierung der fokalen Adhäsionen durch die Expression von CEACAM1, verändert jedoch deren langfristigen Turnover. Im *in vitro*-Wundheilungs-Assay zeigten CEACAM1-L-exprimierende M2-CC1-Zellen 18 h nach dem Setzen der Wunde einen normalen Turnover der fokalen Adhäsionen, während die Filamin A- und CEACAM1-L-koexprimierenden A7-CC1-Zellen eine erhöhte Anzahl fokaler Adhäsionen enthielten. Da die Migration einen koordinierten Auf- und Abbau der fokalen Adhäsionen benötigt [Schlaepfer et al., 1999], ist es möglich, dass auch der veränderte Turnover zumindest für einen Teil der Reduktion der Motilität von A7-CC1-Zellen verantwortlich ist. Interessanterweise wurde in

Filamin A-positiven Ratten-Endothelzellen ein gegensätzlicher Einfluss der Expression von CEACAM1-L auf die Bildung von fokalen Adhäsionen gefunden [Müller et al., 2005]. Diese Zellen zeigten nach der Expression von CEACAM1-L eine Verringerung der Neubildung fokaler Adhäsionen, was zu einer erhöhten Migration führte. Ob diese verschiedenen Wirkungsweisen von CEACAM1-L auf der unterschiedlichen Antwort-Maschinerie von Epithel- und Endothelzellen beruhen oder Zelllinien-spezifisch sind muß noch untersucht werden.

Dass Filamin A auch ohne die Interaktion mit CEACAM1 einen Einfluss auf die Integrin-abhängige Adhäsion von Zellen hat, zeigte sich besonders deutlich in den morphologischen Auswertungen der Adhäsions-Assays auf verschiedenen Matrixproteinen. Hier konnte gezeigt werden, dass A7-Zellen immer schlechter als M2-Zellen spreiteten.

### **Filamin A beeinflusst die Membranstabilität von Zellen**

Filamin A verknüpft F-Aktin in dreidimensionale Netzwerke und wurde daher, wie auch andere F-Aktin-organisierende Proteine, als "gelierendes" Protein beschrieben [Nakamura et al., 2002; Nunnally et al., 1981; Sobue et al., 1982]. Filamin A stärkt so das periphere Aktin-Netzwerk und stabilisiert dadurch die Plasmamembran und ihre Ausstülpungen. Auch die Verknüpfung membranständiger Proteine mit dem Aktinzytoskelett dient unter anderem der Stabilisierung der Plasmamembran [Glogauer et al., 1998] und gilt als zweite Haupteigenschaft von Filamin A.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten, die das Spreiten von M2- und A7-Zellen betreffen, widersprechen früheren Veröffentlichungen über M2- und A7-Zellen [Cunningham, 1995], in denen A7-Zellen immer besser spreiteten als M2-Zellen. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass beide Filamin A-exprimierenden Zelllinien (A7 und A7-CC1) gegenüber den Filamin A-defizienten Zelllinien (M2 und M2-CC1) eine verstärkte Bildung von blasenartigen Membranausstülpungen (*membrane blebs*) aufwiesen. In der Literatur wurden diese Membranausstülpungen immer den M2-Zellen zugeordnet [Cunningham, 1995; Cunningham et al., 1997; Dai und Sheetz, 1999]. Die zugehörige Arbeitshypothese von Cunningham *et al.* besagt, dass Filamin A die Membranstabilität erhöht und somit das Spreiten verbessert bzw. die Bildung der blasenartigen Ausstülpungen verhindert.

Eine befriedigende Begründung für die Widersprüche zwischen der Literatur und den in dieser Arbeit gefundenen Phänotypen wurde nicht gefunden. Die korrekte Zuordnung der Filamin A- und CEACAM1-L-Expression der in dieser Arbeit benutzten Zellen wurde mehrfach geprüft und bestätigt. Da die veröffentlichten Daten zum Migrationsverhalten von

M2- und A7-Zellen in Transwell-Assays [Cunningham et al., 1992] mit unseren Daten sehr gut übereinstimmen, kann dies nur bedeuten, dass die Zellen entweder im Laufe der Zeit ihren Phänotyp in Bezug auf die Ausbildung von blasenartigen Membranausstülpungen zum jeweilig entgegengesetzten Erscheinungsbild verändert haben oder, dass die differenziellen Interferenz-Kontrast (DIC)-Bilder in den damaligen Veröffentlichungen [Cunningham, 1995; Cunningham et al., 1997; Dai und Sheetz, 1999] vertauscht waren. Die Auslegung der Ergebnisse dieser Veröffentlichungen oder zumindest der betroffenen Bilder müsste dann neu erfolgen.

Zu den stabilisierenden Eigenschaften des Filamin A passen die in dieser Arbeit gezeigten Bilder auf den ersten Blick weniger, da erst das Vorhandensein des Filamin A die Membranausstülpungen und das verringerte Spreiten auslöst. Es ist aber möglich, dass Filamin A zwar das F-Aktin-Netzwerk stabilisiert und dieses eventuell sogar mit der Plasmamembran verbindet, aber dass es, entgegen der bisherigen Theorie, nicht die Verbindung der Zelle mit der Matrix unterstützt, sondern - im Gegenteil - nicht adhärente Strukturen wie die blasenartigen Ausstülpungen verstärkt. Diese Hypothese würde auch die Erkenntnis erklären, dass die verstärkte Bindung von Filamin A an  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten die Migration von Zellen verringert [Calderwood et al., 2001]. Ebenso würde die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion der Migration von Filamin A-CEACAM1-L-Doppeltransfektanten gegenüber den parental A7-Zellen gut mit dieser Hypothese übereinstimmen.

### **CEACAM1-L und Filamin A verändern die Regulation von kleinen GTPasen**

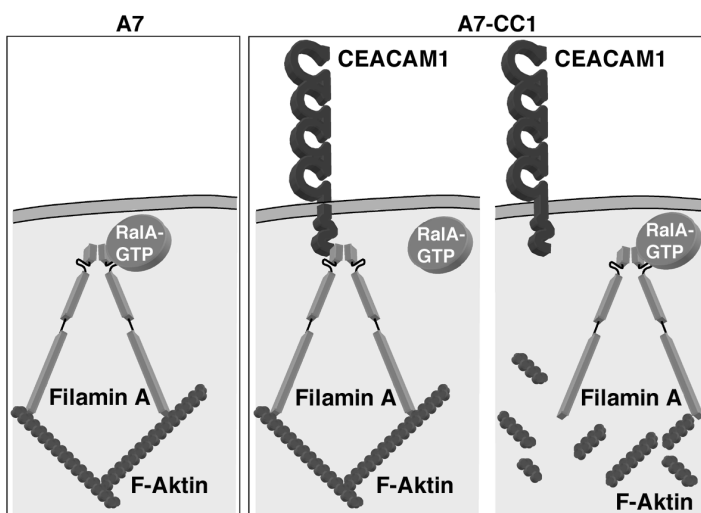
Kleine GTPasen haben die Fähigkeit, Aktin-basierte Strukturen einer Zelle zu beeinflussen und umzubauen [Van Aelst und Symons, 2002]. So trägt Rho zu einer Reifung und Stabilisierung von fokalen Adhäsionen bei, was z.B. zu dem eben beschriebenen Phänotyp der verstärkten Erhaltung dieser Zell-Matrix-Kontakte in A7-CC1-Zellen führen könnte. Rho gilt außerdem als verantwortlich für die Induktion von Stressfasern, während Rac kortikales F-Aktin und die Bildung von fokalen Komplexen induziert [Hall, 1998]. Zusammen mit Cdc42 ist Rac dann auch für die Bildung von Membranausstülpungen (Lamellipodien) verantwortlich, während Rho die Kontraktion der Zelle reguliert [Ridley et al., 2003].

Filamin A-exprimierende A7-Zellen und Filamin A-CEACAM1-L-koexprimierende A7-CC1-Zellen zeigten deutliche Unterschiede im Aufbau des Aktinzytoskeletts und der Lamellipodienbildung während der Wund-induzierten Migration. Während A7-Zellen wenig kortikales F-Aktin und die temporäre Induktion von Stressfasern aufwiesen, zeigten A7-CC1-Zellen keine Stressfasern und einen erhöhten Aufbau von kortikalem F-Aktin. Die A7-Zellen

begannen zu migrieren, während die A7-CC1-Zellen die Bildung von Lamellipodien einstellten und unbeweglich blieben. In beiden Zelllinien schienen also verschiedene kleine GTPasen zeitlich unterschiedlich reguliert zu sein. Filamin A wird als Koordinator der Integration extrazellulärer Signale, die zur Aktivierung von Rho-GTPasen führen, diskutiert [Bellanger et al., 2000]. Außerdem liegen die Bindungsstellen der GTPasen Rac1, Cdc42, RhoA und RalA alle im Filaminrepeat 24 [Ohta et al., 1999]. Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 interagiert direkt mit eben diesem Repeat und so stellt sich die Frage, ob die CEACAM1-L-Filamin A-Interaktion einen Einfluss auf GTPase-vermittelte Signale haben könnte.

RalA wurde als Ziel einer genaueren Untersuchung ausgewählt, da Filamin A von allen oben genannten GTPasen nur durch RalA GTP-abhängig gebunden wird [Ohta et al., 1999]. RalA wird durch verschiedene Studien mit der Regulation der Migration und der Zellmorphologie in unterschiedlichen Zellen wie skelettalen Myoblasten [Suzuki et al., 2000], transformierten Tumorzellen [Camonis und White, 2005; Feig, 2003], aber auch epithelialen Zellen in Drosophila-Ovarien [Lee et al., 1996] in Zusammenhang gebracht. In Swiss 3T3-Fibroblasten und im M2/A7-Melanomzellensystem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von RalA mit Filamin A eine Voraussetzung für die Cdc42-induzierte Filopodienbildung ist [Ohta et al., 1999].

Die Expression von CEACAM1 hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Expression oder die Aktivierung von RalA. Allerdings verhinderte die Koexpression von CEACAM1-L signifikant die Bindung von RalA an Filamin A (Abb. 54). Da sowohl CEACAM1-L als auch RalA nur etwa 1 bis 3 % des gesamten Filamin A-Pools binden, scheinen beide Moleküle um dieselbe Subpopulation von Filamin A-Molekülen zu konkurrieren, was die Spezifität der Inhibition unterstreicht.



**Abb. 54: Modell der Interaktionen zwischen CEACAM1, Filamin A und RalA.** In A7-Zellen interagieren RalA und Filamin A unter allen untersuchten Bedingungen (links). In A7-CC1-Zellen scheint CEACAM1-L die Interaktion von Filamin A und RalA zu unterbinden (Mitte). Während der Inkubation der A7-CC1-Zellen in Suspension, welche eine Bindung von CEACAM1 an Filamin A verhindert, kann RalA an Filamin A binden (rechts).

Zusammengenommen ergeben diese Daten ein Modell, das Filamin A und RalA als Effektoren in der CEACAM1-vermittelten Signalweiterleitung der (negativen) Regulation der Migration beinhaltet. Die Bindung von CEACAM1-L an Filamin A scheint dessen Interaktion mit RalA durch eine Kompetition um die Bindungsstelle im Filaminrepeat 24 zu verhindern (Abb. 54). Filamin A konnte aktiviertes RalA in A7-Zellen unter allen untersuchten Bedingungen binden, während dies in A7-CC1-Zellen nur möglich war, wenn die Zellen in Suspension inkubiert wurden. Diese Behandlung verhinderte die Interaktion von Filamin A und CEACAM1. Ob CEACAM1 auch unter physiologischen Konzentrationen in der Bindung an Filamin A über RalA dominiert, muss in endogen exprimierenden Zellen überprüft werden. Diese Bindungen und Kompetitionen könnten in SPR („BIAcore“-) Bindungsstudien mit verkürzten oder mutierten Proteinen bzw. Peptiden noch genauer untersucht und spezifiziert werden.

### **CEACAM1-L bindet Filamin A Phosphorylierungs-unabhängig**

Auch die genauen Bindungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-L und im C-Terminus von Filamin A können durch Bindungsstudien weiter eingegrenzt werden. Es konnte in dieser Arbeit allerdings bereits eindeutig gezeigt werden, dass die Bindung von CEACAM1-L und Filamin A unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung ist. Unsere *in vitro*-Bindungsstudien wurden mit aus Bakterien gereinigten Proteinen durchgeführt, welche daher wahrscheinlich weder Tyrosin-, noch Serin- oder Threonin-phosphoryliert vorlagen. Außerdem wurde Filamin A durch eine nicht mehr Tyrosin-phosphorylierbare CEACAM1-L-Mutante (Y488,513F) koimmunpräzipitiert. Auch für andere Proteine wurde eine solche Phosphorylierungs-unabhängige Bindung an CEACAM1 beschrieben, so z.B. für Calmodulin, Tropomyosin und G-Aktin [Edlund et al., 1996; Schumann et al., 2001].

Das CEACAM1 und Filamin A auch in endogen exprimierenden Systemen interagieren, wurde durch Koimmunpräzipitationen aus Zellen und Geweben humanen und Ratten-Ursprungs gezeigt. Da für die *in vitro*-Wundheilungs-Assays verschiedene CEACAM1-L exprimierende Klone benutzt wurden, kann die Aussage getroffen werden, dass eine unterschiedlich starke Expression die Migrationseigenschaften der M2- und A7-Zellen in der gleichen Weise verändert haben (ohne Abbildung). Dennoch war in jedem der untersuchten Klone CEACAM1-L überexprimiert, so dass eine genaue Aussage über die CEACAM1-L-Konzentrationsabhängigkeit der Beeinflussung der Migration, vor allem in Zusammenhang mit der Expression von Filamin A, erst getroffen werden kann, wenn eine Untersuchung an einem oder mehreren endogenen Systemen erfolgt ist. Dass die Koexpression von CEACAM1-L und Filamin A die Migration nicht verringern muss, zeigt sich z.B. in

Endothelzellen aus der Ratte (RBE-Zellen). In diesen endogen Filamin A-positiven Zellen erhöhte die Reexpression von CEACAM1-L deren Migration [Müller et al., 2005].

Dennoch scheint die Interaktion von CEACAM1-L und Filamin A im hier benutzten Transfektantensystem spezifisch gewesen zu sein, da sie dynamisch, also regulierbar, war. Die Bindung der beiden Moleküle konnte in der Zellkultur durch Induktion der Migration (das Setzen von Wunden) oder der Adhäsion verstärkt werden. Beide Prozesse beinhalten einen verstärkten Um- und Aufbau des Aktinzytoskeletts sowie von Adhäsionsstrukturen [Wehrle-Haller und Imhof, 2003]. Die Verringerung der Bindung durch Kultivierung der Zellen in Suspension passt sich gut in dieses Bild ein, da das Aktinzytoskelett durch diese Behandlung einen Abbau erfährt. Wie genau der Auf- oder Abbau des hochorganisierten F-Aktins mit der Bindungsstärke bzw. dem Vorhandensein der Verbindung von CEACAM1-L und Filamin A verknüpft ist, muss noch geklärt werden. So ist z.B. noch ungewiss, ob die Bindung durch die Migrations- und Adhäsionsgeschehnisse ausgelöst wurde oder ob die Bindung eher initial geschieht und auf der Seite der auslösenden Faktoren zu finden ist.

### **CEACAM1 beeinflusst die Tumorprogression und Zellstreuung**

CEACAM1 wurde in verschiedenen Studien entweder als Tumorsuppressor oder als fördernder Faktor in der Tumorprogression beschrieben. In den meisten Kolonkarzinomen scheint CEACAM1 herunterreguliert zu sein [Neumaier et al., 1993; Nittka et al., 2004; Nollau et al., 1997a; Nollau et al., 1997b; Rosenberg et al., 1993]. Das CEACAM1 tatsächlich eine Tumor-supprimierende Wirkung besitzt, wurde an einem Maus-Modell für Kolon-Karzinome gezeigt, in dem die Expression von CEACAM1 die Tumorbildung reduzierte [Izzi et al., 1999]. Andererseits wurde gezeigt, dass CEACAM1 in Melanomen und deren Metastasen häufig hochreguliert ist und dass diese *de novo*-Expression mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht [Thies et al., 2002]. Die Expression von CEACAM1 ermöglicht sogar eine genauere Vorhersage in Bezug auf die Metastasierung als die Tumordicke. CEACAM1 wird insbesondere an der invasiven Front von Melanomen exprimiert, weshalb ein CEACAM1-abhängiger Mechanismus für die Unterstützung der Invasion und damit der Metastasierung diskutiert wird [Brümmer et al., 2001]. Auch in Patienten mit Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen (non-small cell lung cancer, NSCLC) zeigte ein Großteil der Tumoren eine *de novo*-Expression von CEACAM1, während normale bronchiale Epithelzellen CEACAM1-negativ waren [Sienel et al., 2003]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die CEACAM1-Expression mit einer schlechteren Überlebensrate bei einer NSCLC-Erkrankung korreliert.

Im Gegensatz zu den  $\beta 3$ -Integrin-positiven Melanomzellen [Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2004] führte die Expression von CEACAM1-L in A7-Zellen nicht zu einer Erhöhung der Invasivität, sondern reduzierte den Filamin A-verursachten Anstieg der Invasivität. Die alleinige Expression von CEACAM1-L in M2-Zellen führte zu keiner Veränderung der Invasion. Tumorzellen müssen aber nicht nur die Fähigkeit besitzen, die extrazelluläre Matrix zu degradieren, um auswandern und Metastasen bilden zu können. Sie müssen sich auch von benachbarten Zellen und der Basalmembran lösen können und einen migrationsfähigen Phänotyp erlangen [Haass et al., 2005]. Unsere Daten zeigen, dass das unterschiedliche Streuverhalten der M2-CC1- und der A7-CC1-Zellen nicht auf eine Veränderung der E-Cadherin- oder N-Cadherin-Expressionslevel, sondern auf die Expression von CEACAM1-L und Filamin A bzw. deren Interaktion zurückzuführen ist. Alle Zelllinien zeigten die für fortgeschrittene Melanome typische *de novo*-Expression von N-Cadherin und eine verhinderte Oberflächenexpression von E-Cadherin.

Obwohl CEACAM1-L in *in vitro*-Wundheilungs-Assays nach dem Setzen der Wunde in Filamin A-positiven und -negativen Zellen gleichermaßen an die Zell-Zell-Kontakte rekrutiert wurde, zeigten sich hier Unterschiede in der Erhaltung von Zell-Zell-Adhäsionen. Wurden Filamin A und CEACAM1-L koexprimiert, so führte dies zu einer verstärkten Zell-Zell-Adhäsion, die durch die verringerte Migration bzw. die verhinderte Streuung der A7-CC1-Zellen zum Ausdruck kam. Im Gegensatz dazu lösten sich CEACAM1-L-exprimierende, Filamin A-negative M2-CC1-Zellen häufig von benachbarten Zellen ab und wanderten als Einzelzellen umher. Dieses Verhalten der M2-CC1-Zellen erinnert an ähnliche Phänotyptransitionen, die z.B. während der epithelialen-mesenchymalem Transformation (EMT) auftreten [Savagner, 2001], und könnte die für CEACAM1 postulierte Rolle in der Melanomprogression und der Metastasierung reflektieren. [Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2004; Thies et al., 2002]

Die Streuung der M2-CC1-Zellen steht nicht im Konflikt mit der Fähigkeit, homophile Bindungen einzugehen [Ocklind und Öbrink, 1982]. Im Gegenteil haben Hunter et al. die verstärkte Expression von CEACAM1 mit der EMT in Zusammenhang gebracht [Hunter et al., 1994]. Sie haben gezeigt, dass die Expression von CEACAM1-L in NBT-II-Zellen, bei welchen die EMT induziert wurde, stark hochreguliert wird. Parallel zu dieser erhöhten Expression von CEACAM1 streuten die Zellen und reduzierten ihre Zell-Zell-Kontakte. Ob CEACAM1 aber ein kritischer Faktor in der Zellstreuung und damit verknüpfter Phänotypveränderungen der NBT-II-Zellen (wie z.B. der Internalisierung von Desmosomen) ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Ein weiteres Beispiel für CEACAM1-induzierte, "EMT-ähnliche" Veränderungen sind MDCK-Zellen, die, wenn sie CEACAM1-L exprimieren, weniger Desmosomen besitzen und weniger gut organisierte Keratinfilamente



ausbilden [Sundberg et al., 2004]. Ein Einfluss von CEACAM1 auf die Migration wurde in diesen Zellen allerdings nicht untersucht.

In unseren *in vitro*-Studien war die Reduktion der Migration durch die Koexpression von CEACAM1-L und Filamin A deutlich stärker, wenn die Zellen im Kontakt mit dem Zellverband und der Matrix verblieben (Wundheilungs-Assays) und schwächer, wenn die Experimente mit Einzelzellen durchgeführt wurden (Transwell-Assays). Dies zeigt besonders deutlich, dass die Eigenschaften des CEACAM1-L auch vom Zustand der Zelle und der Beschaffenheit des umgebenden Gewebes abhängt. Es könnte also in der radialen und vertikalen Phase der Tumorentstehung eine andere Rolle spielen als während der Metastasierung. Außerdem könnte das Verhältnis der CEACAM1-Isoformen zueinander [Singer et al., 2000] oder zu Filamin A eine wichtige Rolle spielen. Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht, obwohl aus den Bindungs-Assays hervorgeht, dass auch die kurze Isoform von CEACAM1 zumindest indirekt mit Filamin A interagieren kann.

Auch die Auswirkung der CEACAM1-Expression auf das Wachstum der Melanomzellen in der dreidimensionalen Zellkultur muss noch genauer untersucht werden. Die vorläufigen Daten stimmen mit denen zur Zellstreuung überein und deuten darauf hin, dass die nicht motilen CEACAM1-L-Filamin A-Doppeltransfektanten größere und kompaktere Kolonien bilden, während die CEACAM1-L-exprimierenden, sehr motilen Zellen kleinere und eher "ausgefrante" Kolonien bilden. Daten aus solchen *in vitro*-3D-Modellen können interessante Hinweise liefern, jedoch sollte bedacht werden, dass diese Ergebnisse keinen direkten Schluss auf das Verhalten von Zellen im Tiermodell zulassen. Die Fähigkeit, im 3D-Modell zu überleben und zu wachsen, muss nicht unbedingt mit der Fähigkeit korrelieren, im Tiermodell einen Tumor und eventuell auch Metastasen zu bilden.

Der Einfluss von CEACAM1-L auf den RalA-Signalweg via Filamin A erweitert die Möglichkeiten, wie CEACAM1-L in die Onkogenese eingebunden sein könnte. Eine schnell wachsende Zahl an Studien deutet darauf hin, dass ein Grossteil der Ras-induzierten Veränderungen, die eine Zelle in eine Tumorzelle transformieren, über RalA als Effektor vermittelt werden [Gonzalez-Garcia et al., 2005; Tchekina et al., 2005]. Eine tiefgreifendere Untersuchung der Verknüpfung von CEACAM1-L mit Filamin A und damit auch mit der RalA-Signalweiterleitung könnte eine Erklärung für die widersprüchlich erscheinenden Fähigkeiten von CEACAM1 liefern, welches einerseits kanzerogene Eigenschaften z.B. von vielen Kolonkarzinomzellen unterdrücken kann [Neumaier et al., 1993; Nollau et al., 1997a; Nollau et al., 1997b; Rosenberg et al., 1993], das andererseits aber die malignen Eigenschaften z.B. von Melanomzellen verstärkt [Brümmer et al., 2001; Ebrahimnejad et al., 2004; Thies et al., 2002].

### **Poldip2 und seine intrazelluläre Lokalisation**

Auch der zweite in dieser Arbeit identifizierte Interaktionspartner, das Poldip2, ist ein interessantes Protein in Bezug auf die Signalwirkung von CEACAM1. Zu Beginn dieser Arbeit, als der Poldip2-Klon durch den Yeast-Two-Hybrid-Screen als CEACAM1-Interaktionspartner gefunden wurde, gab es lediglich zwei cDNA (Image)-Klone, welche die vollständige cDNA des humanen bzw. des murinen Poldip2 kodierten sowie eine auf diesen cDNAs basierende, computergestützte Vorhersage des Proteins. 2003 wurde Poldip2 erstmals als funktionelles Protein veröffentlicht [Liu et al., 2003]. Poldip2 ist hochkonserviert, und die Poldip2-Homologe aus *Drosophila* und *C. elegans* weisen immer noch 57% bzw. 35% Übereinstimmung mit dem humanen Poldip2 (PDIP38) auf. Insbesondere die 315 C-terminalen Aminosäuren zeigen eine extrem hohe Übereinstimmung. Zwischen Maus, Mensch und Hund sind dort maximal 3 Aminosäuren ausgetauscht, zum Huhn sind es 14 Aminosäuren Unterschied. Die C-terminale Sequenz von Poldip2 weist Homologien zum F-Box-Protein FBA und zum bakteriellen APAG-Proteinen auf. Eine Funktion des APAG-Proteins ist noch nicht beschrieben worden. F-Box-Proteine sind Bestandteil des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus und binden über ihre F-Box-Domäne die E3-Ligasen [Ilyin et al., 2000], wodurch sie die Substratspezifität beeinflussen können und so bestimmen, welches Protein degradiert wird. Welche Bedeutung der zu Poldip2 homologe Bereich des F-Box-Proteins FBA haben könnte ist jedoch noch nicht geklärt.

Der N-Terminus der Homologe von Poldip2 ist weniger gut konserviert, auch wenn bestimmte Spezies dort eine relativ hohe Konservierung aufweisen, wie z.B. Maus, Mensch und Hund mit 14 von 53 nicht übereinstimmenden Aminosäuren. Dieser geringere Konservierungsgrad des N-Terminus kann entweder darauf hindeuten, dass dieser Teil des Proteins keine besondere Relevanz in der Funktion besitzt oder aber im Gegenteil, die Spezifität von potentiellen Interaktionen und damit die Funktion beeinflusst.

In der zweiten Veröffentlichung über das humane Homolog von Poldip2 (PDIP38) werden widersprüchliche Daten über die Lokalisation von Poldip2 präsentiert [Xie et al., 2005]. Es werden eine potentielle mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS) innerhalb der ersten 35 Aminosäuren und zwei potentielle Schnittstellen für die MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) und die MIP (*Mitochondrial Intermediate Peptidase*) zwischen den Aminosäuren 50 und 51 bzw. 58 und 59 beschrieben. Das in dieser Veröffentlichung verwendete Programm zur Vorhersage einer MTS ([www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)) findet auch im Poldip2-Protein aus der Maus, dem Hund und dem Huhn, nicht aber aus der Ratte und dem Zebrafisch, eine potentielle MTS und eine potentielle Peptidase-Schnittstelle.

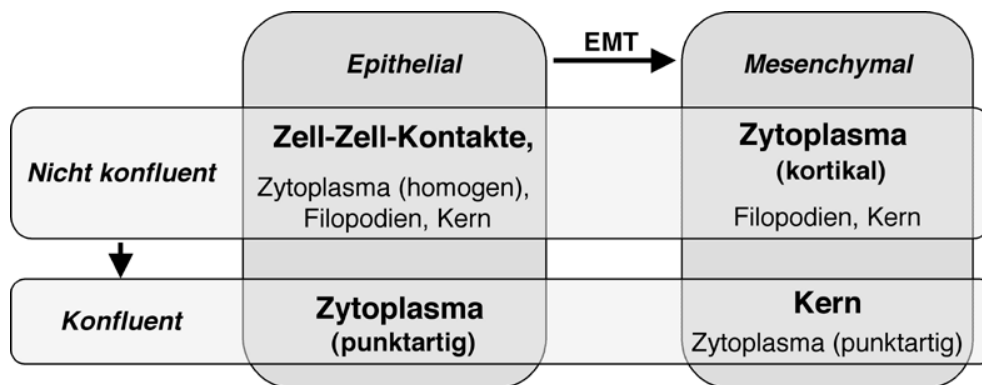
Xie und Mitarbeiter konnten tatsächlich eine mitochondriale Lokalisation von Poldip2 durch die Doppelfärbung von humanen HeLa-, MCF7- und 293T-Zellen mit einem mitochondrialen Marker und mit einem gegen die 20 C-terminalen Aminosäuren von Poldip2 hergestellten polyklonalen Antiserum zeigen. Das Antiserum erkannte keinerlei Poldip2 im Kern, sondern zeigte ausschließlich eine punktierte zytoplasmatische Färbung. Xie und Mitarbeiter wiesen im Western-Blot allerdings dennoch Poldip2 in der Kernfraktion von Kern-Zytosol-Trennungen nach, und zeigten außerdem eine inhibierende Wirkung des Poldip2 auf die Aktivität der Polymerase $\delta$ , die sich ausschließlich im Kern befindet. Diese Diskrepanzen von Kern-Zytosol-Trennungen und Immunfluoreszenzen könnten dadurch erklärt werden, dass das Antiserum die denaturierte Form des Poldip2 besser erkennt und somit im Blot sensitiver ist als in der Immunfluoreszenz. Die Spezifität des Antiserums für nicht denaturierte Proteine, wie z.B. durch eine Immunpräzipitation mit anschließender Coomassie-Färbung des Geles, wurde in der Veröffentlichung nicht nachgewiesen. Das Antiserum wurde offenbar ohne weitere Reinigung der IgG-Fraktion verwendet.

Die mitochondriale Lokalisation von Poldip2 wurde von Xie *et al.* allerdings auch durch die Transfektion von HeLa-Zellen mit verschiedenen GFP-fusionierten Deletionsmutanten des humanen Poldip2 und der Kofärbung mit einem mitochondrialen Marker sowie durch die Isolation der Mitochondrien-Fraktion aus HeLa-Zellen gezeigt. Die ersten 35 Aminosäuren waren in HeLa-Zellen ausreichend, um eine mitochondriale Lokalisation des C-terminal fusionierten GFP-Anteils zu erzielen, und die N-terminale Fusion des GFP führte zu einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung. Als allgemeiner Kritikpunkt muss hier genannt werden, dass keine konfokalen Bilder gezeigt werden, und alle Aufnahmen Antiserumgefärbter Zellen und GFP-Fusionsprotein-transfizierter Zellen normale Epifluoreszenzen darstellen, welche zur Detektion von „Kokolokalisationen“ übereinander gelegt wurden. Ob Poldip2 in den von uns verwendeten Zellsystemen auch in den Mitochondrien zu finden ist, muss noch durch Doppelfärbungen mit einem mitochondrialen Marker und komplexere Fraktionierungsversuche geklärt werden. Da diese Versuche vor der Veröffentlichung von Xie *et al.* durchgeführt wurden, sind keine mitochondrialen Marker einbezogen worden. Die teilweise gefundene punktierte Färbung durch die IgG-Fraktion des in dieser Arbeit hergestellten Antiserums zeigte nicht das typisch mitochondriale Muster fädiger Strukturen, jedoch sind Mitochondrien bekannt für ihre vielfältige Gestalt, so dass eine mitochondriale Lokalisation zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann.

Auf jeden Fall haben Xie und Mitarbeiter eine schlüssige Beweiskette vorgelegt, die das etwas zu schnelle Laufverhalten des Poldip2 in der SDS-PAGE erklärt. Statt auf der Höhe der berechneten 42 kDa läuft Poldip2 bei 38 kDa, was zur Namensgebung für das humane Poldip2 als PDIP38 (*Polymerase Delta Interacting Protein 38*) führte. Es werden offenbar

etwa 50 Aminosäuren vom N-Terminus abgespalten, um ein reifes Protein zu ergeben. Dies konnte anhand verschiedener N- bzw. C-terminal-fusionierter FLAG- und GFP-Tags gezeigt werden, wobei jeglicher N-terminal-fusionierter Tag zur Verhinderung der Abspaltung des N-Terminus führte. Als Positivkontrolle wurde eine *in vitro*-Translation durchgeführt, bei der N- und C-terminal-getagte Fusionsproteine im Gel auf gleicher Höhe liefen. Diese Prozessierung des N-Terminus muss in der Zelle sehr effizient ablaufen, da endogenes Poldip2 immer als einzelne, homogene Bande detektiert wird und nie eine zweite, größere Bande erscheint.

Hier stellt sich nun folgende Frage: Wenn die Prozessierung mit dem Import in das Mitochondrium verknüpft ist und der gesamte Poldip2-Pool als prozessiertes Protein vorliegt, wie kann dann Poldip2 in den Kern und in das Zytoplasma gelangen? Xie et al. haben leider keinen Versuch mit Inhibitoren für mitochondriale Peptidasen (z.B. N-Ethylmaleimid) durchgeführt, der Aufschluss darüber geben könnte, ob die Prozessierung von Poldip2 tatsächlich mit dem Import in das Mitochondrium verknüpft ist oder eventuell durch andere Peptidasen erfolgen könnte und somit nicht im Widerspruch zu einer zytoplasmatischen oder nukleären Lokalisation steht.



**Abb. 55:**  
**Poldip2-**  
**Lokalisation**  
**in NBT-II-**  
**Zellen.**

Das eine solche zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation tatsächlich vorhanden ist, zeigen nicht nur die bereits oben diskutierten Daten von Xie *et al.* sondern auch die in dieser Arbeit durchgeführten Kern-Zytosol-Trennungen und Immunfluoreszenzen. Das die zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation weder ein Artefakt der Färbung noch die Verunreinigung der Fraktionierung ist, zeigt die Regulierbarkeit dieser unterschiedlichen Lokalisationen. So scheint eine Translokation zu den Zell-Zell-Kontakten in NBT-II-Zellen von deren Konfluenz abhängig zu sein (Abb. 55). Auch eine Behandlung mit EGF hat die Lokalisation von Poldip2 beeinflusst. Außerdem zeigten in Suspension gehaltene NBT-II-Zellen eine deutliche Verringerung des zytoplasmatischen Poldip2-Pools. Ob diese Verringerung allerdings durch Abbau oder durch andere Mechanismen erfolgt, muss noch geklärt werden.

**Kann Poldip2 als Signalprotein funktionieren?**

Wie am Beginn der Diskussion angedeutet, wurden viele in und an Zellkontakten lokalisierte Proteine als direkte, in den Nukleus pendelnde Signalproteine und Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie beschrieben. Der sicherlich bekannteste Vertreter ist das  $\beta$ -Catenin, welches als E-Cadherin-bindendes Strukturprotein in *Adherens Junctions* gefunden wurde und außerdem als in den Zellkern translozierendes, mit dem Transkriptionsfaktor Lef1 interagierendes Protein und Teil des Wnt-Signalweges erkannt wurde [Harris und Peifer, 2005]. Nachdem die zunächst eher unwahrscheinlich erscheinende Idee eines in den Kern translozierenden Zelladhäsionsproteins von der breiten Masse der Wissenschaftler akzeptiert wurde, sind weitere Beispiele für solche Signalproteine gefunden worden. Zu diesen gehören auch verschiedene LIM-Domänen-Proteine, wie z.B. Mitglieder der Zyxin/Paxillin-Familien [Wang und Gilmore, 2003] und Migfilin [Wu, 2005]. Zyxin und Paxillin sind die Prototypen zweier verwandter Unterfamilien von Lim-Domänen-Proteinen, die vorwiegend an fokalen Adhäsionen lokalisiert sind und in den Nukleus translozieren können, wo sie mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren können. Diese Proteine können durch Interaktion mit anderen Proteinen in den Nukleus gelangen, werden aber durch ein nukleäres Exportsignal (NES) aus dem Nukleus exportiert. Migfilin ist ein erst kürzlich beschriebener Bestandteil von Zelladhäsionen. Interessanterweise ist es sowohl an fokalen Adhäsionen wie auch in *Adherens Junctions* zu finden. Es bindet unter anderem Mig-2, die Aktin-bindenden Proteine Filamin A, B und C sowie VASP (*Vasodilator Stimulated Phosphoprotein*) und den Transkriptionsfaktor CSX/NKX-25 [Takafuta et al., 2003; Tu et al., 2003].

Insbesondere die LIM-Domänen-Proteine verdeutlichen, dass der Mangel einer Kernlokalisationssequenz (NLS) kein Ausschlusskriterium für eine nukleäre Lokalisation und die Beteiligung an Transkriptionsvorgängen ist. Es muss nun geklärt werden, ob Poldip2 in der Lage ist, DNA oder andere Transkriptionsfaktoren zu binden oder die Genregulation anderweitig zu kontrollieren, und wie die Translokation in den Zellkern bzw. die Rekrutierung an die Plasmamembran reguliert ist. Ein weiterer Ansatzpunkt könnte die Regulation der Expression von Poldip2 selber sein. Im Northern-Blot war in undifferenzierten Embryonalen Stammzellen und PC12-Zellen jeweils mehr mRNA vorhanden, als in den differenzierten Zellen.

**Kann Poldip2 die Wachstums-regulierende Eigenschaft von CEACAM1 vermitteln?**

Poldip2 wurde als Interaktionspartner der DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol $\delta$ ) und von PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) beschrieben [Liu et al., 2003]. Beide sind eng in die Regulation und die Durchführung der Proliferation eingebunden. Die Pol $\delta$  dient der Replikation und der Reparatur der DNA, und arbeitet hierbei mit PCNA zusammen. PCNA ist ein sog. *DNA sliding clamp*-Protein und bildet Homotrimere. Diese Homotrimere liegen wie ein Ring um die DNA-Stränge herum und unterstützen so die vielfältigen Funktionen der Bindungspartner, indem sie deren Nähe zur DNA gewährleisten. Für PCNA wurde eine Vielzahl an Interaktionspartnern beschrieben, die dieses Protein in so verschiedene Vorgänge wie das Prozessieren von Okazaki-Fragmenten, die DNA-Reparatur, die DNA-Methylierung, den Chromatin-Umbau und die Kontrolle des Zellzyklus einbinden [Maga und Hubscher, 2003]. Zu den interagierenden Proteinen gehören z.B. die DNA-Ligase I, die Polymerasen Pol $\delta$  und Pol $\epsilon$  (DNA-Replikation und Reparatur), Pol $\beta$  (Reparatur fehlender Basen) sowie Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  und Pol $\lambda$  (Überlesen und DNA-Synthese geschädigter Stellen, *translesion synthesis*) aber auch Cyclin/CDKs und p21/cip (Zellzykluskontrolle). Auch MeCTr, welches in die Erhaltung von Methylierungsmustern involviert ist oder die Apoptose-verhindernden Proteine Gadd45 und MyD118 können mit PCNA interagieren. Ob CEACAM1 via Poldip2 tatsächlich in der Lage ist, einzelne PCNA-vermittelte Funktionen zu beeinflussen, muss noch untersucht werden.

Die Interaktion mit Poldip2 könnte die oft beschriebene Wachstums-regulierende Eigenschaft von CEACAM1 erklären. So wurde CEACAM1 als Regulator der Kontaktinhibition der Proliferation von epithelialen NbE- und NBT-II-Zellen beschrieben [Singer et al., 2000]. Dieser inhibitorische Effekt auf die Proliferation konfluenter Zellen wird unter anderem durch die reduzierte Expression des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27kip1 vermittelt und benötigt die Kostimulation durch Wachstumsfaktoren im Serum des Zellkulturmediums [Scheffrahn et al., 2005]. Außerdem konnte der Verlust der Expression von CEACAM1 in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen mit einer erhöhten Proliferation in Zusammenhang gebracht werden [Busch et al., 2002]. In Jurkat- und Kit-225-Zellen inhibiert die Expression von CEACAM1-L die Proliferation [Chen und Shively, 2004]. Für T-Zellen konnte sowohl ein inhibierender [Nakajima et al., 2002] wie auch - trotz der zwei ITIM-Motive in der zytoplasmatischen Domäne - ein aktivierender [Kammerer et al., 1998] Einfluss auf die Proliferation gezeigt werden. Sollte Poldip2 tatsächlich die Fähigkeit besitzen, DNA- oder Transkriptionsfaktoren zu binden, oder auf andere Weise in die Genregulation eingreifen können, wäre es ein interessanter Kandidat für Untersuchungen über die Vermittlung CEACAM1-regulierter Wachstumskontrolle.