

2. Ergebnisse

2.1. CEACAM1-Isoformen in PC12-Zellen

2.1.1. Transmembranäre Isoformen

Da vom CEACAM1 mehrere Spleißvarianten bekannt sind, wurde zuerst untersucht, welche der Isoformen in den PC12-Zellen exprimiert werden. Nach Immunpräzipitationen mit Isoform-spezifischen Antiseren (Baum et al., 1995) konnten sowohl CEACAM1-4L als auch CEACAM1-4S im Immunblot mit dem mAk Be 9.2, der die N-terminale Ig-Domäne des CEACAM1 bindet, nachgewiesen werden (Abb. 6).

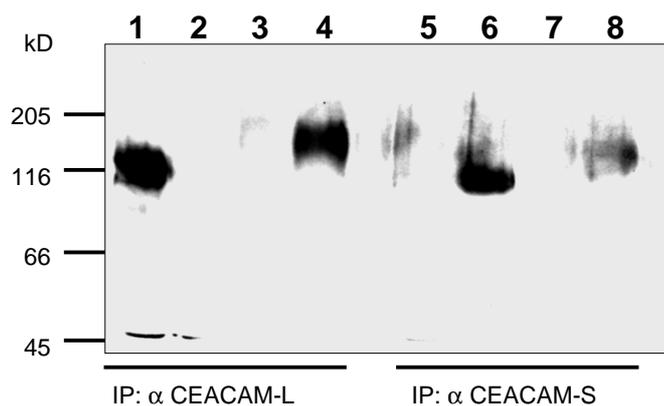


Abbildung 6: Identifikation von transmembranären CEACAM1-Isoformen in PC12-Zellen mit Isoform-spezifischen Antiseren

Zelllysate aus CHO-CEACAM1-L (1+5), CHO-CEACAM1-S (2+6), CHO-CEACAM1- Δ C (3+7) oder PC12-Zellen (4+8) wurden mit Isoform-spezifischen Antiseren gegen CEACAM1-L (1-4) oder CEACAM1-S (5-8) immunpräzipitiert. Alle CEACAM1-Isoformen wurden im Immunblot mit dem mAk Be 9.2 nachgewiesen.

Die Lokalisation von CEACAM1 auf der Zelloberfläche wurde durch FACS-Analysen von nicht-permeabilisierten Zellen gezeigt (Abb. 7). Auch in der indirekten Immunfluoreszenz konnte CEACAM1 auf den PC12-Zellen detektiert werden (siehe unten).

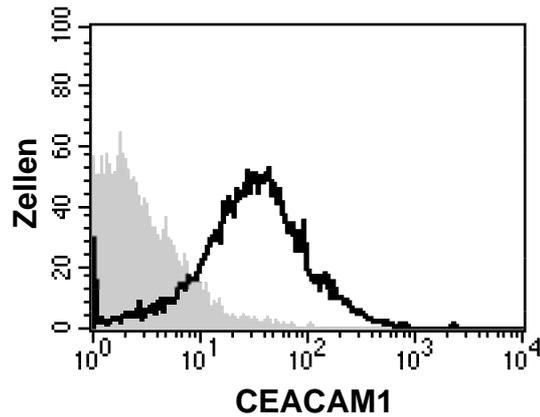


Abbildung 7: Nachweis der CEACAM1-Expression auf der Oberfläche der PC12-Zellen durch FACS-Analyse.

Nicht permeabilisierte PC12-Zellen wurden mit polyklonalem anti-CEACAM1 und FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt (schwarze Linie). Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne primären Antikörper gefärbt (graue Fläche).

Die Identifikation von CEACAM1 auf Proteinebene wurde auch auf RNA-Ebene bestätigt.

Die mRNAs der CEACAM1-Isoformen konnten durch RT-PCR mit verschiedenen Primern charakterisiert werden: Die Verwendung Isoform-spezifischer Primer (9+L für CEACAM1-4L und 22+L für CEACAM1-4S) bestätigte das Vorliegen der beiden bekannten Formen. Die Primerkombination R+L umspannt das variabel gespleißte Exon 7 und reagiert deshalb mit beiden Isoformen. Erwartungsgemäß wurden PCR-Produkte von 679 bp und 626 bp amplifiziert, die nach Sequenzierung als CEACAM1-4L und CEACAM1-4S identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurde jedoch auch noch eine dritte Bande von ca. 500 bp (Abb. 8) gefunden.

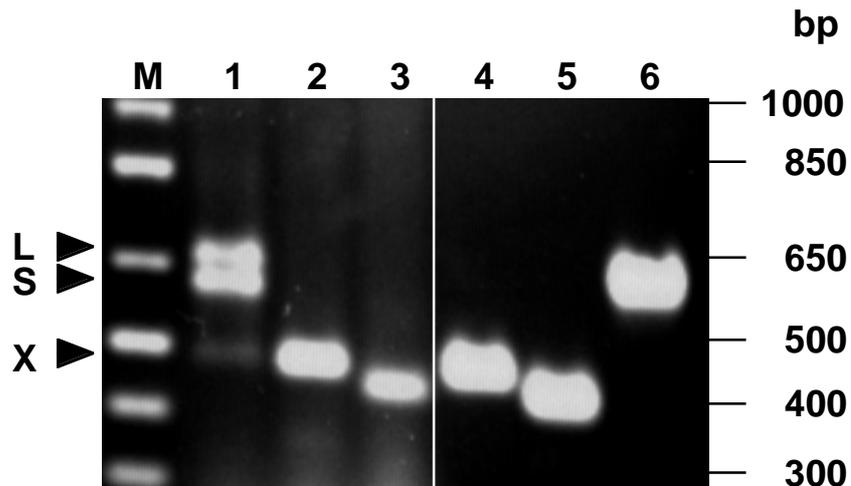


Abbildung 8: Nachweis der CEACAM1-Isoformen in PC12-Zellen durch RT-PCR.

RNA aus PC12-Zellen wurde revers transkribiert und die cDNA in PCR-Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen untersucht (1-3). Als Kontrollen dienten die Expressionsplasmide pSN3 für CEACAM1-4L (4+6) bzw. pKB6 für CEACAM1-4S (5): Primer R+L (1+6) erfassen alle CEACAM1-Isoformen, das Primerpaar 9+L (2+4) ist spezifisch für CEACAM1-L, das Primerpaar 22+L (3+5) ist spezifisch für CEACAM1-S. Die mit R+L detektierten PCR-Produkte in Bahn 1 sind durch Pfeilspitzen (L für CEACAM1-4L, S für CEACAM1-4S, X für zusätzliche Bande) gekennzeichnet.

2.1.2. Sekretierte Isoformen

Die Isolierung und Sequenzierung des zusätzlichen PCR-Produktes ergab, dass es sich hierbei um zwei neue, noch nicht bekannte Spleißvarianten handelt, in denen das für die Transmembrandomäne kodierende Exon 6, und in der zweiten Form zusätzlich noch das Exon 7 fehlen. Abbildung 9 fasst schematisch die Exon-Verwendung aller identifizierten Spleißvarianten des CEACAM1 zusammen. Neben den bekannten Formen CEACAM1-4L und CEACAM1-4S konnten zwei neue Formen charakterisiert werden, die gemäß der Nomenklatur der CEA-Familie mit CEACAM1-4C1 und CEACAM1-4C2 benannt wurden. Die Sequenzen wurden in der NCBI Genbank unter den Zugangsnummern AJ2771104 und AJ2771105 abgelegt.

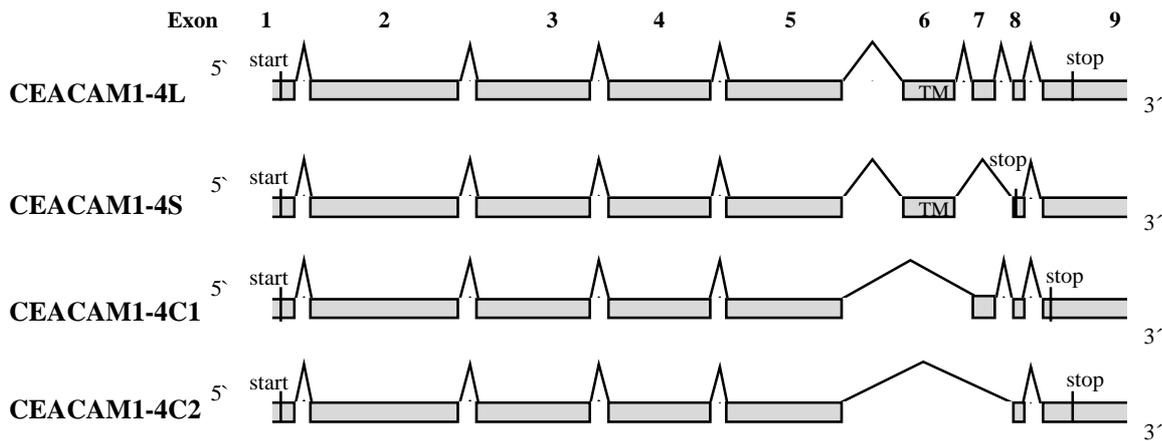


Abbildung 9: Exon-Zusammensetzung der in PC12-Zellen identifizierten CEACAM1-Isoformen

L	RISHPIKLDV	IPDPTQGNSG	LSEGAIAGIV	IGSVAGVALI	AALAYFLYSR	450
S	"	"	"	"	"	450
C1	"	"REV"IEI"Q	STNPQPPATI	WVLLTLLTR	WMTSHTLS.	448
C2	"	"H	"	"	"	412
L	KTGGGSDHRD	LTEHKPSTSS	HNLGPSDDSP	NKVDDVSYSV	LNFNAAQQSKR	500
S	"	"	"	"	"SGSF.	458
C2	"	"	"	"	"	440
L	PTSASSSPTE	TVYSVVKKK.				519
C2	"	"	"	"	"	459

Abbildung 10: Partielle Aminosäure-Sequenzen der CEACAM1-Isoformen.

Die C-Termini der CEACAM1-Isoformen CEACAM1-4L (L), CEACAM1-4S (S), CEACAM1-4C1 (C1) und CEACAM1-4C2 (C2) sind ab AS 401 dargestellt. Senkrechte Striche kennzeichnen zu L identische AS. Der Transmembranbereich von L und S ist gepunktet unterstrichen.

Die jeweiligen Kombinationen der Exons bewirken spezielle Aminosäuresequenzen für die beiden neuen Proteine (Abb. 10): Das alleinige Fehlen von Exon 6 in CEACAM1-4C1 bewirkt eine Leserahmenverschiebung in den Exons 7 bis 9 und das Ende der Transkription an einem frühen Stopp-Codon in Exon 9. Dieser Isoform fehlen daher die letzten elf Aminosäuren der vierten Ig- Domäne (AS 412-423) und der Transmembranbereich (AS 424-448). Sie endet mit einem 37 AS langen C-Terminus, der keine Homologie zu anderen

CEACAM1-Proteinen aufweist. Durch gemeinsames Spleißen von Exon 6 und 7 ergibt sich die korrekte Ablesung der Exons 8 und 9, wodurch diese Isoform in ihrem C-terminalen Bereich dem zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L entspricht. CEACAM1-4C2 weicht ebenso wie CEACAM1-4C1 ab Position 412 von der Aminosäuresequenz des CEACAM1-L ab. An dieser Stelle steht ein Histidin, das durch die Verknüpfungsstelle der beiden Exons codiert wird. Dann schließt sich ein 48 AS langer Bereich an, der mit dem C-Terminus von CEACAM1-L identisch ist. Die aus den Sequenzdaten abgeleitete Proteinstruktur aller in PC12-Zellen exprimierten CEACAM1-Isoformen ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt.

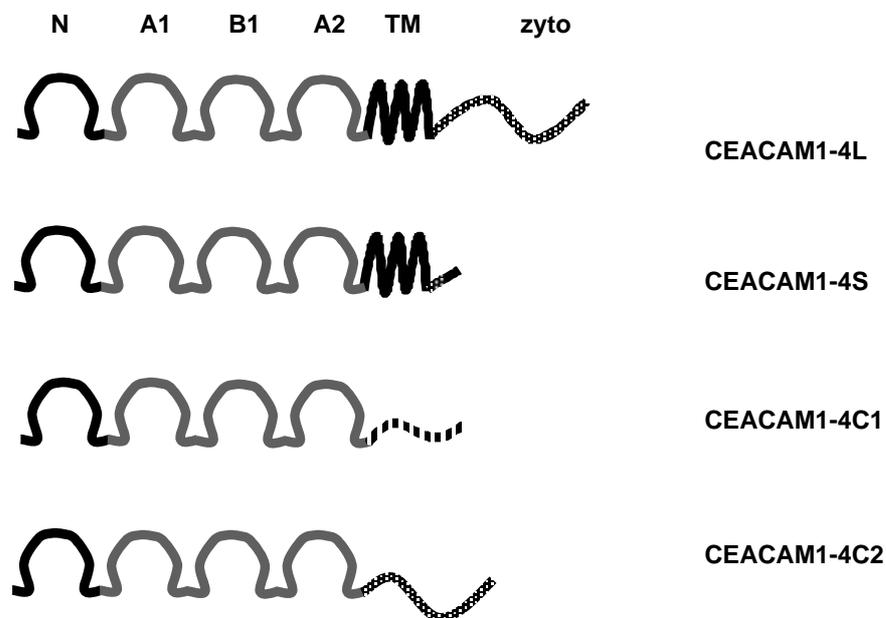


Abbildung 11: Schematische Darstellung der CEACAM1-Isoformen aus PC12-Zellen.

CEACAM1-4L besitzt alle vier Ig-Domänen (N, A1, B1, A2), einen Transmembranbereich (TM) und einen zytoplasmatischen Teil (zyto). CEACAM1-4S kennzeichnet einen verkürzten zytoplasmatischen Teil, der sich auch teilweise von dem des CEACAM1-4L unterscheidet (schwarz). Den beiden neuen Isoformen CEACAM1-4C1 und CEACAM1-4C2 fehlt die TM-Domäne. Den vier Ig-Domänen folgt hier jeweils ein anderer C-Terminus, der für CEACAM1-4C2 mit dem des CEACAM1-4L übereinstimmt (gepunktet). Der C-Terminus von CEACAM1-4C1 (gestreift) weist keine Homologie zu anderen CEACAM1-Isoformen auf.

Da die Signalsequenz zur Membraninsertion in Exon 1 noch vorhanden ist, sollte es sich bei beiden um lösliche, sekretierte Formen handeln. Der Nachweis des CEACAM1-4C2, der Form mit dem zu CEACAM1-L analogen C-Terminus konnte auch auf Proteinebene erbracht werden. Hierzu wurde das α -CC1-cyto-Antiserum verwendet, das gegen den rekombinant exprimierten, zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L generiert wurde. Zur Überprüfung der Spezifität des Antiserums wurden CEACAM1-4L, CEACAM1-4S und CEACAM1- Δ C, eine Mutante ganz ohne zytoplasmatischen Anteil, in CHO-Zellen exprimiert. Nach Transfektion und Selektion wurde die CEACAM1-Expression stabil exprimierender Klone durch Immunblot-Analysen überprüft (Abb. 12, Lysate). Die Spezifität des Antiserums wurde durch Immunpräzipitationen gezeigt: Mit α -CC1-cyto wurde nur CEACAM1-L aus CHO-Zelllysate präzipitiert, nicht aber CEACAM1-S oder CEACAM1- Δ C (Abb. 13).

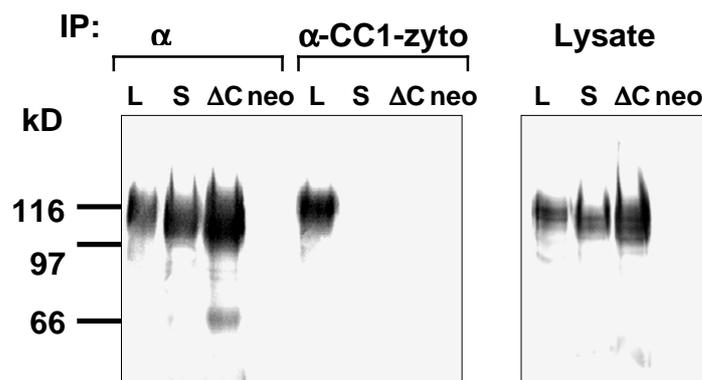


Abbildung 12: Spezifität des Antiserums gegen die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L.

Lysate aus CHO-CEACAM1-L (L), CHO-CEACAM1-S (S), CHO-CEACAM1- Δ C (Δ C) oder CHO-neo (neo) -Zellen wurden mit anti-CEACAM1- (α -CC1) oder anti-CEACAM1-zyto (α -CC1-zyto)-Antiserum immunpräzipitiert. Die Detektion von CEACAM1 erfolgte im Immunblot mit dem mAk Be 9.2. Die Expression von CEACAM1 wurde durch Immunblotanalyse der Zelllysate überprüft (rechts).

Dieses Antiserum erkennt also nur den zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L und sollte deshalb geeignet sein, die tatsächlich sekretierte Isoform von proteolytisch freigesetzten extrazellulären Domänen des CEACAM1 zu unterscheiden. In Immunpräzipitationen mit α -CC1-cyto aus konditionierten Zellkulturmedium von PC12-Zellen wurde auch tatsächlich

CEACAM1 nachgewiesen. Die deutlich größere Menge CEACAM1, die mit gleicher Menge eines polyklonalen α -CC1-Serums (gegen das gesamte CEACAM1-Molekül gerichtet) präzipitiert wurde, ist vermutlich auf das Vorhandensein des CEACAM1-4C1 zurückzuführen. Diese Isoform kann aufgrund ihres von den anderen Isoformen abweichenden C-Terminus nicht mit der hier angewendeten Methode erfasst werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass durch das α -CC1-Serum nicht nur CEACAM1-4C1, sondern auch noch zusätzlich durch Proteolyse freigesetzte Fragmente der membrangebundenen CEACAM1-Isoformen angereichert werden.

Der *in vitro*-Nachweis der sekretierten CEACAM1-Isoformen ließ sich auch *in vivo* reproduzieren. In Rattenserum, nicht aber in Rattenurin ließ sich CEACAM1-4C2 auf die beschriebene Art nachweisen. Die Konzentrationen sowohl des mit α -CC1-Serum nachweisbaren CEACAM1, als auch des mit α -CC1-zyto-Serum detektierten CEACAM1-4C2 waren bei Tieren mit Morris-Hepatom erhöht (Abb. 13).

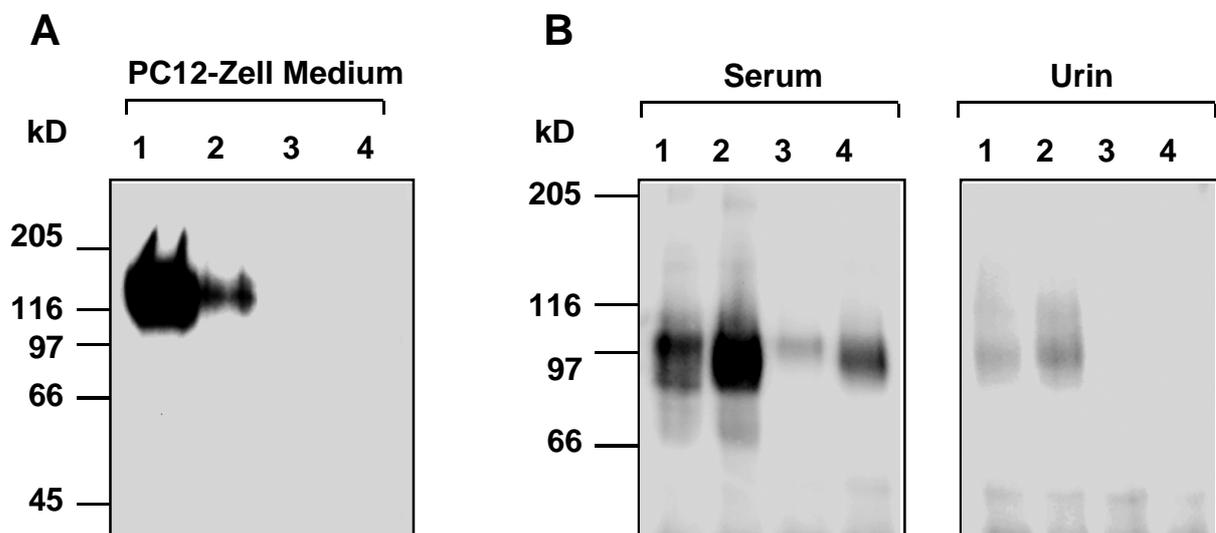


Abbildung 13: *in vitro* und *in vivo* Nachweis von sekretiertem CEACAM1-4C2.

A: Nachweis von CEACAM1 im Kulturmedium von PC12-Zellen. Konditioniertes (Bahn 1+2) oder frisches (Bahn 3+4) PC12-Zell-Medium wurde mit α -CC1 (Bahn 1+3) oder α -CC1-zyto immunpräzipitiert. **B:** Serum und Urin von hepatomtragenden Ratten (Bahn 2+4) oder Kontrolltieren (Bahn 1+3) wurde mit α -CC1 (Bahn 1+2) oder α -CC1-zyto immunpräzipitiert. Der Nachweis von CEACAM1 erfolgte jeweils im Immunblot mit dem mAk Be 9.2.

2.2. CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung

Der folgende Teil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Signaltransduktion des transmembranären CEACAM1. Die Signaltransduktion des CEACAM1 sollte anhand von Veränderungen seiner Phosphorylierung untersucht werden. Während sowohl CC1-L als auch CC1-S Phosphorylierungsstellen an Serin- und Threoninresten aufweisen, besitzt nur CC1-L zwei Tyrosine (Abb. 5). Deshalb können Veränderungen der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung ohne Kenntnis der vorliegenden Isoformen eindeutig CC1-L zugeschrieben werden. Zuerst wurden Bedingungen für die Darstellung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung etabliert. Die Stimulation von PC12-Zellen mit Pferdeserum bewirkte eine Erhöhung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung. Allerdings war nur dann ein nennenswerter Spiegel von phosphoryliertem CEACAM1 nachweisbar, wenn die Zellen vor der Aufarbeitung mit dem Tyrosinphosphatase-Inhibitor Pervanadat behandelt wurden. Dies weist auf eine mögliche Dephosphorylierung von CEACAM1 während der Probenaufarbeitung hin (Abb. 14). Nach Gabe von Pervanadat wurde aber auch in Abwesenheit von Serum tyrosinphosphoryliertes CEACAM1 nachgewiesen. Dies deutet auf eine konstitutive, basale CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung in PC12-Zellen hin. Die Darstellung von tyrosinphosphoryliertem CEACAM1 war sowohl durch Immunpräzipitation von CEACAM1 und anschließenden anti-Phosphotyrosin-Immunblot, als auch umgekehrt, durch anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation, gefolgt vom Nachweis mit anti-CEACAM1 spezifisch möglich. Nur mit der ersten Methode war aber die Kontrolle der CEACAM1-Menge im jeweiligen Ansatz durch anti-CEACAM1-Immunblot möglich, was eine genaue Quantifizierung der relativen Phosphorylierung ermöglichte. Deshalb wurde dieser Ansatz für alle weiteren Versuche angewendet.

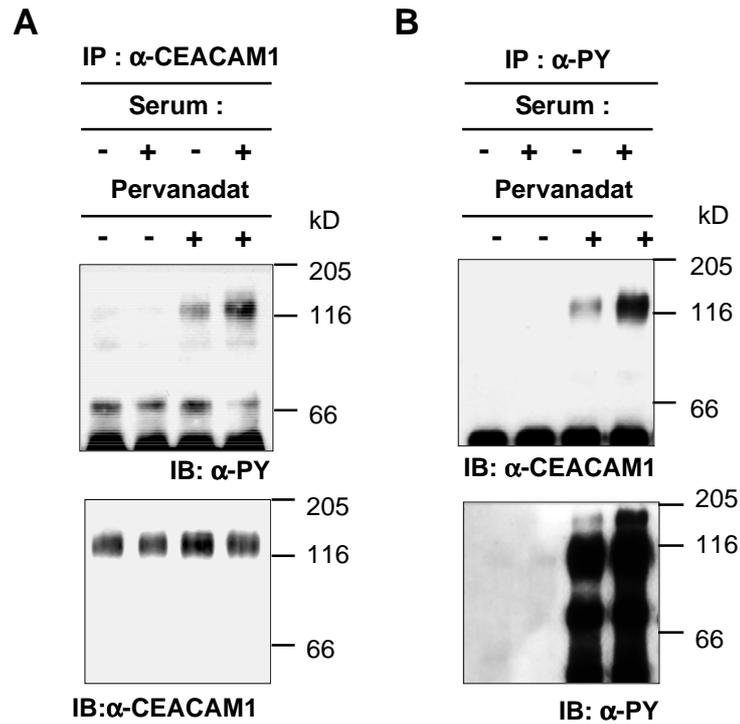


Abbildung 14: Darstellung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung in PC12-Zellen in Gegenwart des Tyrosinphosphatase-Inhibitors Pervanadat.

A: CEACAM1 wurde aus dem Zelllysat von Serum- bzw. Pervanadat-behandelten PC12-Zellen immunpräzipitiert und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin (α -PY) bzw. dem mAk Be 9.2 (α -CEACAM1) untersucht. **B:** Anti-Phosphotyrosin-Immünpräzipitation der gleichen Proben.

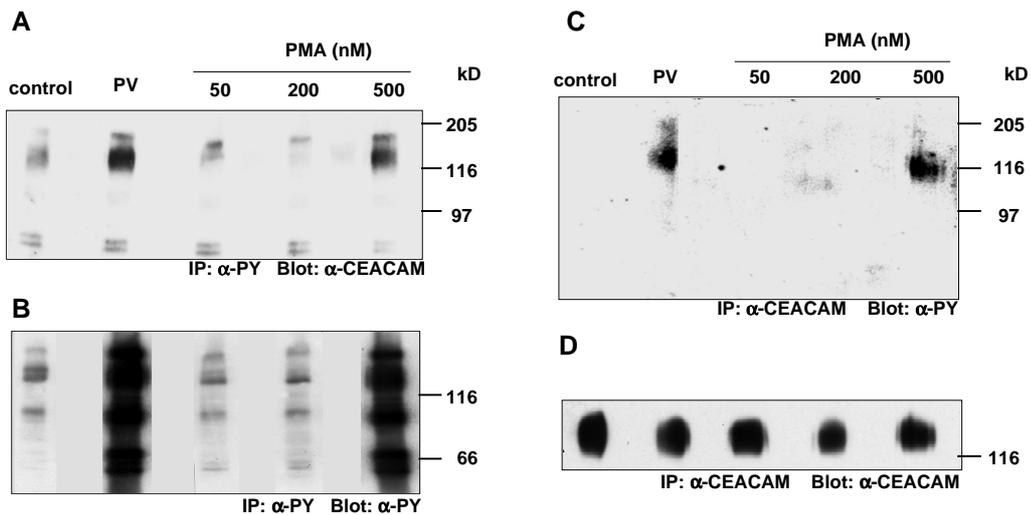


Abbildung 15: CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung durch PMA.

PC12-Zellen wurden mit PMA oder Pervanadat (PV) behandelt. Aus dem Lysat wurden CEACAM1 (C+D) oder Phosphotyrosin-haltige Proteine (A+B) immunpräzipitiert und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin (α -PY, B+C) bzw. dem mAk Be 9.2 (α -CEACAM1, A+D) nachgewiesen.

In höheren Konzentrationen bewirkte auch das Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), ein Stimulator der Serin-Threonin-Proteinkinase C (PKC), eine verstärkte CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 15). Da dies aber nur über indirekte Effekte zu erklären sein kann, etwa durch Aktivierung von Tyrosinkinase durch PMA-aktivierte PKC, wurde dieser Befund nicht weiter verfolgt.

2.2.1. Stimulation von CEACAM1 induziert dessen Tyrosin-Dephosphorylierung

Stattdessen wurde versucht, durch direkte Stimulation des CEACAM1 ein Signal zu induzieren. Als Stimulus wurde die Quervernetzung von CEACAM1 mit Antikörpern gewählt. Im unstimulierten Zustand ist CEACAM1 nahezu homogen auf der Oberfläche der PC12-Zellen verteilt. Die Stimulation mit dem mAk Be 9.2 bewirkt keine sichtbare Veränderung der CEACAM1-Verteilung. Durch Stimulation mit dem Be 9.2 in Kombination mit einem sekundären anti-Maus-Antikörper konnte dagegen die Bildung von großen CEACAM1-Clustern auf der Zelle induziert werden (Abb. 16).

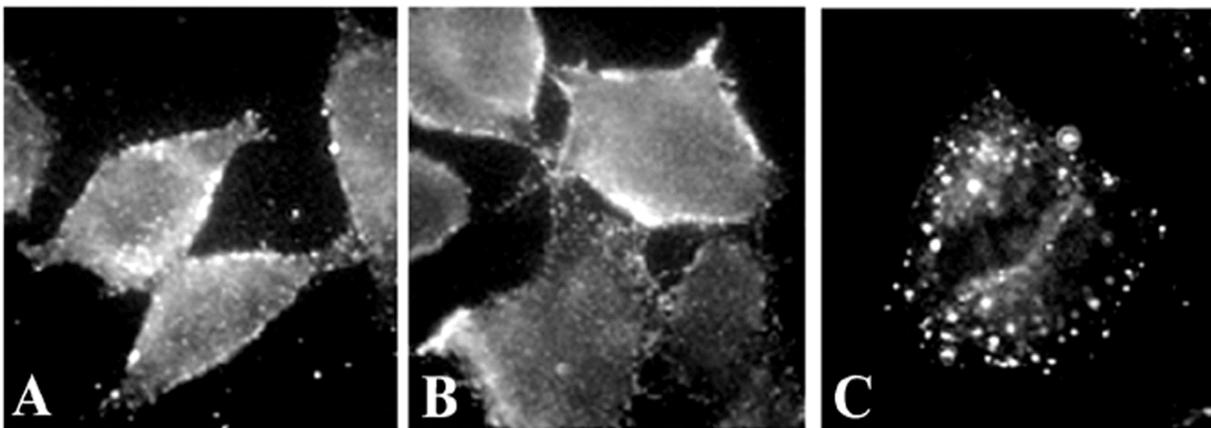


Abbildung 16: Die Stimulation von CEACAM1 mit Antikörpern bewirkt die Bildung von CEACAM1-Aggregaten.

PC12-Zellen wurden bei 4°C mit dem mAk Be 9.2 und anschließend bei 37°C mit einem FITC-markierten anti-Maus IgG –Antikörper markiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte dabei entweder vor der Färbung (A), nach Inkubation mit dem ersten (B) oder dem zweiten Antikörper (C).

Die Stimulation durch Clustern bewirkte eine schnelle und reversible Abnahme der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung. Bereits nach 5 Min. Stimulation war eine deutliche Abnahme der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung zu verzeichnen, die innerhalb einer Stunde wieder auf das Ursprungsniveau anstieg. Die Stimulation mit dem mAk Be 9.2 oder mit anti-Maus-Antikörpern alleine löste keinen signifikanten Effekt aus, was darauf hindeutet, dass tatsächlich die Veränderung der makromolekularen Organisation des CEACAM1 das entscheidende Signal darstellt (Abb. 17). Die Inhibition der zellulären Tyrosinphosphatasen durch Pervanadat erfolgte erst unmittelbar vor der Probenaufarbeitung. Die vorherige Dephosphorylierung des CEACAM1 fand also unter ungehemmten Bedingungen statt (siehe Material Methoden, 5.2.1.3.)

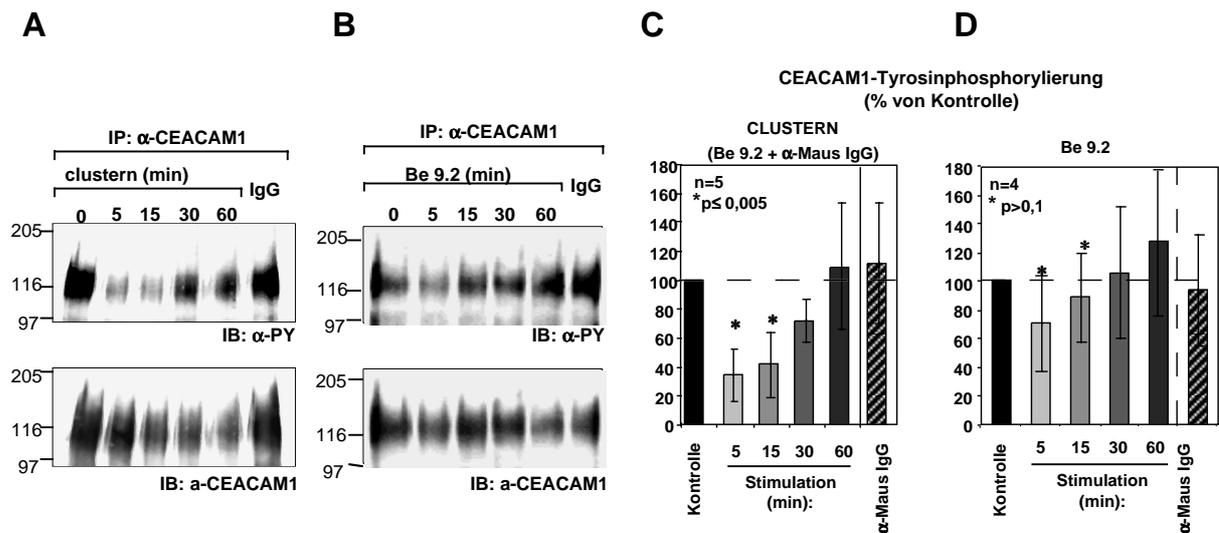


Abbildung 17: CEACAM1 wird nach Clustern an Tyrosin dephosphoryliert.

PC12-Zellen wurden mit dem mAk Be 9.2 vorinkubiert und mit sekundären anti-Maus IgG-Antikörpern stimuliert (A+C) oder nur mit dem mAk Be 9.2 stimuliert (B+D). CEACAM1 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin (α -PY) und anti-CEACAM1-Antikörpern untersucht. Aus den Intensitäten der Banden wurde die relative CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung berechnet (C+D).

2.3. CEACAM1 bindet die Tyrosinphosphatase SHP2

Die beobachtete Tyrosin-Dephosphorylierung von CEACAM1 nach erfolgter Stimulation legt die Interaktion mit Tyrosinphosphatasen nahe. Deshalb wurden anti-CEACAM1-Immünpräzipitate auf die Anwesenheit von Tyrosinphosphatasen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphatase SHP2 nach Behandlung von PC12-Zellen mit Pervanadat spezifisch durch anti-CEACAM1-Antikörper aus dem Lysat ko-präzipitiert wurde (Abb. 18). Wie bereits oben gezeigt, konnte nur unter diesen Bedingungen die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung konserviert werden. In Kontrollansätzen ohne Pervanadat oder ohne spezifische anti-CEACAM1-Antikörper wurde dagegen kein SHP2 gefunden. Die der SHP2 eng verwandte, ebenfalls in PC12-Zellen exprimierte Tyrosinphosphatase SHP1 konnte dagegen nicht in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion zwischen SHP2 und CEACAM1 wurde im reziproken Ansatz bestätigt: CEACAM1 wurde ebenfalls nur nach Gabe des Phosphataseinhibitors und nur bei Präzipitation mit anti-SHP2-Antikörpern kopräzipitiert. Da die Interaktion von CEACAM1 und SHP2 von der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung abhängig ist, und CEACAM1 nach Stimulation an Tyrosin dephosphoryliert wird, wurde der Einfluß des Quervernetzens von CEACAM1 auf die CEACAM1-SHP2-Interaktion untersucht. Abbildung 18 C zeigt die Reduktion der Interaktion nach kurzer Stimulation und deren erneute Nachweisbarkeit nach 60 min. Die Interaktion zwischen SHP2 und CEACAM1 wird durch die Stimulation also mit ähnlicher Kinetik reguliert wie auch die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung selbst.

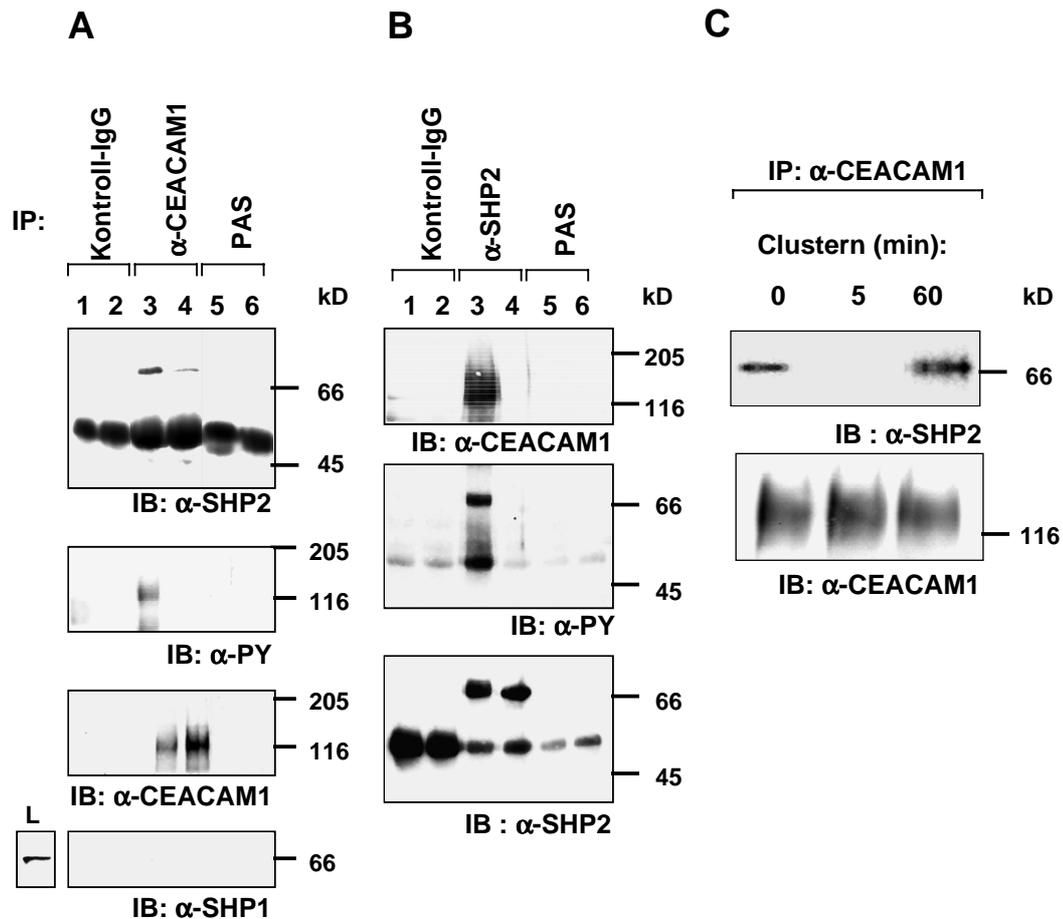


Abbildung 18: CEACAM1 bindet die Tyrosinphosphatase SHP2 in Abhängigkeit von der makromolekularen Verteilung.

PC12-Zellen wurden mit Pervanadat behandelt (1, 3, 5) oder unbehandelt gelassen (2, 4, 6). **A:** Aus dem Lysat wurde CEACAM1 (3+4) immunpräzipitiert und das Präzipitat im Immunblot auf SHP2, SHP1, Phosphotyrosin oder CEACAM1 untersucht. In Kontrollansätzen wurde mit unspezifischem Kaninchen-IgG (1+2) oder Protein A-Sepharose (PAS, 5+6) präzipitiert. **B:** Im umgekehrten Ansatz wurde SHP2 (3+4) immunpräzipitiert. **C:** PC12-Zellen wurden durch CEACAM1-Clustern stimuliert und mit Pervanadat behandelt. Das anti-CEACAM1-Immunpräzipitat wurde im Immunblot auf SHP2 und CEACAM1 untersucht.

2.4. CEACAM1-Stimulation aktiviert die Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) ERK1 und ERK2

Die Bildung der CEACAM1-Cluster hatte eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 zur Folge, wie durch Immunblots mit Antikörpern, die ein bisphosphoryliertes Tripeptid (pTEpY) in der Aktivierungsdomäne dieser Kinasen erkennen, gezeigt werden konnte. Die Stimulation wirkte schnell, war reversibel und spezifisch. Die Aktivierung war

bereits nach 5 min. maximal, und ging schon nach 30 min. deutlich zurück. In Analogie zu den bereits gezeigten Ergebnissen war auch hier die Stimulation mit beiden Antikörpern nötig, um einen Effekt zu erzielen. Die Aktivierung war spezifisch für ERK1 und ERK2, denn es konnte keine gesteigerte Phosphorylierung der anderen MAPK- Mitglieder JNK und p38 gemessen werden (Abb. 19).

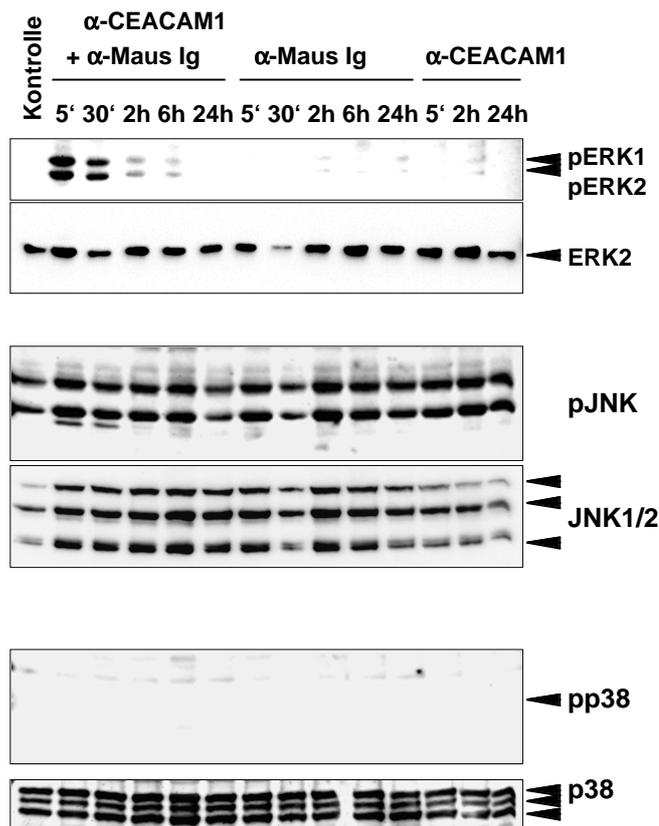


Abbildung 19: CEACAM1-Clustern bewirkt die Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2, aber nicht JNK oder p38.

PC12-Zellen wurden mit Antikörpern stimuliert, wie angezeigt. Aktivierte MAP-Kinasen wurden im Zelllysat mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern (pERK1/2, pJNK, pp38) detektiert. Die Kontrolle der Proteinmenge erfolgte mit α -ERK2, α -JNK1/2 und α -p38-Antikörpern.

2.5. Clustern induziert die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett

Neben den bereits beschriebenen Effekten auf die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung bewirkte die Stimulation von CEACAM1 auch noch eine verminderte Löslichkeit des CEACAM1 im Solubilisationspuffer (siehe Abb. 17 A, α -CEACAM1). CEACAM1 konnte nach Solubilisierung mit 1% Triton X-100 und Zentrifugation im Detergens-unlöslichen Pellet nachgewiesen werden. Auch hier erfolgte die Antwort auf die Stimulation in einer reversiblen Weise: Die maximale Menge von CEACAM1 war im Pellet nach 60 min nachzuweisen (ca. 25% des gesamten CEACAM1). Danach nahm sie wieder ab, blieb aber innerhalb der untersuchten Stimulationsdauer von 180 min zumindest zum Teil erhalten (Abb. 20).

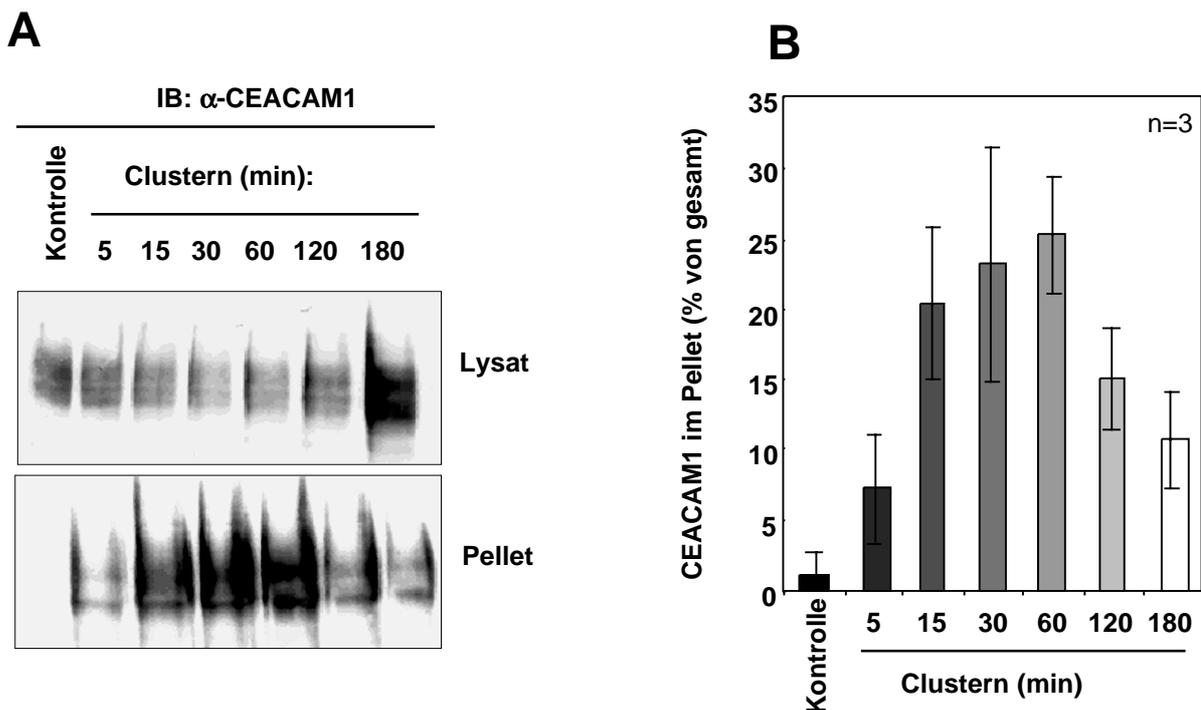


Abbildung 20: Clustern induziert die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett.

A: PC12-Zellen wurden durch CEACAM1-Clustern stimuliert und mit 1% Triton X-100 extrahiert (Lysat) Die unlöslichen Fraktionen wurde in SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht (Pellet). Aliquots der Lysat- und Pellet-Fraktionen wurden im Immunblot mit dem mAk Be 9.2 auf CEACAM1 untersucht. **B:** Aus den Bandenintensitäten und den Mengen der aufgetragenen Proben wurde der prozentuale Anteil von CEACAM1 im Pellet errechnet.

Ohne den Stimulus des Clusters war CEACAM1 dagegen schon in 0,5% Triton vollständig löslich; lediglich unter sehr milden Solubilisationsbedingungen, in 0,1% Triton X-100, fand sich eine Detergens-unlösliche Population von CEACAM1 (Abb. 21).

Die Auswirkung der CEACAM1-Stimulation auf die Extraktionsfähigkeit wurde auch in der Immunfluoreszenz dargestellt (Abb. 22). Ohne Stimulation ist das CEACAM1 gleichmäßig verteilt (A) und wird durch Behandlung der Zelle mit Triton X-100 vor dem fixieren nahezu komplett extrahiert (C). Das charakteristische punktförmige Muster der CEACAM1-Aggregate (B) wird dagegen nicht durch die Extraktion beeinflusst (D).

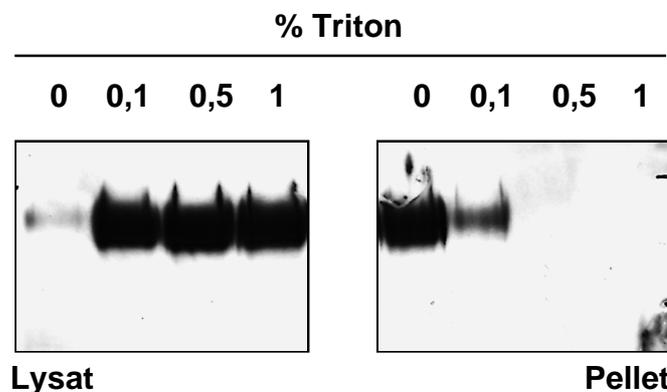


Abbildung 21: Detergenslöslichkeit von CEACAM1 ohne Stimulation

PC12-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Detergens Triton X-100 extrahiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden wie oben beschrieben auf CEACAM1 getestet.

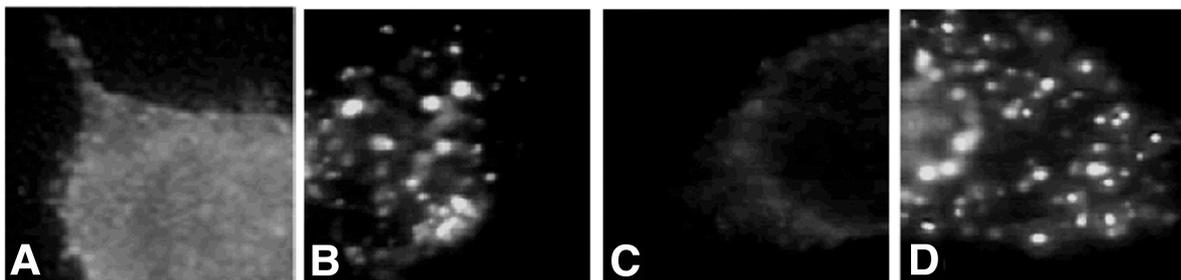


Abbildung 22: Darstellung der Cluster-induzierten Detergens-Unlöslichkeit von CEACAM1 in der Immunfluoreszenz

Unstimulierte (A+C) oder durch Quervernetzen von CEACAM1 stimulierte PC12-Zellen (B+D) wurden fixiert und CEACAM1 in der indirekten Immunfluoreszenz gefärbt. Zellen in C+D wurden vor dem fixieren mit 0,5% Triton X-100 extrahiert.

Der Nachweis, dass es sich bei der Cluster-induzierten Detergensunlöslichkeit um eine Bindung an das Aktin-Zytoskelett handelt, wurde durch Vorinkubation der Zellen mit Cytochalasin D (Cy D) und Latrunculin A (Lat A) erbracht. Diese beiden Stoffe interferieren mit der korrekten Ausbildung und Aufrechterhaltung der filamentösen Struktur des Aktins und zerstören so das Netzwerk der Filamente, das die Unlöslichkeit des Zytoskeletts bedingt. Diese Beeinflussung des Zytoskeletts bewirkte eine deutliche Verringerung des Anteils von unlöslichem CEACAM1 (Abb. 23).

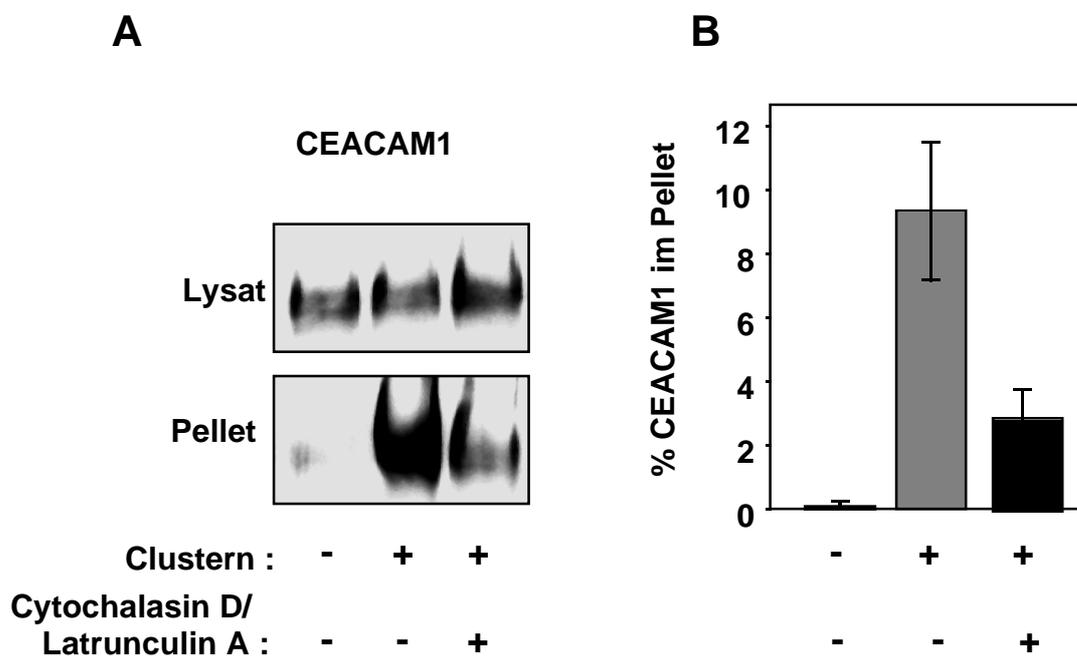


Abbildung 23: CEACAM1 bindet an das Aktin-Zytoskelett

A: PC12-Zellen wurden wie angezeigt mit Cytochalasin D und Latrunculin A behandelt und durch CEACAM1-Clustern stimuliert. Die Verteilung von CEACAM1 zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion wurde im Immunblot wie oben bestimmt. **B:** Quantifizierung.

2.5.1. CEACAM1 wird durch Quervernetzen nicht in Lipid-Rafts oder Endosomen rekrutiert

Neben dem Zytoskelett kennt man noch eine andere makromolekulare Organisationseinheit, welche die Unlöslichkeit von Proteinen in Triton X-100 bewirken kann. Es handelt sich hierbei um spezialisierte Domänen in der Plasmamembran, die sich durch eine besondere Lipid- und –Proteinzusammensetzung auszeichnen. Diese Aggregate diffundieren als stabile Komplexe in der Membran, und werden deshalb auch im englischen Sprachgebrauch als Lipid-Rafts („Lipid-Flöße“) bezeichnet. Aufgrund ihrer geringen Dichte lassen sie sich durch Dichtegradientenzentrifugation anreichern. Zur Klärung, ob CEACAM1 möglicherweise durch das Clustern in die Lipid-Rafts rekrutiert wird, wurde nach anti-CEACAM1-Stimulation und Detergens-Extraktion erhaltenes Zellysate im Dichtegradienten aufgetrennt und dann fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden im Immunblot auf CEACAM1 und Caveolin1 getestet (Abb. 24). Die Anwesenheit von Caveolin1 in den Fraktionen 2 bis 8 mit geringer Dichte weist auf die Anreicherung der Lipid-Rafts in diesem Bereich des Gradienten hin. CEACAM1 ist aber weder vor noch nach der Stimulation hier nachzuweisen. Stattdessen findet man nach CEACAM1-Stimulation wieder eine Anreicherung von CEACAM1 im unlöslichen Pellet. Hieraus folgt, dass CEACAM1 nicht mit Lipid-Rafts assoziiert ist.

Die Stimulation von Transmembranrezeptoren auf der Zelloberfläche kann ihre Internalisierung durch Endozytose, häufig gefolgt vom proteolytischen Abbau, nach sich ziehen. Um zu klären, ob sich CEACAM1 nach dem Quervernetzen noch auf der Zelloberfläche oder intrazellulär befindet, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit CEACAM1 und Rab5A, einem Markerprotein für frühe Endosomen, durchgeführt (Abb. 25). Beide Proteine weisen eine punktiertes Verteilungsmuster auf. Die deutlichsten Unterschiede zeigen sich in der Kernregion, wo keine Färbung für Rab5A nachzuweisen ist, während CEACAM1 hier aufgrund seiner Lage oberhalb des Kerns unscharf erscheint. Konfokale Aufnahmen bestätigten, dass keine Kolo-kalisation vorlag (nicht gezeigt).

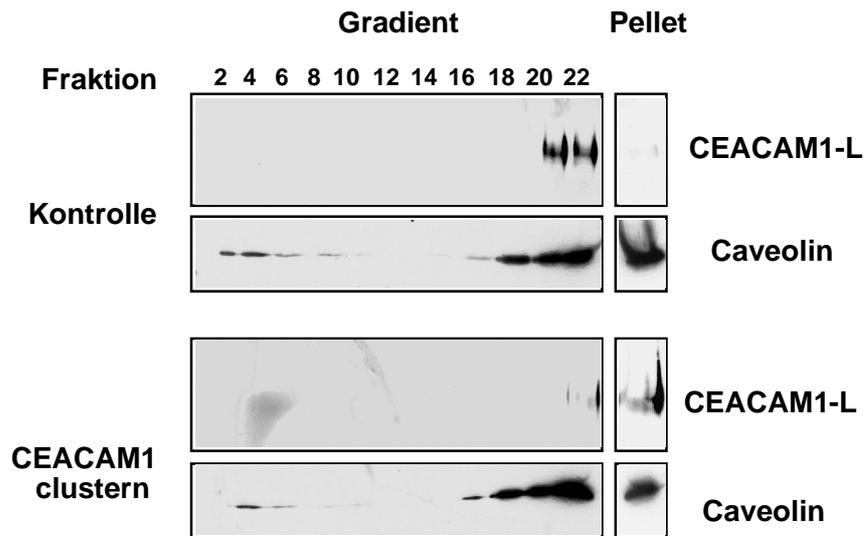


Abbildung 24: CEACAM1 wird nicht in Lipid-Rafts rekrutiert.

Das Lysat aus unbehandelten oder durch CEACAM1-Clustern stimulierten PC12-Zellen wurde im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Aliquots der Gradientenfractionen wurden im Immunblot auf CEACAM1 und Caveolin1 untersucht.

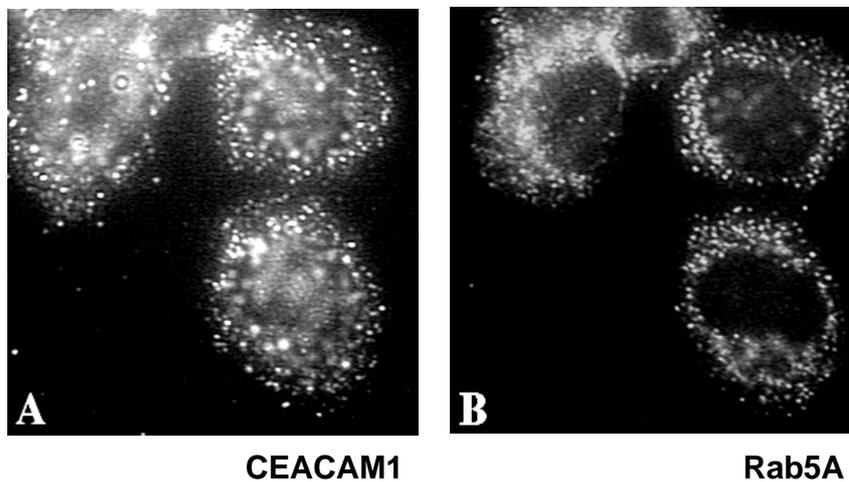


Abbildung 25: CEACAM1 wird nach Clustern nicht in Endosomen transportiert

CEACAM1 wurde auf PC12-Zellen mit Antikörpern quervernetzt. CEACAM1 und Rab5A wurden in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen.

2.5.2. Modulation der CEACAM1-Aktin-Interaktion

Die Stimulation der makromolekularen Reorganisation von CEACAM1 bewirkt also seine Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett. Diese Interaktion ist verschiedenen Einflüssen unterworfen: Zur effizienten Konservierung der CEACAM1-Bindung an das Zytoskelett war die Durchführung der Detergensextraktion bei 37 °C nötig. Im Vergleich zur Extraktion bei 4 °C wurde ein deutlich erhöhter Anteil von CEACAM1 im Pellet gefunden (Abb. 26). Soweit nicht anders erwähnt, wurden daher alle Versuche zur Löslichkeit des CEACAM1, auch die bereits gezeigten, bei 37 °C durchgeführt. Des weiteren hatte die Zelldichte einen deutlichen Einfluß auf die Effektivität der Verknüpfung von CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett. Unter nahezu konfluenten Wachstumsbedingungen wurde nach Stimulation etwa doppelt so viel CEACAM1 im Pellet erhalten, wie aus der gleichen Zellzahl einer verdünnten Kultur (Abb. 27).

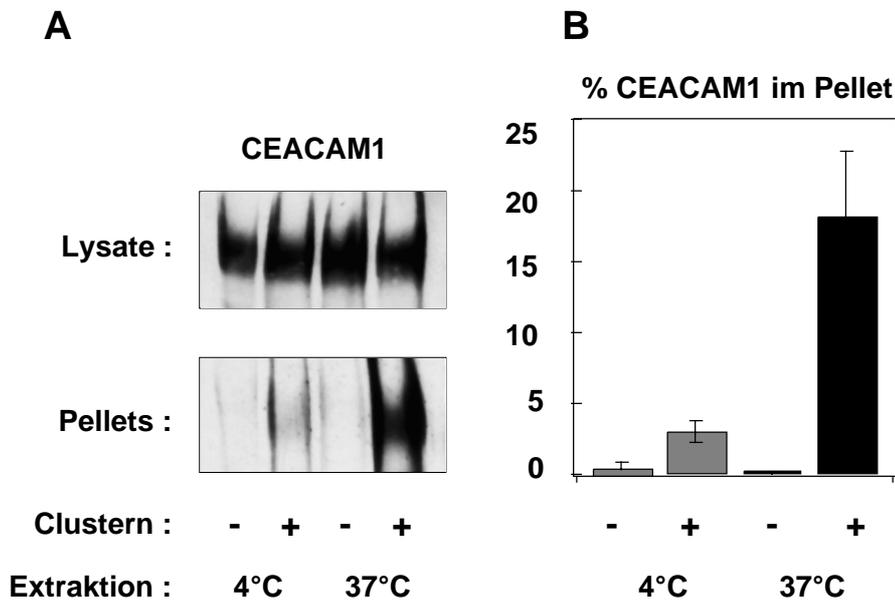


Abbildung 26: Abhängigkeit der Interaktion von CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett von der Solubilisierungstemperatur

A: PC12-Zellen wurden durch CEACAM1-Clustern stimuliert und bei 4°C oder 37°C extrahiert. Lysate und Pellets wurden im Immunblot auf CEACAM1 untersucht. **B:** Quantifizierung.

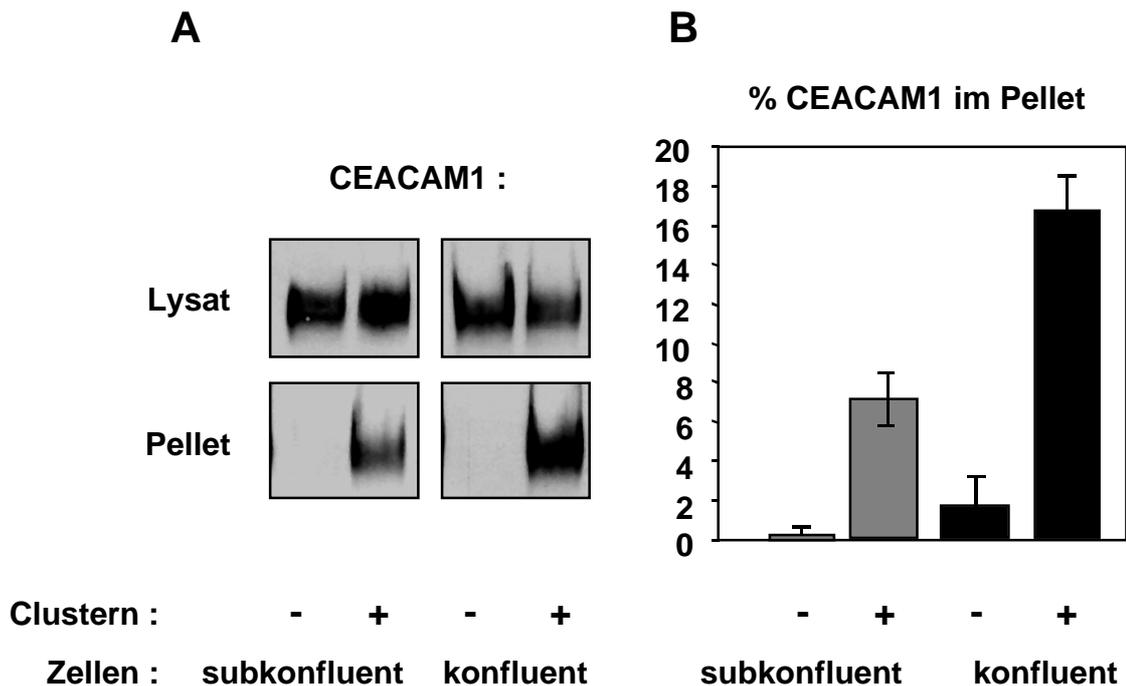


Abbildung 27: Die Zelldichte reguliert die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett

A: Subkonfluente oder konfluente PC12-Zellen wurden durch CEACAM1-Clustern stimuliert. Die Verteilung von CEACAM1 zwischen Lysat und Pellet wurde im Immunblot dargestellt. **B:** Quantifizierung.

2.5.3. Die Rolle der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1 bei der Cluster-induzierten Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett

Verschiedene Studien haben eine direkte Interaktion der zytoplasmatischen Teile von CEACAM1-L und auch CEACAM1-S mit Aktin vorgeschlagen. Um zu untersuchen, ob die Bindung der makromolekularen CEACAM1-Aggregate an das Zytoskelett auch auf diesem direkten Weg erfolgt, wurde die Löslichkeit von CEACAM1 in Abhängigkeit von seiner zytoplasmatischen Domäne untersucht. Sowohl CEACAM1-L als auch CEACAM1-S, und außerdem auch die Deletionsmutante CEACAM1- Δ C, der der intrazelluläre Anteil komplett fehlt, wurden nach Stimulation mit Antikörpern in vergleichbaren Anteilen im Pellet nachgewiesen (Abb. 28). Dies deutet auf eine indirekte, von der zytoplasmatischen Domäne unabhängige Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett hin.

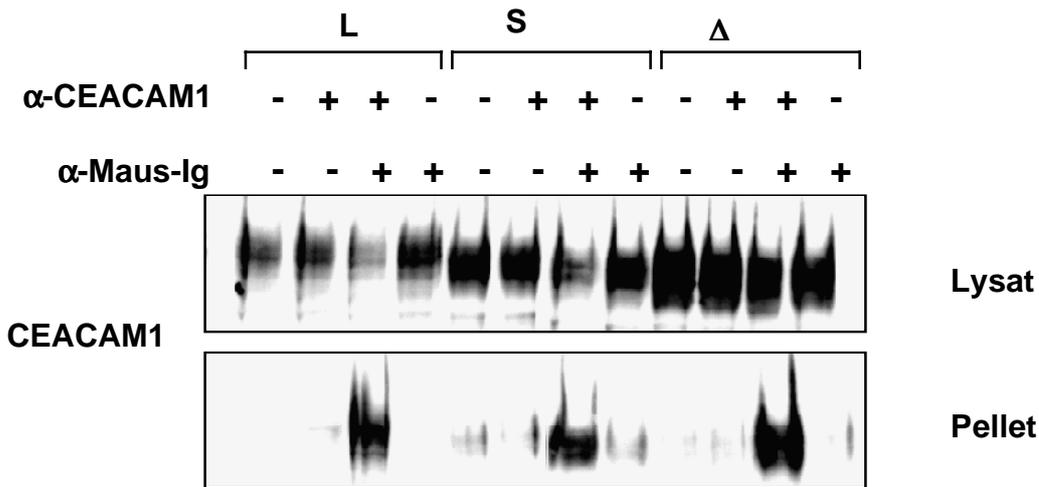


Abbildung 28: Die Rolle der zytoplasmatischen Domäne bei der Interaktion des CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett.

CHO-CEACAM1-4L- (L), CHO-CEACAM1-4S- (S) und CHO-CEACAM1-4ΔC- (ΔC) exprimierende CHO-Zellen wurden mit Antikörpern stimuliert, wie angezeigt und die Verteilung von CEACAM1 zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion im Immunblot untersucht.

2.5.4. Interaktion von CEACAM1-L und Aktin in Detergens-resistenten Strukturen an Zellkontakten in Rattenhirn-Endothel-Zellen

Die Lokalisation von CEACAM1 in Barbe-Rattenhirnendothelzellen wurde durch konfokale Laser-scanning-Mikroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurden CEACAM1-L, CEACAM1-S und CEACAM1-ΔC stabil in den Zellen exprimiert (Abb. 29).

Trotz vergleichbarer Expression der CEACAM1-Isoformen auf den Zellen fanden sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Detergens-Resistenz und die Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett. CEACAM1-L war auf der gesamten Zelloberfläche nachweisbar, eine besonders hohe Konzentration fand sich aber häufig an den Kontaktstellen zwischen den Zellen. Durch Extraktion der Zellen mit 0,1% Triton X-100 vor der Fixierung wurde das meiste CEACAM1-L entfernt, lediglich an den Zellkontakten blieb es erhalten. Speziell in diesen Detergens-resistenten Strukturen wurde auch eine Kolo-kalisation mit F-Aktin gefunden (Abb. 30). Die CEACAM1-Isoformen mit verkürzter oder fehlender zytoplasmatischer Domäne waren in diesem System deutlich sensitiver gegenüber der

Detergensbehandlung. Sowohl die Permeabilisierung der fixierten Zellen (mit 0,5% Triton X-100, Abb. 31) als auch die Extraktion der nicht fixierten Zellen (mit 0,1% Triton X-100, nicht gezeigt) bewirkten die nahezu vollständige Entfernung des CEACAM1 aus den Zellen.

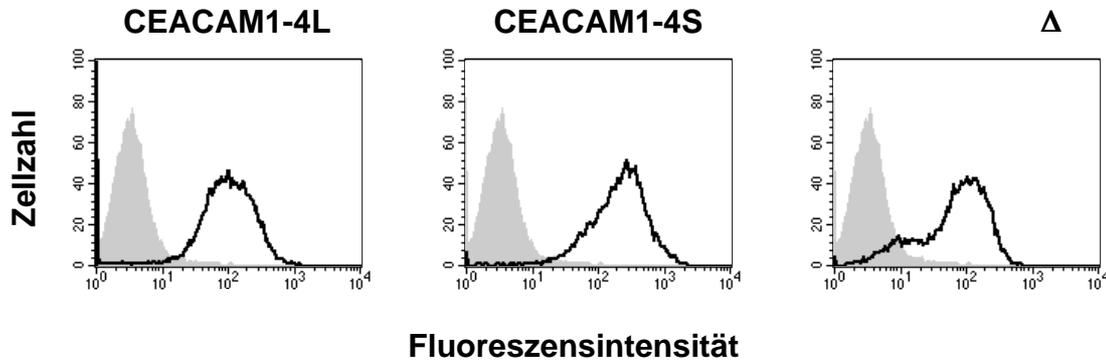


Abbildung 29: Darstellung der Oberflächen-Expression von CEACAM1-Varianten in Barbe-Endothelzellen

Die Expression von CEACAM1- Isoformen auf Barbe-Rattenhirnendothelzellen wurde durch FACS-Analysen nach Markierung mit polyklonalem α -CC1-Serum und einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper untersucht (schwarze Linien). Untransfizierte Barbe-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet (graue Flächen)

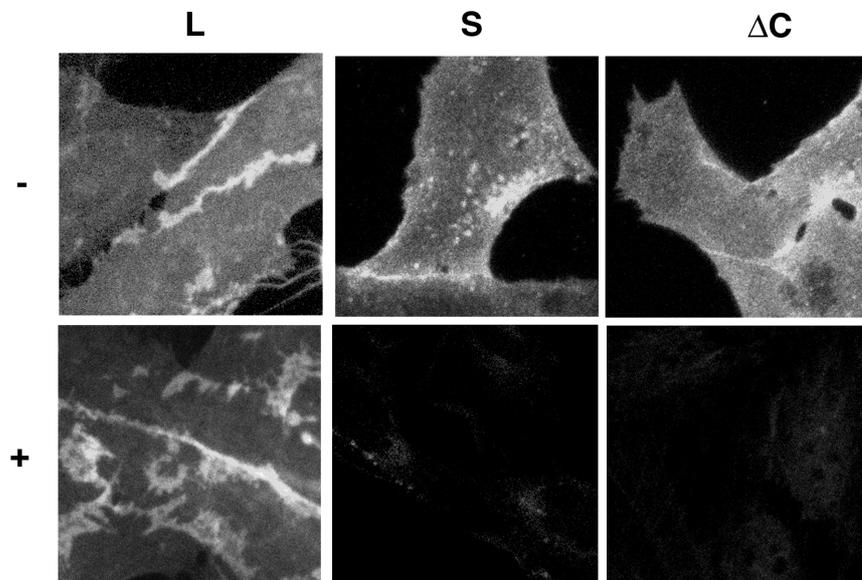


Abbildung 31: Unterschiedliche Extrahierbarkeit der CEACAM1-Isoformen in Barbe-Endothelzellen.

CHO-CEACAM1-4L- (L), CHO-CEACAM1-4S- (S) und CHO-CEACAM1-4 Δ C- (Δ C) exprimierende Barbe-Zellen wurden fixiert und permeabilisiert (+) oder nicht (-). CEACAM1 wurde gefärbt wie oben.

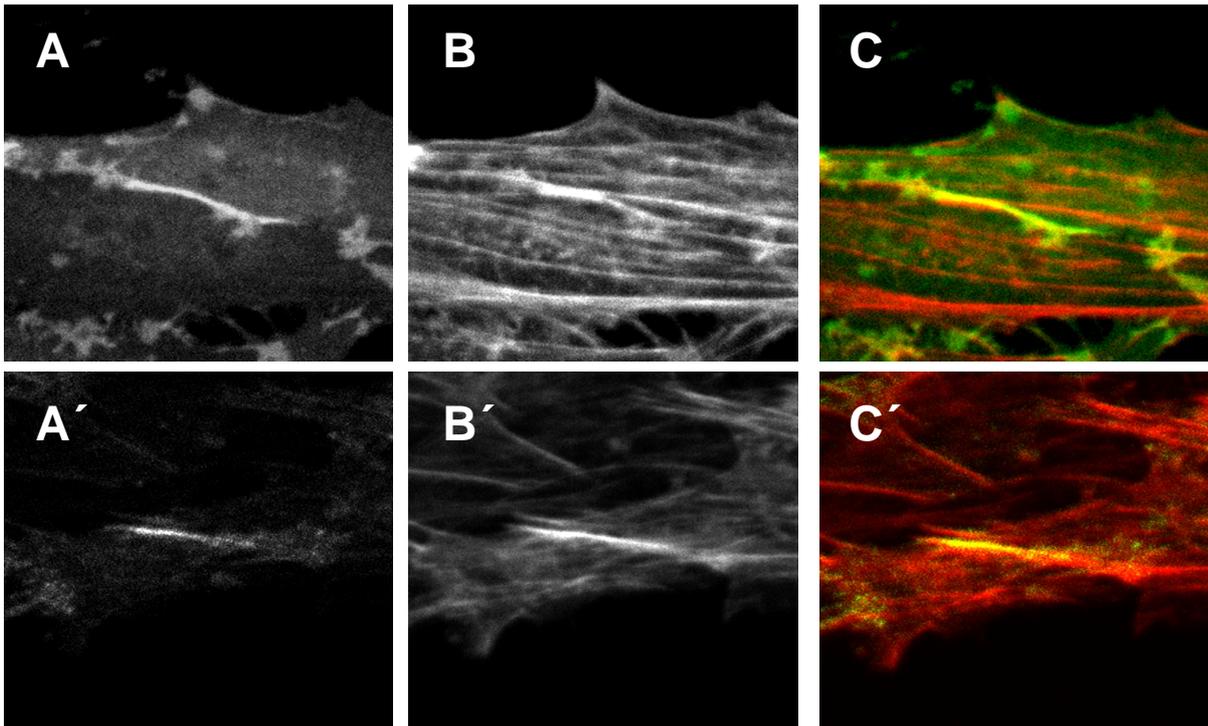


Abbildung 30: Darstellung der Kolo-kalisation zwischen CEACAM1-4L und Aktin in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfluente, CEACAM1-4L-exprimierende Barbe-Zellen wurden fixiert und permeabilisiert (A-C). Die Zellen in A'-C' wurden vor dem Fixieren mit 0,1% Triton X-100 extrahiert. CEACAM1 wurde mit polyklonalem anti-CEACAM1 und FITC-markiertem Sekundärantikörper gefärbt (A, A', C, C'). F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert (B, B', C, C'). In der Überlagerung der Einzelbilder zeigt Gelbfärbung die Kolo-kalisation von CEACAM1 und F-Aktin (C+C').

2.6. Funktionelle Hierarchie der Cluster-induzierten Effekte am CEACAM1

Die Veränderung der makromolekularen Organisation des CEACAM1 hat, wie gezeigt, zwei Auswirkungen direkt am CEACAM1-Molekül: sie bewirkt seine Tyrosin-Dephosphorylierung, und die Bindung an das Aktin-Zytoskelett. Um zu klären, ob eine gegenseitige Beeinflussung zwischen diesen beiden Effekten vorliegt, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt: Der Einfluß der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung auf die Bindung an das Zytoskelett wurde durch Expression (Abb. 32) und Stimulation von CEACAM1-Mutanten in CHO-Zellen untersucht.

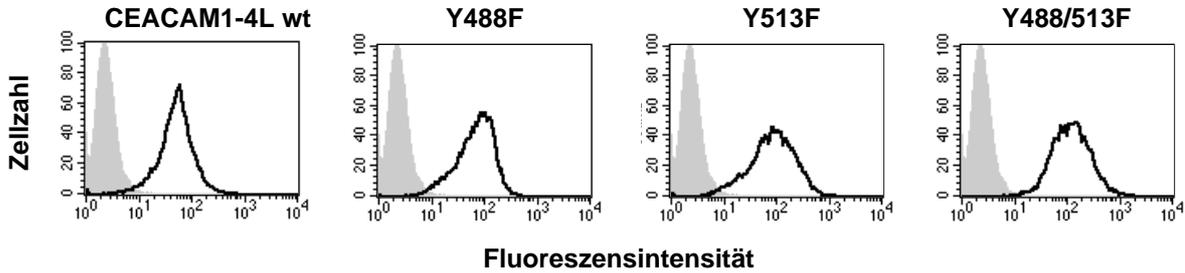


Abbildung 32: Darstellung der Oberflächen-Expression von CEACAM1-Mutanten in CHO-Zellen

CEACAM1-4L und Punktmutanten der Tyrosine wurden stabil in CHO-Zellen exprimiert. Die CEACAM1-Expression wurde durch FACS-Analysen von nicht permeabilisierte Zellen überprüft.

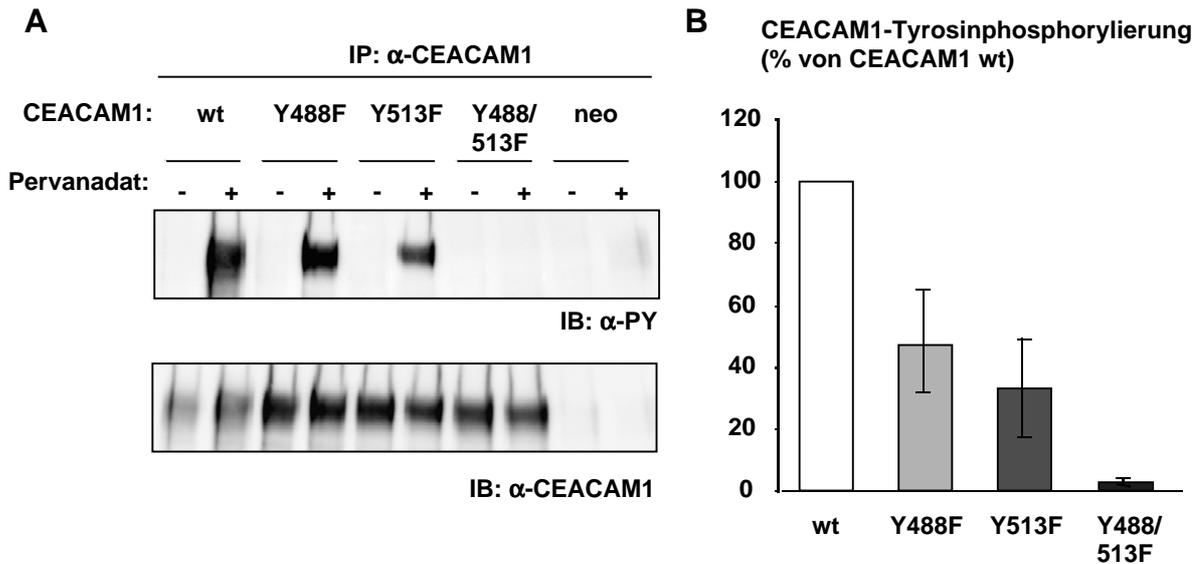


Abbildung 33: Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1- Mutanten in CHO-Zellen.

A: CEACAM1 (Wildtyp (wt) und Mutanten der Tyrosinreste) wurde aus unbehandelten bzw. mit Pervanadat behandelten CHO-Zellen immunpräzipitiert und im Immunblot auf Phosphotyrosin und CEACAM1 untersucht. Mit Leervektor transfizierte CHO-Zellen (neo) wurden als Negativkontrolle verwendet. **B:** Quantifizierung der relativen CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung.

Der Austausch der Tyrosinreste 488 und 513, sowohl einzeln als auch in Kombination, gegen Phenylalanin hatte keinen Einfluß auf die Menge des Detergens-unlöslichen CEACAM1.

Auch die Doppelmutante, bei der keine Tyrosinphosphorylierung mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 33), reagierte wie der Wildtyp (Abb. 34). Daraus folgt, dass die Bindung von CEACAM1 an das Aktin-Zytoskelett nicht durch seine Tyrosinphosphorylierung reguliert wird. Dagegen konnte ein Einfluß des Aktin-Zytoskeletts auf die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden. Die Vorinkubation mit Cytochalasin D und Latrunculin A bewirkte die Aufhebung der Cluster-induzierten CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 35). CEACAM1 war unter diesen Bedingungen konstitutiv geringer tyrosinphosphoryliert, die Stimulation bewirkte aber keine weitere Änderung des Phosphorylierungsgrades. Hieraus folgt, dass ein intaktes Aktin-Zytoskelett für die Regulation der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung von Bedeutung ist.

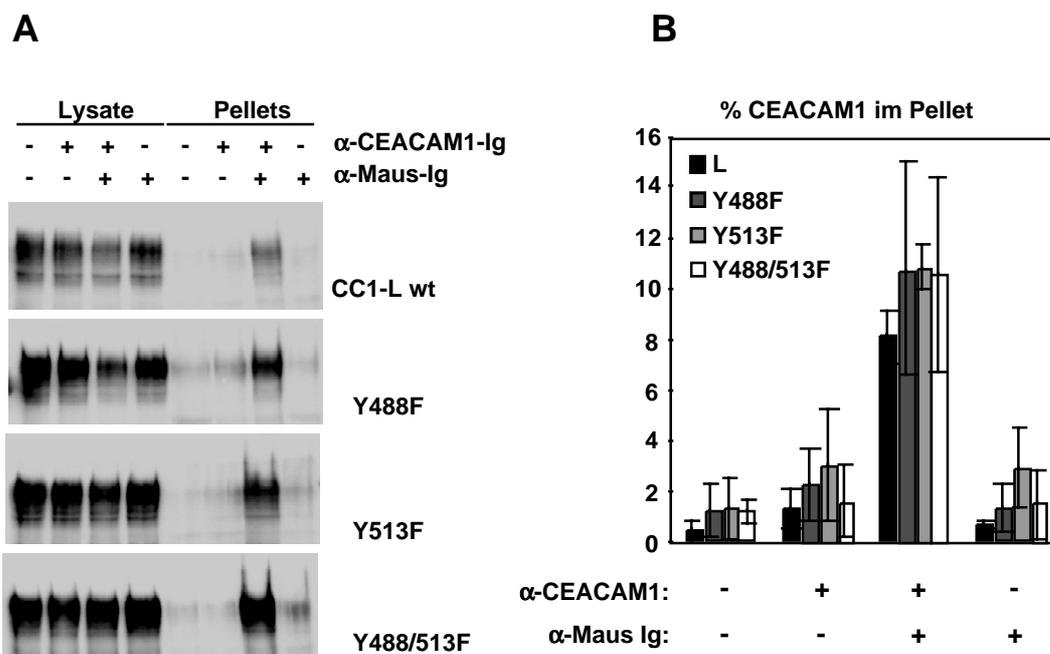


Abbildung 34: Die Interaktion von CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett hängt nicht von der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung ab.

A: CHO-CEACAM1-4L-Wildtyp (CC1-L wt) und die Punktmutanten der Tyrosine wurden in CHO-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern stimuliert wie angezeigt und die Verteilung von CEACAM1 zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion im anti-CEACAM1-Imunoblot untersucht. **B:** Quantifizierung.

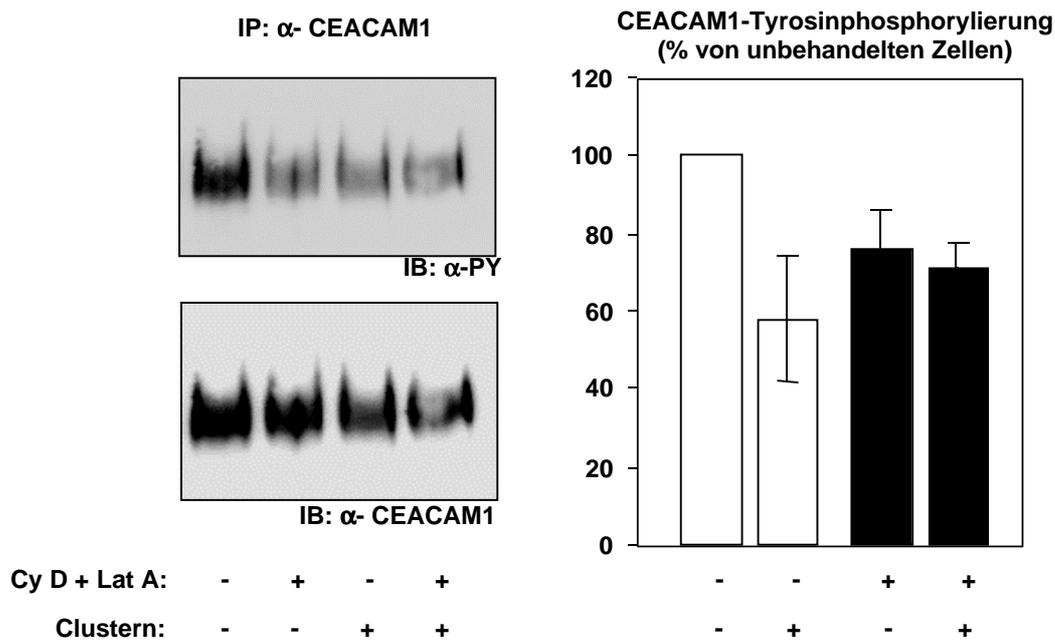


Abbildung 35: Der Zustand des Aktin-Zytoskeletts reguliert die CEACAM-Tyrosinphosphorylierung.

A: PC12-Zellen wurden mit Cytochalasin D und Latrunculin A vorbehandelt und durch CEACAM1-Clustern stimuliert, wie angezeigt. CEACAM1 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin- (α -PY) und anti-CEACAM1-Antikörpern nachgewiesen. **B:** Quantifizierung der relativen CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung.

2.7. Einfluß der neuronalen Differenzierung der PC12-Zellen auf die CEACAM1-Stimulation

Die Ausprägung des neuronalen Phänotyps bewirkte eine veränderte Reaktion von CEACAM1 auf die Stimulation mit Antikörpern. Die durch Quervernetzen induzierte Bindung an das Aktin-Zytoskelett war in differenzierten gegenüber unbehandelten Zellen mehr als doppelt so hoch. Fehlte jedoch der spezielle Stimulus, so war CEACAM1 auch in differenzierten Zellen vollständig löslich (Abb. 36). Die Differenzierung der PC12-Zellen verhinderte dagegen die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung durch makromolekulare Reorganisation (Abb. 37). Das konstitutive Niveau der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung entsprach in differenzierten Zellen etwa dem dephosphorylierten Zustand in nicht

differenzierten Zellen und wurde durch Stimulation nicht weiter gesenkt. Die Oberflächenexpression und die Bildung der CEACAM1-Cluster nach Antikörpergabe wurden durch die Differenzierung nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

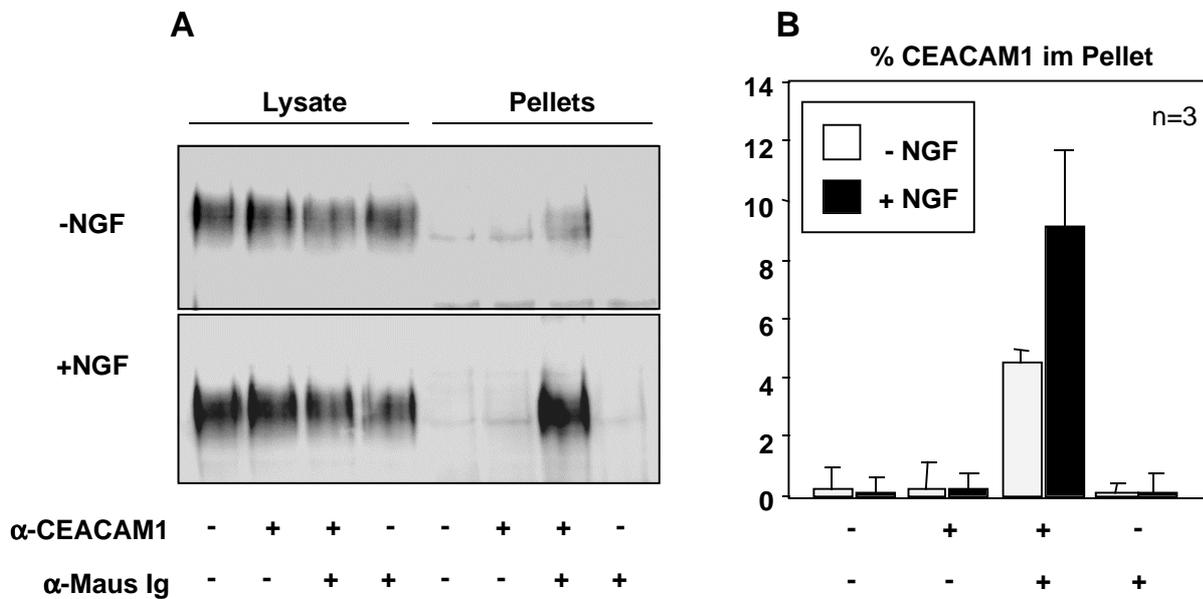


Abbildung 36: Einfluß der neuronalen Differenzierung auf die Interaktion von CEACAM1 mit dem Aktin-Zytoskelett

A: PC12-Zellen wurden für 72 h mit oder ohne den neuronalen Wachstumsfaktor NGF kultiviert und dann mit Antikörpern stimuliert. Die Verteilung von CEACAM1 zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion wurde im anti-CEACAM1-Imunoblot untersucht. **B:** Quantifizierung.

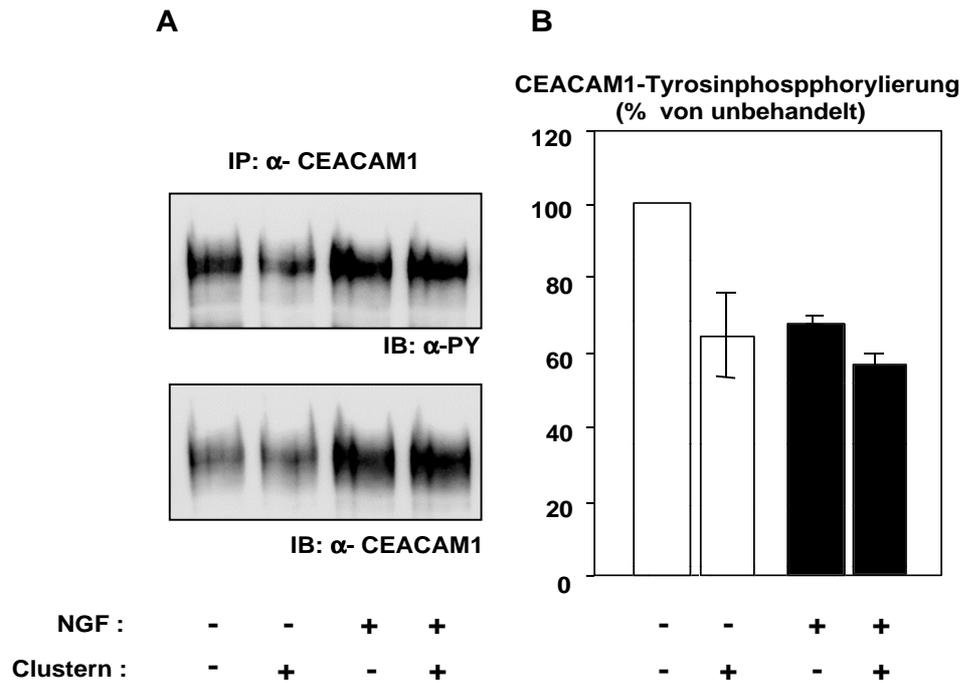


Abbildung 37: Einfluß der neuronalen Differenzierung auf die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung

A: PC12-Zellen wurden für 72 h mit oder ohne den neuronalen Wachstumsfaktor NGF kultiviert und dann mit Antikörpern stimuliert. CEACAM1 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert und im Immunblot mit anti-Phosphotyrosin- (α -PY) und anti-CEACAM1-Antikörpern nachgewiesen. **B:** Quantifizierung der relativen CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung.