

Aus der Abteilung für Klinische Chemie der Medizinischen Klinik
der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Christoph Wagener

**Untersuchungen zur Interaktion von
rekombinantem CGM1a mit Tyrosinkinasen der
SRC-Familie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Stefanie Ganzer

aus Helmstedt

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:

Referent:

Korreferent:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die CEA-Familie.....	1
1.2	Das CD66-Cluster.....	3
1.3	CGM1.....	6
1.4	Die Kinasen der SRC-Familie.....	12
1.5	Ziel und Fragestellung.....	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Chemikalien.....	17
2.1.2	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	18
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.4	Geräte.....	24
2.1.5	Bakterien, Plasmide, Nukleinsäuren und Enzyme.....	25
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1.1	Granulozytenisolierung aus Buffy-Coats.....	25
2.2.1.2	RNA-Isolierung aus Granulozyten und anschließende Konzentrationsbestimmung.....	26
2.2.1.3	Chemische Synthese von Oligonukleotiden.....	27
2.2.1.4	Reverse-Transkriptions-PCR.....	27
2.2.1.5	„Nested PCR“.....	29
2.2.1.6	DNA-Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion.....	30
2.2.1.7	Southern Blot.....	31

2.2.1.8	Markierung von Oligonukleotiden.....	32
2.2.1.9	Hybridisierung mit Oligonukleotiden.....	33
2.2.1.10	Restriktionsanalysen von DNA.....	33
2.2.1.11	Herstellung kompetenter Bakterien.....	34
2.2.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.1.13	Transformation von Bakterien.....	35
2.2.1.14	Colony-Screening.....	36
2.2.1.15	Plasmid-Gewinnung.....	37
2.2.1.16	Sequenzierungen.....	37
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	38
2.2.2.1	Proteinexpression.....	38
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page).....	39
2.2.2.3	Proteinfärbungen.....	40
2.2.2.4	Aufreinigung von Proteinen.....	40
2.2.2.5	Phosphorylierungen mit Kinasen der Src-Familie.....	41
2.2.2.6	Bindung von SH2-Domänen an phosphoryliertes CGM1a-ZYT.....	42
2.2.2.7	Western Blot und Chemilumineszenz.....	43
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Amplifikation der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a.....	46
3.2	Klonierung von rekombinatem CGM1a-ZYT in E. coli.....	49
3.3	Expression der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a in E.coli SG13009.....	51
3.4	Aufreinigung der rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a.....	52
3.5	Phosphorylierung der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a durch Kinasen der SRC-Familie.....	52
3.6	Aktivierung der SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a.....	54

3.7	Bindung von SH2-Domänen an die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a.....	55
4.	Diskussion.....	57
5.	Zusammenfassung.....	71
6.	Literaturverzeichnis.....	72
7.	Abkürzungen.....	85
8.	Anhang.....	87

1. Einleitung

1.1 Die CEA-Familie

Die CEA-Familie besteht aus einer Gruppe hochhomologer Proteine, die in den verschiedensten Geweben des menschlichen Körpers zu finden sind. Aufgrund struktureller Merkmale, die den konstanten und variablen Immunglobulin-Domänen ähneln, wird die CEA-Familie als eine Untergruppe der Immunglobulin-Familie angesehen. Von den Mitgliedern der Immunglobulin-Familie ist bekannt, daß sie vielfältige Aufgaben im Rahmen immunologischer und intrazellulärer Erkennungsprozesse besitzen (Paxton et al. 1987, Thompson et al. 1989).

Der Begriff „CEA-Familie“ geht zurück auf die Entdeckung des „Carcinoembrionalen Antigens“ (CEA) in den 60er Jahren als „tumorspezifisches Antigen des menschlichen Gastrointestinaltraktes“ (Gold et al. 1965). Ursprünglich fand man CEA in Kolonkarzinomen und verschiedenen Geweben fetalen Ursprungs, heutzutage wird es in der Praxis als Tumormarker für z.B. das Kolonkarzinom benutzt (Shively et al. 1985).

Seit den 60er Jahren wurden im menschlichen Organismus verschiedene, dem CEA eng verwandte Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 20 000 und 200 000 Dalton gefunden, die in der CEA-Familie zusammengefaßt werden (Thompson et al. 1988). Nach bisherigen Erkenntnissen werden die Proteine dieser Familie durch insgesamt 18 hochhomologe Gene, die alle auf dem langen Arm von Chromosom 19 lokalisiert sind, kodiert (Kamarck et al. 1987, Zimmermann et al. 1988, Barnett et al. 1989, Niemann et al. 1989, Willocks et al. 1989, Streydio et al. 1990, Thompson et al. 1990, Bandriff et al. 1992).

Die den Genen der CEA-Familie zugehörigen Proteine lassen sich entsprechend Abb. 1-1 in zwei Subgruppen aufteilen, nämlich zum einen in Proteine, die sezerniert werden, den „Pregnancy Specific Glycoproteins“ (PSG) und zum anderen in eine Gruppe, die hauptsächlich aus Membranproteinen und nur in einem geringeren Anteil auch aus löslichen Proteinen besteht (Barnett et al. 1990). Die Mitglieder einer Subgruppe sind sowohl auf Basis der Nukleotid- als auch der Aminosäuresequenz hochhomolog. Heterogenität innerhalb einer Gruppe entsteht vor

allem durch alternative Splice-Vorgänge oder unterschiedliche Glykosylierungen einiger Mitglieder (Thompson et al. 1991).

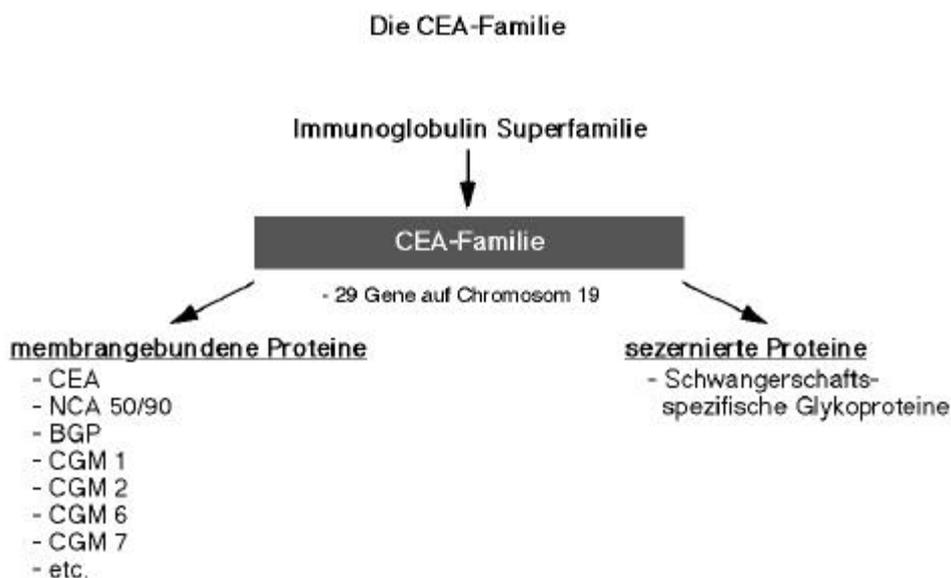


Abbildung 1-1

Die Untergruppe der „Pregnancy Specific Glycoproteins“ umfaßt mindestens elf Gene (Thompson et al. 1991, Khan et al. 1992), die entsprechenden Proteine werden von der Plazenta während der Schwangerschaft gebildet.

Die zweite Subgruppe der CEA-Familie, die Gruppe der Membranproteine, besteht aus CEA (Zimmermann et al. 1987, Oikawa et al. 1987, Beauchemin et al. 1987), NCA-50/90 (Non-Cross-reacting-Antigen 50/90) (Neumaier et al. 1988), BGP (Biliary Glycoprotein) (Hinoda et al. 1988, Barnett et al. 1989), CGM1 (CEA-Gene-family-Member) (Thompson et al. 1989), CGM2 (Thompson et al. 1989), CGM6 (Arakawa et al. 1990, Berling et al. 1990) und CGM7 (Thompson et al. 1992). Eine mögliche gemeinsame Funktion dieser Proteine ist noch unbekannt, es gibt jedoch Hinweise, daß sie eine Rolle bei Zelladhäsionsvorgängen spielen. So konnte für CEA, NCA-50/90, BGP und CGM1 *in-vitro* gezeigt werden, daß sie homophile bzw. heterophile Zelladhäsion vermitteln (Benchimol et al. 1989, Oikawa et al. 1989, 1991, Rojas et al. 1990, Zhou et al. 1990, Kuijpers et al. 1992). Für BGP wird eine Tumor-Suppressor-Funktion angenommen, da es in Kolon-Karzinomen stark herunterreguliert ist und

nach Reexpression das Tumorstadium hemmt (Neumaier et al. 1993, Thompson et al. 1994, Hsieh et al. 1995).

Aufgrund ihrer Rolle als Zelladhäsionsmoleküle werden die Proteine der CEA-Familie in einer neuen Nomenklatur als CEACAM (CEA-Cell-Adhesion-Molecule) bezeichnet und entsprechend durchnummeriert (bisher unveröffentlicht). In Abb. 1-2 ist die neue Nomenklatur für die oben beschriebene Subgruppe der Membranproteine aufgeführt. In dieser Arbeit wird jedoch im weiteren Verlauf die alte Bezeichnung verwendet.

<u>alte Nomenklatur</u>	<u>neue Nomenklatur</u>
BGP	CEACAM1
CGM1	CEACAM3
CGM7	CEACAM4
CEA	CEACAM5
NCA	CEACAM6
CGM2	CEACAM7
CGM6	CEACAM8

Abbildung 1-2

Proteine der CEA-Familie, die mit einem definierten Panel von Antikörpern auf Granulozyten detektierbar sind, werden als CD66-Cluster bezeichnet. Eine Ausnahme bilden CEA und PSG1, die nicht auf Granulozyten exprimiert werden, jedoch trotzdem dem CD66-Cluster angehören.

1.2. Das CD66-Cluster

Leukozyten exprimieren viele verschiedene Moleküle oder "Marker" auf ihrer Oberfläche, die zur Unterscheidung von Zellpopulationen dienen. Viele diese Moleküle können durch spezifische monoklonale Antikörper identifiziert werden. Für die Zelloberflächenmarker wurde eine systematische Nomenklatur entwickelt, das CD-System, in welchem die Marker fortlaufend als CD1, CD2 usw. nummeriert werden. CD steht für "Cluster of Differentiation" und bezeichnet Gruppen (engl.: cluster) von monoklonalen Antikörpern, wobei jeder Cluster ganz spezifisch eine bestimmte Gruppe von Zellmarkern bindet. Monoklonale Antikörper mit

ähnlicher Spezifität sind in einer gemeinsamen CD-Nummer zusammengefaßt. Die Nummerierung der Antikörper wird gleichzeitig auch zur Bezeichnung der entsprechenden Oberflächenmoleküle verwendet.

Einige Mitglieder der CEA-Familie entsprechen Antigenen auf aktivierten Granulozyten, die durch ein solches Panel von Antikörpern erkannt werden, nämlich durch CD66 monoklonale Antikörper (Watt et al. 1991). Bemerkenswert ist, daß diese Proteine eine erhöhte Oberflächenexpression nach Stimulation der Granulozyten aufweisen, weswegen die Vermutung aufgestellt wurde, daß sie eine bedeutende Funktion für Granulozyten besitzen (Ducker et al. 1992).

Granulozyten stellen ungefähr 60-70% der Blutleukozyten dar. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der akuten Entzündung in der Abwehr von Mikroorganismen. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose (Roitt et al. 1995). Die vermutete Bedeutung der CD66-Proteine innerhalb dieses Prozesses liegt wahrscheinlich in der Vermittlung von Zell-Zelladhäsionen (Skubitz et al. 1997).

Zu dem CD66-Cluster gehören CD66a (BGP), CD66b (CGM6), CD66c (NCA), CD66d (CGM1), CD66e (CEA) und CD66f (PSG1) (Skubitz et al. 1992, Daniel et al. 1993, Watt et al. 1994, Skubitz et al. 1997). CD66e und CD66f werden als einzige dieser Proteine nicht auf Granulozyten exprimiert, zeigen aber Kreuzreaktionen mit mehreren der monoklonalen CD66-Antikörper (Grunert et al. 1994, Skubitz et al. 1997), so daß man sie ebenfalls zum CD66-Cluster zählt.

Während man CD66a, c und e in vielen anderen epithelialen und hämatopoetischen Zellen gefunden hat, wurde CD66d bisher mit Hilfe monoklonaler Antikörper nur auf Granulozyten detektiert (Kuroki et al. 1991, Nagel et al. 1993). Auch bei der Untersuchung von 63 gynäkologischen und zwölf zerebralen Tumoren (Thompson et al. 1993) sowie in 62 Fällen von Akuter Lymphatischer Leukämie (Hananberg et al. 1994) wurde kein entsprechendes Transkriptionsprodukt gefunden, so daß man gegenwärtig davon ausgeht, daß es sich bei CD66d im Gegensatz zu den anderen Proteinen des CD66-Clusters um ein Granulozyten-spezifisches Protein handelt (Nagel et al. 1993).

BGPb etc) (Thompson et al. 1991). Für CD66a hat man bisher acht (BGPa-h), für CD66d drei (CGM1a-c) verschiedene Splice-Varianten gefunden. Man vermutet, daß durch die verschiedenen Splice-Varianten auch verschiedene Signalwege beschritten werden können und sie somit eine wichtige Rolle bei der biochemischen Regulation spielen (Watt et al. 1994). Auf die genaue Struktur der drei CD66d-Proteine soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

1.3 CGM1

CGM1 ist das kleinste Protein des CD66-Clusters. Das zugehörige Gen umspannt eine Region von ca. 15 Kilobasen auf Chromosom 19 (Nagel et al. 1993). Dort liegt es zwischen anderen Genen der CEA-Familie in der folgenden Reihenfolge: CGM7-CEA-NCA-CGM1-BGP-CGM9-CGM8-PSG (Tynan et al. 1992, Thompson et al. 1992).

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, wurden drei CGM1-Genprodukte gefunden, die durch alternative Splice-Vorgänge entstehen. CGM1a, b und c sind in Abb. 1-4 dargestellt und sollen im folgenden genauer besprochen werden.

Struktur der verschiedenen CGM1-Proteine

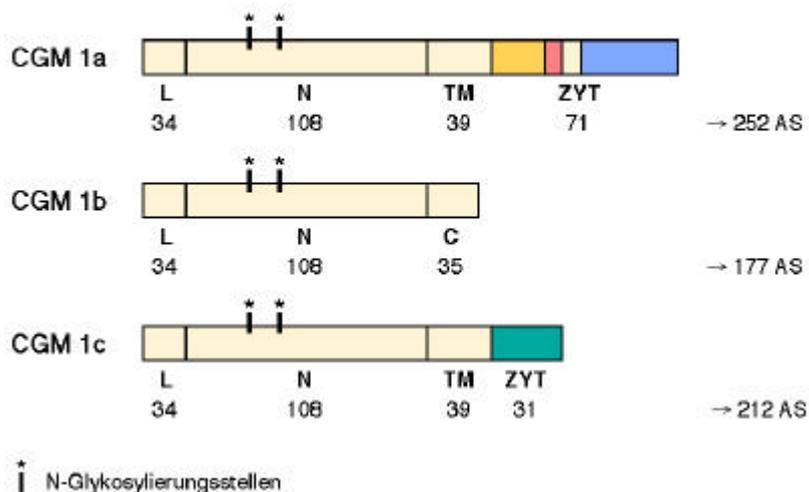


Abbildung 1-4

(L = Leader-Peptid, N = N-terminale Domäne, TM = Transmembran-Öse Domäne, ZYT = Zytoplasmatische Domäne)

Die cDNA von CGM1a umfaßt insgesamt 1127 bp. Sie besteht aus einer 54 bp 5' nichtkodierenden Region, einem 756 bp offenen Leserahmen und einer 317 bp 3' nichttranslatierten Region (Nagel et al. 1993). Die gesamte Sequenz ist im Anhang aufgeführt. Diese cDNA kodiert für ein Protein, das aus 252 Aminosäuren besteht und mit einem beschriebenen Molekulargewicht zwischen ca. 28 und 35 kDa das größte CGM1-Protein bildet (Nagel et al. 1993, Kuroki et al. 1991). Die 252 Aminosäuren verteilen sich auf die einzelnen Domänen des CGM1a wie folgt: 34 AS Leader-Peptid, 108 AS IgV-Domäne, 39 AS transmembranöse Domäne, 71 AS zytoplasmatische Domäne. Letztere setzt sich aus vier Exons zusammen.

Die CGM1b cDNA besteht aus 990 bp und kodiert für ein Protein mit einem beschriebenen Molekulargewicht von ca. 28 kDa (Kuroki et al. 1991). Dieses Protein besteht ebenfalls aus einem Leader-Peptid und einer N-terminalen Domäne, im Unterschied zum CGM1a fehlen jedoch die transmembranöse und zytoplasmatische Domäne. Statt dessen besitzt es eine andere C-terminale Domäne, die sich aus einem Teil der IgC-artigen Domäne und aus Sequenzen, die vom Downstream-Intron kodiert werden, zusammensetzt (Kuroki et al. 1991). Die IgC-Anteile entstammen wahrscheinlich einem anderen Exon, das durch alternatives Splicen in die mRNA eingefügt wird. Der beschriebene Aufbau legt die Vermutung nahe, daß es sich bei CGM1b um ein Protein handelt, das sezerniert wird.

Die cDNA von CGM1c umfaßt 1022 bp und kodiert für ein Protein von ca. 23 kDa (Nagel et al. 1993). Dieses stimmt in seinem extrazellulären Anteil mit dem des CGM1a überein, besitzt im Unterschied zu diesem jedoch eine kürzere zytoplasmatische Domäne (CGM1a: 71 AS, CGM1c: 31 AS), die auch eine andere Aminosäuresequenz aufweist. Die Ursache hierfür liegt in einer 53 bp-Deletion im ersten Exon der zytoplasmatischen Domäne, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Dadurch wird gleichzeitig auch ein neues, früheres Stopkodon kreiert. Eine zweite Deletion von 52 bp liegt direkt 3'-terminal zu diesem Stopkodon und bleibt somit ohne Einfluß auf die Aminosäuresequenz .

In den Beschreibungen der cDNAs für CGM1 hat man wiederkehrend vier Nukleotid-Differenzen gefunden, so daß davon ausgegangen wird, daß das CGM1-Gen in verschiedenen Allelen existiert (Nagel et al. 1993). Drei der vier Basenaustausche haben für CGM1a auch eine

zu Prolin anstatt Serin, die Austausche von T zu A und C zu T an Position 697 und 703 resultieren in einem Austausch von Histidin für Leucin bzw. Leucin für Prolin. Der vierte keine Auswirkung auf die Proteinsequenz.

Über die Funktion der CGM1-Proteine ist noch wenig bekannt. Hinweise lassen sich allerdings CGM1-Proteine befinden sich zwei konservierte Stellen für N-Glykosylierungen (Kuroki et al. 1991). Für andere Mitglieder des CD66-Clusters wurde gezeigt, daß es durch diese Stellen zu einer über Sialyl-Le^x-Oligosaccharid-Reste vermittelten Bindung an E-Selektin auf aktiviertem Endothel kommt (Stocks et al. 1990, Kuijpers et al. 1992). CGM1 könnte also eine Rolle bei Zelladhäsionsvorgängen spielen. Tatsächlich haben Untersuchungen gezeigt, daß Maus-CGM1a ein Ca²⁺-unabhängiges Zelladhäsionsmolekül (CAM) *in-vitro* ist (McCuaig et al. 1992).

Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Splice-Vorgänge auf RNA-Ebene zu Sequenzänderungen in den zytoplasmatischen Domänen von CGM1a und c. Diese führen auf Proteinebene zu verschiedenen Phosphorylierungsstellen für Kinasen. Kinasen sind Enzyme, die Aminosäuren phosphorylieren und auf diese Weise eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Regulationsvorgängen spielen.

Hauptsächlich werden in Zellen Serin- und Threoninreste phosphoryliert. Dieses Geschehen dient der Stoffwechselsteuerung. In sehr geringem Umfang werden auch Tyrosinreste durch Tyrosinkinase phosphoryliert. Diesen Tyrosinkinase und ihren Substraten kommt ein zentraler Stellenwert im Rahmen der Regulation von Wachstumsprozessen, morphogenetischen Programmen, aber auch der malignen Transformation zu. Damit Aminosäurereste durch Kinasen phosphoryliert werden können, müssen sie in einer für die jeweilige Kinase spezifischen Konsensussequenz liegen.

Beim Vergleich der Sequenzen der zytoplasmatischen Domänen der CGM1-Proteine stellt man fest, daß sowohl CGM1a als auch CGM1c ein Threonin (Thr 179) in einem Konsensusmotiv

für Proteinkinase C besitzen. Im Gegensatz zu CGM1c besitzt CGM1a zusätzlich noch ein Motiv für Caseinkinase II (Ser 228) und zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für Tyrosinkinasen (Tyr 230 und Tyr 241). Letztere liegen in einer Sequenz, die ein gutes Konsensusmotiv für eine bestimmte Familie von Tyrosinkinasen, den Kinasen der SRC-Familie, darstellt. Die Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a (im „one-letter“ Aminosäurecode) mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen und die entsprechenden Konsensusmotive der Kinasen (Songyang et al. 1995) sind in Abb. 1-5 dargestellt.

Erkennungsmotive für Proteinkinasen in der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

Zytoplasmatische Domäne von CGM1a:



- Proteinkinase C (PKC): (S,T) x (R,K)
- Caseinkinase II (CKII): (S,T) xx (D,E)
- Kinasen der SRC-Familie (SRC): D,E, hydrophil, hydrophob, Y, hydrophil, hydrophil, hydrophob

Abbildung 1-5

Die beiden Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne des CGM1a liegen in folgendem Motiv: YX₂LX₇YX₂M. Dieses ähnelt dem YX₂LX₅₋₁₂YX₂₋₃L/I-Motiv (kurz YLYL), dem sogenannten „ITAM“ (Immunoreceptor-Tyrosine-based-Activation-Motif), das man in verschiedenen Immunrezeptoren gefunden hat (Sunder-Plassmann et al. 1997). Von einigen Rezeptoren, wie zum Beispiel den verschiedenen Typen von Rezeptoren für den Fc-Anteil des IgG (Fc_γRs),

weiß man, daß die Aktivierung dieses ITAMs eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, an deren Ende es zur Aktin-Polymerisation und Phagozytose kommt (Greenberg 1995).

Tatsächlich haben neueste Untersuchungen ergeben, daß CGM1a eine Rolle bei Internalisierungs-Vorgängen von Granulozyten spielen könnte. Es wurde gezeigt, daß bestimmte Membranproteine von Neisserien, die sogenannten "Opacity-Associated Outer Membrane Proteins" (Opa-Proteine) an einige CD66-Antigene, unter anderem auch CGM1a, binden und über diese Bindung von CD66-transfizierten Zelllinien internalisiert werden.

Die Bakterienfamilie der Neisseriaceae umfaßt sowohl apathogene Stämme, die zur normalen Flora des Menschen gehören, als auch die beiden humanpathogenen Spezies *Neisseria gonorrhoeae*, den Erreger der Gonorrhoe, und *Neisseria meningitidis*, einen häufigen Erreger von Meningitiden. Neisserien sind typische Schleimhautparasiten, die außerhalb des menschlichen Organismus schnell absterben. So erfolgt eine Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae*, indem sich die Erreger über Haftpili sowie den bereits genannten Opa-Proteinen an spezifische Rezeptoren der Urogenitalmukosa heften und hierdurch durch die Mukosa geschleust werden. Im darunterliegenden Gewebe rufen sie dann eine akute, eitrige Entzündung hervor.

Neuere Arbeiten zeigen nun einen anderen Mechanismus, über den *Neisseria gonorrhoeae* internalisiert werden kann. Wie bereits erwähnt, wurde nachgewiesen, daß die Bakterien über verschiedene Opa-Proteine an Mitglieder des CD66-Clusters binden und über diese Bindung von CD66-transfizierten HeLa-Zellen aufgenommen werden (Chen et al. 1996, Virji et al. 1996). Im einzelnen wurde gezeigt, daß Opa-Proteine an CD66a (BGP), CD66d (CGM1a), CD66c (NCA) und CD66e (CEA) binden (Gray-Owen et al. 1997). Die Erkennungsmotive für diese Bindungen liegen jeweils in der N-terminalen Domäne der CD66-Antigene (Bos et al. 1998). Es binden also verschiedene Opa-Proteine verschieden gut an die genannten vier CD66-Mitglieder. Dabei fanden Chen et al. heraus, daß CGM1a im Verhältnis zu den anderen Mitgliedern der CEA-Familie am stärksten die Internalisierung von OpaI tragenden Neisserien förderte (Chen et al. 1997).

CGM1a könnte also *in-vivo* eine bedeutende Rolle bei Zelladhäsionsvorgängen von Opa-Protein-tragenden *Neisseriae gonorrhoeae* an Phagozyten spielen und somit auch den Krankheitsverlauf der Gonorrhoe entscheidend steuern. So gibt es inzwischen Hinweise, daß durch diese Form der Internalisierung für Bakterien eine Nische entsteht, in Phagozyten aufgenommen zu werden, ohne jedoch durch diese abgetötet zu werden, wie es bei einer Opsonin-vermittelten Phagozytose der Fall wäre (Naidu et al. 1991, Hauck et al. 1997, Bos et al. 1997). Opa⁺-Bakterien könnten auf diese Weise also die Infektabwehr umgehen, länger im menschlichen Körper überleben und die Erkrankung aufrechterhalten.

Man kann nun vermuten, daß CD66-Antigene auch als Mediatoren zwischen anderen Opa-tragenden Neisserien, wie *Neisseria meningitidis*, und menschlichen Granulozyten fungieren könnten, und somit auch den Verlauf einer Meningitis beeinflussen könnten. Insgesamt gesehen handelt es sich bei dem beschriebenen Vorgang sehr wahrscheinlich jedoch nur um ein Epiphänomen anderer Funktionen des CGM1a, die noch zu klären sind.

Es stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen es über CGM1a zur beschriebenen Internalisierung kommen kann. Eine Theorie wäre, daß das oben beschriebene ITAM-Motiv eine zentrale Rolle bei einer Signalkaskade spielen könnte, die unter anderem auch die Aktivierung von Tyrosinkinasen beinhaltet würde. Dafür würde einerseits die Tatsache sprechen, daß zytoplasmatische Tyrosinkinasen mit dem ITAM assoziieren können (Keegan et al. 1992, Reth 1995) und andererseits die Erkenntnis, daß die CGM1a-vermittelte Internalisierung von Opa-positiven *Neisseriae gonorrhoeae* über einen Signalweg abläuft, der die Aktivierung von Kinasen der SRC-Familie beinhaltet (Meyer 1998, Hauck et al. 1998).

Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen CGM1a und Tyrosinkinasen der SRC-Familie ergeben sich auch aus der bereits erwiesenen Interaktion zwischen CD66a und SRC-Kinase. Wie CGM1a besitzen einige Splice-Varianten von CD66a Tyrosinreste in Konsensusmotiven für Tyrosinkinasen der SRC-Familie (Afar et al. 1992). Für eine dieser Splice-Varianten, dem BGP_a, einem humanen Homolog eines Zelladhäsionsmoleküls (CAM) der Ratte, das in verschiedenen Zellen myeloischen und epithelialen Ursprungs exprimiert wird, konnte gezeigt werden, daß es mit SRC-Kinase *in-vitro* assoziiert ist, ein Substrat der SRC-Kinase *in-vitro* darstellt und diese auch *in-vitro* aktiviert (Afar et al. 1992, Culic et al. 1992,

Brümmer et al. 1995). Gleichzeitig gibt die nachgewiesene Assoziation von CD66a, b und c mit Kinasen der SRC-Familie (Skubitz et al. 1995) Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Kinasen an Signaltransduktionswegen, die durch CGM1a vermittelt werden.

1.4 Die Familie der SRC-Kinasen

SRC-Kinase wurde erstmalig im Rous sarcoma virus, einem Virus, das in Hühnern Sarkome induziert, beschrieben (Duesburg et al. 1970). In der Folge fand man das SRC-Gen auch in normalen Hühnerzellen und stellte fest, daß subtile Veränderungen des Gens oder seiner Expression für das onkogene Potential verantwortlich sein mußten (Spector et al. 1978, Stehelin et al. 1976). Diese Entdeckungen zur SRC-Kinase bildeten die Grundlage zur Entwicklung des Onkogen-Konzeptes. Gleichzeitig war SRC-Kinase eine der ersten Kinasen, für die gezeigt wurde, daß sie spezifisch Tyrosin-Reste phosphoryliert (Hunter et al. 1980).

Inzwischen hat man verschiedene, der SRC-Kinase strukturell verwandte Kinasen gefunden, die als Familie der SRC-Kinasen zusammengefaßt werden und sich bezüglich Struktur und Gewebsverteilung voneinander unterscheiden. Die Familie der SRC-Kinasen umfaßt momentan neun Mitglieder (Bolen et al. 1992). In Abb. 1-6 sind diese Kinasen und ihre Verteilung auf verschiedene menschliche Gewebe dargestellt. Während einige Kinasen nur in speziellen hämatopoetischen Zellen vorkommen, hat man SRC-Kinase selbst in vielen Geweben gefunden (Erpel et al. 1995).

KINASEN	VORKOMMEN
SRC	verschiedene Gewebe
YES	verschiedene Gewebe
FYN	verschiedene Gewebe
LYN	verschiedene Gewebe
LCK	Lymphozyten
HCK	hämatopoetische Zellen
FGR	Monozyten, Granulozyten
BLK	B-Lymphozyten
YRK	Zentralnervensystem

Abbildung 1-6: Kinasen der SRC-Familie (nach Wagener, C. (1996). Einführung in die Molekulare Onkologie. Thieme-Verlag, 1. Aufl., S. 65)

Es handelt sich bei dieser Familie von Kinasen um eine Gruppe von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, denen transmembranöse und zytoplasmatische Domänen fehlen und die somit ausschließlich im Zellinneren lokalisiert sind. Ähnlich wie Rezeptor-Tyrosinkinasen wirken sie bei der Übertragung extrazellulärer Signale in die Zelle mit und helfen bei der Regulation von Stoffwechselfvorgängen und Zellproliferation (Erpel et al. 1995). Für SRC-Kinase wurde festgestellt, daß sie eine Rolle in der Pathogenese diverser Karzinome spielt (Hennipman et al. 1989, Ottenhoff-Kalff et al. 1992).

Am N-terminalen Ende der Kinasen befindet sich ein Myristinsäure-Rest, über den sie wahrscheinlich in der Zellmembran verankert sind. Anschließend folgt eine „spezielle Domäne“, deren Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Mitgliedern der SRC-Familie am stärksten abweicht. Es wird daher angenommen, daß diese Domäne für die speziellen Funktionen der verschiedenen SRC-Kinasen verantwortlich ist .

Weiter in Richtung des C-terminalen Endes folgen zwei Domänen, die als „SRC-Homologiedomäne“ 3 und 2 (SH3- und SH2-Domäne) bezeichnet werden. SH2- und SH3-Domänen kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Die SH2-Domäne bindet an Phosphotyrosinreste in

charakteristischen Aminosäuresequenz-Motiven (Anderson et al. 1990, Pawson et al. 1993). Dabei erkennen die SH2-Domänen verschiedener Proteine auch verschiedene Motive. Die Funktion der SH2-Domäne liegt in der festen Bindung der Kinase an das Substrat (Koch et al. 1991). Die SH3-Domäne ist hingegen wahrscheinlich primär für die lockere Assoziation der SRC-Kinasen an ihre Substrate zuständig (Cohen et al. 1995).

Weiter C-terminal folgt die katalytische Domäne (SRC-Homologiedomäne 1) der Kinasen, die zwischen den Mitgliedern der Familie am stärksten konservierte Domäne (Parsons et al. 1989). In dieser katalytischen Domäne liegt eine für die katalytische Aktivität kritische Tyrosin-Autophosphorylierungsstelle. Die letzten 15-17 Aminosäuren am C-terminalen Ende („C-tail“) beinhalten ebenfalls einen Tyrosinrest und üben eine regulatorische Funktion aus.

Wie in Abb. 1-7 gezeigt, kann der C-terminale Phosphotyrosinrest eine intramolekulare Bindung mit der SH2-Domäne eingehen. Hierdurch wird die enzymatische Aktivität der Kinase-Domäne gehemmt. Für die Aktivierung der SRC-Kinasen kommen theoretisch mindestens zwei Mechanismen in Frage. Zum einen könnte der C-terminale Phosphotyrosinrest durch eine Phosphatase dephosphoryliert werden, wozu die intramolekulare Bindung des Phosphotyrosinrests an die SH2-Domäne gelöst werden müßte. Dies könnte zum Beispiel durch Konkurrenz mit einem höheraffinen Phosphotyrosin-Peptid-Motiv anderer Phosphotyrosine geschehen. Die daraus resultierende Konformationsänderung bewirkt dann die Autophosphorylierung des Tyrosinrests der katalytischen SRC-Domäne. Eine Aktivierung der Kinasen könnte auch durch Phosphorylierung des Tyrosinrests der katalytischen Domäne durch eine andere Tyrosinkinase initiiert werden. Die Hemmung der Kinase-Aktivität erfolgt wahrscheinlich entweder durch Dephosphorylierung des Phosphotyrosins der katalytischen Domäne durch eine Phosphatase oder durch eine Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrests (Cooper et al. 1993, Liu et al. 1993, Boerner et al. 1995).

1.5. Ziel und Fragestellung

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, besitzt CGM1a Tyrosinreste in Konsensusmotiven für Kinasen der SRC-Familie. Somit wäre eine Interaktion von CGM1a mit diesen Kinasen theoretisch möglich. Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, ob eine

solche Interaktion tatsächlich stattfindet, und hierüber Aufschlüsse über eventuelle Signaltransduktionswege von CGM1a zu erlangen.

Dazu sollte in einem ersten Schritt die zytoplasmatische Domäne von CGM1a (CGM1a-ZYT) aus menschlichen Granulozyten kloniert und anschließend rekombinant als Protein bakteriell exprimiert und aufgereinigt werden.

Mit dem aufgereinigten Protein sollte untersucht werden, ob CGM1a-ZYT durch verschiedene Kinasen der SRC-Familie *in-vitro* phosphoryliert wird.

Desweiteren sollte geklärt werden, ob erstens SRC-Kinase über seine SH2-Domäne an tyrosinphosphoryliertes CGM1a-ZYT bindet und ob zweitens die postulierte Bindung spezifisch für die SRC-SH2-Domäne erfolgt.

Als letztes ergab sich die Frage, ob CGM1a-ZYT SRC-Kinase *in-vitro* aktiviert. Abschließend war zu klären, inwiefern diese Aktivierung spezifisch für SRC-Kinase selbst ist, oder ob auch andere Mitglieder der Familie der SRC-Kinasen durch CGM1a-ZYT aktiviert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	Biozym, Hameln
Ampicillin (Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Biotest, Dreieich
Bacto-Tryptone	Biotest, Dreieich
Bacto-Yeast-Extrakt	Biotest, Dreieich
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
EDTA-Na ₂ (Titrplex)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Na-Salz	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Gibco BRL, Eggenstein
Harnstoff	Gibco BRL, Eggenstein
IPTG	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Maltose	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Gibco BRL, Eggenstein
Nukleosidtriphosphate	Pharmacia/LKB, Freiburg
PBS	Gibco BRL, Eggenstein
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Quiaex	Diagen, Hilden

TEMED	Biorad, München
Tris	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Biomol, Hamburg

2.1.2 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Amp-Platten	LB-Platten + 100 µg/ml Ampicillin
Assay-Puffer (Chemilumineszenz)	7,1 mM Na ₂ CO ₃ 1,2 mM NaHCO ₃ 1,0 mM MgCl ₂ pH 9,5
Assay-Puffer (Phosphorylierung)	50 mM Hepes 0,1 mM EDTA 0,015% Brij 35
ATP-Labeling-Mix	0,25 mM dATP 50 mM MgCl ₂
Bakterielle Selektionsmedien	Ampicillin 50-100 µg/ml Tetracyclin 12,5 µg/ml Kanamycin 70 µg/ml Chloramphenicol 30-170 µg/ml
Blot-Puffer	Anode 1: 0,3 M Tris, 20% Methanol Anode 2: 30 mM Tris, 20% Methanol

	Kathode: 40 mM 6-Aminohexansäure 25 mM Tris-HCl 20% Methanol, pH 9,4
Denhardt-Lösung	0,2 g/l Ficoll 0,2 g/l Polyvinylpyrrolidon 0,2 g/l BSA (Fraktion 5)
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol 7% (v/v) Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie-Blau 45% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v)
Denaturierungslösung (Southern Blot)	0,4 M NaCl 1,5 M NaCl
Elektrophorese-Puffer (Proteine)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
GT-Puffer (Chemilumineszenz)	1 x TBS 0,1% (w/v) Gelatine 0,1% (v/v) Tween 20

Hybridisierlösung	6 x SSC 5 x Denhardt-Lösung 10 mM EDTA 0,8% (w/v) SDS 200 µg/ml Herinsperma-DNA
IPTG (0,5 M)	1 g IPTG (238,3 g/mol) in 8,4 ml H ₂ O lösen, mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren
Kinase-Dilution-Puffer	10 ml Kinase-Assay-Puffer 1 µg BSA 20 µl β-Mercaptoethanol
Ladepuffer (Proteingelelektrophorese)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5,0% (w/v) β-ME 2,0% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 10,0% (w/v) Glycerol
Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	0,04% (w/v) Bromphenolblau 0,04% (w/v) Xylencyanol FF 2,5% (w/v) Ficoll (400) in TAE-Puffer
LB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l NaCl pH 7,0 15 g/l Bacto-Agar f. Festmedium
LB-Platten	LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar

Ligase-Puffer (10 x)	500 mM Tris-HCl, pH 7,6 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT
Lyse-Puffer	155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA
MOPS-Puffer	1,25 M NaCl 50 mM MOPS 15% (v/v) Ethanol pH 8,2
Neutralisierungslösung (Southern Blot)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
Phenol-Chloroform	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 mischen (Für DNA-Extraktionen)
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl
Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M Na ₃ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH8,0
Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M Na ₃ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 6,3

Puffer E	8 M Harnstoff 0,1 M Na ₃ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 4,5
Sammelgel	5% (w/v) Acrylamid 0,1% (w/v) Bisacrylamid 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,05% (w/v) APS 0,01% (v/v) TEMED
SSC-Lösung (1 x)	150 mM NaCl 15 mM Na ₃ -Citrat pH 7,0
SSPE-Lösung (20 x)	3,6 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,7 0,02 M Na ₂ EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
TBS (Chemilumineszenz)	150 mM NaCl 15 mM Tris 5 mM NaN ₃ 1 mM EDTA pH 7,8
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA ph 8,0

TELT-Lysis-Puffer	50 mM Tris/HCl 62 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4% Triton X-100
Top-Agarose	LB-Medium + 15g/l Bacto-Agar
Trenngel	17,5% (w/v) Acrylamid 0,1% (w/v) Bisacrylamid 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,05% (w/v) APS 0,01% (v/v) TEMED
TSS	10% (w/v) PEG8000 5% (w/v) DMSO 50mM MgCl ₂ pH6,5
Waschlösung (Chemilumineszenz)	1 x PBS 0,05% (v/v) Tween 20

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Centricon 10, 30	Amicon, Witten
EDTA-Röhrchen	Braun, Melsungen
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Falcon, Lübeck
Nap-5-Säule	Pharmacia, Uppsala, SWE
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran	NEN DuPont, Bad Homburg
Parafilm	American National Can, Neenah

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
	Eppendorf, Hamburg
Polaroidfilm	Polaroid, St. Albans, UK
Röntgenfilm	Amersham, SWE
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Verstärkerfolien	NEN DuPont, Bad Homburg
Whatman Papier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.4 Geräte

Digitalwaage	Mettler, Greifensee, CH
DNA-Synthesizer	Pharmacia, Freiburg
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Hybridisierofen	GFL, Burgwedel
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mini-Elektrophorese-Apparatur	Hoefer, Heidelberg
PCR-Gerät	Biozym, Hameln
pH-Meter	Beckmann, Palo Alto, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Polaroidkamera	Polaroid, Cambridge, USA
Szintillationszähler	Packard Tricarb, Frankfurt
SpeedVac	Savant, USA
Spektrophotometer	Shimadszu, Japan
Sterilwerkbank	Flow, Meckenheim
Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellinkubator	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (2 ml Tubes)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Hermle	Eppendorf, Hamburg

2.1.5 Bakterien, Plasmide, Nukleinsäuren und Enzyme

Heringsperma-DNA	Boehringer, Mannheim
Isotope	DuPont, Bad Homburg
Lamba-DNA	Gibco BRL, Eggenstein
Enzyme:	
BamH1, EcoR1, Hae III, Hind III, Taq 1, XHO I	NEB, Schwalbach und Gibco BRL, Eggenstein
Retrotherm™ RT	BIOzym, Hess
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
Plasmide:	
Bluescript	Gibco BRL, Eggenstein
pCR	Invitrogen, Hoffmann La Roche
pQE 31	Diagen, Hilden
Bakterien:	
E.coli SG 13009	Quiagen, Düsseldorf
One shot-competent cells	Invitrogen, Hoffmann La Roche
Buffy-Coat	UKE Eppendorf, Abt. für Transfusionsmedizin, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Granulozytenisolierung aus Buffy-Coats

Es wurden 15 ml Ficoll in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und mit 30 ml Buffy-Coat überschichtet. Anschließend wurde 30 min bei Raumtemperatur und 1500 Upm zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand verworfen. Es verblieb ein Erythrozyten-/Granulozyten-Sediment, wobei die Granulozyten als dünne, gelblich gefärbte Schicht auf der unteren rotbraunen Erythrozytenschicht lagen. Das Sediment wurde mit Lyse-Puffer bis auf 50 ml aufgefüllt.

Nach Resuspendierung des Sediments wurde 20 min bei 10°C und 1500 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert, nochmals mit Lyse-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut 15 min bei 1500 Upm und 4°C zentrifugiert.

Die Überstände wurden wieder dekantiert, dann wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 1500 Upm bei 4°C 15 min zentrifugiert. Dieser letzte Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt. Die gewaschenen Granulozyten verblieben als gelbliches Sediment im Röhrchen.

2.2.1.2 RNA-Isolierung aus Granulozyten und anschließende Konzentrationsbestimmung

Die Zellen wurden in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Solution D + β-2-Mercaptoethanol (β-2-ME) aufgenommen und es wurden nacheinander 50 µl 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 500 µl Phenol und 200 µl NaCl-Lösung hinzugegeben und der Ansatz 15 min auf Eis gestellt.

Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, volumengleich mit Isopropanol aufgefüllt und 1 h bei -100°C inkubiert.

Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und erst 300 µl Solution D + β-2-ME, dann 300 µl Isopropanol zugegeben und erneut für 2 h bei -100°C inkubiert.

Nach Zentrifugation wurde das Pellet 2 x mit 75%igem Ethanol gewaschen, 15 min in der Speed-Vac getrocknet und in 200 µl bis 500 µl DEP-H₂O (bidest. H₂O, 0,1% Diethylpyrocarbonat 97%, 12 h inkubiert, autoklaviert) aufgenommen.

Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Quarz-Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge im Spektrophotometer von Shimadzu.

Eine OD_{260} von 1 entsprach einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Daraus ergab sich folgende Berechnung: $E_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung} = \text{RNA-Konzentration} (\mu\text{g/ml})$. Die Reinheit einer Probe ließ sich über den Quotienten E_{260}/E_{280} abschätzen, der für Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Ein Quotient von $<1,7$ wies auf Verunreinigungen mit Proteinen oder anderen Strahlen absorbierenden Substanzen hin.

2.2.1.3 Chemische Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide als PCR-Primer wurden auf einem Syntheseautomaten (Gene Assembler von Pharmacia) hergestellt. Dem Syntheseverfahren lag das Phosphoramidit-Verfahren nach Caruthers (Caruthers et al. 1989) zugrunde.

Nach Beendigung der Synthese wurden zur Deprotektion der matrixgebundenen Oligonukleotide die Synthesekartuschen zunächst in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert, dann in ein 2 ml Gefäß überführt und zur Äquilibrierung in 0,5 ml 30%igem Ammoniak erneut wie oben zentrifugiert

Nach Zugabe weiterer 500 μl 30% Ammoniaks wurde das Gefäß verschlossen, in ein Szintillationsgefäß überführt, in das ebenfalls 1 ml Ammoniak vorgelegt wurde und für 1 h bei 70°C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden vor Öffnung auf -70°C gekühlt und der Deblockierungsansatz in der SpeedVac einrotiert. Anschließend wurde er in 500 μl ddH₂O aufgenommen, erneut einrotiert und nach Aufnahme in Wasser über eine Nap-5-Säule säulenchromatographisch gereinigt.

2.2.1.4 Reverse-Transkriptions-PCR

Die Reverse-Transkriptions-PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt:

D1: 5' GGAATTCCTGGAGCCCAGGCTCTTT 3'

U1: 5' CTGTCGAGGTCTCCACA3'

Dieses Primer-Paar diente der spezifischen Amplifizierung der CGM1a-cDNA in nahezu ihrer gesamten Länge.

Die CGM1-cDNA wurde folgendermaßen hergestellt:

10 µl der durch o.g. Methode gewonnenen RNA wurden mit 1 µl U1-Primer (15 µmolar) zusammenpipettiert.

Dieser Ansatz wurde zuerst für 10 min auf 70°C erhitzt, damit eventuelle Primer-Dimere zerstört wurden und eine Anlagerung der Primer an die RNA erfolgte, und dann 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde folgendes hinzugegeben:

1 µl dNTP (10 mM)
 2 µl DTT (0,1 M)
 3 µl DEP-H₂O
 2 µl Superscript-buffer
 1 µl Superscript-Enzym
 =9 µl

Der Ansatz verblieb 5 min bei Raumtemperatur und wurde dann 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde folgendes hinzupipettiert:

10 µl 10x PCR-Puffer
 1 µl dNTPs (10 mM)
 0,7 µl Primer D1 (15 µM)
 0,7 µl Primer U1 (15 µM)
 1 µl Taq-Polymerase (5 U)
 66,6 µl ddH₂O (bidestilliertes H₂O)
 =100 µl

Der Ansatz wurde in ein 500 µl Eppendorf-Gefäß pipettiert, gemischt, kurz zentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die Zyklusbedingungen waren:	Denaturierung:	94°C 1 min
	Annealing:	54°C 1 min
	Synthese:	72°C 1 min 30 s

Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wurde der Syntheschritt um weitere 5 min bei 72°C verlängert und das PCR-Produkt dann bei +4°C aufbewahrt.

2.2.1.5 „Nested PCR“

Von der im vorigen Schritt erhaltenen CGM1a-DNA wurde mit Hilfe einer zweiten PCR nur die gesamte zytoplasmatische Domäne amplifiziert. Die PCR-Primer wurden hierbei so gewählt, daß die amplifizierten Sequenzen an beiden Enden Restriktionsstellen enthielten, um eine nachfolgende "sticky ends"-Ligation zu ermöglichen. Abb. 2-1 zeigt die verfolgte PCR- und Ligations-Strategie.

PCR und Klonierung in den pQE31-Vektor

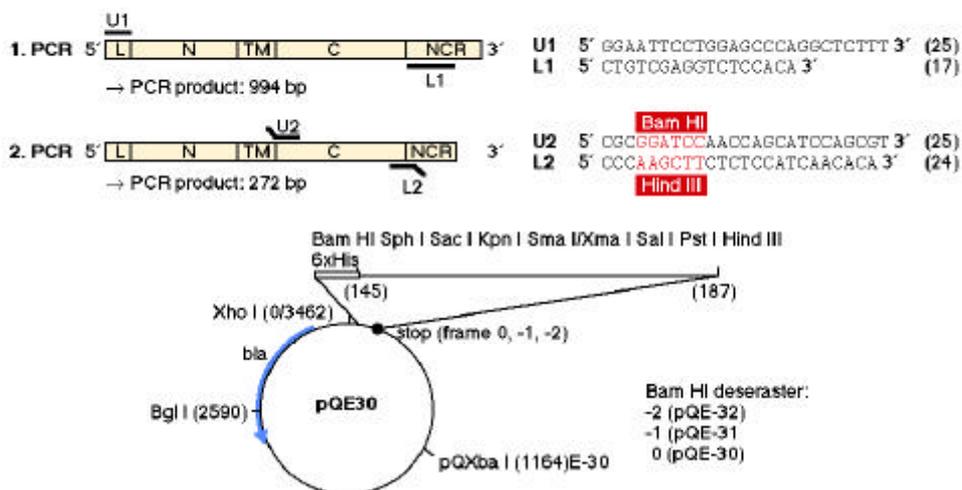


Abbildung 2-1

(L = Leader-Peptid, N = N-terminale Domäne, TM = transmembranäre Domäne, C = C-terminale Domäne, NCR = non-coding region)

Folgende Primer wurden für die „Nested PCR“ verwendet:

D2: 5' CGCGGATCCAACCAGCATCCAGCGT 3'

U2: 5' CCCAAGCTTCTCTCCATCAACACA 3'

Der Primer D2 enthielt eine BamHI- und der Primer U2 eine HindIII-Schnittstelle.

Der PCR-Ansatz erfolgte in einem Volumen von 100 μl der folgenden Zusammensetzung:

10 μl 10x PCR-Puffer
16 μl dNTPs (10 mM)
5 μl Primer D2 (20 μM)
5 μl Primer U2 (20 μM)
0,5 μl Taq-Polymerase (2,5 U)
63,5 μl dd H₂O
=100 μl

Der Ansatz wurde in ein 500 μl Eppendorf-Tube pipettiert, gemischt, kurz zentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet.

Die Zyklusbedingungen waren:	Denaturierung:	94°C 1 min
	Annealing:	53°C 1 min
	Synthese:	72°C 1 min

Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wurde der Syntheseschritt um weitere 10 min bei 72°C verlängert und das PCR-Produkt dann bei +4°C aufbewahrt.

2.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Für die DNA-Elektrophorese in TAE-Puffer wurden je nach Fragmentgröße 0,7 % bis 2 % Agarose (w/v) in TAE mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid erhitzt und nach Abkühlung auf unter 55°C in die Gelform mit einem passenden Probekamm gegossen. Die DNA-Proben wurden in Ladepuffer vor dem Auftragen 5 min bei 65°C erhitzt. Die Horizontal-Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 6 V pro cm Gellänge. Unter UV-Licht wurden die durch Ethidiumbromid fluoreszierenden Banden photographiert.

Als Größenstandard lief entweder Bakteriophagen-Lambda-DNA/HindIII geschnitten oder Bluescript/HaeIII geschnitten mit. Die Aufteilung der Fragmentlängen der Größenstandards ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Lambda/HindIII	Bluescript/HaeIII
23 130	605
9 416	458
6557	434
4361	293
2322	267
2027	243
564	174
125	142
	102
	80
	79
	58
	18
	11

Tabelle 1: Restriktionsfragmentlängen der verwendeten Standards

Die DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen erfolgte auf Ionenaustauscherbasis. Agaroseblöckchen mit den DNA-Banden wurden bei 50°C gelöst, die DNA an der Ionenaustauschermatrix (Quiaex) gebunden und mit H₂O entsprechend den Herstellerangaben eluiert.

2.2.1.7 Southern Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte wurden vor der Hybridisierung nach einer von Southern (Southern et al. 1975) entwickelten Methode auf Nylonmembranen transferiert.

Entsprechende Agarosegele wurden nach dem Lauf zur Depurinierung 2 x 15 min in 0,25 M HCl und zur Denaturierung und Neutralisation 2 x 15 min in 0,5 M NaOH/ 1,2 M NaCl geschüttelt.

Nach Äquilibrierung der Gele in Transferlösung (1 M Ammoniumacetat/ 20 mM NaOH) für 30 min, wurde das System zum Kapillartransfer aufgebaut.

Nylonfolie und Filterpapiere wurden vor Gebrauch in Transferlösung getaucht, um einen luftblasenfreien Zusammenbau zu erleichtern.

Nach dem Transfer über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Folien zur Fixierung der DNA 1 h im Vakuumofen bei 80°C gebacken und anschließend direkt in die Prähybridisierung gegeben.

2.2.1.8 Markierung von Oligonukleotiden

Markiert wurde folgendes Oligonukleotid:

CGM1a-internes-Oligonukleotid: 5' TTCCTCATAGATGGAAGCTG 3'

Die Markierung des Oligonukleotids erfolgte mittels γ -³²P ATP in folgendem Ansatz:

10 μ l H₂O
2 μ l 10 x LK-Puffer
5 μ l Oligonukleotid (50 ng)
1 μ l T4-Polynukleotidkinase
2 μ l γ -³²P ATP

Dieser Ansatz wurde zunächst 60 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 65°C inkubiert.

Danach wurde folgendes zu dem Ansatz hinzugegeben:

- 26 μ l TE-Puffer
- 2 μ l 0,1 M EDTA (pH 8,0)
- 2 μ l Hefe-t-RNA (55 ng)

Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde über eine Nap-5-Säule abgetrennt, die zuvor dreimal mit TE-Puffer äquilibriert wurde. Die Probe wurde mit 450 μ l TE-Puffer versetzt, auf die Säule gegeben und der Durchfluß verworfen. Zur Elution der markierten Sonde wurde die Säule dann mit 1 ml TE-Puffer versetzt. Zur Bestimmung der Sondenkonzentration wurde dann 1 μ l des Ansatzes in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) im P-Kanal des Packard Tricarb Szintillationszähler gemessen. Es wurden Werte zwischen $15-30 \times 10^4$ cpm gemessen.

5×10^6 cpm wurden zur Hybridisierung eines Southern-Blots und $12,5-25 \times 10^6$ cpm zum Colony-Screening eingesetzt.

2.2.1.9 Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Nach Prähybridisierung der Blots in "Rapid-Hyp-Buffer" bei 42°C für 15 min wurde die markierte Probe hinzugegeben und 1 h bei 42°C hybridisiert. Anschließend wurde die Folie zunächst 20 min in 5 x SSC, 0,1% SDS und dann 15 min in 1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Der Southern Blot wurde dann in eine Röntgenkassette zwischen zwei Röntgenfilme gelegt und mindestens 24 h bei -80°C inkubiert.

2.2.1.10 Restriktionsanalysen von DNA

Restriktionsanalysen wurden zum einen zur Bestätigung des richtigen PCR-Produktes und zum anderen zur Identifizierung rekombinanter Klone durchgeführt.

Der typische Verdauungsansatz sah folgendermaßen aus:

x μ l zu verdauende DNA

1 μ l 10x Reaktionspuffer

1 μ l 0,1% (w/v) BSA

1 μ l Restriktionsendonuklease (5-10 U/ μ l entsprechend der Konzentration der zu verdauenden DNA)

y μ l ddH₂O ad 10 μ l

Es wurden die für das jeweilige Enzym optimalen Puffer benutzt. Bei Spaltungen durch mehrere Restriktionsendonukleasen, die unterschiedliche Pufferbedingungen erfordern, wurden die Reaktionen nacheinander durchgeführt.

Der Ansatz wurde eine Stunde bei der optimalen Reaktionstemperatur (meist 37°C) inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Restriktionsenzyme jeweils durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.1.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Die gefrorenen Zellen wurden langsam aufgetaut, auf Minimal-Medium-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Medium suspendiert und über Nacht in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 2 ml der Vorkultur wurden in 200 ml LB-Medium verdünnt und weiter inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 erfolgte eine Zentrifugation mit 3000 x g über 10 min bei 0°C. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ aufgenommen, wieder zentrifugiert und in 100 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer 75-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und schließlich in 12,5 ml eiskaltem 85 mM CaCl₂ mit 15% Glycerol aufgenommen, in 0,5 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

Als Schnellmethode wurden kompetente Zellen nach dem "One-Step-Protokoll" von Chung et al. (1989) hergestellt. Dabei wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 angezogen,

geerntet (siehe oben) und in 0,1 Volumen eiskalten TSS-Mediums resuspendiert. Nach einer Inkubation in Eiswasser wurden die Zellen transformiert oder zur Aufbewahrung aliquotiert und tiefgefroren.

2.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationen wurden mit der T₄-Ligase in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Das Enzym verknüpft kovalent sowohl doppelsträngige DNA mit komplementären Einzelsträngen ("sticky ends") als auch glatte doppelsträngige Enden ("blunt ends"). Das molare Verhältnis der zu ligierenden Fragmente betrug 1:3, 1:5, 1:10 (Vektor/Fragment).

Ein typischer Ligase-Ansatz enthielt:

1 µl linearisierter Vektor (100 ng)
x µl Fragment (entsprechend Vektor/Fragment 1:3, 1:5, 1:10)
2 µl 10 x Ligase-Puffer
1 µl T₄-Ligase
y µl ddH₂O ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.2.1.13 Transformation von Bakterien

Zu 150 µl Zellsuspension wurden 10 ng Vektor pipettiert und 45 min auf Eis inkubiert. Nach kurzer Erwärmung von 1 min bei 42°C wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurden jeweils 5 µl und 50 µl der Zellsuspension auf LB/Ampicillin/Kanamycin-Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Die ausgezählten Kolonien wurden zur eingesetzten DNA-Menge in Beziehung gesetzt.

2.2.1.14 Colony-Screening

Auf LB-Platten, die mit Kolonien bewachsen waren, wurden passende 0,45 μm Nitrocellulose-Membranen gelegt, die Feuchtigkeit und die Kolonien aufnahmen. Die Filter wurden vor dem Abnehmen mit einer lackgetränkten Kanüle markiert, so daß sich später LB-Platte und autoradiographisch abgebildete Nitrocellulose eindeutig in der Position zuordnen ließen.

Zur Fixierung der Kolonien auf der Nitrocellulose wurde die Membran nacheinander für jeweils 5 min auf 3 MM Filterpapier gelegt, das jeweils mit folgenden Lösungen benetzt war:

0,5 M NaOH

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5

0,5 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl

2 x SSC

Zwischen den einzelnen Schritten mußte die Membran jeweils 5 min trocknen, bevor sie abschließend für 2 h im Vakuumofen bei 80°C endgültig getrocknet wurde.

Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 68°C in 25 ml Hybridisierungslösung, die vorher 10 min lang gekocht wurde. Hybridisiert wurde bei 65°C über Nacht. Danach wurde der Filter für je eine Stunde in 6 x SSC, 0,1% SDS und 0,5 x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Danach erfolgte die Autoradiographie der Nitrocellulose-Membran mit Verstärkerfolie bei 70°C für 2 bis 48 h.

Auf die entwickelten Röntgenfilme wurden die Markierungen der Nitrocellulose-Filter übertragen, den LB-Platten zugeordnet und anhand der geschwärzten Areale diejenigen Kolonien identifiziert, deren Klone erfolgreich mit einem PCR-Produkt enthaltendem Vektor transformiert wurden.

2.2.1.15 Plasmid-Gewinnung

Für die Gewinnung geringer Plasmid-Mengen wurde anhand der TELT-Mini-Präparation vorgegangen, bei der Pellets einer 2 ml Kultur nach Zentrifugation in 250 µl TELT-Lysis-Puffer resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung, kurzem Kochen und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet entfernt und der Überstand zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal nur mit Chloroform ausgeschüttelt. Die obere Phase wurde entnommen, die DNA volumengleich mit 2-Propanol gefällt und zentrifugiert. Das Pellet (2-3 µg Plasmid) wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Für die quantitative Gewinnung von mg-Mengen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde ein Anionenaustauscherharz auf Silicagel-Basis (Qiagen-Maxisäulen) benutzt. Nach alkalischer Lyse der Zellen wurde dsPlasmid-DNA mit MOPS-Puffer für die DNA-Sequenzierung entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.16 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen von PCR-Produkten wurden nach deren Ligation in den pCR-Vektor mit DyeDeoxy-Terminatoren™ durchgeführt. Diese mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTP's wurden mit Hilfe der Amplitaq DNA Polymerase, FS™ durch sog. zyklische Sequenzierung in die Amplifikate eingefügt. Mit Ausnahme des Primers waren alle notwendigen oben genannten Komponenten dieser Sequenzierungsreaktion im ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) enthalten:

- vier mit Farbstoff markierte ddNTP's
- entsprechend vier verschiedene dNTP's
- Tris-HCl (pH 9.0)
- MgCl₂
- hitzestabile Pyrophosphatase
- Amplitaq DNA Polymerase, FS

Es wurden 3 bis 4 µl pCR-Vektor + PCR-Produkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt, zusammen mit 10 pmolen Primer und 8 µl Terminator Ready Reaction Mix. An Primern wurden bei zuvor klonierten PCR-Produkten Oligonukleotide der T7-Sequenz verwendet.

Zum Erreichen des Reaktionsvolumens von 20 µl wurde entsprechend 1 bis 8 µl ddH₂O dazupipettiert. Mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler mit folgenden Bedingungen linear amplifiziert:

Denaturierung:	96 °C, 30 Sekunden
Annealing:	50 °C, 15 Sekunden
Elongation:	60 °C, 4 Minuten

Diese Schritte wurden in 25 Zyklen durchgeführt und der Reaktionsansatz im Anschluß sofort bei 4°C gelagert. Danach wurde die DNA mit Ethanol, ohne Zusatz von Glykogen, für 20 min auf Eis präzipitiert und einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann in dem geöffnetem 1,5 ml Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Die Probe wurde daraufhin auf einem Polyacrylamidgel mit Hilfe eines DNA Sequenzautomaten (373A von Applied Biosystems oder 377 von ABI PRISM) vom Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie der Universität Hamburg analysiert.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Proteinexpression

Eine Über-Nacht-Kultur von E.coli-Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, wurde 1:100 in LB/Amp./Kana.-Medium verdünnt und in einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,8 inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonz.) wurde die Bakterienkultur für weitere 4 h inkubiert, anschließend kurz abzentrifugiert und die Pellets bei -70°C weggefroren.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts eignete sich SDS-Page, wobei zur Fokussierung der Proteine ein 5%iges Sammelgel (siehe 2.1.2) und zur Auftrennung ein 17,5%iges Trenngel (siehe 2.1.2) benutzt wurden. Die Proben wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf das SDS-Gel geladen. Als Marker wurden 5 µl "Low-Weight-Marker" mit 5 µl 2 x Ladepuffer eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 10 mA, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Die weitere Auftrennung erfolgte bei 20 mA bis die Bromphenolblaufront gerade aus dem Gel lief.

Tabelle 2 zeigt den verwendeten Low-Weight-Marker mit den entsprechenden Referenzproteinen:

Molekulargewicht in Da	Referenzprotein
2500	
6200	CnBr-geschnittenes Myoglobin
8100	
14400	Lysozym
16900	Myoglobin
19700	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
20400	
31000	Karboanhydrase

Tabelle 2

2.2.2.3 Proteinfärbungen

a) Silberfärbung

Mit der Silberfärbung ließen sich geringe Proteinmengen ab einer Konzentration von 2-5 ng Protein pro Bande detektieren. Dazu wurde das Proteingel folgendermaßen behandelt:

Es wurde zunächst 30 min in Fixierlösung geschwenkt, dann 10 min in Quelllösung, anschließend zweimal in H₂O gewaschen und für eine Minute sensitiviert. Dann wurde erneut zweimal gewaschen und 30 min unter Lichtausschluß in Silbernitratlösung gefärbt. Wiederum wurde zweimal in H₂O gewaschen und dann in Entwicklerlösung geschwenkt bis die Banden sichtbar werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stop-Lösung beendet.

b) Coomassie-Färbung

Diese Färbung ermöglichte eine Detektion ab 300-1000 ng Protein pro Bande.

Das zu färbende Gel wurde über Nacht in einer Coomassie Färb- und Fixierlösung (siehe 2.1.2) inkubiert. Überschüssige Farbe wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Entfärbelösung entfernt.

2.2.2.4 Aufreinigung von Proteinen

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte alternativ in kleinen Mengen mit "Spin-Columns", in größeren Mengen quantitativ mit Ni-NTA-Säulen oder dem Econo-System 191.

a) Aufreinigung kleiner Proteinmengen mit "Spin-Columns"

Aufgereinigt wurden Proteine aus einer 10 ml Bakterienkultur. Die herunterzentrifugierten Bakterien wurden in 1 ml Puffer B resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur leicht durchmischt. Das so erhaltene Zellysat wurde für 10 min bei RT und 10000 xg zentrifugiert, der Überstand mit dem Protein wurde weiterverarbeitet.

Eine mit 600 µl Puffer B voräquilierte Ni-NTA-Spin-Column wurde mit 600 µl des Überstandes beladen und 2 min bei 2000 xg zentrifugiert. Dabei band das Protein, das einen Schwanz aus sechs Histidinresten besaß, an die Ni²⁺-Ionen der Spin-Column, die anderen Proteine wurden herunterzentrifugiert.

Die Waschung und Elution des Proteins erfolgte über einen pH-Gradienten: Die Spin-Column wurde zweimal mit 600 µl Puffer C (pH 6,3) gewaschen und das gereinigte Protein schließlich mit zweimal 200 µl Puffer E (pH 4,5) eluiert.

b) Aufreinigung quantitativer Proteinmengen mit Ni-NTA-Säulen

Aufgereinigt wurden Proteine aus einer 1000 ml Bakterienkultur. Das entsprechende Bakterienpellet wurde in 3 ml Puffer B (+ 20 mM Imidazol, 10% Glycerol) pro Gramm Pellet resuspendiert. Das Gemisch ließ man 1 h bei RT rotieren und zentrifugierte dann den Zelldetritus 10 min bei 10000 xg ab.

Der Überstand wurde zu 4 ml Ni-NTA gegeben, die vorher mit zweimal 50 ml Puffer B (+ 20 mM Imidazol, 10% Glycerol) gewaschen wurde. Das Ganze ließ man 1 h rotieren und zentrifugierte dann 5 min bei 1000 xg.

Die Ni-NTA, die nun das Protein mit dem 6xHis-Tag gebunden hatte, wurde in 10 ml Puffer B + Imidazol + Glycerol aufgenommen und auf eine Econo-Säule geladen. Die Aufreinigung und Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit einem steigenden Imidazol-Gradienten in Puffer B von 20 mM bis 100 mM. Das gereinigte Protein wurde bei 50 mM Imidazol eluiert.

2.2.2.5 Phosphorylierungen mit Kinasen der SRC-Familie

Aufgereinigte zytoplasmatische Domäne von CGM1a (CGM1a-ZYT) wurde über Nacht mit verschiedenen Kinasen der SRC-Familie (SRC-, LYN-, FYN-Kinase) und ATP-Labeling-Mix in Assay-Puffer bei 37°C inkubiert.

Ein typischer Phosphorylierungs-Ansatz enthielt folgendes:

10 μl CGM1a-ZYT (in Assay-Puffer gelöst)
 5 μl ATP-Labeling-Mix
 10 μl Kinase (1:4 in Dilution-Puffer verdünnt)
 25 μCi γ - ^{32}P ATP

In einem zweiten Phosphorylierungsansatz wurde zusätzlich zu verschiedenen Mengen von CGM1a-Zyt Enolase, ein anderes Substrat der SRC-Kinase, hinzugegeben. Dieser Ansatz sah folgendermaßen aus:

	1	2	3	4
SRC-Kinase (1:4 in Dilution-Puffer)	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
Enolase	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
CGM1a-ZYT (in Assay-Puffer)		1 μl	5 μl	9 μl
ATP-Labeling-Mix	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
Assay-Puffer	9 μl	8 μl	4 μl	

Zu jedem Ansatz wurden außerdem 25 μCi γ - ^{32}P ATP hinzugegeben. Anschließend wurden sie 40 min bei 37°C inkubiert.

Die Ergebnisse dieser Phosphorylierungs-Versuche wurden auf ein 17,5%iges SDS-Gel aufgetragen, das fertige Gel in Klarsichtfolie eingeschweißt in eine Röntgenkassette zwischen zwei Röntgenfilme gelegt und zwischen 4 und 24 h bei -80°C exponiert.

2.2.2.6 Bindung von SH2-Domänen an phosphoryliertes CGM1a-ZYT

Phosphoryliertes CGM1a-ZYT wurde mit rekombinanten SH2-Domänen aus SRC-Kinase (SRC), Phosphoinositol-3-Kinase (PI3) und Phospholipase-C γ (PLC γ) präzipitiert. Die SH2-Domänen lagen bereits an Agarose gebunden vor. Sie wurden entsprechend den

Herstellerangaben (Oncogene) mit radioaktiv markierter zytoplasmatischer Domäne von CGM1a inkubiert, gewaschen und dann auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Ergebnis der Präzipitationen wurde mittels Autoradiographie dargestellt.

2.2.2.7 Western Blot und Chemilumineszenz

Nach der SDS-Page wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wodurch die gewünschten Proteine immunchemisch gefärbt werden konnten.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese mit Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern, dann mit einem Primärantikörper inkubiert und an diesen schließlich ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper gebunden. Die Farbreaktion entstand durch Umsetzung von Diaminobenzamidin durch das Enzym Peroxidase.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Drei Filterpapiere wurden jeweils in Anodenpuffer (10 x) und Anodenpuffer (1 x) getränkt und luftblasenfrei übereinander gelegt. Auf die darauf liegende Nitrocellulosmembran wurde das SDS-Gel gelegt. Es folgte ein weiterer Stapel dreier Filterpapiere, die in Kathodenpuffer getränkt waren. Nach dem Auflegen des Kathodendeckels erfolgte der Proteintransfer bei 245 mA für 45 min.

Nach dem Transfer wurde die Bahn, in der sich die Marker-Proteine befinden, abgetrennt und in einer Amidoschwarzlösung gefärbt. Die restliche Membran wurde in Blocklösung I und II für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Der Primärantikörper wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml in Blocklösung auf die Membran gegeben und diese dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 min mit PBS-Lösung gewaschen und danach mit der Sekundärantikörperlösung (Kaninchen-anti-Maus, Verdünnung 1:2000 in PBS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte durch Zugabe einer DAB-Lösung (Diaminobenzidin), die das Substrat für die Peroxidase enthielt.

Die Detektion von Proteinbanden im Chemilumineszenz-Verfahren funktionierte im wesentlichen wie das eben beschriebene Verfahren, nur das in diesem Fall der Sekundärantikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert war. Ein Substrat der Alkalischen Phosphatase war CSPD, ein Farbstoff, der nach Umsatz durch das Enzym Licht emittierte und damit eine Schwärzung des Röntgenfilms verursachte. Durch den Umsatz eines lichtemittierenden Farbstoffs war diese Detektionsart wesentlich sensitiver als die des DAB-Umsatzes.

Das Polyacrylamidgel wurde wie oben beschrieben nach Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Nach dem Transfer wurde die Markerbahn abgetrennt und mit Amidoschwarz gefärbt. Die Membran wurde für 30 min in 50%iger Isopropanol-Lösung inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal kurz in H₂O gewaschen und 15 min in TBS geschwenkt. Die Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C in einer 5%igen BSA/TBS-Lösung. Die Membran wurde zweimal in GT-Puffer gewaschen und 1 h in diesem geschwenkt. Sie wurde nun mit dem Primärantikörper (Endkonzentration 1 µg/ml in GT-Puffer) 2 h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Membran zweimal 30 min in GT-Puffer geschwenkt und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Ziege-anti-Maus, AP-gekoppelt; 1:1000 in GT-Puffer verdünnt). Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT.

Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal mit Waschlösung gewaschen und zweimal je 1 h darin geschwenkt. Es erfolgte ein weiterer Blockierungsschritt, bei dem die Membran mit 5% Milchpulver in Waschlösung für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde zweimal mit Waschlösung gewaschen und 15 min darin geschwenkt, um sie anschließend dreimal 15 min in Assaypuffer zu äquilibrieren.

Die Chemilumineszenzreaktion erfolgte 5 min in 10 ml Assaypuffer, dem 700 µl Emerald (Reaktionsverstärker) und 70 µl CSPD-Substrat zugefügt wurden.

Die Membran wurde gut abgetropft und luftblasenfrei in Klarsichtfolie gelegt, um sie dann in einer Filmkassette einem Röntgenfilm zu exponieren.

Nach verschiedenen Expositionszeiten (10 bis 60 min) wurden die Röntgenfilme entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Amplifikation der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

Zunächst wurde aus humanen Granulozyten mRNA gewonnen und mittels rT-PCR in cDNA transkribiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Primer U1 (5' CTGTCGAGGTCTCCACA3') und D1 (5' GGAATTCCTGGAGCCCAGGCTCTTT 3') das gesamte CGM1a-Gen (994bp) amplifiziert. Daraufhin wurden für die zytoplasmatische Domäne von CGM1a spezifische Primer (U2: 5' CCCAAGCTTCTCTCCATCAACACA 3' / D2: 5' CGCGGATCCAACCAGCA TCCAGCGT 3') synthetisiert, die gleichzeitig am 5'-Ende eine Schnittstelle für HindIII und am 3'-Ende eine Schnittstelle für BamHI amplifizierten.

Das so gewonnene Produkt der Nested-PCR ist 272bp lang und läuft im Agarose-Gel zwischen den Banden bei 267 bp und 293 bp des Bluescript-Markers. Dies ist in Abb. 3-1 zu sehen.

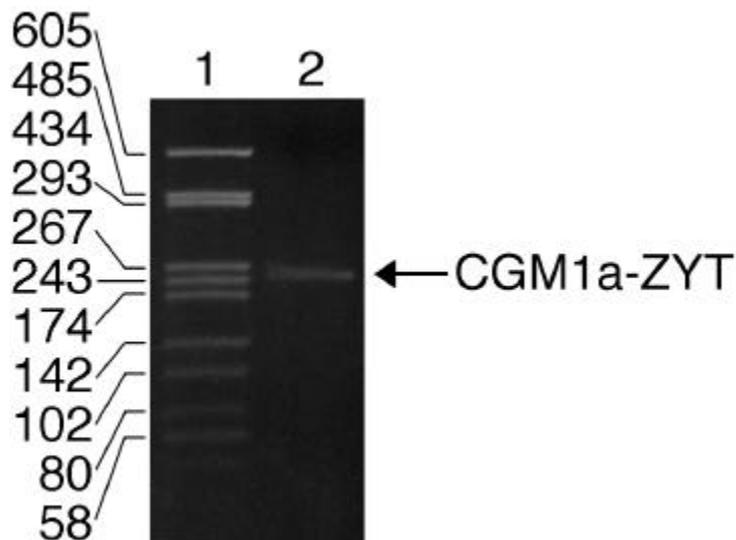


Abbildung 3-1: PCR-amplifizierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a, 2,0% Agarose-Gel

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | Standard: Bluescript/ HaeIII |
| 2 | zytoplasmatische Domäne von CGM1a |

Die zytoplasmatische Domäne des CGM1a-Gens enthält eine Restriktionsstelle für das Enzym TaqI (Schnittstellensequenz: T[↓]CGA), welches das 272bp-Produkt in Fragmente folgender Längen schneiden würde: 181bp, 91bp. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um

sicherzustellen, daß es sich bei dem erhaltenen PCR-Produkt wirklich um die zytoplasmatische Domäne von CGM1a handelt, indem das Amplifikat mit TaqI verdaut wurde. Abb. 3-2 zeigt den Restriktionsverdau mit den erwarteten Fragmentgrößen.

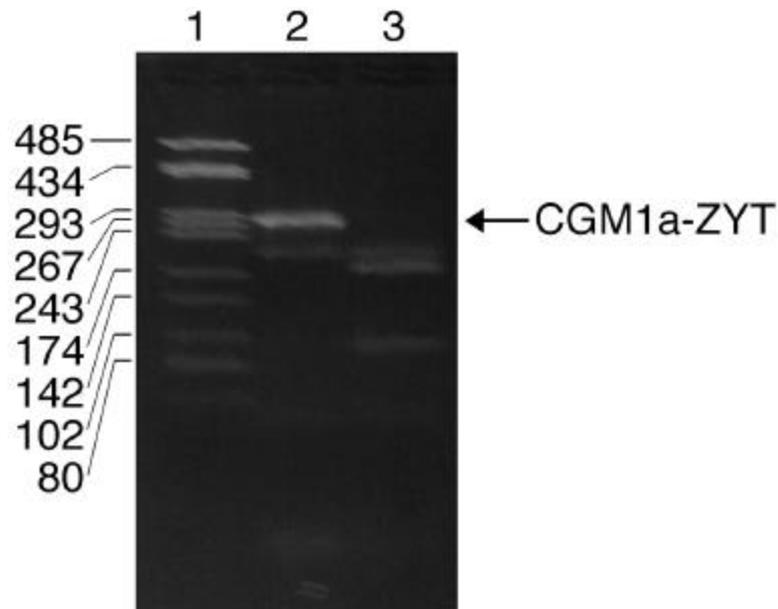


Abbildung 3-2: Restriktionsverdau der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a mit TaqI, 2,5% Agarose-Gel

1	Standard: Bluescript/ HaeIII
2	zytoplasmatische Domäne von CGM1a
3	Restriktionsverdau der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

Als weitere Kontrolle wurde das PCR-Produkt auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem CGM1a-spezifischen, 20bp langen internen Oligonukleotid (5'TTCCTCATAGATGGAA GCTG 3') hybridisiert. Abb. 3-3 zeigt die erfolgte Hybridisierung.

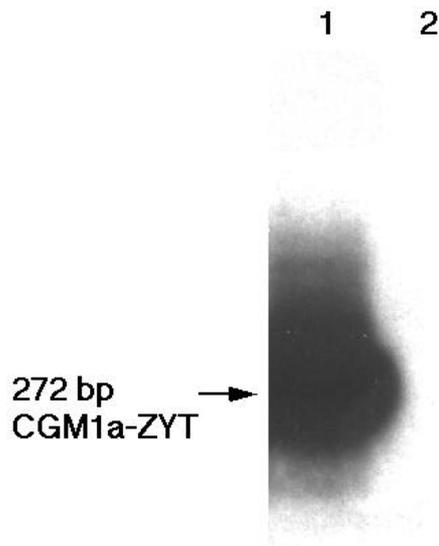


Abbildung 3-3: Hybridisierung der PCR-amplifizierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a mit einem internen Oligonukleotid, Autoradiographie, 24h

- | | |
|---|---|
| 1 | hybridisierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a |
| 2 | Negativkontrolle (H ₂ O) |

Als letzter Kontrollversuch wurde das PCR-Produkt sequenziert, um zu überprüfen, ob die erhaltene Sequenz mit der von Thompson et al. (1989) beschriebenen Sequenz des CGM1a-Gens übereinstimmt. Bisher hat man für das CGM1a-Gen zwei verschiedene Sequenzen gefunden.

Diese unterschieden sich unter anderem durch einen Basenaustausch des Nukleotids an Position 699 des CGM1a-Gens, bzw. des Nukleotids an Position 124 der amplifizierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a. Beschrieben wurde an dieser Position ein Thymin-Adenin-Austausch.

Hierdurch würde es auf Proteinebene an dieser Stelle auch zu einem Aminosäureaustausch von Serin gegen Threonin kommen. Auf die Bedeutung dieser Ergebnisse wird unter 4.1. näher eingegangen. In drei verschiedenen Sequenzierungsansätzen fand sich hier nur die Sequenz mit Adenin an der genannten Position. Das Ergebnis einer solchen Sequenzierung ist in Abb. 3-4 zu sehen.

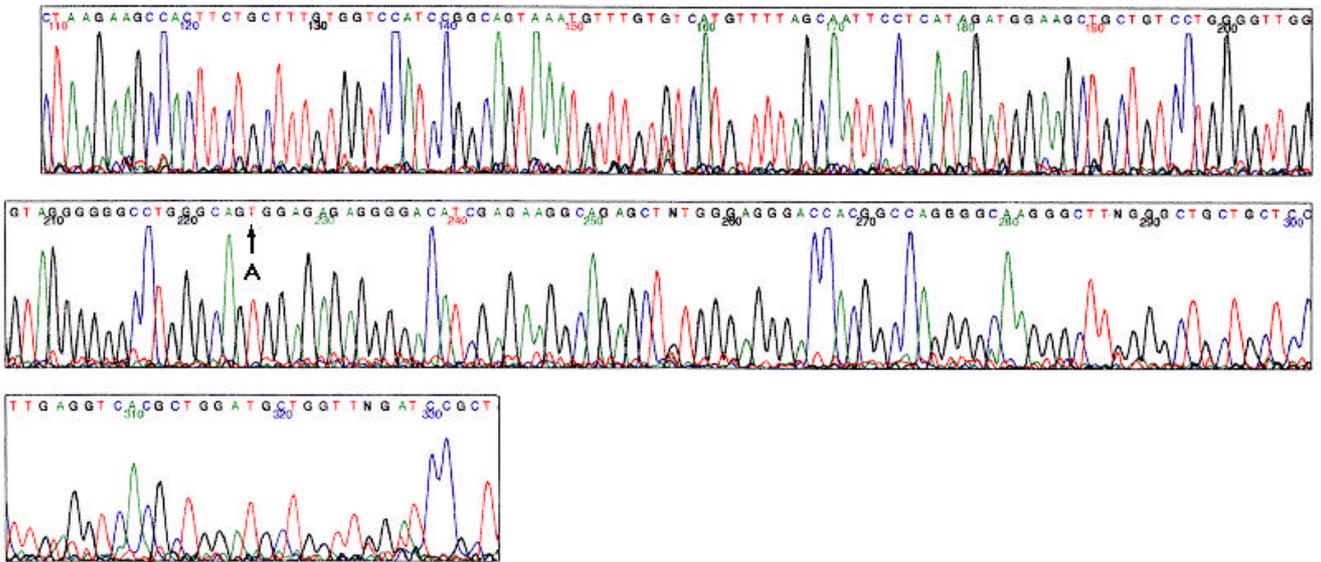


Abbildung 3-4: Dye-Primer-Sequenzierung der PCR-amplifizierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

3.2 Klonierung von rekombinantem CGM1a-ZYT in *E. coli*

Die amplifizierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a sollte nun in den Expressionsvektor pQE31 eingebaut und anschließend in *E. coli* SG13009 transformiert werden.

Dazu wurden zunächst sowohl das Plasmid als auch das PCR-Produkt mit BamHI und HindIII geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* SG13009 transformiert. Um die Bakterienkolonien zu identifizieren, in denen der Inserteinbau erfolgt war, wurde ein in Abb. 3-5 zu sehendes Colony-Screening durchgeführt. Die Bakterien, die das Ligationsprodukt als Insert enthalten, sind als radioaktiv markierte Punkte zu erkennen.

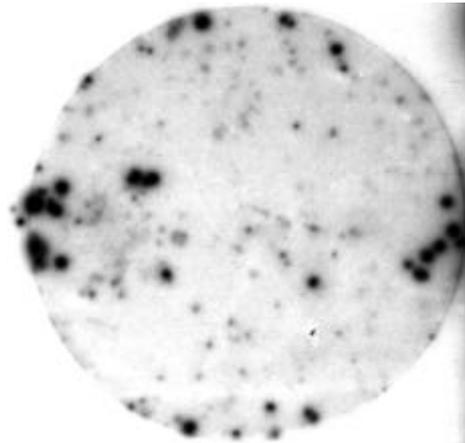


Abbildung 3-5: Colony-Screening einer mit dem Ligationsprodukt aus pQE31 und CGM1a-Zyt. transformierten *E. coli*-Kultur, Autoradiographie

Anschließend wurde aus den entsprechenden Kolonien Plasmid-DNA gewonnen und diese mit XHOI und HindIII verdaut. Bei erfolgtem Inserteinbau in das Plasmid wäre ein Fragment von 407 bp zu erwarten. Das Ergebnis des XHOI-/HindIII-Verdau der Plasmid-DNA ist in Abb. 3-6 zu sehen.

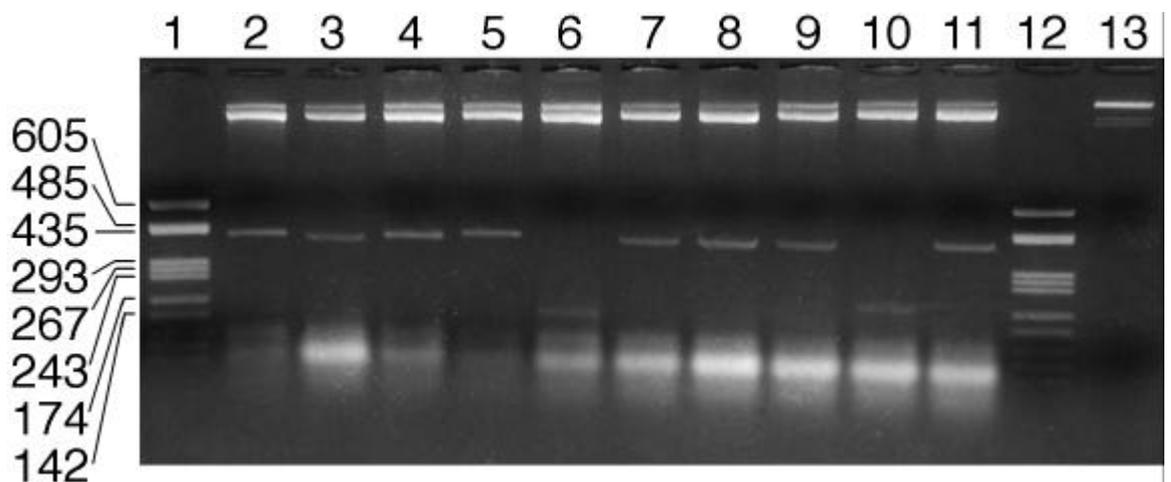


Abbildung 3-6: XHOI-/HindIII-Restriktionsverdau der Plasmid-DNA von transformierten *E. coli*, 1,0% Agarose-Gel

- 1 Bluescript/HaeIII-Größenstandard
- 2-11 geschnittene Plasmid DNA der transformierten Bakterien
- 12 Bluescript/HaeIII-Größenstandard
- 13 geschnittene, nichtligierte Plasmid-DNA

3.3 Expression der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a in *E. coli* SG13009

Die Proteinexpression erfolgte durch Induktion mit IPTG. Es wurden sowohl Bakterienstämme stimuliert, die pQE-Vektor+CGM1a-ZYT enthielten, als auch Bakterienstämme, die nur den Vektor enthielten. Diese dienten als Negativkontrolle. Abb. 3-7 zeigt zum einen die Bakterienlysate und zum anderen deren grobe Aufreinigung über Ni-NTA-Spin-Columns.

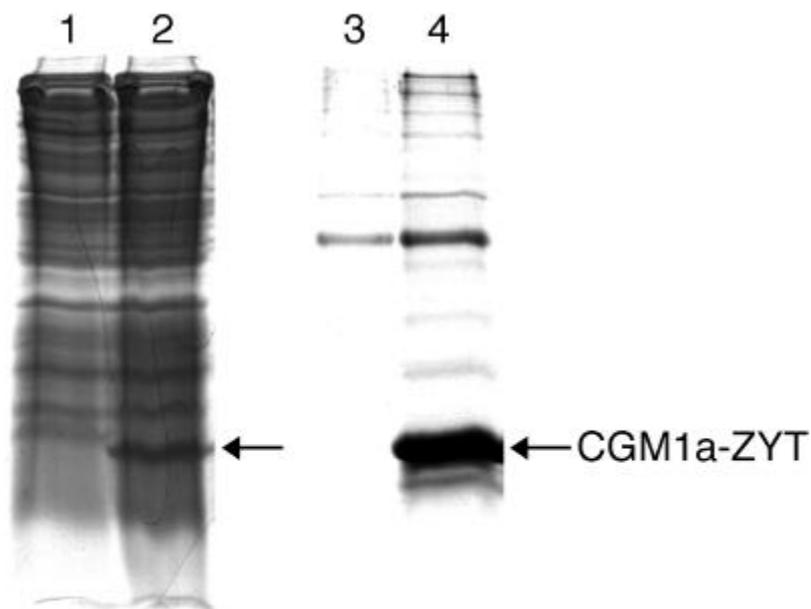


Abbildung 3-7: Expression von CGM1a-ZYT in *E. coli* SG13009: Bakterienlysate und aufgereinigte Lysate nach 4 h Expression bei 37°C, SDS/17,5% PAGE

Lane 1: Bakterienlysate: *E. coli* SG13009 + pQE31

Lane 2: Bakterienlysate: *E. coli* SG13009 + pQE31+CGM1a-ZYT

Lane 3: Aufreinigung von Lane 1

Lane 4: Aufreinigung von Lane 2

Man erkennt im Lysat der Bakterien, die sowohl Vektor als auch Insert enthalten, eine deutliche Proteinbande bei ca. 8000 Dalton, die in der Negativkontrolle nicht vorhanden ist. Diese Proteinbande lässt sich über Ni-NTA aufkonzentrieren und entspricht somit mit großer Wahrscheinlichkeit dem exprimierten Insert-Protein, das über ein 6xHis-Tag an Ni²⁺-Ionen bindet.

3.4 Aufreinigung der rekombinant exprimierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

Das Expressionsprodukt wurde auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und über einen Imidazol-Gradienten aufgereinigt. Das errechnete Molekulargewicht des CGM1a-ZYT-Inserts beträgt 8247,2 Dalton. Das aufgereinigte Expressionsprodukt läuft in einer Höhe von ca. 8000 Dalton und stimmt also gut mit dem erwarteten Gewicht überein. Abb. 3-8 zeigt die Gel-Elektrophorese der aufgereinigten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a.

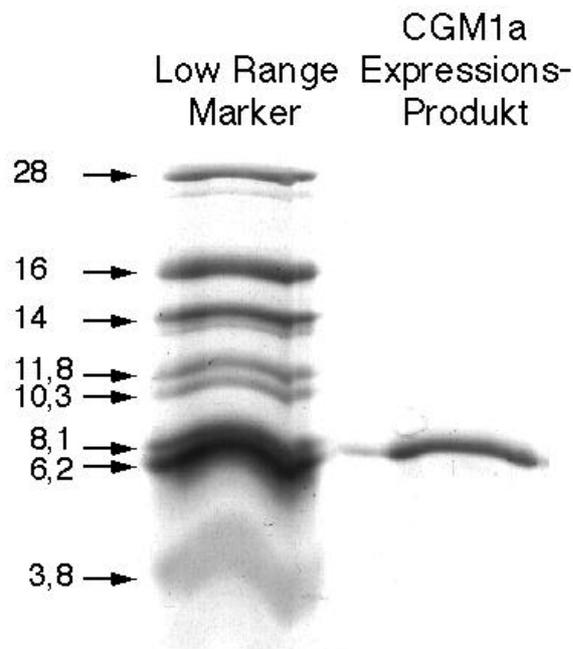


Abbildung 3-8: Aufgereinigte zytoplasmatische Domäne von CGM1a, SDS/17,5% PAGE

3.5 Phosphorylierung der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a durch Kinasen der SRC-Familie

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Interaktion zwischen CGM1a und Kinasen der SRC-Familie zu überprüfen. Dazu wurde die aufgereinigte zytoplasmatische Domäne von CGM1a mit SRC-Kinase und radioaktivem ATP inkubiert und das Ergebnis in einem Western-Blot durch Phosphotyrosin-Antikörper sichtbar gemacht. Abb. 3-9 zeigt den Western-Blot.

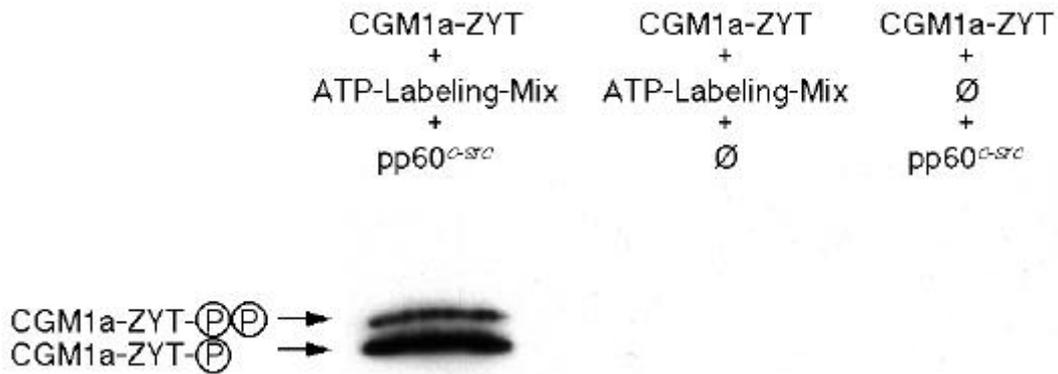


Abbildung 3-9: Bindung von Phosphotyrosin-Antikörper PY20 an CGM1a-ZYT (pp60^{c-src} = SRC-Kinase, CGM1a-ZYT-P= einfach phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a, CGM1a-ZYT-PP = zweifach phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a), SDS/17,5 PAGE, transferiert auf Nitrocellulose

Es ist zu erkennen, daß der Phosphotyrosin-Antikörper zwei Banden auf Höhe des CGM1a-ZYT detektiert. Diese beiden Banden entsprechen wahrscheinlich dem an einem Tyrosin (untere Bande) bzw. an beiden Tyrosinen (obere Bande) phosphoryliertem CGM1a-ZYT.

In einem weiteren Versuch wurde die aufgereinigte zytoplasmatische Domäne mit anderen, kommerziell erwerblichen Kinasen aus der SRC-Familie, nämlich LYN- und LCK-Kinase, im gleichen Versuchsansatz inkubiert. Abb. 3-10 zeigt, daß CGM1a auch durch LYN- und LCK-Kinase phosphoryliert wird, allerdings in wesentlich geringem Umfang als durch SRC-Kinase.

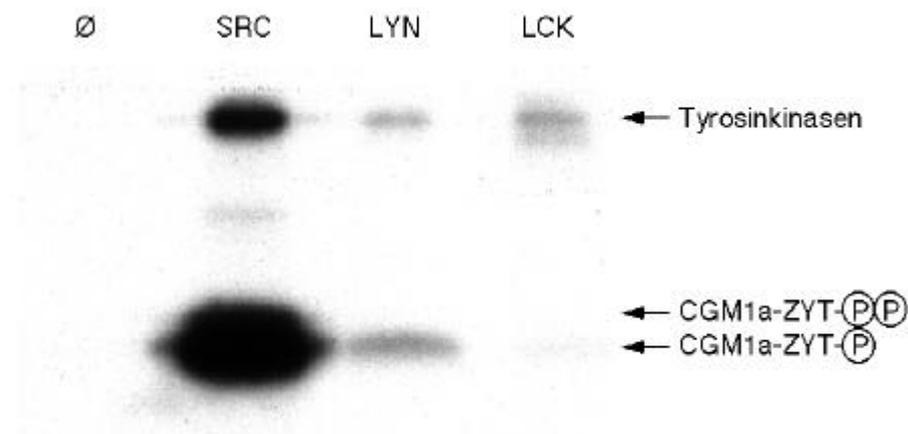


Abbildung 3-10: In-vitro-Tyrosin-Phosphorylierung von CGM1a-ZYT durch drei verschiedene Kinasen der SRC-Familie, SDS/17,5% PAGE, Autoradiographie

Die oberen Banden in dieser Abbildung entsprechen den Tyrosinkinasen. Man erkennt ein starkes Signal bei der SRC-Kinase, das auf eine deutliche Autophosphorylierung der Kinase hinweist. LCK- und LYN-Kinase sind ebenfalls als radioaktiv markierte Bande zu erkennen, jedoch wesentlich schwächer als SRC-Kinase. Sie scheinen somit in diesem Reaktionsansatz eine erheblich schwächere Autophosphorylierung zu zeigen. LYN-Kinase gibt noch einmal ein deutlich schwächeres radioaktives Signal als LCK-Kinase.

Die unteren Banden entsprechen dem phosphorylierten CGM1a-ZYT. Im Inkubationsansatz mit SRC-Kinase ist das stärkste Signal zu sehen. Es setzt sich aus den beiden bereits beschriebenen Banden zusammen. Eine deutlich radioaktiv markierte CGM1a-ZYT-Bande ist ebenfalls bei LYN-Kinase erkennbar, wenn auch erheblich schwächer als bei SRC-Kinase. Bei LCK-Kinase hingegen ist nur eine sehr schwache Markierung des CGM1a-ZYT zu sehen.

3.6. Aktivierung von SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a

Weiterhin sollte untersucht werden, ob phosphoryliertes CGM1a-ZYT SRC-Kinase (pp60^{c-SRC}) aktiviert. Dazu wurde in einem Versuch synthetisch hergestelltes CGM1a-ZYT-Phosphopeptid (Arg-Thr-Ala-Ala-Ser-Ile-Tyr(PO₃H₂)-Glu-Glu-Leu-Leu-Lys-His) mit SRC-Kinase und Enolase, einem Substrat der SRC-Kinase, inkubiert. Abb. 3-11 zeigt, daß durch Zugabe dieses Phosphopeptids sowohl die Enolase, also das Substrat der SRC-Kinase, stärker phosphoryliert wird als auch eine stärkere Autophosphorylierung der SRC-Kinase selbst erfolgt.

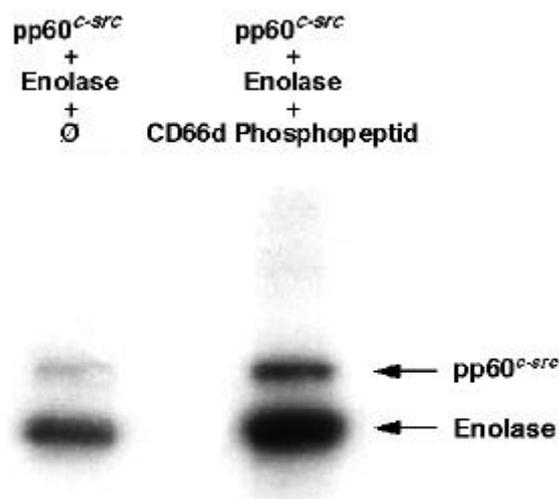
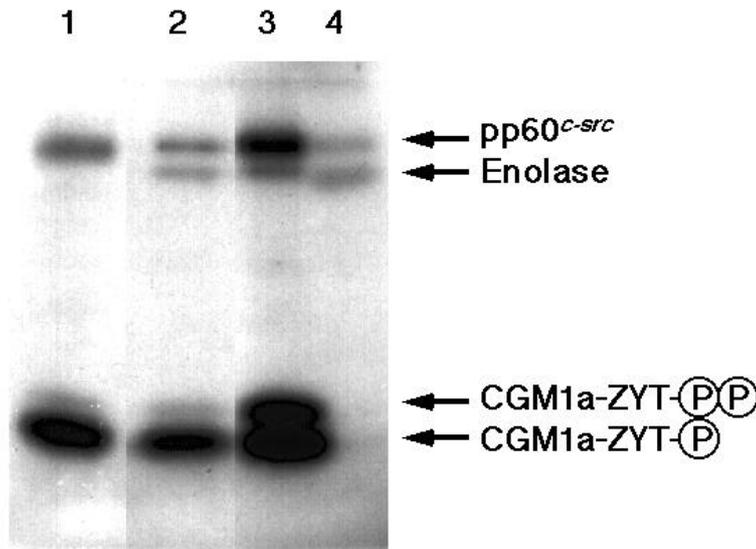


Abbildung 3-11: Aktivierung von pp60^{c-SRC} durch CGM1a-ZYT-Phosphopeptid, (pp60^{c-SRC} = SRC-Kinase), SDS/17,5% PAGE, Autoradiographie

Daraufhin wurde dann die zytoplasmatische Domäne von CGM1a in verschiedenen Verdünnungen anstatt des synthetischen Phosphopeptids hinzugegeben. Abb. 3-12 zeigt die deutlich stärkere Phosphorylierung von Enolase, CGM1a-ZYT und SRC-Kinase in Abhängigkeit von der zugefügten CGM1a-ZYT-Menge. Es zeigt also zum einen eine Aktivierung der SRC-Kinase durch phosphoryliertes CGM1a-ZYT und zum anderen, daß diese Aktivierung der SRC-Kinase mit der Menge an zugesetztem CGM1a-ZYT ansteigt..



Lane 1: pp60^{c-src} + CGM1a-ZYT

Lane 2: pp60^{c-src} + Enolase + CGM1a-ZYT

Lane 3: pp60^{c-src} + Enolase + 5 x CGM1a-ZYT

Lane 4: pp60^{c-src} + Enolase

Abbildung 3-12: Aktivierung von pp60^{c-src} durch CGM1a-ZYT, (pp60^{c-src} = SRC-Kinase), SDS/17,5% PAGE, Autoradiographie

3.7 Bindung von SH2-Domänen an die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a

Es sollte überprüft werden, ob SH2-Domänen an phosphoryliertes CGM1a-ZYT binden. Untersucht wurde dies für die SH2-Domänen von SRC-Kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und Phospholipase-C γ (PLC γ). Radioaktiv markiertes CGM1a-ZYT wurde mit den SH2-Domänen präzipitiert. Abb. 3-13 zeigt, daß CGM1a-ZYT an alle drei SH2-Domänen bindet.

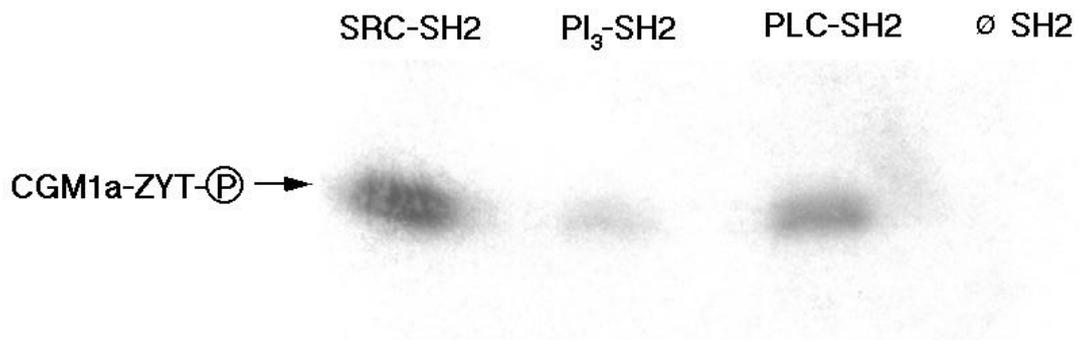


Abbildung 3-13: Präzipitation von phosphoryliertem CGM1a-ZYT durch verschiedene SH2-Domänen, SDS/17,5% PAGE

Es ist zu erkennen, daß die Bindung zwischen SRC-SH2-Domäne und phosphoryliertem CGM1a-ZYT am stärksten ist. Phosphoryliertes CGM1a-ZYT präzipitiert ebenfalls, wenn auch in deutlich geringerem Maße, mit der PLC γ -SH2-Domäne und noch schwächer mit der PI3-SH2-Domäne.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von CGM1a, einem Mitglied der CEA-Familie, mit Tyrosinkinase der SRC-Familie zu untersuchen und hierüber Informationen über seine mögliche Beteiligung an Signaltransduktionsvorgängen zu gewinnen. Für BGP, ein anderes Mitglied der CEA-Familie, konnte eine Assoziation mit SRC-Kinase und nachfolgende Aktivierung der Kinase *in-vitro* gezeigt werden (Brümmer et al. 1995). Da die zytoplasmatische Domäne von BGP, einer Splice-Variante des BGP, Tyrosinreste in einer ähnlichen Konsensussequenz besitzt wie die zytoplasmatische Domäne des CGM1a (Nagel et al. 1993), liegt die Hypothese nahe, daß CGM1a auch auf ähnliche Weise wie BGP mit SRC-Kinase interagiert.

Um Untersuchungen hierzu durchführen zu können, mußte zunächst reine zytoplasmatische Domäne von CGM1a gewonnen werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt aus Granulozyten-RNA mittels reverser Transkription und PCR CGM1a-cDNA gewonnen. Die Granulozyten entstammten gepoolten Blutproben gesunder Probanden.

Mittels PCR erhielt man ein Produkt, das auf dem Agarose-Gel zwischen den Banden bei 267 bp und 293 bp des Bluescript-Markers lief. Die Identifikation dieses PCR-Produktes als zytoplasmatische Domäne von CGM1a ergab sich sowohl aus der erwarteten Größe von 272 bp als auch durch einen Restriktionsverdau mit TaqI und durch eine Sequenzierung des DNA-Fragments.

Dieses Ergebnis bestätigt zunächst den vorbeschriebenen Befund, daß CGM1a in Granulozyten gesunder Probanden exprimiert wird. CGM1a-mRNA war bisher von Kuroki et al. 1991 und Nagel et al. 1993 in Granulozyten detektiert worden, das CGM1-Protein war von Nagel et al. 1993 durch monoklonale Antikörper des CD66-Clusters in geringer Konzentration auf der Oberfläche reifer Granulozyten detektiert worden.

Die Sequenzierung der erhaltenen zytoplasmatischen Domäne von CGM1a zeigte eine Abweichung von der erstmals von Kuroki et al. 1991 beschriebenen Nukleotidsequenz. An Position 99 der zytoplasmatischen Domäne fand sich anstatt eines Thymins ein Adenin. Dies

resultierte auf Proteinebene in dem Austausch der Aminosäure Serin gegen Threonin. Für diesen Befund gibt es zwei mögliche Erklärungen.

Zum einen könnte es sich um einen Fehler der Taq-Polymerase während der PCR-Amplifikation handeln, zum anderen bestünde die Möglichkeit, daß CGM1 in verschiedenen Allel-Formen existiert. Letzteres ist aus zweierlei Gründen die wahrscheinlichere Ursache. Zum einen wurden in dieser Arbeit die Produkte aus drei verschiedenen PCR-Ansätzen sequenziert, die alle drei ein Adenin an Position 99 aufwiesen und sonst keinerlei Abweichungen von der vorbeschriebenen Sequenz zeigten. Zum anderen ist dieselbe Abweichung in der CGM1-Sequenz auch schon von Nagel et al. 1993 beschrieben worden ist. Damals fand sich bei CGM1a an der oben genannten Position ein Thymin, bei CGM1c ein Adenin.

Es gibt bisher keine Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieses Polymorphismus in der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a. So liegen die Stellen, an denen es auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch kommt, nicht in den Konsensus-Motiven für Proteinkinasen. Es ändert sich also nichts an den Phosphorylierungsmöglichkeiten in der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a und den hierüber vermittelbaren Signaltransduktionsvorgängen.

Das CGM1a-PCR-Produkt wurde in *E. coli* SG13009 exprimiert. Die Aufreinigung des Bakterienlysats ergab ein Protein, das mit der Bande bei 8,1 kDa des Low-Weight-Protein-Markers lief. Dies entsprach ungefähr dem errechneten Gewicht des CGM1a-Expressionsproduktes von ca. 8,2 kDa. In der Negativkontrolle zeigte sich keine Proteinbande, so daß man davon ausgehen konnte, daß das aufgereinigte Protein tatsächlich der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a entsprach.

Bei der Aufreinigung des Expressionsproduktes durch einen Imidazolgradienten ergab sich die Schwierigkeit, daß regelmäßig auch eine Bande zwischen 16 - 17 kDa aufgereinigt wurde. Diese ließ sich nur schwerlich mittels eines weiteren Imidazolgradienten unter Zusatz von 10% Glycerol von dem eigentlichen Expressionsprodukt bei 8,1 kDa trennen konnte. In einer anderen Arbeit dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß monoklonale CGM1a-Antikörper an diese verunreinigende Bande binden, sie also einen CGM1a-Anteil besitzen muß (Ergebnisse bislang unveröffentlicht). Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, wie es zu dieser Bande

kommt. Eine Erklärung wäre die Assoziation der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a mit einem zweiten, unbekanntem Protein aus dem Bakterienlysat, das ebenfalls ein ungefähres Molekulargewicht von 8 –9 kDa besitzen müßte.

Die wahrscheinlichere Erklärung für die genannte Bande ist jedoch eine Dimer-Bildung des CGM1a-Expressionsproduktes, also die Assoziation zweier zytoplasmatischer Domänen von CGM1a. Nicht zu klären ist hierbei, ob die Dimerisation über die eigentlichen Anteile der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a erfolgt oder etwa durch die im Expressionssystem zugefügten Histidinreste vermittelt wird. Es gibt jedoch Hinweise, die nahelegen, daß die Dimerisation durch die CGM1a-Anteile selbst erfolgen könnten. So weiß man von BGP, einem eng verwandten Protein aus der CEA-Familie, daß seine zytoplasmatischen Domänen assoziieren können (Hunter et al. 1996). Von anderen Rezeptoren, die selber eine Tyrosinkinase-Aktivität besitzen, ist bekannt, daß sie nach Bindung von Liganden an der Zelloberfläche dimerisieren. Über diese Dimerisation erfolgt dann eine Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalwege. Der Schluß liegt nahe, daß auch CGM1a und BGP nach Bindung extrazellulärer Liganden dimerisieren könnten und durch diese Dimerisation dann weitere Signalkaskaden in Gang gesetzt würden.

Mit der aufgereinigten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a wurde nun untersucht, ob sie mit Tyrosinkinasen der SRC-Familie interagiert.

Zunächst wurde untersucht, ob SRC-Kinase selbst mit der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a interagiert. Es zeigte sich, daß SRC-Kinase die zytoplasmatische Domäne von CGM1a *in-vitro* phosphoryliert. Auffällig bei diesem Phosphorylierungsansatz war, daß mittels Phosphotyrosin-Antikörper im Western-Blot zwei Banden detektiert wurden. Eine dieser Banden lief ungefähr auf Höhe der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a, die andere lief bei einem etwas höheren Molekulargewicht.

Wie bereits besprochen, besitzt die zytoplasmatische Domäne von CGM1a zwei Tyrosinreste, die in einem Konsensusmotiv für Kinasen der SRC-Familie liegen. Dieses Konsensusmotiv wird vor allem durch die vier Aminosäuren vor und nach dem Tyrosin bestimmt.

Das allgemeine Motiv für Kinasen der SRC-Familie sieht folgendermaßen aus:

hydrophhile AS - hydrophhile AS - hydrophobe AS - **Y** - hydrophhile AS - hydrophhile AS - hydrophobe AS

Im einzelnen sind die optimalen Konsensussequenzen jedoch für die jeweiligen Mitglieder der SRC-Familie verschieden und bewirken deren unterschiedliche Substratspezifitäten..

So phosphoryliert SRC-Kinase bevorzugt Tyrosine, die in folgendem Motiv liegen:

-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
D	E/D	E/D/G	I/V/L	Y	G/E	E	F/I	F

(im „one-letter“-Aminosäurecode, nach Songyang et al. 1995)

Die Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a liegen in folgenden Sequenzen: AASIYEELL und NTNIYCRMN. Man erkennt, daß der erste Tyrosinrest in nahezu optimaler Erkennungssequenz für SRC-Kinase liegt, während der zweite Tyrosinrest hingegen in einer deutlich schlechteren Sequenz liegt. Es sind bisher nur wenig andere Proteine beschrieben, die einen Tyrosinrest in ähnlich gutem Erkennungsmotiv für SRC-Kinase besitzen. Diese anderen Proteine sind humanes Rb-assoziiertes rb 110 (LSKRYEEIY), bovine, β -adrenerge Rezeptor-Kinase (LVEFYEEIK) und Mäuse-Immunoglobulin ϵ Rezeptor β (DDRLYEELN) (Songyang et al. 1993).

Vor diesem Hintergrund lassen sich nun die beiden oben genannten Banden im Western-Blot erklären. Es ist davon auszugehen, daß es sich bei den beiden Banden um einfach bzw. zweifach tyrosinphosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a handelt. Diese würden erwartungsweise in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterschiedliche Motilität aufweisen, da eine einfache bzw. zweifache Phosphorylierung eine unterschiedliche Ladung des Gesamtmoleküls bewirkt. Man kann die Vermutung aufstellen, daß die untere, stärkere Bande der einfach phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a entspricht und daß die obere Bande, die im Western-Blot ein schwächeres Signal gibt, die an beiden Tyrosinresten phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a darstellt. Daß sie schwächer als die

untere Bande ausfällt, könnte man dann damit erklären, daß das Tyrosin in der schlechteren Sequenz für SRC-Kinase quantitativ weniger phosphoryliert wird.

In einem weiteren Versuch sollte herausgefunden werden, ob andere Kinasen der SRC-Familie ebenfalls die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a phosphorylieren. Zum Versuchszeitpunkt waren nur zwei weitere Kinasen dieser Familie, nämlich LYN- und LCK-Kinase, käuflich zu erwerben, so daß nur diese beiden untersucht wurden. LYN-Kinase wird in Zellen verschiedener Gewebe exprimiert, so auch in Granulozyten, LCK-Kinase ist hingegen bisher nur in Lymphozyten beschrieben worden (Bolen et al. 1992).

Es zeigte sich, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a auch durch LYN- und LCK-Kinase *in-vitro* phosphoryliert wird, allerdings in wesentlich geringerem Maße als durch SRC-Kinase.

Die unterschiedlich starke Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a durch die drei verschiedenen Kinasen läßt sich anhand der unterschiedlichen Konsensusmotive erklären.

Die Substratspezifität von LYN- und LCK-Kinase sieht folgendermaßen aus:

	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	
Lck	X	E	X	I/V/L/F	Y	G/A	V	L/V/F/I	F/L/V/I	
Lyn	D	E	E	I/L	Y	E	E	L	X	

(nach Songyang et al. 1995)

Ein Tyrosinrest des CGM1a liegt also in einem guten Konsensusmotiv für LYN-Kinase, während keines der beiden Tyrosine des CGM1a im Konsensusmotiv für LCK-Kinase liegt. Dies entspricht dem Versuchsergebnis, daß LYN-Kinase die zytoplasmatische Domäne von CGM1a deutlich stärker phosphoryliert als LCK-Kinase. Eine Interaktion von LCK-Kinase mit CGM1a *in-vitro* wäre nicht weiter von Interesse, da sie aufgrund des ausschließlichen Vorkommens von LCK-Kinase in Lymphozyten *in-vivo* keine Bedeutung hätte. Anders bei SRC- und LYN-Kinase: beide werden auch in Granulozyten exprimiert, so daß die

beschriebene Phosphorylierung des CGM1a durch diese Kinasen *in-vitro* Hinweise auf mögliche Vorgänge *in-vivo* liefert.

Insgesamt kann man nach Betrachtung der Literatur und der erhaltenen Ergebnisse davon ausgehen, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a spezifisch durch SRC-Kinase phosphoryliert wird.

In einem weiteren Versuch wurde die Bindung verschiedener SH2-Domänen an die zytoplasmatische Domäne von CGM1a untersucht.

Die SRC-Homologiedomäne (SH2-Domäne) umfaßt ca. 100 Aminosäuren. Sie findet sich in einer Vielzahl von Proteinen, die an intrazellulären Signalübertragungsprozessen beteiligt sind. SH2-Domänen binden an Phosphotyrosinreste in charakteristischen Aminosäuresequenz-Motiven, wobei die SH2-Domänen verschiedener Proteine geringe strukturelle Abweichungen aufweisen und somit auch verschiedene Motive erkennen. Die Funktion von SH2-Domänen liegt in der festen Bindung der Kinase ans Substrat (Koch et al. 1991).

Ein Tyrosinrest der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a liegt nicht nur in einer guten Konsensussequenz, um von Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert zu werden, sondern außerdem in einem guten Motiv für die Bindung von SRC-SH2-Domänen. Ob eine solche Bindung stattfindet, sollte in einem weiteren Versuch geprüft werden. Zusätzlich wurden zwei weitere SH2-Domänen, nämlich die SH2-Domänen von Phospholipase-C γ (PLC γ) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) untersucht. Alle drei untersuchten Enzyme sind Proteine, die über ihre SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste von Rezeptor-Tyrosinkinasen binden und so für die Weiterleitung von Signalen in die Zelle zuständig sind.

Die drei SH2-Domänen wurden mit phosphorylierter zytoplasmatischer Domäne von CGM1a präzipitiert. Es zeigte sich, daß sowohl SRC-, PI3- und PLC γ -SH2-Domänen an CGM1a *in-vitro* binden, wobei die SRC-SH2-Domäne am stärksten bindet.

Dies läßt sich einfach erklären, wenn man sich die Konsensusmotive der jeweiligen SH2-Domänen anschaut und mit den Motiven der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a

vergleicht. Ausschlaggebend für die Bindung einer SH2-Domäne ist ein Phosphotyrosin, sowie die nächsten drei Aminosäuren C-terminal.

Die Konsensusmotive im „one-letter“ Aminosäurecode der untersuchten SH2-Domänen sind nachfolgend dargestellt.

	Y	+1	+2	+3
SRC-SH2	Y	E/D/T	E/N/D	I/V/M/L
PLCγ-SH2	Y	L/I/V	E/D	L/I/V
PI3-SH2	Y	X	X	M

(nach Cantley et al. 1991, Liu et al. 1993, Songyang et al. 1993, Breeze et al. 1996)

Die Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a liegen, wie bereits erwähnt, in folgenden Konsensusmotiven: YEEL und YCRM. Vergleicht man diese mit den Motiven für die drei untersuchten SH2-Domänen, so stellt man fest, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a das optimale Bindungsmotiv für die SRC-SH2-Domäne besitzt. Die Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne liegen jedoch nicht in den bevorzugten Sequenzen für PLC γ - und PI3-SH2-Domänen. Dieser theoretische Hintergrund zusammen mit dem Versuchsergebnis zeigen, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a spezifisch an die SRC-SH2-Domäne bindet.

Beide bisher besprochenen *in-vitro*-Versuche geben einen Hinweis darauf, daß die Signalübertragung durch CGM1a innerhalb der Zelle möglicherweise im Zusammenspiel mit SRC-Kinase erfolgt.

Um weiteren Aufschluß darüber zu erhalten, sollte untersucht werden, ob SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a *in-vitro* aktiviert wird.

Zunächst wurde ein Vorversuch mit einem synthetisch hergestellten Phosphopeptid, das einem Sequenzstück der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a entsprach, durchgeführt. Das verwendete CGM1a-Phosphopeptid sah folgendermaßen aus: Arg-Thr-Ala-Ala-Ser-Ile-

Tyr(PO₃H₂)-Glu-Glu-Leu-Leu-Lys-His, beinhaltet also den Tyrosinrest der zytoplasmatischen Domäne, der in dem besseren Konsensusmotiv für SRC-Kinase liegt.

Dieses Phosphopeptid wurde mit SRC-Kinase und Enolase, einem bekannten Substrat der SRC-Kinase, inkubiert. Man sah, daß durch Zugabe des Phosphopeptids zum einen die Enolase, also das Substrat der SRC-Kinase, stärker phosphoryliert wurde und zum anderen auch die SRC-Kinase selbst stärker autophosphoryliert wurde. Dieses Ergebnis läßt sich durch ein Modell erklären, in dem die SRC-Kinase durch das CGM1a-Phosphopeptid aktiviert wird und somit sowohl ihre Substrate als auch sich selbst stärker phosphoryliert. Brümmer et al. zeigten in einem ähnlichen Versuch, daß die Aktivität von SRC-Kinase signifikant durch zwei verschiedene BGP-Phosphopeptide, die jeweils einen Tyrosinrest enthielten, stimuliert wurde (Brümmer et al. 1995). SRC-Kinase wurde deutlich stärker durch die beiden BGP-Phosphopeptide aktiviert als durch ein SRC-Phosphopeptid, das den Tyrosinrest des C-tails der Kinase enthielt. Da die Tyrosinreste des CGM1a in noch besseren Konsensusmotiven für SRC-Kinase liegen als die des BGP, kann man davon ausgehen, daß SRC-Kinase ebenfalls durch das CGM1a-Phosphopeptid stärker aktiviert wird als durch das SRC-Phosphopeptid.

In einem weiterführenden Versuch wurde die rekombinant exprimierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a in steigender Konzentration mit SRC-Kinase und Enolase inkubiert. Dieser Versuch zeigte, daß auch die gesamte zytoplasmatische Domäne von CGM1a eine stärkere Phosphorylierung von Enolase und SRC-Kinase ergab, als im Ansatz, der nur Enolase und SRC-Kinase enthielt. Zusätzlich konnte man erkennen, daß die Phosphorylierung von Kinase, Enolase und zytoplasmatischer Domäne abhängig von der zugefügten Menge an zytoplasmatischer Domäne des CGM1a war. Die Phosphorylierung war umso stärker, je mehr CGM1a-zytoplasmatische Domäne man dazugab.

Diese deutlich stärkere Phosphorylierung von Enolase, zytoplasmatischer Domäne des CGM1a und SRC-Kinase in Abhängigkeit von der zugefügten CGM1a-Menge ist Ausdruck einer Aktivierung der SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a. Die möglichen Mechanismen dieser Aktivierung sollen im folgenden besprochen werden.

Der inaktive Zustand der SRC-Kinase wird durch eine intramolekulare Bindung bewirkt. Und zwar bindet ein Phosphotyrosinrest, welcher im sogenannten „C-tail“ der Kinase sitzt (Y530), an die SRC-eigene SH2-Domäne. Hierdurch wird das katalytische Zentrum der SRC-Kinase inaktiviert. Eine Aktivierung der Kinase kann nun grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann das Tyrosin im C-tail dephosphoryliert und somit die Bindung an die SRC-SH2-Domäne gelöst werden. Diese Dephosphorylierung könnte eventuell sogar durch die Kinase selbst geschehen, denn es ist nachgewiesen, daß SRC-Kinase auch Dephosphorylierungsreaktionen katalysieren kann (Boerner et al. 1995). Zum anderen kann ein höher affiner Ligand für die SRC-SH2-Domäne (mit einem Phosphotyrosin in einem besseren Erkennungsmotiv) den C-tail aus der Bindung verdrängen. Durch beide Mechanismen wird das katalytische Zentrum der Kinase freigegeben. Im Zuge dessen kommt es zur Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes, der innerhalb der Kinase-Domäne liegt (Y 419), und nachfolgend zu einer Aktivierung der SRC-Kinase (Boerner et al. 1995).

Für die Aktivierung von SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a sind durchaus beide besprochenen Wege möglich. Wie bereits besprochen, besitzt die zytoplasmatische Domäne von CGM1a ein sehr gutes Konsensusmotiv für SRC-SH2-Domänen und wird durch diese *in-vitro* präzipitiert. Somit könnte es durchaus durch eine Verdrängung des SRC-eigenen C-tails an der SH2-Domäne durch CGM1a zur Kinasen-Aktivierung kommen. Dieser Mechanismus der Kinasen-Aktivierung ist in Abb. 4.1. dargestellt.

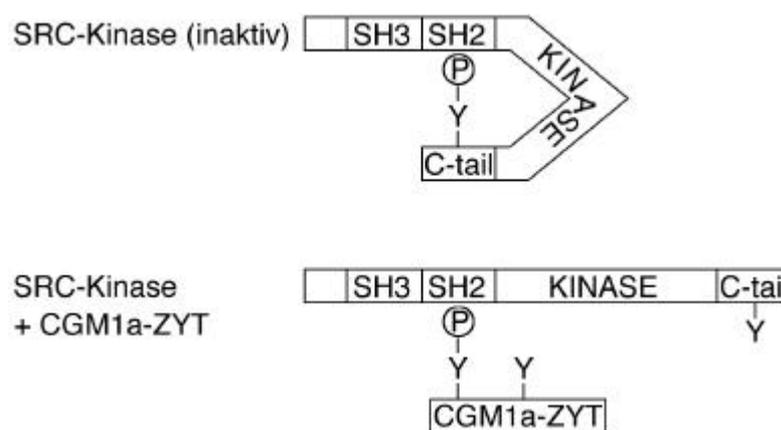


Abbildung 4.1: Aktivierung von SRC-Kinase durch CGM1a-ZYT

(SH3 = SRC-Homologiedomäne 3, SH2 = SRC-Homologiedomäne 2, Y = Tyrosinrest, Y-P = phosphorylierter Tyrosinrest, CGM1a-ZYT = zytoplasmatische Domäne von CGM1a)

Es ist aber ebenso möglich, daß die SRC-Kinase sich bei Zugabe des Substrates CGM1a selbst dephosphoryliert und somit selbst aktiviert. Welche Art der Aktivierung bei diesem Versuch tatsächlich ablief, kann hier nicht eindeutig geklärt werden.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß erstens CGM1a ein Substrat von LYN- und SRC-Kinase ist, durch diese also *in-vitro* phosphoryliert wird, daß zweitens CGM1a *in-vitro* an SRC-SH2-Domäne bindet und daß drittens CGM1a SRC-Kinase *in-vitro* aktiviert. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern diese gefundenen Interaktionen zwischen CGM1a und SRC- bzw. LYN-Kinase auch *in-vivo* eine Rolle spielen könnten.

Wie eingangs erwähnt, ist für CGM1a bekannt, daß es homophile und heterophile Zelladhäsion vermittelt (McCuaig et al. 1992). Zudem ergaben neuere Studien, daß CGM1a die Bindung und Internalisierung von *Neisseria gonorrhoeae*, dem Erreger der Gonorrhoe, vermittelt (Gray-Owen et al. 1997, Chen et al. 1997). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der bekannten Vorgänge, die bei der Phagozytose ablaufen, kann man die Vermutung aufstellen, daß CGM1a eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die eine Interaktion mit Kinasen der SRC-Familie beinhaltet.

Diese Theorie soll im folgenden näher erläutert werden. Dazu benötigt man einen kurzen Überblick über die bekannten Abläufe während der Phagozytose. Relativ gut untersucht sind Phagozytose-Vorgänge, die durch B- und T-Zell-Antigen-Rezeptoren vermittelt werden. Diese besitzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne ein oder mehrere „ITAMs“ (Immunoreceptor-Tyrosine-based-Activation-Motif). Dieses ITAM besteht aus zwei YXXL-Sequenzen, die durch sieben bis acht Aminosäuren getrennt werden (Reth et al. 1989). Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zunächst zur Bindung von Kinasen der SRC-Familie an das ITAM. Dabei bindet die Kinase nicht mit der SH2-Domäne sondern mit ihrer sogenannten „spezifischen Domäne“ an das unphosphorylierte ITAM (Timson-Gauen et al. 1992). Die „spezifische Domäne“ ist die Domäne, die die größten Sequenzunterschiede unter den Kinasen aufweist und vermutlich für deren Spezifität verantwortlich ist. Entsprechend binden verschiedene ITAMs unterschiedliche Kinasen der SRC-Familie (Johnson et al. 1995).

Im weitem Verlauf kommt es durch sogenanntes „Cross-linking“, also Assoziation, der extrazellulären Domänen der Rezeptoren intrazellulär zu einer Aktivierung der gebundenen SRC-Kinasen. Diese Aktivierung der SRC-Kinasen resultiert in einer Phosphorylierung des ITAMs an seinen beiden Tyrosinen (Chan et al. 1994, Samelson et al. 1994). An das nun zweifach phosphorylierte ITAM binden nachfolgend weitere Tyrosinkinase. Diese Bindung wird durch die SH2-Domänen der Tyrosinkinase vermittelt.

Die Tyrosinkinase, die an das ITAM binden, sind in T-Lymphozyten ZAP70 oder SYK-Kinase (Isakov et al. 1995), in B-Lymphozyten SRC- oder SYK-Kinase (Campbell et al. 1991). Im Rahmen dieser Bindung werden die Kinasen dann wiederum durch Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert und somit aktiviert (Iwashima et al. 1994). Man geht davon aus, daß diese aktivierten Kinasen dann weitere Signaltransduktionsvorgänge induzieren, die schließlich zur Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts und somit zur Phagozytose führen (Greenberg et al. 1995).

Nachdem die Vorgänge der Phagozytose im allgemeinen dargestellt worden sind, kann man nun auch eine Theorie über die mögliche Rolle von CGM1a bei der Internalisierung von Opa-Protein-tragenden Neisserien aufstellen. CGM1a besitzt wie die eben beschriebenen T- und B-Zell-Rezeptoren ein ITAM: YEELLKHNTIYCRM. Die C-terminale Sequenz entspricht hier zwar nicht dem geforderten Motiv YXXL, man hat jedoch herausgefunden, daß Mutationen am Leucin der C-terminalen Sequenz noch Signaltransduktionsvorgänge zulassen (Sunder-Plassmann et al. 1997). Bindet nun ein Opa-Protein-tragendes Bakterium an die extrazelluläre Domäne von CGM1a, könnte es durch Dimerisation des CGM1a an der Zelloberfläche zur Bindung und Aktivierung von Kinasen der SRC-Familie kommen. *In-vitro* wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a aktiviert wird. Die aktivierte SRC-Kinase könnte dann das ITAM des CGM1a phosphorylieren. Die Phosphorylierung von CGM1a an beiden Tyrosinen durch SRC-Kinase *in-vitro* wurde ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt.

An dieses zweifach phosphorylierte ITAM könnten dann entsprechend der oben beschriebenen Vorgänge bei B- und T-Zell-Rezeptoren SYK- oder SRC-Kinase über ihre SH2-Domänen binden und somit weitere Signaltransduktionsvorgänge bis zur Aktin-Umverlagerung in den

Neutrophilen und Phagozytose der Neisserien bewirken. Auch die Bindung von SRC-SH2-Domäne an die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a wurde *in-vitro* nachgewiesen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die in dieser Arbeit festgestellten Interaktionen zwischen CGM1a und SRC-Kinase eine Grundlage für ein Modell der initialen Signaltransduktionsvorgänge, die durch CGM1a vermittelt werden, bereiten. Diese Wege der Signalübertragung könnten durchaus bei der Internalisierung von Opa-tragenden Neisserien durch Neutrophile besritten werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spielen jedoch nicht nur in Hinsicht auf die CGM1a-vermittelte Internalisierung von Neisserien eine wichtige Rolle, sondern lassen sich auch vor dem Hintergrund eines möglichen Zusammenspiels von CGM1a mit anderen Mitgliedern des CD66-Clusters, insbesondere BGP und NCA, deuten.

Wie bereits besprochen, wurde sowohl für BGP als auch CGM1a gezeigt, daß sie durch SRC-Kinase phosphoryliert werden. Zusätzlich wurde für CGM1a gezeigt, daß SRC-SH2-Domäne an die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne bindet. Die Vermutung liegt also nahe, daß BGP und CGM1a bei der Übertragung von Signalen in die Zelle zusammenwirken könnten. An diesem Zusammenspiel könnten auch noch andere Proteine des CD66-Clusters beteiligt sein. Ein Modell hierfür ist in Abb. 4.2. dargestellt und soll im folgenden näher beschrieben werden.

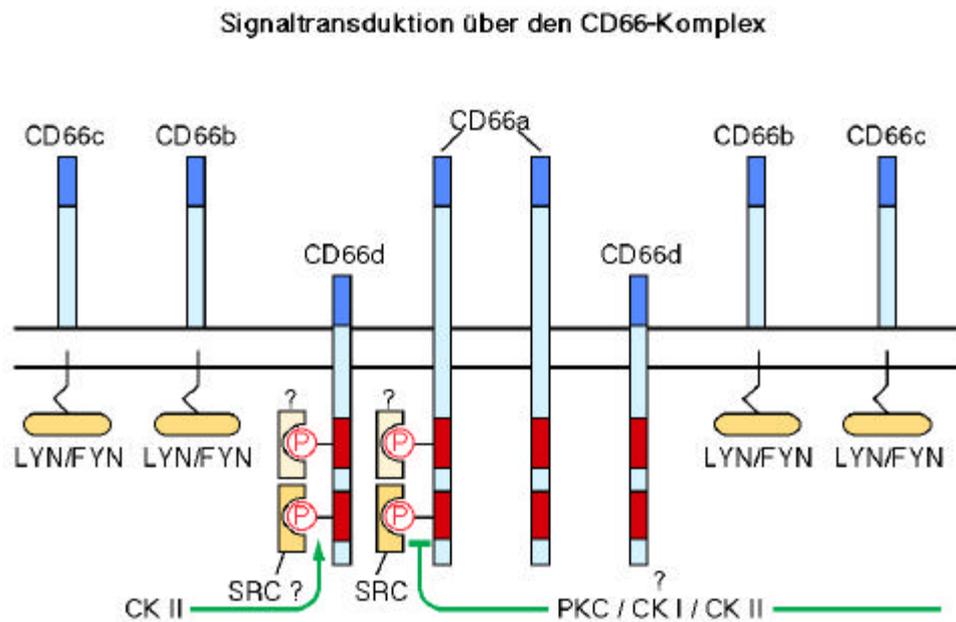


Abbildung 4.2: Signaltransduktion durch den CD66-Komplex

Ein Signal von außen könnte zu einer Vernetzung von BGP, CGM1a und anderen Mitgliedern des CD66-Clusters an der Zelloberfläche führen, da die Proteine Homologien in ihren extrazellulären Anteilen aufweisen. Einige Proteine des CD66-Clusters sind mit Kinasen der SRC-Familie assoziiert. Die beschriebene Vernetzung von CD66-Proteinen an der Zelloberfläche hätte also zur Folge, daß diese Kinasen direkt an die Tyrosinreste in den zytosomatischen Domänen anderer CD66-Mitglieder herangeführt würden. Diese würden daraufhin phosphoryliert, was wiederum eine Bindung von SRC-Kinase an diese phosphorylierten Tyrosinreste nach sich ziehen könnte. Die so gebundene SRC-Kinase würde aktiviert und könnte dann andere BGP- und CGM1a-Moleküle, andere Mitglieder des CD66-Clusters oder auch bislang unbekannte Bindungsproteine phosphorylieren. Diese könnten dann noch weitere SRC-Kinasen binden, so daß es insgesamt zu einer lokalen Ansammlung vieler aktivierter SRC-Kinasen an der Zelloberfläche kommen würde. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, daß auch andere Proteine als SRC-Kinase mit den phosphorylierten Mitgliedern des CD66-Clusters assoziieren (z.B. SHP-1, SHP-2, CAP-80, Calmodulin).

Es ist bekannt, daß es nach Aktivierung von SRC-Kinasen in der Zelle zu einer Aktivierung sogenannter RAS-Proteine kommt. RAS-Proteine sind in der Lage, GTP zu binden und zu hydrolysieren. Sie stellen eine zentrale Schaltstelle in der Signalübertragung extrazellulärer

Signale zum Zellkern dar. Die CD66-vermittelte Signalübertragung extrazellulärer Signale zum Zellkern könnte also via SRC-Kinase und verschiedener anderer Adaptorproteine zu einer Aktivierung von RAS-Proteinen führen, welche dann über Aktivierung weiterer, hier nicht näher besprochener Proteine zu einer Antwort im Zellkern führen würde.

Ein Vorgang, bei dem es zu einem Zusammenwirken der Mitglieder des CD66-Clusters kommen könnte, ist die im vorigen Kapitel besprochene Internalisierung von *Neisseria gonorrhoeae*. Es wurde nämlich außer für CGM1a auch für BGP und NCA herausgefunden, daß sie die Bindung und Internalisierung von *Neisseria gonorrhoeae* fördern (Gray-Owen et al. 1997). Es ist also durchaus ein Szenario denkbar, bei dem diese drei Proteine des CD66-Clusters in der oben beschriebenen Weise, sich gegenseitig verstärkend, Signalkaskaden initiieren, die dann zur Internalisierung der gebundenen Bakterien führen.

Beachtung verlangt schließlich noch die Tatsache, daß BGP und NCA in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden (Culic et al. 1992), CGM1a jedoch bisher nur in Granulozyten detektiert werden konnte. Dies könnte eventuell darauf hindeuten, daß die Rolle des CGM1a in Granulozyten darin bestehen könnte, andere Proteine des CD66-Clusters, wie eben BGP und NCA, in ihrer Funktion verstärkend zu unterstützen. Ob dies der Fall ist oder CGM1a selbst eine bedeutende Funktion innehat, ist jedoch in Zukunft noch zu klären.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von CGM1a mit Tyrosinkinase der SRC-Familie untersucht werden. CGM1a ist ein Mitglied der CEA-Familie, einer Gruppe von Proteinen, die der Immunglobulin-Superfamilie angehören.

CGM1a hat man bisher nur in Granulozyten detektieren können. Neueren Erkenntnissen zufolge vermittelt es die Bindung und Internalisierung Opa-Protein tragender *Neisseria gonorrhoeae* *in-vitro* und *in-vivo*. CGM1a besitzt in seiner zytoplasmatischen Domäne ein sogenanntes ITAM-Motiv, das man von einer Reihe anderer Rezeptoren kennt, die an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind. Fraglich ist, ob erstens eine solche Interaktion zwischen ITAM und Tyrosinkinase auch bei CGM1a stattfindet und zweitens, welche Tyrosinkinase daran beteiligt sein könnten. Offen ist weiterhin, ob durch diese Vorgänge die Internalisierung von Bakterien zu erklären wäre.

Es wurde gezeigt, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a sowohl durch LYN- als auch SRC-Kinase *in-vitro* phosphoryliert wird. In sehr geringem Maße erfolgt auch eine Phosphorylierung durch LCK-Kinase.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne von CGM1a durch verschiedene SH2-Domänen *in-vitro* präzipitiert wird. Untersucht wurde die Bindung mit SH2-Domänen von SRC-Kinase, Phospholipase-C γ (PLC γ) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3). Am stärksten wurde die SRC-SH2-Domäne, am schwächsten die PI3-SH2-Domäne gebunden.

Als letztes konnte beobachtet werden, daß SRC-Kinase durch die zytoplasmatische Domäne von CGM1a *in-vitro* konzentrationsabhängig aktiviert wird, und zwar umso stärker, je größer die CGM1a-Menge war, die man dem Reaktionsansatz hinzufügte.

Es wurde in dieser Arbeit also eine spezifische Interaktion zwischen CGM1a und SRC-Kinase *in-vitro* festgestellt. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob eine entsprechende Interaktion auch *in-vivo* stattfindet.

6. Literaturverzeichnis

Afar, D.E.H., Stanners, C.P., Bell, J.C. (1992). Tyrosine phosphorylation of biliary glycoprotein, a cell adhesion molecule related to carcinoembryonic antigen. *Biochem. Biophys. Acta* 1134, 46-52.

Anderson, D., Koch, C.A., Grey, L. Ellis, C., Moran, M.F., Pawson, T. (1990). Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250, 979-982.

Arakawa, F., Kuroki, M., Misumi, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., Matsuoka, Y. (1990). Characterization of a cDNA clone encoding a new species of the nonspecific crossreacting antigen (NCA), a member of the CEA gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 1063-1071.

Brandriff, B.F., Gordon, L.A., Tynan, K.T., Olsen, A.S., Mohrenweiser, H.W., Fertitta, A., Carrano, A.V., Trask, B.J. (1992). Order and genomic distances among members of the CEA gene family determined by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 12, 773-779.

Barnett, T.R., Pickle, W., Rae, P.M.M., Hart, J., Kamarck, M., Elting, J. (1989). Human pregnancy-specific α 1-glycoproteins are coded within chromosome 19. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 890-893.

Barnett, T.R., Kretschmer, A., Austen, D.A., Goebel, S.J., Hart, J.T., Elting, J.J., Kamarck, M.E. (1989). Carcinoembryonic antigens: Alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J. Cell. Biol.* 108, 267-276.

Barnett, T.R., Zimmermann, W. (1990). Proposed nomenclature for the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family. *Tumor Biol.* 11, 59-63.

Barnett, T.R., Drake, L., Pickle, W. (1993). Characterization of a family of novel alternative spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1273.

Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A., Stanners, C.P. (1987). Isolation and characterization of full length cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3221-3230.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57, 327-334.

Berling, B., Kolbinger, F., Grunert, F., Thompson, J.A., Brombacher, F., Buchegger, F., von-Kleist, S., Zimmermann, W. (1990). Molecular cloning of a carcinoembryonic antigen (CEA) gene family member expressed in leukocytes of chronic myeloid leukaemia patients and bone marrow. *Cancer Res.* 50, 6534-6539.

Boerner, R.J., Kassel, D.B., Edison, A.M., Knight, W.B. (1995). Examination of the dephosphorylation reactions catalyzed by pp60c-src tyrosine kinase explores the roles of autophosphorylation and SH2 ligand binding. *Biochemistry* 34, 14852-14860.

Bolen, J.B., Rowley, R.B., Spana, C. (1992). The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J.* 6, 3403-3409.

Bos, M.P., Hogan, D. and Belland, R.J. (1997). Selection of Opa+ *Neisseria gonorrhoeae* by limited availability of normal human serum. *Infect-Immun.* 65, 645-50.

Bos, M.P., Grunert, F. and Belland, R.J. (1997). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect-Immun.* 65, 2353-61.

Bos, M.P., Kuroki, M., Krop-Watorek, A., Hogan, D., Belland, R.J. (1998). CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 9584-9.

Breeze, A.L., Kara, B.V., Barratt, D.G., Anderson, M., Smith, J.C., Luke, R.W., Best, J.R., Cartlidge, S.A. (1996). Structure of a specific peptide complex of the carboxy-terminal SH2 domain from the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J.* 15, 3579-3589.

Brümmer, J., Neummaier, M., Göpfert, C., Wagener, C. (1995). Association of pp60 c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11, 1649-1655.

Campbell, M.A., Sefton, B.M. (1992). Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the src-family of protein tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2315.

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal-transduction. *Cell* 64, 281-302.

Caruthers, M.H., Brill, W.K., Grandas, A., Ma, Y.X., Nielsen, J., Tang, J.Y.(1989) Synthesis of oligodeoxynucleoside phosphorodithioates. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 21, 119-20.

Chan, A., Desai, D.M., Weiss, A. (1994). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 555-92.

Chen, T., Gotschlich, E. (1996). CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*93, 14851-14856.

Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A., Gotschlich, E.C. (1997). Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *J. Exp. Med.* 185, 1557-64.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform-extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H. (!989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2172-5.

Cohen, G.B., Ren, R. Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-243.

Cooper, J.A., Howell, B. (1993). The when and how of Src regulation. *Cell* 73, 1051-1054.

Culic, O., Huang, Q.H., Flanagan, D., Hixson, D., Lin, S.H. (1992). Molecular cloning and expression of a new rat liver cell-CAM105 isoform. Differential phosphorylation of isoforms. *Biochem. J.* 285, 47-53.

Daniel, S., Nagel, G., Johnson, J., Lobo, F.M., Hirn, M., Jantscheff, P., Kuroki, M., von-Kleist, S., Grunert, F. (1993). Determination of the specificity of monoclonal antibodies recognizing members of the CEA-family using a panel of transfectants. *Int. J. Cancer* 55, 303-310.

Diagen Application Protocols (1990). *The Quiagenologist* (3rd Edition), Diagen GmbH, Düsseldorf.

Ducker, T.P., Skubitz, K.M. (1992). Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *Leukocyte Biol.* 52, 11-6.

Duesburg, P.H., Vogt, P.K. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 1673.

Erpel, T., Courtneige, S.A. (1995). Src family protein kinases in signal transduction pathways. *Cell Biol.* 7, 176-182.

Gold, P., Freeman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122, 467-481.

Gold, P., Freedman, S.O. (1965). Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 121, 439-462.

Grassme, H.U.C., Ireland, R.M., van Putten, J.P.M. (1996) Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infect. Immun.*, 64, 1621-1630.

Gray-Owen, SD, Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., Meyer, T.F. (1997). CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO. J.* 16, 3435-45.

Greenberg,S. (1995). Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell. Biol.* 5, 93-99.

Grunert, F., Soubt, N., Jantscheff, P et al. (1994). Specificity and epitope of CD66 monoclonal antibodies. In: Schlossman, S., Boumsell, L., Gilks, W. et al., eds. *Leukocyte typing V*, Oxford: Oxford University Press.

Hanenberg, H., Baumann,M., Quentin,I., Nagel, G., Grosse-Wilde, H., von-Kleist, S., Gobel, U., Burdach, S., Grunert, F. (1994). Expression of the CEA Gene Family Members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemias (ALLs) and in Cell Lines of B-Cell Origin. *Leukemia* 12, 2127-2133.

Hauck, C.R., Lorenzen, D., Saas, J., Meyer,T.F. (1997) An in-vitro-differentiated human cell line as a model system to study interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with phagocytic cells. *Infect. Immun.*, 65, 1863-1869.

Hauck, C.R., Meyer, T.F., Lang, F., Gulbins, E. (1998). CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *Embo.J.* 17, 443-54.

Hefta, S.A., Hefta, L.J.F., Lee, T.D., Paxton, R.J., Shively, J.E. (1988). Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: Identification of the ethanolamine linkage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4648.

Hennipman, A., van Oirshot, B.A., Smits, J., Rijksen, G., Staal, G.E. (1989). Tyrosine kinase activity in breast cancer, benign breast disease, and normal breast tissue. *Cancer Res.* 49, 516-521.

Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S.A., Drzeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L.J., Shively, J.E., Paxton, R.J. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6959-6963.

Hsieh, G.T., Luo, W., Song, W., Wang, Y., Kleinerman, D.I., Van, N.T., Lin, S.H. (1995). Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Research* 55, 190-197

Hunter, T., Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1311.

Hunter, I., Hiroki, S., Edlund, M., Öbrink, B. (1996). Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem. J.* 320, 847-853.

Isakov, N., Wange, R.L., Byrgess, W.H., Watts, J.D., Aebersold, R., Samelson, L.E. (1995). ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J. Exp. Med.* 181, 375-380.

Iwashima, M., Irving, B.A., van-Oers, N.S.C., Chan, A.C., Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.

Johnson, S.A., Pleiman, C.M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., Cambier, J.C. (1995). Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. of Immunol.* 155, 4596-4603

Kamarck, M.E., Elting, J.J., Hart, J.T., Goebel, S.J., Rae, P.M., Nothdurft, M.A., Nedwin, J.J., Barnett, T.R. (1987). Carcinoembryonic antigen family: Expression in a mouse alpha-cell transfectant and characterization of a partial cDNA in bacteriophage lambda γ 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5350-5354.

Keegan, A., Paul, W. (1992). Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signalling pathway. *Immunol. Today*. 13, 63-68.

Khan, W.N., Frangmyr, L., Teglund, S., Israelsson, A., Bremer, K., Hammarstrom, S. (1992). Identification of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics* 1, 384-390.

Khan, W.N., Teglund, S., Bremer, K., Hammarstrom, S. (1992). The pregnancy-specific glycoprotein family of the immunoglobulin superfamily: Identification of new members and estimation of family size. *Genomics* 12, 780-787.

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 252, 668-674.

Kuijpers, T.W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L.J., Nagel, G., van-der-Schoot, C.E., Grunert, F., Roos, D. (1992). CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in adhesion of neutrophil to cytokin activated endothelial cells. *J. Cell Biol.* 118, 457-466.

Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuo, Y., Oikawa, S., Misumi, Y., Nakazato, H., Matsuoka, Y. (1991). Molecular cloning of nonspecific cross-reacting antigens in human granulocytes. *J. of Biol. Chem.* 266, 11810-11817.

Leusch, H.G., Drzeniek, Z., Hefta, S.A., Markos-Pusztai, Z., Wagener, C. (1991). The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA and BGP) As ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. *Int. J. Med. Microbiol.* 275, 118.

Leusch, H.G., Drzeniek, Z., Markos-Pusztai, Z., Wagener, C. (1991). Binding of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: Differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect. Immun.* 59, 2051-2057.

Liu, X, Brodeur, S.R., Gish, G., Songyang, Z., Cantley, L.C., Laudano, A.P., Pawson, T. (1993). Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the src SH2 domain. *Oncogene* 8, 1119-1126.

McCuaig, K., Turbide, C., Beauchemin, N. (1992). mmCGM1a: A Mouse Carcinoembryonic Antigen Gene Family Member, Generated by Alternative Splicing, Functions as an Adhesion Molecule. *Cell Growth & Differentiation* 3, 165-174.

Meyer, T.F. (1998). Pathogenic Neisseria- interplay between pro- and eukaryotic worlds. *Folia Microbiol.Praha* 43, 311-319.

Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T.W., Watt, S.M., Thompson, J., Zimmermann, W. (1993). Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur. J. Biochem.* 214, 27-35.

Naidu, F.L., Rest, R.F. (1991) Stimulation of human neutrophil oxidative metabolism by nonopsonized *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*, 59, 4383-4390.

Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., Wagener, C. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10744-10748.

Niemann, S.C., Schonk, D., van Dijk, P. Wieringa-B; Grzeschik, K.H., Bartels, I. (1989). Regional localization of the gene encoding pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (PSBG1) to chromosome 19q 13.1. *Cytogenet. Cell Genet.* 51, 1053.

Oikawa, S., Nakazato, H.,Kozaki, G. (1987). Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 511-518.

Oikawa, S., Mizuku, C., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G., Nakazato, H. (1989). Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: Homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 39-45.

Oikawa, S., Inuzuka, C., Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuoka, Y., Kosaki, G., Nakazato, H. (1991). A specific heterotype cell adhesion activity between members of the carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J. Biol. Chem.* 266, 7995-8001.

Ottenhoff-Kalff A.E., Rijksen G., van-Beurden E.A., Hennipman A., Michels A.A. (1992). Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer-Res.* 52, 4773-4778.

Parsons, J.T., Weber, M.J. (1989). Genetics of src: Structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 147, 79-127.

Pawson, T., Gish, G.D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71, 359-362.

Pawson, T, Schlessinger, J. (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr. Biology* 3, No 7.

Paxton, R., Mooser, G., Pande, H., Lee, T.D., Shively, J.E. (1987). Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: Identification and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 920-924.

Reth, M. (1995). The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains. *Semin. Immunol.* 5, 21-27.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.

Reynolds, A.B., Vila, J., Lansing, T.J., Potts, W.M., Weber, M.J., Parsons, J.T. (1987). Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *EMBO J.* 6, 2359-2364.

Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme, 3.Auflage: 14-16.

Rojas, M., Fuks, A., Stanners, C.P. (1990). Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin superfamily, functions as a Ca⁺⁺-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Diff.* 1, 527.

Samelson, L.E., Klausner, R.D. (1992) Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. Current research on activation via the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 24913-24916.

Sauter, S.L., Rutherford, S.M., Wagener, C., Shively, J.E., Hefta, S.A. (1991). Binding of nonspecific cross-reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to *Escherichia coli* expressing type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* 59, 2485-2493.

Shively, J.E., Beatty, J.D. (1985). CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2, 355-399.

Skubitz, K.M., Ducker, T.P., Goueli, S.A. (1992) CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine-containing protein bearing a carcinoembryonic antigen cross-reacting antigen on the surface of human neutrophils. *J. Immunol.* 148, 852

Skubitz, K.M., Campell, K.D., Ahmed, K., Skubitz, A.P.N. (1995) CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 155, 5382-5390.

Skubitz, K.M., Grunert, F., Jantscheff, P., Kuroki, M., Skubitz, A.P.N. (1997). CD66 family Workshop Panel report. *Leukocyte Typing VI*, 992-1000.

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. (1993). SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences. *Cell* 72, 767-778.

Songyang, Z., Cantley, C.C. (1995). Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *TIBS* 20, 470-475.

Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J. (1995). Catalytic specificity of protein tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536-539.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Spector, D.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1978). Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4102.

Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K. (1976). DANN related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DANN. *Nature* 260, 170.

Stocks, S.C., Albrechtsen, M., Kerr, M.A. (1990). Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine Lex) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA160. *Biochem.J.* 268, 275.

Streydio, C., Lacka, K., Swillens, S., Vassart, G. (1990). Structure, evolution and chromosomal localization of the human pregnancy specific α 1-glycoprotein gene family. *Genomics* 6, 579-592.

Sunder-Plassmann, R., Lialios, F., Madsen, M., Koyasu, S., Reinherz, E.L. (1997). Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3-ITAM are functionally distinct. *Eur. J. Immunol.* 27, 2001-2007.

Thompson, J., Zimmermann, W. (1988). The carcinoembryonic antigen gene family: Structure, expression and evolution. *Tumor Biol.* 9, 63-83.

Thompson, J.A., Mauch, E.M., Chen, F.S., Hinoda, Y., Schrewe, H., Berling, B., Barnert, S., von-Kleist, S., Shively, J.E., Zimmermann, W. (1989). Analysis of the size of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family: isolation and sequencing of N-terminal domain exons. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 3, 996-1004.

Thompson, J., Koumari, R., Wagner, K., Barnert, S., Schleussner, C., Schrewe, H., Zimmermann, W., Muller, G., Schempp, W., Zaninetta, D. (1990). The human pregnancy specific glycoprotein genes are tightly linked on the long arm of chromosome 19 and are coordinately expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 996-1004.

Thompson, J.A., Grunert, F., Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen family: molecular biology and clinical perspective. *J. Clin. Lab. Anal.* 5, 344-366.

Thompson, J., Zimmermann, W., Osthus-Bugat, P., Schleussner, C., Eades-Perner, A.M., Barnert, S., Von-Kleist, S., Willcocks, T., Craig, I., Tynan, K. (1992). Long range chromosomal mapping of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family cluster. *Genomics* 12, 761-772.

Thompson, J., Mossinger, S., Reichardt, V., Engels, U., Beauchemin, N., Kommoss, F., von-Kleist, S., Zimmermann, W. (1993). A polymerase chain reaction assay for the specific identification of transcripts encoded by individual carcinoembryonic antigen (CEA)-gene-family members. *Int. J. Cancer* 55, 311-319.

Thompson, G., Zimmermann, W., Nollau, P., Neumaier, M., Weber-Arden, J., Schrewe, H., Craig, I., Willcocks, T. (1994). CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269, 32924-32931.

Timson-Gauen, L., Kong, L.E., Samelson, L.E., Shaw, A.S. (1992). The p59fyn tyrosine kinase is associated with multiple T cell receptor subunits through its unique domain. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5438

Tynan, K., Olsen, A., Trask, B., de-Jong, P., Thompson, J., Zimmermann, W., Carrano, A., Mohrenweiser, H. (1992). Assembly and analysis of cosmic contigs in the CEA-gene family region of human chromosome 19. *Nucleic Acids Res.* 20, 1629-1636.

Van der Schoot, C.E., Daams, M., von dem Borne, A.E.G.Kr. et al. (1989). Biochemical analysis of the myeloid panel, in Knapp, W., Dorken, B., Gelks, W.R. et al.: *White Cell Differentiation Antigens: Leukocyte Typing IV*. Oxford. UK. P. 887.

Virji, M., Watt, M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R. (1996). The N-domain of the human Cd66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* 22, 926-939.

Virji, M., Makepeace, K., Freguson, D.J.P., Watt, S.M. (1996). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol. Microbiol.* 22, 941-950.

Wagener, C. (1996). Einführung in die Molekulare Onkologie. Thieme-Verlag, 1. Aufl., 64-66.

Watt, S.M., Sala-Newby, G., Hoang, T., Gilmore, D.J., Grunert, F., Nagel, G., Murdoch, S.J., Tchilian, E., Lennox, E.S., Waldmann, H. (1991). CD66 identifies a neutrophil specific epitope within the haematopoietic system that is expressed by members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules. *Blood* 78, 63.

Watt, S.M., Fawcett, J., Murdoch, S.J., Teixeira, A.M., Gschmeissner, S.E., Hajibagheri, N.M., Simmons, D.L. (1994). CD66 identifies the biliary glycoprotein (BGP) adhesion molecule: Cloning, expression and adhesion functions of the BGPc splice variant. *Blood* 84, 200-210.

Willocks, T.C., Craig, S.P., Craig, I.W. (1989). Assignment of the coding sequence of carcinoembryonic antigen (CEA) reveal a highly conserved repeating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2960-2964.

Zhou, H., Fuks, A., Stanners, C.P. (1990). Specificity of intercellular adhesion mediated by various members of the immunoglobulin supergene family. *Cell.Growth. Differ.* 1, 209-15.

Zimmermann, W., Ortlieb, B., Friedrich, R., von-Kleist, S. (1987). Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2960-2964.

Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, H.H., Shively, J.E., von-Kleist, S., Thompson, J.A. (1988). Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res.* 48, 2550-2554.

7. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BGP	Biliäres Glykoprotein
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGM	Mitglied der Carcinoembryonalen-Gen-Familie
CGM1a-ZYT	Zytoplasmatische Domäne des Carcinoembryonalen-Gen-Familien-Mitglieds 1a
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
E ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante Immunglobulin-Domäne
IgV-Domäne	variable Immunglobulin-Domäne
IPTD	Isopropylthiogalactosid
ITAM	Immunoreceptor-Tyrosin-based-Activation-Motif
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
kD	Kilodalton
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCA	Non specific Cross-reacting Antigen
OD	Optische Dichte

Opa-Protein	Opacity-associated outer membrane Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pp ^{60c-src}	SRC-Kinase
PSG	Pregnancy Specific Glykoprotein
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-Domäne	SRC-Homologie-Domäne
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetraethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Units (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Y	Tyrosin

8. Anhang

Dargestellt ist die cDNA von CGM1a sowie die entsprechende Aminosäuresequenz im Drei-Buchstaben-Aminosäure-Code.

↓L

TCCTGGAGCCCAGGCTCTTTTCCACAGAGGAGGAAAGAGCAGGCAGCAGAGACCATGGGGCCC

Met Gly Pro

CCGTCAGCCTCTCCCCACAGAGAATGCATCCCCTGGCAGGGGCTTCTGCTCACAGCCTCACTT

Pro Ser Ala Ser Pro His Arg Glu Cys Ile Pro Trp Gln Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu

↓N

CTAAACTTCTGGAACCCGCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCATGCCGCTCAGTGTC

Leu Asn Phe Trp Asn Pro Pro Thr Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Met Pro Leu Ser Val

GCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTGGCTACAGC

Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser

TGGTACAAAGGGGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTGGGATATGTAATAGGAACTCAA

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln

CAAGCTACCCAGGGGCCGCATACAGCGGTGAGAGACAATATACACCAATGCATCCCTGCTG

Gln Ala Thr Pro Gly Ala Ala Tyr Ser Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Thr Asn Ala Ser Leu Leu

ATCCAGAATGTCACCCAGAATGACATAGGATTCTACACCCTACAAGTCATAAAGTCAGATCTT

Ile Gln Asn Val Thr Gln Asn Asp Ile Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu

↓TM

GTGAATGAAGAAGCAACTGGACAGTTCATGTATACCAAGAAAATGCCCCAGGCCTTCCTGTG

Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Gln Glu Asn Ala Pro Gly Leu Pro Val

GGGGCCGTCGCCGCATCGTGACCGGGTCTGGTTCGGAGTGGCGCTGGTGGCCGCGCTGGTG

Gly Ala Val Ala Gly Ile Val Thr Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Val Ala Ala Leu Val

↓ZYT

TGTTTCCTGCTCCTTGCCAAAACCTGGAAGAACCAGCATCCAGCGTGACCTCAAGGAGCAGCAG

Lys Cys Phe Leu Leu Leu Ala Thr Gly Arg Thr Ser Ile Gln Arg Asp Leu Lys Glu Gln Gln

CCCCAAGCCCTTGCCCCTGGCCGTGGTCCCTCCCACAGCTCTGCCTTCTCGATGTCCCCTCTCTCC

Pro Gln Ala Leu Ala Pro Gly Arg Gly Pro Ser His Ser Ser Ala Phe Ser Met Ser Pro Leu Ser

T/ACTGCCC/TAGGCCCCCTACCCAACCCAGGACAGCAGCTTCCATCTATGAGGAATTGCTA

Ser Ala Gln Ala Pro Leu Pro Asn Pro Arg Thr Ala Ala Ser Ile Tyr Glu Glu Leu Leu

AAACATGACACAAACATTTACTGCCGGATGGACCACAAAGCAGAAGTGGCTTCTTAGCTTCCTCC

Lys His Asp Thr Asn Ile Tyr Cys Arg Met Asp His Lys Ala Glu Val Ala Ser ***

AGGAGCTGCTCCTGTGTGTTGATGGAGAGTCCCCAAGGCCCCAGCCCTGGGGATGGGGAAGGA

CATGAAGCCTGAGCCAGAGAACCAGCTATAAGTCCTGAGAAGACACTGGTGTCTGGGGACAGGG

AGGGATGGGGTCCCTGATGAATATCTGGAGACCTCGACAGCCTGCCCTAGGCCCTGGGTGGGTC

AGGACAAAGGCCTCTCATCACCGCAGAAAGCGGGGGCTTGCAGGGAAAGTGAATGGGCCTGTGG

CCCACCTGGGGTCACTTGAAAGGATCTGAATAAAGGGGACCCTTCCTCG

L: Leader-Peptid

N: N-terminale Domäne

TM: Transmembranöse Domäne

ZYT: Zytoplasmatische Domäne

*** Stop-Codon

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. C. Wagener, UKE Hamburg, danke ich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und insbesondere für seine großzügige Unterstützung, die es ermöglicht hat, diese Arbeit im Rahmen eines Kongresses zu präsentieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. J. Brümmer, UKE Hamburg, für die Einführung in das Arbeitsthema, die hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Neumaier bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft und die wegweisenden Tips. Den technischen Assistentinnen Kerstin Reher und Birgit Grage danke ich für ihre Hilfe bei der praktischen Laborarbeit. Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe des Hormonlabors für das hervorragende Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen während der Inkubationspausen.

Frau S. Wuttke danke ich im besonderen für die ausgezeichnete und geduldige Bearbeitung der in dieser Arbeit enthaltenen Abbildungen.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich für ihre großzügige materielle und moralische Unterstützung während der letzten Jahre.

Bei Christian bedanke ich mich für seine Großzügigkeit und außerordentliche Hilfsbereitschaft, die mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Bei Emma bedanke ich mich für das überraschende und wundervolle Jahr Baby-Pause, in dem ich diese Doktorarbeit fertigstellen konnte.

Lebenslauf

Geburtstag:	1. Juli 1970	
Geburtsort:	Helmstedt	
Familienstand:	ledig, eine Tochter	
Schulbildung	1976-1980	Grundschule Wildeshausen
	1980-1982	Orientierungsstufe Wildeshausen
	1982-1989	Gymnasium Wildeshausen, Abitur
Studium	1990	Studium der Chemie
	1990-1997	Studium der Humanmedizin
	1992	Ärztliche Vorprüfung
	1993	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
	1993	1. Teil des Amerikanischen Staatsexamens
	1996	2. Teil der Ärztlichen Prüfung
	1997	3. Teil der Ärztlichen Prüfung
AiP:	seit 01.01.1998	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....