

Untersuchungen zur Dysregulation und Funktion von Mitgliedern der CEACAM-Genfamilie im humanen Kolon

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Stefanie Nittka

aus Hamburg

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. NEUMAIER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE
Tag der Disputation: 16. Februar 2007

Hamburg, den 30. Januar 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1	EINLEITUNG	5
1.1	Struktur der Kolonmukosa	5
1.1.1	Modelle der Kolonkarzinomentstehung	6
1.1.2	Frühe Veränderungen der Kolonmukosa	9
1.2	Biologie der Zelladhäsionsmoleküle	9
1.2.1	Die Immunoglobulin Superfamilie	11
1.2.2	Die CEACAMs	12
1.3	Funktionen von CEACAM1.....	13
1.4	Die Expression von CEACAM1 und CEACAM5	14
1.5	Bekannte Regulatoren von CEACAM1	15
1.6	Stoffwechselprozesse im Kolon	16
1.7	Apoptose.....	17
1.7.1	Zellbiologische Merkmale der apoptotischen Zelle	19
1.8	Fragestellung	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Plastikware und Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.3	Glasware.....	22
2.1.4	Chemikalien und Kits.....	22
2.1.5	Enzyme.....	23
2.1.6	Gewebeproben.....	23
2.1.7	Eukaryotische Zelllinien	23
2.1.8	Bakterienstämme und Plasmide	24
2.1.9	Antikörper	25
2.1.10	Primer und Hybridisierungs Sonden	26
2.1.11	Allgemeine Lösungen und Reagenzien.....	27
2.1.12	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	29
2.2	Zellbiologische Methoden.....	30
2.2.1	Allgemeine Zellkultur	30
2.2.2	Hitzeinaktivierung von Serumzusätzen.....	30
2.2.3	Optimierung der Antikörperproduktion von Hybridomen.....	30
2.2.4	Subkultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien	31
2.2.5	Subkultivieren von Suspensionskulturen	31
2.2.6	Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl	31
2.2.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	32

2.2.8	Mycoplasmen Test	32
2.2.9	Stimulationen und Induktionen	32
2.2.10	Apoptoseassays auf zellulärer Basis	34
2.2.11	Quantifizierung der Nukleosomenbildung in Zellextrakten	35
2.2.12	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	35
2.3	Immunchemische Methoden	36
2.3.1	Präparation der Kolonmukosa.....	36
2.3.2	Immunglobulingehalt-Quantifizierung in Hybridoma-Überständen.....	37
2.3.3	Dialyse von Antikörpern	38
2.3.4	Aufreinigung von Antikörpern.....	38
2.3.5	Biotinylierung von Antikörpern.....	39
2.3.6	CAT-ELISA	40
2.3.7	Bestimmung der Proliferation von HT29 Zellen	40
2.3.8	Herstellung von Zellausstrichen für die Immunfluoreszenz	40
2.3.9	Immunfluoreszenz Färbung	41
2.3.10	Immunhistochemie an Paraffinschnitten.....	41
2.3.11	Darstellung apoptotischer Zellen im Gewebe	43
2.3.12	FACS Analyse von Antigennachweisen	44
2.3.13	Immunpräzipitation von CEACAM1	45
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	45
2.4.2	Isolation von Histonen	46
2.4.3	In vitro Deglykosylierung von Glykoproteinen	47
2.4.4	BCA-Assay zur Proteinbestimmung	48
2.4.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	48
2.4.6	Tris-Tricin Gelelektrophorese.....	49
2.4.7	Coomassie-Färbung.....	49
2.4.8	Western Blot.....	50
2.4.9	Caspase Assay	50
2.4.10	Protease Assay	52
2.4.11	Messung des Mitochondrienpotentials am FACS.....	53
2.5	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	54
2.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	54
2.5.2	Transformation von E. coli.	55
2.5.3	Klonierung.....	55
2.5.4	GITC-Lyse von eukaryotischen Zellen zur mRNA-Isolation.....	56
2.5.5	Isolation von Gesamt- RNA.....	56
2.5.6	Real-time PCR am LightCycler	57
2.5.7	Plasmid Isolation	59
2.6	Statistik und Software.....	59
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Immunhistochemische Untersuchung der Kolonmukosa.....	60
3.1.1	Expression von Antigenen der CEACAM-Genfamilie.....	62
3.1.2	β -Catenin als Indikator für Störungen von APC und Wnt-Signalweg.....	65
3.1.3	Proliferation und Apoptose in Kolonkrypten.....	67

3.2	Entwicklung eines CEACAM1-4L spezifischen Antikörpers	71
3.3	Funktionelle Untersuchungen an CEACAM1	76
3.3.1	Expression von CEACAM1	76
3.3.2	Promotoraktivität durch Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren.....	85
3.3.3	Apoptoseinduktion durch Vernetzung von CEACAM1	86
3.3.4	Intrinsischer Apoptoseweg	93
3.3.5	CEACAM1-4L Quervernetzung induziert Caspaseaktivität.....	96
3.3.6	Identifizierung aktivierter Caspasen	97
3.3.7	Fragmentierung von CEACAM1-4L	101
3.3.8	CEACAM1 wird extra- und intrazellulär gespalten.....	104
3.3.9	Proteaseaktivität in Jurkat Zelllysaten	106
3.4	HT29 – Ein Modellsystem zur Untersuchung von CEACAM1	108
3.4.1	CEACAM1-Quervernetzung in HT29	108
3.4.2	Caspaseaktivierung in CEACAM1-quervernetzten HT29.....	109
3.5	Identifikation eines natürlichen Liganden für CEACAM1	111
4	DISKUSSION.....	113
4.1	Histochemische Untersuchung der CEACAM-Expression.....	113
4.2	Untersuchung der physiologischen Funktion von CEACAM1.....	117
4.3	Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf die CEACAM Expression.....	119
4.3.1	Auswirkung der Fettsäuren auf die Promotoraktivität von CEACAM1	120
4.4	Apoptoseinduktion durch Quervernetzung von CEACAM1.....	121
4.5	Apoptoseinduktion durch eine CEACAM1-Quervernetzung.....	122
4.6	Spaltung von CEACAM1 unter Apoptose.....	124
4.7	Identifikation eines natürlichen Liganden für CEACAM1	126
5	ZUSAMMENFASSUNG	128
6	LITERATUR.....	130
7	ANHANG	144
7.1	Vektorkarten	1

1 Abkürzungsverzeichnis

ψ	Mitochondrienpotential
β	Beta
$\Delta G'_{\circ}$	Freie Reaktionsenthalpie
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
A. bidest.	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]
ACF	Aberrant crypt foci (Aberanter Krypten Focus)
ad	Auffüllen bis/ auf
AFC	7-Aminomethylcoumarin
AMC	7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöses polyposis coli
Apo1	Fas-Rezeptor, alternative Bezeichnung CD95
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchonine acid solution</i>
BGP	Biliäres Glykoprotein, veraltete Bezeichnung für CEACAM1
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CAD	DNA-fragmentierender Faktor 45
CAT	Acetyl-CoA:Chloramphenicol acetyltransferase
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (durch reverse Transkriptase umgeschriebene RNA)
CEA	Carcinoembryonales Antigen, aktuell als CEACAM5 bezeichnet
CEACAM1	Carcinoembryonales Zelladhäsionsmolekül 1
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> (Intestinale alkalische Phosphatase aus dem Kalb)
Cl	Chlorid

d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i> (Deletiert in kolorektalen Karzinomen)
DMEM	Dulbecco's Modifikation des Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i> (teilsequenzierte cDNA in Datenbanken)
et al	lat. Et alterum (und andere)
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenz-assistierte Zellsortierung
FADD	<i>Fas-associated via death domain</i> (Fas-assoziiert über eine Todesdomäne)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidyl Inositol
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HEX	Hybridoma Express (Medium)
IFN- γ	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IgCAM	Immunglobulin-like domain containing cell adhesion molecules
IgG	Immunglobulin Isotyp G
IRE	Insulin Response Element
J	Joule
kDa	kiloDalton
konz.	Konzentration bzw. konzentriert(e/es)

K-Ras	Kirsten Ratten Sarcoma 2 virales Onkogen Homolog
L	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli-, Meter
M	Mol
mAb	Monoklonaler Antikörper
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> (Multiple Klonierungsstelle)
Min	Minute
Mr	Relative Molmasse
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (molekulares Ausschlussvolumen)
n	Nano; Gesamtmenge oder -anzahl
n.b.	nicht bestimmt
Na	Natrium
NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
p	piko
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaktion</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pH	Negativ-dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
r	Korrelationskoeffizient
Rb	Retinoblastom
RE	<i>Response Element</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
R-PE	Phycoerythrin, R-Form
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
s.u.	siehe unten
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
T	Thymin; Temperatur
T.	Tunica

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris gepufferte Salzlösung)
Tcf-Signalweg	T-cell factor Pathway (T-Zellfaktor Signalweg)
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TM	Transmembrane Domäne
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton® X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
TUNEL	<i>TdT mediated dUTP nick end labeling</i> (TdT vermittelte dUTP Einstrangbruch Markierung)
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
Wnt	Wingless und INT1 Signalweg
x	x-faches
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Struktur der Kolonmukosa

Der Darm gliedert sich in mehrere Abschnitte mit unterschiedlichen Funktionen. Unterteilt werden Duodenum, Jejunum, Ileum sowie Kolon und Rektum, wobei jeder Abschnitt eine ihm eigene Gewebeorganisation aufweist. Das Kolon schließt direkt an das terminale Ileum an und wird seinerseits weiter untergliedert. Es beginnt mit Caecum und Colon ascendens, setzt sich fort in Colon transversum, Colon descendens, Colon sigmoideum und mündet in das Rektum.

Wichtige Funktionen von Ileum und Kolon bestehen in der Resorption von Wasser, anorganischen Salzen, organischen Stoffen und anderen aus der Nahrung freigesetzten Molekülen. Während die Wasserrückresorption sowohl im Dünndarm als auch im Kolon erfolgt, ist die anaerobe bakterielle Aufspaltung bis dahin unverdauter Faserbestandteile und die Resorption der dadurch freigesetzten Nährstoffe dem Kolon vorbehalten. Diese Nährstoffe sind zumeist organische Säuren, die zusammen mit dem im Fäzes enthaltenen Restwasser von den Epithelzellen des Kolon aufgenommen werden. Auf einer Länge von 1,5 – 2,0 m werden täglich bis zu 8 Liter Flüssigkeit resorbiert. 1 g Fäzes enthält neben unverdaubaren Faserbestandteilen etwa 10^{10} Bakterien.

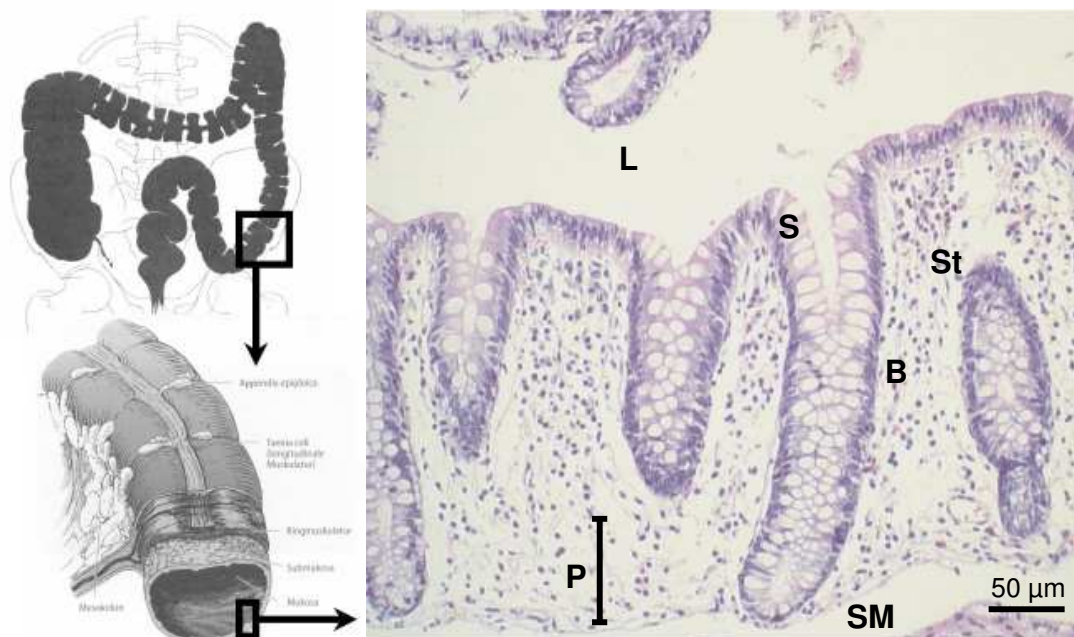


Abb. 1 Links: Lage des Kolon und Kolonquerschnitt. Untere Darstellung nach Junqueira et al., Histologie, 5. A, 1995. Rechts: Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Längsschnittes durch die normale humane Kolonmukosa. Zellkerne stellen sich blaugefärbt dar, Zytoplasma ist rötlich gefärbt. Die Abkürzungen bezeichnen: L – Lumen, S – Saumeptihel, B – Epithel mit Becherzellen, St – Stroma, P – Proliferationskompartiment mit Organstammzellen, SM – Submukosa.

Die Kolonwand gliedert sich von außen nach innen in Tunica serosa, T. subserosa, T. muscularis, T. submucosa und T. muscularis mucosae und T. mucosa. Die Mukosa besteht aus einer Lage

regelmäßig angelegter Krypten, die im Regelfall nicht verzweigt sind (Abb. 1). Im unteren Bereich der Mukosa, zwischen den Kryptenbasen im Stroma angeordnet und z.T. bis in die Submukosa hineinreichend, liegen Lymphfollikel.

Die Kolonkrypte ist entlang ihrer Längsachse in drei Kompartimente gegliedert. Basal beginnt die Krypte mit der Proliferationszone, darin enthalten die zur Regeneration des Gewebes notwendigen Organstammzellen, von denen es abhängig vom zugrundegelegten Modell etwa 1-10 in jeder Kolonkrypte gibt (Potten et al., 1997; Slack, 2000; Potten et al., 2003).

Lumenwärts folgt eine Differenzierungszone, in der die Zellen zu den einzelnen Zelltypen differenzieren und ihren höchsten Differenzierungsgrad mit dem Übergang in das dritte Kompartiment, die Abschlüfferungszone erreichen.

Unter den differenzierten Zellen werden vier Zelltypen unterschieden. Die Saumzellen (Wasser- und Elektrolytresorption, Sekretion von Enzymen des Bürstensaumes) stellen den Hauptanteil der Zellen an der dem Darmlumen zugewandten Mukosaoberfläche, während die Krypten der Länge nach von schleimproduzierenden (Mukos) Becherzellen ausgekleidet werden. Zwischen die Becherzellen eingelagert finden sich sogenannte Paneth-Körnerzellen (überwiegend rechtes Kolon) und endokrine Zellen (überwiegend linkes Kolon, Sekretion von Peptiden).

Im Saumepithel tritt die höchste Zelltodrate auf, hier werden alternde oder geschädigte Zellen abgeschlüffert. Gauthier et al. (2001) zeigten Mechanismen auf, die einer Regulation des Absterbens alternder Zellen in Abhängigkeit zum Differenzierungszustand der Kolonepithelzellen im Saumepithel zugrunde liegen können.

Der Erhalt der normalen Gewebeorganisation wird durch die Gewebekomöostase gewährleistet. Die Gewebekomöostase bezeichnet ein Gleichgewicht zwischen der Zellteilungsaktivität (Proliferation) in der Proliferationszone und dem Auftreten von programmiertem Zelltod (Apoptose) im Bereich des Saumepithels (Jones und Gores, 1997; Weinstein, 2000; Grossmann et al., 2002).

Die Koordination von Proliferation und Apoptose ist nicht nur für den Strukturhalt des Gewebes von zentraler Bedeutung, sondern auch Voraussetzung für die Regeneration von Geweben und bei der Koordination der Embryonalentwicklung. Im Verlauf der Entstehung eines mehrzelligen Organismus gehen Zellen gezielt durch Apoptose zugrunde, formen hierdurch z.B. Strukturen von Fingern und bilden Grundlagen für die Entwicklung des Nervensystems (Woo et al., 1998; Zakeri und Lockshin, 2002).

1.1.1 Modelle der Kolonkarzinomentstehung

Nach den Kreislauferkrankungen zählen Krebserkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache in Deutschland. Unter den Krebserkrankungen ist Darmkrebs bei Männern die zweithäufigste, bei Frauen die dritthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Abb. 2). Die jährliche Mortalität, bezogen auf 100.000 Einwohner, liegt dabei inzwischen unter 15%.

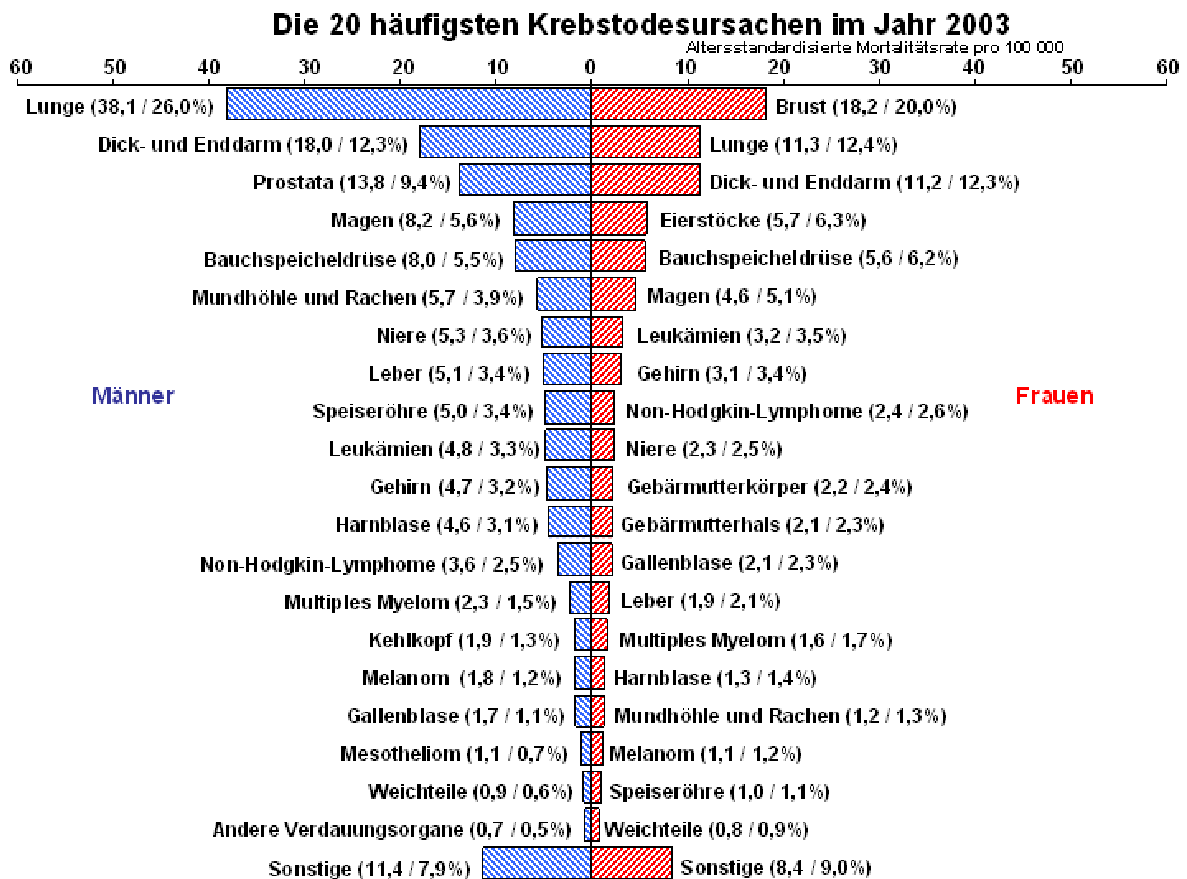


Abb. 2 Mortalität der Krebserkrankungen in Deutschland. In Klammern angegeben sind die Zahlen für West- und Ostdeutschland. (Quelle: Krebsatlas DKFZ; www.dkfz.de)

Dennoch ist der Anteil der neu hinzukommenden Fälle von Darmkrebs in Deutschland (Inzidenz) mit mehr als 40.000 Fällen jährlich (Becker et al., 2002) noch immer hoch und liegt über der Rate der Mortalität (Abb. 2). Die Fünfjahres-Überlebensraten liegen für Männer mit Darmkrebs bei 51,4%, für Frauen bei 44,8%.

In den letzten 15 Jahren wurden verschiedene Modelle zur Beschreibung der Entstehung eines kolorektalen Tumors vorgestellt, denen Hypothesen zu verschiedenen möglichen Ursachen (Arnold et al., 2005; Kayser et al., 2005; Sancho et al., 2004; Jass et al., 2002; Michor et al., 2003) zu Grunde liegen. Der überwiegende Teil konzentriert sich dabei auf die Vorgänge, die vom Adenom zum Karzinom führen. In der Regel basieren sie auf der von Knudson am Beispiel der genetischen Prädisposition zur Entwicklung eines Retinoblastoms vorgeschlagenen, sogenannten „Hypothese der zwei Ereignisse“ (two hit hypothesis) (Knudson et al., 1971). Allgemein besagt diese Hypothese, dass die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in zwei Schritten verläuft. Nach der Inaktivierung des ersten Allels eines Tumorsuppressorgens, kommt es in einem zweiten Schritt zum Verlust der Heterozygotie und dadurch zur Geninaktivierung und somit zur Krebsentstehung. Für Kolonkarzinome existiert ein derzeit weit akzeptiertes Modell, das von einer Sequenz Normalgewebe – Adenom – Karzinom ausgeht.

Dieses Modell wurde von Vogelstein und Mitarbeitern (Kinzler und Vogelstein, 1996; Morin et al., 1996) erarbeitet und integriert Knudsons Hypothese. Das betroffene Gen ist hierbei das APC Protein (Adenomatöses Polyposis Coli), dessen Funktion analog zur Hypothese von Knudson beeinträchtigt wird, was sich in Störungen des β -Catenin-Abbaus und des Wnt/ Tcf-Signalwegs auswirkt (Hart et al., 1998) (Abb. 3). Nach einer Mutation eines APC Wildtypallels und dem darauf folgenden Verlust des zweiten Allels und somit der Heterozygotie, kommt es zur Initiation der Tumorgenese. Zellen der Kolonmukosa, die von diesem Verlust betroffen waren, wurden mit dem Entstehen von Mikroadenomen in Mausmodellen in Verbindung gebracht (Oshima et al., 1995).

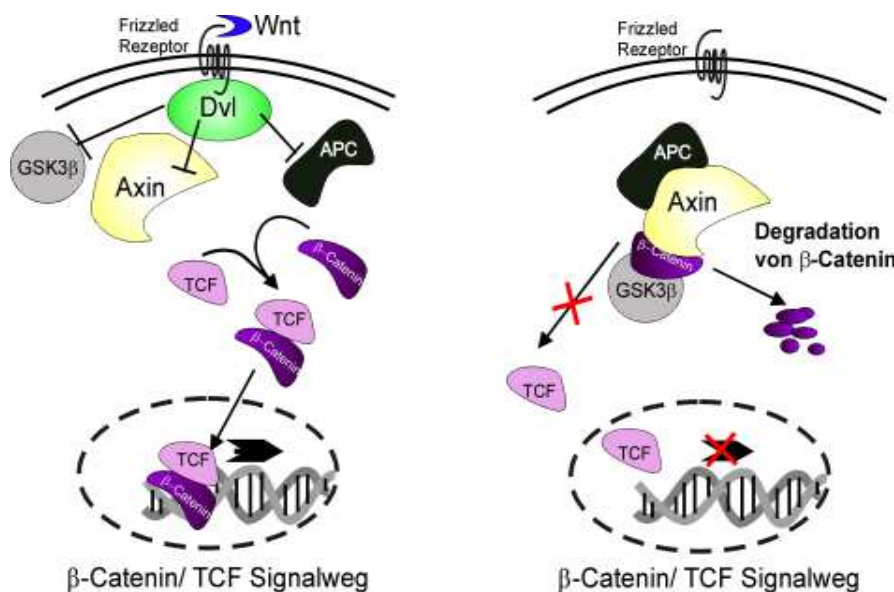


Abb. 3 Inaktivierung des Wnt-Signalwegs durch Interaktion des APC Proteins mit β -Catenin. Linke Seite: Der Wnt-Ligand inhibiert die Komplexbildung aus Axin, APC und GSK3 β . β -Catenin akkumuliert und gelangt in den Zellkern, wo es den Tcf-Signalweg anschaltet. Rechte Seite: Bei fehlender Wnt-Frizzled Interaktion ist GSK3 β aktiv und bildet einen Komplex mit APC und β -Catenin, dass in der Folge degradiert wird und nicht in den Zellkern transloziert. Der Tcf-Signalweg bleibt abgeschaltet.

Derzeit wird die Mutation von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder Stabilitätsgenen als wichtiger Beitrag, aber nicht als alleiniger Auslöser für Tumore gesehen (Vogelstein und Kinzler, 2004). Einige der Mutationen müssen bereits auf der Ebene der Kryptenstammzellen akquiriert werden.

Zu den Genen, die neben dem APC in verschiedenen Stadien der Kolonkarzinogenese häufig von Defekten betroffen sind, zählen K-ras, p53, Rb und β -Catenin. Letzteres ist häufig indirekt betroffen durch einen vorangehenden Defekt des APC Gens (Morin et al., 1997; Ilyas et al., 1997; Neufeld et al., 2000).

1.1.2 Frühe Veränderungen der Kolonmukosa

Eine Lücke des Modells von Vogelstein und Mitarbeitern betrifft die Veränderungen der Kolonmukosa, die dem Adenom als erste neoplastische Veränderung vorangehen.

Nach heutigem Stand werden zwei Ansätze der Tumorentstehung diskutiert: die *de novo* Entstehung von Adenomen aus gesunder Mukosa oder eine Progression aus Vorläuferläsionen (Jass, 1989; Aoki et al., 1994; Konishi et al., 1996; Leslie et al., 2002; Shiomori et al., 2003). Der zweite Ansatz wird hier zumeist in Zusammenhang mit dem Auftreten von Aberranten Krypten Foci (ACF) gesehen.

Die ACF wurden zuerst von Bird (1987) für die murine Mukosa beschrieben und später von Roncucci et al. (1991) auch in der humanen Kolonmukosa identifiziert.

Auf histologischer Ebene werden zwei Entitäten unterschieden: neben den deutlich selteneren dysplastischen ACF (Bouzourene et al., 1999), ist der überwiegende Anteil der ACF hyperplastisch. Von einigen Autoren wurde außerdem ein bevorzugtes Auftreten von dysplastischen ACF in den rechten Darmsegmenten festgestellt (Jenab et al., 2001). ACF werden heute als früheste prä-maligne Veränderungen der Kolonmukosa angesehen (Luebeck und Moolgavkar, 2002).

Derzeit existiert keine pathobiochemische Hypothese oder molekulares Modell, welches die Entstehung von Tumoren direkt aus hyperplastischen Vorstufen beschreibt, obwohl das Auftreten von molekularen Defekten und Dysregulation(en) der Genexpression auch in diesen Entitäten beschrieben wurde (Jass et al., 2001). Einen Gegensatz hierzu stellen die dysplastischen ACF dar. Dysplastische ACF weisen Mutationen auf, wie sie bei Auftreten der neoplastischen Transformation beobachtet wurden (Cheng und Lai, 2003).

In verschiedenen Studien an ACF wurden mehrere potentielle Gene/ Proteine identifiziert, die in diesen Vorläuferläsionen einer Veränderung unterliegen. Dies sind unter anderem die K-ras Expression, Veränderungen in der Mucin-Zusammensetzung, Defekte in Mismatch Reparatur Genen, Veränderungen in der Expression des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) oder p53 (Augenlicht et al., 1996; Jenab et al., 2001; Shivapurkar et al., 1997; Yuan et al., 2001). Hyperplastische ACF weisen in der Regel keine APC-Defekte auf, auch wenn Yamada et al. (2001) eine Untergruppe der hyperplastischen ACF mit β -Catenin akkumulierenden Krypten in relativer Nähe zu Lymphfollikeln identifiziert haben.

1.2 Biologie der Zelladhäsionsmoleküle

Die Fähigkeit der Zelle zur Adhäsion, d.h. zur Anheftung an Oberflächen ebenso wie zur Ausbildung von Kontakten zu anderen Zellen, wird einer Zelle durch die auf ihrer Oberfläche lokalisierten Zelladhäsionsmoleküle verliehen. Das auf der Zelloberfläche lokalisierte Repertoire der Zelladhäsionsmoleküle bestimmt die Spezifität und Flexibilität der Zellkontakte. Die Zelladhäsionsmoleküle sind transmembranöse oder über Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerte Oberflächenrezeptoren (Bütikofer et al., 2001; Spiro, 2002; Christofori, 2003). Zelladhäsionseigen-

schaften bilden die Basis für den Aufbau von dreidimensionalen Gewebestrukturen mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften.

Die Funktion der Zelladhäsionsrezeptoren ist nicht auf die Ausbildung von Kontakten zur Extrazellulären Matrix (ECM) beschränkt. Sofern eine zytoplasmatische Domäne vorhanden ist, besteht die Möglichkeit zu Kontakten zum Zytoskelett, wodurch diese Rezeptoren weiteren Einfluss auf das Verhalten der Zelle, Zellmobilität, Differenzierung und Proliferation nehmen (Thiery, 2003; Christofori, 2003).

Zelladhäsionsmoleküle sind demzufolge an der Signaltransduktion durch die Zellmembran beteiligt. Die hierzu verwendeten Signalwege weisen Analogien zur Signaltransduktion durch Rezeptoren für Wachstumshormone auf, nutzen zur Signaltransduktion zentrale Mechanismen wie die Phosphorylierung von Tyrosinen und Serinen, die Bindung an Bestandteile des Zytoskeletts (z.B. Integrine), die Rekrutierung von Adaptermolekülen wie z.B. G-Proteinen und anderen zytosolischen Bindungspartnern (Braga, 2002).

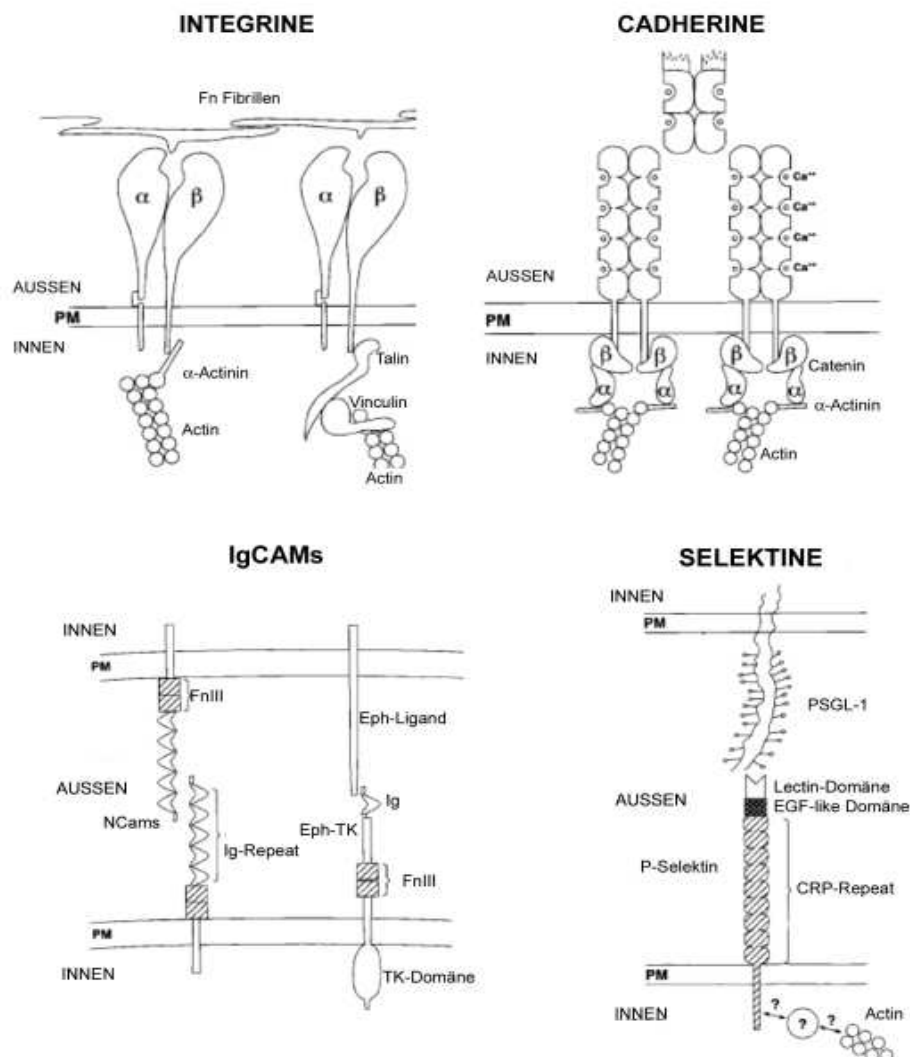


Abb. 4 Übersicht über die Grundstruktur der vier Familien von Zelladhäsionsmolekülen. Verändert nach Alpin et al., 1998.

Die Einteilung der Zelladhäsionsmoleküle erfolgt in vier Proteinfamilien und basiert dabei auf den zwischen ihnen bestehenden Homologien. Unterschieden werden die folgenden vier Familien von Zelladhäsionsmolekülen: Integrine, Cadherine, Selektine und Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie (Abb. 4). Dennoch bestehen familienübergreifende Gemeinsamkeiten im prinzipiellen Struktur eines Zelladhäsionsmoleküls.

In ihrem Aufbau gliedern sich Zelladhäsionsmoleküle in eine oder mehrere extrazelluläre Domänen, einem GPI-Anker oder einen transmembranen Abschnitt gefolgt von einer zytoplasmatischen Domäne.

Da sich die vorliegende Arbeit auf Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie (IgCAMs) konzentriert, beschränken sich die Ausführungen im folgenden Abschnitt ausschließlich auf deren Vertreter.

1.2.1 Die Immunglobulin Superfamilie

Nach den Cadherinen bilden die Zelladhäsionsmoleküle aus der Immunglobulin Superfamilie (IgCAMs) die zweitgrößte Familie der Zelladhäsionsmoleküle. Kennzeichnend für diese Gruppe sind die Ig-artigen Domänen, die bei IgCAMs in unterschiedlicher Anzahl vorhanden sind. Ig-artige Domänen bestehen aus zwei β -Faltblättern, die wie in einem Sandwich übereinander gelagert sind. Sie werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten und in ihrer kompakten Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert (Halaby et al., 1999). Innerhalb dieses Domänentyps werden 4 Subtypen (C1, C2, I oder V-Typ) unterschieden. Diese Einteilung basiert auf der Länge und Größe des β -Faltblattes ebenso wie auf der Konformation und Größe der Loop-Regionen. Neben den Ig-artigen Domänen sind auch Fn3 (Fibronectin III-Typ) Domänen vertreten (Halaby et al., 1999). Sofern IgCAMs eine zytoplasmatische Domäne besitzen, ist die bereits erwähnte Interaktion mit dem Zytoskelett oder mit Tyrosinkinasen möglich (siehe 1.2). Die Familie der IgCAMs zählt derzeit mehr als 100 Mitglieder, sie werden nach der Zusammensetzung ihrer Domänen derzeit in mindestens acht Subfamilien unterteilt.

IgCAMs sind in wichtige Prozesse wie der Neuriteninduktion oder der Interaktion mit der Extrazellulären Matrix (Subfamilie der NCAM), der Interaktion zwischen Neuronen (z.B. L1-CAM), der Apoptose (z.B. DCC, s.u.) oder der Differenzierung involviert. Viele IgCAMs existieren in verschiedenen Spleißvarianten, deren Regulation entsprechend der Proteinfunktion abhängig von der Gewebedifferenzierung oder Organentwicklung ist (Brümmendorf und Lemmon, 2001). Für viele Vertreter der Immunglobulin Superfamilie ist ein distinktes Expressionsmuster charakteristisch.

NrCAM wird nur von Neuriten exprimiert, die Expression von NgCAM beschränkt sich auf Axone. Dennoch finden sich Vertreter der IgCAMs auch in allen anderen Geweben und viele von ihnen werden weder gewebespezifisch noch zelltypspezifisch exprimiert.

Bekannte Beispiele sind das DCC-Protein (Deleted in Colorectal Cancer), das im oberen Kryptendrittel der gesunden Kolonmukosa exprimiert wird und dessen Expression in Karzinomen häufig

fehlt oder das CEACAM5 (ehemals CEA, Carcinoembrionales Antigen; Beauchemin et al., 1999), das aufgrund seiner tumorassoziierten Überexpression klinisch als Tumormarker eingesetzt wird.

1.2.2 Die CEACAMs

Der Begriff CEACAM steht für Carcinoembrionales Antigen Cell Adhäsion Molecule (Carcinoembryonales Antigen Zelladhäsions Molekül) und bezeichnet eine Gruppe von derzeit mehr als 29 Proteinen, die zur Immunglobulin Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle gehören (Hammarström et al., 1999). Die Mitglieder der CEACAM-Familie werden überwiegend von epithelialen Zellen exprimiert, aber auch die Expression auf endothelialen Zellen, auf Lymphozyten sowie auf Vertretern aus der myeloiden Reihe ist beschrieben worden.

Eine der am besten untersuchten und belegten Funktionen der CEACAMs in diesen Zellen ist die Zelladhäsion und Funktion als Pathogenrezeptor für *Neisseria* Spezies (Virji et al., 1996; Prall et al., 1996; Hammarström et al., 1999; Popp et al., 1999; Muenzner et al., 2000).

In ihrer Struktur entsprechen die Mitglieder der CEACAM-Familie dem für die IgCAMs beschriebenen Aufbau (siehe 1.2.1). Neben einer oder mehreren extrazellulären Domänen sind die CEACAMs in der Plasmamembran entweder über einem GPI-Anker oder eine transmembrane Domäne verankert, z.T. erweitert um eine zytoplasmatische Domäne.

Insbesondere bei CEACAM1, das nach derzeitigem Stand in 11 verschiedenen Spleißvarianten vorliegen kann (Gray-Owen et al., 2006), wird die Struktur zusätzlich durch Anfügen der Anzahl der extrazellulären Domänen und der Form der zytoplasmatischen Domäne der Proteinbezeichnung ergänzt. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit CEACAM1-4L gearbeitet. Es ist die längste Form von CEACAM1, besitzt vier extrazelluläre Domänen und die langen Form der zytoplasmatischen Domäne (Zusatz L hinter der Anzahl der extrazellulären Domänen).

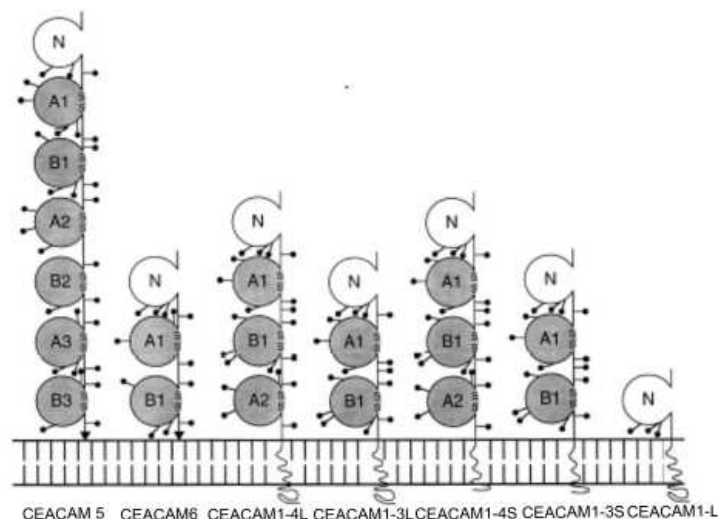


Abb. 5 Übersicht über die CEACAM- Familie mit einigen ihrer bekannteren Mitglieder. Die extrazellulären Domänen weisen z.T. starke Glykosylierungen auf (•). Homologe Domänen tragen die gleiche Domänenbezeichnung. Verändert nach Hammarström et al.,(1999).

Die variable Glykosylierung der extrazellulären Domänen vergrößert das strukturelle Repertoire innerhalb der Familie, da auch für identische CEACAM-Spleißvarianten zelltypabhängige Unterschiede in der Glykosylierung bestehen (Mahrenholz et al., 1993; Kannicht et al., 1999; Lucka et al., 2005).

Das erste bekannt gewordene Mitglied der unter CD66 (Cluster of Differentiation) zusammengefassten und seit 1999 als CEACAM-Familie (Beauchemin et al., 1999) bezeichneten Gruppe ist das CEACAM5 (ehemals CEA), welches 1965 von Gold und Freedman zunächst als ein tumorspezifisches Glykoprotein von 180 kD beschrieben wurde. Es folgte die Identifizierung des CEACAM6 (ehemals NCA, Non-specific Crossreacting Antigen), das 1972 von Kleist et al. und von Mach & Pusztaszeri beschrieben wurde.

Für mehrere Mitglieder der von humanen Zellen exprimierten CEACAMs sind homologe Formen in anderen Spezies wie Maus, Ratte oder verschiedenen Affenspezies gefunden worden. Die dokumentierten Untersuchungen fokussieren sich dabei überwiegend auf die Analyse von EST Sequenzen und der Suche nach orthologen Genen zum humanen Ceacam1 oder Ceacam5 bzw. Homologien zu den aus diesen DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der N-terminalen Proteindomänen. Der molekulare Stammbaum für CEACAM1, basierend auf Vergleichen der Aminosäuresequenz der N-Domäne, erfasst derzeit drei Gruppen: Primaten, Rodentia und Artiodactyla/ Perissodactyla (Kammerer et al., 2004). Für das humane CEACAM1 wurden jeweils zwei verschiedene, orthologe Gene bei *Mus musculus* (*Ceacam1a*, *Ceacam1b*) sowie jeweils eines in *Rattus norvegicus* und in *Bos taurus* gefunden. Die geringste Verwandtschaft besteht hierbei zwischen der humanen und den zwei murinen Formen des CEACAM1.

Der größte phylogenetische Abstand besteht zwischen den in Primaten und Rodentia gefundenen CEACAM1 Genen (Kammerer et al., 2004).

Einer Theorie nach sind CEACAM6 und CEACAM5 und mehrere der neueren Mitglieder der CEACAM-Familie durch Genduplikation entstanden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von CEACAM6 und CEACAM5 zeigt eine 90%ige Homologie zwischen den Aminosäuren 1–108, nur die 3' gelegenen 40 Nukleotide des ersten Exons von CEACAM6 sind in CEACAM5 nicht enthalten (Zhou et al. 2001; Kammerer et al., 2004). Daher könnte sich CEACAM5 durch Genduplikation aus CEACAM6 entwickelt haben (Paxton et al., 1987).

1.3 Funktionen von CEACAM1

Bisher wurde eine Vielzahl von biologischen Funktionen für verschiedene Vertreter der CEACAMs nachgewiesen. Das schließt auch z.T. sich widersprechende Funktionen ein. So zeigt CEACAM1 sowohl eine das Tumorwachstum hemmende Wirkung (Funktion eines Tumorsuppressors) als auch eine die Angiogenese fördernde Wirkung. Auch eine Beteiligung von CEACAM1 im Insulinabbau wurde bereits *in vitro* nachgewiesen (Poy et al., 2002; Soni et al., 2000). Gut belegt ist die Funktion von CEACAM1 als Pathogenrezeptor, insbesondere für

Neisseria Spezies. Neisserien binden über auf ihrer Zelloberfläche lokalisierte opa Proteine (opacity Proteine, ein Pathogenitäts Faktor) an CEACAM1 und werden z.T. durch diese Bindung phagozytiert (Muenzner et al., 2001; Muenzner et al., 2002). Eine direkte Folge der Pathogenbindung an CEACAM1 ist eine erhöhte Expression von CEACAM1 auf der Zelloberfläche der bindenden Zelle sowie, abhängig vom Zelltyp der Zielzelle, die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine.

Ein Modell, das die Funktion von CEACAM1 in Verlauf der Milchgangbildung des Brustgewebes beschreibt, wurde von Kirshner et al (2003) aufgestellt. In einem Zellkultursystem mit Mammakarzinomzellen wurde gezeigt, dass CEACAM1 eine Schlüsselfunktion bei der für die Morphogenese der Milchgänge essentiellen Apoptoseinduktion erfüllt. Dabei sind Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne mit Integrinen und die Aktivierung von Calpainen wichtige Bestandteile des durch CEACAM1 ausgelösten Signalweges (Kirshner et al., 2004).

1.4 Die Expression von CEACAM1 und CEACAM5

Proteine der CEACAM-Familie werden in vielen Geweben exprimiert, dabei weisen einzelne Vertreter dieser Rezeptorfamilie ein besonders breites Expressionsspektrum auf. CEACAM1 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, darunter die Epithelien des Magens, der Speiseröhre, des Darms oder Pankreas ebenso wie in einigen Strukturen bzw. Zelltypen der Niere, Prostata, Endometrium oder Leber. Für CEACAM5 ist dagegen die Expression fast ausschließlich in Kolongewebe, schleimproduzierende Zellen des Magenepithels und Ösophagus sowie in Zellen des Prostataepithels beschrieben worden (Hammarström, 1999).

Die festgestellten Expressionsunterschiede betreffen dabei nicht nur die Gesamtmenge des exprimierten Proteins, sondern auch das Verhältnis der verschiedenen Spleißvarianten zueinander. In der Gallenflüssigkeit kommen von CEACAM1 zwei Spleißformen vor, die sich in ihren Molekulargewichten von 85 kD und 115 kD deutlich unterscheiden (Neumaier, Bonn, Dissertation 1986).

Auch im Kolonepithel kommt CEACAM1 überwiegend in zwei Spleißvarianten mit identischem extrazellulären Anteil und Unterschiede in der Länge der zytoplasmatischen Domäne (CEACAM1-4L bzw. CEACAM1-4S) vor (Sundberg et al., 2002). Alternatives Spleißen kann als der Regelfall für CEACAM1 angesehen werden (Stoffel et al., 1993). In voll ausdifferenzierten Kolonepithelzellen kommt es zu einer sukzessiven Verschiebung des Verhältnisses von CEACAM1-4S zu CEACAM1-4L zugunsten von CEACAM1-4L. Dabei liegt das Verhältnis zwischen CEACAM1-S und CEACAM1-L zwischen 9:1 und 3:1 (Izzi et al., 1999). Aufgrund ihrer extensiven Glykosylierung haben beide CEACAM1-Formen im Western Blot ein scheinbares Molekulargewicht von 160 kD.

Wird CEACAM1 aus Granulozyten isoliert, liegt das Molekulargewicht dagegen bei 180 kD, ebenfalls begründet durch Unterschiede in der Glykosylierung.

Im Kolongewebe werden im wesentlichen CEACAM1, aber auch CEACAM5 und CEACAM6 exprimiert (Hammarstrom et al., 1999). Für alle im Kolongewebe exprimierten CEACAMs ist die Expression in der normalen Darmschleimhaut auf das obere Drittel bis maximal die obere Hälfte beschränkt (Frangmyr et al. 1995; Sundberg et al., 2002). In einem Längsschnitt durch die Darmschleimhaut ist im proliferativen Kompartiment bis hinauf zur Kryptenmitte in der Regel keines der CEACAMs nachzuweisen.

In Kolontumoren verändert sich das Expressionsmuster, häufig tritt ein Verlust der CEACAM1 Expression auf. Im Gegensatz hierzu ist die Expression von CEACAM6 und CEACAM5 häufig erhöht. Auf Protein- und RNA-Ebene sind diese Veränderungen für Adenome und Karzinome gut belegt, dennoch gibt es bisher keine Untersuchungen zur Expression in Vorläuferläsionen der Kolonmukosa (Neumaier et al., 1993; Nollau et al., 1997).

Die Dysregulation der CEACAMs ist nicht auf Kolontumore beschränkt. Sie tritt auch in Tumoren der Prostata, Lunge, Mamma und des Endometriums auf (Bamberger et al., 2001; Busch et al., 2002; Laack et al., 2002; Sienel et al., 2003). Eine Besonderheit stellen die Melanome dar, die häufig im Gegensatz zur gesunden Epidermis CEACAM1 exprimieren (Thies et al., 2002).

1.5 Bekannte Regulatoren von CEACAM1

Interferon- γ (IFN- γ) ist eine der ersten Substanzen, für die der regulative Einfluss auf CEACAM1 belegt werden konnte (Takahashi et al., 1993; Chen et al., 1996). IFN- γ ist ein Zytokin, das im Verlauf der Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Zellen gebildet wird. Die Produktion von IFN- γ zählt zu den Merkmalen der Th1 Differenzierung.

Der von IFN- γ aktivierte Signalweg ist inzwischen gut untersucht. Die Bindung von IFN- γ erfolgt an den IFN- γ -Rezeptor (CDw119), einem Klasse II Zytokinrezeptor. Dieser Rezeptor besteht aus zwei Ketten mit unterschiedlicher Funktion. Die Hauptfunktion der α -Kette (IFN- γ R α -Kette, 90 kD) ist die Bindung des IFN- γ . Die β -Kette (IFN- γ R β -Kette, 62 kD) dient der Signaltransduktion in das Innere der Zelle (Schroder et al., 2004).

Das IFN- γ vermittelt seine Wirkung auf CEACAM1 über ein Response Element im CEACAM1 Promotor. Analog verläuft die Induktion von CEACAM1 durch Androgene, für deren Signalweg ebenfalls ein Response Element im CEACAM1 Promotor enthalten ist.

Die Struktur des CEACAM1-Promotors ist bekannt (Hauck et al., 1994) und mehrere der promotorbindenden Transkriptionsfaktoren konnten bisher identifiziert werden. Beschrieben wurden neben HNF-4 α , USF-1 und AP-1 auch ein Komplex aus SP2 mit SP3 und möglicherweise SP1 (Hauck et al., 1994; Phan et al., 2001; Phan et al., 2004.).

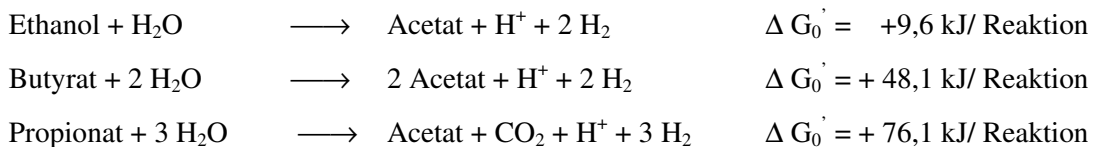
Es ist außerdem bekannt, dass CEACAM1 und CEACAM5 eine von Differenzierungsfähigkeit und –grad der Zelle abhängende Expression zeigen (Scheffrahn et al., 2005), was eine bei Zellad-

häsionsmolekülen nicht selten der Fall ist und eine koordinierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle innerhalb von Differenzierungsprogrammen nahe legt.

1.6 Stoffwechselprozesse im Kolon

Wie bereits beschrieben, herrschen im Kolonlumen anaerobe Bedingungen (siehe 1.1). Resistente Kohlenhydrate und Pektine, die im Dünndarm nicht verdaut werden konnten, werden hier durch Mikroorganismen verschiedener Gattungen durch einen anaeroben Stoffwechsel abgebaut. Dabei ist zu berücksichtigen, dass keine vollständige anaerobe Nahrungskette durchlaufen wird, was letztlich zur Bildung von CH_4 , CO_2 und Anorganik führen würde. Die Reaktion wird durch die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), die von den Kolonepithelzellen des Wirtorganismus selber als C-Quelle genutzt werden können, beendet.

Die schnelle Aufnahme von SCFAs ist für beide Seiten von Vorteil: Eine geringe Konzentration freier Fettsäuren gewährleistet die fortgesetzte Reaktion von Butyrat und Propionat zu Acetat, da das chemische Gleichgewicht dieser Reaktionen stark auf der linken Seite der Reaktion liegt. Ein niedriger pH_2 Partialdruck gewährleistet die Regeneration von NAD^+ aus NADH mit der Freisetzung von H_2 .



Die Konzentration von Butyrat wird für das luminale Kompartiment im millimolaren Bereich angegeben (Williams et al., 2003). Als physiologische Zusammensetzung für ein durch mikrobielle Fermentation im Kolonlumen entstandenes Fettsäuregemisch wurde mit einem Verhältnis von Acetat : Propionat : Butyrat von 41:21:38 oder 75:15:10 ermittelt (Abrahamse et al., 1999).

Die mikrobiell gebildeten Fettsäuren üben ihrerseits eine Reihe von Wirkungen auf die Epithelzellen aus, wo sie in den Mitochondrien über die β -Oxidation verstoffwechselt werden (Heerdt et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass diese Fettsäuren in zentrale Programme wie Differenzierung und Apoptose eingreifen (Rudolph et al., 2001; Andoh et al., 2003). Insbesondere kurzkettige, gesättigte Fettsäuren wie Acetat, Butyrat und Propionat wirken differenzierend auf Zellen der Mukosa, während zugleich die Proliferationsrate gesenkt wird (Abrahamse et al., 1999). Ein belegter Nebeneffekt der SCFAs besteht zudem in einer protektiven Wirkung der Fettsäuren auf die Kolonepithelzellen gegenüber chemischen Noxen und der Entstehung von Kolonkarzinomen sowie der Modulation der Immunfunktionen der Mukosa (Williams et al., 2003; Emenaker et al., 2001; Nkondjock et al., 2003; Schaubert et al., 2003). Die Aufnahme der Fettsäuren erfolgt entweder durch Diffusion der protonierten Formen oder durch Anionen-Austausch gegen HCO_3^- .

1.7 Apoptose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, stellt für das Gewebe einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Zellzahl, Entsorgung gealterter oder geschädigter Zellen und zur Aufrechterhaltung der Gewebestruktur dar. Der gesamte Prozess der Strukturaufrechterhaltung von Geweben wird als Homöostase bezeichnet (Kerr et al., 1972; Guo und Hay, 1999; Jaattela, 2002) (siehe 1.1).

Neben der Apoptose bezeichnet Nekrose eine grundsätzlich andere Form des Zelltods. Nekrose wird durch das Zugrundegehen der Zelle durch äußere Noxen und ohne Beteiligung von zellulären Programmen ausgelöst. Im Verlauf der Nekrose löst sich die äußere Membran der Zelle auf, das Zytoplasma wird freigesetzt und verursacht so in der Regel entzündliche Reaktionen im umliegenden Gewebe (Darzynkiewicz et al., 1998).

Im Gegensatz dazu wird bei der Apoptose zunächst die DNA in Fragmente einer definierten Länge (143 bp bzw. ein Vielfaches davon) zerschnitten, gefolgt von dem Verpacken des Zellinhaltes in sogenannte Apoptosekörper. Diese Vesikel werden im Gewebe von Makrophagen aufgenommen. Es kommt zu keinen entzündlichen Prozessen. Der Vorteil der Apoptose besteht im gezielten Zugrundegehen von Zellen mit gleichzeitiger Minimierung des Verlustes von biologischem Material und der Vermeidung von entzündlichen Reaktionen.

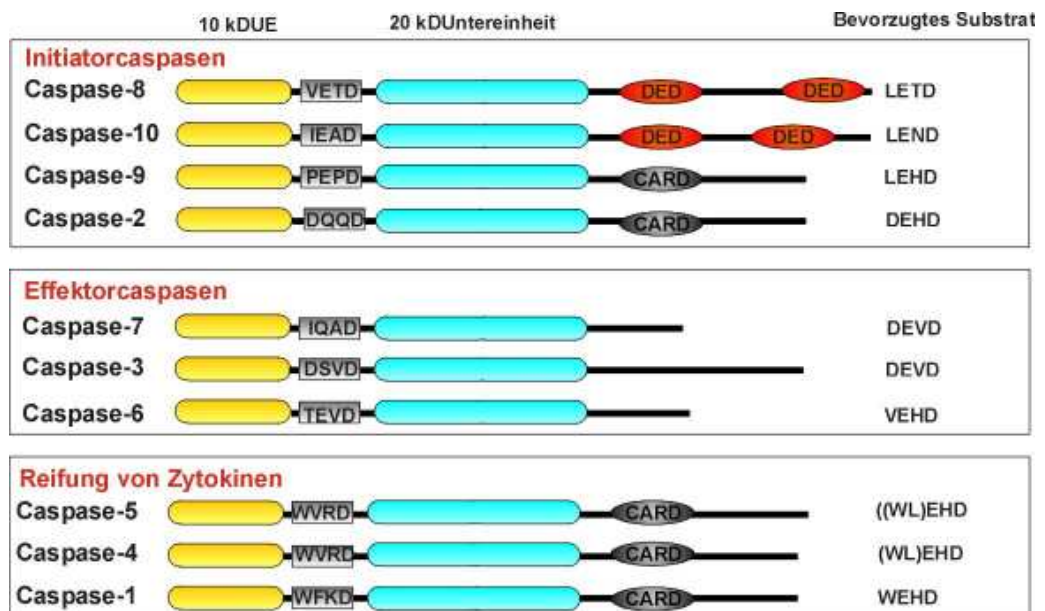


Abb. 6 Einteilung der Caspasen in die Gruppen der Initiatorcaspasen, Effektorcaspasen und die Gruppe der an der Zytokinreifung beteiligten Caspasen. Jede Caspase weist jeweils eine 10 kD und 20 kD Untereinheit (UE) auf, deren Sequenzen in allen Caspasen identisch sind. Unterschiede bestehen dagegen in den kurzen Peptidsequenzen, durch die beide Untereinheiten verbunden sind. Neben der Proteinstruktur ist die bevorzugte Spaltungssequenz in Substraten für jede Caspase angegeben.

Apoptose wurde zunächst an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* untersucht. Nematoden eigneten sich wegen der Eigenschaft der Zellzahlkonstanz in ausgewachsenen Individuen hervorragend zum Studium von Zelltod-Prozessen. Viele der in *C. elegans* als Apoptose ausführende Enzyme identifizierten Caspasen trugen daher zunächst einen „CED“-Präfix vor ihren Bezeichnungen. Inzwischen sind 11 Caspasen bekannt und nicht bei allen ist die Funktion eindeutig geklärt (Nunez et al., 1998; Chang und Yang, 2000; Strasser, 2000). Unterteilt werden Caspasen entsprechend ihrer Position in der Apoptosekaskade in Initiatorcaspasen und ausführende oder Effektorcaspasen (Abb. 6).

Zu den Initiatorcaspasen zählen Caspase-2, -8, -9 und -10. Caspase-8 wird häufig in der rezeptor-induzierten Apoptose aktiviert. Die Aktivierung von Caspase-9 erfolgt dagegen durch den intrinsischen Apoptoseweg, in den Mitochondrien involviert sind und eine Cytochrom c Freisetzung wichtiger Bestandteil der Caspaseaktivierung ist (Green, 1998; Adams und Cory, 2002).

Zu den Effektorcaspasen gehören Caspase-3, -6 und -7 (Adams et al., 2003), die das Zelltodsignal letztlich in den Zellkern weiterleiten. Die meisten Caspasen werden als inaktive Zymogene, als sogenannte Procaspsen, synthetisiert und erst bei Apoptoseinduktion aktiviert.

Für die Aktivierung von Caspasen bestehen prinzipiell drei Möglichkeiten. Häufig ist die Rekrutierung zum Komplex aus Todesrezeptor-Domäne, Adaptermolekül und Procaspase, die zu einer Abspaltung der Prodomäne führt und deren Folge eine Aktivierung der Caspase ist. Im zweiten Fall reicht die Komplexbildung aus mehreren Caspase-Molekülen aus, um eine autokatalytische gegenseitige Aktivierung der Caspasen zu erzielen. Die letzte Möglichkeit stellt die Abspaltung der Prodomäne durch nicht-Caspase Proteasen dar (Johnson, 2000). Diskutiert werden hier Granzym B sowie Angehörige der Gruppe der Calpaine und Cathepsine (Kidd et al., 2000).

Bei einigen Caspasen (Caspase-1, -4 und -5) wird außerdem eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen angenommen. Das schließt eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen nicht aus, denn auch für Caspase-1 und -4 wurde gezeigt, dass sie durchaus an Apoptoseprozessen beteiligt sind (Mariathasan et al., 2004). Die Aktivierung von Caspase-4 wurde als ein Amplifikationsmechanismus oder Feedback-Loop in der Fas-Ligand induzierten Apoptose identifiziert (Hilbi et al., 1998; Liu et al., 2003).

Ist das Apoptose-Programm einmal ausgelöst, wird es konsequent bis zu seinem Ende ausgeführt. Die Kaskaden, über die der Apoptosestimulus dabei bis zum Zellkern reicht, können sich erheblich voneinander unterscheiden. Sogenannte „Todesrezeptoren“ wie z.B. der Fas-Rezeptor (CD95, Apo1) verlaufen intrazellulär über sogenannte Todesdomänen, mit FADD als Kofaktor und über Caspase-8 zu Caspase-3, die letztendlich Kofaktoren aktiviert, welche die genomische DNA im Zellkern fragmentieren (Nagata, 1999; Ashkenazi und Dixit, 1999).

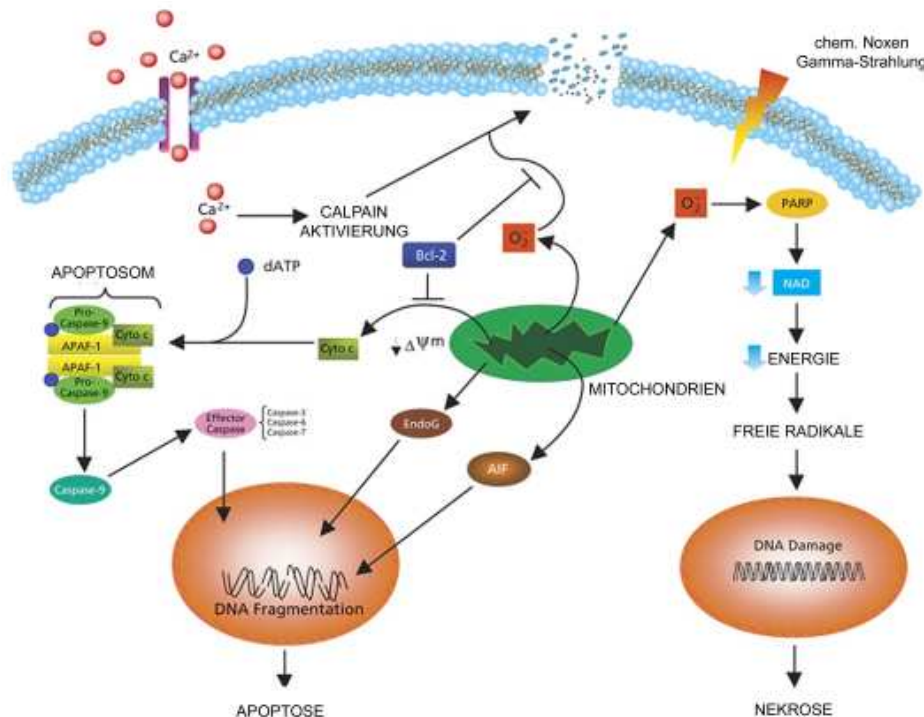


Abb. 7 Mitochondrialer Apoptoseweg mit Bildung des Apoptosoms. Apoptosis Pathway Slides, Sigma RBI.

Neben externen, durch Zelltodrezeptoren vermittelte Signale, können auch intrazelluläre, mitochondriale Signalwege Apoptose auslösen. In diesem Fall kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom c, der Assemblierung des Apoptosoms (Chinnaiyan, 1999; Joza et al., 2001; Adams und Cory, 2002) und nachfolgend zu einer Aktivierung von Caspase-9 mit anschließender Aktivierung von Caspase-3 und CAD (Caspase activated DNase). In beiden Fällen ist letztlich eine Kaskade aus mindestens zwei Caspasen an der Ausführung des Zelltodprogramms beteiligt (Abb. 7).

1.7.1 Zellbiologische Merkmale der apoptotischen Zelle

Die sichtbare DNA-Fragmentierung ist eines der wichtigsten Merkmale der Apoptose. Sie kann mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, z.B. durch Gelelektrophorese (DNA-Leiter), Fluoreszenzfärbungen die den in Apoptosekörper zerfallenden Zellkern zeigen, oder im ELISA, der die Bildung freier Nukleosomen detektiert. Auch Membranveränderungen, wie sie durch die Bildung der Membranblasen (sogenanntes membrane blebbing) in den Frühstadien der Apoptose auftreten (Desjardins und MacManus, 1995), können durch die kalziumabhängige Bindung von Annexin V nachgewiesen werden (Koopman et al., 1994).

Nicht immer ist ein membranständiger Rezeptor erforderlich, um Apoptose zu induzieren. Im Fall von Granzym B reicht ein Porenkomplex in der Membran aus, ebenso wie Gamma-Strahlung, die direkt auf den Zellkern einwirkt und Apoptose durch DNA-Schädigung auslöst.

1.8 Fragestellung

Hintergrund für diese Arbeit bildete die für Kolontumore bekannte Dysregulation von CEACAM1 und CEACAM5, deren Ursache ebenso wie der Zeitpunkt ihres Auftretens unklar war. In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst mit den ACF (Aberranten Krypten Foci) und hyperplastischen Polypen histologisch erkennbare, früheste Veränderungen der Kolonmukosa auf ihre CEACAM1 und CEACAM5 Expression untersucht werden.

Unterschiede in der CEACAM1-Expression, die im Verlauf dieser Arbeit festgestellt wurden, führten zur Frage nach den physiologischen Auswirkungen einer Expressionsveränderung von CEACAM1, insbesondere da in der Tumorentstehung die Homöostase, das Gleichgewicht zwischen Auslösung von Apoptose und Proliferationsaktivität, gestört ist.

Zur isolierten Untersuchung der Funktion von CEACAM1 wurde ein entsprechendes Zellkulturmodell mit stabil transfizierten Zellen aufgebaut. In einem zweiten Zellkulturmodell wurde die Funktion von CEACAM1 in einem epithelialen Zellkulturmodell untersucht und mögliche Stimuli zur Beeinflussung der CEACAM1-Expression in Kolonkarzinomzellen identifiziert.

Der zweite Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Identifikation beteiligter Signalwege in den etablierten Zellkulturmodellen und auf die Suche nach Möglichkeiten zur gezielten Aktivierung dieser Signalkaskaden bzw. der Induktion der CEACAM1 Expression.

Das Interesse richtete sich vor allem auf die in der Kolonmukosa exprimierten Mitglieder CEACAM1 und CEACAM5, da es sich bei diesen nicht nur um die am stärksten exprimierten CEACAMs der Kolonmukosa handelte, deren Expression, wie gefunden wurde, in Tumoren gegenläufig reguliert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Mikroliterpipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipetten	Multipette	AbiMed, Heidelberg
pH-Meter mit pH-Elektrode	InoLab, Scintex	WTW, Mettler
Light Cycler	Typ 1.2	Roche, Mannheim
ELISA-Reader	BioLinx	DynaTech Corp.
Sterile Werkbank		Hereaus, Hanau
CO ₂ -Inkubator		Hereaus, Hanau
Heizblock für Reaktionsgefäße	HeizerDuo	NeoLab, Heidelberg
Plattenfluorimeter	Victor3	Appl. Biosys., Weiterstadt
Wasserbad		GFL
Tischzentrifuge	Fresco	Heraeus, Hanau
Pipettierhilfe	Multipette	Eppendorf, Hamburg
Inverses Mikroskop	IX-70	Olympus, Hamburg
Aufrechtes Mikroskop		Leica, Wetzlar
Wärmeschrank		Bender
Photometer		LKB Instruments
Photometer zur Nukleinsäurequantifizierung	GeneQuant	Pharmacia, Freiburg
Apparatur zur horizontalen Gelelektrophorese	SubMarine	Pharmacia, Freiburg
Apparatur für Polyacrylamidgele	Protean III	BioRad, BioMetra
Semi-Dry Blot Gerät	Transblot	BioRad, München
Gel-Dokumentationsanlage		Innotech
Horizontal-Schüttler		Eppendorf, Hamburg
Überkopf-Schüttler	Roto Shake Genie	Scientific Ind.
Gefrierschrank und Kühlschrank		Liebherr
Flüssigstickstoff-Lagertank	Apollo	Messer

2.1.2 Plastikware und Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	Star Lab, PeqLab
Serologische Pipetten	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen (80 und 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen (10 und 15 cm Durchmesser)	Falcon, Heidelberg
Multiwell Schalen (6, 24 und 96 Kavitäten)	Falcon, Heidelberg
Mikrotiterplatten für Proteinbestimmungen	Greiner, Frickenhausen
Microlon 600 96 Well Platten (ELISA)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
Spritzen Vorsatz Filter	Sarstaed, Nümbrecht
Filtereinheiten für Volumina bis 125 mL	Costar, New York, USA
Spritzen verschiedener Volumina	Becton Dickinson
Konische Röhrchen (15 mL und 50 mL)	Falcon, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße (0,5 – 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell zum Einmalgebrauch	Braun Aesculap AG, Tuttlingen

Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm	3 M
Filterpapier für Blot-Applikationen	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose Membran BA45 und BA38	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond C-Extra Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.3 Glasware

SuperFrost™ Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Laborflaschen	Schott
Pasteur Pipetten	Hirschmann
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Hamburg

2.1.4 Chemikalien und Kits

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern es nicht anders angegeben ist, von den Firmen Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) oder MERCK (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Apoptosis Inducer Set	BioCat
Interferon- γ , humanes	PeproTech Inc.
Caspase Inhibitoren und Substrate	Calbiochem
Hoechst Dye 13342	Molecular Probes
JC-1	Calbiochem
Valinomycin	Calbiochem
Nonyl Acridine Orange	Calbiochem
ECL Substrat (Alkalische Phosphatase)	BioRad
Polyacrylamid (29:1) 40%-ig und (37,5:1) 30%-ig	BioRad
TEMED	BioRad
Protein G4 FastFlow Sepharose	Amersham
NHS-Biotin	Pierce
TMB	KMF
Diaminobenzidine Metal Enhanced Substrate	Pierce
Protease Inhibitoren und universelles Protease-Substrat	Roche
Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	Roche
Cell Proliferation ELISA (BrdU)	Roche
CAT ELISA	Roche
Vectastain Elite Kit Peroxidase	Vector Laboratories
Protein A Antibody Purification Kit	BioRad
Mycoplasma Detection Kit	Roche
In situ Cell Death Detection Kit POD (TUNEL Assay)	Roche
BCA Assay	Pierce
QiaAmp DNA Isolation Kit	Qiagen
RNeasy RNA Isolation Kit	Qiagen
RNA Master Kit Hybridisation Probes	Roche
Fugene6	Roche
QiaPräp Plasmid Maxi Kit	Qiagen

2.1.5 Enzyme

Taq DNA-Polymerase	Sigma
PNGaseF	New England Biolabs
DNaseI	Qiagen
Proteinase K	Sigma
Pronase	Sigma
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs

2.1.6 Gewebeprobe

Für immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten wurden bereits in Paraffin eingebettete Gewebeprobe aus dem Archiv des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, verwendet. Das Alter der Blöcke betrug dabei zum Zeitpunkt der Schnittherstellung höchstens 18 Monate. Zusätzlich benötigte Gewebeprobe von frischen Kolonresektaten wurden ebenfalls durch das Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Eukaryotische Zelllinien

I. Parentale

Bezeichnung	Organismus/ Spezifikation	Herkunft
HT-29	humane Kolonkarzinom Zelllinie	ATCC
Jurkat	humane T-Lymphozyten Zelllinie, CEACAM-negativ	J. Shively, City of Hope, CA, USA
MC38	murine Methylcholantrene induzierte Kolonkarzinom Zelllinie	IKC, Klinikum Mannheim
SW480	humane Kolonkarzinom Zelllinie	Prof. Wagener, UKE, Hamburg
HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie	Prof. Zentgraf, DKFZ Heidelberg
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie	DMSZ

II. Transfektome und Hybridome

Bezeichnung	Organismus/ Spezifikation	Herkunft
MC38-CEACAM1-4L	murine Kolonkarzinom Zelllinie, humanes CEACAM1-4L exprimierend	J. Shively, City of Hope, CA, USA
C15A3	murine Kolonkarzinom Zelllinie, humanes CEACAM5 exprimierend	IKC, Klinikum Mannheim
Jurkat-CEACAM1-4L	humane T-Lymphozyten, CEACAM1-4L exprimierend	J. Shively, City of Hope, CA, USA
Jurkat-CEACAM1-4S	humane T-Lymphozyten, CEACAM1-4S exprimierend	J. Shively, City of Hope, CA, USA

II. Transfektome und Hybridome (Fortsetzung)

HeLa-CEACAM6	humane Zervixkarzinom Zelllinie, CEACAM6 exprimierend	J. Shively, City of Hope, CA, USA
HEK-CEACAM1-4L	humane embryonale Nierenzelllinie, CEACAM1-4L exprimierend	IKC, Klinikum Mannheim
HEK-FLAG/CEACAM1-4L	humane embryonale Nierenzelllinie, FLAG-CEACAM1-4L exprimierend	IKC, Klinikum Mannheim
T84.1	mAb T84.1 produzierendes Hybridom	J. Shively, City of Hope, CA, USA
T84.66	mAb T84.66 produzierendes Hybridom	J. Shively, City of Hope, CA, USA
7-2.3	mAb 7-2.3 produzierendes Hybridom	IKC, Klin. Mannheim/ ATV, DKFZ Heidelberg

2.1.8 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Durchführung von Promotorassays wurde der Vektor pCATbasic (Promega) mit zwei verschiedenen Inserts verwendet.

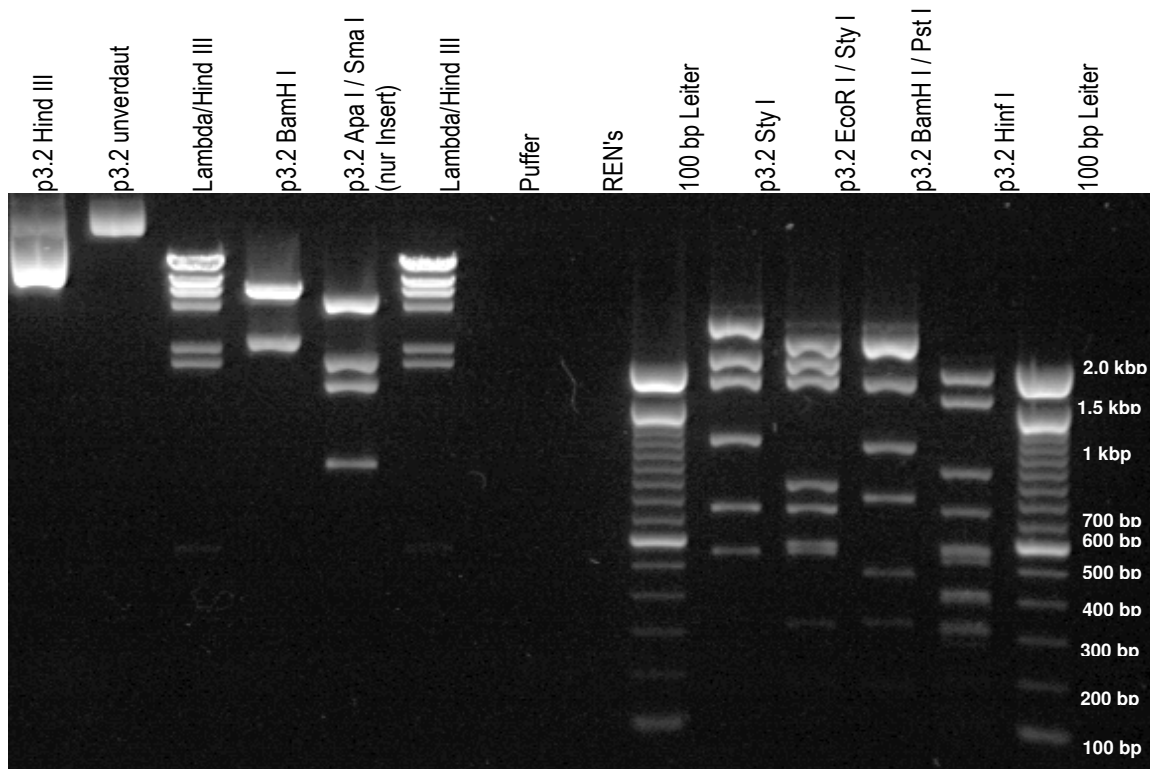


Abb. 8 Kontrollverdau des CEACAM1-Promotor Reportervektors p3.2. Das Plasmid weist ein CAT Reportergen auf, das unter Kontrolle eines 5,5 kbp grossen Fragments der Promotorregion von CEACAM1 steht. Die Grösse des Vektors beträgt 6,8 kbp. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1,0% Agarosegel. Als Marker wurden eine 100 bp Leiter und Lambda DNA, verdaut mit HindIII, verwendet.

Die Inserts bestanden aus der sense CEACAM1-Promotor-CAT Kasette) bzw. der CEACAM1(reverse)-Promotor-CAT Kasette. Diese Konstrukte wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert; Die korrekte Orientierung des Inserts wurde durch multiplen Restriktionsverdau und

Ansequenzieren der Vektoren sichergestellt (Abb. 8). Für die Expression des N-Terminal FLAG-markierten CEACAM1-4L wurde CEACAM1-4L in den Vektor p3xFLAG-CMV-9 (Sigma) kloniert und in *E. coli* Top10 transformiert.

Zur Transfektion humaner Zelllinien fanden die unten aufgeführten Plasmide Verwendung:

Plasmide	p3.2	CEACAM1-Promotor im pCATbasic Reporterplasmid, sense Orientierung
	p4.1	CEACAM1-Promotor im pCATbasic Reporterplasmid, reverse Orientierung
	pEGFP	EGFP-Neomycin Kontrollplasmid
	pCAT control	CAT Expressionsplasmid (Kontrollplasmid, Promega)
	pCEACAM1-4L-FLAG	Expressionsplasmid zur Expression von N-terminal FLAG markierten Proteinen (Sigma)
(Plasmid-Karten siehe Anhang, S.144).		

2.1.9 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit fanden die im Folgenden genannten Antikörper Verwendung. Es handelte sich bei den primären Antikörpern durchgängig um monoklonale Antikörper muriner Herkunft.

I. Primäre Antikörper (murin)

Antigenspezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
CEACAM-1	29H2	IgG1	NovoCastra
CEACAM-1, -5, und CEACAM-6	T84.1	IgG1	J. Shively, City of Hope, CA
CEACAM-6	By 114	IgG1	Innogenex
CEACAM-1, -5, -6 und CEACAM-2	Kat4c	IgG1	DAKO
CEACAM-5	T84.66	IgG2b	J. Shively, City of Hope, CA
CEACAM-1	4D1/C2	IgG1	C. Wagener, UKE, Hamburg
CEACAM-1, lange zytopl. Domäne	7-2.3	IgG1	H. Zentgraf, DKFZ, Heidelberg
β -Actin	AC-15	IgG1	Abcam
β -Catenin, N-Terminus, Exon2	7D11	IgG2a	Alexis Biochemicals
β -Catenin	Klon 14	IgG1	Transduktion Laboratories
Caspase gen.s Cytokeratin-18 Neopepitop	M 30	k.a.	Roche
Ki-67	Mib-1	IgG1	DAKO
Fas Ligand, induzierend	CH 11	IgM	Immunotech Beckman Coulter
CEACAM-1	8G5	IgG2a	Genovac
Cytochrom c	A-8	IgG2b	Santa Cruz
Caspase-3	3G2	IgG	Cell Signalling
3xFLAG Tag	M2	IgG1	Sigma

II. Sekundär Antikörper und Konjugate

Wirt-Spezies	Spezifität	Konjugation	Herkunft
Ziege	Anti-Maus	unkonjugiert	Dianova
Ziege	Anti-Maus	Alkalische Phosphatase	BioRad
Ziege	Anti-Maus	Peroxidase	Dianova
Ziege	Anti-Maus	FITC	Dianova
Ziege	Anti-Maus, polyclonal	Peroxidase	DAKO
Ziege	Anti-Maus, F(ab') ₂	Phycoerythrin (R-PE)	DAKO
Ziege	Anti-Maus	Biotinyliert	Dianova
Streptavidin		Peroxidase	DAKO
Streptavidin		unkonjugiert	Sigma

2.1.10 Primer und Hybridisierungs Sonden

Für das Design von PCR-Primern und Hybridisierungs-Sonden wurden die Programme Oligo 4.0 (National Biosciences) und die Internet-Ressource Primer 3.0 (www-genome.wi.mit.edu) verwendet. Die Primer wurden von der Firma Metabion (www.Metabion.de), die Hybridisierungs-Sonden vom Hersteller TibMolBiol (www.TibMolBiol.de) bezogen.

FRET-Sonden und Primer für RT-PCR Anwendungen mit Einsatz am LightCycler

Dem Primer- und Sondendesign zur Amplifikation von CEACAM1 lag die Sequenz von Barnett et al. 1989, GenBank Accession No. X16354, zugrunde. Für das Primerdesign zur Amplifikation von PBGD (Porphobilinogen Deaminase, sog. Housekeeping Gen) wurde die Sequenz der GenBank Accession No. X04217 verwendet.

CEACAM1 Primer

Linker Primer CC1-U1108 5' – CTG ACC TGC TCC ACA AAT GA – 3' T_m = 62,6 °C
 Rechter Primer CC1-L1369 5' – GGC CAC TAC TCC AAT CAC AAT – 3' T_m = 63,3 °C

CEACAM1 Sonden

BGP-3' Fluorescein 5' – AAG CTG TCC CAG GGC AAC A – Fl. T_m = 69,7 °C
 BGP-5' LC705 LC705 – ACC CTC AGC ATA AAC CCT GTC AA – 3' T_m = 71,8 °C

PBGD Primer

Linker Primer PBGD U64 5' – GAA AAC AGC CCA AAG ATG AGA G – 3' T_m = 52,4 °C
 Rechter Primer PBGD L338 5' – GAT GGT GAA GCC AGG AGG AA – 3' T_m = 53,9 °C

PBGD Sonden (C. Thömmes, Diplomarbeit, Giessen 2000)

PBGD1 Fluorescein 5' – GCA ACA TTG AAA GCC TCG TAC CCT GGC CTG CAG TTT – Fl.
 PBGD1 LC640 LC640 – AAA TCA TTG CTA TGT CCA CCA CAG GG P – 3'

2.1.11 Allgemeine Lösungen und Reagenzien

Zelllyse-Puffer für Zellkulturen

RIPA-Puffer	Trisbase	50	mM
	Natriumchlorid	150	mM
	Triton X-100 (v/v)	1,0	%
	SDS (w/v)	0,1	%
	Natriumdesoxycholat (w/v)	1,0	%

den pH-Wert auf 7,2 einstellen und den Puffer bei 4°C lagern.

Proteaseinhibitoren-Zusätze für Zellkulturlysate

Natriumorthovanadat 1 M	10	μL
Natriumfluorid 1 mg/mL	100	μL
Aprotinin 1 mg/mL	100	μL
Leupeptin 1 mg/mL	10	μL
PMSF 1 μg/mL	100	μL

Zusatz der angegebenen Volumina zu jeweils 10 mL Zelllyse-Puffer

Tris-Puffer für die Verwendung in Western Blots und ELISA

10x Stocklösung	Trisbase	100	mM
	Natriumchlorid	10	mM

den pH-Wert mit 1N HCl auf pH 7,6 einstellen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) für die Verwendung in der Immunchemie

10x Stocklösung	Kaliumchlorid	2,0	g/L
	KH ₂ PO ₄	2,0	g/L
	Natriumchlorid	80,0	g/L
	Na ₂ HPO ₄	11,5	g/L

den pH-Wert auf pH 7,4 einstellen.

Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen:	Tris-Puffer (pH 8,8)	1,880	M
	Tris-Puffer (pH 6,8)	0,625	M
	Ammoniumpersulfat in A. bidest. (w/v)	10,000	%
	SDS in A. bidest. (w/v)	0,500	%

Diskontinuierliche Gele: Zusammensetzung für Sammel- und Trenngele

Sammelgel 5%-ig	Polyacrylamid/Bisacrylamid (30%, 37,1:1)	0,330	mL
	Tris-Puffer 0,625 M (pH 6,8)	0,400	mL
	SDS 0,5% (w/v)	0,400	mL
	A. bidest.	0,870	mL
	Ammoniumpersulfat 10% (w/v)	0,010	mL
	TEMED	0,002	mL

%-Gehalt Trenngel	7,5	10	12,5	15
Polyacrylamid/Bisacrylamid (30%; 37,1 : 1)	1,000 mL	1,330 mL	1,667 mL	1,500 mL
Tris 1,88 M (pH 8,8)	0,800 mL	0,800 mL	0,800 mL	0,800 mL
SDS 0,5% (w/v)	0,800 mL	0,800 mL	0,800 mL	0,800 mL
A. bidest.	1,400 mL	1,060 mL	0,734 mL	0,900 mL
APS 10% (w/v)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
TEMED	3,3 µL	3,3 µL	3,3 µL	3,3 µL

Probenpuffer für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

4x Stocklösung	Glycerin	4,6 mL
	Tris-HCl 1M (pH 6,8)	2,5 mL
	SDS	0,8 g
	Bromphenolblau (1%) (w/v)	1,0 mL
	β-Mercaptoethanol	1,0 mL

Auffüllen auf 10 mL mit A. bidest.; aliquotiert bei –20°C lagern.

Laufpuffer für die SDS-Page (Gebrauchslösung)

Trisbase	25,0	mM
Glycin	192,0	mM
SDS	3,5	mM

Coomassie-Blau Färbelösung und Entfärber

Coomassie-Blau R250 (w/v)	0,1	%
Methanol (v/v)	40,0	%
Eisessig (v/v)	10,0	%

Zum Entfärben wurde eine Lösung aus 25% Methanol (v/v) und 10% Eisessig (v/v) in A. bidest. verwendet. Die Entfärbedauer richtete sich nach der Färbestärke des Gels und betrug 3 bis 16 Stunden.

Immunpräzipitationspuffer (1x)

Natriumchlorid	500	mM
Trisbase	50	mM
Kalziumdichlorid	2	mM
NP-40 (v/v)	0,05	%
BSA (w/v)	0,10	%

Den pH-Wert auf pH 8,5 einstellen und den Puffer bei 4°C lagern.

Transfer-Puffer für Nitrocellulosemembranen

Methanol (v/v)	10	%
Trisbase	25	mM
Glycin	150	mM

der pH-Wert liegt bei genauem Einwiegen bei pH 8,3

Blockadereagenz für Nitrocellulosemembranen

5% Magermilchpulver (w/v) in TBS Puffer unter Rühren lösen. Bei einzelnen Antikörpern wurden bis zu 0,1% Tween-20 (v/v) zugesetzt.

Ladepuffer für Agarosegele	Bromphenolblau	0,25	%
10x Stocklösung	Xylene Cyanol FF	0,25	%
	Saccharose (w/v)	40,00	%

Lagerung des Puffers bei 4°C.

Zum Gebrauch 9 Teile PCR-Produkt oder Nukleinsäurepräparation mit einem Teil Ladepuffer versetzen. Für die Elektrophorese wurde als Laufpuffer ein TBE-Puffer der Zusammensetzung 53 mM Tris, 54 mM Borsäure und 1,2 mM EDTA verwendet.

2.1.12 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur**Basalmedien für eukaryotische Zelllinien**

RPMI 1640 (mit Phenolrot) mit L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat	PAA, GIBCO/ Invitrogen
RPMI 1640 (ohne Phenolrot) mit L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat	PAA, GIBCO/ Invitrogen
DMEM mit hohem Glucosegehalt, mit L-Glutamin	PAA
DMEM, HEPES gepuffert ohne L-Glutamin	GIBCO/ Invitrogen
Hybridoma Express TM	PAA

Supplemente und Reagenzien für die Zellkultur

L-Glutamin	PAA
Fötale Kälber Serum GOLD	PAA
Natrium-Pyruvat	PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO/ Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Biochrom
Trypanblau 0,2%ige Lösung	Sigma
Dulbeccos's PBS-Puffer (pH-Wert 7,4), ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	PAA
G-418 Lösung (50 mg/mL)	PAA
Trypsin/ EDTA (2,5 g/L / 0,2 g/L)	PAA

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Zur Kultur von HT-29 Zellen, HeLa Zellen und T84.66 Hybridomen wurde RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10% Fötalem Kälber Serum (FCS) (v/v), 5 mM L-Glutamin sowie 500 U/L Penicillin und 1000 U/L Streptomycin verwendet.

Die Kultur der Zelllinien SW480, MC38 und T84.1 Hybridome erfolgte in DMEM mit Zusatz von 10% FCS (v/v), 8 mM L-Glutamat und 500 U/L Penicillin und 1000 U/L Streptomycin.

Die Zelllinien C15A3 (MC38, stabil mit CEACAM5 transfiziert) und MC38-CEACAM1-4L (MC38, stabil mit CEACAM1-4L transfiziert) wurden in dem für MC38 angegebenen Kulturmedium gehalten. Die Selektion zum Erhalt der Transfektion wurde mit dem Aminoglykosid G-418 in einer Endkonzentration von 10 µg/mL Zellkulturmedium durchgeführt.

Die CEACAM-6 transfizierten HeLa-CEACAM6 Zellen wurden in DMEM mit Zusatz von 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (v/v), 5 mM L-Glutamin sowie 10% FCS und 500 U/L Penicillin, 1000 U/L Streptomycin kultiviert.

Jurkat, eine humane T-Lymphozyten Zelllinie, wurde in RPMI 1640 kultiviert, dem 10% hitzeinaktiviertes FCS (v/v) sowie 8 mM L-Glutamat, 500 U/L Penicillin und 1000 U/L Streptomycin zugesetzt wurden. Die FACS Versuche erforderten anstelle des phenolrothaltigen Mediums eine phenolrotfreie Variante sonst gleicher Zusammensetzung.

Die Selektion der stabil CEACAM1 transfizierten Jurkat T-Lymphozyten erfolgte mit G-418 in einer Konzentration von 12 µg/mL. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage vollständig erneuert.

Alle angegebenen Zelllinien benötigten zum Wachstum eine Temperatur von 37°C und einen CO₂-Gehalt von 5%.

2.2.2 Hitzeinaktivierung von Serumzusätzen

Das Fötale Kälber Serum (FCS) wurde in 50 mL Polypropylen Röhrchen aliquotiert und für 30 Minuten bei 56 °C in einem Wasserbad inkubiert. Diese Temperatur stellt die Inaktivierung aller im Serum enthaltenen Komplementbestandteile durch Proteindenaturierung sicher. Bei längerer Einwirkungsdauer kommt es darüber hinaus auch zu einer Zerstörung der im Serum enthaltenen und für das Zellwachstum erforderlichen Wachstumsfaktoren.

Zur besseren Wärmeverteilung wurde in 5 Minuten Intervallen gründlich durchmischt und das Serum vor dem Zusatz zum Zellkulturmedium durch ein Filter mit 0,22 µm Porenweite sterilfiltriert.

2.2.3 Optimierung der Antikörperproduktion von Hybridomen

Zur Steigerung der Antikörperproduktion wurden Hybridoma Zelllinien an ein serumfreies, für Hybridome optimiertes Kulturmedium (Hybridoma ExpressTM, HEX) adaptiert.

Die Adaption erfolgte durch Zusatz von konditioniertem DMEM zu zunächst 33% HEX Medium. Nach durchschnittlich zwei bis drei Passagen wurde der Anteil des serumfreien Medium auf 66% erhöht und nach weiteren 2 Passagen durch reines Hybridoma Express als Kulturmedium ersetzt. Die Zellen konnten mindestens vier Tage bis zum nächsten Umsetzen in diesem Medium belassen werden. Der Zellkulturüberstand enthielt den produzierten Antikörper in Konzentrationen von 20 – 400 µg/mL, abhängig von dem verwendeten Hybridom. Die Produktivität des Hybridoms wurde durch einen ELISA mit murinem IgG als Standard kontrolliert (2.3.2).

2.2.4 Subkultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien

Die Subkultivierung von Zelllinien erfolgte in der Regel bei einer Konfluenz von 70–95%. Das Zellkulturmedium wurde mit einer sterilen Pipette abgesaugt und verbleibende Reste des Zellkulturmediums durch vorsichtiges Abspülen des Kulturflaschenbodens mit Dulbecco's PBS-Puffer entfernt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Trypsin/ EDTA für 5–15 Minuten bei 37 °C. Nach der mikroskopischen Kontrolle des Ablösungsgrades wurde der Zellsuspension ein dem Trypsin/EDTA Volumen entsprechendes Kulturmediumvolumen zur Trypsin-inaktivierung zugesetzt und die Zellsuspension bei 200 x g bis 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Zellzahl ausgesät.

2.2.5 Subkultivieren von Suspensionskulturen

Bei Suspensionskulturen wurde die Zellsuspension zunächst bei 200 x g für 3 Minuten abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in neuem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Mindestdichte von 10^5 Zellen/mL ausgesät.

2.2.6 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer (Assistent) bestimmt. Für jede Kammerzählung wurden mikroskopisch jeweils 4 Großquadrate oder mindestens 400 Zellen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl errechnete sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Zellzahl [Zellen/mL]} = \text{Mittelwert eines Großquadrates} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Bei Bedarf konnte der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung festgestellt werden. Für diese Färbung wurden die Färbelösung und eine entsprechend verdünnte Zellsuspension im gleichen Verhältnis gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Färbung in der Zählkammer ausgewertet werden. Bei toten Zellen ist die Integrität der Zellmembran nicht gegeben, wodurch diese Zellen den Farbstoff im Gegensatz zu lebensfähigen Zellen nicht ausschließen können und sich blau anfärben.

Der Anteil toter Zellen sollte bei Standardkulturbedingungen einen Wert von 8–10% nicht überschreiten.

2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei Temperaturen unter -196 °C ist ein spezielles Gefriermedium erforderlich. Die Zellen mussten zunächst geerntet und abzentrifugiert werden.

Um eine Schädigung der Zellen durch die Bildung von Eiskristallen innerhalb der Zelle und der damit verbundenen Volumenzunahme des gefrorenen Wassers zu vermeiden, wurden die Zellen in einer filtersterilisierten Lösung aus 90% FCS und 10% DMSO aufgenommen.

Nach dem Aliquotieren des resuspendierten Zellpellets in Kryoröhrchen wurden diese sofort auf Eis gelagert und nach 30 Minuten in eine -20 °C Lagerung überführt, wo die Röhrchen für 24 Stunden belassen wurden. Daran schloss sich eine Lagerung bei -80 °C für zwei Tage an, bevor der Transfer der Röhrchen in den Flüssigstickstoff-Lagerungsbehälter erfolgte.

2.2.8 Mycoplasmen Test

Die Kontamination mit Mycoplasmen kann das Verhalten und die physiologischen Eigenschaften einer Zelllinie nachhaltig verändern.

Deswegen wurden alle Zellkulturen in regelmäßigen Abständen und generell vor physiologischen Experimenten auf eine mögliche Kontamination mit Mycoplasmen kontrolliert. Getestet wurde mit dem Mycoplasma Detection ELISA der Firma Roche.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben im Protokoll des Herstellers. Für die Auswertung am Plattenphotometer wurde ein Filtersatz für die Messung bei 450 nm verwendet.

2.2.9 Stimulationen und Induktionen

Um die Regulation und biologische Funktion von CEACAM1 in vitro untersuchen zu können, wurden verschiedene differenzierungs-induzierende oder zelltodauslösende Stimuli eingesetzt. Für alle Stimulationen wurde Zellkulturmedium mit hitzeinaktiviertem FCS verwendet.

2.2.9.1 Apoptoseinduktion

Apoptose kann durch eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli ausgelöst werden. Der Verlauf des Apoptosesignalwegs ist vom Auslöser abhängig.

Als Kontrollstimuli für die allgemeine Induzierbarkeit der Apoptose wurden Camptothecin, Etoposid, Cycloheximid und Actinomycin D eingesetzt. Die zu verwendenden Konzentrationsbereiche wurden einzeln für jede Zelllinie durch Titrationsreihen bestimmt. Für Jurkat T-Lymphozyten betrugen die Konzentrationen jeweils: Camptothecin 500 nM, Etoposid 50 μM , Actinomycin D 500 nM und Cycloheximid 100 μM . Der Fas-Ligand wurde in Konzentrationen von 50–200 ng/mL eingesetzt.

2.2.9.2 Quervernetzung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche

Zur Quervernetzung des membranständigen CEACAM1 wurden sowohl der CEACAM1-spezifische monoklonale Antikörper 4D1/C2 als auch der CEACAM1, -5 und -6 erkennende Antikörper T84.1 eingesetzt. Die Konzentration der Antikörper betrug in Abhängigkeit zur

verwendeten Zelllinie 0,5–2 µg/mL Zellkulturmedium. Die Zelldichte betrug $6,4 \cdot 10^4$ Zellen/ Well einer 24 Well Platte.

24 Stunden vor Zugabe des primären Antikörpers wurde die Kultur antibiotikafrei kultiviert. Nach Zugabe des primären Antikörpers erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ für 4 – 16 Stunden. Die Quervernetzung wurde durch Zusatz eines Sekundärantikörpers (1–5 µg/mL) verstärkt. In den Experimenten, in denen ein biotinylierter Primärantikörper Verwendung fand, wurde Streptavidin in einer Endkonzentration von 1 µg/mL Zellkulturmedium eingesetzt. In den Gruppen, in denen CEACAM5 Protein anstelle des Antikörpers eingesetzt wurde, erfolgte der Zusatz des Proteins steril und azidfrei direkt zum Zellkulturmedium. Der weitere Einsatz von vernetzenden Antikörpern erübrigte sich hier.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ bis zum Versuchsende inkubiert, maximal jedoch für 4 Tage. Nach 24 Stunden wurden 1/5 des Kulturvolumen als frisches Medium zugesetzt.

2.2.9.3 Stimulation von HT-29 mit Interferon Gamma

HT-29 Zellen wurden 24 Stunden vor der geplanten Stimulation mit einer Zelldichte von $6,4 \cdot 10^4$ Zellen/ 9,5 cm² Aufwuchsfläche in normalem Kulturmedium mit hitzeinaktiviertem FCS ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ in inkubiert. Zur Stimulation wurde das Kulturmedium entfernt und durch 3 mL Kulturmedium, versetzt mit 500 U/mL humanem IFN-γ, ersetzt und die Zellen für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach Ende der Stimulationsdauer wurden die Zellen einmal mit 2 mL Dulbecco's PBS gewaschen und zur CEACAM1-Quervernetzung mit den entsprechenden Antikörpern weiter inkubiert oder mit Trypsin/EDTA abgelöst, bei 300 x g abzentrifugiert und entsprechend der benötigten Protokolle weiter aufgearbeitet.

2.2.9.4 Stimulationen mit kurzkettigen Fettsäuren

Zur Stimulation von Kolonkarzinomzelllinien mit den wasserlöslichen Natriumsalzen der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, n-Butyrat und Propionat wurden adhärente Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/ 25 cm² Aufwuchsfläche bei 5 mL Kulturvolumen ausgesät und 48 Stunden ohne Mediumwechsel kultiviert.

Zur Stimulation mit Fettsäuren wurden die Festsubstanzen der Fettsäuren direkt in Zellkulturmedium gelöst und diese Stock-Lösungen sterilfiltriert. Daraus wurden mit Zellkulturmedium weitere Verdünnungen hergestellt (Konzentrationen 1–55 mM). Nach Absaugen des alten Kulturmediums wurden die entsprechenden Verdünnungen als frisches Kulturmedium zugegeben. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂. Im Anschluss an die Stimulation wurden zur Analyse der Stimulationswirkungen entweder Proteinlysate hergestellt oder Gesamt-RNA isoliert.

2.2.10 Apoptoseassays auf zellulärer Basis

2.2.10.1 PI-Färbung zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Der Anteil der apoptotischen Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl unter Abzug der nekrotischen Zellen wurde mikroskopisch durch Färbung mit Propidiumjodid ermittelt. Dem Kulturmedium wurde das Propidiumjodid (1 mg/ mL A. bidest.) direkt aus der Stocklösung zugesetzt. Die Endkonzentration betrug 10 µg/mL. Die Inkubationsdauer vor der mikroskopischen Auswertung betrug 10 Minuten im Dunkeln bei 37 °C in der Zellkulturschale. Die Färbung wurde unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filtersatzes (Filtersatz IB, Olympus) ausgezählt. Propidiumjodid in dieser Konzentration ist vergleichsweise unempfindlich gegenüber Photobleaching-Effekten, wodurch die Färbung über einen Zeitraum von mehreren Stunden auswertbar blieb.

2.2.10.2 Bestimmung des Anteils einzelner Apoptosestadien

Als eindeutiges Merkmal für das Eintreten von Apoptose wurde die Bildung von Membranblasen, das sogenannte „membrane blebbing“ und der darauf folgende Zerfall des Zellkerns in Apoptosekörper angesehen (Hengartner, 2000).

Ein Ereignis, das der Bildung von Membranblasen direkt nachfolgt, ist der Verlust der Zellmembranintegrität. Dieser Verlust der Ausschlussfähigkeit kann durch Zusatz von Vitalfarbstoffen wie Propidiumjodid leicht festgestellt werden. Der Zerfall des Zellkerns ist nicht immer leicht im Phasenkontrast zu erkennen, jedoch klar erkenntlich durch Anfärbung mit nukleinsäurebindenden Farbstoffen. Da nicht alle DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffe (hier z.B. Hoechst Dye 13342, Molecular Probes Inc.) zwischen lebenden und toten Zellen diskriminieren, konnte die Kombination aus zwei verschiedenen Farbstoffen hier einen zusätzlichen Informationsgewinn erzielen.

Färbeansatz	Propidiumjodid (1 mg/mL A. bidest.)	5 µL
	Hoechst Dye (10 mg/mL A. bidest.)	1 µL
	Zusatz der wässrigen Stocklösungen steril direkt zu 100 µL Zellkultur; Auswertung nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C im Dunkeln.	

Die Kombination beider Farbstoffe erlaubte das Differenzieren zwischen drei verschiedenen Phasen der Apoptose: der frühen Apoptose, in welcher bereits der Zellkern fragmentiert wurde, nicht jedoch die Kernmembran zerstört ist. In der nachfolgenden Phase tritt der Verlust der Membranintegrität ein, gefolgt von der Fragmentierung des Zellkerns. Der Unterschied zu nekrotischen Zellen ist hier offensichtlich: Intakte Zellkerne bei zerstörter Membranintegrität schließen ein Apoptose-Ereignis im engeren Sinne aus. Das Erfassen der Anteile der einzelnen Zelltodstadien ermöglicht zudem, den zeitlichen Verlauf des Zelltodprozesses zu erfassen (Abb. 41).

2.2.11 Quantifizierung der Nukleosomenbildung in Zellextrakten

Der Zerfall der DNA in Histon-DNA-Komplexe, die sogenannten Nukleosomen, kann mit Hilfe eines Sandwich-ELISA quantitativ gemessen werden.

In diesem ELISA wurde ein gegen den Histon-Anteil des Nukleosoms gerichteter, biotinylierter Antikörper als Fängerantikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels eines gegen die DNA-3' Enden gerichteten und an Peroxidase gekoppelten Antikörpers.

Jeweils 10^6 Zellen wurden für 10 Minuten bei $220 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand hinterher verworfen. Die Zellen wurden in Lysispuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 10^6 Zellen wurden in 500 μL (Jurkat) bzw. 1000 μL (HT29) Lysispuffer aufgenommen.

Die Lysate wurden bei $220 \times g$ abzentrifugiert. Zu jeweils 20 μL des Lysates wurden 80 μL des nach Herstellerangaben hergestellten Immunreagenzes zugesetzt und die Proben in eine strept-avidinbeschichtete Mikrotiterplatte überführt. Die Inkubationsdauer betrug 2 Stunden auf einem Schüttler mit etwa 250 Upm bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte abgeklopft und die einzelnen Wells dreimal mit jeweils 200 μL Inkubationspuffer gewaschen. Der ELISA wurde durch Zusatz von 100 μL ABTS entwickelt. Nach fest definierten Zeitintervallen von 2, 3, 5 und 10 Minuten wurde die OD bei 405 nm mit einem Plattenphotometer gemessen. Eine mit dem ELISA-System mitgelieferte Negativ- und Positivkontrolle wurde auf jeder Platte zusätzlich zu den experimentellen Kontrollen mitgeführt.

2.2.12 Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es ist hierbei zwischen transienter und stabiler Transfektion zu unterscheiden. Für die stabile Transfektion wurde zusätzlich ein Selektionsmarker, etwa eine Resistenz gegen das Neomycin-derivat G-418, übertragen. Das zusätzliche Vorhandensein eines direkt sichtbaren Markers wie z.B. GFP (Grün fluoreszierendes Protein) erleichterte die Subklonierung.

SW480 Zellen wurden mittels Lipofektion unter Verwendung von Fugene6 (Roche) mit zirkulärer Plasmid-DNA transfiziert. Im Grundlegenden wurde dabei nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Transfektion wurde in 6 Wellplatten mit 1-1,2 μg DNA für $5 \cdot 10^5$ Zellen/Well und Transfektionsansatz durchgeführt. Das ideale Verhältnis zwischen Fugene6 und DNA für die Transfektion betrug 7:1, was auf empirischer Basis zuvor festgestellt worden war.

Die maximale Aufnahme des Plasmids wurde nach 36–48 Stunden Inkubation erreicht. Ein GFP-Neomycin Konstrukt diente als Positivkontrolle für die erfolgreiche Transfektion und zur Etablierung der für die Zelllinie optimalen Transfektionsbedingungen. Bei dem gewählten Ansatz betrug die Effizienz für die Transfektion 25-35% der Zellen nach 48 Stunden, bestimmt durch Messung des Anteils GFP-positiver Zellen im nicht unter Selektion stehenden Transfektionsansatz am FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting).

Zur Transfektion von HEK293 Zellen eignete sich die Kalziumphosphat-Methode. Hierbei wurden $3 \cdot 10^5$ Zellen/ Well einer 6 Well Platte ausgesät (Kulturvolumen 2 mL) und 4 Stunden nach der Aussaat mit dem Kalziumphosphat-Plasmid Komplex transfiziert.

HBS-Puffer (2x)	Natriumchlorid	50 mM
	di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	1,5 mM
	HEPES	55 mM

den pH-Wert exakt auf 7,0 einstellen; die Lösung durch einen 0,22 μ M Filter filtrieren und in Aliquots zu 2 mL bei – 20°C bis zum Gebrauch lagern. Aufgetaute Lösungsreste verwerfen.

2 M Kalziumchlorid	Kalziumchlorid-Hexahydrat	47,7 g in 100 mL A. bidest. lösen.
	Die Lösung bei 4°C bis zum Gebrauch lagern. Nicht wegfrieren!	

Transfektionsansatz: (500 μ L Reaktionsgefäß)	2,5 μ g	Plasmid-DNA, zirkulär
	7,47 μ L	Kalziumchlorid (2M)

ad 60 μ L mit A. bidest. (steril) auffüllen, um Volumenunterschiede durch unterschiedliche Plasmid-Konzentrationen auszugleichen.

Das doppeltkonzentrierte HBS wurde mit der Mikroliterpipette zugegeben und nach dreimaligem Mischen durch Pipettieren der gesamte Ansatz tropfenweise zu den Zellen in die 6 Well Platte getropft. Das Medium wurde in den ersten 48 Stunden nach der Transfektion nicht gewechselt. Bei jeder Transfektion wurde ein EGFP-Vektorkonstrukt zur Positivkontrolle und Transfektions-effizienz-Abschätzung sowie ein plasmidfreier Ansatz zur Negativkontrolle parallel transfiziert. In den Fällen, in denen eine stabile Transfektion notwendig war, wurde nach 48 Stunden mit der Selektion begonnen. Die einzusetzende Antibiotika-Konzentration richtete sich dabei nach der verwendeten Zelllinie und wurde zuvor empirisch ermittelt.

2.3 Immunchemische Methoden

2.3.1 Präparation der Kolonmukosa

Zur Isolierung von ACF der humanen Kolonmukosa wurde Material von frischen Resektaten verwendet. Das Kolongewebe wurde mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und nach Begutachtung durch einen Pathologen für die Präparation zu verwendende Bereiche identifiziert. Diese Bereiche wurden in Abschnitte von ca. 25 cm² geteilt und die Gewebestücke auf einer Korkplatte fixiert. Die Mukosa wurde von der darunter liegenden Submukosa abgetrennt.

Zum Aufspannen der abgelösten Mukosa wurde diese auf mit Filterpapier bespannte Objektträger aufgelegt und 2-4 Stunden in 4%igem gepuffertem Formaldehyd bei 4 °C fixiert.

Die Färbung des Gewebes erfolgte direkt auf den Objektträgern für 3 Minuten in 0,2%igem, PBS-gepuffertem Methylenblau.

Es schlossen sich 3 x 5 Minuten Waschschrte in Leitungswasser zur Entfernung der überschüssigen Färbelösung an. Das auf dem Filterpapier haftende Gewebe wurde unter eine Stereolupe gelegt und mit etwa 30–40facher Vergrößerung auf vorhandene ACF untersucht.

Kriterien zur Identifizierung von ACF lauteten in Anlehnung an Bird (1987):

- Im Längsprofil verlängerte und daher erhaben wirkende Krypten
- Erweiterte, häufig schlitz- oder sternförmige Lumenöffnungen
- Häufig stärkere Anfärbbarkeit mit Methylenblau
- Klar abgegrenzte Zone im Umriss vergrößerter Krypten

Identifizierte ACF wurden mit permanenter Tusche markiert und mit einem Skalpell ca. 1 mm von ihrem Rand herausgeschnitten und zur Fixierung in 4%igem gepufferten Formaldehyd bei 4 °C gelagert. Diese Gewebestücke wurden nachfolgend in Paraffin eingebettet. Im Durchschnitt wurden aus jeder Gewebeprobe 5-8 ACF isoliert.

2.3.2 Immunglobulingehalt-Quantifizierung in Hybridoma-Überständen

Für eine erste Abschätzung des Immunglobulingehaltes in Kulturüberständen von Hybridomkulturen wurde ein direkter ELISA verwendet. Dazu wurde eine Microton 600 Mikrotiterplatte mit murinem Immunglobulin (Ig), gelöst im gleichen Zellkulturmedium wie die zu testende Zellkultur, als Standard verwendet.

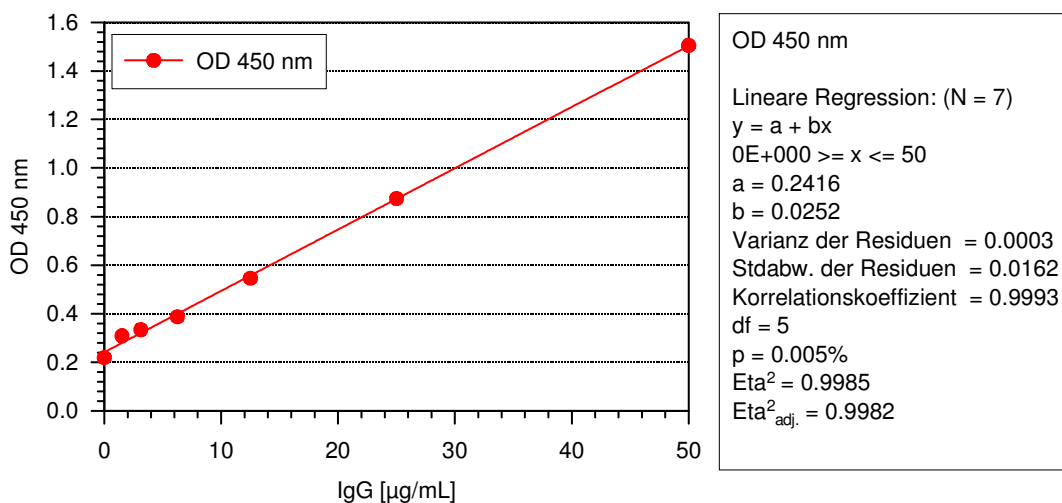


Abb. 9 Quantifizierung von murinem IgG aus Zellkulturmedium im direkten ELISA. Darstellung einer Eichreihe für den Bereich 1,5 – 50 µg/mL murines IgG. Es wurde in Dreifachbestimmungen gearbeitet.

Das Volumen zum Beschichten betrug 50 µL der Standardverdünnungen (Standardreihe) oder der zu testenden Zellkulturprobe (Hybridomkulturüberstand). Es wurde über Nacht bei 4 °C beschichtet und nachfolgend mit 200 µl 2% (w/v) BSA, gelöst in TBS, für 1 Stunde bei 37 °C blockiert. Die Detektion erfolgte mit einem Ziege anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat (Verdünnung 1:4000, DAKO) für 1 Stunde bei 37 °C. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal mit 200 µL

TBS/ 0,1% Tween20 (w/v), für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Das für die Substratumsetzung verwendete TMB-Volumen betrug 100 µL/ Well.

Das Abstoppen der TMB Substratumsetzung erfolgte mit 1N Schwefelsäure nach optischer Kontrolle. Die Platte wurde an einem Plattenphotometer bei 450 nm ausgewertet. Der Bereich der Eichreihe lag zwischen 1,5 und 50 µg IgG/ mL (Abb. 9).

Zur genauen Bestimmung der IgG-Gehalte wurde ein Ziege anti-Maus IgG Fängerantikörper über Nacht beschichtet und mit einer 1:10 bis 1:10.000 in PBS Puffer verdünnten Probe für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der sich anschließende Nachweis erfolgte dann wie oben beschrieben.

Dieser Sandwich-ELISA schließt eine Interferenz mit dem im Kulturmedium enthaltenen Kälberserum aus.

2.3.3 Dialyse von Antikörpern

Um einen Verlust des zu dialysierenden Antikörpers zu vermeiden, wurden Spinsäulen (Millipore) mit passivierter Oberfläche verwendet. Dazu wurden die für ein Dialysat von 500 µL ausgelegten Säulen mit 500 µL einer 5%igen BSA/PBS (w/v) Lösung befüllt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die BSA-Lösung wurde nachfolgend abpipettiert und die Spinsäule mit 500 µL PBS ohne Zusätze befüllt und 15 Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert.

Zur Entfernung von Natriumazid-Zusätzen und zur Umpufferung von Antikörpern wurden diese in die passivierten Spinsäulen gefüllt und 10 x 30 Minuten bei 11.000 x g in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Dialysiert wurde gegen PBS oder 0,9%ige Natriumchloridlösung.

Die dialysierten Antikörper wurden nachfolgend entweder in Zellkulturmedium verdünnt und sterilfiltriert oder für eine Kopplung an NHS-Biotin verwendet.

2.3.4 Aufreinigung von Antikörpern

Die Aufreinigung von Antikörpern erfolgt in der Regel über Affinitätschromatographische Methoden.

Bei murinen Antikörpern des IgG1 Isotyps ist eine Verwendung sowohl von Protein A als auch Protein G Säulen möglich, dennoch ist die Bindungsfähigkeit an Protein A unter Zusatz von 3,3 M Natriumchlorid (w/v) zum Zellkulturüberstand und bei einem pH-Wert von 7,6 +/- 0,1 Einheiten deutlich besser. Für die Bindung und Elution fand das MAPS II Puffersystem (Bindungs- und Elutionspuffer) der Firma BioRad Verwendung. Für eine schnellere und reproduzierbarere Aufreinigung wurde das Econo Pumpen- und Schreibersystem (BioRad) eingesetzt.

Eine Säule mit 2 mL Protein A Matrix wurde mit 10 mL MAPS II Bindungspuffer äquilibriert. Sie bindet nach Herstellerangaben 2–4 mg Maus IgG1. Dementsprechend wurde Hybridomakulturüberstand mit einem zuvor ermittelten IgG Gehalt von etwa 2-3 mg mit einer Flussrate von 0,8 mL/min. über die Säule geleitet. Die Säule wurde mit 20 mL MAPS II Puffer bei einer Flussrate von 1,0 mL/min. gewaschen. Eluiert wurde der Antikörper mit 15 mL Citrat Elutionspuffer (pH-Wert 3, BioRad) bei einer Flussrate von 1,0 mL/min (Abb. 10). Es wurden Fraktionen von jeweils

1,5 mL aufgefangen, die durch Zusatz von 350 μ L eines 1 M Trispuffers (pH-Wert 8,8) neutralisiert wurden.

Der Verlauf des Elutionsprozesses wurde kontinuierlich durch eine hinter die Säule geschaltete UV-Messzelle bei 280 nm mit zugeschaltetem Schreiber protokolliert. Der IgG-Gehalt der gesammelten Fraktionen wurde hinterher photometrisch bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $1,42 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für 280 nm ($0,72 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für 260 nm) und bei Abgleich gegen 1,5 mL Citrat-Puffer mit Zusatz vom 350 μ L Trispuffer bestimmt.

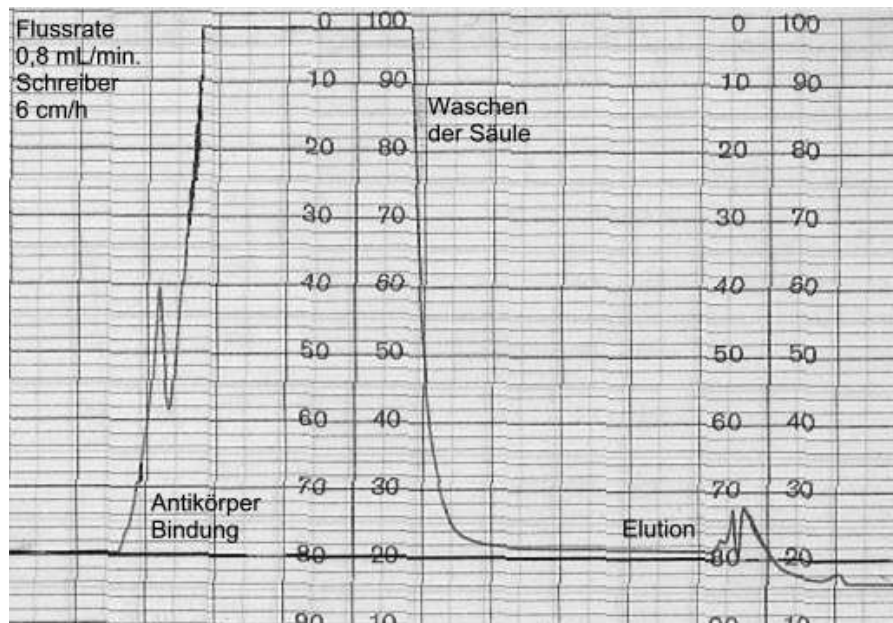


Abb. 10 Aufreinigung eines monoklonalen murinen IgG1 Antikörpers aus Zellkulturüberständen mittels einer ProteinA Säule. Hier wurden 70 mL Zellkulturüberstand über eine Protein A Säule mit einem Bettvolumen von 2 mL geleitet. Die Flussrate zur Immunglobulinbindung betrug 0,8 mL/min, eluiert wurde mit einer Flussrate von 1,0 mL/min. mit Citratpuffer, pH 3,0.

Für den murinen IgG1 Antikörper T84.1 betrug die Ausbeute in der Regel 80–90%. Der Erhalt der Bindungsfähigkeit des Antikörpers wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen an geeigneten Zelllinien (Expression der Antigene CEACAM1, -5 und CEACAM6) verifiziert.

2.3.5 Biotinylierung von Antikörpern

Zur Biotinylierung von Antikörpern ist es erforderlich, alle störenden Bestandteile insbesondere jedoch Moleküle mit freien Aminogruppen, zuvor aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

Über Protein A aufgereinigte Antikörper wurden in MikroconTM-Spinsäulen (Millipore) mit einer Molekulargewichts-Ausschlußgröße (MWCO) von 10 kD für 3 x 30 Minuten gegen PBS mit 500 μ L Puffer je Durchlauf dialysiert und der aufkonzentrierte Antikörper hinterher mit einer NHS-Succinimidobiotin-Lösung nach Herstellerangaben versetzt. Für 2 mg des Antikörpers wurden dabei 35 mM des Esters eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde der Antikörper erneut zur Entfernung von nicht gebundenen Succinimidobiotin dialysiert und auf seine Funktionsfähigkeit in der Immunfluoreszenz kontrolliert.

2.3.6 CAT-ELISA

Das Enzym Acetyl-CoA:Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ist ein bakterielles Enzym, das kein Homolog in Eukaryoten aufweist. Seine Expression ist daher in Gesamtzellextrakten der eukaryotischen Zelllinien spezifisch nachweisbar.

Im Sandwich-ELISA (Roche) wird CAT durch zwei verschiedene, unterschiedliche Epitope erkennende und CAT-spezifische Antikörper gebunden. Der Fängerantikörper war biotinyliert, über ihn wurde das CAT-Molekül an eine streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Der zweite Antikörper war mit Digoxigenin markiert. Diese Markierung kann durch Zugabe eines anti-Digoxigenin Peroxidasekomplexes detektiert werden. Die Umsetzung der Peroxidase erfolgte mittels ABTS. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers mit dem im Kit enthaltenen CAT-Standard durchgeführt.

2.3.7 Bestimmung der Proliferation von HT29 Zellen

Der Assay beruht auf der Detektion des während der DNA-Replikation in proliferierenden Zellen eingebaute Basenanalogen Bromdesoxyuridin (BrdU). Dieses kann nach Fixieren und Permeabilisieren der Zellen direkt durch Bindung eines BrdU-Spezifischen Antikörpers in einem kommerziell erhältlichen, direkten ELISA nachgewiesen werden (Roche).

Für den Assay wurden 10^4 HT29 Zellen/ Well einer 96 Well Platte 4 Stunden lang in Gegenwart von $20\text{ }\mu\text{M}$ BrdU in sterilem Kulturmedium (mit Zusatz von Serum) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in der Mikrotiterplatte 1 Stunde bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und anschließend durch Zugabe von $200\text{ }\mu\text{L}$ FixDenat-Lösung/ Well durch Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Lösung wurde nachfolgend abgeklopft und durch das anti-BrdU Peroxidasekonjugat ersetzt. Der Antikörper wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers entwickelt, die Umsetzung von ABTS wurde durch Zugabe von $20\text{ }\mu\text{L}$ $1\text{N H}_2\text{SO}_4$ / Well gestoppt und der ELISA am Plattenphotometer bei 450 nm ausgewertet.

2.3.8 Herstellung von Zellausstrichen für die Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz- und Immunzytochemiefärbungen wurden Suspensionszellen aus dem Zellkulturmedium bei $200 \times g$ für 5 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 5 mL Mg^{2+} und Ca^{2+} freiem PBS Puffer resuspendiert. Nach dem erneuten Zentrifugieren bei $200 \times g$ für 5 Minuten wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen und $20\text{--}50\text{ }\mu\text{L}$ auf einem SuperFrostTM Objektträger aufgetragen und mit der Kante eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Die Lufttrocknung der Ausstriche erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Für eine bessere Haftung der Zellen auf der Objektträgeroberfläche erfolgte ein Fixieren der Präparate für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 100%igem Methanol, gefolgt von 10 Minuten in 100%igem Aceton. Nach dem erneuten Lufttrocknen der Präparate wurden sie bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.3.9 Immunfluoreszenz Färbung

Die bei -20°C gelagerten Zellausstriche wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und weitere 5 Minuten in PBS rehydriert.

Die Präparate wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 5%igem Ziegen Serum, angesetzt in 3% BSA/PBS blockiert, um unspezifische Proteinwechselwirkungen abzusättigen. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper in geeigneter Verdünnung aufgetragen und die Präparate 45 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abspülen der Präparate mit demineralisiertem Wasser und einer 5 minütigen Inkubation in PBS wurde der sekundäre Antikörper, zumeist ein Ziege anti-Maus IgG Antikörper, markiert mit FITC oder R-PE in geeigneter Verdünnung, aufgetragen. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Nach dem Abspülen der Präparate mit demineralisiertem Wasser und der 10-minütigen Inkubation in PBS im Dunkeln erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Filtersatzes GW (Olympus) für RPE-Färbungen oder IBW (Olympus) für Nachweise mit FITC markierten Sekundärantikörpern. Das sehr schnell erfolgende Photobleaching von FITC-Färbungen wurde durch Auftragen einer 50%igen Glycerinlösung, versetzt mit 10% (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan (DABCO, Sigma) in PBS vermindert.

2.3.10 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Für die Darstellung verschiedener Antigene in paraffin-eingebettetem Gewebe wurden Mikrotomschnitte mit einer Dicke von $4\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt.

Die Schnitte wurden auf SuperFrostTM Objektträger aufgezogen und bei 50°C für 14 Stunden getrocknet. Sie konnten nachfolgend bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden.

Antigendemaskierung

Direkt vor Beginn der Immunhistochemie wurden die Schnitte entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 2 x 5 Minuten in Xylol, jeweils 2-5 Minuten in 100% Ethanol, 95% Ethanol, 95% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol und deionisiertes Wasser.

Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger entweder in 10 mM Citrat-Puffer (pH 6,0) für 10 Minuten bei 650 W in der Mikrowelle gekocht oder in 1mM EDTA-Puffer (pH 8,0) für 2-3 Minuten bei 650 W erhitzt und dann weitere 10 Minuten bei 120 W warm gehalten.

Nach dem Abkühlen der Objektträger bei RT für 10 Minuten folgte eine Inkubation in PBS für 5 Minuten. Die Wahl des Puffers zur Antigendemaskierung richtete sich nach dem darzustellenden Antigen und dem dafür verwendeten primären Antikörper (s.u.).

Antigendarstellung

Die Antigendarstellung erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Biotin Technik. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte in 10%igem Wasserstoffperoxid/Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blockierung einer unspezifischen Proteinbindung erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer 1%igen Pferdeserum/1% BSA-PBS Lösung bei 37°C für 30 Minuten. Dieser und alle im folgenden genannten Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Objektträger wurden nach dem Blockieren direkt mit dem primären Antikörper über eine Zeit von 45 – 90 Minuten inkubiert, die Inkubationsdauer richtete sich nach dem primären Antikörper.

Nach Abspülen des Antikörpers mit deionisiertem Wasser und einer Inkubation in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten bei 37 °C. Nachfolgend wurde gewaschen wie zuvor. Die Inkubationszeit mit dem Streptavidin-Peroxidasekomplex betrug 30 Minuten bei 37°C und nachfolgend wurde gewaschen wie zuvor. Daran schloss sich eine letzte Inkubation für 10 Minuten in PBS bei RT an. Für die Substratumsetzung durch die Peroxidasemarkierung wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Die Präparate wurden für qualitative Studien einzeln unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Für eine Quantifizierung wurden die Präparate abhängig vom Antigen für definierte Zeitspannen zwischen 10 – 180 Sekunden entwickelt.

Verwendete Verdünnungen der primären Antikörper und Bedingungen der Antigendemaskierungen:

Anti-CEACAM1 Klon 29H2	1:50	10 mM Citrat-Puffer, 650 W 10 min.
Anti-βCatenin Klon 14	1:1000	10 mM Citrat-Puffer, 650 W 10 min.
Anti-βCatenin Klon 7D11	1:500	1mM EDTA, 150 W 10 min.
Anti-CEACAM5 Klon T84.66	1 µg/mL	1mM EDTA, 150 W 10 min.
Anti-CEACAM6 Klon By116	1:200	keine Antigendemaskierung
Anti-Ki67 Klon Mib-1	1:75	10 mM Citrat-Puffer, 650 W 10 min.
Anti-Cytokeratin-18 Neoepitop M30	1:50	10 mM Citrat-Puffer, 100 W 10 min.

Nach Entwicklung des Peroxidase wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxilin (Sigma, gebrauchsfertige Lösung) 30 – 90 Sekunden gegengefärbt und hinterher 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut.

Eindecken von Gewebeschnitten

Zum dauerhaften Eindecken von Gewebeschnitten wurden diese in deionisiertem Wasser gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 80% - 95% - 100% - 100%) dehydriert. Zum Eindecken folgten 5 Minuten in reinem Xylol. Zuletzt wurden die Schnitte mit einem Tropfen Eukitt bedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.3.11 Darstellung apoptotischer Zellen im Gewebe

Der Nachweis von Apoptose im Gewebe kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu der sogenannte TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling) und der Nachweis eines durch Caspaseaktivität erzeugten Cytokeratin-18 Neoepitopes durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers M30 eingesetzt. Beide Assays verwenden spezifische Antikörper, wobei im Fall des TUNEL-Assays die Entstehung von DNA-Strangbrüchen durch DNA-Splattende Faktoren wie DFF45 nachgewiesen werden. Der TUNEL-Assay basiert auf der Markierung von freien 3'-OH-Gruppen mit Fluorescein markierten Nukleotiden durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) und deren Erkennung durch fluoresceinspezifische Antikörper. Da diese Strangbrüche auch durch die Herstellung der Schnitte sowie durch nekrotische Prozesse erzeugt werden können, handelt es sich beim TUNEL Assay um keinen hochspezifischen Apoptoseassay. Der ermittelte Prozentsatz apoptotischer Zellen im Gewebe liegt hier systematisch höher, im Vergleich zum Einsatz des M30-Antikörpers.

2.3.11.1 TUNEL-Assay an Paraffingewebe

Nachweisprinzip

In apoptotischen Zellen wird die genomische DNA in Fragmente zu 149 bp Länge zerschnitten. Diese Strangbrüche können durch Markierung der freien 3'-OH Gruppe mit dUTP-Fluorescein durch eine Terminale Desoxynucleotid Transferase (TdT) nachgewiesen werden. Das eingebaute Fluorescein wird durch einen gegen Fluorescein gerichteten und an Peroxidase gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Durch Zugabe eines präzipitierenden Substrates (Diaminobenzidin, DAB) wird die Peroxidasemarkierung nachgewiesen. Bei Bedarf können die Gewebeschnitte mit Hämatoxilin gegengefärbt und eingedeckt werden.

Vorbereitung von Paraffinschnitten

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurden Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert wie unter 2.3.10 beschrieben, ein zusätzlicher Gewebeschnitt diente als Positivkontrolle. Zur Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte die Inkubation der Schnitte für 15 Minuten in 3% Wasserstoffperoxid/ Methanol bei Raumtemperatur, gefolgt von der Rehydrierung in PBS für 5 Minuten.

Durch Inkubation der Schnitte in einer Lösung aus 20 µg Proteinase K, gelöst in 1 mL eines 10 mM Tris-Puffers (pH-Wert 8,0) für 15 Minuten bei 37 °C wurden die Kernmembranen partiell zerstört. Das Waschen der Gewebeschnitte erfolgte für 3 mal 5 Minuten in PBS bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit sollte die Positivkontrolle bei Raumtemperatur für 8 - 10 Minuten mit DNaseI (10 Kunitz Units/ 80 µL Reaktions-Puffer), abgedeckt mit Parafilm, inkubiert werden. Die Positivkontrolle wurde nachfolgend dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und 3

Minuten in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Alle im Folgenden genannten Arbeitsschritte wurden mit allen Präparaten parallel durchgeführt.

Markierungsreaktion und Detektion

Für jedes Präparat wurden 49 μL Markierungs-Lösung mit 1 μL TdT-Enzymlösung versetzt und direkt auf den Schnitt gegeben. Die Inkubation der mit Parafilm abgedeckten Gewebeschnitte erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C, gefolgt von einer Inkubation für 3 x 5 Minuten in PBS. An dieser Stelle konnte eine Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der erfolgreichen Markierung durchgeführt werden.

Zur Detektion wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten bei 37 °C mit 5%igem normalem Schaaf-Serum/ 2% BSA in PBS inkubiert, an die sich eine 30minütige Inkubation mit 50 μL eines Schaaf anti-Maus Peroxidasekonjugats anschloss.

Die Gewebeschnitte wurden nachfolgend 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Detektion mit DAB für 2-5 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Das Gegenfärben und Eindecken der Schnitte erfolgte wie für die Immunhistochemie unter 2.3.10 beschrieben.

2.3.11.2 M30 Färbung apoptotischer Zellen

Der spezifisch gegen das Cytokeratin-18 Neopitop gerichtete Antikörper M30 wurde ausschließlich an Paraffin eingebetteten oder formaldehydfixiertem Material eingesetzt.

Die Präparate wurden wie unter 2.3.10 beschrieben entparaffiniert, und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 10% Wasserstoffperoxid/ Methanol gelagert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Erhitzen in 10 mM Citratpuffer bei 650 W in der Mikrowelle für 15 Minuten.

Die Detektion der Antikörpermarkierung folgte dem unter 1.3.10 dargestellten Protokoll.

2.3.12 FACS Analyse von Antigennachweisen

Die Kontrolle der Stabilität der Expression von transfizierten Zelllinien und der Spezifität von Antikörpern erfolgte mit Hilfe der Analyse von Fluoreszenzmarkierungen am FACS (Fluoreszenz activated cell sorting).

Die benötigte Zellzahl betrug 10^4 Zellen je Nachweis, resuspendiert in 100 μL PBS. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und in 100 μL einer 5%igen Ziegen Serum/PBS Lösung aufgenommen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation der Zellen bei 300 x g folgte eine Inkubation in 100 μL des verdünnten primären Antikörpers für 30 – 60 Minuten bei 37 °C. Die eingesetzte Antikörperkonzentration richtete sich nach dem verwendeten Primärantikörper und musste vor Versuchsbeginn empirisch festgestellt werden. Der Antikörper wurde in einer 1%igen BSA/PBS Lösung verdünnt.

Es schlossen sich ein zweimaliges Waschen des Zellpellets in jeweils 1 mL PBS mit Zentrifugationen bei 300 x g für 5 Minuten an.

Das nach dem zweiten Waschen erhaltene Zellpellet konnte direkt in 50 μ L des zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzten Ziege anti-Maus IgG Phycoerythrin-Konjugat (1:50 verdünnt, DAKO) resuspendiert werden. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut zweimal mit jeweils 1 mL PBS gewaschen und in 200-300 μ L PBS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson). Als Kontrollen bei jeder Messgruppe dienten jeweils eine Isotypkontrolle (nicht-bindender Antikörper des gleichen Isotyps wie der verwendete primäre Antikörper) und eine Kontrolle ohne primären Antikörper, sowie bei Bedarf eine Vergleichsgruppe nicht transfizierter Zellen.

2.3.13 Immunpräzipitation von CEACAM1

Der Anteil von CEACAM1 in Gesamtzelllysaten kann sehr unterschiedlich sein. Zur Anreicherung von CEACAM1 erfolgte eine Immunpräzipitation des Antigens aus TNE- oder RIPA-Lysaten (siehe 2.4.1) mittels des pan-CEACAM Antikörpers T84.1.

Vor der Inkubation des Antikörpers mit den Zelllysaten wurden 20 – 30 μ g Antikörper an 300 μ L einer Protein G–Sephrose Matrix gebunden und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Parallel hierzu erfolgte die Herstellung der Zelllysate in RIPA-Puffer oder TNE-Puffer, hierbei konnten adhärenente Zellen direkt für eine Stunde bei 4°C in der Zellkulturflasche auf dem Schüttler lysiert werden. Das für jeweils 1 cm² Aufwuchsfläche benötigte Puffervolumen betrug hierbei 50 μ L.

Nach zwei Stunden Inkubation der Protein G-Sephrose mit dem zu bindenden Antikörper folgte ein zweimaliger Waschschrift des Sepharose-Protein G-Antikörper-Komplexes mit jeweils 10 mL PBS. Es wurde bei 4000 x g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Zusatz der Zelllysate folgte die Inkubation über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C.

Die Präzipitation wurde nachfolgend zweimal mit 10 mL Immunpräzipitationspuffer gewaschen und bei 4000 x g für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male mit 10 mL PBS wiederholt. Eluiert wurde das Antigen durch Aufkochen der abzentrifugierten Sepharose-Matrix mit einfach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Analyse von Proteinen auf Polyacrylamidgelen, Western Blots und ihre Deglykosylierung wurden jeweils 10⁶ bis 10⁷ Zellen in PBS gewaschen und in einem Milliliter des nachfolgend aufgeführten Lysispuffer resuspendiert. Sofern es nachfolgende Assays nicht störte, wurde dem Lysispuffer 1/100 Volumen einer Protease-Inhibitorenmischung (Sigma) zugesetzt.

TNE-Puffer (1x) PH-Wert 7,6	Trisbase (Mr 121,1)	50	mM	6,06 g
	Natriumchlorid (Mr 58,44)	150	mM	8,77 g
	EDTA (Mr 370,0)	2	mM	0,74 g

auf 990 mL mit A. bidest. auffüllen und den pH-Wert mit Natriumacetat auf 7,6 einstellen; 10 mL Triton X-100 oder NP40 zusetzen und die Lösung bei 4°C lagern.

Proteaseinhibitoren	Na3OV4 (Tyrosin-Phosphatase), 1M	10 µL/ 10 mL TNE
	Aprotinin/ Leupeptin (Protease-I.), 1 mg/mL	100 µL/ 10 mL TNE
	Na-Fluorid (Ser/Thr-Phosphatase Inhibitor), 0,5 M	10 µL/ 10 mL TNE

Die Inkubation der vollständig resuspendierten Zellen erfolgte auf Eis für 30 Minuten. Das dadurch erhaltenen Lysat wurde nachfolgend in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung unlöslicher Zelltrümmer für 15 Minuten bei 13.000 x g in der Tischzentrifuge bei 4 °C abzentrifugiert. Die Lagerung des Überstandes erfolgte aliquotiert bei -20°C bis zur weiteren Analyse.

2.4.2 Isolation von Histonen

Zur Isolation von Histonen wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, bei 400 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 1 mL eiskaltem Lysispuffer (s.u.) aufgenommen. Zur Homogenisierung fand ein Dounce Homogenisator (Assistent) Verwendung.

Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 400 x g für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und das erhaltene Pellet zweimal mit 100 µL eiskaltem Lysispuffer gewaschen.

Das zum Resuspendieren des die Zellkerne enthaltenen Pellets benötigt Volumen Tris-EDTA betrug 100 µL, dem nach vollständigen Resuspendieren 1,1 µL konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt wurden. Nach erneutem gründlichen Durchmischen erfolgte die Extraktion der Histone durch Inkubation für 2,5 Stunden auf Eis.

Nach einer weiteren Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 12.000 x g für 10 Minuten bei 4 °C konnten aus dem Überstand Histone durch Fällung isoliert werden. Hierzu wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 mL 100%iges Aceton zugesetzt und die Fällung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf von mindestens 12 Stunden wurde bei 12.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das erhaltene Histonpellet in zweimal 1 mL reinem Aceton gewaschen und das Pellet luftgetrocknet. AUT-Gel Probenpuffer wurde zum Resuspendieren des Pellets verwendet.

Lysispuffer	Trisbase	100 mM
	Natriumthiosulfat	55 mM
	Triton X-100 (v/v)	1 %
	Magnesiumdichlorid x 1 H ₂ O	20 mM
	Saccharose	250 mM
	den pH-Wert auf 6,3 einstellen.	

Tris-EDTA	Trisbase	20 mM
	EDTA	25 mM
	den pH-Wert auf 7,4 einstellen.	

AUT-Gel Probenpuffer 2x Stocklösung	Harnstoff	8,00 M
	β -Mercaptoethanol	0,73 M
	Eisessig (v/v)	6,00 %
	vor Gebrauch Zusatz von 0,01% (w/v) Pyronin Y.	

Die Histon-Proben wurden auf einem Essigsäure-Harnstoff-Triton X-100 Gel (AUT-Gel, s.u.) aufgetrennt.

2.4.2.1 AUT Gel

Das sogenannte AUT-Gel (Acetat-Urea-TritonX Gel) findet Verwendung bei der Auftrennung von Histonkomplexen und anderen sauren Proteinen. Der Lauf des harnstoffhaltigen Acrylamidgels erfolgte in einem Glycin-Essigsäure Laufpuffer bei 8 – 10 mA konstant und reverser Polung der Elektrophoresekammer. Es wurde die gleiche apparative Ausrüstung wie für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (siehe 2.4.5) verwendet.

Sammelgel	Harnstoff	0,484 g
	Eisessig	0,060 mL
	Ammoniak (konz.)	0,010 mL
	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 18,75 : 1)	0,130 mL
	A. bidest.	0,350 mL

Zur Polymerisation Zusatz von 20 μ L TEMED und 70 μ L Riboflavin (0,004%, w/v, wässrige Lösung). Unter einer starken Lichtquelle für mindestens 1 Stunde polymerisieren lassen.

Trenngel	Harnstoff	2,880 g
	Eisessig	0,360 mL
	Ammoniak (konz.)	0,020 mL
	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 37,5 : 1)	2,400 mL
	Triton-X	0,100 mL
	A. bidest.	5,600 mL

Zur Polymerisation Zusatz von 30 μ L TEMED und 400 μ L Riboflavin. Unter Licht mindestens 1 Stunde auspolymerisieren lassen. Das Gel hierzu mit A. bidest. überschichten.

Laufpuffer für AUT-Gele	Glycin	7,5 g
	Eisessig	6,0 mL
ad 1 Liter mit A. bidest. auffüllen und bis zum Gebrauch bei 4°C lagern.		

2.4.3 In vitro Deglykosylierung von Glykoproteinen

Der Kohlenhydratanteil in Glykoproteinen kann sehr stark variieren. Die Glykosylierung erfolgt dabei entweder über eine N-glykosidische oder O-glykosidische Bindung. Da diese Kohlenhydratseitenketten zum Molekulargewicht des Proteins beitragen, können diese Modifikationen die

Unterscheidung zwischen sehr ähnlichen Spleißvarianten (wie z.B. der S- und L-Form von CEACAM1 mit 7 kD Unterschied) eines Proteins in der Gelelektrophorese erschweren. Werden die Kohlenhydratreste entfernt, sind diese Unterschiede dagegen im Gel oder auf dem Western Blot klar erkenntlich.

In TNE-Lysaten von Zelllinien (siehe 2.4.1) können Kohlenhydratketten von Glykoproteinen enzymatisch abgespalten werden. Im Fall der N-Glykosylierung, wie sie bei Proteinen der CEACAM-Familie vorkommt, wurde hierzu das Enzym PNGaseF (NEB) eingesetzt. Lysate aus 10^6 Zellen/100µL wurden mit Denaturierungspuffer des Enzymherstellers versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Der Ansatz wurde nachfolgend für wenige Minuten auf Eis abgekühlt. Es folgte der Zusatz von jeweils 1/10 Volumen G7-Puffer und 10%igem NP-40. Die für eine Reaktion verwendete Enzymmenge betrug 500 Units PNGaseF auf 10^6 Zellen bei einer Inkubationsdauer des Reaktionsansatzes von 2 Stunden bei 37°C im Heizblock.

2.4.4 BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in Zelllysaten wurde mittels des sogenannten Bichinolin-4-carbonsäure Assays (BCA-Assay, KMF) bestimmt (Smith et al., 1995). Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ im alkalischen Milieu durch die in der Probe enthaltenen Proteine. Dabei entsteht ein violett gefärbter Chelatkomplex aus zwei Molekülen Bichinolinsäure mit einem Cu^+ -Atom.

In seiner Mikrotiterplatten-Variante konnte der Assay in einem Sensitivitätsbereich von 20 - 1000 µg Protein/mL mit geringer Empfindlichkeit gegenüber im Puffer enthaltener Detergenzien eingesetzt werden.

Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die Verdünnung der Standardreihe erfolgte dabei in Wasser oder dem für die Proteinlysate verwendeten Lysispuffer. Der Blindwert entsprach dem Solvent des Standards, alle Bestimmungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zu jeweils 50 µL der Probe oder des Standards wurden 200 µL der Reagenzlösung (1 Teil Lösung B mit 49 Teilen Lösung A) direkt in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte bei 37°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte 30 Minuten nach Reagenzzugabe am Plattenphotometer (BioLinx, DynaTech) bei einer Wellenlänge von 570 nm. Der zu bestimmende Proteingehalt wurde aus der Eichreihe berechnet.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer ladungsunabhängigen Grösse im elektrischen Feld erfolgte durch eine vertikale Gelelektrophorese im Protean III-System (Biorad). Es wurden diskontinuierliche Gelsysteme (Laemmli et al., 1970) mit einem 5%igen Sammel- und 7,5%- bis 15%igem Trenngel bei 10–15 Taschen pro Gel und einer Geldicke von 0,75 mm eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel unter reduzierend-denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung der Gele ist unter 2.1.5 beschrieben.

Die Proteinproben wurden mit einem $\frac{1}{4}$ Volumen eines 4-fach konzentrierten Probenpuffers versetzt, für 5 - 10 Minuten bei 95 °C im Wasserbad aufgeköcht und 3 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. In jede Geltasche wurden 2 bis 25 μ L Proteinprobe entsprechend 10 – 100 μ g Protein in Abhängigkeit zum nachzuweisenden Antigen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V – 160 V mit konstanter Spannung.

Als Größenstandard wurden Marker der BenchMark™ Reihe der Firma Invitrogen verwendet. Speziell für Western Blot Applikationen stand eine vorgefärbte Variante zur leichteren Visualisierung der Auftrennung während der Elektrophorese und zur Kontrolle des späteren Transfers zur Verfügung.

2.4.6 Tris-Tricin Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen unterhalb von 70 kD wurden Tris-Tricin-Gele verwendet, deren Auflösungsvermögen bei kleinen Molekulargewichten den konventionellen Tris-SDS Gelen überlegen ist.

Rezeptur für Trenngele	Polyacrylamid/Bisacrylamid (40%, 29:1)	2,172	mL
	3M Tris-HCl/ 0,3% (w/v) SDS pH 8,45	2,000	mL
	A. bidest.	1,194	mL
	Glycerin (w/v)	0,800	g
	APS 10%ig (w/v)	0,010	mL
	TEMED	0,003	mL
Rezeptur für Sammelgele	Polyacrylamid/Bisacrylamid (40%, 29:1)	0,484	mL
	3M Tris-HCl/ 0,3% SDS (w/v), pH 8,45	1,240	mL
	A. bidest.	3,276	mL
	APS 10%ig (w/v) in A. bidest.	0,020	mL
	TEMED	0,012	mL

Anders als in Laemmli-Gelsystemen erforderte die Elektrophorese für diesen Geltyp die Arbeit mit getrennten Anoden- und Kathodenpuffern.

Anodenpuffer	Tris-HCl	200 mM
	pH-Wert auf 8,9 einstellen	
Kathodenpuffer	Trisbase	100 mM
	Tricin	100 mM
	SDS	0,1% (w/v)

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA konstant begonnen und nach Erreichen der Trenn-Sammelgelgrenze bei 40 mA fortgesetzt.

2.4.7 Coomassie-Färbung

Die Visualisierung von Proteinen in Acrylamidgelen erfolgte durch Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau, einem proteinbindenden Farbstoff.

Hierzu wurden die Gele nach Abschluss der Elektrophorese aus der Kammer entnommen und in die Färbelösung gelegt (Fairbanks et al., 1971, siehe auch 2.1.5). Auf einem Schüttler wurden sie dann 1-2 Stunden bei Raumtemperatur gefärbt und für weitere 2 - 3 Stunden entfärbt. Die Entfärbelösung wurde in Abständen von 30 Minuten erneuert.

Nach Ablauf dieser Zeitspannen zeichneten sich die Gelbanden deutlich gegen den klaren Gelhintergrund ab.

2.4.8 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schuell) erfolgte durch Elektroblothen unter Verwendung des Semi-Dry Blot-Gerätes der Firma BioRad.

Dazu wurden die Gele aus der Gelkammer entnommen und luftblasenfrei auf einer Nitrocellulose-Membran platziert und ober- und unterhalb des Gel-Membran-Komplexes drei Lagen Blot-Puffer getränktes Filterpapier (Whatmann Typ 003, Schleicher & Schuell) gelegt. Geblottet wurde mit 250 mA/cm² Membran über einen Zeitraum von 20 – 60 Minuten, abhängig von der Grösse der zu transferierenden Proteine. Eine nachfolgende Ponceau S Färbung (Sigma) diente zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Membran.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5%igem Magermilchpulver/ TBS inkubiert, nachfolgend in den primären Antikörper überführt und über Nacht bei 4°C für 14 Stunden im Kühlraum gelagert. Es folgte ein Waschschrift der Membran in TBS-Puffer mit Zusatz von 0,1% (v/v) Tween-20 für 1 Stunde bei RT. Der Puffer wurde in 15 Minuten Intervallen gewechselt. Beide Antikörperverdünnungen wurden in Blockadereagenz angesetzt.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, in der Regel einem Ziege anti-Maus Alkalische Phosphatase-Konjugat, erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde weitere 2 Stunden in oben genanntem Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) auf Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham).

2.4.9 Caspase Assay

Die Detektion der Anwesenheit aktivierter Caspasen in einem Zelllysate erfolgte durch Inkubation der Zellextrakte mit AFC- oder AMC-markierten Caspasesubstraten unterschiedlicher Enzymspezifität (Tab. 1). Die Fluoreszenz der beiden Coumarin-Derivate 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) und 7-Amino-4-(trifluoromethyl)coumarin (AFC) erlaubte die Messung unter Verwendung eines Fluorescein-Filtersatzes am Plattenfluorimeter. Ihre Emissionsmaxima liegen bei 460 bzw. 500 nm.

Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Caspase-Substrate und ihre Enzymspezifitäten. Dargestellt ist ein Bestimmungsschema zur Identifikation einzelner Caspasen aus einem komplexen Lysat mit unterschiedlicher Caspaseaktivität.

Enzym	Substrate [10 mM] in DMSO	Aussage	Zusatz-Test		
Caspase 1	Ac-YVAD	Caspase-1 und/oder Caspase-4 aktiv	Ac-LEVD neg.		⇒ Caspase-1 aktiv
Caspase 2	Ac-VDVAD	Caspase-2 aktiv			
Caspase 3	Ac-DEVD	Caspasen 3,6,7,8 und 10 evtl. aktiv	Ac-IETD neg.	Ac-VEID neg.	⇒ Caspase-3 od. -7 aktiv
Caspase 4	Ac-LEVD	Caspase-4 aktiv			
Caspase 5	Ac-WEHD	Caspasen 1,4 und/od. 5 aktiv	Ac-LEVD neg.	Ac-YVAD neg.	⇒ Caspase-5 aktiv
Caspase 6	Ac-VEID	Caspase-6 aktiv			
Caspase 7	Ac-DEVD	Caspasen 3,6,7,8 und 10 evtl. aktiv	Ac-IETD neg.	Ac-VEID neg.	⇒ Caspase-3 od. -7 aktiv
Caspase 8	Ac-IETD	Caspase-8 aktiv			
Caspase 9	Ac-LEHD	Caspasen 4,5 und/oder 9	Ac-LEVD neg.	Ac-WEHD neg.	⇒ Caspase-9 aktiv

Bei den Substraten handelte es sich um Tetrapeptide definierter Sequenz mit einem Aspartatrest an vierter Position (Tab. 1), die eine Spaltung durch Caspasen ermöglichen. Durch die Spaltung wird die chromogene oder fluoreszierende Markierung freigesetzt, welche photometrisch respektive fluorimetrisch quantifiziert werden kann.

Lysispuffer für Caspase-Assays
20x Stocklösung

Trisbase	200 mM
Natriumchlorid	2 M
EDTA	20 mM
Triton X-100 (v/v)	0,2 %

den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

Reaktionspuffer für Caspase-Assays
5x Stocklösung

PIPES	50 mM
EDTA	10 mM
CHAPS (w/v)	0,5 %

den pH-Wert auf 7,4 einstellen und vor Gebrauch frisch zusetzen: 1/20 Volumen 1 M DTT

Daraus wird der 2x Reaktionspuffer wie folgt angesetzt:

20 µL Caspase-Substrat (10 mM)
400 µL 5x Reaktionspuffer
580 µL A. bidest.

Für den Assay wurden 10^6 Zellen für 5 Minuten bei 500 x g abzentrifugiert und nachfolgend in 5 mL kaltem PBS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 μ L des 1x Lysispuffers aufgenommen und in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Zelllyse erfolgte durch Inkubation der Ansätze für 5 Minuten in ein Trockeneis-Ethanol Bad.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur konnte die Lyse der Zellen am Mikroskop kontrolliert und der Gefrier-Tauzyklus bei Bedarf wiederholt werden.

Die Entfernung des unlöslichen Zelldebris erfolgte durch Zentrifugieren für 5 Minuten in 2 mL Reaktionsgefäßen bei 1000 x g. Jeweils 50 μ L des Überstandes wurden in einer Halbvolumen Mikrotiterplatte (Greiner) vorgelegt und danach mit 50 μ L des 2x Reaktionspuffers versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 0,5 – 5 Stunden. Zur Auswertung wurde eine Plattenfluorimeter (Victor3, Perkin Elmer) verwendet.

Für Quantifizierungen wurde eine Standardreihe aus Verdünnungen des freien Fluorochrom (AMC, AFC) über einen Konzentrationsbereich von 0 – 25 μ M in 1x Reaktionspuffer auf der gleichen Mikrotiterplatte mit gemessen.

2.4.10 Protease Assay

Die in Zelllysaten vorhandene Proteaseaktivität kann durch Umsetzung eines Resorufin-markierten Casein-Substrats bestimmt werden. Die zur Lysatherstellung verwendeten Lysispuffer dürfen hierzu keine Proteaseinhibitoren enthalten und die Handhabung der Lysate muss während der gesamten Assaydurchführung auf Eis erfolgen.

Substrat-Lösung	Resorufin-Casein (w/v) (Roche)	0,40	%
Inkubations-Puffer	Tris-HCl pH 7,8	0,20	M
	Natriumchlorid	0,02	M
Stopp-Lösung	Trichloressigsäure (w/v)	5,00	%
Assay-Puffer	Tris-HCl pH 8,8	0,50	M
Standard	Pronase in Assay Puffer	1,00	mg/mL

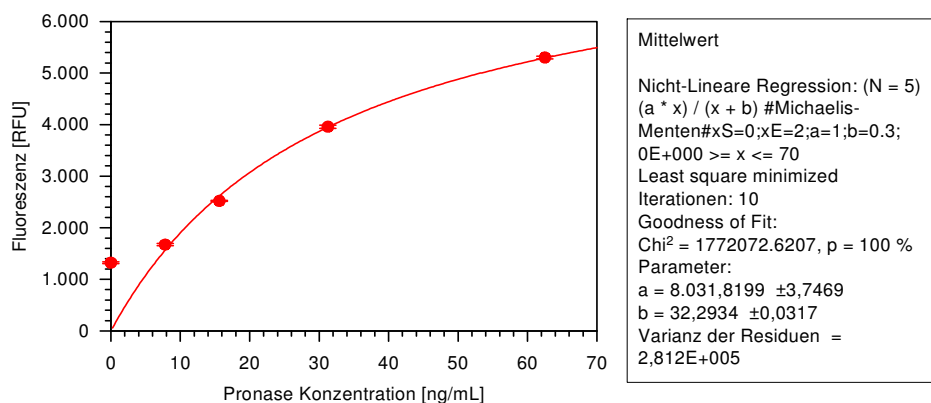


Abb. 11 Resorufin-Casein Spaltung durch Pronase. Darstellung einer Eichreihe im Bereich von 0 – 60 ng/mL in Dreifachbestimmungen.

Für den Assay wurden 100 µL Proteinlysate mit 50 µL Inkubations-Puffer versetzt und 50 µL Substrat-Lösung hinzugefügt. Die Caseinspaltung erfolgte für 15 bis 300 Minuten bei 37°C, abhängig vom verwendeten Proteingehalt und der zu erwartenden Proteaseaktivität. Ein Standard aus verdünnter Pronase, gelöst in Assay-Puffer, diente zur Quantifizierung der Proteaseaktivität.

Die Caseinspaltung wurde durch Zusatz von 480 µL Stopp-Lösung beendet und die Ansätze nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C für 5 Minuten bei 11.000 x g abzentrifugiert.

Der Messansatz enthielt 400 µL des Überstandes, versetzt mit 600 µL Assay Puffer. Die Messung erfolgte mit einem Plattenfluorimeter (Victor 3, Perkin Elmer) (Abb. 11). In einigen Assays wurden einzelne Proteaseinhibitoren zugesetzt (Tab. 2).

Tab. 2 Zur Bestimmung einer Proteaseaktivität verwendete Proteaseinhibitoren. Angegeben sind die Spezifität der Hemmung und die maximale im Assay verwendete Endkonzentration. Inhibitoren wurden in DMSO gelöst.

Inhibitor	Spezifität der Hemmung	Endkonzentration
Antipain	Papain, Trypsin	74 µM
Bestatin	Aminopeptidasen, Lysin- und Tripeptid-Aminopeptidase	130 µM
Chymostatin	α-, β-, γ- und δ-Chymotrypsin	100 µM
E-64	Cystein-Proteasen	28 µM
Leupeptin	Serin- und Cystein-Proteasen, Plasmin, Papain, Trypsin und Cathepsin B	10 µM
Pepstatin	Aspartat-Proteasen, Pepsin, Renin, Cathepsin D, Chymosin	1 µM
Phosphoramidon	Metalloendopeptidasen, Thermolysin, Collagenasen	0,6 mM
Pefabloc	vor allem Serin-Proteasen, Trypsin, Chymotrypsin	4 mM
EDTA	Metalloproteinasen	1,3 mM
Aprotinin	Serin-Proteasen	0,3 µM

2.4.11 Messung des Mitochondrienpotentials am FACS

Der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 färbt spezifisch Mitochondrien auf Basis ihres Membranpotentials ψ an. Bei hohem Mitochondrienpotential bildet der Farbstoff Aggregate, die bei Anregung der Wellenlänge 488 nm eine Rotfluoreszenz aufweisen. Bei niedrigem Mitochondrienpotential bilden sich dagegen Monomere, die bei gleicher Anregung eine Grünfluoreszenz zeigen.

Zur Färbung wurde eine JC-1 Stocklösung (10 mg/mL DMSO) vor Gebrauch 1:1000 in Zellkulturmedium mit Zusatz von 10% FCS (v/v) verdünnt und ausfallende Farbstoffaggregate 3 Minuten bei 100 x g abzentrifugiert. Jeweils 10^6 Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 300 µL der Färbelösung resuspendiert. Die Inkubationsdauer bei 37°C im Dunkeln betrug 15 Minuten. Der Zeitraum zur Messung der Proben am FACS-Calibur (Becton Dickinson) betrug 30 Minuten.

2.5 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Damit die Aufnahme von Plasmiden in die bakterielle Zelle möglich ist, müssen sich die Bakterienzellen in einem als Kompetenz bezeichneten Zustand befinden. Dieser Zustand wird durch die Anzucht in speziellen Nährmedien unter kontrollierten Temperaturbedingungen und anschließenden speziellen Zellernteprotokollen hergestellt.

Benötigte Reagenzien und Medien

Magnesium-Lösung	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	24,6 g
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	20,3 g

auf 100 mL mit A. bidest. Auffüllen.

SOB-Medium	Trypton	20,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	Natriumchlorid	0,6 g

mit A. bidest. auf 990 mL auffüllen und 10 mL einer 2M Magnesium-Lösung zugeben.

Transformationspuffer:	PIPES	3,0 g
	CaCl ₂ ·H ₂ O	2,2 g
	Kaliumchlorid	18,6 g

Die Salze in 900 mL A. bidest. lösen und den pH-Wert auf 6,75 einstellen. Dann 10,9 g MnCl₂·4 H₂O zugeben und das Volumen auf 1 Liter mit A. bidest. auffüllen.

Zur Anzucht wurden *E. coli* Top10 (Invitrogen) auf LB-Agarplatten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Für eine Vorkultur wurden 30 mL SOB-Medium mit einer Einzelkolonie von der Platte beimpft und bis zu einer leichten Trübung bei 37 °C und 180 Upm auf dem Luftschüttler bebrütet. Für die eigentliche Anzucht in 200 mL SOB-Medium wurde ein Inokulum von 20 mL dieser Vorkultur verwendet und die Kultur bei 25 °C und 180 Upm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 weiter bebrütet.

Die Zellernte aus der Bakterienkultur erfolgte bei 4 °C mit 4.000 x g für 30 Minuten. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in 67 mL eisgekühltem Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert und nachfolgend noch weitere 10 Minuten inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4.000 x g mit 4°C für 30 Minuten erfolgte ein Resuspendieren des Bakterienpellets mit Transformationspuffer in 1/15 des ursprünglichen Kulturvolumens auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei –80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.5.2 Transformation von *E. coli*.

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurden kompetente *E. coli* XL-1 blue oder Top10 auf Eis aufgetaut.

Zu 40 µL Bakteriensuspension wurden 10 – 50 ng Plasmid DNA zugefügt und mit 1/5 Volumen eines 5-fach konzentriertem KCM-Puffer (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂) versetzt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 45 Sekunden. Die Zellen wurden hinterher sofort für 3 Minuten auf Eis abgekühlt.

Nach Zugabe von 100 µL LB-Boullion wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C und 300 Upm im Schüttelheizblock inkubiert, bevor sie auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

Spätestens nach 20 Stunden wurden Einzelkolonien von der Platte in antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft und auf ihren Plasmidgehalt kontrolliert. Zur Plasmidisolation wurde das NucleoSpin Kit der Firma Machery & Nagel nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

2.5.3 Klonierung

Zur gerichteten Ligation eines Inserts in einem Vektor werden Insert und Vektor zunächst mit zwei verschiedenen, geeigneten Restriktionsenzymendonukleasen verdaut. Der verdaute Vektor wird zudem mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt, um eine Religation ohne Insert zu unterbinden.

Restriktionsenzymverdau	10x Reaktionspuffer	3,0 µL
	p3xFLAG-CMV9	2,0 µg
	HindIII (10 U/µL)	0,5 µL

Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock.

Vektor und Insert wurden nach erfolgtem Restriktionsenzymverdau auf einem Gel aufgetrennt und die betreffenden Banden ausgeschnitten.

Der Gelextraktion nach Herstellerangaben (Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen) folgte direkt die Ligation in einem Ansatz von 10 bis 12 µL bei 16°C über Nacht (Ligation Kit Version 1.2, TaKaRa).

Ligationsansatz	Eluat des Gelaufreinigung	6 µL
	TaKaRa Ligase Mix I	6 µL

Aus dem Ligationsansatz wurden 2 bis 6 µL für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.5.4 GITC-Lyse von eukaryotischen Zellen zur mRNA-Isolation

GITC-Lösung	Guanidiniumthiocyanat	210,0 g
	Tri-Natriumcitrat-dihydrat (0,75 M)	9,9 mL
	N-lauryl-Sarcosin-Natriumsalz 10% (w/v)	15,0 mL

Das Guanidiniumthiocyanat wurde unter Rühren bei 37 °C in 120 mL A. bidest. vor Zugabe der anderen Substanzen gelöst. Erst nach Zugabe der anderen Lösungen wurde auf 300 mL aufgefüllt.

Direkt vor Gebrauch sind 36 µL β-Mercaptoethanol zu 5 mL GITC-Lösung zuzugeben.

Das Material zur DNA-Isolation wurde in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen und mit 5 mL GITC-Lösung unter Vortexen vermischt. Bei Bedarf konnte die auf diese Art stabilisierte Probe bei –80°C gelagert werden. Andernfalls schloss sich direkt die Isolation der mRNA oder Gesamt-RNA an.

Isolation von mRNA

Zum Nachweis einer Änderung in der Promotoraktivität mittels einer RT-PCR ist die Isolation von mRNA erforderlich. Dazu wurde die Methode der Hybridisierung von mRNA's an Oligo-dT Sequenzen mit einer nachfolgenden Aufreinigung über magnetische Glass Partikel (Beads) eingesetzt. Zur Isolation wurde das RNA Blood and Bone Marrow Kit der Firma Roche verwendet. Die Isolation folgte im Wesentlichen den Empfehlungen des Herstellers mit folgenden Abweichungen: Jeweils 2 Tabletten magnetischer Glass Partikel wurden in 120 µL DEPC Wasser gelöst und direkt zu 500 µL GITC-Zelllysatz zugesetzt.

Nach einer 30-minütigen Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 400 Upm wurden die Partikel für 10 Minuten bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.

Für jede Isolation wurden 30 µL der Biotin-Oligo-dT Sonde zugesetzt, die Elution der isolierten mRNA erfolgte in PCR-grade Wasser bei 70°C für 2 Minuten. Die isolierte mRNA wurde bei –80 °C gelagert.

2.5.5 Isolation von Gesamt- RNA

Für die RNA-Isolation wurden 10^6 bis 10^7 Zellen bei 300 x g abzentrifugiert und das Pellet in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit 600 µL RLN-Puffer lysiert. Zur Isolation fand das RNeasy RNA Isolation Kit der Firma Qiagen Verwendung.

RLN-Puffer	Tris-HCl	50,0 mM
	Natriumchlorid	140,0 mM
	Magnesiumchlorid	1,5 mM
	Nonidet P-40 (v/v)	0,5 %

Zur Homogenisierung der Probe wurde das Lysat auf QIAshredder Spinröhrchen (Qiagen) pipettiert und durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 8 Minuten durch die Matrix der Spinsäule

getrieben. Dabei wurde das Material homogenisiert. Das resultierende Lysat wurde nach Angaben des Herstellers im RNeasy Protokoll für Zellen tierischer Herkunft (Qiagen) aufgearbeitet.

Die RNA konnte im letzten Schritt in PCR-grade Wasser eluiert und photometrisch in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:25 am GeneQuant Photometer (Amersham) in einem Gesamtvolumen von 60 µL vermessen werden.

2.5.6 Real-time PCR am LightCycler

Der Vorteil der real-time PCR besteht in der direkten und schnellen Erfassung des PCR-Verlaufs. Durch die Verwendbarkeit mehrerer Fluoreszenzmarkierungen mit gleicher Anregungswellenlänge, aber unterschiedlicher Emissionswellenlänge, sind quantitative real-time Multiplexanwendungen möglich.

Die Technologie beruht darauf, dass kleine Reaktionsvolumina von 10 - 20 µL in Kapillaren mit sehr dünner Glaswand unter gebracht werden. Das große Oberflächen-/Volumenverhältnis der LightCycler Kapillaren ermöglicht schnelle Temperaturgradienten mit Temperaturrampen von 20°C/Sekunde. Das führt zu einer Verkürzung der Zykluszeiten. Nach jedem Zyklus wird in der Annealingphase die Bindung der Sonden mittels der Fluorimeter-Funktion des LightCyclers gemessen.

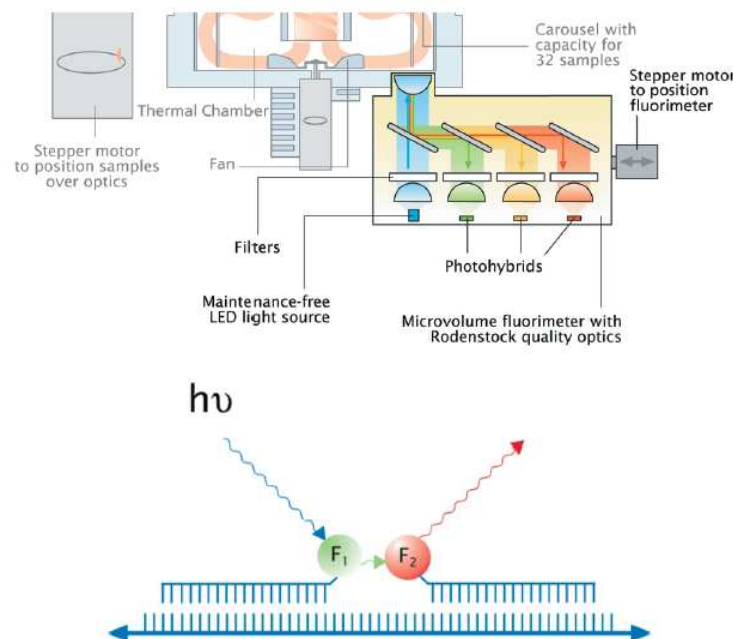


Abb. 12 Funktionsweise eines LightCycler™ Gerätes. Links: Schemazeichnung eines Gerätes zeigt die Anordnung der Kühlelemente und die Anordnung der Detektion zur Fluoreszenz-Messung. Rechts ist schematisch der Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer (FRET) zwischen Anker und Sensor-Sonde dargestellt. (Abb. Roche Produktinformation)

Die Bindung der Anker-Sonden (markiert mit Fluorescein) und Sensor Sonden (markiert mit LightCycler Red, einem Fluorochrom) muss dabei in enger räumlicher Nähe, im Idealfall nur 1 Base voneinander getrennt, erfolgen (Abb. 12, rechte Seite).

Der Verlauf der Fluoreszenz wird als Kurve in Form eines „Fluoreszenz-Zyklus“ Diagramms dargestellt. Die gleichzeitige Erfassung mehrerer Fluoreszenzsignale ist vor allem bei quantifizierenden PCRs sinnvoll, wenn Proben durch die im gleichen Ansatz enthaltenen Mengen eines Kalibrators, in der Regel ein sogenanntes Houskeeping-Gen wie GAPDH oder PBGD, mit amplifiziert werden. Im Nachfolgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Programme und PCR-Mastermixe aufgeführt. Bei Messung mehrerer Fluorochrome in einer Kapillare (Multiplex-Ansatz) ist eine vorherige Kalibrierung des Gerätes zur Ermittlung der spektralen Überlappung zwischen den einzelnen Fluorochromemissionen (sogenannte Color Compensation) erforderlich.

CEACAM1 FRET Multiplex real-time RT-PCR

Mastermix für eine Reaktion Ansatz: 20µL /Kapillare	10x RT-PCR Puffer	2,0 µL
	MgCl ₂ 25 mM	0,8 µL
	U64 Primer 10 µM	0,6 µL
	L338 Primer 10 µM	0,6 µL
	CC1-Links 10 µM	0,6 µL
	CC1-Rechts 10 µM	0,6 µL
	Sonden 20 µM	0,3 µL x 4
	Wasser	3,2 µL
	Taq Polymerase	0,4 µL
	Template:	10,0 µL
LightCycler PCR-Programm	RT-Reaktion	55°C 3 min.
	Denaturierung	95°C 30 sec.
	Annealing	55°C 16 s Fluoreszenzmessung
	Elongation	72°C 15 s
	Denaturierung	95°C 1 s
	Anzahl der Zyklen:	45 Zyklen

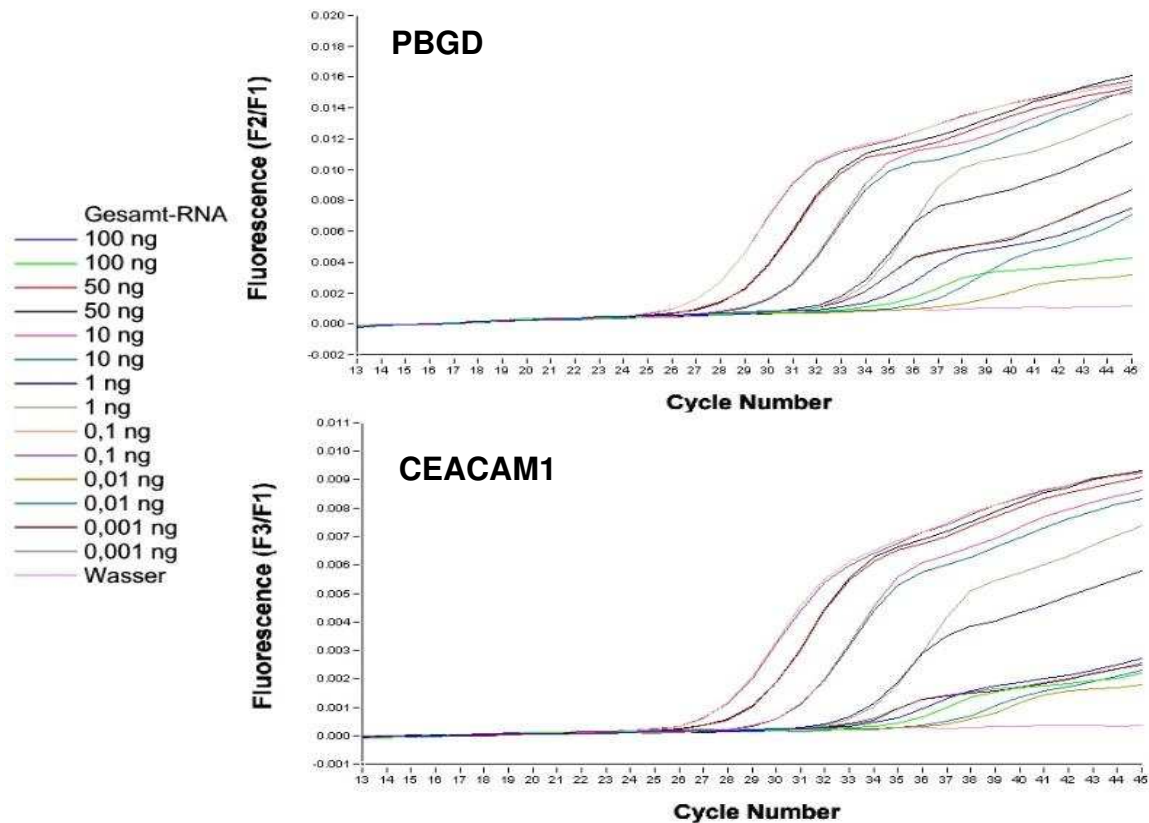


Abb. 13 Multiplex LightCycler quantitative RT-PCR zur Amplifikation von PBGD und CEACAM1 aus RNA von HT-29 Zellen. Es wurden 100 – 0,001 ng Gesamt-RNA eingesetzt und in Doppelbestimmungen gemessen.

2.5.7 Plasmid Isolation

Zur Gewinnung von endotoxinfreien Plasmidpräparationen aus *E. coli* XL-1 blue für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Für eine Isolation wurden 200 mL LB-Medium mit Zusatz von 100 µg/mL Ampicillin mit einer einzelnen Kolonie von *E. coli* angeimpft und die Kultur über Nacht bei 37°C angezogen. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6 Statistik und Software

Für die in dieser Arbeit dargestellten Auswertungen wurde der zweiseitige Wilcoxon Rangsummen Test, der zweiseitige t-Test oder der Mann-Whitney U-Test verwendet. Die Tests wurden mit dem Exel-AddOn WinSTAT berechnet.

Für densitometrische Auswertungen wurde das Programm Scion Image (Scion Corp., NIH, USA) eingesetzt. Die Quantifizierung von real-time PCRs erfolgte mittels der Rel Quant Software (Vertrieb durch Roche Diagnostics).

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Untersuchung der Kolonmukosa

Ausgehend von der bekannten Dysregulation der CEACAM-Expression in Kolontumoren wurde die vorliegende Arbeit mit der Suche nach der frühesten Gewebeveränderung mit dysregulierter CEACAM1- und CEACAM5-Expression begonnen.

Die Basis für diese Untersuchung bildete hier das Modell von Vogelstein und Kinzler, nach dem das APC (Adenomatöses Polyposis Coli) Protein das Schlüsselprotein für die Entstehung von Karzinomen ist. APC Defekte akkumulieren erst in Adenomen, entsprechend einer Assoziation mit der dysplastischen Veränderung der Mukosa.

Es bestehen morphologisch distinkte, nicht dysplastische Veränderungen, die von der Neoplasie unabhängig sind. Diese Gruppe umfasst die hyperplastischen Polypen und die aberranten Krypten Foci (ACF), die beide als nicht maligne Veränderungen angesehen werden.

ACF stellen ein anerkanntes, frühes Stadium einer morphologischen Veränderung in der Kolonmukosa dar. Diese Vorläuferläsion ist als eine der frühesten Veränderung der Kolonmukosa in der Methylenblaufärbung klar zu erkennen (Abb. 14) und von zumeist hyperplastischer Natur.

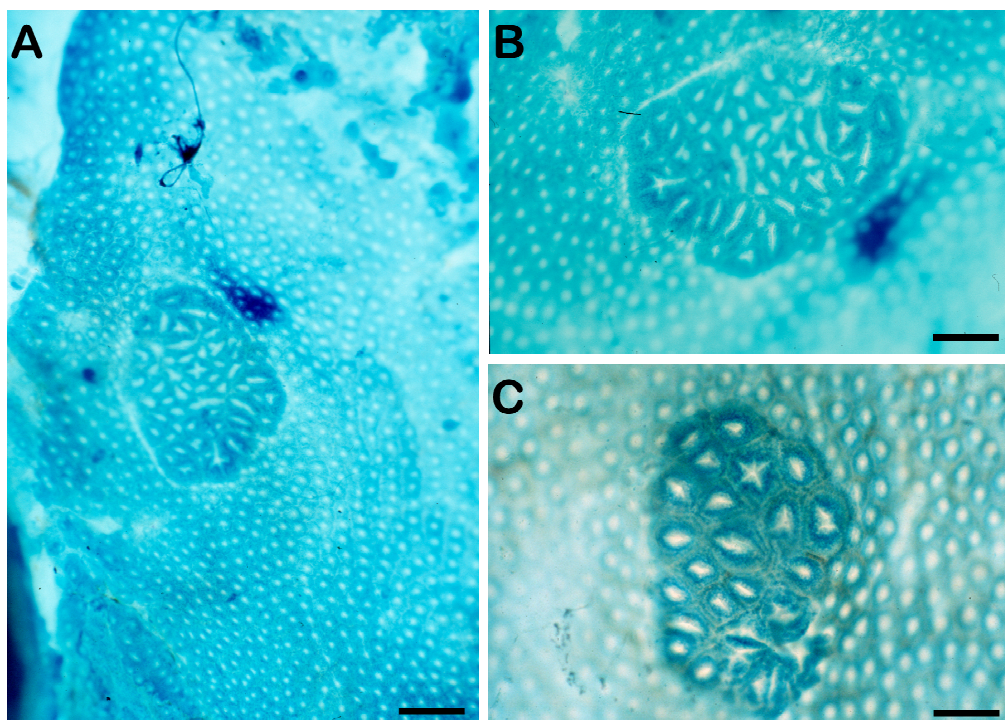


Abb. 14 Methylenblaufärbung zur Identifikation von ACF aus der humanen Kolonmukosa. Die frisch präparierte Kolonmukosa wurde nach Methylenblaufärbung unter der Stereolupe bei 10 bis 20facher Vergrößerung untersucht. Deutlich sind, neben der stärkeren Anfärbbarkeit, erhabene Krypten mit schlitz- bis sternförmigen geformten, vergrößerten Lumenöffnungen zu erkennen. A – Übersicht über ein ACF mit angrenzender Mukosa. Die Größe des Balkens entspricht 250 µm. B und C – Die Vergrößerung des ACF aus (A) und ein weiteres ACF von einem anderen Patienten zeigen deutliche Charakteristika der ACF. Die Größe des Balkens entspricht 200 µm.

Insgesamt wurden 95 Gewebeproben von 42 Patienten immunhistochemisch charakterisiert. Die untersuchten Proben umfassten neben den ACF als Vorläuferläsionen auch Paraffinmaterial von hyperplastischen Polypen sowie von unterschiedlichen neoplastischen Tumorstadien aus dem Archiv der Pathologie (siehe 2.1.6). Es wurde somit die gesamte Karzinomsequenz von Vogelstein und Kinzler abgedeckt. Zudem wurden hyperplastische Polypen und ACF in die Untersuchungen einbezogen, die von Vogelstein und Mitarbeitern nicht in ihr Modell aufgenommen wurden.

Die ACF wurden für spätere immunhistochemische Nachweise von frischen OP-Resektaten nach Begutachtung durch einen Pathologen aus der Mukosa isoliert. Dazu wurde die Mukosa herunter präpariert und in aufgespanntem Zustand mit Methylenblau angefärbt. Die ACF hoben sich als dunkelblaue und erhabene Bereiche mit vergrößerten Krypten und länglichen bis sternförmigen Lumenöffnungen ab. Aus jedem Gewebestück konnten bei ca. 10 x 15 cm Gesamtfläche etwa 5 bis 8 ACF identifiziert und isoliert werden (Abb. 14 und Abb. 16). Insgesamt wurden 32 ACF isoliert.

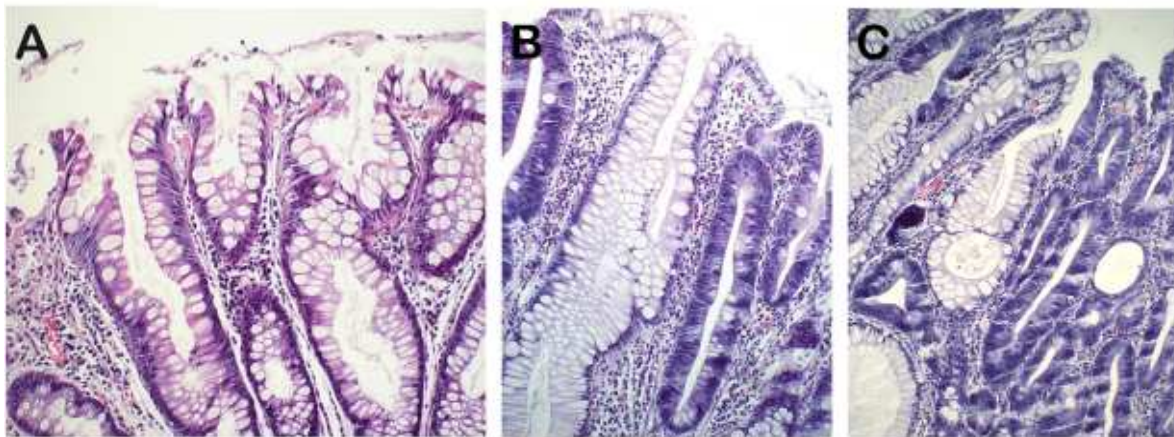


Abb. 15 Längsschnitte von hyperplastischen Polypen und hyperplastischen Polypen mit dysplastischen Anteilen. Hämatoxylin-Eosin Färbung von 3 Polypen im Längsschnitt bei 100facher Vergrößerung. A – hyperplastischer Polyp, B und C – hyperplastische Polypen mit dysplastischen Anteilen in der rechten Bildhälfte. Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung.

Das Kollektiv der hyperplastischen Polypen (27 hyperplastische Polypen und 15 hyperplastische Polypen mit dysplastischen Anteilen, Abb. 15), Adenome (16 Fälle) und Karzinome (5 Fälle) wurde dem Paraffinblockarchiv der Pathologie entnommen. Zur histochemischen Untersuchung wurden überwiegend solche Gewebestücke mit einer gut erhaltenen Transitionszone zwischen Normalgewebe und Tumor ausgewählt. Ausschlusskriterien für den Einschluss eines Blockes in die histochemische Untersuchung waren das Vorliegen eines Morbus Crohn, einer Colitis ulcerosa, von HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) oder FAP (familiäre Adenomatöse Polyposis) oder das Fehlen eines Normalgewebeanteils mit Krypten in Längsorientierung.

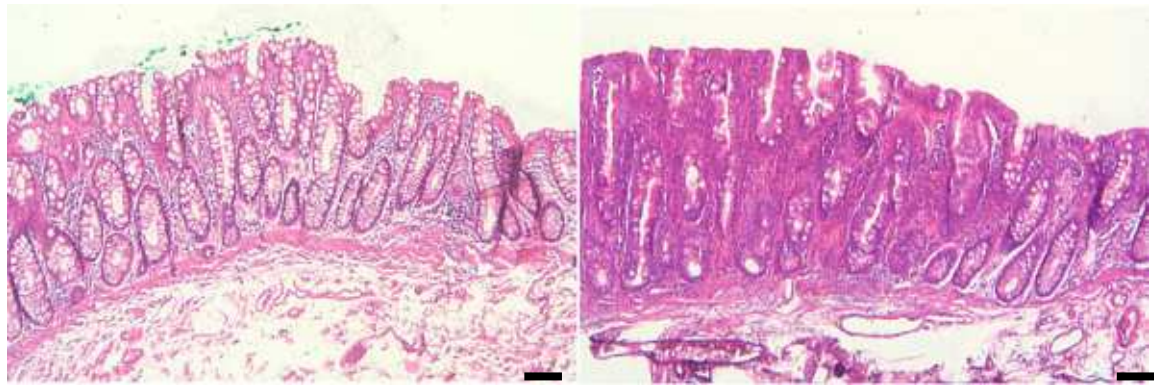


Abb. 16 Hämatoxilin-Eosin Färbung von Längsschnitten durch ACF der humanen Kolonmukosa. Links: hyperplastisches ACF mit vergrößerter Kryptenöffnung die sich bis zur Kryptenbasis erstreckt und deformierter Kryptenarchitektur, erkenntlich an Krypten in direkter Nachbarschaft in Längs- und Schräganschnitt. Rechts: Dysplastisches ACF mit einer verminderten Zahl von Becherzellen, dichterem Zytoplasma und damit verbundener stärkeren Anfärbbarkeit des Zytoplasmas. Die Länge der Balken entspricht 150 µm.

In der Gruppe der ACF wurden insgesamt 32 Gewebebereiche von 8 verschiedenen Patienten nach den Kriterien von Bird (1987) als potentielle ACF isoliert. Dabei handelte es sich bei 31 der Läsionen um hyperplastische ACF (96,9%) und nur bei einem um ein dysplastisches ACF (3,1%) (Abb. 16). Deutlich ist eine stärkere Anfärbung des Zytoplasmas beim dysplastischen ACF zu erkennen, was auf eine verminderte Zahl der Becherzellen hinweist (Abb. 16). Eine Verzweigung der Krypten ist dagegen in beiden ACF zu erkennen.

3.1.1 Expression von Antigenen der CEACAM-Genfamilie

Die Expression von CEACAM5 und CEACAM1 in ACF, hyperplastischen Polypen, Adenomen und Karzinomen wurde histochemisch untersucht (Tab. 3). Die Beurteilung der individualspezifischen Normalexpression erfolgte hierbei auf der Basis des im Paraffinschnitt enthaltenen Normalgewebeanteils, in der Nähe der Transitionszone zur Läsion.

Die Auswertung für CEACAM1 ergab Veränderungen in der Expression in 75% (24/32) der ACF, in denen eine Verminderung der Expression, wenn auch nicht immer ein vollständiger Expressionsverlust festgestellt wurde (Tab. 4). Die Expression von CEACAM5 blieb in 56,3% (18/32) der untersuchten ACF unverändert (Tab. 4).

In hyperplastischen Polypen ohne dysplastische Anteile war die Expression von CEACAM1 in 70,4% (19/27) der untersuchten Fälle verringert oder nicht mehr nachweisbar. Es war z.T. ein abrupter Übergang zwischen der Expression von CEACAM1 Normalgewebe zum vollständigen Verlust der Expression im hyperplastischen Polypen (Abb. 17) zu erkennen.

Tab. 3 Gewebekollektiv zur histochemischen Untersuchung der Expression von CEACAM1, CEACAM5, β -Catenin, Ki-67 Antigen sowie des Cytokeratin-18 Neopitops.

Gruppe	Dx	Läsionen [Anzahl]	Anteil am Gesamtkollektiv [%]	Patienten [Anzahl]	Mittelwert Alter [Jahre]	Median Alter [Jahre]
ACF	hyperplastische	31	32,6	M (4) / W (3)	63,3	70,0
	dysplastische	1	1,0	M (0) / W (1)	55,0	55,0
hyper- plastische Polypen	rein hyper- plastische	27	28,4	M (5) / W (8)	67,8	67,0
	mit Dys- plasieanteilen	15	15,8	M (2) / W (2)	73,8	70,5
Adenom	Adenom	13	13,7	M (6) / W (3)	68,8	69,0
	Serrated Adenoma	3	3,2	M (3) / W (0)	66,7	66,0
Karzinom	-	5	5,3	M (2) / W (3)	74,0	76,0

M = männlich, W = weiblich; Dx = Differenzierung

In den meisten der untersuchten Polypen konnte eine scharfe Abgrenzung zwischen hyperplastischen Polypen und Normalgewebe festgestellt werden, die CEACAM1-Expression fällt am Übergang nahezu abrupt aus (Abb. 17, mittlere Reihe).

Tab. 4 Immunhistochemischer Nachweis von CEACAM1 und CEACAM5 im humanen Kolongewebe. Untersucht wurden insgesamt 95 Gewebeproben der in der linken Spalte angegebenen Differenzierung. Alle eingetragenen Veränderungen wurden, soweit möglich, im Vergleich zum im gleichen Gewebeschnitt enthaltenen Normalgewebeanteil beurteilt.

Antigen	CEACAM1			CEACAM5	
Expressionsgrad	- bis 0	+	++	+	++
ACF (n=32)	71,9 % (23 / 32)	28,1 % (9 / 32)	-	56,3 % (18 / 32)	43,7 % (14 / 32)
hyperplastische Polypen (n=27)	70,4 % (19 / 27)	22,2 % (6 / 27)	7,4 % (2 / 27)	14,8 % (4 / 27)	85,2 % (23 / 27)
hyperplastische Polypen mit dys- plastischen Anteilen (n=15)	60,0 % (9 / 15)	33,3 % (5 / 15)	6,7 % (1 / 15)	13,3 % (2 / 15)	86,7 % (13 / 15)
Adenom (n=16)	93,7 % (15 / 16)	6,3 % (1 / 16)	-	18,8 % (3 / 16)	81,2 % (13 / 16)
Karzinom (n=5)	100 % (5 / 5)	-	-	-	100 % (5 / 5)

- bis 0 = verminderte Expression oder Verlust, + = Expression i.d. Läsion entspricht dem Normalgewebe, ++ = erhöhte Expression. (Anzahl / n) Anzahl der Läsionen mit den angegebenen Eigenschaften.

Bezogen auf Polypen mit dysplastischen Anteilen waren 60,0% (9/15) der Polypen von einem CEACAM1-Verlust betroffen. Die Expression von CEACAM5 war in 85,2% (23/27) der hyper-

plastischen Polypen erhöht. Mit 86,7% (13/15) liegt der prozentuale Anteil der erhöhten CEACAM5-Expression in hyperplastischen Polypen mit dysplastischen Anteilen vergleichbar.

In Adenomen war die Expression von CEACAM1 nur schwach oder überhaupt nicht nachweisbar. Nur in 6,3% (1/16) der untersuchten Fälle konnte eine normale CEACAM1-Expression festgestellt werden. Der Nachweis für CEACAM5 fällt in Adenomen stärker aus als im Normalgewebe, die Zahl der Adenome mit gesteigerter CEACAM5-Expression entspricht mit 81,2% (13/16) in etwa dem prozentualen Anteil CEACAM5-überexprimierender Gewebeproben unter den hyperplastischen Polypen.

Bei den Karzinomen zeigte sich in allen untersuchten Fällen der vollständige Verlust der CEACAM1-Expression, sowie eine Überexpression von CEACAM5.

Zusammenfassend kann von einer gegenläufigen Richtung der Expressionsveränderung von CEACAM1 und CEACAM5 gesprochen werden.

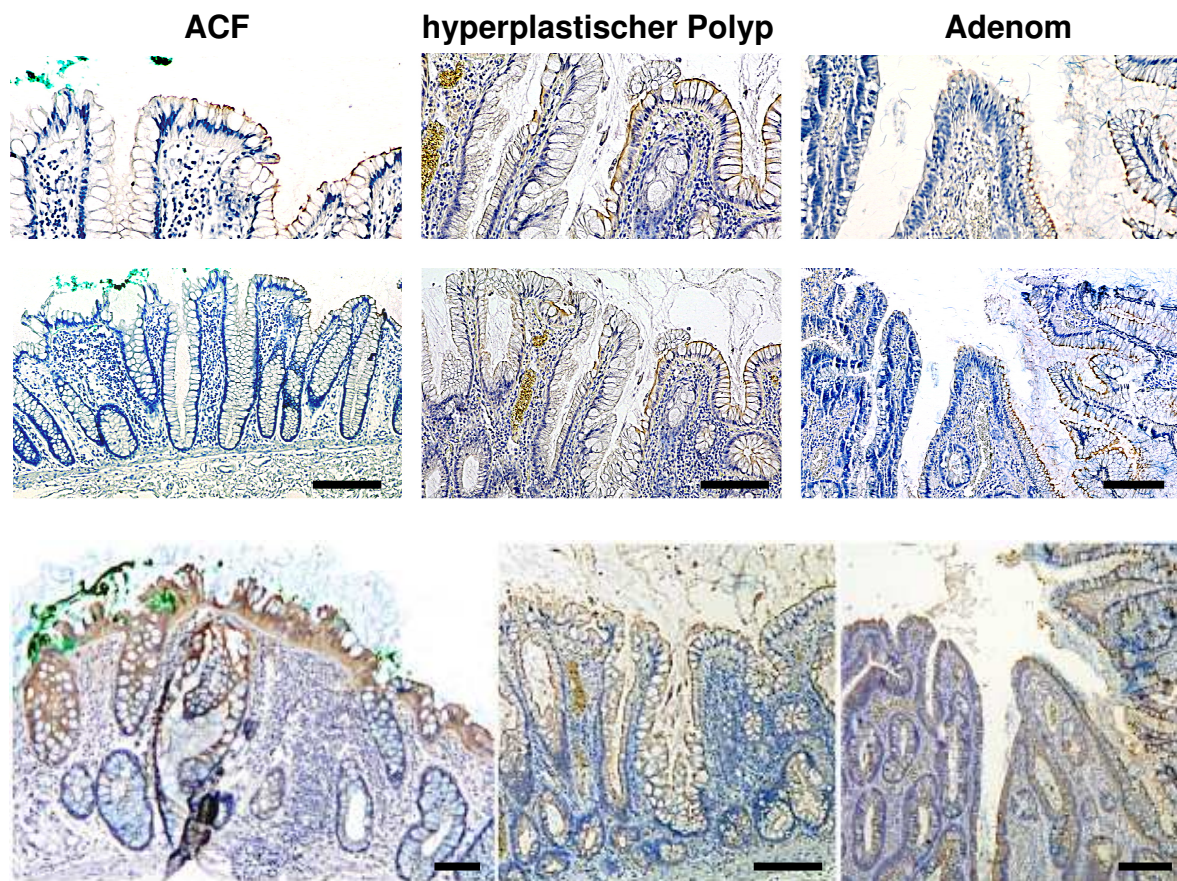


Abb. 17 Immunhistochemischer Nachweis von CEACAM1 (obere und mittlere Reihe) und CEACAM5 (untere Reihe) in ACF, hyperplastischen Polypen und Adenomen des Kolongewebes. Jeweils im rechten Teil des Bildes zu erkennen ist der im Schnitt enthaltene Normalgewebeanteil. Grüne Markierungen: Permanent-Tusche zum Kennzeichnen von identifizierten ACF vor der Präparation. Die Länge der Balken entspricht 250 µm.

Eine Veränderung der Expressionszonen im Kolongewebe über das obere Kryptendrittel hinab in die Kryptentiefe des hyperplastischem Gewebes (ACF, Polypen) wurde weder für CEACAM1

noch für CEACAM5 festgestellt. Die Dysregulation betrifft ausschließlich die Nachweisstärke, nicht jedoch die Lokalisation des histochemischen Nachweises.

3.1.2 β -Catenin als Indikator für Störungen von APC und Wnt-Signalweg

Als Kriterium für einen gestörten Wnt-Signalweg wurde die Akkumulation des Proteins β -Catenin im Zytoplasma der Zelle bzw. bei schweren Störungen auch eine Akkumulation von β -Catenin im Zellkern gewertet. Ursache für diese Akkumulation können sowohl z.B. ein Defekt des für die β -Catenin-Bindung zuständigen Bereichs des APC-Proteins oder eine Veränderung im β -Catenin-Gen (z.B. Exon 15) sein. Eine β -Catenin-Akkumulation kann daher von Defekten beider Proteine gleichermaßen verursacht werden (siehe Abb. 3, S. 8) und die Art des Defektes kann in der Regel nur mit molekulargenetischen Ansätzen erfasst werden. Die hier angewandte Methode des histochemischen Nachweises ist dagegen auf die Detektion einer vorliegenden Störung limitiert, erlaubt dafür aber eine sichere Zuordnung der Lokalisation des Nachweises (z.B. Akkumulation im Nukleus).

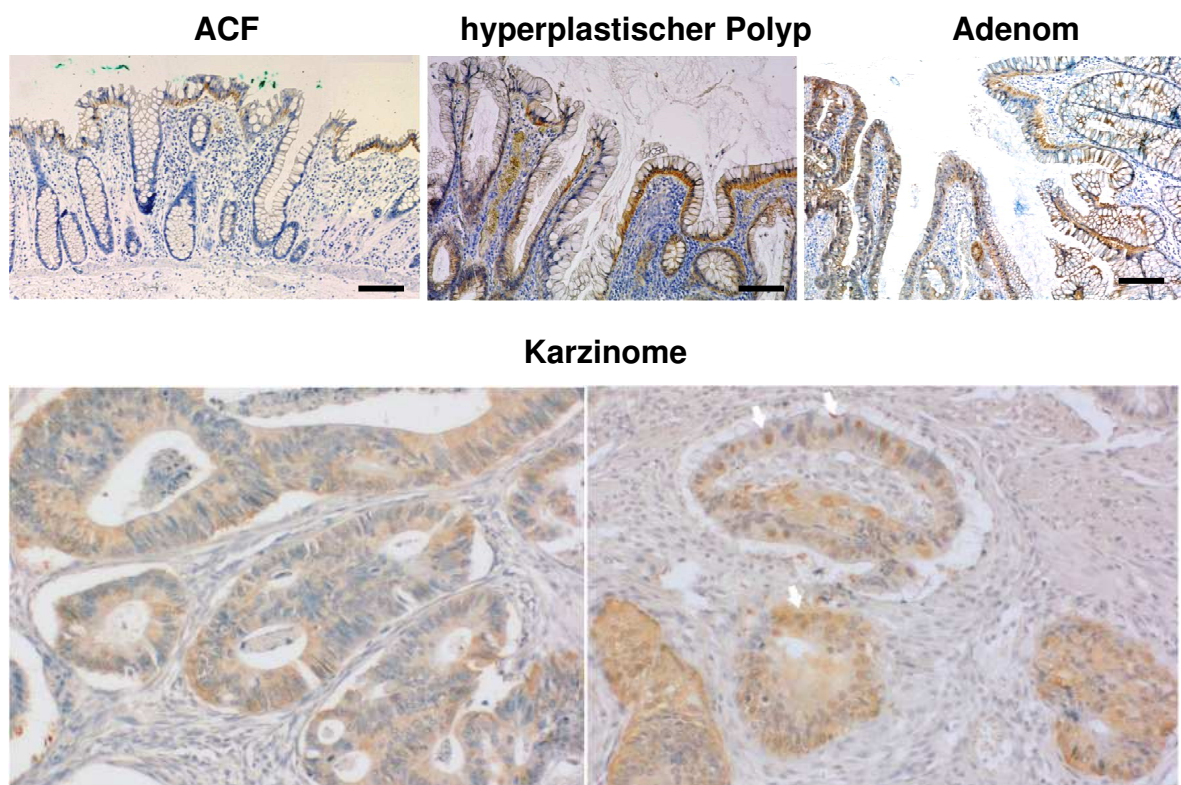


Abb. 18 Darstellung des immunhistochemischen Nachweises von β -Catenin in Kolongewebe unterschiedlicher Differenzierungen. Obere Reihe: ACF, hyperplastischer Polyp und Adenom mit einem jeweils für dieses Gewebe typischen β -Catenin-Nachweis. Untere Reihe: links ein Karzinom mit typischer zytoplasmatischer Akkumulation von β -Catenin und rechts daneben ein Beispiel für eine zusätzliche nukleäre Lokalisation von β -Catenin im Karzinom (weiße Pfeile), erkennbar an den braun gefärbten Zellkernen. Die Länge der Balken entspricht 400 μ m.

Im Gewebeschnitt wurde β -Catenin durch Bindung von monoklonalen Antikörpern histochemisch nachgewiesen. Bei der mikroskopischen Auswertung der Färbungen wurde der Nachweis von β -Catenin im Normalgewebe direkt mit dem Nachweis im neoplastischen Anteil des gleichen Gewebeschnittes verglichen. Dieses Vorgehen schloss ein Interpretationsfehler durch vererbte Defekte aus. Derartige Defekte könnten theoretisch z.B. das Epitop des β -Catenin bindenden Antikörpers zerstören, ohne dabei direkt in einen Zusammenhang mit dem im Gewebeschnitt untersuchten Tumor zu stehen.

Eine Veränderung der Lokalisation des β -Catenin-Nachweises war überwiegend in Gewebeschnitten von Adenomen und Karzinomen zu beobachten (Abb. 18, obere Reihe). In den ACF und hyperplastischen Polypen konnte nur in einem der Gewebelöcke aus dem Kollektiv der ACF und in zweien der hyperplastischen Polypen ein verstärkter β -Catenin-Nachweis festgestellt werden.

Bei diesem ACF handelte es sich um das einzige dysplastische ACF unter den 32 isolierten ACF dieser histochemischen Untersuchung (Tab. 3). Im Gegensatz dazu wurde in 75% (12/16) der Adenome und 80% (4/5) der Karzinome eine Akkumulation von β -Catenin festgestellt (Tab. 5).

Tab. 5 Immunhistochemische Untersuchung der Expression von β -Catenin an humanem Kolongewebe unterschiedlicher Differenzierungen. Beurteilt wurde Stärke des β -Catenin-Nachweises im Zytoplasma oder als nukleäre Färbung in Abhängigkeit zur Gewebedifferenzierung. + = normaler Nachweis, ++ = starker Nachweis, +++ = stark erhöhter Nachweis oder nukleäre β -Catenin-Färbung.

Differenzierung	β -Catenin Nachweis		
	+	++	+++ oder nukleär
ACF	96,9 % (31/32)	3,1 % (1/32)	-
hyperplastische Polypen	95,2 % (40/42)	4,8 % (2/42)	-
Adenom	25 % (4/16)	75 % (12/16)	-
Karzinom	20 % (1/5)	40 % (2/5)	40 % (2/5)

Eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin wurde dagegen nur in Karzinomen beobachtet (Abb. 18, untere Reihe rechts). Hier zeigten zwei der fünf untersuchten Karzinome eine nukleäre Färbung im β -Catenin-Nachweis, die etwa 10 - 20% der Zellkerne des Karzinoms betraf (Abb. 18 rechts). Im angrenzenden Normalgewebe war diese nukleäre Färbung nicht nachzuweisen.

Zusammenfassend wurden Veränderungen im β -Catenin-Nachweis vor allem in Adenomen und Karzinomen festgestellt. Veränderungen in den anderen Gewebeformen sind selten und die einzigen hier beobachteten Ausnahmen bildeten gemischte Polypen mit dysplastischen Anteilen und das dysplastische ACF.

Im untersuchten Gewebekollektiv präsentierte sich somit ein veränderter Nachweis von β -Catenin als ein Merkmal der dysplastischen Veränderung.

3.1.3 Proliferation und Apoptose in Kolonkrypten

Die Kolonkrypte gliedert sich in drei Kompartimente mit klar umschriebener physiologischer Funktion. Unterschieden werden von der Kryptenbasis zum Kolonlumen hin Proliferationskompartiment, Differenzierungs-Kompartiment und Abschilferungszone. Einer der Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Kompartimenten besteht dabei im Differenzierungsgrad und der Expression differenzierungsabhängiger- und zellzyklusassoziierter Antigene von Zellen der einzelnen Kompartimente. Im Regelfall können Kompartimente durch Unterschiede in der Antigenexpression identifiziert werden.

Zur Beurteilung der Veränderungen der Zellteilungsaktivität in den einzelnen Kompartimenten müssen, neben Unterschieden in der Nachweisstärke oder Nachweishäufigkeit, auch die Antigenverteilung über die Kryptenlänge berücksichtigt werden. Auch hier wurde ein Vergleich zwischen Antigennachweisen im Normalgewebeanteil und der Läsion innerhalb des gleichen Schnittes vorgenommen.

Die Identifikation der Proliferationszonen erfolgte durch den histochemischen Nachweis des Ki-67 Antigens, einem proliferations-assoziiertem Antigen, das in proliferierenden Zellen im Zellkern exprimiert wird und chromosomal gebunden vorliegt (Abb. 19A).

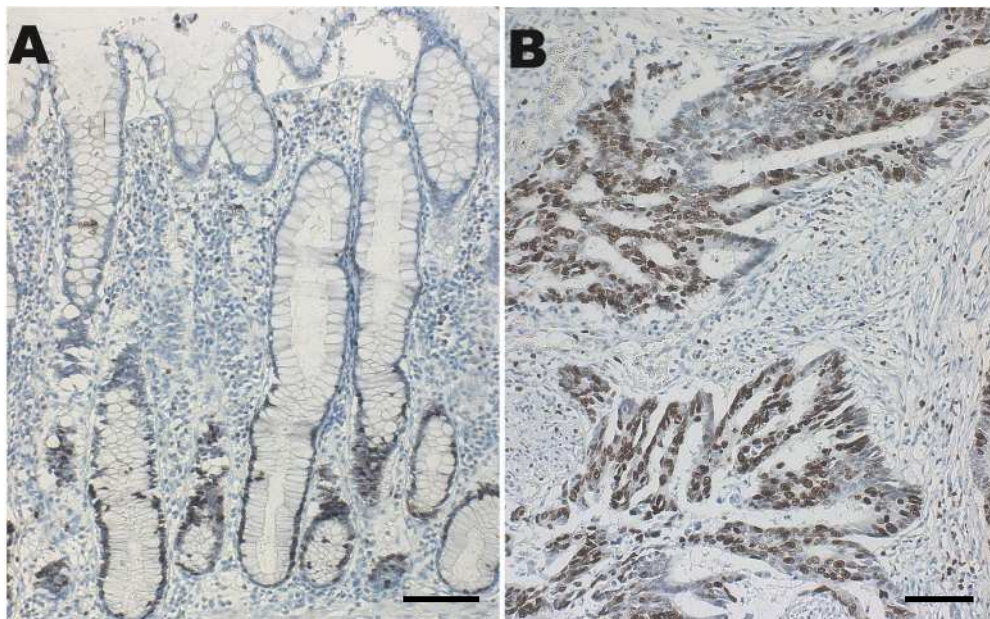


Abb. 19 Identifikation der Proliferationszone im Kolongewebe. Durch immunhistochemischen Nachweis des Ki-67 Antigens wurden proliferierende Zellen identifiziert. Zellteilungsaktive Zellen sind an ihrer dunklen, nukleären Färbung zu erkennen. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämalalaun gegengefärbt. A -Normalgewebe , B - Karzinom. Die Länge des Balkens entspricht 200 µm.

Eine nachweisbare Verlängerung der Proliferationszone über das untere Kryptendrittel hinaus konnte nur in Adenomen festgestellt werden, wo proliferierende Zellen bis zur Kryptenmitte herauf nachgewiesen werden konnten. In Karzinomen wurde dagegen eine vollständig ungeordnete, über die gesamte Krypte verteilte Proliferationsaktivität festgestellt (Abb. 19 B). Eine Veränderung im

Nachweismuster von Ki-67 konnte in keiner der frühen Veränderungen (ACF, hyperplastische Polypen) des Kolongewebes festgestellt werden. Der Nachweis proliferierender Zellen entsprach in Anzahl und Lokalisation dem des Normalgewebes (Abb. 19 A).

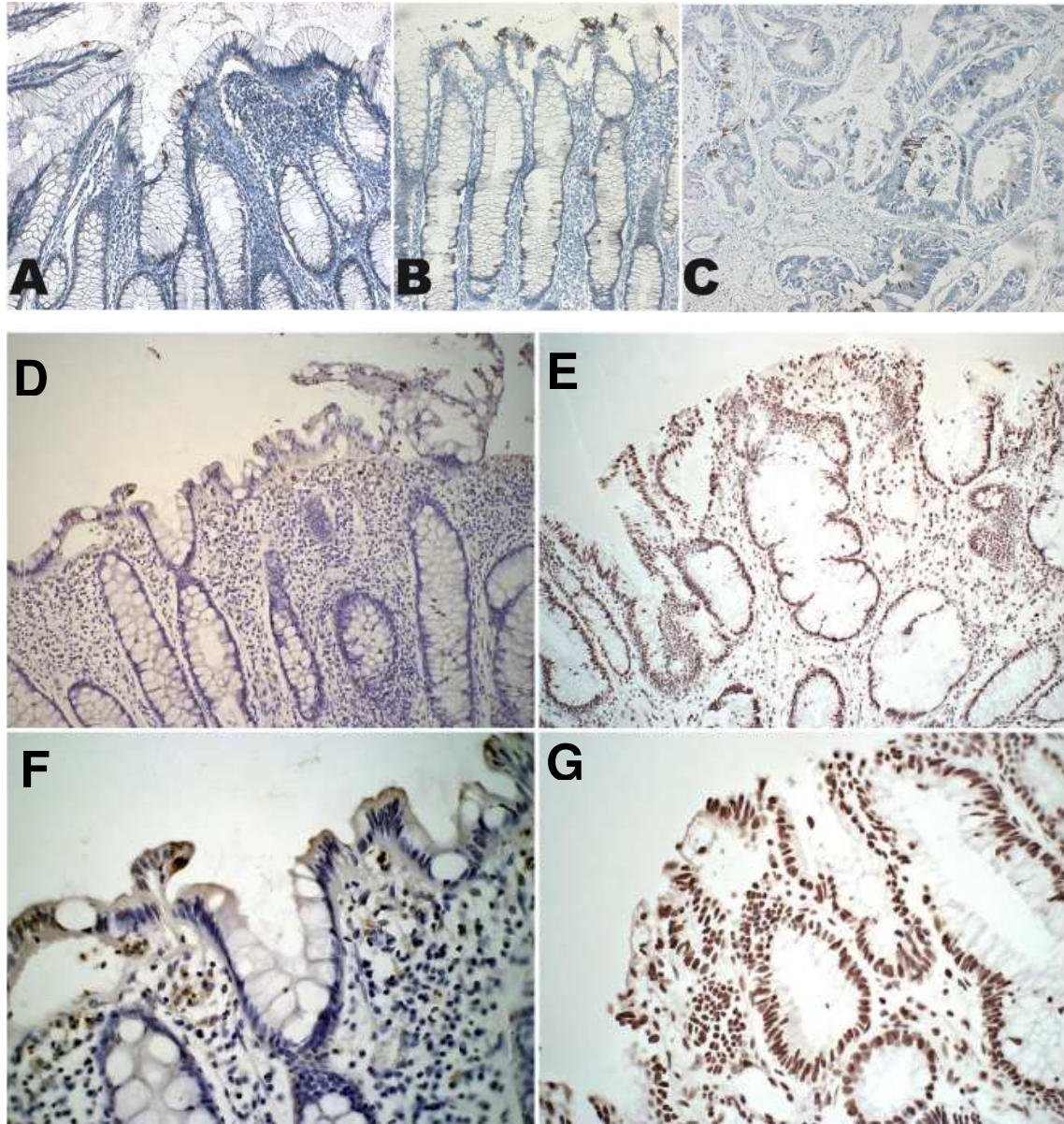


Abb. 20 Apoptosenachweis an Gewebeschnitten von hyperplastischen Polypen des Kolongewebes. Verwendet wurden zwei immunhistochemische Nachweise. (A – C) Nachweis apoptotischer Zellen mittels des M30 Antikörpers in Normalgewebe (A, B) und C) im Karzinom. (D-G) die TUNEL-Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen im Kolongewebe. D und F) Nachweise im Normalgewebe, (E,G) repräsentieren Beispiele für die Positivkontrollen eines TUNEL-Nachweises. Bei vollständigem Aufschluss der Zellen sind hier alle Nuklei peroxidasepositiv.

Ein zweiter zentraler Mechanismus zur Regulation der Zellzahl in Epithelien ist die Apoptose. Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Apoptoserate im Gewebeschnitt eingesetzt.

Diese Methoden unterschieden sich sowohl in den erfassten Apoptosestadien als auch in der Spezifität des Apoptosenachweises. Zum einen wurden unter Apoptose auftretende DNA-Strangbrüche mittels eines sogenannten TUNEL-Assays in Gewebeschnitten nachgewiesen. Dieser Assay erfasst auch frühe Apoptosestadien, ist jedoch relativ unspezifisch, da er letztlich allgemein Zellen mit DNA-Strangbrüchen nachweist. Die zweite Methode beruht auf dem Nachweis eines durch Caspasespaltung spezifisch in apoptotischen Zellen entstehenden Cytokeratin-18 Neoepitops mittels des monoklonalen Antikörpers M30. Hier werden erst fortgeschrittene Apoptosestadien erfasst. Der Vorteil liegt hier in der höheren Apoptosespezifität des Nachweises, der indirekt ein Maß für die Aktivierung eines der apoptose-ausführenden Enzyme (Caspase-3) ist. Diese zweite Methode wurde daher bevorzugt eingesetzt.

Für das Normalgewebe wurde mit der letztgenannten Methode ein medianer Apoptoseanteil von 0,5% apoptotischen Zellen in der oberen Kryptenhälfte ermittelt. Hierzu wurden die Zellen der oberen Kryptenhälfte am Mikroskop ausgezählt und der prozentuale Anteil nachweispositiver Zellen berechnet (Abb. 20 A bis C).

Der Anteil apoptotischer Zellen verringert sich in ACF (Median bei 0,07%) und z.T. auch bei hyperplastischen Polypen (Median bei 0,13%), steigt dagegen in Adenomen mit 0,2% wieder deutlich an (Abb. 21). Für diese drei Läsionen liegt der Anteil der apoptotischen Zellen dennoch unterhalb des für Normalgewebe festgestellten Medians von 0,5% mit den in Abb. 21 angegebenen Signifikanzen.

In Karzinomen ist der Anteil der apoptotischen Zellen gegenüber dem Normalgewebe dagegen mit etwa 1% der Zellen deutlich erhöht (Abb. 20 C und Abb. 21). Dieses Ergebnis des M30-Nachweises wurde an hyperplastischen Polypen mit der TUNEL-Methode überprüft.

Für diese Methode ist ein höherer Anteil nachweispositiver Zellen zu erwarten, da auch mechanisch erzeugte Strangbrüche nachgewiesen wurden. Das sollte auf Normalgewebe und hyperplastische Polypen jedoch in gleichen Maße zutreffen.

Hierzu wurden 17 hyperplastische Polypen ausgewählt, die ausreichend große Normalgewebe- und Hyperplasie-Anteile im selben Gewebeschnitt enthielten. Die obere Kryptenhälfte wurde in den Gewebeschnitten im Anschluss an die TUNEL-Färbung ausgezählt. Im Ergebnis lag auch hier die Apoptoserate in der Hyperplasie bei direktem Vergleich zu dem im Schnitt enthaltenem Normalgewebeanteil niedriger (Abb. 21 B), das Signifikanzniveau lag hier bei $p=0,0114$. Die Apoptoserate wurde getrennt für Normalgewebe und Polyp errechnet. Gezählt wurden mindestens 400 Zellen pro Gewebeanteil und Schnitt. In allen 17 untersuchten Polypen lag die Apoptoserate des Normalgewebeanteils höher als die Apoptoserate der Polypen. Das bestätigte das Ergebnis der M30-Färbung (Abb. 21). Die Verminderung im Anteil apoptotischer Zellen ist eines der Merkmale der Hyperplasien.

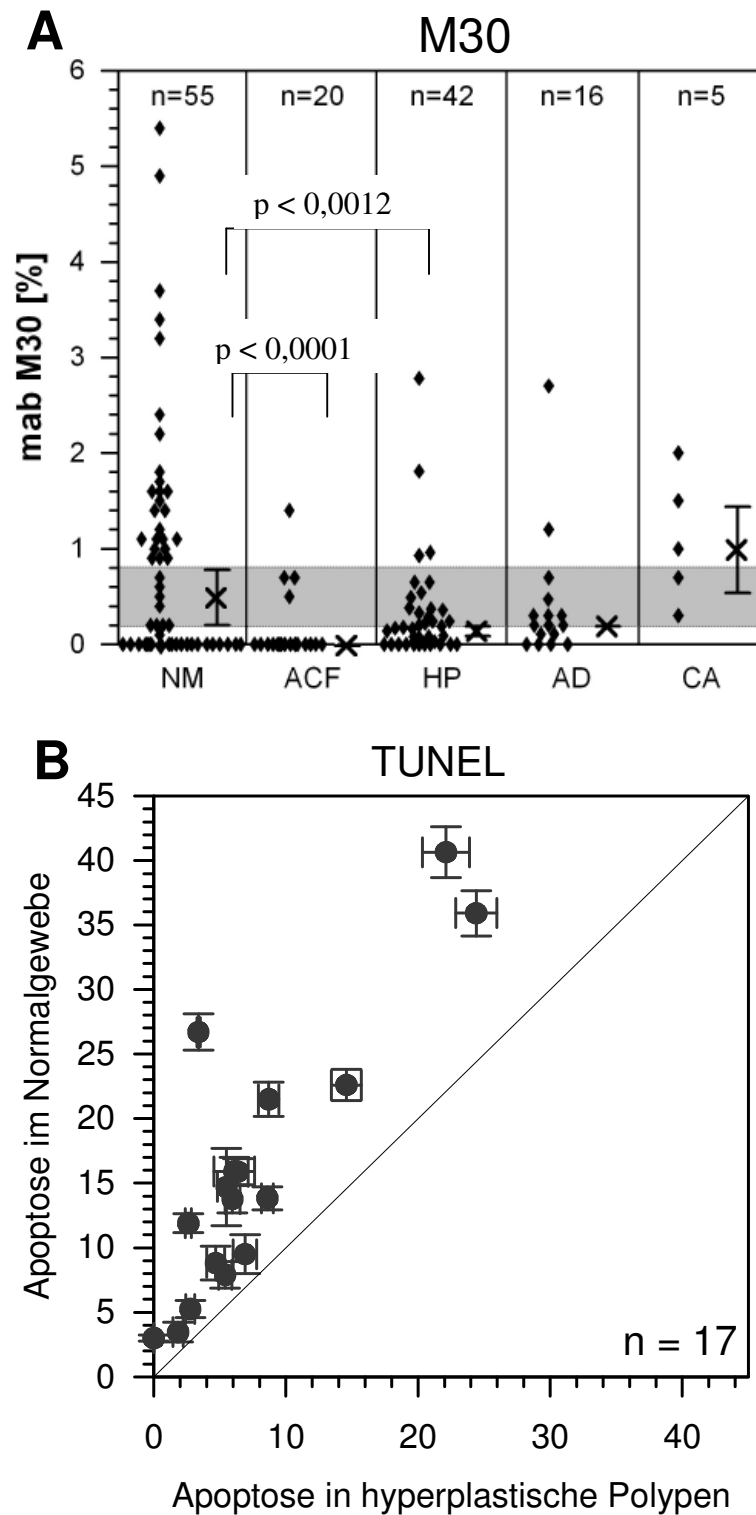


Abb. 21 A - Zusammenfassung der durch den monoklonalen Antikörper M30 für Normalgewebe und Tumore festgestellten Apoptoserate. Ausgezählt wurden, wo dies möglich war, mindestens 1000 Zellen oder die gesamte im Schnitt enthaltene obere Kryptenhälfte. Der prozentuale Anteil nachweispositiver Zellen wurde für jeden Gewebeschnitt einzeln berechnet. Dargestellt ist der Median +/- Standardabweichung. Die Signifikanzen der Unterschiede wurden mit dem zweiseitigen Wilcoxon's Rangsummentest berechnet. B - Apoptoseanteil in hyperplastischen Polypen bestimmt mit der TUNEL-Methode in der oberen Kryptenhälfte. Angabe in % nachweispositiver Zellen. Hyperplasien weisen einen auf dem Niveau $p=0,0114$ (zweiseitiger Welch's t-Test) niedrigeren Anteil apoptotischer Zellen auf. Abkürzungen: NM = Normalgewebe, ACF = Aberrante Crypten Foci, HP = hyperplastischer Polyp, AD = Adenom, CA = Karzinom.

3.2 Entwicklung eines CEACAM1-4L spezifischen Antikörpers

CEACAM1 kommt im humanen Gewebe in verschiedenen Spleißvarianten vor. Die Unterschiede zwischen diesen Varianten betreffen sowohl die Anzahl der extrazellulären Domänen als auch das Vorhandensein und die Länge der zytoplasmatischen Domäne (siehe 1.2.2).

Eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen CEACAM1-Spleißvarianten mit der langen oder kurzen Form der zytoplasmatischen Domäne stellt die Detektion der zytoplasmatischen Domäne mit domänenspezifischen monoklonalen Antikörpern dar.

Zur Detektion der langen zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-4L wurde ein, bis dahin noch nicht verfügbarer, monoklonaler Antikörper benötigt.

Zu dessen Herstellung wurden Mäuse mit einem KLH gekoppelten Peptid der Sequenz PPNKMEVITYSTLNEFEAQQ entsprechend den Aminosäuren 483 – 502 des prozessierten Proteins immunisiert (Abb. 22, blau unterstrichene Sequenz).

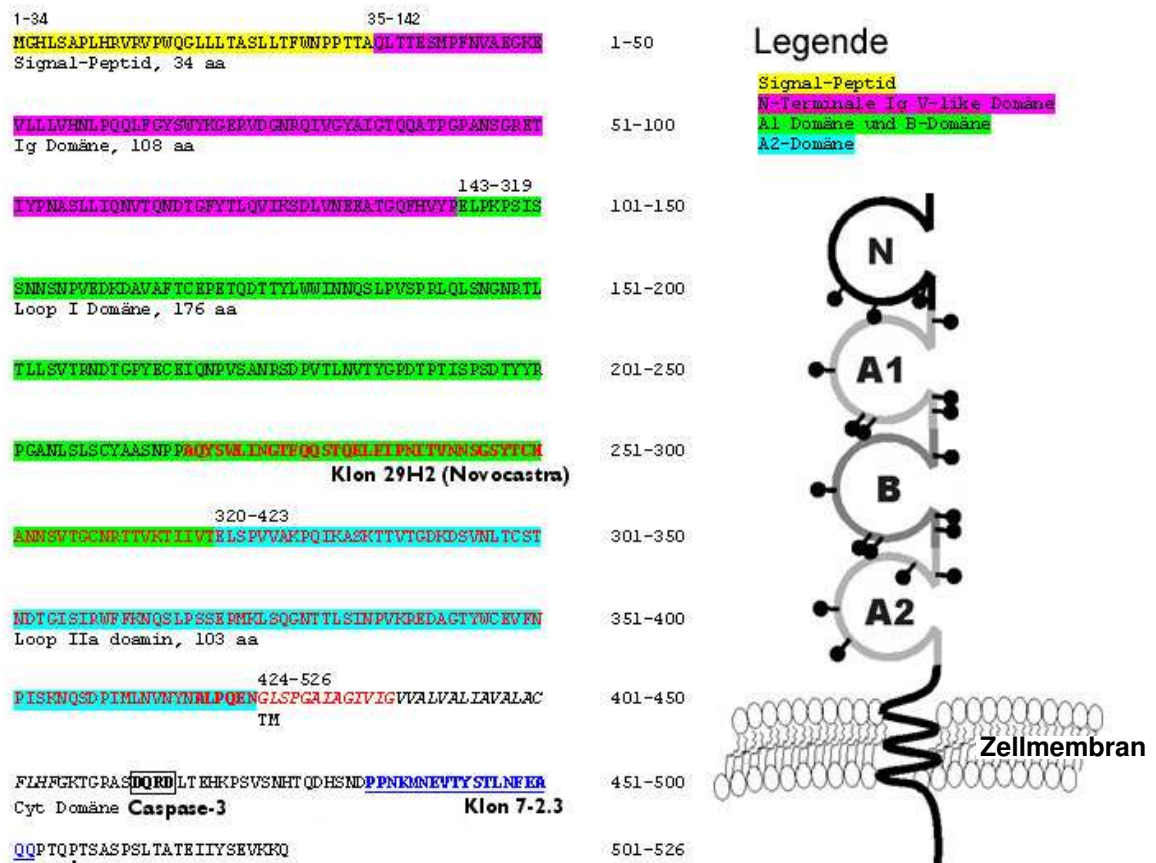


Abb. 22 Domäneneinteilung der CEACAM1-4L Spleißvariante. Darstellung der Proteinsequenz mit Zuordnung der extrazellulären Domänen sowie den Immunisierungssequenzen für zwei der in der Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (Klon 7-2.3 und Klon 29H2). Rechts: Anordnung der Domänen in Bezug auf die Zellmembran und Anzahl der Glykosylierungsstellen (•). Sequenzdaten: NCBI Datenbank Accession Number NP_001703 (Stand: 28-MAY-2006)

Nach Fusion der murinen Milzzellen mit einer Myelom-Zelllinie wurden die Zellen vereinzelt und der HAT-Selektion unterzogen. Die Immunisierungen und Selektion wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

Zum Primärscreening wurden aus zwei verschiedenen Immunisierungsgruppen zusammen mehr als 200 Klone isoliert und sowohl im ELISA als auch im Western Blot auf ihre Bindung an das zur Immunisierung verwendete Peptid getestet. Bindende Klone wurden expandiert. Die aus diesen Kulturen erhaltenen Kulturüberstände wurden für eine weitere Überprüfung der Bindung an CEACAM1-4L eingesetzt. Der erste Nachweis einer CEACAM1 Bindung der im ELISA positiv getesteten Klone erfolgte zunächst im FACS (Abb. 23) und die Überprüfung der Spezifität nachfolgend in der Immunfluoreszenz (Abb. 24) an Transfektomen mit Expression einzelner CEACAM-Mitglieder.

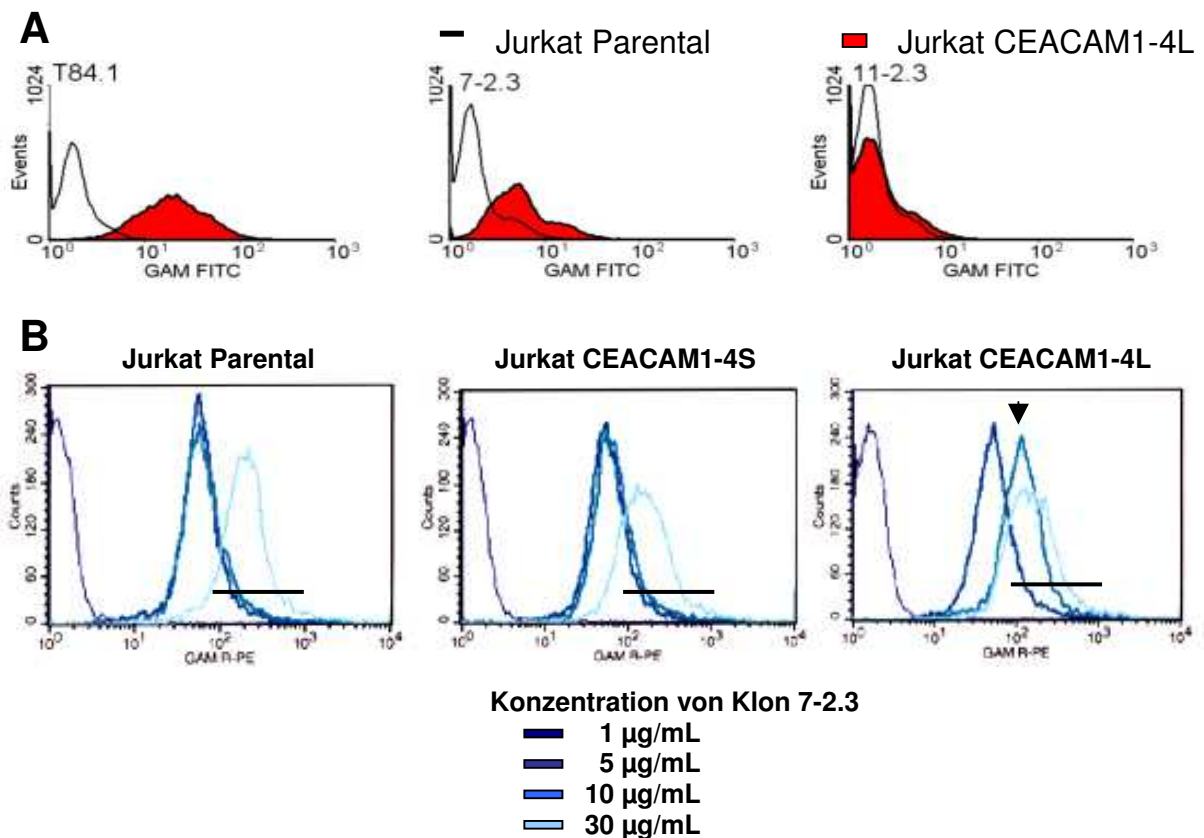


Abb. 23 FACS-Analyse zur Identifizierung potentiell CEACAM1-4L bindender Klone. A) Exemplarische Darstellung eines CEACAM1-bindenden und eines nicht-bindenden Klons bei Verwendung unverdünnter Hybridom-Überstände an Saponin-permeabilisierten Jurkat CEACAM1-4L Zellen. Die Bindung (Kurve mit roter Fläche) wurde im Vergleich zur unspezifischen Bindung an das Jurkat Parental (schwarze Kurve) beurteilt. Als Positivkontrolle fand Klon T84.1 Verwendung. B) Spezifität der Bindung des Klon 7-2.3 an die lange zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-4L. Verwendet wurden Jurkat Parentale oder Subklone, stabil transfiziert mit CEACAM1-4L bzw. CEACAM1-4S. Untersucht wurden die Antikörperkonzentrationen 1, 5, 10 und 30 µg/mL (dunkel – zu Hellblau). Der Pfeil bezeichnet die optimale Konzentration für zytochemische Färbungen mit Klon 7-2.3.

Für dieses Screening wurden zunächst unverdünnte Kulturüberstände verwendet. Eindeutig CEACAM1-bindende Klone wurden subkloniert und weiteren Kontrollen unterzogen.

Der Klon 7-2 wurde im FACS als CEACAM1-bindender Klon identifiziert. Aus der nachfolgenden Subklonierung konnte Subklon 3 (produzierter Antikörper 7-2.3) als Klon mit der stärksten Bindung an CEACAM1-4L identifiziert werden (Abb. 23 A).

Ein Vergleich der Antikörperkonzentrationen der Hybridom-Überstände mit den Konzentrationen der verwendeten Kontrollantikörper (0,5–1 µg/mL), zeigte das der Klon 7-2.3 im FACS in vergleichsweise hohen Konzentrationen verwendet werden musste. Klon 7-2.3 zeigte bei Einsatz von 1 µg/mL keine CEACAM1 Bindung (Abb. 23 B, dunkelblaue Linie im rechten Histogramm), für die Bindung wurde in diesem Experiment eine Konzentration von 10 µg/mL benötigt. Dies weist auf eine geringe Affinität des Antikörpers 7-2.3 für CEACAM1-4L hin.

Bei Konzentrationen oberhalb von 10 µg/mL band 7-2.3 zudem unspezifisch an CEACAM1-4S, nicht jedoch an das Parental, was aus der FACS-Analyse der Titrationsreihen an Jurkat Parental, Jurkat CEACAM1-4L und CEACAM1-4S hervorgeht (Abb. 23 B, hellblaue Linie).

Um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers 7-2.3 mit CEACAM 5 und CEACAM6 ausschließen zu können, wurden die Zelllinien MC38-CEACAM1 (CEACAM1 transfizierte, murine MC38), C15A3 (CEACAM5 transfizierte, murine MC38) sowie HeLa-CEACAM6 (humane HeLa Zellen, transfiziert mit CEACAM6) für die Immunfluoreszenz eingesetzt. Diese Kreuzreaktivität musste für den späteren Einsatz des Antikörpers in Kolonzellen ausgeschlossen werden, da CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 von Kolonzellen exprimiert werden können.

Die Immunfluoreszenz zeigte, dass CEACAM1 spezifisch von Klon 7-2.3 nachgewiesen wurde (Abb. 24 A, untere Reihe). Zudem unterschied Klon 7-2.3 in der Immunfluoreszenz an Jurkat-Zellen zwischen CEACAM1-4L und CEACAM1-4S (Abb. 24 A, untere Reihe), womit das Ergebnis der FACS-Messungen bestätigt werden konnte und die Spezifität des Nachweises belegt wurde.

Ein zusätzliches Inhibitionsexperiment, in dem das zur Immunisierung verwendete Peptid dem Klon 7-2.3 eine Stunde vor Durchführung der Immunzytochemie zugesetzt wurde, bewies die Spezifität der Immunzytochemie und schloss eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche von Jurkat-CEACAM1-4L Zellen endgültig aus (Abb. 24 C).

An die Austestung der Spezifität des Antikörpers 7-2.3 schloss sich die Evaluation eines möglichen Einsatzes im Western Blot an.

Hier konnte eine Bindung von Klon 7-2.3 an Präparationen aus MC38-CEACAM1-4L sowohl nach Immunpräzipitation als auch nach Deglykosylierung mit PNGaseF gezeigt werden, nicht jedoch an Gesamtlysate aus HT29 Zellen. Die im Blot erkenntlichen Banden der schweren Kette des zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers T84.1 belegen die äquivalente Gelbeladung. Das detektierte Antigen entspricht in seinem Molekulargewicht CEACAM1.

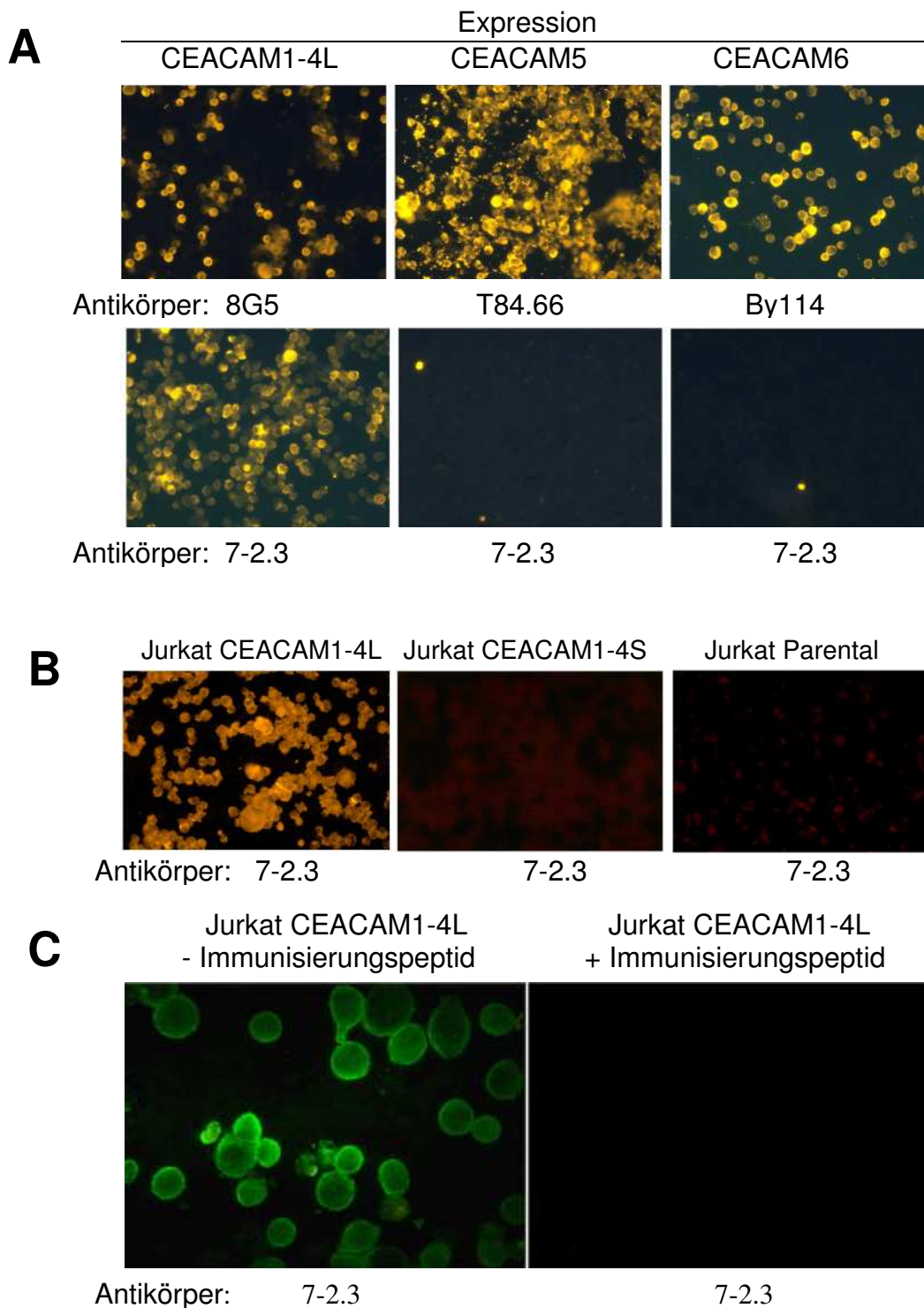


Abb. 24 Analyse der Spezifität von Klon 7-2.3 in der Immunfluoreszenz. A) Nachweis der spezifischen Bindung von Klon 7-2.3 an CEACAM1. Verglichen wurde die Bindung von Klon 7-2.3 (40 µg/mL) mit der Bindung von Antikörpern mit bekannter Spezifität (siehe Beschriftungen unterhalb der Fotos). Für die Nachweise wurden die Zelllinien MC38-CEACAM1 (linke Spalte), C15A3 (mittlere Spalte) und HeLa-CEACAM6 (rechte Spalte) verwendet. B) Nachweis der Spezifität von Klon 7-2.3 für die Spleißvariante CEACAM1-4L in der Immunfluoreszenz an Jurkat, transfiziert mit den angegebenen CEACAM1-Spleißvarianten. C) Die spezifische Bindung von Klon 7-2.3 ist durch das die Bindungssequenz enthaltende Peptid inhibierbar. Das Peptid wurde in 5fachem Überschuss eine Stunde vor Verwendung des Antikörpers diesem zugesetzt.

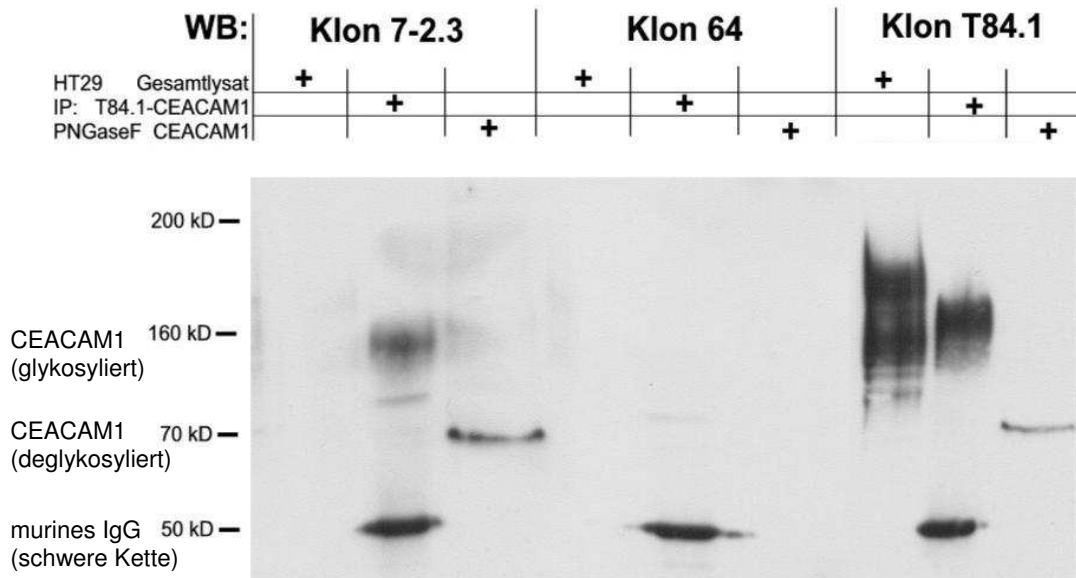


Abb. 25 Untersuchung des Bindungsverhaltens von Klon 7-2.3 im Western Blot. Positivkontrolle ist T84.1 (1 µg/mL), die Entwicklung des Blots erfolgte mittels ECL. Verwendet wurden die folgenden Proteinpräparationen: HT29 Gesamtlysate (enthält CEACAM1 und CEACAM5; Proteinmenge 30 µg/Spur) sowie aus MC38-CEACAM1-4L immunopräzipitiertes CEACAM1. Zusätzlich wurden MC38-CEACAM1 Gesamtlysate mittels PNGaseF deglykosyliert und ebenfalls aufgetragen. Zum Vergleich ist das Ergebnis für einen im Western Blot nicht bindenden Klon (Klon 64) aus der ersten Screeninggruppe dargestellt.

Der fehlende Nachweis von CEACAM1 in HT29 Gesamtlysaten stellte zunächst einen Widerspruch zur Bindung von Klon 7-2.3 an immunpräzipitiertes CEACAM1 aus MC38-CEACAM1 Zellen dar. In beiden Proben liegt CEACAM1 nach der Probenvorbereitung als denaturiertes Protein mit reduzierten Disulfidbrücken vor, daher sollte in beiden Präparationen ein Nachweis möglich sein.

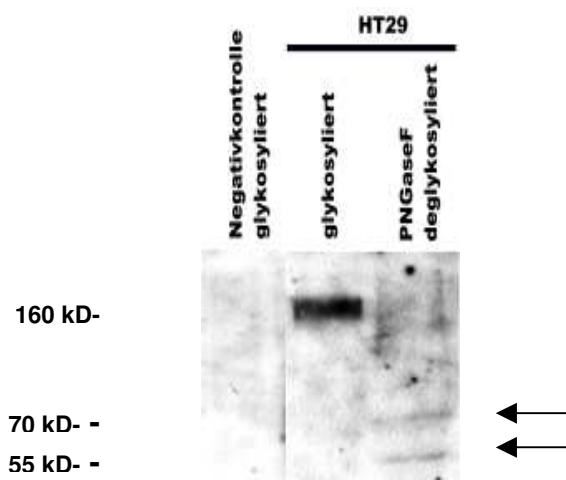


Abb. 26 Expression von CEACAM1 in HT29 Zellen. 10µg Gesamtlysate von HT29 Zellen wurden direkt oder nach Entfernung der N-Glykosylierung mit PNGaseF auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nachfolgend im Western Blot analysiert. Es konnten zumindest zwei Spleißvarianten von CEACAM1 nachgewiesen werden (Pfeile). Der spezifische Nachweis von CEACAM1 erfolgte mit dem an die transmembrane Domäne bindenden Antikörper 29H2 (Verdünnung 1:50).

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Bindung des Antikörpers 7-2.3 an CEACAM1 aus HT29 Gesamtllysaten bietet die Tatsache, dass in HT29 Zellen nicht alle exprimierten CEACAM1-Formen die lange Form der zytoplasmatischen Domäne tragen. Die simultane Expression mehrerer CEACAM1-Varianten ist ein bekannter Sachverhalt für Kolonzelllinien, der auch auf HT29 zutrifft. Im Western Blot konnten nach Deglykosylierung zumindest zwei verschiedene Spleißvarianten von CEACAM1 nachgewiesen werden (Abb. 26).

Es ist daher unrealistisch anzunehmen, dass es sich bei dem in HT29 Gesamtllysaten enthaltenen CEACAM1-Varianten ausschließlich um solche mit der langen zytoplasmatischen Domäne handelt. Ein direkter Vergleich der Nachweisstärken des die lange zytoplasmatische Domäne von einigen CEACAM1-Varianten erkennenden Klon 7-2.3, mit der Nachweisstärke des die N-Domäne in allen CEACAM1-Varianten erkennenden Klon T84.1 ist daher nicht angebracht.

Zusätzlich zeigte sich auch im Western Blot die geringere Affinität von Klon 7-2.3 für sein Antigen. Es wurden deutlich höhere Antikörperkonzentrationen benötigt, um eine mit dem Nachweis von CEACAM1 durch T84.1 vergleichbare Nachweisintensität aus immunpräzipitiertem CEACAM1-4L zu erzielen.

3.3 Funktionelle Untersuchungen an CEACAM1

CEACAM1 wird im Regelfall in verschiedenen Spleißvarianten und häufig zusammen mit anderen Vertretern der CEACAM-Genfamilie exprimiert.

Um die biologische Funktion von CEACAM1 untersuchen zu können, wurde daher zunächst ein System benötigt, in dem CEACAM1 exklusiv und in einer definierten Spleißvariante exprimiert wird. Die Wahl der Spleißvariante fiel auf CEACAM1-4L. Es weist vier extrazelluläre Domänen auf und unterscheidet sich von CEACAM1-4S nur in der Länge seiner zytoplasmatischen Domäne. Die L-Form von CEACAM1 weist einen Abschnitt von 73 Aminosäuren auf, welcher der S-Form fehlt.

Zunächst wurden humane Zelllinien eingesetzt, die mit CEACAM1-4L transfiziert wurden. Für weiterführende Versuche wurden humane Kolonkarzinom-Zelllinien verwendet, in denen auch die Regulation der CEACAM1-Expression untersucht werden konnte.

3.3.1 Expression von CEACAM1

Direkte Einflüsse von CEACAM1-4L auf das Verhalten von Zellkulturen können nur belegt werden, wenn eine Abhängigkeit zwischen beobachteter Wirkung und der exprimierten CEACAM1-Menge gezeigt werden kann. Hierzu wurde nach Stimuli gesucht, die einen Einfluss auf die Expression von CEACAM1 haben und direkt an etablierten Kolonkarzinom-Zelllinien eingesetzt werden konnten.

Die einzige zu Beginn der Arbeit bekannte, CEACAM1 induzierende Substanz war Interferon- γ (IFN- γ). Aus der Literatur (Takahashi et al., 1993) ist bekannt, daß die Inkubation mit 500 U/mL

humanem IFN- γ über einen Zeitraum von 6 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von CEACAM1 führt, bei längerer Inkubationsdauer kommt es auch zu einer Erhöhung der Expression von CEACAM5.

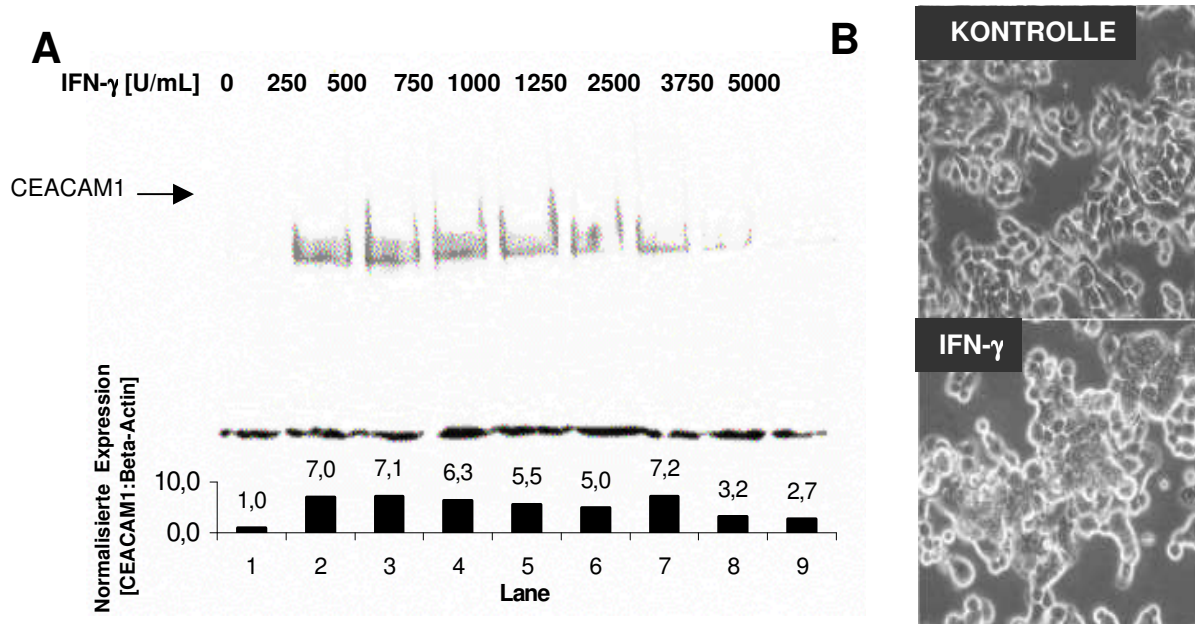


Abb. 27 Einfluss der IFN- γ Konzentration auf die Expression von CEACAM1 in HT29 Zellen. A) HT29 Zellen wurden 24 h vor Beginn der Stimulation ausgesät und nachfolgend für 6 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von IFN- γ stimuliert. Die Zellen wurden nachfolgend lysiert und die CEACAM1-Expression im Western Blot mit dem CEACAM1-spezifischen Antikörper 4D1/C2 (1 μ g/mL) bestimmt. Zur Kontrolle des Auftrags gleicher Proteinmengen in der SDS-Page wurde der Blot parallel mit einem anti- β -Actin Antikörper (Ladekontrolle) beprobt. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung nach Stimulation ist im unteren Teil der Abbildung als Ratio der Quantifizierungen CEACAM1 zu β -Actin dargestellt. B) Darstellung der Veränderung von HT29 im Phasenkontrast nach Stimulation mit 3750 U/mL IFN- γ . Aufnahme bei 100facher Vergrößerung.

Das unter den angegebenen Bedingungen durch Stimulation mit IFN- γ zu erreichende CEACAM1-Expressionsmaximum, bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe, ist bei einer Konzentration von 2500 U/mL mit einer Erhöhung der CEACAM1-Expression auf das 7,2-fache erreicht. Expressionszunahmen in vergleichbarer Höhe wurden bereits nach Stimulation mit 250 U/mL mit einer Zunahme der Expression auf das 7,0-fache bzw. 97% des Expressionsmaximums erzielt.

Die Expressionszunahme blieb über einen Bereich von 250 – 2500 U/ mL nahezu konstant. Eine deutlich höhere IFN- γ Konzentration im Bereich von 3750 bis 5000 U/ mL bewirkt dagegen ein Absinken der CEACAM1-Expression auf Proteinebene, mit einer normalisierten CEACAM1-Expression von 3,2 bzw. 2,7 (Abb. 27A). Parallel zur Verminderung der CEACAM1-Expression wurde unter dem Mikroskop bei Phasenkontrasteinstellung eine Verminderung der Differenzierung und ein beginnendes Abrunden der HT29 Zellen bemerkt (Abb. 27B). Diese Beobachtung legt einen toxischen Effekt nahe, den höhere Konzentrationen von IFN- γ oder dessen Einwirkung über

einen längeren Zeitraum auf HT29 Zellen hat. IFN- γ Konzentrationen oberhalb von 750 U/ mL wurden daher als ungeeignet für die weitere Arbeit angesehen.

Benötigt wurde eine IFN- γ Konzentration ohne negative Effekte auf die Vitalität der Zellen mit möglichst hoher CEACAM1-Expressionszunahme. Es sollte sich zudem bei der nachweisbaren Zunahme der CEACAM1-Proteinmenge nicht nur um einen Effekt der Modifikation der Protein-stabilität handeln.

Daher wurde der Einfluss von IFN- γ auf die Transkription von CEACAM1 in einer quantifizierenden real-time RT-PCR untersucht. Die aus der cDNA gebildete PCR-Produktmenge für CEACAM1 wurde auf die Produktmenge für das Housekeeping-Gen PBGD normalisiert.

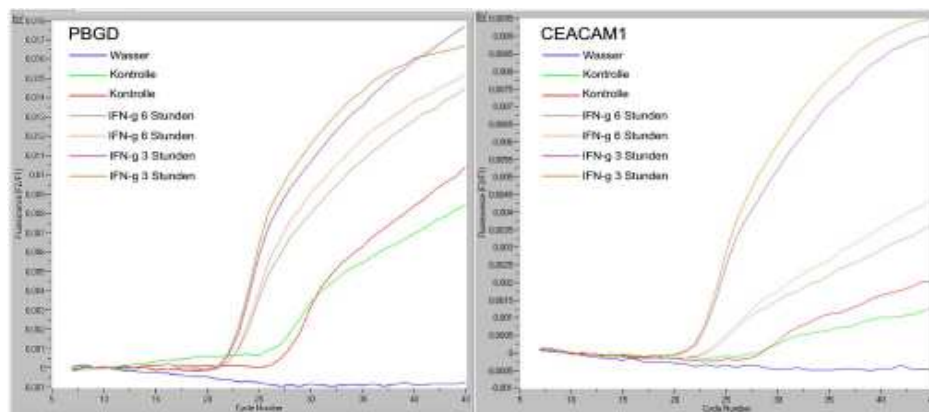


Abb. 28 Real-time RT-PCR zur parallelen Amplifikation von CEACAM1 und dem Housekeeping-Gen PBGD aus mRNA von HT29 Zellen, stimuliert mit IFN- γ (500 U/mL) für 3 bzw. 6 Stunden.

Die Untersuchung wurde exemplarisch für die Stimulation mit 500 U/mL für 3 und 6 Stunden im Vergleich zu unstimulierten HT29 Zellen durchgeführt (Abb. 28). Die Untersuchung der Expression auf mRNA Ebene ergab eine Zunahme der CEACAM1 Transkripte sowohl nach 3 als auch nach 6 Stunden Stimulationsdauer mit 500 U/mL IFN- γ , was mit den Ergebnissen des Western Blots übereinstimmt.

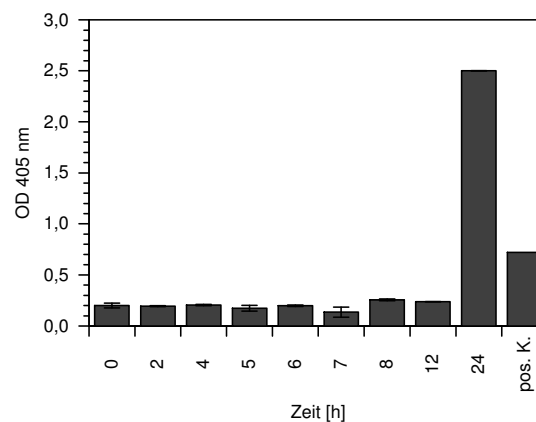


Abb. 29 Einfluss der IFN- γ Stimulation von HT29 Zellen auf die in der Kultur auftretende Apoptose. Darstellung der im Cell Death Detection ELISA gemessenen OD nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL) für 2-24 Stunden. Pos. K. = Positivkontrolle des Apoptoseassays: Fas-induzierte HT29 Zellen. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen in drei Parallelen.

Im dargestellten Experiment enthielten die Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit IFN- γ etwa die 8-fache mRNA Menge für CEACAM1, verglichen mit der Kontrollgruppe.

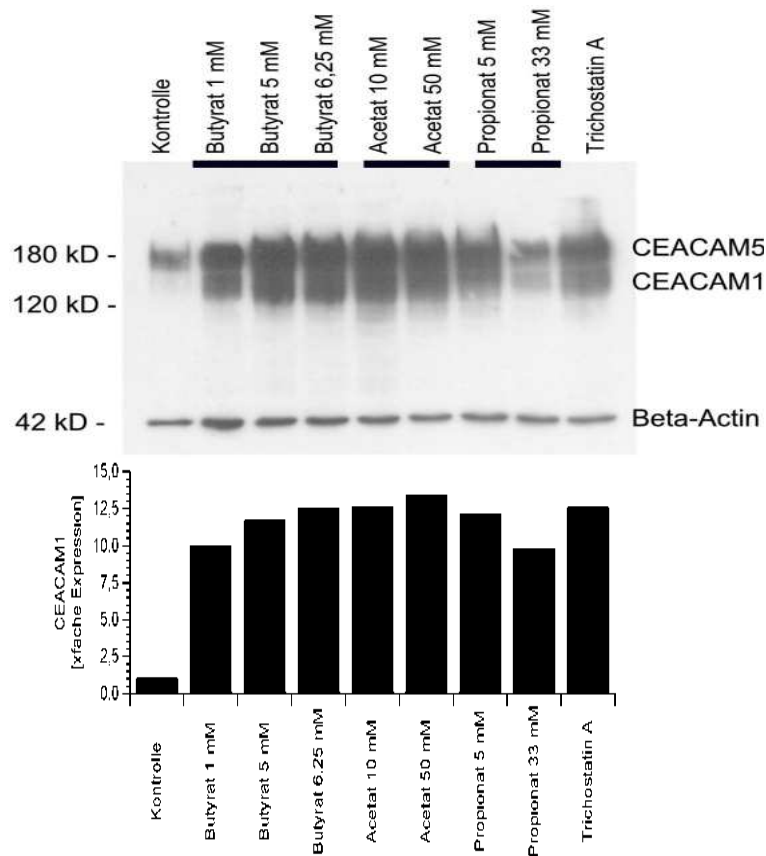


Abb. 30 Stimulation von HT29 Zellen mit kurzkettigen Fettsäuren induziert CEACAM1. Detektion von CEACAM1 und CEACAM5 in HT29 Gesamtzelllysaten durch den Antikörper T84.1. Im unteren Teil ist die densitometrische Quantifizierung für CEACAM1 in Gesamtzelllysaten von HT29 dargestellt.

Die Stimulation mit 500 U/mL für 6 Stunden wurde aus diesen Ergebnissen für die maximale Expression von CEACAM1 als geeignet angesehen.

Eine toxische Reaktion der Zellen auf die zur Steigerung der CEACAM1-Expression verwendeten Bedingungen der IFN- γ Stimulation war unbedingt auszuschließen, da mögliche Auswirkungen einer erhöhten CEACAM1-Expression maskiert werden könnten.

Daher wurden HT29 Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 500 U/mL stimuliert und nachfolgend einem Vitalitätstest sowie einem Apoptoseassay unterzogen. In Abb. 29 ist exemplarisch das Ergebnis des Apoptoseassays für eine IFN- γ Stimulation von HT29 Zellen über die angegebenen Zeiträume dargestellt.

Eine Zunahme der Proliferation und ein vermehrtes Auftreten von Apoptose über einen Zeitraum von 12 Stunden wurde nicht beobachtet (Abb. 29). Dieses Ergebnis bestätigte die Wahl von 500 U/mL IFN- γ über 6 Stunden als geeignete Stimulation für HT29 Zellen zum Ziel der Steigerung der CEACAM1-Expression ohne unmittelbare Einflussnahme auf die Zellvitalität.

Der beobachtete Zusammenhang zwischen der Zelldifferenzierung und der CEACAM1-Expression bei der IFN- γ Stimulation führte zu der Hypothese, dass allgemein Substanzen die eine Zelldifferenzierung bewirken, auch einen Einfluss auf die CEACAM1-Expression haben könnten.

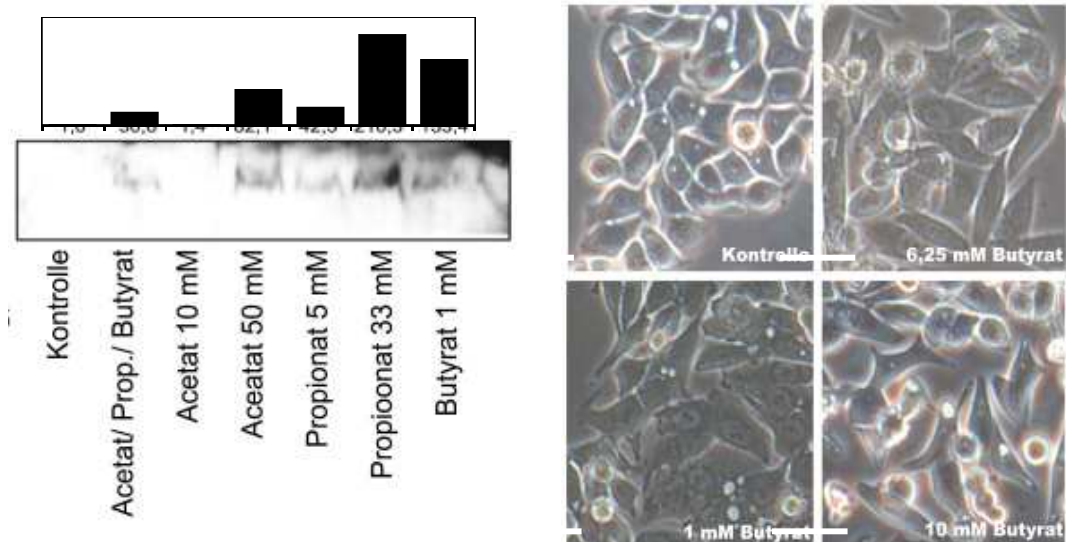


Abb. 31 Differenzierender Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren auf HT29 Zellen. Linke Seite: Ausschnitt aus einem Polyacrylamid-Gel ohne reduzierende- oder denaturierende Behandlung der Proben zum Erhalt der Enzymaktivität, mit anschließendem Blot und ECL Entwicklung der intestinalen alkalischen Phosphatase. Rechte Seite: HT29 Zellen im Phasenkontrast nach Butyratstimulation über 24 Stunden in den angegebenen Konzentrationen. Die Größe des Balkens entspricht 80 μm .

Es sind einige Substanzen bekannt, die auf Kolonepithelzellen eine differenzierende Wirkung zeigen. Gut beschrieben ist hier die Wirkung der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Butyrat und Propionat. Diese Fettsäuren werden durch mikrobielle Fermentation im Darmlumen gebildet und können von den Kolonozyten als Energiequelle verstoffwechselt werden.

Ausgetestet wurden die Fettsäuren Acetat (10–50 mM), Propionat (5–3 mM) sowie Butyrat (1–10 mM). Diese Fettsäuren stellen den größten Anteil der bakteriellen Fermentationsprodukte im Darmlumen dar.

Durch Nachweis einer Zunahme der in den HT29 Zellen gebildeten alkalischen Phosphatase konnte zunächst – neben rein morphologischen Kriterien – die Zunahme der Differenzierung der HT29 Zellen gezeigt werden (Abb. 31). Zudem wurde eine Verminderung der Proliferation in den mit kurzkettigen Fettsäuren behandelten HT29 Kulturen beobachtet. Zur Quantifizierung dieses proliferations-hemmenden Einflusses der kurzkettigen Fettsäuren wurde den Zellen Bromdesoxyuridin (BrdU) im Medium zugesetzt und nach 4 Stunden das in die DNA inkorporierte BrdU im ELISA quantifiziert. In der Auswertung wurde der Wert für die unbehandelte Kontrolle mit eins gleichgesetzt und alle anderen Proliferationswerte auf diesen Ausgangswert bezogen (Abb. 32).

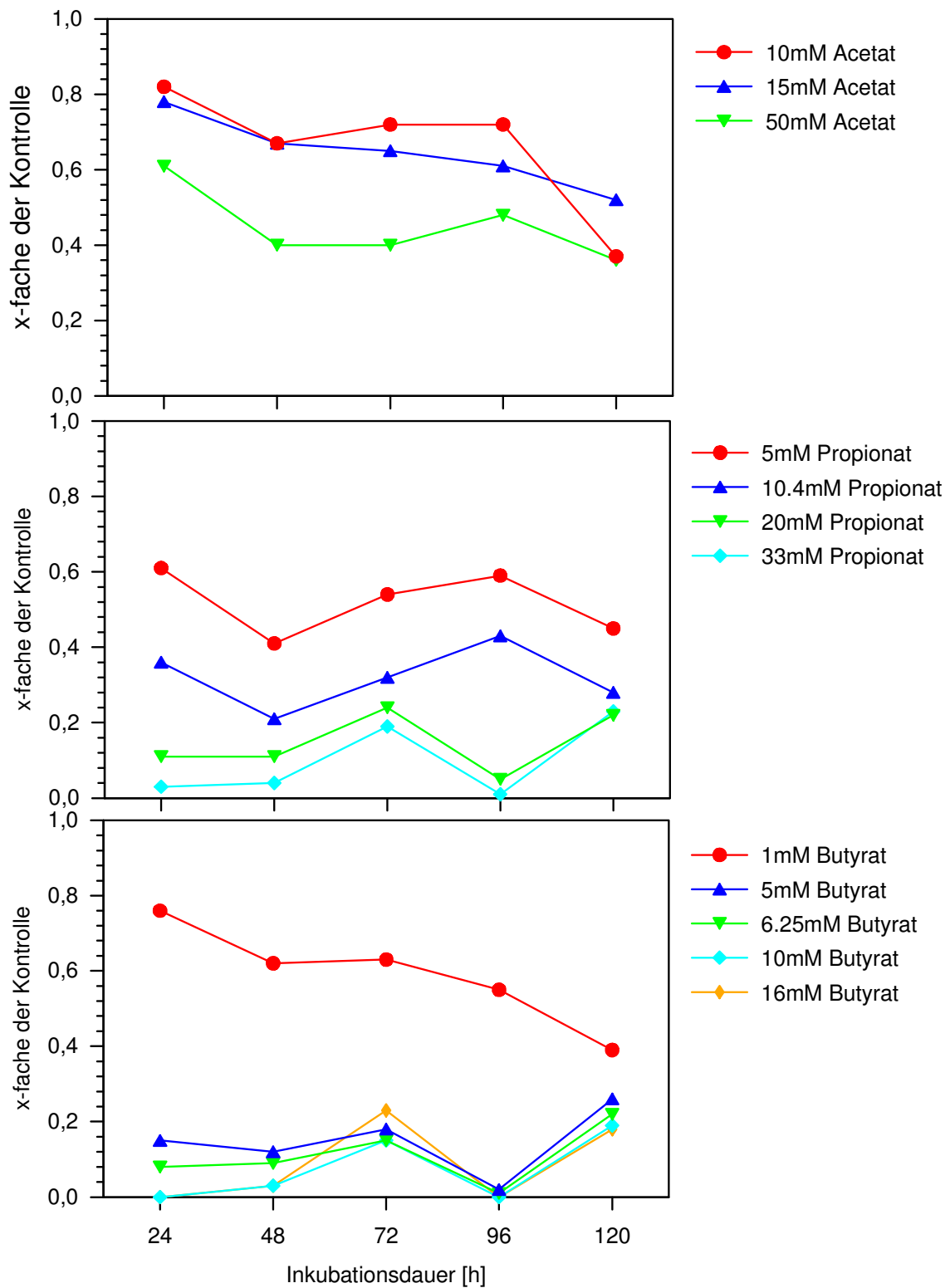


Abb. 32 Proliferation in HT29 Zellen nach Zusatz von kurzkettigen Fettsäuren zum Kulturmedium. Die Proliferation wurde durch Quantifizierung des BrdU Einbaus in die DNA im ELISA bestimmt. Die für unbehandelte HT29 Zellen festgestellte Proliferation wurde für die Auswertung auf 1.0 gesetzt. Darstellung einer Versuchsdurchführung mit drei Parallelen.

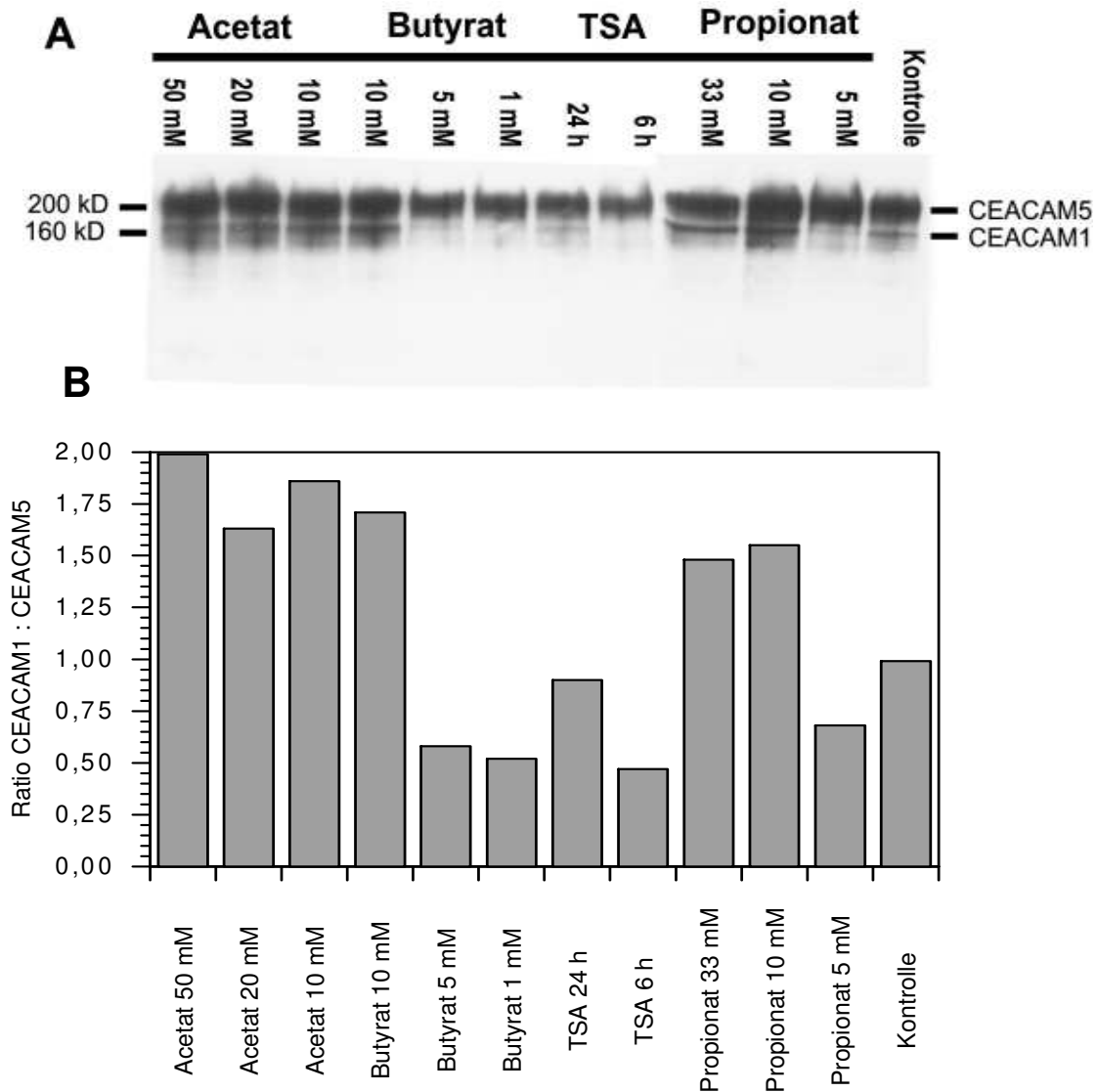


Abb. 33 Analyse des Einflusses kurzkettiger Fettsäuren auf die CEACAM1 und CEACAM5 Expression. A - Western Blot mit HT29 Gesamtzelllysaten, stimuliert für 24 Stunden mit verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren in den angegebenen Konzentrationen. B - Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung des Einflusses der kurzkettigen Fettsäuren auf das Verhältnis der Expressionen von CEACAM1 zu CEACAM5.

Der hemmende Einfluss von Fettsäuren auf die Proliferation der HT29 Zellen ist deutlich für alle untersuchten Fettsäurekonzentrationen zu erkennen. Die stärkste Abnahme der Proliferation wurde dabei bei Zusatz von Butyrat in Konzentrationen von 5 mM oder höher festgestellt. Bereits nach 24 Stunden Inkubationsdauer wurde die Proliferation auf weniger als 20% reduziert.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Fettsäuren auf die Expression von CEACAM1 und CEACAM5 untersucht.

Der Zusatz von Fettsäuren zum Kulturmedium über 24 Stunden führte sowohl für CEACAM5 als auch für CEACAM1 zu einer Zunahme des Proteins, wenngleich der Einfluss auf CEACAM5 deutlich geringer ausfiel (Abb. 33 A). Der Anteil des CEACAM1-Proteins stieg durch Zusatz von Acetat in das Kulturmedium in der angegebenen Konzentration um das 12,5 – 13,5fache an, bei

Zusatz von Butyrat erfolgte eine Zunahme um das 10,0 – 12,5fache der Kontrolle und durch Propionatzusatz wurde das 9,5 – 12fache der Expression in der Kontrolle festgestellt.

Das ist vergleichbar mit der Wirkung von Trichostatin A (TSA) über den gleichen Zeitraum. TSA ist ein Histon-Deacetylase Hemmer und wurde als Kontrolle für eine mögliche Wirkung der Fettsäuren über den Mechanismus der Histonacetylierung verwendet. Dies ist eine notwendige Kontrolle, da bei vielen der kurzkettigen Fettsäuren davon ausgegangen wird, dass ihre Wirkung nicht zuletzt auf ihrer histonacetylierenden Wirkung beruht. Der Einsatz von TSA ist somit eine geeignete Kontrolle zur Beurteilung der Relevanz dieses in den Bereich der Epigenetik fallenden Einflusses. Aus Abb. 33 ist deutlich zu ersehen, dass auch in TSA behandelten Zellen mehr CEACAM1 Protein nachzuweisen ist.

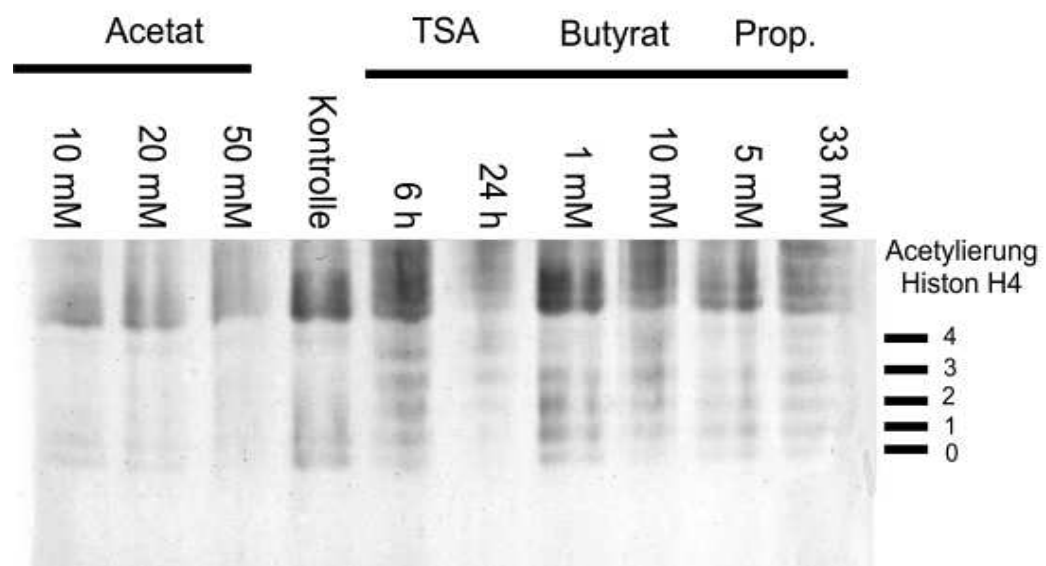


Abb. 34 Coomassie-Färbung eines AUT-Gels zur Darstellung acetylierter Histone. Histonpräparationen aus HT29 Zellen, behandelt mit kurzkettigen Fettsäuren der angegebenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Ein Vergleich des Einflusses der Fettsäuren auf die Expression von CEACAM1 und CEACAM5 zeigt eindeutig, dass bei vergleichbarer Fettsäurekonzentration die CEACAM1 Proteinmenge stärker zunimmt. Das Verhältnis zwischen CEACAM1 und CEACAM5 verschob sich bei Behandlung mit Acetat zugunsten von CEACAM1, ein deutlicher Unterschied zu Behandlungen mit Butyrat oder Propionat (Abb. 33 B). Für alle Experimente mit HT29 Zellen, in denen kein IFN- γ Verwendung fand, wurde daher die Behandlung mit Acetat eingesetzt. Acetat zeichnete sich in der untersuchten Fettsäuregruppe zudem durch einen CEACAM1-induzierenden Einfluss mit breitem Wirkungsoptimum aus.

Kurzkettige Fettsäuren inhibieren unspezifisch Histondeacetylasen, was zu einer Akkumulation acetylierter Histone und nachfolgend zu einer Chromatinauflockerung führt.

In einem TritonX-Harnstoff-Essigsäuregel (AUT-Gel) kann die Acetylierung von Histonen mit Hilfe einer Coomassie-Färbung dargestellt werden. In einem solchen Gel wurden zu Kontrollzwecken Histone, isoliert aus den in Abb. 33 dargestellten Stimulationsgruppen, aufgetrennt.

Die Coomassie-Färbung zeigte die Zunahme acetylierter Histone, erkenntlich an dem leiterartigen Muster der H4-Histone mit 1-4facher Acetylierung. Ein Trend zur 3- und 4-fachen Acetylierung ist der Abb. 34 zu entnehmen. Ausnahme bildet hier die Acetat-Behandlung, für die keine eindeutige Veränderung im Acetylierungsmuster erkennbar war. Die Behandlung mit TSA über 24 Stunden diente auch hier als Positivkontrolle für eine Zunahme der Histonacetylierung, nicht-acetyliertes H4-0 war hier nicht mehr nachzuweisen.

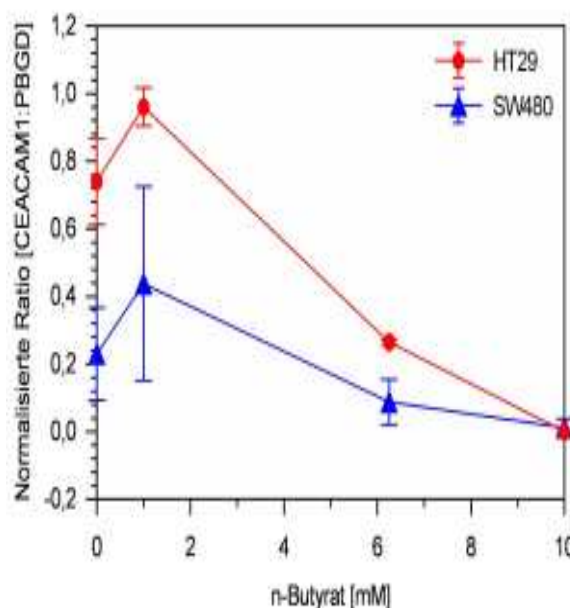


Abb. 35 Quantifikation der RNA von CEACAM1 und PBGD in einer Multiplex real-time RT-PCR. Verwendet wurde Gesamt-RNA von HT29 und SW480 Zellen, behandelt mit n-Butyrat in Konzentrationen von 1 mM bis 10 mM. Darstellung aus 2 Versuchswiederholungen mit jeweils zwei Parallelen.

Die Expression von CEACAM1 nach Behandlung von HT29 oder SW480 Zellen mit Butyrat wurde auf RNA-Ebene mittels einer quantifizierenden real-time Multiplex RT-PCR für CEACAM1, normalisiert auf die Expression von PBGD, untersucht (Abb. 35).

Das Ergebnis zeigt eine deutliche Abnahme der CEACAM1 RNA-Synthese bei steigenden n-Butyrat Konzentrationen. Dabei verhalten sich die zwei untersuchten Kolonkarzinom-Zelllinien gleichsinnig, auch wenn die CEACAM1-Expression in der unstimulierten Kontrolle in SW480 Zellen deutlich geringer ist. Eine anfängliche CEACAM1 zu PBGD Ratio von 0,2 bzw. 0,77 wurde durch Stimulation mit 1 mM n-Butyrat in beiden Zelllinien verändert, die RNA-Synthese stieg an. Bei Gabe von 6,25 mM und 10 mM n-Butyrat trat in den getesteten Zelllinien eine Verminderung der CEACAM1-RNA auf, die normalisierte Ratio liegt zwischen 0,12 und 0,24. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass im Gegensatz zu der Stimulation mit IFN- γ (siehe Abb. 28) die Stimulation mit Butyrat einen negativen Einfluss entweder auf die Stabilität der präparierten RNA oder auf die

CEACAM1-Promotoraktivität hatte. Bereits auf zellulärer Ebene war der zunehmende Zellstress bei steigender Butyrat-Konzentration festgestellt worden (siehe Abb. 31).

3.3.2 Promotoraktivität durch Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren

Nach Feststellung einer eindeutigen Zunahme des nachweisbaren CEACAM1 Proteins durch Fettsäurestimulation und bei Berücksichtigung des inversen Verhältnisses zwischen Proteinmenge und RNA-Synthese, zumindest für Stimulationen mit n-Butyrat, bleibt die Frage der Promotoraktivität offen.

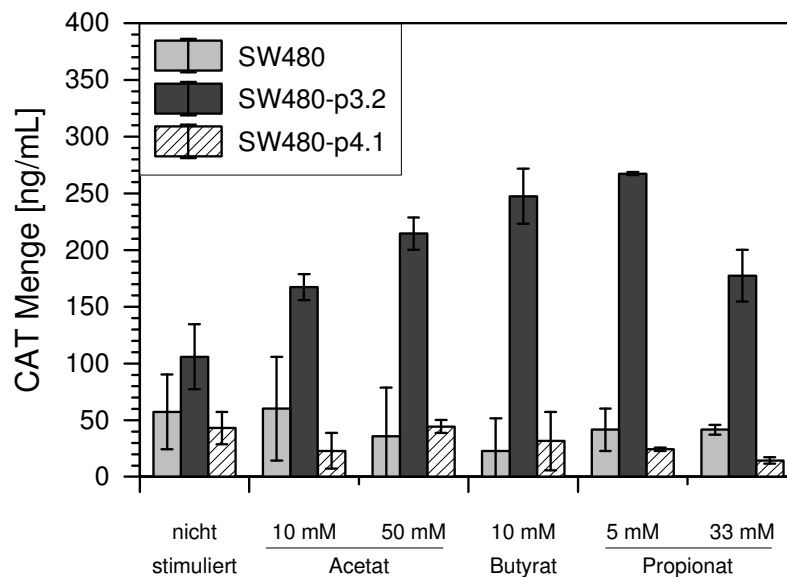


Abb. 36 CAT Promotor Assay zur Bestimmung des Einflusses von kurzkettigen Fettsäuren auf die Promotoraktivität von CEACAM1. Humane SW480 Zellen wurden stabil mit dem CEACAM1 Promotor-Reporterkonstrukt p3.2 mit Insert in Sinn-Orientierung oder reverser Orientierung (p4.1) transfiziert und für 24 Stunden mit Fettsäuren der angegebenen Konzentrationen stimuliert. Mittels eines Sandwich ELISA wurde die Menge des synthetisierten CAT-Proteins bestimmt. Der Unterschied zwischen Kontrolle und 33 mM Propionat, bzw. Acetat (10 mM und 50 mM) ist signifikant mit $p < 0,003$ oder besser.

Durch stabile Transfektionen der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit einem Reporterkonstrukt bestehend aus dem CEACAM1-Promotor mit CAT als Reportergen (Vektoren p3.2 in sinn-Orientierung und p4.1 mit Promotor in reverser Orientierung), konnte der direkte Einfluss von Fettsäuren auf den CEACAM1-Promotor gezeigt werden.

Das Ergebnis des mittels eines ELISA nachgewiesenen CAT Enzyms zeigte eindeutig die Aktivierung des CEACAM1-Promotors durch steigende Konzentrationen der Fettsäuren (Abb. 36). Für Propionat wurde eine Hemmung der Promotoraktivität bei 33 mM Propionatzusatz festgestellt, was in Übereinstimmung mit dem schwächeren Nachweis für CEACAM1 in den Western Blot Ergebnissen der Abb. 30 und Abb. 33 steht.

3.3.3 Apoptoseinduktion durch Vernetzung von CEACAM1

CEACAM1 erfüllt die Funktion eines membranständigen Rezeptors mit Signaltransduktionskapazität. Die einfachste Möglichkeit, die zugehörigen Signalkaskaden zu aktivieren, besteht in der extrazellulären Bindung von Molekülen an die extrazellulären Domänen von CEACAM1 und der nachfolgenden Untersuchung der derart behandelten Zellen auf Veränderungen in Proliferation, Zelldifferenzierung oder Zelltod.

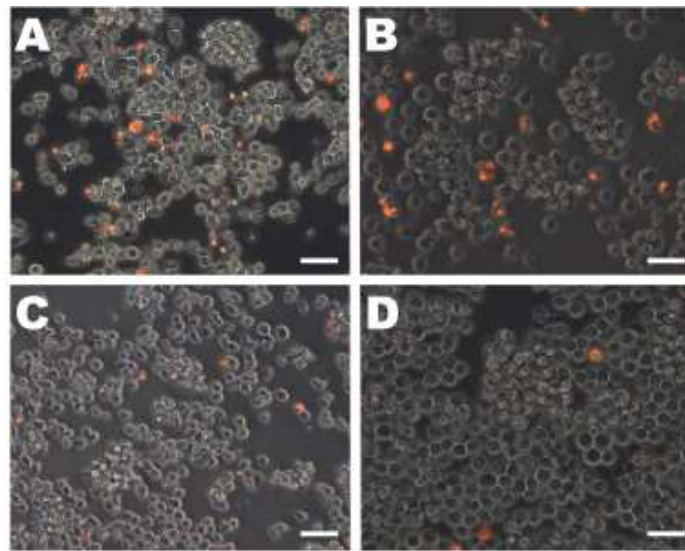


Abb. 37 Propidiumjodidfärbung von Jurkat-Zellen. Die Jurkat-Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern für 24 Stunden inkubiert und zelltodassoziierte Veränderungen der Zellkernmorphologie mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Propidiumjodid nachgewiesen. Lebende Zellen bleiben ungefärbt. A) CEACAM1-Quervernetzung durch eine Kombination der Antikörper T84.1 und anti-Maus IgG, B) durch vernetzenden anti-Fas Antikörper apoptoseinduzierte Jurkat-Zellen, C) anti-Maus IgG und D) Kontrolle ohne Antikörperzusätze. Die Größe des Balkens entspricht 100 μm .

In orientierenden Versuchen konnte festgestellt werden, dass Veränderungen bei extrazellulärer Bindung vor allem den Bereich des Zelltods betrafen (Abb. 37). Deutlich konnte eine Zunahme im Anteil der toten Zellen in Jurkat-Kulturen bereits nach 24 Stunden festgestellt werden.

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe eines ELISA zur Quantifizierung freier Nukleosomen festgestellt. Eine Propidiumjodidfärbung wurde zur direkten Kontrolle und Visualisierung der Apoptoseinduktion in den Jurkat-Zellen parallel eingesetzt.

Der Zusatz von Propidiumjodid direkt zum Zellkulturmedium erlaubte eine Unterscheidung sowohl zwischen lebenden (ungefärbten) und toten (rot gefärbten) Zellen als auch auf Basis der Zellkernmorphologie zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen möglich.

Der Einfluss einer Quervernetzung von CEACAM1 auf den Anteil apoptotischer Zellen war bereits nach 24 Stunden zu erkennen (Abb. 37) und wurde in Vorversuchen mikroskopisch durch Auszählen des Anteils apoptotischer Zellen in den Jurkat-Kulturen untersucht. Die festgestellte Veränderung im Anteil der apoptotischen Zellen wurde in den nachfolgenden Experimenten durch einen ELISA zur Quantifizierung des Anteils freier Nukleosomen ermittelt.

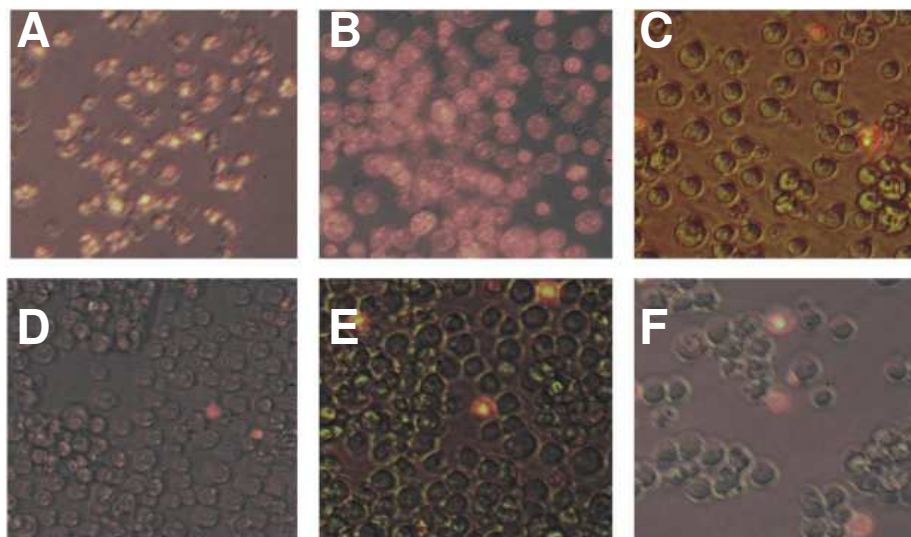


Abb. 38 Propidiumjodidfärbung von Jurkat-Zellen. Die Jurkat-Zellen wurde mit verschiedenen Antikörpern für 96 Stunden inkubiert und zelltod-assoziierte Veränderungen der Zellkernmorphologie mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Propidiumjodid nachgewiesen. Lebende Zellen bleiben ungefärbt. A) Fas-induzierte Apoptose, B) CEACAM1-Quervernetzung durch eine Kombination der Antikörper T84.1 und anti-Maus IgG, C) nur anti-Maus IgG, D) nicht-bindender primärer Antikörper mit anti-Maus IgG, E) anti-CEACAM5 Antikörper T84.66 mit anti-Maus IgG und F) unbehandelte Kontrolle.

Die T-Zelllinie Jurkat eignete sich vor allem auf Grund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von Apoptosestimuli mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen für diese orientierenden Versuche. Als Kontrolle für einen rezeptor-assoziierten Apoptoseweg wurde ein induzierender Ligand für den Fas-Rezeptor (CD95) verwendet.

Wie Abb. 38 und Abb. 39 zeigen, führte ein Zusatz CEACAM1-bindender Antikörper zu einer Zunahme apoptotischer Zellen in der Zellkultur. In diesem Assay wurde ein Vergleich zwischen CEACAM1-4L transfizierten Jurkat-Zellen und dem zugehörigen Parental durchgeführt. Durch die CEACAM1-Quervernetzung traten 24,2% mehr apoptotische Zellen auf. Der Unterschied war auf einem Niveau von $p < 0,01$ signifikant. Der Gesamtanteil apoptotischer Zellen bei 4D1/C2 vermittelter Quervernetzung betrug hier 54,3%, bei Quervernetzung mit dem Antikörper T84.1 waren es 40,7% apoptotische Zellen mit einer Signifikanz im Unterschied zwischen Parental und CEACAM1-4L Transfektom von $p = 0,053$.

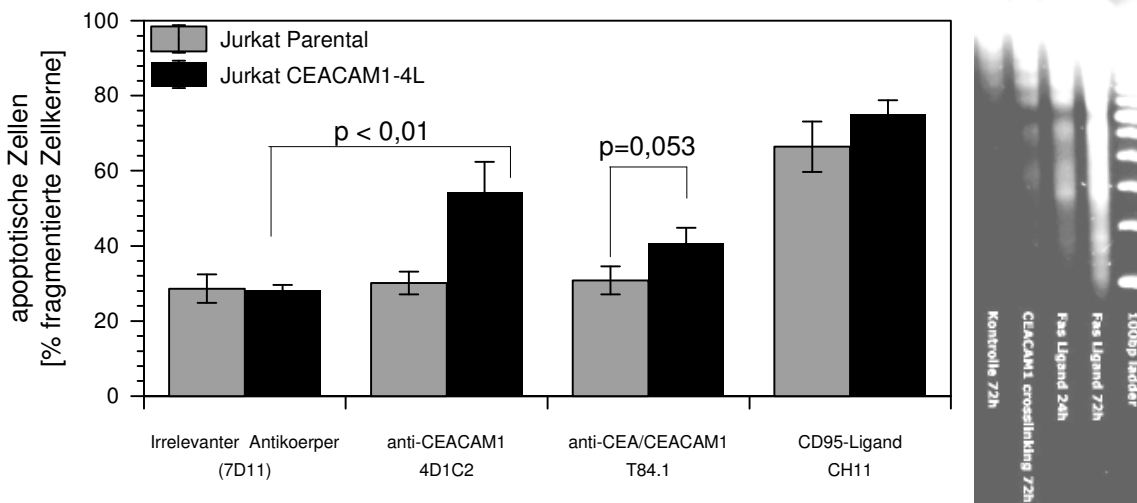


Abb. 39 Quervernetzung von CEACAM1-4L auf der Oberfläche von Jurkat-Zellen löst Apoptose aus. CEACAM1-4L transfizierte Zellen wurden mit verschiedenen primären Antikörpern über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert, bevor ein vernetzendes anti-Maus IgG zugegeben wurde. Die Darstellung umfasst Mittelwerte aus 6 Versuchswiederholungen mit jeweils 3 Parallelen. Die statistische Signifikanz ist über den Balken angegeben (Rangsummen Test nach Wilcoxon). Rechte Seite: Darstellung der apoptosetypischen DNA-Leiter aus genomischer DNA, isoliert aus Zellen nach Fas-Induktion oder CEACAM1-Quervernetzung zum angegebenen Zeitpunkt.

Die Zugabe eines irrelevanten Antikörpers, d.h. ein nicht an CEACAM1- oder ein anderes Oberflächenantigen bindender Antikörper, führt zu keiner Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen. Das zeigte ein Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in der Kultur des Parentals mit der Kultur des CEACAM1-4L Transfektoms. Für die Apoptoseinduktion mit einem Fas-Liganden betrug der Unterschied zwischen beiden Zelllinien dagegen 8,5%. Dieser Unterschied bei Fas-induzierter Apoptose zwischen dem Jurkat Parental und dem CEACAM1-4L transfizierten Subklon ist dabei nicht signifikant.

Die Differenz zwischen dem Jurkat Parental und dem CEACAM1-4L Transfektom bei CEACAM1-Quervernetzung ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummen Test) bei Verwendung des 4D1/C2 Antikörpers gesichert.

Zusätzlich zu den dargestellten Ergebnissen der Propidiumjodidfärbung wurde aus apoptose-induzierten Zellen DNA isoliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Unter Apoptose entstehen DNA-Fragmente von definierter Länge, die sich im Agarosegel als ein charakteristisches Leitermuster darstellen. Der Nachweis dieser Leiter gilt als sichere Abgrenzung der Apoptose gegen die Nekrose.

Auf dem in Abb. 39 rechts dargestellten Gel ist die aus der Apoptoseinduktion über den Fas-Liganden resultierende DNA-Leiter zu erkennen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Apoptoseinduktion über eine CEACAM1-4L Quervernetzung einen gleichartigen Effekt hat, auch wenn dieser deutlich schwächer ausfällt.

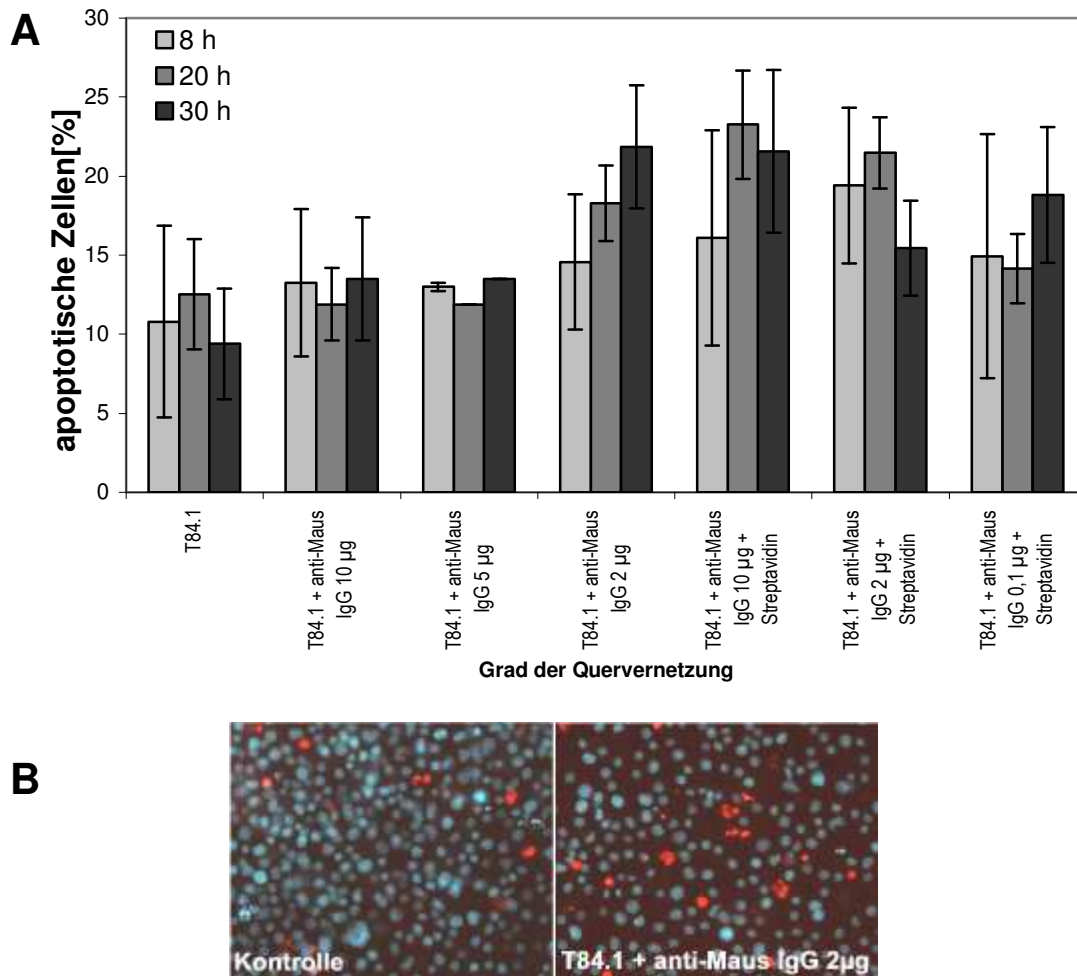


Abb. 40 CEACAM1-Quervernetzung durch einen Komplex aus murinem anti-CEACAM1 Antikörper und anti-Maus IgG bzw. anti-Maus-IgG-Biotin in Verbindung mit Streptavidin. A) Verschiedene Kombinationen mit unterschiedlichen Vernetzungseffizienzen wurden auf der Oberfläche von Jurkat CEACAM1-4L Zellen gebunden und die Auswirkungen auf die Apoptoserate in den Zellkulturen mittels einer Propidiumjodid-Hoechst Dye Färbung bestimmt. Die in den Ansätzen auftretenden apoptotischen Zellen wurden nach 8, 20 und 30 Stunden gezählt und der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. B) Propidiumjodid-Hoechst Dye Färbung von Jurkat CEACAM1-4L ohne CEACAM1-Quervernetzung (links) oder mit dem angegebenen Ansatz zur Quervernetzung, inkubiert für 20 Stunden bei 37°C. 100-fache Vergrößerung.

Damit das Auftreten von Apoptose in den Zellkulturen unter den beschriebenen Bedingungen in Abhängigkeit zur CEACAM1-4L Expression gestellt werden konnte, musste ein direkter Zusammenhang zwischen der auf der Zelloberfläche exprimierten CEACAM1-4L Menge und der in der Zellkultur auftretenden Apoptose nachgewiesen werden.

In Abb. 40 ist der Einfluss des Vernetzungsgrades von CEACAM1 auf der Zelloberfläche auf die Apoptoseinduktion dargestellt. Für diese Versuche wurde der Antikörper T84.1 entweder direkt in Verbindung mit vernetzendem polyklonalem Ziege anti-Maus IgG (anti-Maus IgG) oder biotinyliert mit Vernetzung durch Streptavidin in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen der Zellkultur zugesetzt. Der Assay zur Detektion der Apoptose wurde zur einer Doppelfärbung mit Propidiumjodid und Hoechst Dye ausgebaut, da das Erfassungsvermögen einer einfachen Propidiumjodidfärbung nicht ausreichte, um Unterschiede, wie sie im Rahmen von

Titrationen zu erwarten waren, nachzuweisen (Abb. 40 B). Die Propidiumjodid–Hoechst Dye Doppelfärbung ist hier sensitiver, bedingt vor allem durch das Erfassen früher Apoptosestadien durch Hoechst Dye und der klaren Abgrenzung nekrotischer Zellen durch die Propidiumjodid-Anfärbbarkeit bei intaktem Zellkern (Abb. 41).

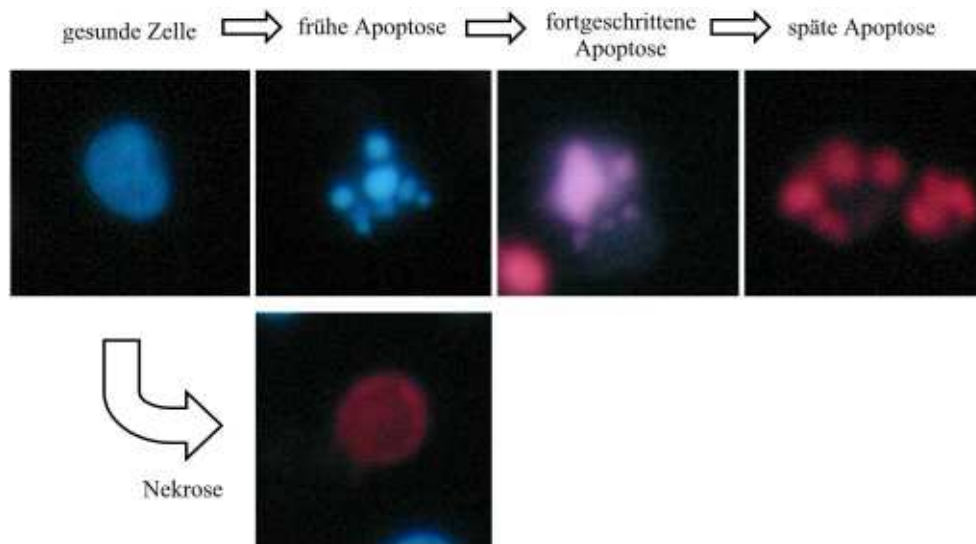


Abb. 41 Propidiumjodid-Hoechst Dye Doppelfärbung. Hoechst Dye färbt Nuklei aller Zellen blau fluoreszierend, wodurch ihre Kernmorphologie erkenntlich wurde. Propidiumjodid wird von Zellen mit intakter Zytoplasmamembran aktiv ausgeschlossen, wodurch bei gleichzeitigem Einsatz beider Farbstoffe Zellen in 5 verschiedenen Zustandsformen unterschieden werden konnten.

Die Doppelfärbung wurde über einen Zeitraum von bis zu 30 Stunden eingesetzt, um den Verlauf der Apoptose im Mikrotiterplattenformat zu untersuchen. Es wurde hierbei sowohl die Abnahme des Anteils lebender Zellen, als auch die Verteilung der einzelnen Stadien erfasst.

Wie aus Abb. 42 A zu erkennen ist, nehmen im Verlauf der Apoptose die prozentualen Anteile der frühen Apoptosestadien (nur fragmentierte Zellkerne) und späten Apoptosestadien (vollständig permeable Zellmembran mit fragmentiertem Zellkern) kontinuierlich zu. Ein Anstieg bei den frühapoptotischen Zellen ist hier bereits nach 6 Stunden zu verzeichnen, ohne dass es eine starke Zunahme unter den spätapoptotischen Zellen gibt. Dieser Trend setzt sich über die nächsten Stunden fort und ist apoptosespezifisch, wie die Inkubation mit Dexamethason zeigt. Dexamethason löst in Jurkat keine Apoptose aus, wie in Vorversuchen ermittelt wurde.

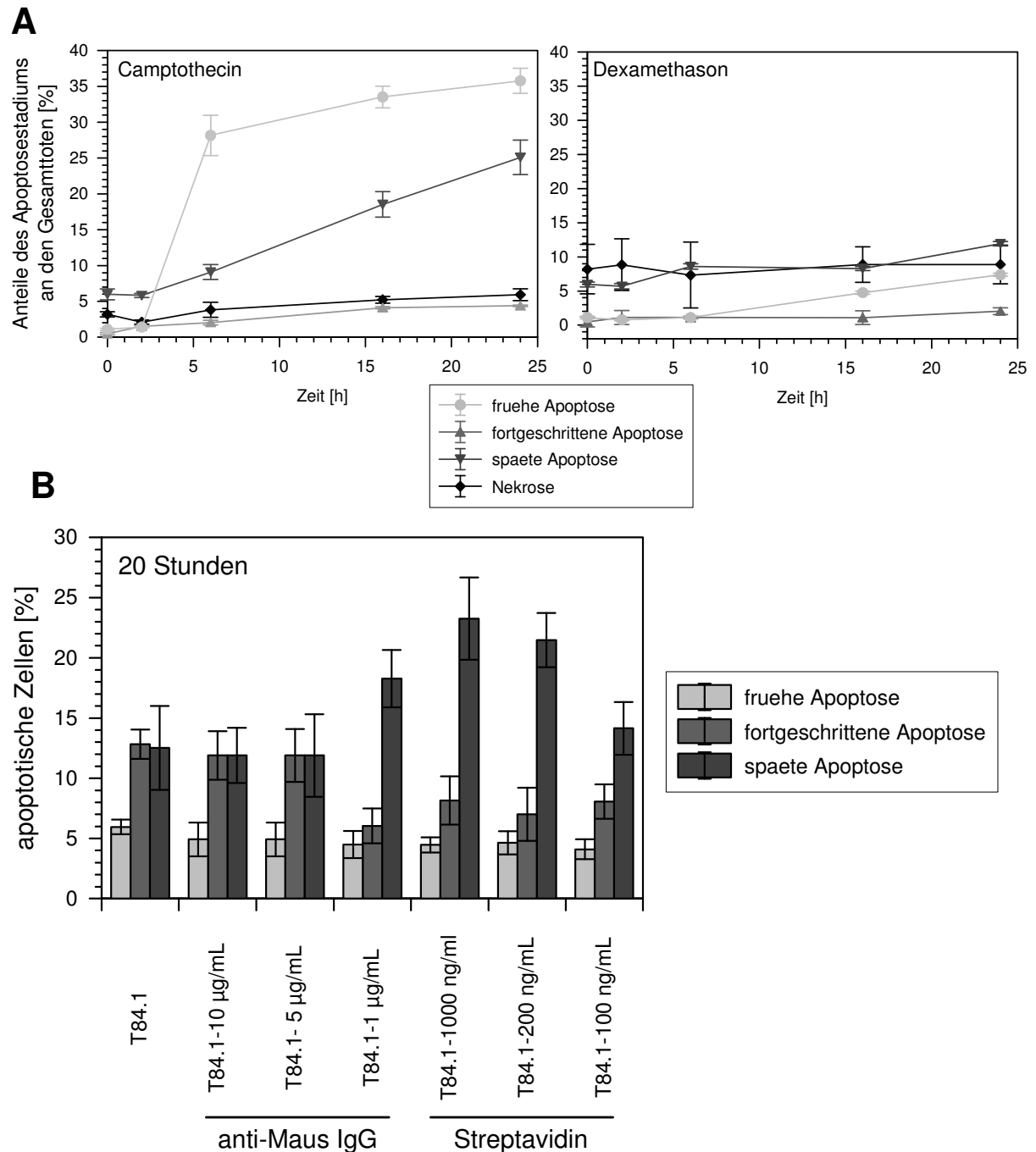


Abb. 42 Apoptoseinduktion in Abhängigkeit zum Quervernetzungsgrad von CEACAM1 auf der Oberfläche von Jurkat CEACAM1-4L Zellen. Unterschiedliche Vernetzungsgrade von CEACAM1 wurden durch Kombinationen des primären Antikörpers T84.1 mit anti-Maus IgG oder Streptavidin erreicht und die resultierende Apoptose durch eine Propidiumjodid-Hoechst Dye Doppelfärbung ermittelt. A) Etablieren der Doppelfärbung für Jurkat-Zellen unter Einsatz der Apoptose induzierenden Substanz Camptothecin und Verwendung von Dexamethason als nicht induzierende Kontrolle. B) Titration des anti-CEACAM1 Antikörpers T84.1 in Kombination mit verschiedenen Ziegen anti-Maus IgG Konzentrationen (10, 5 und 2 $\mu\text{g/mL}$) sowie einem biotinyliertem T84.1 mit Streptavidin in Konzentrationen von 1000 ng/mL, 200 ng/mL oder 100 ng/mL. Die Konzentration des T84.1 betrug in allen Ansätzen 2 $\mu\text{g/mL}$. Ausgezählt wurden pro Well jeweils 4 Gesichtsfelder mit insgesamt mindestens 400 Zellen/ Well und drei Wells für jede Antikörperkombination. Zu Versuchsbeginn betrug der Anteil der toten Zellen 8%, bei Versuchsende 10%. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Parallelzellen.

Die Austestung der verschiedenen T84.1/ T84.1-Biotin und Sekundärantikörper/Streptavidin Kombinationen ergaben für die Kombination aus 2,5 µg/mL T84.1-Biotin und 1 µg/mL Streptavidin die wirksamste Kombination zur Apoptoseinduktion. Es wurden hier etwa 30% apoptotische Zellen gezählt. Der Anteil der toten Zellen in der antikörperfreien Kontrolle wurde zu Versuchsbeginn und bei Versuchsende gezählt, und lag bei 8% bzw. 10%.

Insgesamt ist die Wirkung einer Streptavidin-vermittelten Quervernetzung stärker als die Verwendung eines Sekundärantikörpers.

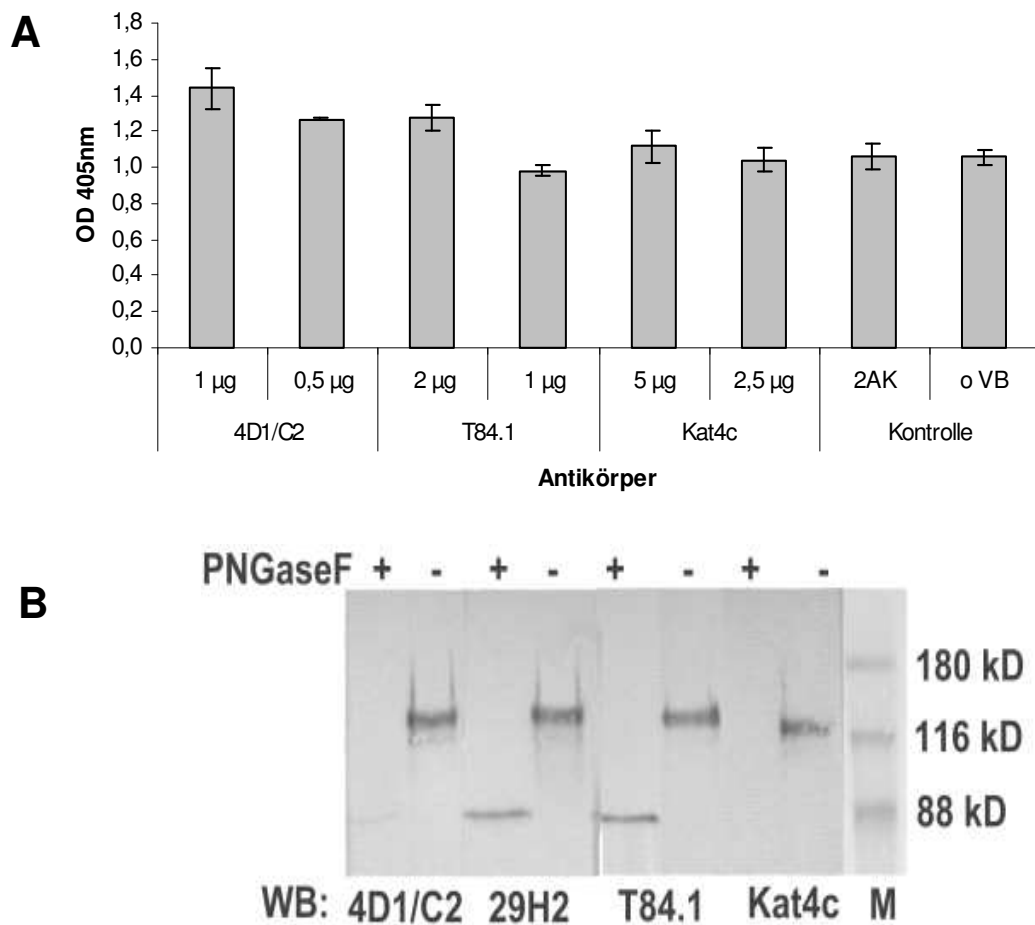


Abb. 43 Untersuchung verschiedener CEACAM1-bindender Antikörper auf ihre Funktion als Ligand für CEACAM1 in Quervernetzungsexperimenten. A) CEACAM1 wurde auf der Oberfläche der Jurkat CEACAM1-4L Zellen mit den angegebenen Antikörpern quervernetzt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach 3 Tagen im Cell Death Detection ELISA bestimmt. 2AK = nur Sekundärantikörper, oVB = ohne vernetzende Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Parallelen. B) Kontroll-Blot mit Jurkat CEACAM1-4L Lysaten mit und ohne PNGaseF-Behandlung zum Nachweis der CEACAM1-Bindung. 29H2 erkennt ein transmembranes Epitop und eignet sich nicht für den Einsatz in der Zellkultur.

Da das mikroskopische Auszählen von Fluoreszenzfärbungen generell mehrere Nachteile aufweist, und das Ergebnis auch bei Blindversuchen nicht zuletzt stark von der auszählenden Person abhängt, wurde ein Sandwich-ELISA zur Quantifizierung der durch Apoptoseprozesse generierten, freien Nukleosomen eingesetzt. Dieser ELISA wurde auf die Zellzahl normiert und ist deutlich sensitiver im Nachweis fragmentierter Zellkerne. Der Assay eignete sich zudem auch für den direkten Ver-

gleich der Wirksamkeit verschiedener CEACAM1-bindender Antikörper im Quervernetzungs-Ansatz.

Das Ergebnis des ELISA zeigte eindeutig, dass für eine Apoptoseinduktion durch Quervernetzung nur 3 der 4 untersuchten Antikörper verwendet werden können, wenn auch alle CEACAM1 erkennen, wie der in Abb. 43B dargestellte Western Blot belegt. Bei den quervernetzenden Antikörpern handelte es sich um die Klone 4D1/C2 und T84.1. Der kreuzreaktive anti-CEACAM1, -5 und CEACAM6 Klon Kat4c (DAKO) hatte dagegen keinen Effekt, auch wenn er nach Herstellerangaben an einen extrazellulären Bereich von CEACAM1 bindet. Ein weiterer Unterschied bestand in der Erkennung von deglykosyliertem CEACAM1, das durch alle getesteten Klone bis auf Kat4c erkannt wurde. Die Frage nach dem erreichbaren Vernetzungsgrad bei Bindung an ein Kohlenhydrat-Epitop anstelle des Proteinbackbones wurde hier nicht weiter verfolgt. Sofern der Antikörper zur Verfügung stand, wurde zur CEACAM1-Quervernetzung der Antikörper 4D1/C2 verwendet, alternativ fand Klon T84.1 Verwendung.

3.3.4 Intrinsischer Apoptoseweg

Der Nachweis einer Bcl-2 Verminderung, die Freisetzung von Cytochrom c und mittelbar die Messung einer Mitochondrienpotentialabnahme können zum Nachweis der Aktivierung des intrinsischen, überwiegend durch oxidativen Stress oder mitochondriale Schädigung ausgelösten Apoptoseweges herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in der Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden in Jurkat CEACAM1-4L Zellen Apoptose über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden mit verschiedenen Stimuli ausgelöst und die Zellen nacheinander für die Immunfluoreszenzfärbung ausgestrichen. Die Freisetzung von Cytochrom c zeigte sich durch eine Abnahme der organellengebundenen Färbung und einer Zunahme der zytosolischen Färbung.

Für Etoposid ist ein Verlauf der Apoptose über den intrinsische Apoptoseweg beschrieben, die Stimulation der Jurkat CEACAM1-4L Zellen mit Etoposid diente daher als Positivkontrolle (Abb. 44).

Im Normalfall stellten sich die Mitochondrien als um den Zellkern herum angeordnete Partikel dar (siehe Abb. 45, A). Bei Freisetzung von Cytochrom c wurde die Färbung diffus über die gesamte Zelle verteilt (Pfeile, Abb. 44).

Nach Apoptoseinduktion mit Etoposid wurde Cytochrom c in Jurkat CEACAM1-4L nach 48 Stunden in das Zytoplasma freigesetzt, in allen anderen Ansätzen erfolgte die Freisetzung von Cytochrom c erst nach 72 Stunden. Die Cytochrom c-Freisetzung wurde hier von einer erkennbaren Zunahme der Zellschädigung durch die induzierte Apoptose begleitet (Abb. 45 A).

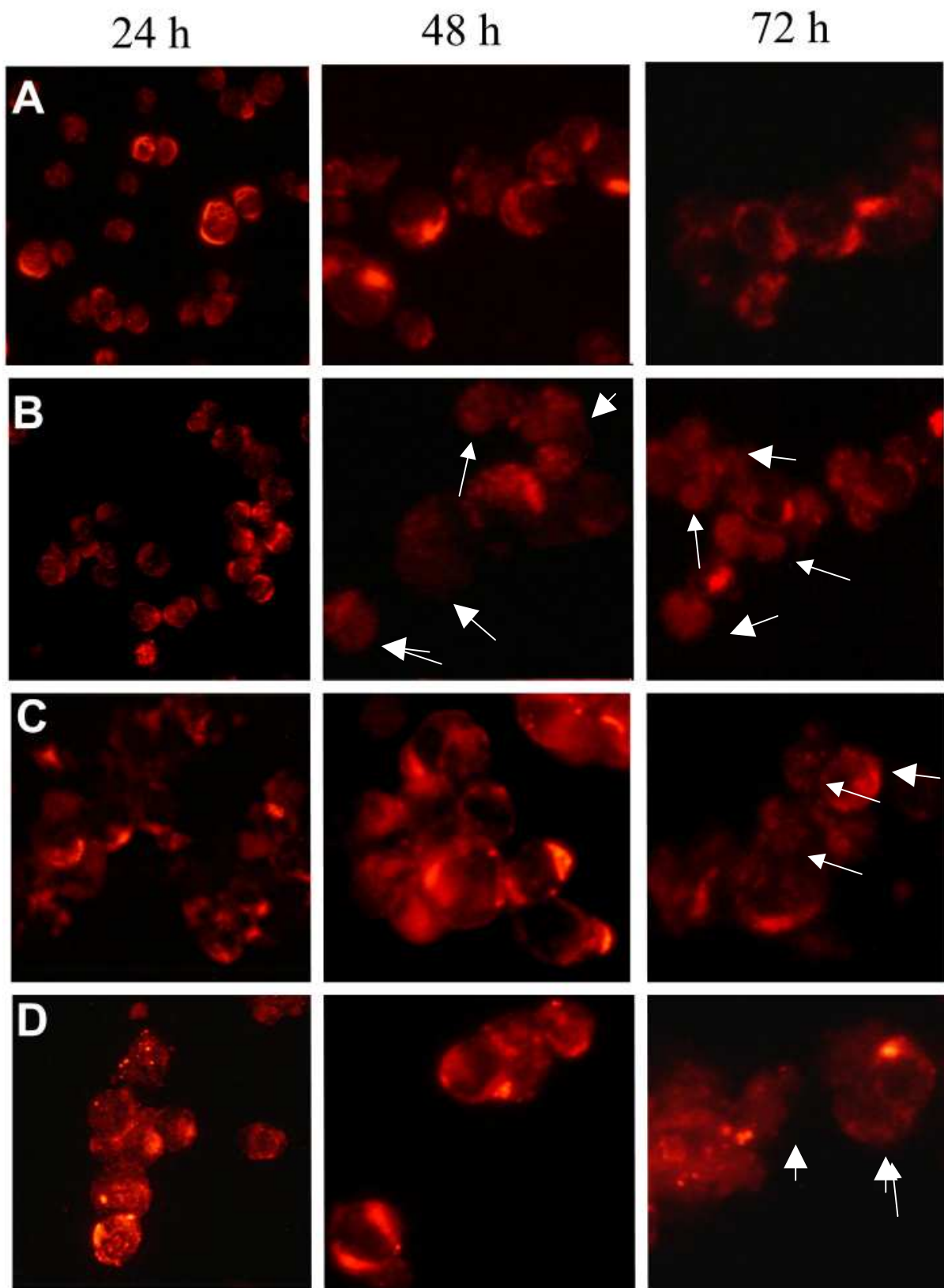


Abb. 44 Immunzytochemischer Nachweis der Freisetzung von Cytochrom c in Jurkat CEACAM1-4L Zellen nach CEACAM1-Quervernetzung. Bei den einzelnen Abbildungsgruppen handelt es sich um (A) Kontrolle, (B) Actinomycin D, (C) Etoposid und (D) CEACAM1-Quervernetzung. Mitochondrien stellen sich als helle, extranukleäre Färbung dar. Pfeile kennzeichnen Zellen mit Cytochrom c-Freisetzung.

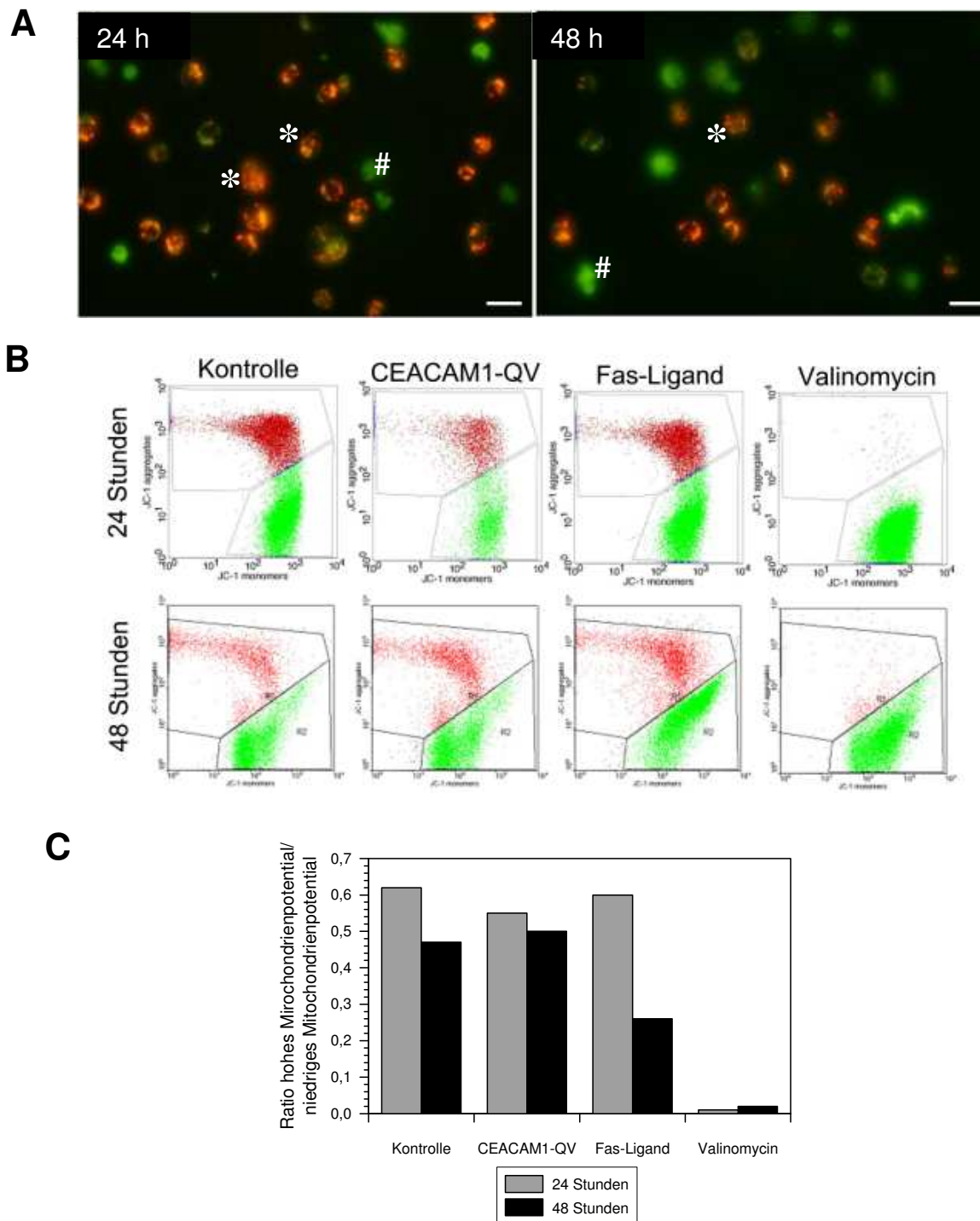


Abb. 45 Messung des Mitochondrienpotentials in Jurkat CEACAM1-4L Zellen, behandelt mit verschiedenen Stimuli. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von JC-1 gefärbten Mitochondrien in Zellen der Kontrollgruppe nach 24 h und 48 h. In Zellen mit hohem Mitochondrienpotential (*) oder niedrigem Mitochondrienpotential (#) stellen sich die einzelnen Organellen als stark orange gefärbte bzw. grün fluoreszierende Partikel dar. Die Größe des Balkens entspricht 60 µm. B) FACS Analyse der JC-1 Färbung zur Bestimmung des Mitochondrienpotentials. Dargestellt sind Messungen nach 24 h und 48 h. Zellen mit einem hohem Mitochondrienpotential befinden sich überwiegend im linken oberen Quadranten (rotes Gate), Zellen mit geringem Mitochondrienpotential im unteren rechten Quadranten (grünes Gate). Valinomycin wurde zur vollständigen Depolarisierung der Mitochondrien als Positivkontrolle verwendet. C) Quantifizierung der in B dargestellten Messungen als Ratio „Anteil von Zellen mit hohem Mitochondrienpotential/ Zellen mit geringem Mitochondrienpotential“.

In späten Apoptosestadien ist eine Freisetzung von Cytochrom c im Rahmen des Zellabbaus zu erwarten. Diese Freisetzung ist eine Folge der apoptosebedingten Zellschädigung und zu diesem Zeitpunkt nicht mehr als Auslöser von Apoptose zu interpretieren. Die Kontrolle zeigte auch nach 72 Stunden keine Veränderung.

Eine Beeinflussung der Mitochondrien ist nicht zwangsläufig von einer Cytochrom c-Freisetzung begleitet, weswegen auch das Potential der Mitochondrien untersucht wurde. Stark proliferierende Zellen zeichnen sich häufig durch ein sehr hohes Mitochondrienpotential aus, während in apoptotischen Zellen das Mitochondrienpotential nach einer initialen Zunahme häufig absinkt. Der Einfluss einer CEACAM1-Quervernetzung auf das Mitochondrienpotential wurde durch eine mitochondrienpotentialabhängige Fluoreszenzfärbung mit dem Fluorochrom JC-1 und nachfolgender Auswertung am FACS bestimmt (Abb. 45 B und C).

Zur Kontrolle wurde hier der rezeptorbasierte Fas-Apoptoseweg gewählt. Zur vollständigen Depolarisierung der Mitochondrien in Zellen der positiv Kontrolle, wurden die Zellen 10 Minuten vor der Messung mit dem Ionophor Valinomycin (1 μ M) inkubiert und nachfolgend sofort gemessen.

Es konnte keine spezifische Abnahme im Mitochondrienpotential von Jurkat CEACAM1-4L Zellen nach Apoptoseinduktion durch CEACAM1-Quervernetzung oder Fas-Induktion nach 24 Stunden festgestellt werden. Bei Fas-Induktion wurde nach 48 Stunden Inkubation mit 50 ng Fas-Ligand eine Verminderung des Mitochondrienpotentials auf eine Ratio von 0,62 auf 0,25 festgestellt werden. Das entsprach der Erwartung, da der Fas-Ligand ein sehr starker Apoptosestimulus ist, der nach 48 Stunden in dieser Konzentration bereits zur Zerstörung eines Großteils der Zellen geführt hatte. Letzteres bestätigt die Aussage der auftretenden Mitochondrienschädigung in späten Stadien der Apoptose.

3.3.5 CEACAM1-4L Quervernetzung induziert Caspaseaktivität

Sollte die Quervernetzung von CEACAM1-4L auf der Zelloberfläche eine Apoptosekaskade im klassischen Sinn auslösen, ist eine Aktivierung von Caspasen zu erwarten. Einen ersten Hinweis auf die Anwesenheit aktiver Caspasen lieferten Inhibitionsassays mit dem pan-Caspaseinhibitor z-VAD. Die CEACAM1-Quervernetzungs induzierte Apoptose war durch Zusatz von z-VAD zum Kulturmedium inhibierbar. Z-VAD inhibiert sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen.

Dieses irreversibel bindende Tetrapeptid wurde 1 Stunde vor der eigentlichen Apoptoseinduktion durch CEACAM1-Quervernetzung oder zur Kontrolle durch den Fas-Liganden induzierter Apoptose zugegeben und aufgrund seiner geringen Stabilität bei 37°C im 24-Stunden Intervall ersetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 4 Tage. Zur Kontrolle wurde mit Z-FA ein Kontrollpeptid zugesetzt, dass keine Caspaseinhibition bewirkt.

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde erneut im ELISA bestimmt. Das Ergebnis bestätigte die Inhibition der durch CEACAM1-Quervernetzung induzierten Apoptose bei Zusatz von Z-VAD.

Der Zusatz von Z-FA zum Kulturmedium vor der CEACAM1-Quervernetzung hatte dagegen keinen Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur.

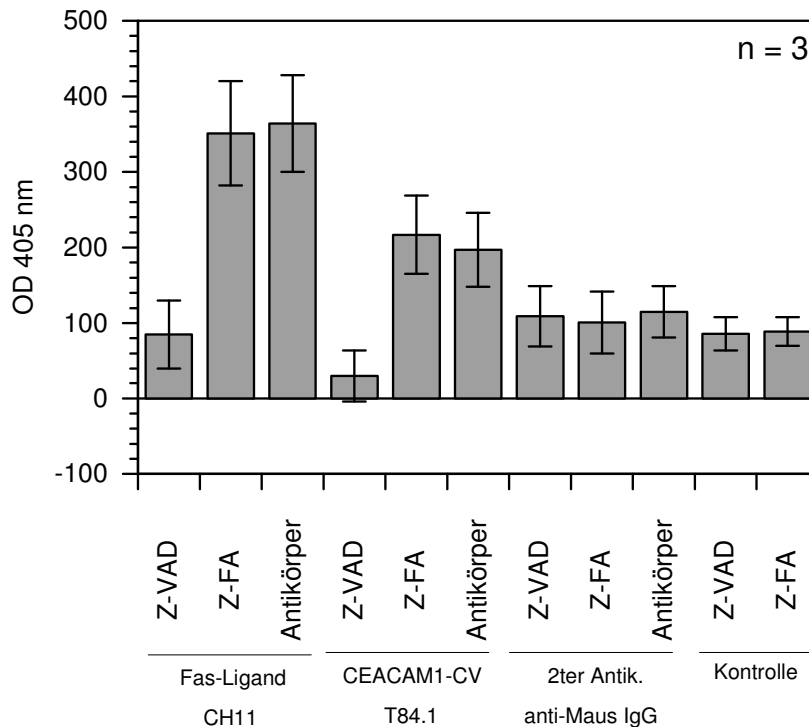


Abb. 46 Inhibition der Apoptoseinduktion in Jurkat CEACAM1-4L Zellen durch Zusatz von z-VAD. Zugewetzt wurden die zellpermeable Form des pan-Caspaseinhibitors z-VAD.fmk oder ein ebenfalls zellpermeables, nicht-inhibierendes Kontrollpeptid (z-FA.fmk). Beide wurden in Konzentrationen von 4 μ M verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Cell Death Detection ELISA (Roche). Darstellung von Mittelwerten aus 3 Versuchswiederholungen.

Die auf der rechten Seite in Abb. 46 dargestellten Kontrollen belegen das indifferente Verhalten der Kontrollansätze gegenüber z-VAD und z-FA. Die Assays wurden für vergleichende Auswertungen auf die zusatzfreie Kontrolle normalisiert. Die Statistische Auswertung mittels eines zweiseitigen Fisher's t-Test ergaben signifikante Unterschiede mit $p = 0,0007$ für die Inhibition der Fas-induzierten Apoptose, $p = 0,0468$ für die Inhibition der durch CEACAM1-Quervernetzung induzierten Apoptose in Bezug auf die Kontrolle und $p = 0,0104$ für den Unterschied der Kulturen bei Quervernetzung ohne Inhibitor-Zusatz gegenüber der z-VAD Ansatzes. Alle anderen Ansätze unterschieden sich nicht signifikant.

3.3.6 Identifizierung aktivierter Caspasen

Die durch CEACAM1-Quervernetzung induzierte Apoptose ist durch z-VAD inhibierbar. Daraus wurde auf eine Beteiligung von Caspasen geschlossen. Abgesehen von der Beteiligung von Effektorcaspasen wurde nach möglicherweise aktivierten Initiatorcaspasen gesucht. Es wurde ein zunächst qualitativer Screeningansatz verfolgt, in dem kombinatorisch fluorochrommarkierte Tetrapeptidsubstrate eingesetzt wurden. Die Menge des freigesetzten Fluorochroms korrelierte in

diesen Assays direkt mit der Menge der in der Probe enthaltenen aktivierten Caspase und wurde nachfolgend auf die eingesetzte Zellextraktmenge bezogen.

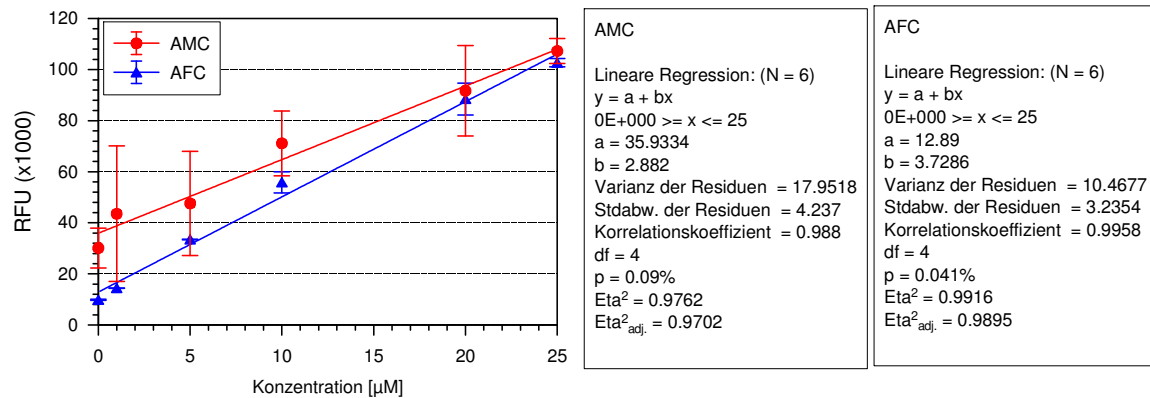


Abb. 47 Eichreihe zur Bestimmung der Mengen freigesetzter Fluorochrome in Caspase-Assays. Strukturabhängig waren die Caspase-Substrate entweder mit 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) oder 7-Amino-4-(trifluoromethyl)coumarin (AFC) markiert.

Die Zuordnung der gemessenen Caspaseaktivitäten wurde nach dem Ausschlussprinzip auf die einzelne Caspase zurückgeführt.

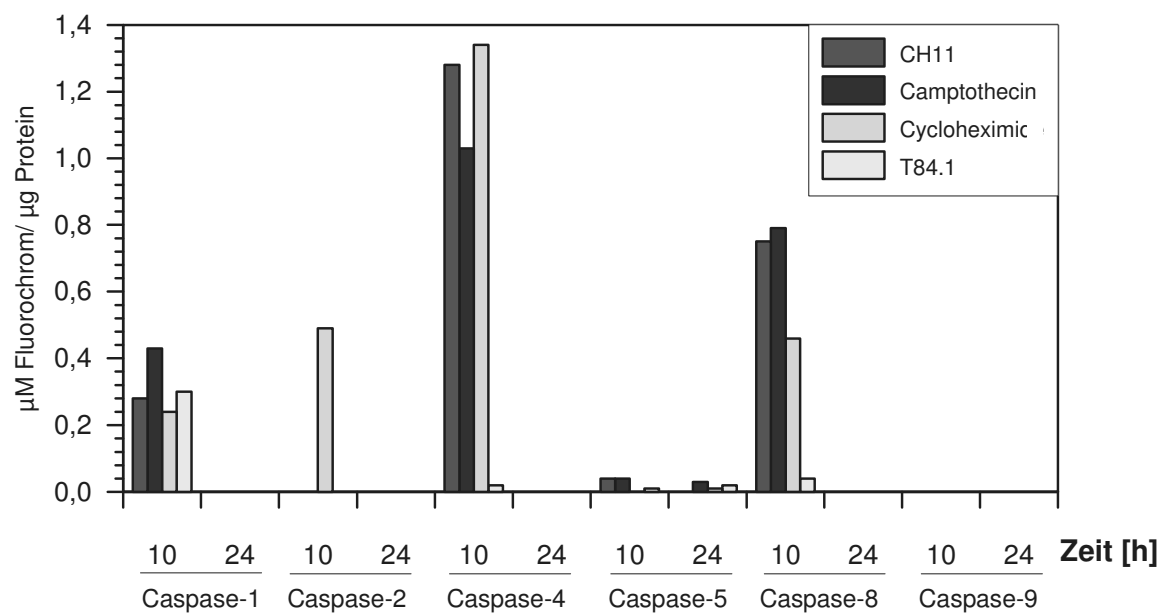


Abb. 48 Aktivierung von Initiatorcaspasen durch Apoptoseinduktion und Messung der Fluorochrom-Freisetzung. Die Induktion von Apoptose erfolgte durch Zusatz des Fas-Liganden (Antikörper CH11), Camptothecin, Cycloheximid oder des CEACAM1-Quervernetzenden Antikörpers T84.1 in Verbindung mit anti-Maus IgG. Dargestellt ist das Ergebnis einer Versuchsdurchführung in Doppelbestimmungen.

Im Screening wurden vier verschiedenen Stimuli zu Apoptoseinduktion in Jurkat CEACAM1-4L Zellen verwendet. Das Ziel bestand darin, möglichst allen getesteten Caspasesubstraten zumindest eine Positivkontrolle gegenüber stellen zu können. Die Fluorochrom-Freisetzung durch aktivierte Caspasen wurde für alle untersuchten Caspasen aus jeweils demselben Zelllysate bestimmt. Da

Initiatorcaspasen identifiziert werden sollten, erfolgte die Durchführung des Assays zu zwei frühen Zeitpunkten (10 bzw. 24 Stunden nach Apoptoseinduktion). Die mikroskopische Auszählung einer Propidiumjodidfärbung diente der Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen und der Kontrolle der erfolgreichen Apoptoseinduktion. Eine Zunahme des Anteils der apoptotischen Zellen in den induzierten Kulturen gegenüber der unbehandelten Kontrolle um den Faktor 2,5 wurde als untere Grenze für die Verwendung der Zellkultur zur Durchführung des Caspase-Assays festgelegt.

Dieser qualitative Assay wurde zweimal in Zweifachbestimmungen durchgeführt (Abb. 48). In der durch den Fas-Liganden oder Camptothecin induzierten Apoptose wurden Caspase-1, -4 und Caspase-8 aktiviert. Die geringe Aktivierung von Caspase-5 dagegen ist wahrscheinlich der überlappenden Substratspezifität von Caspase-1 und Caspase-4 mit Substraten für Caspase-5 (siehe 2.4.9, S. 50) zuzuschreiben. Cycloheximid aktivierte im Assay alle Caspasen mit Ausnahme von Caspase-5 und Caspase-9. Die CEACAM1-Quervernetzung führte überwiegend zu einer Aktivierung von Caspase-1 bei vergleichsweise geringer Caspase-8 Aktivierung.

Nach der Identifikation der Initiatorcaspasen wurde der Assay nach gleichem Schema für die Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7 wiederholt. Die Induktionszeiten betrugen hier 10, 24 und 48 Stunden (Abb. 49)

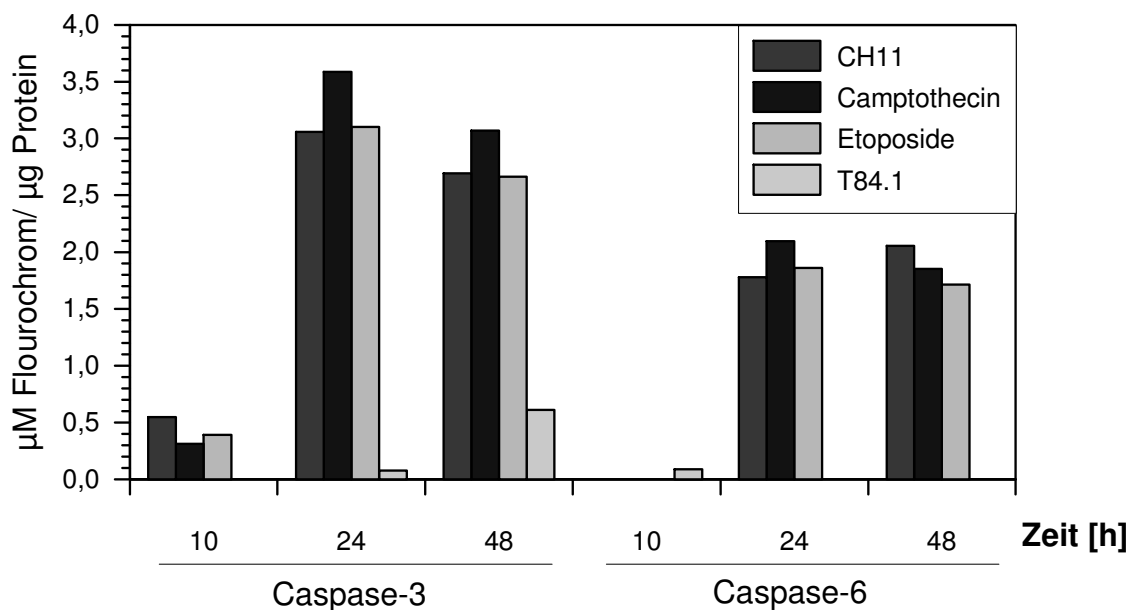


Abb. 49 Aktivierung von Effektorcaspasen durch Apoptoseinduktion in Jurkat CEACAM1-4L Zellen durch Zusatz von Fas-Ligand, Camptothecin, Cycloheximid oder CEACAM1-Quervernetzung. Freigesetzte Fluorochrom-Mengen sind als Differenz zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Parallelen.

Der Assay zeigt die Aktivierung von Caspase-3 für alle getesteten Apoptosestimuli. Im Fall der CEACAM1-Quervernetzung wurde Caspase-3 über den Zeitraum von 48 Stunden kontinuierlich weiter aktiviert, mit höchster Aktivität nach 48 Stunden. Im Vergleich hierzu wurde für die anderen Apoptosestimuli nach 48 Stunden bereits ein Rückgang der Enzymaktivität festgestellt. Das steht in

Übereinstimmung mit dem beobachteten langsamen Verlauf des CEACAM1-induzierten Apoptosesignalweges.

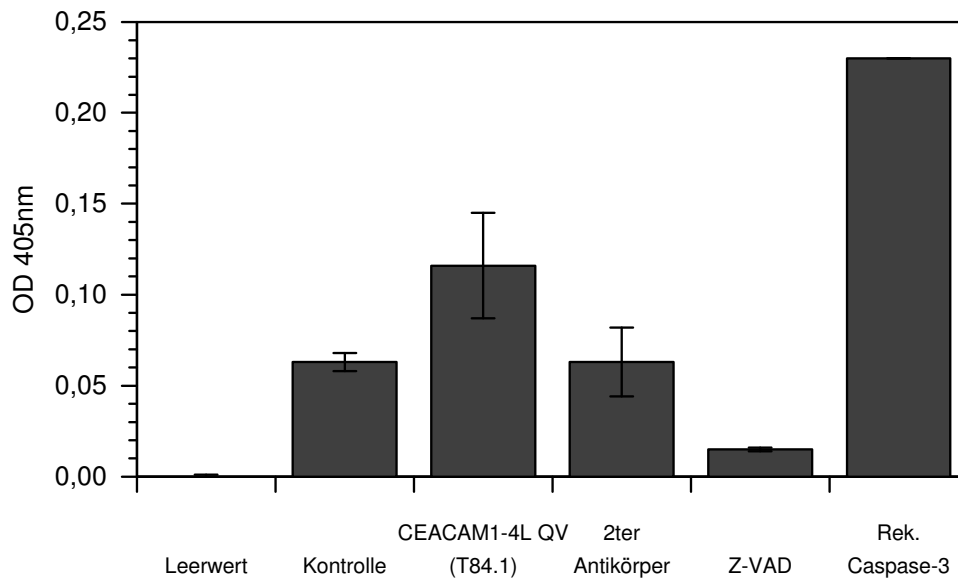


Abb. 50 Aktivierung von Caspase-3 in Jurkat CEACAM1-4L Zellen. Im Verlauf der durch CEACAM1-Quervernetzung (CEACAM1-QV) induzierten Apoptose wird Caspase-3 aktiviert. Die Apoptose ist durch den pan-Caspase Inhibitor z-VAD inhibierbar. Der Zusatz von Ac-DEVD.pNA zu rekombinanter Caspase-3 stellte die Assay-Positivkontrolle dar. Darstellung einer Versuchsdurchführung in Dreifachbestimmungen.

Caspase-6 wird durch CEACAM1-Quervernetzung im erfassten Zeitraum nicht aktiviert. Die im Rahmen dieses Screenings festgestellten potentiellen Caspaseaktivierungen wurden in Einzelassays weiter untersucht.

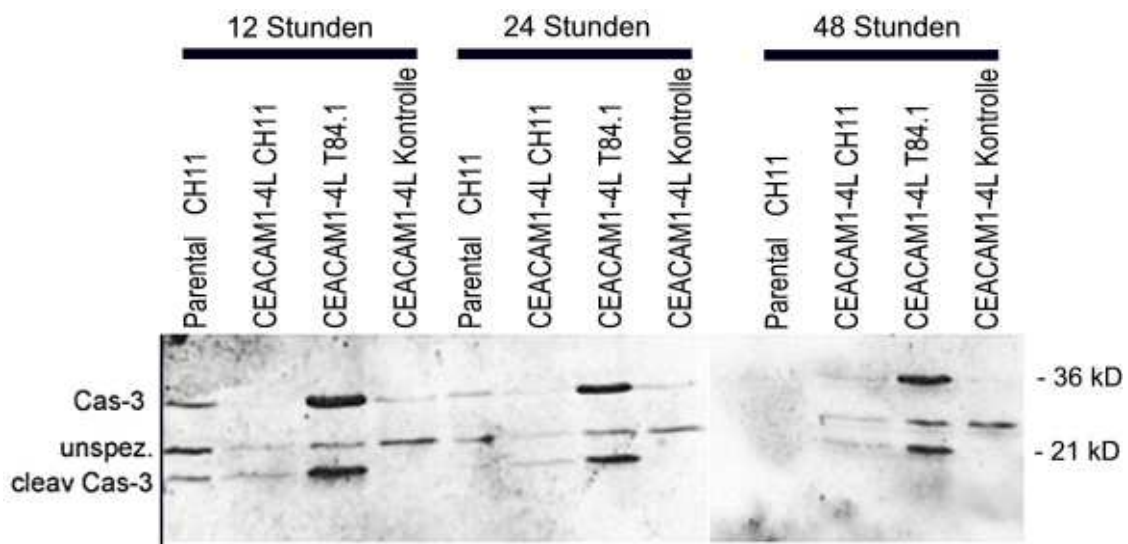


Abb. 51 Nachweis der aktivierten Caspase-3 in Jurkat-Zellen im Western Blot. In Jurkat Parental oder CEACAM1-4L transfizierten Jurkat-Zellen wurde Apoptose für 12 – 48 Stunden induziert. Caspasen wurden auf einem Tris-Tricin Gel aufgetrennt und mit dem anti-Caspase-3 Antikörper 3G2 nachgewiesen. Der Antikörper erkennt sowohl das inaktive Proenzym als auch die katalytisch aktive 21 kD Form. Aufgetragene Proteinmenge: 20 µg Zelllysate/Spur.

In diesen Assays wurde einem Teil der Zellen der pan-Caspaseinhibitor z-VAD zugesetzt und nachfolgend im Mikrotiterplatten-Assay die Umsetzung von Ac-DEVD.pNA durch zytosolische Extrakte untersucht (Abb. 50).

Die Aktivierung von Caspase-3 unter *in vivo* Bedingungen konnte bestätigt werden, die Caspaseaktivierung wurde durch Zusatz von z-VAD vollständig inhibiert (Abb. 50).

Eine Aktivierung von Caspase-3 wurde zudem in einer Zeitreihe im Western Blot untersucht. Die aktive Form von Caspase-3 konnte zu jedem der untersuchten Zeitpunkte in Jurkat-CEACAM1-4L nachgewiesen werden, nicht jedoch in der unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 51).

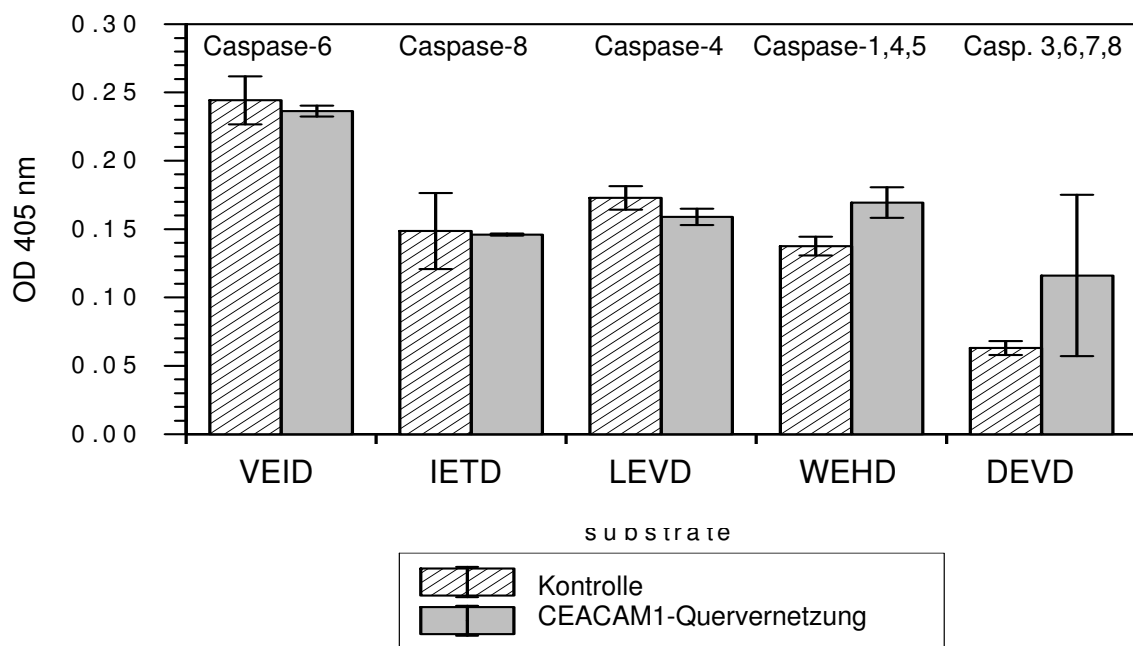


Abb. 52 Analyse der Aktivierung von Initiator Caspasen in Jurkat CEACAM1-4L unter Quervernetzung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche. Untersucht wurde die Aktivierung von Caspasen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Überlappung in der Spezifität der verwendeten Substrate ist oberhalb der Balken im Diagramm angegeben.

Ein nach gleichem Prinzip des Caspase-3 Aktivitätstests durchgeführter Assay mit Substraten der Initiatorcaspasen bestätigte die Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-3 bzw. -7 (Abb. 52). Alle anderen untersuchten Substrate zeigten keine gegenüber der Kontrolle erhöhten Werte. Das Ergebnis aus dem ursprünglichen Screeningansatz konnte somit bestätigt werden.

3.3.7 Fragmentierung von CEACAM1-4L

Für viele Proteine ist die Entstehung trunkierter Formen im Verlauf des Apoptosesignalweges durch Caspaseaktivität beschrieben worden. Durch die Abspaltung von Proteindomänen kann das Protein in seiner Wirkung modifiziert, inaktiviert oder auch aktiviert werden. Es wurde die Frage nach einer apoptose-assoziierten Prozessierung von CEACAM1-4L gestellt. Eine solche Prozessierung könnte einen ersten Hinweis auf mögliche Interaktionen von CEACAM1-4L während der Apoptose liefern.

Für diese Untersuchung wurden Jurkat CEACAM1-4L transfizierte Zellen mit verschiedenen Apoptosestimuli behandelt und Gesamtzelllysate hergestellt. Die Lysate wurde nachfolgend mit PNGaseF deglykosyliert, auf Tris-Tricin Gelen aufgetrennt und mit verschiedenen CEACAM1-detektierenden Antikörpern beprobt.

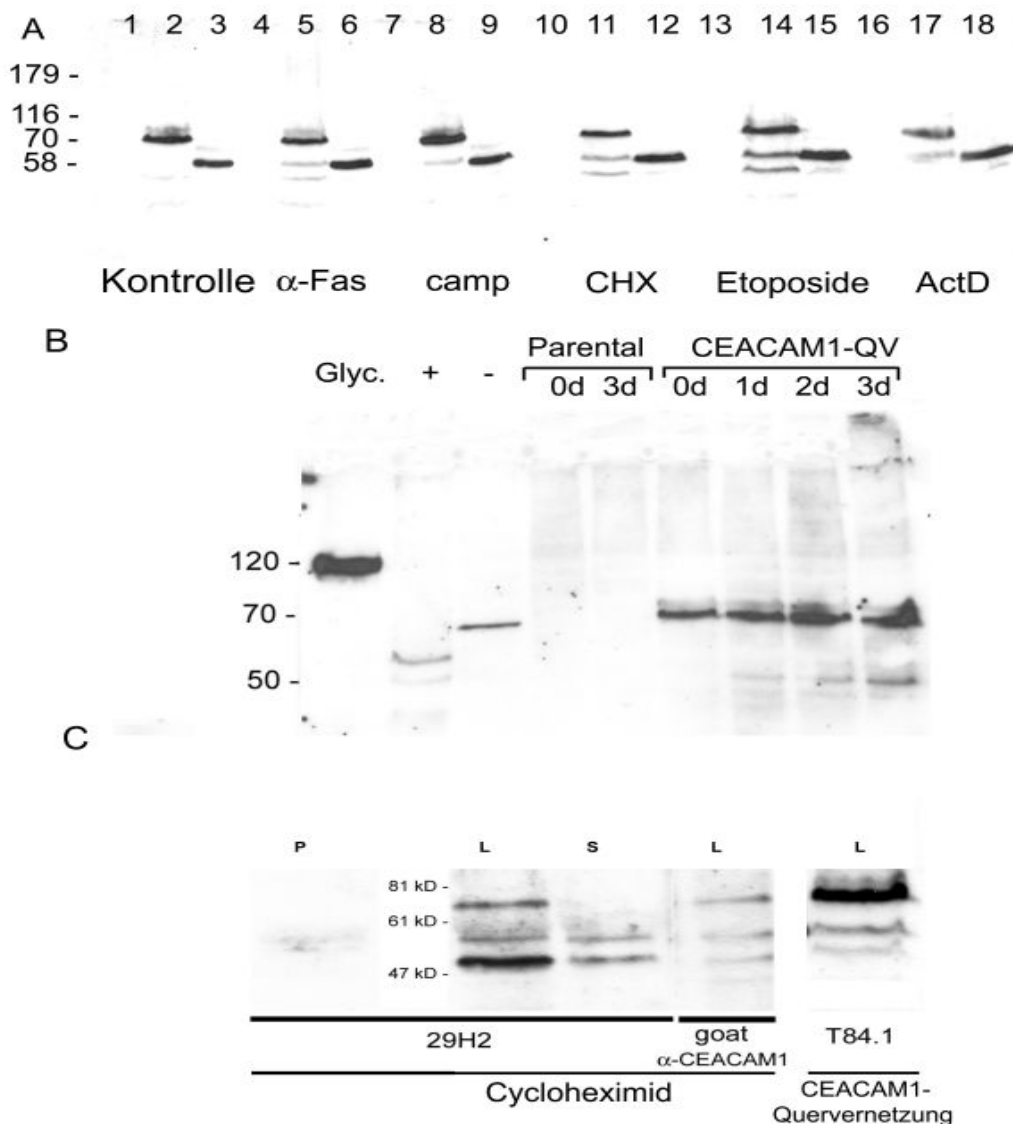


Abb. 53 Apoptose-assoziiertes Spaltungsmuster von CEACAM1-4L in PNGaseF behandelten Zelllysaten. A) In Jurkat CEACAM1-4L wurde Apoptose induziert durch die angegebenen Stimuli: Fas-Ligand, Camptothecin, Cycloheximid, Etoposid und Actinomycin D. A) Jurkat Parental (Spur 1, 4, 7, 10, 13, 16), CEACAM1-4L (Spur 2, 5, 8, 11, 14, 17) und CEACAM1-4S (Spur 3, 6, 9, 12, 15, 18) wurden parallel dem gleichen Stimulus ausgesetzt und nachfolgend auf dem Blot analysiert. Detektiert wurde mit T84.1 und anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase. Der Blot wurde mit ECL entwickelt. B) Analyse des Spaltungsmusters in CEACAM1-4L quervernetzter Apoptose. Jurkat-Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum induziert und nachfolgend analog zu den Lysaten des Blots in A) deglykosyliert. Der Blot wurde mit T84.1 beprobt. C) Lysate aus apoptotischen Jurkat CEACAM1-4L Zellen (L) und -CEACAM1-4S Zellen (S) bzw. Jurkat Parental Zellen (P) wurden mit dem CEACAM1-spezifischen Antikörper 29H2, einem CEACAM1-spezifischen polyklonalem Ziegenserum und T84.1 beprobt. Dauer der Apoptoseinduktion: 16 Stunden.

Die Western Blot Analysen (Abb. 53) zeigen eine spezifische Detektion von CEACAM1 auch in apoptotischen Zelllysaten, was durch die fehlenden Proteinbanden für das Jurkat Parental belegt

wird. Durch den Prozess der Apoptose entstehen demnach keine falsch positiven Banden bei Beprobung der Western Blots mit dem Antikörper T84.1. Das wäre durch die Generierung neuer Epitope infolge des proteolytischen Abbaus durchaus möglich und wurde im Fall des Cytokeratin 18 durch Einsatz des Antikörpers M30 bereits zum Nachweis von Apoptose genutzt.

In der Kontrolle stellt sich CEACAM1-4L nach Behandlung mit PNGaseF als ein Protein mit einer relativen Molmasse von 70 kD dar. Diese Molmasse ist höher, als auf Basis der Aminosäuresequenz zu erwarten gewesen wäre. CEACAM1-4S stellt sich als Bande von 55-60 kD dar. Nach Apoptoseinduktion tritt unabhängig vom verwendeten Stimulus eine weitere CEACAM1-Bande von 50 kD auf, bei der es sich um ein Spaltungsprodukt von CEACAM1 handelt. Diese Bande ist in CEACAM1-4L stärker ausgeprägt, als bei CEACAM1-4S (Abb. 53, A).

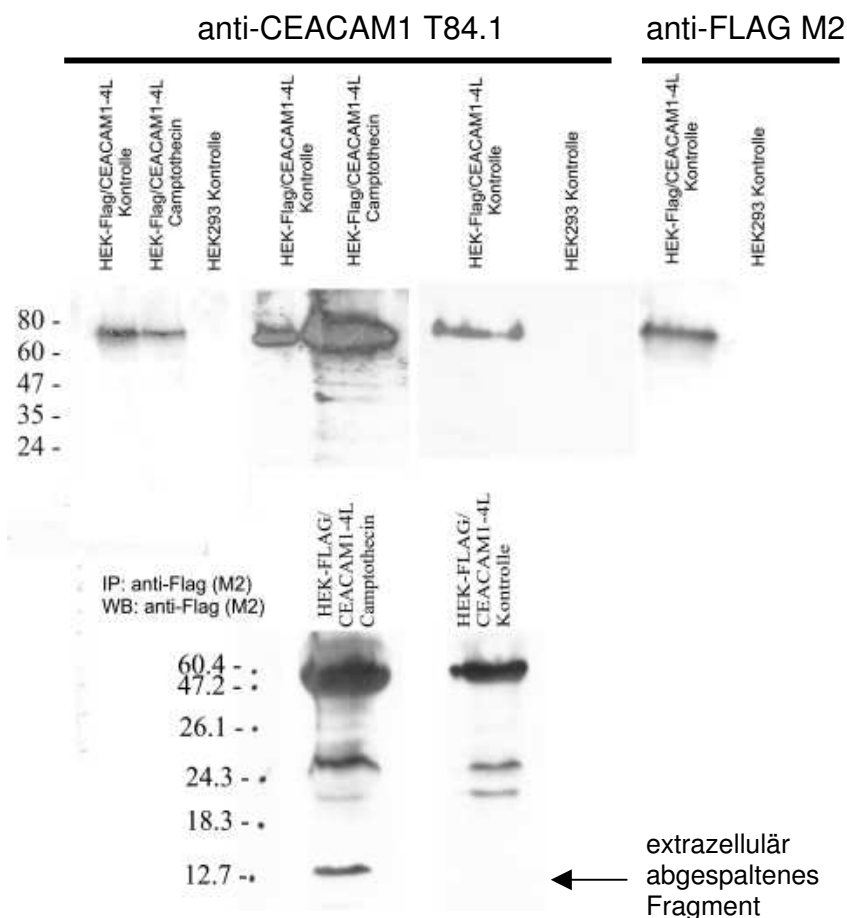


Abb. 54 Detektion der N-Terminal FLAG-markierten Fragmente von CEACAM1-4L in apoptotischen Zelllysaten. Obere Reihe: HEK Zellen wurden mit FLAG-markiertem CEACAM1-4L stabil transfiziert. Nach Induktion mit Camptothecin wurden Gesamtzelllysate hergestellt und CEACAM1-Banden im Western Blot mit T84.1 nachgewiesen. Untere Reihe: Das aus Zellkulturmedium von apoptotischen HEK-FLAG/CEACAM1-4L Zellen immunpräzipitierte, FLAG-markierte Fragment von CEACAM1, detektiert mit einem anti-FLAG Antikörper.

Auch durch CEACAM1-Quervernetzung wird CEACAM1 proteolytisch modifiziert. Es ist hier ausschließlich die 50 kD Bande zu erkennen (Abb. 53B). Eine zweite Beprobung des Western

Blots allein mit dem Sekundärantikörper zeigte keine Bande (hier nicht gezeigt), es ist daher auszuschließen, dass diese Bande durch den quervernetzenden Antikörper hervorgerufen wurde.

Eine Kontrolle mit weiteren CEACAM1-erkennenden Antikörpern bestätigte, dass es sich bei den detektierten Banden von 50 kD, 55-60 kD und 70 kD um CEACAM1 handelt (Abb. 53C). Unklarheit bestand nach diesen Ergebnissen noch darin, an welchem Terminus von CEACAM1 die zweite Spaltung erfolgt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde CEACAM1-4L N-Terminal mit einer FLAG-Sequenz markiert und in HEK Zellen stabil exprimiert. Nach Apoptoseinduktion wurden zelluläre Lysate ebenso wie das Kulturmedium der apoptotischen Zellen auf Spaltungsfragmente von CEACAM1 untersucht (Abb. 54).

Es konnte gezeigt werden, dass die zweite Spaltung extrazellulär innerhalb der N-Domäne erfolgen muss und dass sich das korrespondierende CEACAM1-Fragment aus Kulturüberständen über seine FLAG-Markierung immunpräzipitieren lässt.

3.3.8 CEACAM1 wird extra- und intrazellulär gespalten

Das unerwartete Ergebnis einer doppelten Spaltung im CEACAM1-Protein konnte *in vivo* durch Immunfluoreszenzfärbung der zytoplasmatischen Domäne mit dem für die lange Form der zytoplasmatischen Domäne spezifischen Antikörper 7-2.3 direkt in der Zelle gezeigt werden. Hierzu wurden HEK293-CEACAM1-4L mit Camptothecin stimuliert und nachfolgend mit dem Antikörper 7-2.3 und Hoechst Dye gefärbt (Abb. 55).

Die im Western Blot beobachtete Spaltung konnte auch *in vivo* in HEK293-CEACAM1-4L Zellen gezeigt werden. In apoptotischen Zellen wurde intrazellulär die zytoplasmatische Domäne gespalten, wodurch Aggregate des Spaltprodukts mit dem Antikörper im Zytoplasma nachzuweisen waren. In gesunden Zellen ist die Antikörperfärbung an der Zellmembran lokalisiert. (Abb. 55, A – C). Extrazellulär bewirkt die Induktion von Apoptose sowohl in mit CEACAM1-4L transfizierten Jurkat-Zellen, als auch in CEACAM1-4S exprimierenden Jurkat eine Verminderung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche.

Die extrazelluläre Spaltung tritt zudem auch in Kolonepithelzellen auf, was die Ergebnisse der in Abb. 55 E dargestellten FACS Analyse von CEACAM1 auf apoptotischen HT29 Zellen belegen. Unter Verwendung des CEACAM1-spezifischen Antikörpers 8G5 wurde nach 48 Stunden eine Verminderung der extrazellulären Expression von CEACAM1 um 24% festgestellt.

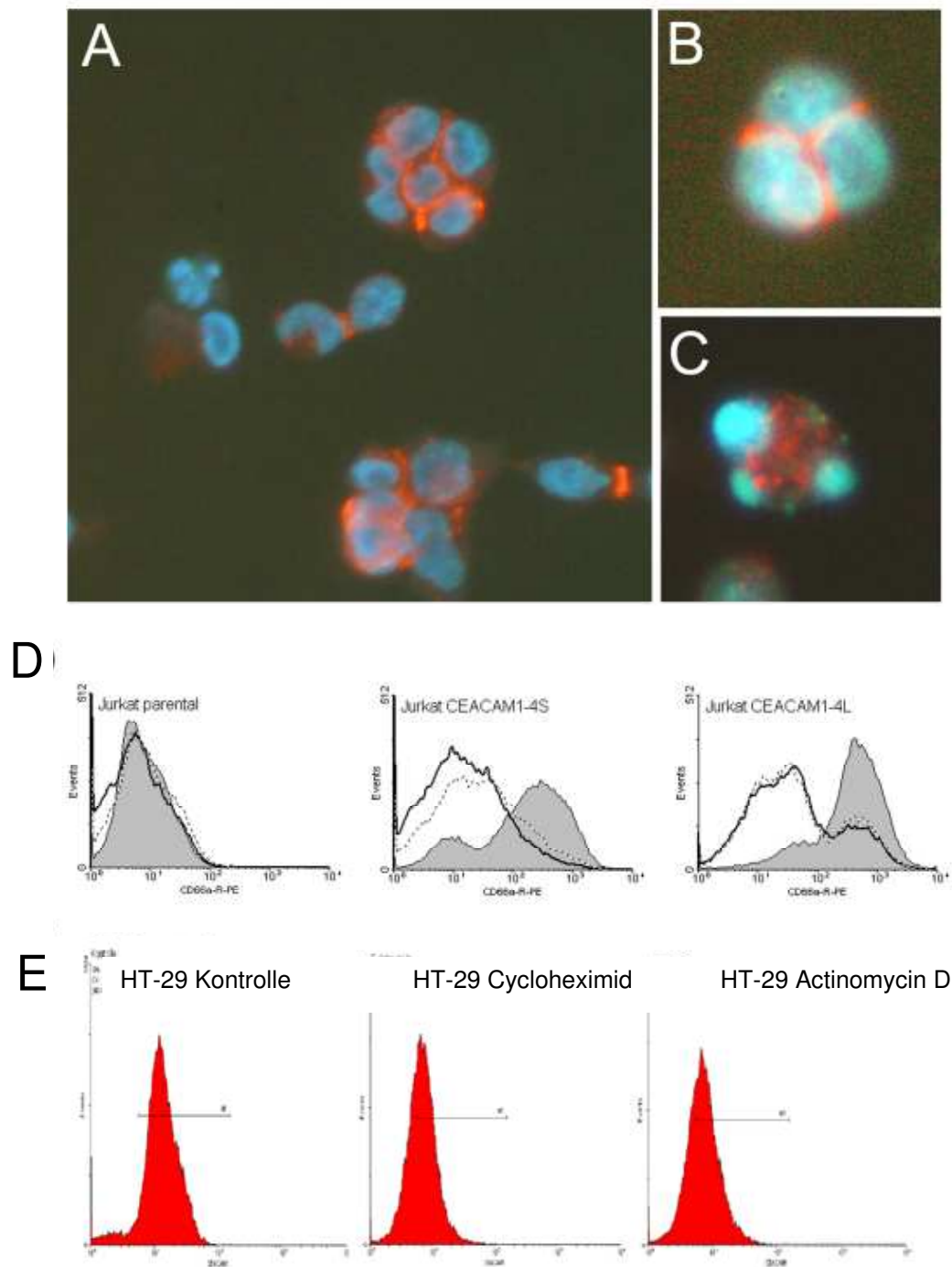


Abb. 55 Spaltung von CEACAM1 unter Apoptose. A - C) Immunfluoreszenznachweis der intrazellulären Spaltung der langen zytoplasmatischen Domäne unter Apoptose mit dem Antikörper 7-2.3. Zellkerne wurden mit Hoechst Dye zur Kontrolle des Zellzustandes angefärbt. In B) sind intakte Zellen mit einer membranständigen CEACAM1-4L Expression dargestellt, während in C) das Antikörpersignal im Zytoplasma lokalisiert ist. D) Nachweis der extrazellulären Spaltung in CEACAM1-4L auf der Oberfläche der angegebenen Jurkat Zelllinie bei Apoptoseinduktion mit Camptothecin. E) Extrazelluläre Spaltung von CEACAM1 auf der Oberfläche von HT29 Zellen in Cycloheximid oder Actinomycin D induzierten HT29 Zellen. Zur FACS Analyse wurde hierbei der CEACAM1-spezifische Antikörper 8G5 verwendet.

3.3.9 Proteaseaktivität in Jurkat Zelllysaten

Die zusätzlichen Bande im CEACAM1-Western Blot aus Zelllysaten apoptotischer Jurkat-Zellen führte zur Frage nach einer zusätzlichen Proteaseaktivität. Eine *in silico* Analyse der Proteinsequenz von CEACAM1 ergab hier eine Vielzahl von möglichen Spaltungstellen von zumeist wenig aussagekräftiger Spezifität.

Um das Feld der Proteasen etwas einzugrenzen, wurde in Jurkat CEACAM1-4L Zellen Apoptose induziert und die Zelllysate auf eine vorhandene und gegenüber der nicht induzierten Kontrolle erhöhte Proteaseaktivität getestet. Diese Aktivität wurde einzelnen Klassen zugeordnet. Für den Assay wurde den Lysaten neben einem universellen Protease-Substrat (Resorufin-markiertes Casein, Substrat für alle Proteaseklassen) Proteaseinhibitoren unterschiedlicher Spezifität zugesetzt.

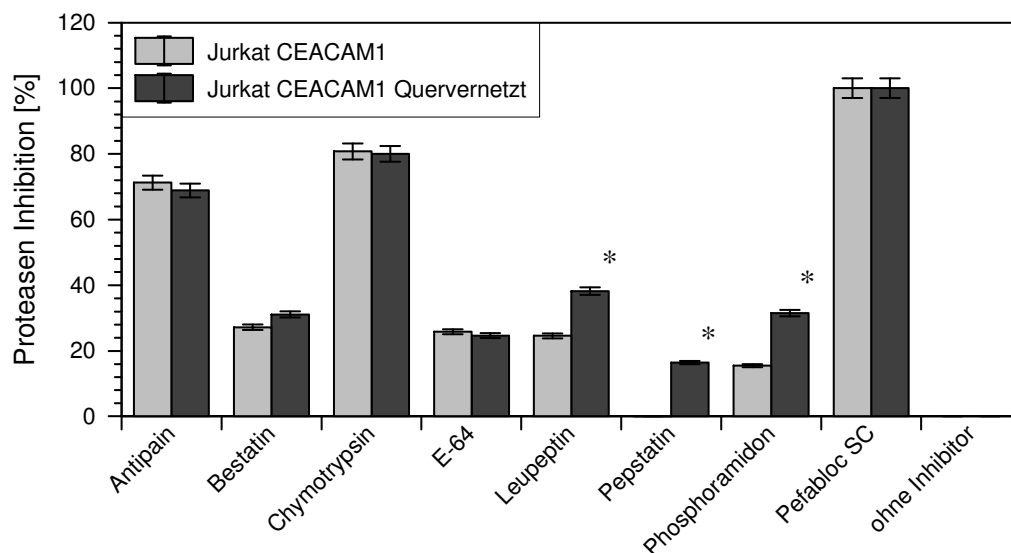


Abb. 56 Inhibition der proteolytische Aktivität in Zelllysaten durch Zusatz von Proteaseinhibitoren. Den Zelllysaten aus den in der Legende angegebenen Zelllinien wurden nach 24 Stunden Apoptoseinduktion die indizierten Proteaseinhibitoren zugesetzt. Aus den Werten für Pefabloc SC, einem universalen Proteaseinhibitor, der die Aktivität auf den Blindwert reduzierte und der Kontrolle ohne Inhibitorzusatz wurde die prozentuale Inhibition errechnet. Darstellung von Mittelwerten aus drei Bestimmungen. * Signifikanz der Unterschiede zwischen beiden Gruppen im zweiseitigen t-Test < 0,001.

Die Auswertung des Assays erfolgte am Plattenphotometer. Aus dem Ergebnis wurde die prozentuale Inhibition der Caseinspaltung berechnet. Der Zusatz eines Inhibitoren-Gemisches (Pefabloc SC) mit klassenübergreifender Wirksamkeit wurde als 100% Inhibition festgelegt, eine Kontrolle ohne Inhibitorzusatz entsprechend als 0% Inhibition.

Im Ergebnis zeigt der Assay, dass durch CEACAM1-Quervernetzung eine zusätzliche Aktivität von Matrixmetalloproteinasen, Leupeptin-inhibierbaren Serin-/ Cystein-Proteasen und von Pepstatin-inhibierbaren Aspartat-Proteasen auftrat.

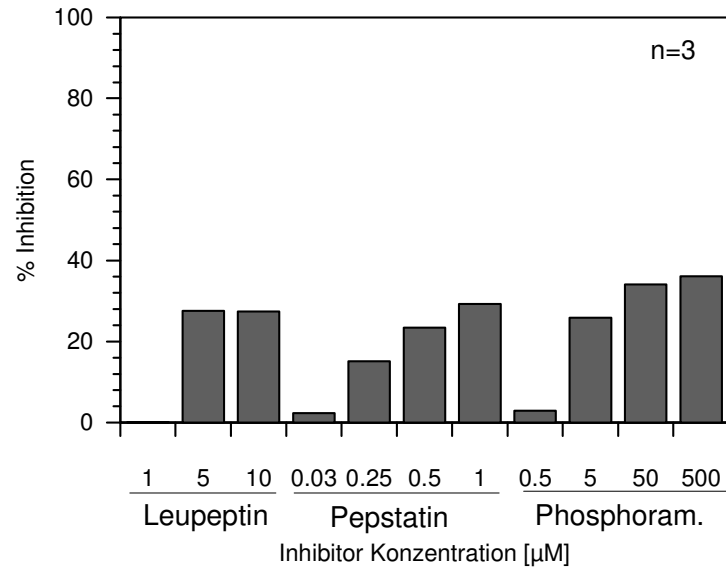


Abb. 57 Titrationsreihe der Proteaseinhibitoren mit inhibierender Wirkung auf die CEACAM1-induzierte Apoptose. Darstellung einer Versuchsdurchführung mit 3 Parallelen.

Die betreffenden drei Proteaseinhibitoren wurden in einer Titrationsreihe weiter untersucht. Hierzu wurde mit Jurkat-CEACAM1-4L Zellextrakten nach Apoptoseinduktion durch CEACAM1-Quervernetzung die Konzentrationsabhängigkeit des inhibierenden Effektes untersucht. Dabei erreichte Leupeptin bereits für vergleichsweise geringe Konzentrationen eine maximale Inhibition, während für Pepstatin keine maximale Inhibition festgestellt wurde. Für alle Inhibitoren bestand ein klarer Zusammenhang zwischen der prozentualen Inhibition und der eingesetzten Inhibitorenkonzentration (Abb. 57).

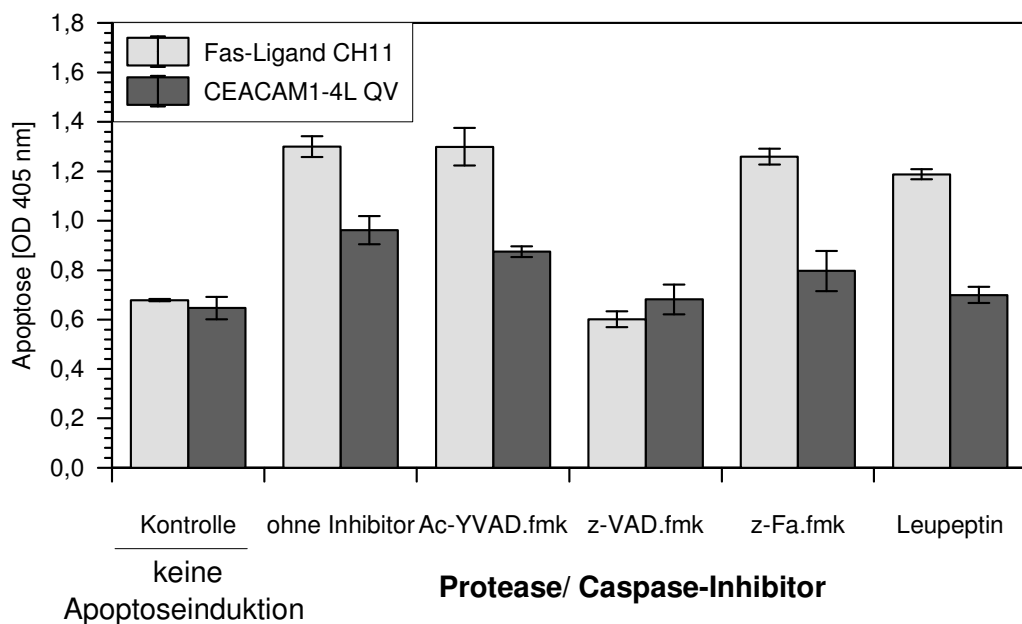


Abb. 58 Inhibition der Apoptose in Jurkat CEACAM1-4L Zellen durch Zusatz verschiedener Protease-/Caspase-Inhibitoren. Apoptose wurde durch Zugabe des Fas-Liganden oder über eine CEACAM1-4L Quervernetzung ausgelöst.

Aus den dargestellten Ergebnissen stellte sich direkt die Frage nach der Relevanz dieser Ergebnisse unter *in vivo* Bedingungen. Aus diesem Grund wurde der zellpermeable Inhibitor Leupeptin der Zellkultur direkt im Kulturmedium zugesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den unter 3.3.5 beschriebenen z-VAD Inhibitionsexperimenten. Parallel wurden auch Caspase-1 und pan-Caspaseinhibitoren im Versuch mitgeführt.

Inhibiert wurde die Apoptoseinduktion in diesem Ansatz sowohl durch den Zusatz von z-VAD.fmk als auch durch den Zusatz von Leupeptin, einem Cathepsin-Inhibitor. In geringerem Maße wirkte auch der Zusatz des zellpermeablen Caspase-1 Inhibitors Ac-YVAD.fmk inhibierend. Das hier verwendete Ac-YVAD.fmk ist im Gegensatz zu dem in den *in vitro* Assays verwendeten Ac-WEHD nicht nur zellpermeabel sondern auch Caspase-1 spezifisch. Beide Ergebnisse sind aufgrund der geringeren Affinität von Caspase-1 für die Sequenz YVAD in quantitativer Hinsicht nicht direkt zu vergleichen.

In einzelnen Experimenten weist auch z-FA.fmk immer wieder die Tendenz zu einer Inhibition der Apoptose auf, was sich bei der Mittelwertbildung durch den höchsten Fehlerbalken der Versuchsgruppe bemerkbar macht. Die Inhibition durch Ac-YVAD oder z-FA ist nach dem Wilcoxon Rangsummen Test nicht signifikant, mit einem $p < 0,10$. Im Gegensatz dazu ist die Inhibition durch z-VAD, Leupeptin oder Ac-YVAD signifikant auf dem Niveau $p < 0,05$. Da Leupeptin keine Caspasen inhibiert, aber dennoch die Apoptoseinduktion durch CEACAM1-Quervernetzung hemmen konnte, muss von einer Aktivierung einer nicht-Caspase Protease als erstem Schritt zwischen CEACAM1 und der im vorangehenden untersuchten Kaskade ausgegangen werden.

3.4 HT29 – Ein Modellsystem zur Untersuchung von CEACAM1

3.4.1 CEACAM1-Quervernetzung in HT29

Nachdem isoliert die Wirkung von CEACAM1-4L an humanen transfizierten Lymphozyten untersucht wurde, stellte sich die Frage nach der Fähigkeit von CEACAM1-4L, auch in Gegenwart der anderen CEACAM-Mitglieder und in einer Zelle mit natürlicher CEACAM1-Expression und -Regulation Apoptose zu induzieren.

Hierzu wurden humane HT29 Kolonkarzinomzellen mit einem CEACAM1-spezifischen Antikörper quervernetzt und die Apoptoserate im ELISA gemessen.

Bei normaler Expression von CEACAM1, wie sie in einer exponentiell wachsenden Kultur auftritt, ließ sich auf diesem Wege keine signifikant erhöhte Apoptoserate in HT29 Zellen ermitteln.

Ein zur Kontrolle mit Lysaten der quervernetzten Zellen durchgeführter Western Blot zeigte nur eine geringe CEACAM1-Expression, dem optischen Bild im Phasenkontrast nach waren die Zellen nur moderat differenziert.

Zur Steigerung der CEACAM1-Expression wurden die Zellen in Kulturmedium, versetzt entweder mit 500 U/mL Interferon- γ oder mit kurzkettigen Fettsäuren im Bereich von 1 – 100 mM, inkubiert (siehe 3.3, S.76).

Durch Zugabe von IFN- γ , einem an den Interferon- γ II Rezeptor bindenden Zytokin, dessen Signalwirkung über den Jak/STAT-Signalweg verläuft, wurde CEACAM1 um das 2-8fache heraufreguliert. Dieser Effekt tritt durch das im CEACAM1-Promotor enthaltene IRE (Interferon-Response Element) auf. Interferon- γ ist selber in der Lage, bei höheren Konzentrationen oder längeren Inkubationszeiten Apoptose auszulösen, weshalb zunächst der optimale, nicht apoptose-auslösende Wirkzeitraum für IFN- γ bzgl. der CEACAM1-Expression ermittelt wurde. Ein kontrollierender Apoptoseassay bestätigte, dass die Inkubation mit IFN- γ in einer Konzentration von 500 U/mL für Zeiträume von weniger als 12 Stunden keine Apoptose auslöst (Abb. 27). Diese experimentellen Bedingungen wurden hier in Verbindung mit einer CEACAM1-Quervernetzung eingesetzt.

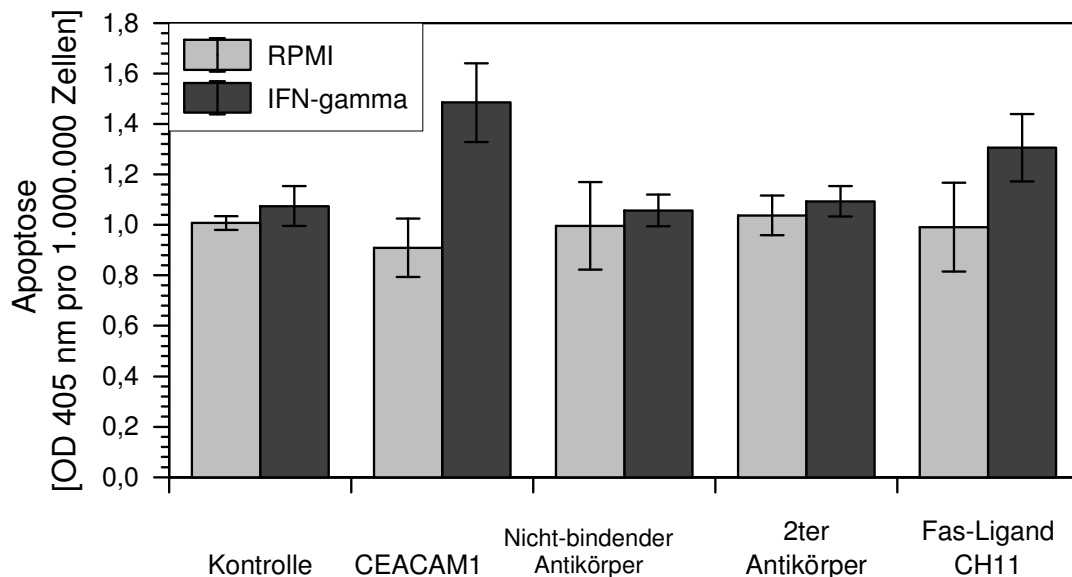


Abb. 59 Auswirkungen einer IFN- γ Stimulation auf HT29 auf die Apoptose. Die Stimulation von HT29 mit 500 U/mL über einen Zeitraum von 6 Stunden bewirkt eine Zunahme der Apoptosebereitschaft in HT29 Zellen. Die Apoptoserate wurde durch einen Cell Death Detection ELISA bestimmt.

Während in HT29 Zellen mit geringer CEACAM1 Expression durch eine Vernetzung auf der Zelloberfläche keine Apoptose induziert werden konnte, zeichneten sich die durch IFN- γ stimulierten und stark CEACAM1 exprimierenden Zellen durch eine Apoptoseinduzierbarkeit aus. In diesem Experiment zeigte sich auch die bereits bekannte, geringere Empfindlichkeit der HT29 Zellen gegenüber einer Apoptoseinduktion durch den Fas-Liganden.

3.4.2 Caspaseaktivierung in CEACAM1-quervernetzten HT29

Im Jurkat CEACAM1-4L Zellkultursystem konnten Caspase-1 und Caspase-3 als die Apoptose vermittelnden Caspasen identifiziert werden. Da diese Ergebnisse aus einem Lymphozytenmodell stammten, musste die Aktivierung der Caspasen in der Kolonzelllinie überprüft werden.

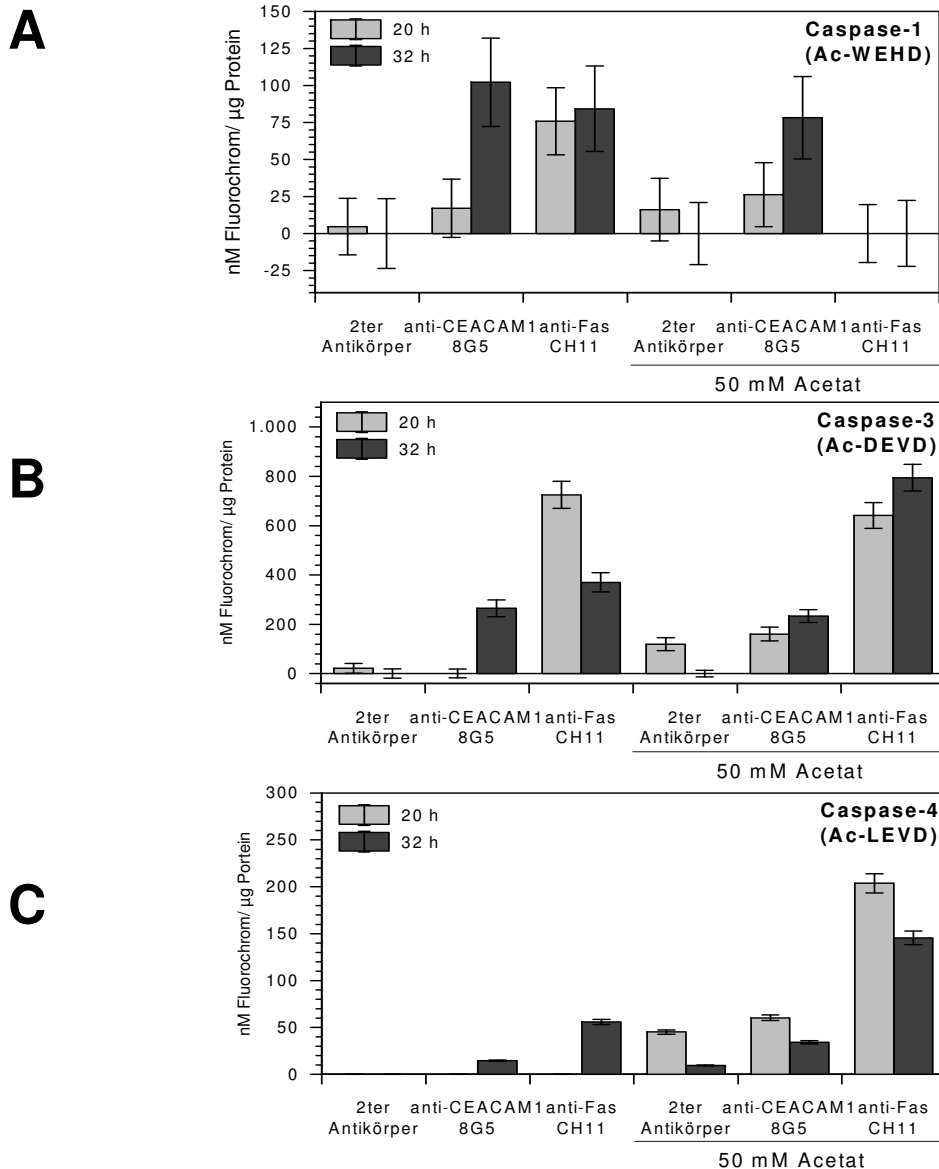


Abb. 60 Caspaseaktivierung in HT29 Zellen nach CEACAM1-Quervernetzung. In HT29 Kolonzenellen wurde durch Bindung des Fas-Liganden oder CEACAM1-Quervernetzung auf der Zelloberfläche Apoptose induziert und nach 20 bzw. 32 Stunden die Aktivierung der Caspasen 1, 3 und 4 bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Zelldifferenzierung und CEACAM1 Hochregulation in HT29 Zellen durch Acetat untersucht. A) Aktivierung von Caspase-1, nachgewiesen durch Spaltung des Substrates Ac-WEHD-AMC in Zelllysaten. Das Substrat wird von Caspase-1 und -4 gespalten, besitzt dabei eine höhere Affinität zu Caspase-1. B) Aktivierung von Caspase-3 durch Spaltung des Substrates Ac-DEVD-AMC. Das Substrat kann von einer Vielzahl von Caspasen, insbesondere von allen Effektorcaspasen gespalten werden und stellt somit eine Positivkontrolle für die erfolgreiche Induktion der Apoptose dar. C) Aktivierung von Caspase-4 durch *in vitro* Spaltung von Ac-LEVD-AFC.

In HT29 wurde CEACAM1 durch den spezifischen monoklonalen Antikörper 4D1/C2 bzw. 8G5 vernetzt, wobei keine Möglichkeit für eine Unterscheidung zwischen einzelnen Spleißvarianten auf der Zelloberfläche bestand. Parallel wurde der Fas-Rezeptor Signalweg als Positivkontrolle für die einzelnen Assays untersucht. Die Aktivierung der Caspasen-1 und -4 ist für den Fas-Rezeptor Signalweg beschrieben.

Zusätzlich wurden die Auswirkungen einer Vorbehandlung von HT29 Zellen mit der kurzkettigen Fettsäure Acetat in Bezug auf die Wirksamkeit einer CEACAM1-Quervernetzung und gegebenenfalls die Modulation der Caspaseaktivierung untersucht.

Das Ergebnis dieser Caspase-Assays (Abb. 60A - C) bestätigte die Aktivierung von Caspase-1 nach 32 Stunden in CEACAM1-quervernetzten Ansätzen, unabhängig von einer Acetatstimulation. Die Aktivierung des Fas-Rezeptor Signalweges löst ebenfalls eine Aktivierung von Caspase-1 aus, der Signalweg verläuft nach einer Acetat-Stimulation jedoch nicht über eine Casapse-1-Aktivierung. Caspase-3 wurde sowohl durch eine Fas-Ligand als auch durch CEACAM-Quervernetzung induzierte Apoptose aktiviert (Abb. 51).

Im Vergleich zum Fas-Signalweg ist die Aktivierung von Caspase-4 vergleichsweise gering, und tritt auch bei Inkubation mit dem vernetzenden Sekundärantikörper allein auf. Es kann sich hier also nicht um einen CEACAM1-spezifischen Effekt handeln. Insgesamt konnten die in Jurkat festgestellten Ergebnisse für die Beteiligung von Caspasen an einer CEACAM1-induzierten Apoptose bestätigt werden.

3.5 Identifikation eines natürlichen Liganden für CEACAM1

Beim Aufbau des HT29 Zellkultursystems wurde bisher gezeigt, dass die CEACAM1-Quervernetzung durch CEACAM-spezifische monoklonale Antikörper in diesen Kulturen Apoptose induziert. Das lies die Frage nach einem natürlichen Liganden für CEACAM1 offen.

Kandidaten für die Funktion sollten über folgende Eigenschaften verfügen: Bindungsfähigkeit an CEACAM1 (z.B. unterer Abschnitt der N-Domäne), eine ausreichende Bioverfügbarkeit und Expression in Geweben parallel zu CEACAM1 bzw. entsprechender Transport in diese Gewebe. Speziell für Kolongewebe sollte dieser Ligand zudem in seiner Bindung nicht durch mucinöse Substanzen beeinträchtigt werden.

Für diesen Liganden kommen verschiedene Substanzen in Betracht. Da bekannt ist, dass es eine Heterodimer-Bildung zwischen CEACAM1 und CEACAM5 gibt, lag hier die Vermutung nahe, dass es sich bei der in der Kolonmukosa gebildeten löslichen Form von CEACAM5 um einen Kandidaten für einen Liganden handelt.

Es konnte gezeigt werden, dass CEACAM5 auf der Oberfläche von CEACAM1-exprimierenden Zellen bindet (Abb. 61, B und C), und der Zusatz von CEACAM5 in Konzentrationen von 1 µg/mL bis herunter auf 50 ng/mL in HT29 Apoptose induziert.

Dabei legen die bisherigen Ergebnisse nahe, dass die Apoptoseinduktion durch CEACAM5 als CEACAM1-Liganden effizienter funktioniert als es mit allen verwendeten monoklonalen Antikörpern der Fall gewesen ist. Eine Gemeinsamkeit der beiden Systeme besteht zudem in ihrer Abhängigkeit von der exprimierten CEACAM1-Menge, was durch die Vergleiche zwischen acetat-behandelten HT29 Zellen mit höherer CEACAM1-Expression und normal CEACAM1 exprimierenden HT29 in Abb. 61 A deutlich wurde.

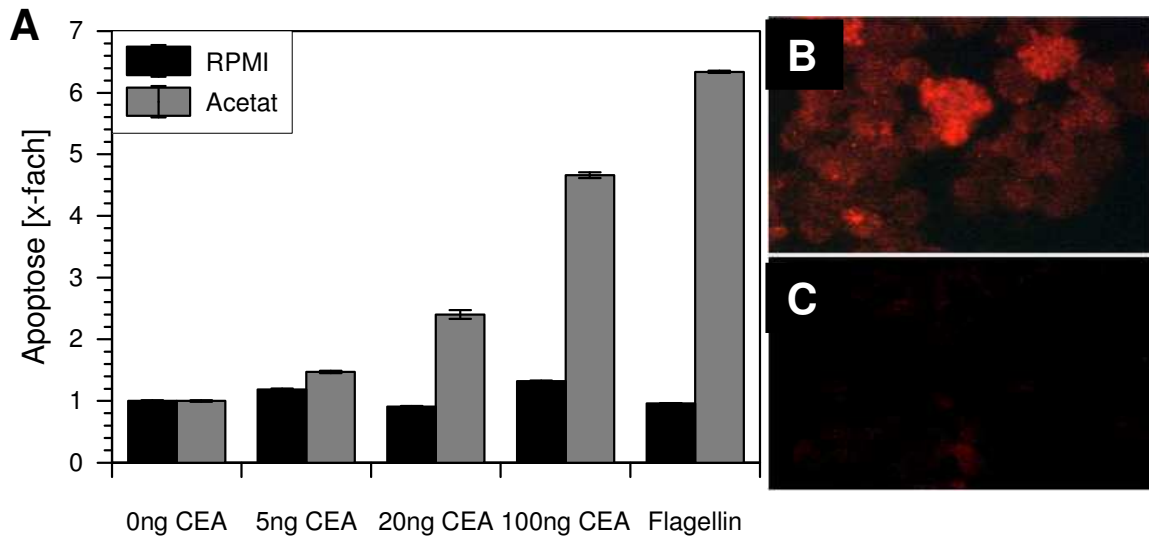


Abb. 61 Apoptoseinduktion in HT29 durch Bindung von CEACAM5 auf der Zelloberfläche. A) HT29 Zellen wurden im Zellkulturmedium unterschiedliche Konzentrationen des CEACAM5-Proteins zugesetzt und die Zellen weitere 3 Tage inkubiert. Apoptose wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA bestimmt und die x-fache Zunahme der Apoptose aus der mitgeführten Eichreihe bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchswiederholungen mit jeweils 3 Parallelen. B und C) Bindung von CEACAM5 auf der Zelloberfläche von Jurkat-Zellen. B) Jurkat CEACAM1-4L wurde mit CEACAM5 und nachfolgend mit dem anti-CEACAM5 Antikörper T84.66 sowie einem anti-Maus IgG-RPE Konjugat inkubiert. C) Jurkat Parental mit gleicher Nachweisprozedur wie in B).

Da CEACAM5 neben seiner durch einen GPI-Anker membrangebundenen Form auch in der löslichen Form vorkommen kann, eröffnet sich hier eine Möglichkeit für eine neue Funktion des CEACAM5 in Form eines CEACAM1-Liganden und Mediator der Apoptose-Suszeptibilität in differenzierten Kolonzellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst histochemische Untersuchungen zur Dysregulation von Mitgliedern der CEACAM-Familie im Kolongewebe durchgeführt. Ziel war hier die Feststellung des Zeitpunktes bzw. Stadiums, in dem Veränderungen in der CEACAM-Expression auftreten.

Die festgestellten Veränderungen sollten in einem zweiten Abschnitt auf zellulärer Ebene auf ihre funktionelle Bedeutung untersucht werden. Es sollte eine Hypothese erarbeitet werden, an welchen physiologischen Prozessen einzelne CEACAM-Mitglieder in Kolonzellen und so letztlich im Kolongewebe mitwirken. Durch diesen Ansatz sollte ein möglicher Beitrag von Mitgliedern der CEACAM-Familie zu Prozessen im Kolongewebe, die zur Entstehung von Vorläuferläsionen führen können, gezeigt werden.

4.1 Histochemische Untersuchung der CEACAM-Expression

In der normalen Kolonmukosa ist die Expression von CEACAM1 und CEACAM5 auf das obere Kryptendrittel begrenzt (Hammarström, 1999). Der höchste Expressionsgrad wird dabei auf den Zellen des Saumepithels beobachtet. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass CEACAM1 in Adenomen und Karzinomen verloren geht und dass dieser Verlust sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsniveau nachweisbar war (Neumaier *et al.*, 1993; Nollau *et al.*, 1997; Nollau *et al.*, 1997b).

In der vorliegenden Arbeit wurde für CEACAM1 und CEACAM5 im Normalgewebe das erwartete Expressionsmuster gefunden, zusätzlich konnte ein Expressionsverlust für CEACAM1 bereits für hyperplastische Veränderungen der Kolonmukosa (ACF, Polypen) festgestellt werden. Damit wurde die bestehende Aussage eines Defektes im Sinne einer Herabregulation der Expression von CEACAM1 in Adenomen bis auf früheste Veränderungen der Kolonmukosa zurückgeführt (Nittka *et al.*, 2004).

Bei den untersuchten ACF aus humanem Kolongewebe handelte sich bis auf eine Probe um hyperplastische ACF, was einem Anteil von 3,1% entspricht. Von Shpitz *et al.* (1998) wurde in einer Studie mit 42 ACF für dysplastische ACF ein Anteil von 29% gefunden, Takayama *et al.* (2001) dagegen fanden unter 3155 isolierten ACF einen Anteil von 5% dysplastischer ACF, Roncucci *et al.* (1998) identifizierten unter 135 ACF einen Anteil von 10% dysplastischen ACF. Das Auftreten dysplastischer ACF weist demnach eine hohe Dynamik auf, und der hier festgestellte Anteil von 3,1% ist mit den Ergebnissen der anderen Studien vereinbar.

Der histochemische Nachweis von CEACAM1 in 32 ACF und 42 hyperplastischen Polypen, von denen nur 3% bzw. 16% der Gewebeproben dysplastische Anteile aufwiesen, zeigte den frühen Verlust von CEACAM1 in 75% und 67% der Hyperplasien der Kolonmukosa auf Proteinebene (siehe Tab. 4, S. 63). Der Verlust von CEACAM1 steigt über Adenome und Karzinome

kontinuierlich an, was konsistent ist mit der Literaturlage für die Expression von CEACAM1 in Adenomen und Karzinomen (Neumaier *et al.*, 1993; Nollau *et al.*, 1997).

An den gleichen Geweben wurde auch die Expression von CEACAM5 untersucht. Zunächst konnte hier die Erwartung bestätigt werden, dass CEACAM5 im Gegensatz zu CEACAM1 nicht herunter reguliert wird, sondern eine Überexpression vorliegt. Während in den hyperplastischen Polypen der Anteil der Läsionen mit Überexpression vergleichbar mit dem Anteil der überexprimierenden Adenome und Karzinome war und bei etwa 80% lag, wurde für ACF nur in einem Anteil von etwa 50% eine CEACAM5 Überexpression festgestellt.

Nach derzeitigem Stand wird davon ausgegangen, dass in ACF die frühesten derzeit bekannten Veränderungen zu finden sind, aus denen sich unter noch nicht näher beschriebenen Bedingungen Tumore entwickeln könnten (Shpitz *et al.*, 1996; di Gregorio *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 2001). Das Modell von Kinzler und Vogelstein (1990), in dem sie das Adenom als früheste Stufe in der Tumorsequenz darstellen, kann also auf Ebene der Gewebedifferenzierung um ACF erweitert werden. Das „Vogelstein-Modell“ hat auch weiterhin Bestand, dennoch existiert mit dem CEACAM1-Expressionsverlust zumindest eine Veränderung, die eindeutig vor der Störung des APC/Wnt-Signalweges auftritt.

Takayama *et al.* (2001) konnten zeigen, dass APC-Defekte erst auf der Stufe der Adenome oder in Dysplasien gefunden werden und somit zeitlich nach dem Expressionsverlust von CEACAM1 auftreten. Auch von Yuan *et al.* (2001) wurde gezeigt, dass nur in 2,9% der von ihnen untersuchten ACF ein APC-Defekt nachweisbar war, wobei diese Gruppe nicht zwischen dysplastischen und hyperplastischen ACF unterschied. Das Vorliegen dieser Defekte in dysplastischen ACF ist daher nicht auszuschließen und wäre nach der beschriebenen Literaturlage zu erwarten. Daher bleibt der Expressionsverlust von CEACAM1 die konsistenteste Veränderung in frühen Läsionen der Kolonmukosa, die noch vor APC-Defekten auftritt.

Kontrovers ist dagegen die Position der hyperplastischen Polypen in dieser Abfolge von Gewebeveränderungen. Während einige Gruppen den hyperplastischen Polypen nicht in einer direkten Abfolge der spontanen Tumore sehen (Hawkins *et al.*, 2000; Ponz de Leon und di Gregorio, 2001), werden sie von anderen Gruppen zumindest nicht als separate Entitäten angesehen (Jass *et al.*, 2000; Jass, 2001; Leggett *et al.*, 2001; Kahn *et al.*, 2002).

Auf Basis des festgestellten, frühen Verlustes der CEACAM1-Expression in einem grossen Anteil der ACF, muß hier von einer typischen Veränderung in frühen Läsionen und möglichen Vorstufen für Dysplasien ausgegangen werden. Da dieser Verlust auch in hyperplastischen Polypen in vergleichbaren Anteilen auftritt, wäre hier eine Progression der ACF zu Adenomen über hyperplastische Polypen gut mit den histochemischen Ergebnissen vereinbar. Der Verlust der CEACAM1-Expression erfolgt dabei vor der Überexpression von CEACAM5. Die frühe Veränderung der untersuchten CEACAM-Mitglieder weist auf eine mögliche Beteiligung in der Progression vom Normalgewebe zur Hyperplasie hin.

Die Entstehung von Hyperplasien wird durch ein nicht reguliertes Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation erklärt, wobei es zunächst zu einer Verminderung der Apoptoserate kommt (Bedi *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1997). Um das Ausmaß dieser Störungen zu bestimmen, wurden mit Ki-67 und Cytokeratin-18 Neoepitop zwei Zellzyklus- bzw. apoptoseassoziierte Antigene histochemisch untersucht.

Ki-67 ist ein Marker, der in der S-Phase der Mitose deutlich ansteigt und sich teilende Zellen charakterisiert und somit proliferative Kompartimente im Gewebe definiert (Jaskiewicz *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde erst in Adenomen eine Zunahme der Proliferation festgestellt. Die Delokalisation der proliferierenden Zellen mit Verteilung entlang der Kryptenachse in obere Kryptenzonen trat erstmalig auf Stufe der Adenome auf.

Kotsinas *et al.* (2002) haben gezeigt, dass die Akkumulation von β -Catenin und das Auftreten von APC-Defekten mit der Zunahme der Proliferation im Gewebe korreliert. Eine Änderung der Proliferationsrate konnte in den hier untersuchten ACF und hyperplastischen Polypen nicht festgestellt werden (siehe 3.1.3, S.67). Auch hier sind die Ergebnisse der histochemischen Untersuchung gut mit den Ergebnissen anderer Gruppen vereinbar (Otori *et al.*, 1995; Renehan *et al.*, 2002).

Der Ausfall von Differenzierungsgenen (Prasad *et al.*, 1998), Onkogenen (Bishop, 1987) oder wachstumsregulierenden Genen (Hanahan *et al.*, 2000) wurde als mögliche Ursache für die Entstehung von Hyperplasien viel diskutiert. In den zugrunde liegenden Hypothesen hierzu bildet eine somatischen Mutation die Ausgangsbasis für die Tumorentstehung und das Auftreten weiterer Gendefekte führt zu Hyperplasie und malignen Veränderungen, wenn sie die Differenzierung einer proliferierenden Zelle behindern und zusätzlich eine Noxe auf das Gewebe einwirkt. Die Folge ist ein Auftreten weiterer Defekte, der Wegfall der Apoptose und die Akkumulation geschädigter Zellen im Gewebe (Bedi *et al.*, 1995; Schulte-Hermann *et al.*, 1995). Nach dieser Hypothese entspricht die hier festgestellte Dysregulation der CEACAMs einem dieser Defekte.

Für Tumore wurde der anti-apoptotische Einfluss von CEACAM5 gezeigt (Soeth *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2002). Von Soeth *et al.* (2001) konnte zudem gezeigt werden, dass eine Ursache für diesen apoptosehemmenden Einfluss auf einer Herunterregulation an Apoptose beteiligter Gene beruht. Zudem konnte die Überexpression von CEACAM5 auch konfluente Zellen vor der Apoptose bewahren, was z.B. Folge auch einer Störung in Zellkontakten sein könnte. Diese Hypothese lässt sich aus der Arbeit von Scheffrahn *et al.* (2005) ableiten, die zeigen konnten, dass eine Bindung monovalenter Antikörperfragmente gerichtet gegen CEACAM1 die von CEACAM1 ausgebildeten Zellkontakte stört und dadurch auch kontakthinhibierte Zellen wieder zu proliferieren beginnen. Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt dem Verlust von CEACAM1 in ACF und Hyperplasien eine stärkere Bedeutung.

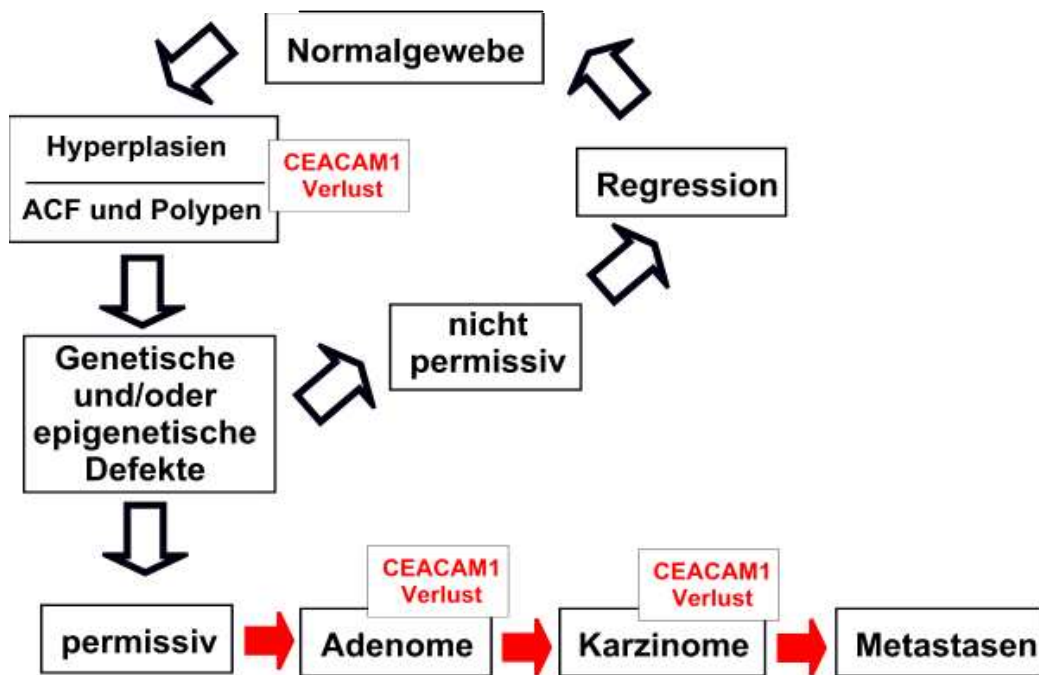


Abb. 62 Hypothetisches Karzinogenese-Modell, wie es aus den histochemischen Studien abgeleitet werden kann.

Die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in Normalgeweben mittels des monoklonalen Antikörpers M30 (Willingham *et al.*, 1999) ergab einen medianen Apoptoseanteil von 0,5% (siehe 3.1.3). Von Koike *et al* (1996) wurden weniger als 0,5% apoptotische Zellen nachgewiesen, bei Kikuchi *et al.* (1997) waren es 2,6% im Normalgewebe. Der hier für Normalgewebe festgestellte Anteil liegt in der gleichen Größenordnung. Umgerechnet auf die Kryptenstruktur der Kolonmukosa entspricht dies einer apoptotischen Zelle auf 3 bis 4 Krypten in einem Normalgewebe-Längsschnitt.

Zur Kontrolle der Verminderung der Apoptose in Hyperplasien wurde speziell in hyperplastischen Polypen Apoptose mit der TUNEL-Methode nachgewiesen. Hier wurde für alle untersuchten Polypen eine Verminderung der Anzahl der apoptotischen Zellen gegenüber dem im Schnitt enthaltenen Normalgewebeanteil festgestellt. Die Zahl der nachgewiesenen apoptotischen Zellen ist mit der TUNEL Methode generell höher als bei Nachweis durch den Antikörper M30 (Carr, 2000). Der Grund hierfür ist unter anderem die artifizielle Entstehung von DNA-Strangbrüchen bei der Herstellung von Gewebeschnitten (Chiu *et al.*, 2001).

Im direkten Vergleich treten auch bei Verwendung der TUNEL-Methode in hyperplastischen Polypen weniger Apoptoseereignisse auf, als im Normalgewebe. Damit wurde die Verringerung der Apoptoserate in hyperplastischen Polypen mit zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen. Es wurde zudem gezeigt, dass der Apoptose-Verlust in den gleichen Gewebeproben auftritt, in denen auch ein Verlust der CEACAM1-Expression festgestellt worden war. Die Korrelation zu diesem parallel verlaufenden Verlust war auf dem Niveau $p < 0,05$ signifikant (Nittka *et al.*, 2004).

Die Zahl der apoptotischen Zellen stieg erst in Adenomen und Karzinomen wieder an, und liegt in Karzinomen mit einer medianen Apoptoserate von 1,0% erstmalig über der Apoptoserate des Normalgewebes (Abb. 21).

Die verringerte Apoptoserate in Hyperplasien bei gleichzeitig unveränderter proliferativer Aktivität belegt, dass die Zellzyklus-Fehlsteuerung mit dem Ausbleiben des Zelltods beginnt. Aus dieser Beobachtung kann die Hypothese aufgestellt werden, dass dieser Verlust von Apoptose-Ereignissen eine direkte Folge der ersten aufgetretenen Defekte ist.

Eine Zunahme in der Proliferationsrate wurde in Adenomen und Karzinomen festgestellt. Diese Beobachtung entspricht der derzeitigen Ansicht, dass in Tumoren durch ungehinderte Proliferation defektbehafteter Zellen die korrekt regulierten Zellen in die Minderheit gedrängt werden (White und McCubrey, 2001). Der spätere Anstieg der Apoptoserate in diesen zugleich stark proliferierenden Zellen kann als indirekte Folge der im Tumor akkumulierenden Zellen mit schweren Defekten angesehen werden (Hao *et al.*, 1998). Dabei könnten Apoptoseprogramme aktiviert werden, die normalerweise nur unter direkter Gewebeschädigung/ DNA-Schädigung aktiviert würden was zu einem Anstieg in der Apoptoserate führen würde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die frühe Verminderung der Anzahl der apoptotischen Ereignisse eine der ersten festgestellten Störungen in der Steuerung des Zellturnovers darstellt. Diese Störung tritt bereits auf der Stufe benigner, d.h. gutartiger Veränderungen im Kolongewebe auf.

Aus dem rein korrelativen Ergebnis eines CEACAM1-Expressionsverlustes als früheste Veränderung ergab sich zusammen mit diesen Ergebnissen ein Ansatzpunkt für den Aufbau einer Hypothese zur funktionellen Bedeutung des CEACAM1-Verlustes mit der zentralen Frage nach einer möglichen Implikation von CEACAM1 in Apoptoseprozesse. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden Modellsysteme zur Untersuchung dieser zentralen Frage etabliert.

4.2 Untersuchung der physiologischen Funktion von CEACAM1

Zur Untersuchung eines möglichen kausalen Zusammenhanges zwischen der CEACAM1 Expression und der Apoptoserate der CEACAM1-exprimierenden Zellen, wurde ein zelluläres System benötigt, in welchem spezifisch die Funktion von CEACAM1-4L, die im Kolon überwiegenden Spleißvariante, untersucht werden konnte (Singer *et al.*, 2002). Dieses System musste der Apoptoseinduktion zugänglich sein, d.h. die zu verwendende Zelllinie sollte möglichst sensitiv auf verschiedenste apoptoseinduzierende Substanzen reagieren können und die gängigen Apoptoseassays sollten an diesem System anwendbar sein.

Da in den meisten epithelialen Zellen neben CEACAM1 auch andere Mitglieder der CEACAM Genfamilie (überwiegend CEACAM5 und CEACAM6) exprimiert werden (Schoelzel *et al.*, 2001) und diese untereinander Interagieren können (Watt *et al.*, 2001), sind epitheliale Tumor-Zelllinien für die ersten Untersuchungen der Ausgangshypothese ungeeignet. Die exklusive Expression eines

CEACAM-Mitgliedes ist unumgänglich zur Untersuchung seiner Funktion, aber in epithelialen Zellen nur schwer zu gewährleisten. Hinzu kommt die, gerade in Tumorzelllinien häufig anzutreffende, Insensitivität gegenüber Apoptosestimuli (Pietenpol *et al.*, 1996; O'Connell *et al.*, 2000).

Es wurden daher stabil CEACAM1-4L transfizierte humane Jurkat T-Lymphozyten verwendet, die in nicht-aktiviertem Zustand keine CEACAM-Expression zeigen. Jurkat Lymphozyten stellen ein häufig verwendetes System zur Untersuchung von Apoptosewegen dar und viele der Erkenntnisse über die rezeptorbasierte Apoptose wurden an vergleichbaren Systemen gewonnen (Boise *et al.*, 1997; Liossis *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1999; Engedal *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2001)

Das Jurkat-Zellkultursystem hat aufgrund der konstitutiven Expression von CEACAM1 unter Kontrolle eines β -Actin Promotors seine Limitierungen dort, wo die Regulation von CEACAM1 benötigt wird oder eine Interaktion von CEACAM1 mit den anderen im Kolon exprimierten CEACAM-Mitgliedern angesprochen wird.

Für diese Fragestellungen wurde als zweites System die Kolonzelllinie HT29 ausgewählt. Diese Zelllinie kommt den Verhältnissen im Kolon näher und ermöglicht zugleich auch eine Regulation der CEACAM1-Expression. Unstimuliert ist die CEACAM1-Expression von HT29 im Vergleich zur CEACAM5-Expression gering. Durch Zusatz von Interferon- γ (IFN- γ) konnte innerhalb von 6 Stunden ein Anstieg der CEACAM1-Expression bewirkt werden, was den von Takahashi *et al.* (1993) und Kantor *et al.* (1989) beschriebenen Effekten entspricht. Ein Vergleich der Expression vor und nach Stimulation mit IFN- γ zeigte auf Protein- und RNA-Ebene eine 5–7fache Zunahme des Proteins und eine 4–8fache Zunahme der CEACAM1-mRNA (siehe 3.3.1, S.76). Die Expression wird durch Bindung eines Transkriptionsfaktors an das im CEACAM1-Promotor enthaltene IFN γ -Response Element (IRE) bewirkt (Boehm *et al.*, 1997).

IFN- γ wird von T-Zellen, NK Zellen und B-Zellen gebildet (Romagnani, 1997; Schroder *et al.*, 2004). Seine Wirkung vermittelt es durch Bindung an den IFN γ -Rezeptor II, der auf nahezu allen Körperzellen exprimiert wird.

Bezüglich der zur Stimulation verwendeten IFN- γ Konzentrationen ist es fraglich, dass im Gewebe an der Kolonmukosa Konzentrationen erreicht werden, wie sie *in vitro* in der Zellkultur verwendet wurden. Die höchsten IFN- γ Konzentrationen würden bei inflammatorischen Prozessen erreicht (Romagnani *et al.*, 1997b; Monteleone *et al.*, 2002). Die Frage einer CEACAM1-Regulation bei Entzündungen liegt jedoch ausserhalb des Themas dieser Arbeit.

Für weiterführende Arbeiten wurde daher ein die physiologischen Verhältnisse im Kolon berücksichtigender Stimulus zur Regulation von CEACAM1 benötigt. Der zu verwendende Stimulus sollte *in vivo* gebildet werden und eine entsprechende Bioverfügbarkeit an der Kolonmukosa aufweisen.

Seine Wirkung sollte möglichst parallel zum Gradienten der CEACAM-Expression entlang der Krypte verlaufen, d.h. eine maximale Verfügbarkeit am Saumepithel der lumenwärtigen Mukosaoberfläche aufweisen. Der Stimulus sollte zudem über eine differenzierende Wirkung verfügen und selber eine geringe Toxizität für Kolonzellen aufweisen.

Der Überlegung nach kommen hier kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in Frage, die durch Fermentation in anaeroben Bereichen des Darmlumens gebildet werden und deren intraluminale Spiegel bekannt sind. Für eine ganze Reihe von Zelllinien ist ihre differenzierende Wirkung bekannt (Augenlicht *et al.*, 1995; Mariadason *et al.*, 2000a; Rudolph *et al.*, 2001).

Eine protektive Wirkung von SCFA wurde zudem am Ratten-Modell gezeigt. In diesem Modell verhinderte der Zusatz von SCFA die Entstehung von ACF (Poulsen *et al.*, 2002). Diese Betrachtungen zeigen das mögliche Potential der Wirkungen von SCFA auf die Epithelzellen der Kolonmukosa, ihr Einfluss auf die CEACAM-Expression und der dahinter stehende Mechanismus waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch mit Ausnahme von Studien zu CEACAM5 unbekannt (Mariadason *et al.*, 2000b).

4.3 Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf die CEACAM Expression

Die Untersuchung des Einflusses einer CEACAM1-Quervernetzung auf der Zelloberfläche von Kolonepithelzellen wurden an HT29 Zellen durchgeführt. In diesen Zellen konnte das Expressionsniveau durch Zusatz von Natriumsalzen der Fettsäuren Acetat (C2-Körper), Propionat (C3-Körper) oder Butyrat (C4-Körper) moduliert werden (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Im Ergebnis konnte die CEACAM1-induzierende Wirkung für CEACAM1 durch alle drei getesteten Fettsäuren gezeigt werden. Die dabei beobachtete Zunahme der Zelldifferenzierung und die Zunahme der Histon-Acetylierung entspricht dabei den bekannten Effekten (Emenaker *et al.*, 2001; Hinnebusch *et al.* 2002; Chen *et al.*, 2003)

In hohen Konzentrationen wurde dabei auch durch Fettsäuren Apoptose induziert, wobei für länger-kettige Fettsäuren die zur Zellschädigung benötigte Konzentration geringer war (siehe Abb. 32). Zusatz von 5 mM Butyrat zum Kulturmedium von HT29 führten bereits zu einer deutlichen Zellschädigung. Acetat stellte nach diesen Versuchen dagegen eine Fettsäure mit guter CEACAM1-Induktion ohne erkennbare Zellschädigungen in Zellkulturen dar.

Durch alle untersuchten Fettsäuren wurden neben der Expression von CEACAM1 auch die CEACAM5-Expression erhöht. Die Zunahme betrug hier jedoch nur das 1,2-5,2fache, während die Expressionssteigerung für CEACAM1 das 1,3-4,7fache Betrug. Der Einfluss der SCFA auf die Genexpression wird häufig über epigenetische Mechanismen, vornehmlich die Modifikation von Histonen, erzielt. Da die Gene für CEACAM1 und CEACAM5 beide in relativer Nähe zueinander auf Chromosom 19 lokalisiert sind, ist der Befund der unterschiedlichen Auswirkung einer Fettsäurestimulation zunächst überraschend. Die Ursache konnte mit den gewählten Methoden

experimentell nicht weiter aufgeklärt werden. Es ist denkbar, dass durch die Stimulation mit SCFA auch andere Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

4.3.1 Auswirkung der Fettsäuren auf die Promotoraktivität von CEACAM1

Nach Stimulation von HT29 und SW480 Zellen nahm die Synthese der CEACAM1-RNA zunächst erwartungsgemäß zu. Der RNA-Gehalt verringerte sich bei Zusatz höherer Fettsäurekonzentrationen, wie hier am Beispiel des Butyrats gezeigt, im Weiteren aber schnell auf einen deutlich unter dem RNA-Gehalt der Kontrollgruppe liegenden Gehalt (Abb. 33).

Dabei ist die basale CEACAM1-Expression vor Zusatz des Butyrat nicht von Bedeutung, wie die unterschiedlichen RNA-Ratios für HT29 und SW480 Kontrollansätze belegen.

Werden die Ergebnisse der Expressionsanalysen im Western Blot, die Quantifizierung aus der real-time quantitativen RT-PCR und des Promotorassays mit mit p3.2 Vektor zusammen geführt, zeigen die Ergebnisse deutlich, dass SCFA zwar einen CEACAM1-induzierenden Einfluss haben, in hohen Konzentrationen aber zu einer Verminderung der RNA-Synthese führen. Da die CEACAM1-Menge auf Proteinebene dennoch ansteigt, bietet hier eine zusätzliche Inhibition des Abbaus durch das Proteasom eine mögliche Erklärung.

Von Yin *et al.* (2001) wurde gezeigt, dass Butyrat den Proteinabbau durch das Proteasom inhibiert, wodurch es zu einer Akkumulation verschiedener Proteine in der Zelle kommt. CEACAM1 könnte nach den vorliegenden Ergebnissen eines dieser Proteine sein.

Eine möglicher Mechanismus, wie der Zusatz von SCFA die CEACAM-Expression induziert, kann aus den Effekten der SCFA auf die Struktur der Histone abgeleitet werden.

Histoncorepartikel werden durch Acetylierung der N-Termini in ihrer Struktur aufgelockert (Bottomley, 2004). Dadurch werden Chromatinbereiche der Transkription zugänglich gemacht, durch die modifizierten N-Termini der Histone können zudem Transkriptionsfaktor-Komplexe rekrutiert werden (Deckert *et al.* 2001; Yasui *et al.*, 2003). Da es sich hier um Versuche mit transienten Transfektionen handelte, ist nicht von einer Genomintegration der Vektoren auszugehen. Die CEACAM1-Promotorbereiche des Reporterkonstruktes sind daher zu Beginn für die Transkription in höchstem Maße verfügbar und die Transkriptionsaktivität des nicht-stimulierten Promotors bereits nahe des erreichbaren Maximums.

Bei höheren Fettsäurekonzentrationen sinkt die Transkriptionsaktivität, was aber bereits durch Analyse der RNA-Expressionsmengen gezeigt worden war (siehe 3.3.2).

4.4 Apoptoseinduktion durch Quervernetzung von CEACAM1

Korrelative Ergebnisse aus der histochemischen Untersuchung von Kolongewebe unterschiedlicher Differenzierungen zeigte einen frühen Verlust von CEACAM1 mit parallel auftretender Verminderung der Anzahl apoptotischer Ereignisse (siehe 3.3.3, S.86).

Die Vernetzung von CEACAM1-4L auf der Oberfläche von stabil CEACAM1-4L transfizierten humanen Jurkat Lymphozyten führte zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen. Dieser Effekt ist auf CEACAM1 zurückzuführen, da das entsprechende Parental bei Zusatz des CEACAM1-bindenden Antikörpers keine Zunahme in der Apoptoserate zeigte.

Der Verlauf der Apoptose kann durch mehrere mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Zelle verfolgt werden. Da sind zunächst das sogenannte „membrane blebbing“, die Fragmentierung der Zellkerne und zuletzt der Verlust der Zellmembranintegrität. Die zwei letztgenannten Merkmale wurden durch eine Fluoreszenz-Doppelfärbung nachgewiesen mit dem Ziel, den zeitlichen Verlauf der Apoptose charakterisieren zu können. Zum Vergleich wurde hier die durch den DNA-Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin ausgelöste Apoptose gewählt.

Im Verlauf der Apoptose kann durch mehrere mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Zelle verfolgt werden. Da ist zunächst das zunächst das sogenannte „membrane blebbing“, die Fragmentierung der Zellkerne und zuletzt der Verlust der Zellmembranintegrität. Die zwei letztgenannten Merkmale wurden durch eine Fluoreszenz-Doppelfärbung nachgewiesen mit dem Ziel, den zeitlichen Verlauf der Apoptose charakterisieren zu können. Zum Vergleich wurde hier die durch den DNA-Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin ausgelöste Apoptose gewählt.

Im Verlauf der durch Camptothecin induzierten Apoptose wurden zunächst Zellkerne fragmentiert, ohne die Integrität der Zellmembran zu beeinträchtigen. Die Zellmembran verlor innerhalb einer, im Vergleich zur Kernfragmentierung kurzen Zeitspanne, dann ebenfalls ihre Integrität und die Zellen gingen in das letzte Apoptosestadium über.

Die Geschwindigkeit, mit der der Membranintegritätsverlust verläuft, zeigte sich am prozentualen Anteil der Zellen, die sich in diesem Stadium befanden.

Dieser Anteil blieb mit 3–5% der Zellen sehr gering und ein im Vergleich zu den beiden anderen Stadien selten zu beobachtendes Ereignis darstellte. Der Anteil der Zellen mit fragmentierten Zellkernen und zerstörter Membran dagegen stieg linear an, da die Zellen in der Kultur akkumulieren.

Dieses System zur Analyse apoptotischer Zellen wurde verwendet, um die wirksamste Quervernetzungsmethode für CEACAM1 auf der Zelloberfläche zu ermitteln.

Die wirksamste Quervernetzung ist eine Kombination aus einem biotinylierten anti-CEACAM1 Antikörper und Streptavidin. Die Zahl der lebenden Zellen sank in diesem System innerhalb der ersten 30 Stunden um 18% ab. Für eine Kombination aus primärem Antikörper und anti-Maus IgG sank der Anteil der lebenden Zellen dagegen nur um 8% (Abb. 39 und Abb. 40).

Die bessere Wirksamkeit des biotinylierten Systems erklärt sich aus der Anzahl der Bindungsstellen, die für das vernetzende Reagenz zur Verfügung stehen. Bei einem IgG-Molekül sind es zwei Bindungsstellen, Streptavidin kann dagegen vier Biotinmoleküle binden (González *et al.* 1997).

Das lässt direkt darauf schließen, dass eine polyvalente Vernetzung zwingende Voraussetzung für eine Apoptoseinduktion über CEACAM1 ist.

Dieses Ergebnis wurde indirekt durch die Arbeit von Scheffrahn *et al.* (2005) unterstützt, die zeigen konnten, dass monovalente Fab-Fragmente in CEACAM1-exprimierenden Zellen keine Apoptose induzieren und unter bestimmten experimentellen Umständen stattdessen zu einer vermehrten DNA-Synthese führen.

Im Rahmen der Vorversuche mit Jurkat-Zellen wurde zudem gezeigt, dass nicht alle anti-CEACAM1 Antikörper in gleichem Maße Apoptose induzieren. Antikörper, bei denen die Immunisierung ursprünglich gegen das CEACAM1-Gesamt-molekül stattgefunden hatte (Klone 8G5 und Kat4c) sind dabei tendenziell weniger wirksam.

Ebenfalls eindeutig ist das unterschiedliche Ausmaß der Quervernetzungs-Wirkung bei Vergleich der Antikörper 4D1/C2 mit T84.1. Letzterer ist in seiner Wirksamkeit deutlich schwächer. Beide Antikörper erkennen Epitope in unterschiedlichen Domänen von CEACAM1. Bei 4D1/C2 wird von einer Bindung in der A2-Domäne ausgegangen. Das Epitop-Mapping für T84.1 zeigt dessen Bindung im Bereich der N-Domäne mit Übergang in die erste A1-Domäne (Watt *et al.* 2001). Das deutet auf eine Bedeutung des durch den Antikörper gebundenen Epitopes für die Induktion der Apoptose hin.

Dennoch ist der Inkubationszeitraum für Zellen mit durch CEACAM1-4L- Quervernetzung induzierter Apoptose mit 3–4 Tagen bis zur Auswertung durch übliche Apoptoseassays (z.B. Cell Death Detecton ELISA, SubG1-Bestimmung am FACS) sehr lang. Das entspricht nicht den Erwartungen für einen Apoptoseauslöser.

Dieser Effekt ist aber für zellzyklusabhängige Apoptosestimuli bekannt. Ein Beispiel ist c-myc, ein Onkogen, das als einer der Regulatoren des G1-Arrests mit Kontrolle des Wachstumsarrests beschrieben worden ist (King und Cidlowsky, 1998). In Zellen, die im G1-Arrest ohne das erforderliche Wachstumsfaktor-Repertoire dennoch in die S-Phase gehen löst c-myc Apoptose aus (Evan *et al.*, 1992; Vaux und Strasser, 1996). Für ein differenzierungsabhängig exprimiertes Antigen wäre eine Kopplung der Apoptoseinduktion mit dem Zellzyklus sinnvoll.

4.5 Apoptoseinduktion durch eine CEACAM1-Quervernetzung

Prinzipiell kann Apoptose auf zwei Wegen induziert werden. Der erste Weg wird als extrinsischer Weg bezeichnet und verläuft über einen Liganden, der an einen membranständigen, sogenannten Todesrezeptor bindet. Bekanntes Beispiel ist die Fas-Rezeptor induzierte Apoptose (Algeciras-

Schimnich *et al.*, 2002; Peter und Krammer, 2003). Der zweite Weg wird als intrinsischer Weg bezeichnet und durch Mitochondrienschädigung oder oxidativen Stress vermittelt (Hacki *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003).

Der Einfluss einer CEACAM1-4L Quervernetzung auf Apoptoseprozesse wurde mit drei verschiedenen Methoden gezeigt, um eine sichere Abgrenzung gegen Nekrose zu gewährleisten. Die Färbung mit Propidiumjodid ermöglichte die genaue Analyse der Zellmorphologie, insbesondere der Morphologie des Zellkerns. Die Detektion freier Nukleosomen stellte eine sichere Bestimmung der DNA-Fragmentierung dar. Zuletzt wurde mit dem Nachweis der DNA-Leiter eindeutig das Vorliegen eines Apoptoseprozesses bewiesen.

Da Apoptosewege keine Zelltypspezifität zeigen und somit kein direktes Ausschlussprinzip besteht, ist eine Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien ebenso erforderlich wie ein Screening nach der Aktivierung einzelner Caspasen.

Inzwischen ist bekannt, dass in den meisten Apoptosewegen eine Beteiligung der Mitochondrien vorliegt. Was sich unterscheidet, ist der Zeitpunkt, zu dem Mitochondrien involviert werden. Verläuft ein Signalweg primär über den intrinsischen Weg, kommt es früh zu einer Ausbildung der Transitions-Poren in der Plasmamembran und einer Cytochrom c-Freisetzung. Damit beginnt die Kaskade der Enzymaktivierungen: die Ausbildung des Apoptosoms aus Bcl-2, Cytochrom c und Caspase-9 (Calviello *et al.*, 2003) führt zur nachfolgenden Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7. Dieser Prozess ist häufig von einer Abnahme des Mitochondrienpotentials begleitet.

Sind Mitochondrien spät im Prozess involviert, kommt es erst nach Aktivierung der Initiatorcaspasen zu einer Freisetzung von Cytochrom c. Für CEACAM1-4L-vernetzte Apoptose trat in den ersten 48 Stunden keine Cytochrom c-Freisetzung auf, eine Aktivierung von Caspase-9 konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Da es auch zu keiner Verminderung des Mitochondrienpotentials kommt, handelt es sich hier nicht um eine stress-induzierte Apoptoseform.

Durch CEACAM1-Vernetzung werden Caspase-1 und Caspase-3 aktiviert. Letztere gehört zu den Effektorcaspasen und ist mit verantwortlich für die beobachtete Zellkernfragmentierung. Ihr Aktivierung war daher erwartet worden und stellte zugleich eine Positivkontrolle für das Caspasescreening dar.

Die Aktivierung der Caspase-1 dagegen stellte zunächst eine Überraschung dar. Diese Cystein-Protease war ursprünglich aufgrund seiner Beteiligung an der Interleukin-1 Aktivierung beschrieben worden (Thornberry *et al.* 1992). Dadurch wurde Caspase-1 zusammen mit Caspase-4 und Caspase-5 zur Gruppe der an inflammatorischen Prozessen beteiligten Caspasen gezählt.

Inzwischen ist bekannt, dass Caspase-1 bestandteil einer regulären Caspase-Kaskade sein kann (Miossec *et al.* 1997, Hilbi *et al.* 1998; Liu *et al.* 2003; Gupta *et al.* 2001)). Die Aktivierung von Caspase-1 durch Fas-Ligand induzierte Apoptose in T-Zellen wurde von Darmon *et al.* (1996)

sowie von Chow *et al.* (1999) beschrieben. Die Aktivierung von Caspase-1 stellt hier eine Möglichkeit zur Amplifikation der Kaskade dar.

Aus den Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass Caspase-1 die proteolytische Aktivierung Caspase-3 bewirkte. Dies ist aus dem zeitlichen Aufeinanderfolgen des Auftretens der einzelnen Caspase-Aktivitäten zu schließen.

Unklar ist, wodurch Caspase-1 aktiviert wurde. Neben der Bindung von Adaptormolekülen wie dem ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, Guan *et al.*, 2003) kommt hier auch eine Aktivierung durch weitere Proteasen in Betracht.

Die Beteiligung sogenannter „nicht-Caspase“ Proteasen ist von mehreren Autoren beschrieben worden (Johnson 2000). Zu diesen Proteasen zählen μ -Calpain und m-Calpain, deren Expression ubiquitär in der Zelle vorkommt und die zu ihrer Aktivierung Ca^{2+} benötigen.

Calpaine können durch Calpastatin und, weniger spezifisch, durch Leupeptin und E-64 gehemmt werden. Calpaine aktivieren Caspase-3 und Caspase-9. Da eine Caspase-9 Aktivität nicht festgestellt werden konnte, scheint eine Aktivierung durch Calpaine unwahrscheinlich.

Eine zweite Gruppe stellen die Cathepsine dar. Es sind lysosomale Proteine, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: Cathepsin A und G als Serin-Proteasen, Cathepsin B, C, H, K, S, und T als Cystein Proteasen sowie Cathepsin D und E als Aspartat Proteasen (Johnson 2003).

Dabei stellen Cathepsin B und D die im Bezug auf Apoptose bisher am besten untersuchten Beispiele dar.

Für beide Cathepsine ist beschrieben, dass sie durch Apoptoseinduktion in das Zytoplasma translozieren, ein essentieller Vorgang, da die gesamte Kaskade im Zytoplasma abläuft (Vancompernelle *et al.*, 1998). Cathepsin D ist durch Pepstatin A inhibierbar (Roberts *et al.*, 1997; Roberts *et al.* 1999) und kann in seiner aktiven Form Cathepsin B aktivieren.

Für Caspase-1 ist eine Aktivierung durch Cathepsin B beschrieben worden (Vancompernelle *et al.*, 1998). Es ist durch Leupeptin inhibierbar.

Aus der Proteaseaktivitätsbestimmung geht hervor, dass hier möglicherweise eine Aktivierung von Cathepsinen vorliegt, da eine durch Leupeptin und Pepstatin inhibierbare Proteaseaktivität spezifisch unter CECAM1-Quervernetzung auftritt (siehe 3.3.9). Die Inhibition funktioniert zudem unter *in vivo* Bedingungen, denn ein Zusatz von Leupeptin zum Kulturmedium konnte die Apoptoseinduktion inhibieren. Pepstatin konnte nicht direkt in Zellkulturen eingesetzt werden.

Dennoch wurden offensichtlich auch noch weitere Proteasen (vor allem Matrixmetalloproteinasen, inhibierbar durch Phosphoramidon) aktiviert, deren Identität unbekannt ist.

4.6 Spaltung von CEACAM1 unter Apoptose

CEACAM1 ist selber Substrat für die Spaltung durch Caspae-3 (Houde *et al.*, 2003). Die Spaltungsstelle liegt in der langen cytoplasmatischen Domäne und generiert aus einer CEACAM1-4L eine CEACAM1-4S Form.

Bei der Untersuchung der CEACAM1-Spaltung in deglykosylierten Gesamtzellextrakten unter apoptotischen Bedingungen wurde eine weitere Spaltung von CEACAM1 nachgewiesen. Diese Spaltung tritt unabhängig vom Apoptosestimulus auf und führt zu Produkten der Grösse 70 kD, 55 - 60 kD und 50 kD. Durch CEACAM1-Quervernetzung wird nach 24 Stunden nur noch eine Bande von 50 kD generiert, bei der es sich nicht um die Bande des vernetzenden Antikörpers handelte (siehe Abb. 53 und Abb. 55).

Das Auftreten der Spaltung wurde auch *in vivo* untersucht. Der Immunfluoreszenznachweis der gespaltenen cytoplasmatischen Domäne durch den an die zytoplasmatische Domäne bindenden Antikörper 7-2.3 zeigte eine Translokation des Fragmentes der langen zytoplasmatischen Domäne in das Zytoplasma der apoptotischen Zelle. Der Nachweis der Expression auf der Zelloberfläche erfolgte durch eine FACS Analyse, in der ein an die N-Domäne von CEACAM1 bindender Antikörper verwendet wurde. Das Ergebnis zeigte deutlich die Verminderung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche unter dem Einfluss von Apoptose. Es wurde ausserdem festgestellt, dass die zweite Spaltung sowohl in CEACAM1-4L als auch in CEACAM1-4S auftritt.

Die Ergebnisse der Western Blots und der FACS Analyse sprechen dafür, dass die zweite Spaltung extrazellulär erfolgt. Das würde auch erklären, weshalb ein gegen die transmembrane Domäne von CEACAM1 gerichteter Antikörper das 50 kD Fragment, welches beide Spaltungen aufweist, besser erkennt, als ein gegen die N-Domäne gerichteter Klon.

Das extrazellulär abgespaltene Protein hat eine Grösse von etwa 5 – 10 kD. Damit ist es in Western Blots nur sehr schwer nachzuweisen. Ein solcher Versuch wurde mit Aceton gefällten Kulturmedien von apoptoseinduzierten Jurkat CEACAM1 Zellen unternommen. Im Blot konnte eine Bande unter 10 kD mit einem gegen die N-Domäne von CEACAM1 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden, was die extrazelluläre Spaltung zu bestätigen schien.

Um diese Interpretation zu belegen, wurde CEACAM1-4L extrazelluläre mit einem FLAG-Epitop markiert und stabil in HEK293 Zellen exprimiert. In den Zellen wurde nachfolgend Apoptose induziert. Infolge der Spaltung wird N-Terminal ein extrazellulärer Abschnitt von CEACAM1-4L in das Zellkulturmedium freigesetzt (siehe Abb. 54).

Dieses Fragment konnte aus dem Kulturmedium über das FLAG-Epitop immunopräzipitiert und im Western Blot ein FLAG-markiertes Fragment der Grösse 7-8 kD nachgewiesen werden. Damit konnte die zweite Spaltung eindeutig extrazellulär im Bereich der N-Domäne zugeordnet werden. Die Folge einer solchen Spaltung kann in einer Veränderung der Adhäsionseigenschaften von CEACAM1 bestehen oder sich allgemein in einer Auflösung von Zellkontakten auswirken. An apoptotischen Zellen kann oft beobachtet werden, dass sie sich aus Gewebe- und Zellverbänden zu lösen vermögen.

Die intrazelluläre Spaltung hat zur Folge, dass Phosphorylierungssignale, wie sie über das ITIM-Motif der langen zytoplasmatischen Domäne vermittelt werden, nicht mehr möglich sind. D.h. die

Spaltung durch Caspase-3 schaltet hier eine mögliche Funktion von CEACAM1 durch Abspaltung der zugehörigen Signalsequenz ab.

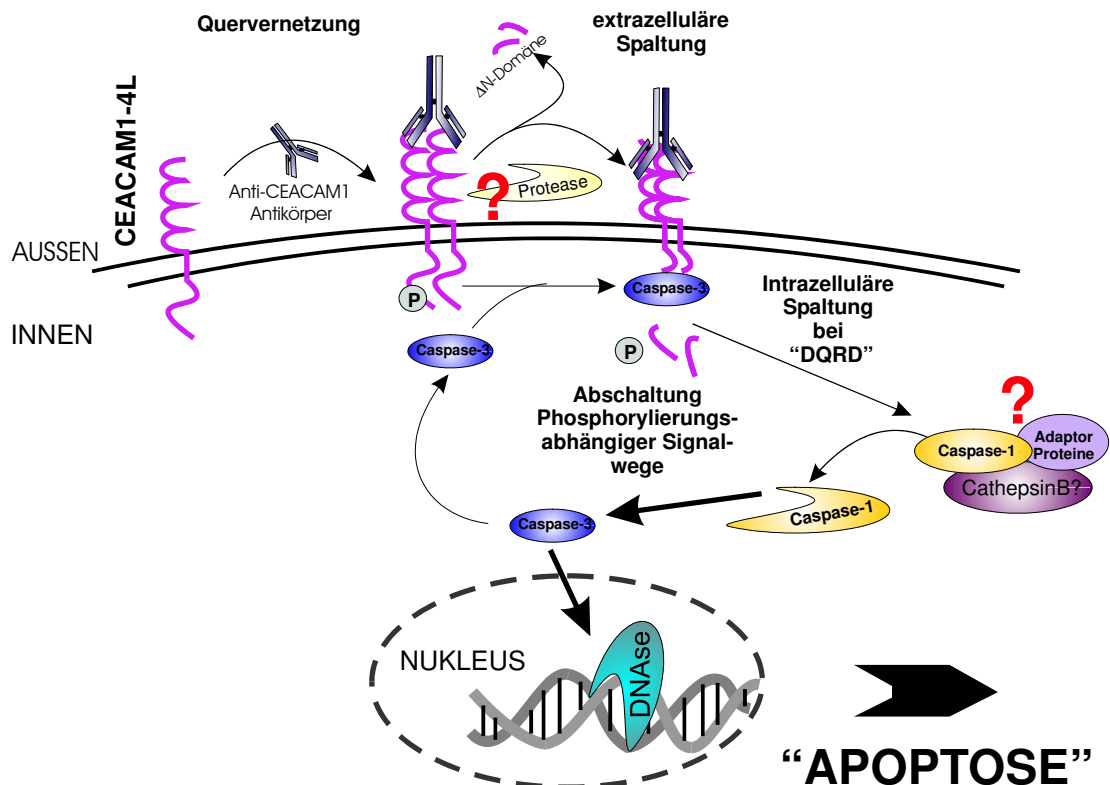


Abb. 63 Hypothetischer Signalweg bei extrazellulärer Bindung von Antikörpern oder CEACAM5 Protein an CEACAM1-4L auf der Zelloberfläche.

4.7 Identifikation eines natürlichen Liganden für CEACAM1

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Expression von CEACAM1 und CEACAM5 in verschiedenen Läsionen der humanen Kolonmukosa untersucht. Im Ergebnis wird CEACAM1 bereits in frühesten hyperplastischen Veränderungen der Kolonmukosa herab reguliert, wobei der Anteil des CEACAM1-Verlustes kontinuierlich bis zum Karzinom zunahm. Für CEACAM5 trat ebenfalls eine frühe Veränderung auf, die CEACAM5 Expression nahm zu, wenn auch der Prozentsatz der Läsionen mit erhöhter CEACAM5-Expression hier geringer war.

Es ist bekannt, dass CEACAM5 eine apoptoseinhibierende Wirkung auf Kolonkarzinomzellen hat (Soeth *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2001) und es auf der Zelloberfläche zwischen CEACAM1-Molekülen auf benachbarten Zellen zur Homodimerbildung kommen kann (Frangsmayr *et al.*, 1999; Charbonneau *et al.*, 1999). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass CEACAM5 einen möglichen Liganden für CEACAM1 darstellen könnte, und dass die Bindung von CEACAM5 an CEACAM1 Apoptose induziert. Diese Hypothese wurde am HT29-Zellkulturmodell untersucht.

Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass CEACAM5 in HT29-Zellen, die durch Acetat-Stimulation eine erhöhte Menge CEACAM1 exprimieren, Apoptose induziert.

Für solche Hypothese und Interpretation des Ergebnisses sprechen Studien, die einen Verlust von CEACAM1 für die meisten Tumore belgen (Nollau *et al.*, 1997). Dagegen hemmt die Überexpression von CEACAM5 in Kolontumoren die Differenzierung und fördert das Wachstum von Tumorzellen (Ilantzis *et al.*, 2002; Baczynska *et al.*, 2003). Diese wachstumsfördernde Wirkung konnte in Metastasen der Kolontumore dagegen nicht gefunden werden. Metastasen solider Kolontumoren finden sich häufig in der Leber.

Hier wird im Regelfall CEACAM1 exprimiert, könnte also seine Funktion als Rezeptor für die durch CEACAM5-CEACAM1-Interaktion vermittelte Apoptose fungieren.

Zusammengefasst zeichnet sich das in Abb. 63 dargestellte Modell eines durch Ligandenbindung an CEACAM1 ausgelösten Signalweges in Kolonzellen ab, und damit verbunden auch eine physiologische Funktion von CEACAM1 als Apoptosevermittelnder Rezeptor im Kolongewebe.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CEACAM1 und CEACAM5 im Kolongewebe, insbesondere in frühen Veränderungen der humanen Kolonmukosa nachgewiesen. Die festgestellten Veränderungen der Gewebeexpression von CEACAM1 führten zu einer detaillierten Untersuchung eines möglichen Einflusses von CEACAM1 auf Prozesse zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase.

In *in vitro* Modellen wurden einzelne Schritte des zu Apoptose führenden Signaltransduktionsweges von CEACAM1 bei Bindung eines extrazellulären Liganden an Zellkultur-Modellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CEACAM1 bereits in 72% der ACF und durchschnittlich 65% der hyperplastischen Polypen deutlich vermindert ist. Dieser Verlust geht der bekannten Dysregulation von CEACAM1 in Adenomen und Karzinomen voraus und ist die erste Beschreibung für eine CEACAM1-Dysregulation in Vorläuferläsionen der Kolonmukosa.

Die Verminderung der Expression ist auf CEACAM1 beschränkt und erstreckt sich nicht auf andere, regulär im Kolon exprimierte Mitglieder der CEACAM-Familie. Eine parallel am gleichen Gewebekollektiv durchgeführte, histochemische Untersuchung von Proliferation und Apoptose zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verlust von CEACAM1 und einem Absinken der Apoptoserate in der gleichen Gewebeprobe ($p < 0,05$).

Zum Nachweis eines kausalen Zusammenhanges zwischen dem Verlust der CEACAM1-Expression und der Verminderung der Apoptoserate wurden zwei Zellkultursysteme etabliert. Untersucht wurde in diesen Systemen vor allem die Relevanz der langen Spleißvariante von CEACAM1-4L. In einem ersten Ansatz wurden CEACAM1-L transfizierte Jurkat-Zellen mit CEACAM1-spezifischen Liganden (CEACAM1-spezifische Antikörper) quervernetzt. Quervernetzung von CEACAM1-L auf der Zelloberfläche führte zu einer spezifischen Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen um 25% in den untersuchten Kulturen.

In einem zweiten Modell wurden an der humanen Kolonepithelzelllinie HT29 zunächst Stimuli ermittelt, die eine Modulation der CEACAM1-Expression in diesen Zellen ermöglichen. Neben dem Zytokin Interferon- γ wurde auch die Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren auf die Expression von CEACAM1 untersucht. Die Wirkung der Fettsäuren erfolgte hierbei auf der Ebene der Histonmodifikation durch Acetylierung, was die erfolgreiche Induktion der CEACAM1-Expression durch Zusatz des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A zum Zellkulturmedium mit nachfolgenden Expressionsanalysen in quantifizierenden Western Blots und real-time qRT-PCR eindeutig zeigte.

Nach Steigerung der CEACAM1-Expression und Vernetzung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche wurde eine Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen in den Zellkulturen festgestellt. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der CEACAM1-Expression und der

Apoptose gesichert werden. Als möglicher physiologischer Ligand wurde CEACAM5 (CEA) identifiziert, ein Protein dass im Kolongewebe neben der GPI-verankerten membrangebundenen Form auch in einer im Mukus enthaltenen, löslichen Form vorkommt.

Die Untersuchung des Apoptosesignalweges zeigten die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-1 durch Vernetzung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche. Die Zugabe von Caspase-3 und Caspase-1 Inhibitoren verhinderte die Auslösung der CEACAM1-induzierten Apoptose.

Die primäre Beteiligung des intrinsischen Apoptosesignalweges mit Beteiligung der Mitochondrien konnte ausgeschlossen werden (JC-1 Färbungen, Cytochrom c und Caspase-9 Analysen).

CEACAM1 unterliegt selber einer Prozessierung im Verlauf der Apoptose. Es tritt eine Spaltung von CEACAM1-L in der langen zytoplasmatischen Domäne auf, zusätzlich wurde zumindest eine weitere Spaltung im extrazellulären Anteil des CEACAM1 belegt. Diese Spaltung tritt unabhängig vom Apoptosestimulus auf. Die Expression von CEACAM1-4L als N-terminal FLAG markiertes Fusionsprotein führte zur Identifizierung eines etwa 12,7 kD grossen, extrazellulär abgespaltenen Fragmentes.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit das Potential des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 zur Induktion von Apoptose und somit indirekt eine Einflussnahme auf die Regulation des Gewebeturnovers in der normalen Kolonmukosa.

6 Literatur

- Abrahamse, S. L., B. L. Pool-Zobel und G. Rechkemmer.** 1999. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* **20**:629-34.
- Adams, J. M.** 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**:2481-2495.
- Adams, J. M. und S. Cory.** 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**:715-20.
- Algeciras-Schimmich, A., B. C. Barnhart und M. E. Peter.** 2002. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* **14**:721-6.
- Algeciras-Schimmich, A., L. Shen, B. C. Barnhart, A. E. Murmann, J. K. Burkhardt und M. E. Peter.** 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**:207-20.
- Alpin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari und I. Juliano.** 1998. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules and Selectins. *Pharm Rev* **50**:197-219.
- Andoh, A., T. Tsujikawa und Y. Fujiyama.** 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* **9**:347-58.
- Aoki, T., S. Takeda, A. Yanagisawa, Y. Kato, Y. Ajioka, H. Watanabe, S. Kudo und Y. Nakamura.** 1994. APC and p53 mutations in de novo colorectal adenocarcinomas. *Hum Mutat* **3**:342-6.
- Arnold, C. N., A. Goel, H. E. Blum und C. R. Boland.** 2005. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*. **104**:2035-47.
- Ashkenazi, A. und V. M. Dixit.** 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**:255-60.
- Augenlicht, L.** 1994. Adhesion molecules, cellular differentiation, and colonic crypt architecture. *Gastroenterology* **107**:1894-8.
- Augenlicht, L. H., C. Richards, G. Corner und T. P. Pretlow.** 1996. Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* **12**:1767-72.
- Augenlicht, L., A. Velcich und B. G. Heerdt.** 1995. Short-chain fatty acids and molecular and cellular mechanisms of colonic cell differentiation and transformation. *Adv Exp Med Biol* **375**:137-48.
- Baczynska, D., J. Wietrzyk, J. Madej, A. Krop-Watorek, A. Dabrowska, K. Widerak, A. Opolski und M. Ugorski.** 2003. The Tumorigenic Potential Of Human CX-1 Colon Adenocarcinoma Cells Depends On Carcinoembryonic Antigen (CEACAM5) Expression. *Cell Mol Biol Lett* **8**:471-86.
- Bamberger, A. M., S. Sudahl, C. Wagener und T. Loning.** 2001. Expression pattern of the adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM, CD66a, BGP) in gestational trophoblastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* **20**:160-5.

- Barnett, T. R., A. Kretschmer, D. A. Austen, S. J. Goebel, J. T. Hart et al.** (1989) Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol* **108**, 267-76.
- Beauchemin, N., P. Draber, G. Dveksler, P. Gold, S. Gray-Owen, F. Grunert, S. Hammarstrom, K. V. Holmes, A. Karlsson, M. Kuroki, S. H. Lin, L. Lucka, S. M. Najjar, M. Neumaier, B. Obrink, J. E. Shively, K. M. Skubitz, C. P. Stanners, P. Thomas, J. A. Thompson, M. Virji, S. von Kleist, C. Wagener, S. Watt und W. Zimmermann.** 1999. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* **252**:243-9.
- Bedi, A., P. J. Pasricha, A. J. Akhtar, J. P. Barber, G. C. Bedi, F. M. Giardiello, B. A. Zehnbauser, S. R. Hamilton und R. J. Jones.** 1995. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* **55**:1811-6.
- Bishop,** Science 235:305-311; 1987
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot und J. C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**:749-95.
- Boise, L. H. und C. B. Thompson.** 1997. Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3759-64.
- Bottomley, M. J.** 2004. Structures of protein domains that create or reorganize histone modifications. *EMBO reports* **5**:464-69.
- Bouzourene, H., P. Chaubert, W. Seelentag, F. T. Bosman und E. Saraga.** 1999. Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum Pathol* **30**:66-71
- Brummendorf, T. und V. Lemmon.** 2001. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* **13**:611-8.
- Busch, C., T. A. Hanssen, C. Wagener und O. B. B.** 2002. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol* **33**:290-8.
- Calviello, G., F. Di Nicuolo, E. Piccioni, M. E. Marocchi, S. Serini, N. Maggiano, K. H. Jones, D. G. Cornwell und P. Palozza.** 2003. gamma-Tocopheryl quinone induces apoptosis in cancer cells via caspase-9 activation and cytochrome c release. *Carcinogenesis* **24**:427-33
- Chang, H. Y. und X. Yang.** 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:821-46.
- Charbonneau, J. und C. P. Stanners.** 1999. Role of carbohydrate structures in CEA-mediated intercellular adhesion. *Cell Adhes Commun* **7**:233-44.
- Chen, C. J., T. T. Lin und J. E. Shively.** 1996. Role of interferon regulatory factor-1 in the induction of biliary glycoprotein (cell CAM-1) by interferon-gamma. *J Biol Chem* **271**:28181-8.
- Chen, J. S., D. V. Faller und R. A. Spanjaard.** 2003. Short-chain Fatty Acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets* **3**:219-36.
- Cheng, L. und M. D. Lai.** 2003. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* **9**:2642-9.

- Chinnaiyan, A. M.** 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**:5-15.
- Chiu, P. M., Y. S. Ngan, U. S. Khoo und A. N. Cheung.** 2001. Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* **38**:243-9.
- Chow, S. C., E. A. Slee, M. MacFarlane und G. M. Cohen.** 1999. Caspase-1 is not involved in CD95/Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* **246**:491-500.
- Christofori, G.** 2003. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *Embo J.* **22**:2318-23.
- Darmon, A. J. und R. C. Bleackley.** 1996. An interleukin-1beta converting enzyme-like protease is a key component of Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* **271**:21699-702.
- Darzynkiewicz, Z., E. Bedner, F. Traganos und T. Murakami.** 1998. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum Cell* **11**:3-12.
- Deckert, J. und K. Struhl.** 2001. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* **21**:2726-35.
- Desjardins, L. M. und J. P. MacManus.** 1995. An adherent cell model to study different stages of apoptosis. *Exp Cell Res* **216**:380-7.
- Di Gregorio, C., L. Losi, R. Fante, S. Modica, M. Ghidoni, M. Pedroni, M. G. Tamassia, L. Gafa, M. Ponz de Leon und L. Roncucci.** 1997. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* **30**:328-34.
- Emenaker, N. J. und M. D. Basson.** 2001. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig Dis Sci* **46**:96-105.
- Engedal, N. und H. K. Blomhoff.** 2003. Combined action of ERK and NF kappa B mediates the protective effect of phorbol ester on Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem* **278**:10934-41.
- Evan, G. I., L. Brown, M. Whyte und E. Harrington.** 1995. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **7**:825-34.
- Evan, G., A. Wyllie, C. Gilbert, T. Littlewood, H. Land et al..** 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **63**:119-25.
- Fairbanks, G., T. Streck und D. F. H. Wallach.** (1971) *Biochemistry* **10**:2606 ff.
- Frangmyr, L., V. Baranov und S. Hammarstrom.** 1999. Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol* **20**:277-92.
- Frangmyr, L., V. Baranov, F. Prall, M. M. Yeung, C. Wagener und S. Hammarstrom.** 1995. Cell-and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* **55**:2963-7.
- Gauthier, R., C. Harnois, J. F. Drolet, J. C. Reed, A. Vezina und P. H. Vachon.** 2001. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1540-54.

- González, A., L. A. Bagatolli, I. Echabe, L. R. Arrondo, C. E. Argarana, C. R. Cantor und G. D. Fidelio.** 1997. Interaction of biotin with streptavidin. *J Biol Chem* **272**:11288-11294.
- Gray-Owen, S. D. und R. S. Blumberg.** 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol.* **6**:433-46.
- Green, D. R.** 1998. Apoptosis. Death deceiver. *Nature* **396**:629-30.
- Grossmann, J., K. Walther, M. Artinger, P. Rummele, M. Woenckhaus und J. Scholmerich.** 2002. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* **97**:1421-8.
- Guan, X., J. Sagara, T. Yokoyama, M. Oguchi, T. Saida und S. Taniguchi.** 2003. ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer* **107**:202-208.
- Guo, M. und B. A. Hay.** 1999. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**:745-52.
- Gupta, S.** 2000. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* **20**:229-39.
- Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay und C. Borner.** 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**:2286-95.
- Halaby, D. M., A. Poupon und J. Mornon.** 1999. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng.* **12**:563-71.
- Hammarstrom, S.** 1999. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* **9**:67-81.
- Han, Z., P. Pantazis, J. H. Wyche, N. Kouttab, V. J. Kidd und E. A. Hendrickson.** 2001. A Fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic Jurkat cell line. *J Biol Chem* **276**:38748-54.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**:57-70.
- Hart, M. J., R. de los Santos, I. N. Albert, B. Rubinfeld und P. Polakis.** 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* **8**:573-81.
- Hauck, W., P. Nedellec, C. Turbide, C. P. Stanners, T. R. Barnett und N. Beauchemin.** 1994. Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur J Biochem* **223**:529-41.
- Hawkins, N. J., P. Gorman, I. P. Tomlinson, P. Bullpitt und R. L. Ward.** 2000. Colorectal carcinomas arising in the hyperplastic polypoid syndrome progress through the chromosomal instability pathway. *Am J Pathol* **157**:385-92.
- Heerdt, B. G. und L. H. Augenlicht.** 1991. Effects of fatty acids on expression of genes encoding subunits of cytochrome c oxidase and cytochrome c oxidase activity in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* **266**:19120-6.
- Hilbi, H., J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, R. A. Flavell, J. Yuan, P. J. Sansonetti und A. Zychlinsky.** 1998. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* **273**:32895-900.

- Hinnebusch, B. F., S. Meng, J. T. Wu, S. Y. Archer und R. A. Hodin.** 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**:1012-7.
- Houde, C., S. Roy, N. Leung, D. W. Nicholson und N. Beauchemin.** 2003. The cell adhesion molecule CEACAM1-L is a substrate of caspase-3-mediated cleavage in apoptotic mouse intestinal cells. *J Biol Chem* **278**:16929-35.
- Iliantzis, C., L. DeMarte, R. A. Screaton und C. P. Stanners.** 2002. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* **4**:151-63.
- Ilyas, M. und I. P. Tomlinson.** 1997. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* **182**:128-37.
- Izzi, L., C. Turbide, C. Houde, T. Kunath und N. Beauchemin.** 1999. cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* **18**:5563-72.
- Jaattela, M.** 2002. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med* **34**:480-8.
- Jaskiewicz, K., E. Lancaster, L. Banach und A. Karmolinski.** 1998. Proliferative activity of normal and neoplastic colonic mucosa in population groups with high and low risk for colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **18**:4641-4.
- Jass, J. R.** 1989. Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World J Surg* **13**:45-51.
- Jass, J. R.** 2000b. Histopathology of early colorectal cancer. *World J Surg* **24**:1016-21.
- Jass, J. R.** 2001. Hyperplastic polyps of the colorectum-innocent or guilty? *Dis Colon Rectum* **44**:163-6.
- Jass, J. R., H. Iino, A. Ruzkiewicz, D. Painter, M. J. Solomon, D. J. Koorey, D. Cohn, K. L. Furlong, M. D. Walsh, J. Palazzo, T. B. Edmonston, R. Fishel, J. Young und B. A. Leggett.** 2000. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* **47**:43-9.
- Jass, J. R., V. L. Whitehall, J. Young und B. A. Leggett.** 2002. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **123**:862-76.
- Jenab, M., J. Chen und L. U. Thompson.** 2001. Sialomucin production in aberrant crypt foci relates to degree of dysplasia and rate of cell proliferation. *Cancer Lett* **165**:19-25.
- Johnson D. E..** 2000. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**:1695-1703.
- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer und J. M. Penninger.** 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**:549-54.
- Kammerer, R., T. Popp, B. B. Singer, J. Schlender und W. Zimmermann.** 2004. Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CECAM1 implies a pathogen-driven evolution. *Gene* **339**:99-109.

- Kannicht, C., Lucka, L., Nuck, R., W. Reutter und M. Gohlke.** 1999. N-glycosylation of the carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule, C-CAM, from rat liver: detection of oversialylated bi- and triantennary structures. *Glycobiology*, **9**:897–906.
- Kantor, J., R. Tran, J. Greiner, S. Pestka, P. B. Fisher, J. E. Shively und J. Schlom.** 1989. Modulation of carcinoembryonic antigen messenger RNA levels in human colon carcinoma cells by recombinant human gamma-interferon. *Cancer Res* **49**:2651-5.
- Kayser, G., U. Gerlach, A. Walch, R. Nitschke, S. Haxelmans, K. Kayser, U. Hopt, M. Werner und S. Lassmann.** 2005. Numerical and structural centrosome aberrations are an early and stable event in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal carcinomas. *Virchows Arch.* **447**:61-5.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie und A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-57.
- Khan, A., I. Shrier und P. H. Gordon.** 2002. The changed histologic paradigm of colorectal polyps. *Surg Endosc* **16**:436-40.
- Kidd, V. J., J. M. Lahti und T. Teitz.** 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* **11**:191-201.
- Kikuchi, Y., W. N. Dinjens und F. T. Bosman.** 1997. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* **431**:111-7.
- King, K. L. und J. A. Cidlowski.** 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**:601-17.
- Kinzler, K. W. und B. Vogelstein.** 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-70.
- Kirshner, J., C. J. Chen, P. Liu, J. Huang und J. E. Shively.** 2003. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:521-6.
- Kirshner, J., C. J. Chen, P. Liu, J. Huang und J. E. Shively.** 2004. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *J Mol Histol.* **35**:287-99.
- Knudson, A. G. J.** 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**:820-824.
- Koike, M.** 1996. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J Surg Oncol* **62**:97-108.
- Konishi, M., R. Kikuchi-Yanoshita, K. Tanaka, M. Muraoka, A. Onda, Y. Okumura, N. Kishi, T. Iwama, T. Mori, M. Koike, K. Ushio, M. Chiba, S. Nomizu, F. Konishi, J. Utsunomiya und M. Miyaki.** 1996. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* **111**:307-17.
- Kotsinas, A., K. Evangelou, P. Zacharatos, C. Kittas und V. G. Gorgoulis.** 2002. Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct beta- catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli and G(1)-to S-phase cell- cycle regulators. *Am J Pathol* **161**:1619-34.

- Laack, E., H. Nikbakht, A. Peters, C. Kugler, Y. Jasiewicz, L. Edler, J. Brummer, U. Schumacher und D. K. Hossfeld.** 2002. Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* **20**:4279-84.
- Laemmli et al.,** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Leggett, B. A., B. Devereaux, K. Biden, J. Searle, J. Young und J. Jass.** 2001. Hyperplastic polyposis: association with colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* **25**:177-84.
- Leslie, A., F. A. Carey, N. R. Pratt und R. J. Steele.** 2002. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* **89**:845-60.
- Liossis, S. N., X. Z. Ding, J. G. Kiang und G. C. Tsokos.** 1997. Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3-and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* **158**:5668-75.
- Liu, K. und S. I. Abrams.** 2003. Coordinate Regulation of IFN Consensus Sequence-Binding Protein and Caspase-1 in the Sensitization of Human Colon Carcinoma Cells to Fas-Mediated Apoptosis by IFN-gamma. *J Immunol* **170**:6329-37.
- Lucka, L., M. Fernando, D. Grunow, C. Kannicht, A. K. Horst, P. Nollau und C. Wagener.** 2005. Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology*. **15**:87-100.
- Luebeck, E. G. und S. H. Moolgavkar.** 2002. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15095-100.
- Mach J.-P. und G. Pusztaszeri.** 1972. Carcinoembryonic antigen (CEA) : demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry* **9**:1031-1034.
- Mahrenholz, A. M., C. H. Yeh, J. E. Shively und S. A. Hefta.** 1993. Microsequence and mass spectral analysis of nonspecific cross-reacting antigen 160, a CD15-positive neutrophil membrane glycoprotein. *J Biol Chem* **268**:13015–13018.
- Mariadason, J. M., G. A. Corner und L. H. Augenlicht.** 2000b. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* **60**:4561-72.
- Mariadason, J. M., K. L. Rickard, D. H. Barkla, L. H. Augenlicht und P. R. Gibson.** 2000a. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J Cell Physiol* **183**:347-54.
- Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson und V. M. Dixit.** 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**:213-218.
- Michor, F., Y. Iwasa, N. L. Komarova und M. A. Nowak.** 2003. Local regulation of homeostasis favors chromosomal instability. *Curr Biol* **13**:581-4.
- Miossec, C., V. Dutilleul, L. Durand, C. Haucheu, L. Pilatre, J. Golec, F. Fassy und A. Diu-Hercend.** 1997. Evidence for an interleukin-1 β converting enzyme (ICE)-like activity distinct from ICE and responsible for ICE and CPP32 cleavage during apoptosis. *Apoptosis* **2**:125-129.

- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein und K. W. Kinzler.** 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**:1787-90.
- Morin, P. J., B. Vogelstein und K. W. Kinzler.** 1996. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7950-4.
- Muenzner, P., C. Dehio, T. Fujiwara, M. Achtman, T. F. Meyer und S. D. Gray-Owen.** 2000. Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. *Infect Immun* **68**:3601-7.
- Muenzner, P., M. Naumann, T. F. Meyer und S. D. Gray-Owen.** 2001. Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen- related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **276**:24331-40.
- Muenzner, P., C. Dehio, T. Fujiwara, M. Achtman, T. F. Meyer und S. D. Gray-Owen** (2000) Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. *Infect Immun* **68**, 3601-7.
- Muenzner, P., M. Naumann, T. F. Meyer und S. D. Gray-Owen** (2001) Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen- related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **276**, 24331-40.
- Nagata, S.** (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**, 29-55.
- Neufeld, K. L., D. A. Nix, H. Bogerd, Y. Kang, M. C. Beckerle et al.** (2000) Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12085-90.
- Neumaier, M.** (1986) Isolierung von Carcinoembryonalem Antigen (CEA) aund CEA-ähnlichen Antigenen mittels monoklonaler Immunabsorbentien: Immunchemische Charakterisierung durch Transblots und Strukturanalytische Untersuchungen. Dissertation, Fachbereich Medizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Bonn.
- Neumaier, M., S. Paululat, A. Chan, P. Matthaes and C. Wagener** (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down- regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10744-8.
- Nittka, S., J. Gunther, C. Ebisch, A. Erbersdobler and M. Neumaier** (2004) The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene* **23**, 9306-13.
- Nkondjock, A., B. Shatenstein, P. Maisonneuve and P. Ghadirian** (2003) Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* **27**, 55-66.
- Nollau, P., F. Prall, U. Helmchen, C. Wagener and M. Neumaier** (1997) Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization. *Am J Pathol* **151**, 521-30.

- Nollau, P., H. Scheller, M. Kona-Horstmann, S. Rohde, F. Hagenmuller et al.** (1997b) Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res* **57**, 2354-7.
- Nunez, G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara** (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**, 3237-45.
- Oancea, M., S. Mazumder, M. E. Crosby and A. Almasan** (2006) Apoptosis assays. *Methods Mol Med* **129**, 279-90.
- O'Connell, J., M. W. Bennett, K. Nally, A. Houston, G. C. O'Sullivan and F. Shanahan** (2000) Altered mechanisms of apoptosis in colon cancer: Fas resistance and counterattack in the tumor-immune conflict. *Ann N Y Acad Sci* **910**, 178-92.
- Oshima, M., H. Oshima, K. Kitagawa, M. Kobayashi, C. Itakura and M. Taketo** (1995) Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4482-6.
- Otori, K., K. Sugiyama, T. Hasebe, S. Fukushima and H. Esumi** (1995) Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res* **55**, 4743-6.
- Paxton, R. J., G. Mooser, H. Pande, T. D. Lee and J. E. Shively** (1987) Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 920-4.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer** (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26-35.
- Petit, P. X., S. A. Susin, N. Zamzami, B. Mignotte and G. Kroemer.** 1996. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* **396**:7-13.
- Phan, D., C. J. Cheng, M. Galfione, F. Vakar-Lopez, J. Tunstead et al.** (2004) Identification of Sp2 as a transcriptional repressor of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in tumorigenesis. *Cancer Res* **64**, 3072-8.
- Phan, D., X. Sui, D. T. Chen, S. M. Najjar, G. Jenster and S. H. Lin** (2001) Androgen regulation of the cell-cell adhesion molecule-1 (Ceacam1) gene. *Mol Cell Endocrinol* **184**, 115-23.
- Pietenpol, J. A., C. Lengauer, J. Jordan, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1996) Mammalian cells resistant to tumor suppressor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8390-4.
- Polyak, K., S. R. Hamilton, B. Vogelstein and K. W. Kinzler** (1996) Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* **149**, 381-7.
- Ponz de Leon, M.** (1996) Genetic basis of tumour development. *Ital J Gastroenterol* **28**, 232-45.
- Ponz de Leon, M. and C. Di Gregorio** (2001) Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* **33**, 372-88.
- Popp, A., C. Dehio, F. Grunert, T. F. Meyer and S. D. Gray-Owen** (1999) Molecular analysis of neisserial Opa protein interactions with the CEA family of receptors: identification of determinants contributing to the differential specificities of binding. *Cell Microbiol* **1**, 169-81.

- Potten, C. S., C. Booth and D. Hargreaves** (2003) The small intestine as a model for evaluating adult tissue stem cell drug targets. *Cell Prolif* **36**, 115-29.
- Potten, C. S., C. Booth and D. M. Pritchard** (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* **78**, 219-43.
- Poulsen, M., A. M. Molck and B. L. Jacobsen** (2002) Different effects of short-and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Nutr Cancer* **42**, 194-205.
- Poy, M. N., Y. Yang, K. Rezaei, M. A. Fernstrom, A. D. Lee et al.** (2002) CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet* **30**, 270-6.
- Prall, F., P. Nollau, M. Neumaier, H. D. Haubeck, Z. Drzeniek et al.** (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* **44**, 35-41.
- Prasad, K. N., A. R. Hovland, P. Nahreini, W. C. Cole, P. Hovland et al.** (2001) Differentiation genes: are they primary targets for human carcinogenesis? *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 805-13.
- Renahan, A. G., S. T. O'Dwyer, N. J. Haboubi and C. S. Potten** (2002) Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis* **4**, 76-89.
- Roberts, L. R., H. Kurosawa, S. F. Bronk, P. J. Fesmier, L. B. Agellon et al.** (1997) Cathepsin B contributes to bile salt induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* **113**, 1714-1726.
- Roberts, L. R., P. N. Adjei and G. J. Gores** (1999) Cathepsins as effector proteases in hepatocytes apoptosis. *Cell Biochem Biophys* **30**, 71-88.
- Romagnani, P., F. Annunziato, M. C. Baccari and P. Parronchi** (1997b) T cells and cytokines in Crohn's Disease. *Curr Opin Immunol* **9**, 793-809.
- Romagnani, P., P. Parronchi, M. M. D'Elia, P. Romagnani, F. Annunziato et al.** (1997) An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol* **113**, 153-6.
- Roncucci, L., A. Medline and W. R. Bruce** (1991) Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**, 57-60.
- Roncucci, L., S. Modica, M. Pedroni, M. G. Tamassia, M. Ghidoni et al.** (1998) Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* **77**, 2343-2348.
- Rudolph, I. L., D. S. Kelley, K. C. Klasing and K. L. Erickson** (2001) Regulation of cellular differentiation and apoptosis by fatty acids and their metabolites. *Nutr Res* **21**, 381-93.
- Sadekova, S., N. Lamarche-Vane, X. Li and N. Beauchemin** (2000) The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol Biol Cell* **11**, 65-77.
- Sancho, E., E. Batlle and H. Clevers** (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 695-723.
- Santos, J. H., L. Hunakova, Y. Chen, C. Bortner and B. Van Houten** (2003) Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* **278**, 1728-34.

- Schauber, J., C. Svanholm, S. Termen, K. Iffland, T. Menzel et al.** (2003) Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* **52**, 735-41.
- Scheffrahn, I., B. B. Singer, K. Sigmandsson, L. Lucka and B. Obrink** (2005) Control of density-dependent, cell state-specific signal transduction by the cell adhesion molecule CEACAM1, and its influence on cell cycle regulation. *Exp Cell Res* **307**, 427-35.
- Scholzel, S., W. Zimmermann, G. Schwarzkopf, F. Grunert, B. Rogaczewski and J. Thompson** (2000) Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol* **156**, 595-605.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume** (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-89.
- Schulte-Hermann, R., W. Bursch, B. Grasl-Kraupp, L. Torok, A. Ellinger and L. Mullauer** (1995) Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett* **83**, 143-8.
- Shiomori, K., S. Shimada, T. Marutsuka, I. Hatayama and M. Ogawa** (2003) Genetic pathways of 'de novo' colorectal carcinomas with reference to fetal-type glycogen phosphorylase positive foci. *Int J Oncol* **22**, 65-74.
- Shivapurkar, N., L. Huang, B. Ruggeri, P. A. Swalsky, A. Bakker et al.** (1997) K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* **115**, 39-46.
- Shpitz, B., K. Hay, A. Medline, W. R. Bruce, S. B. Bull et al.** (1996) Natural history of aberrant crypt foci. A surgical approach. *Dis Colon Rectum* **39**, 763-7.
- Shpitz, B., Y. Bomstein, Y. Mekori, R. Cohen, Z. Kaufman et al.** (1998) Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol* **29**, 469-75.
- Sienel, W., S. Dango, U. Woelfle, A. Morresi-Hauf, C. Wagener et al.** (2003) Elevated Expression of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Promotes Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 2260-6.

- Singer, B. B., I. Scheffrahn, R. Heymann, K. Sigmandsson, R. Kammerer and B. Obrink** (2002) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol* **168**, 5139-46.
- Skubitz, K M. and P. A. Bates** (2001) Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* **98**, 1469-79.
- Slack, J. M.** (2000) Stem cells in epithelial tissues. *Science* **287**, 1431-3.
- Smith, A. et al.** (1995) Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Soeth, E., T. Wirth, H. J. List, S. Kumbhani, A. Petersen et al.** (2001) Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**, 2022-30.
- Soni, P., M. Lakkis, M. N. Poy, M. A. Fernstrom and S. M. Najjar** (2000) The differential effects of pp120 (Ceacam 1) on the mitogenic action of insulin and insulin-like growth factor 1 are regulated by the nonconserved tyrosine 1316 in the insulin receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 3896-905.
- Spiro, R. G.** (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R.
- Stoffel, A., M. Neumaier, F. J. Gaida, U. Fenger, Z. Drzeniek et al.** (1993) Monoclonal, anti-domain and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,000 granulocyte membrane antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family. *J Immunol* **150**, 4978-84.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit** (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-45.
- Sandberg, U. and B. Obrink** (2002) CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **115**, 1273-84.
- Takahashi, H., Y. Okai, R. J. Paxton, L. J. Hefta and J. E. Shively** (1993) Differential regulation of carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein by gamma-interferon. *Cancer Res* **53**, 1612-9.
- Takayama, T., M. Ohi, T. Hayashi, K. Miyanishi, A. Nobuoka et al.** (2001) Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **121**, 599-611.
- Takayama, T., S. Katsuki, Y. Takahashi, M. Ohi, S. Nojiri, S. Sakamaki et al.** (1998) Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* **339**, 1277-84.
- Thiery, J. P.** (2003) Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 365-71.
- Thies, A., I. Moll, J. Berger, C. Wagener, J. Brummer et al.** (2002) CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* **20**, 2530-6.

- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik** (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard et al.** (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1-beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.
- Van Geelen, C. M., E. G. De Vries, T. K. Le, R. P. Van Weeghel and S. De Jong** (2003) Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **89**, 363-73.
- Vancompernelle, K., F. Van Herreweghe, G. Pynaert, M. Van De Crean, K. De Vos et al.** (1998) Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* **438**, 150-158.
- Vaux, D. L. and A. Strasser** (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 2239-2244.
- Virji, M., K. Makepeace, D. J. Ferguson and S. M. Watt** (1996) Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol* **22**, 941-50.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler** (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-99.
- von Kleist, S., G. Chavanel and P. Burtin** (1972) Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2492-4. 1.
- Wang, X.** (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-33.
- Waterhouse, N. J., and D. R. Green** (1999) Mitochondria and apoptosis: HQ or high-security prison? *J Clin Immunol* **19**, 378-87.
- Watt, S. M., A. M. Teixeira, G. Q. Zhou, R. Doyonnas, Y. Zhang et al.** (2001) Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* **98**, 1469-79.
- Weinstein, I. B.** (2000) Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* **21**, 857-64.
- White, M. K. and J. A. McCubrey** (2001) Suppression of apoptosis: role in cell growth and neoplasia. *Leukemia* **15**, 1011-21.
- Williams, E. A., J. M. Coxhead and J. C. Mathers** (2003) Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc* **62**, 107-15.
- Willingham, M. C.** (1999) Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* **47**, 1101-10.
- Wirth, T., E. Soeth, F. Czubayko and H. Juhl** (2002) Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of colon cancer cells and inhibits metastatic tumor growth. *Clin Exp Metastasis* **19**, 155-60.
- Woo, M., R. Hakem, M. S. Soengas, G. S. Duncan, A. Shahinian et al.** (1998) Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* **12**, 806-19.

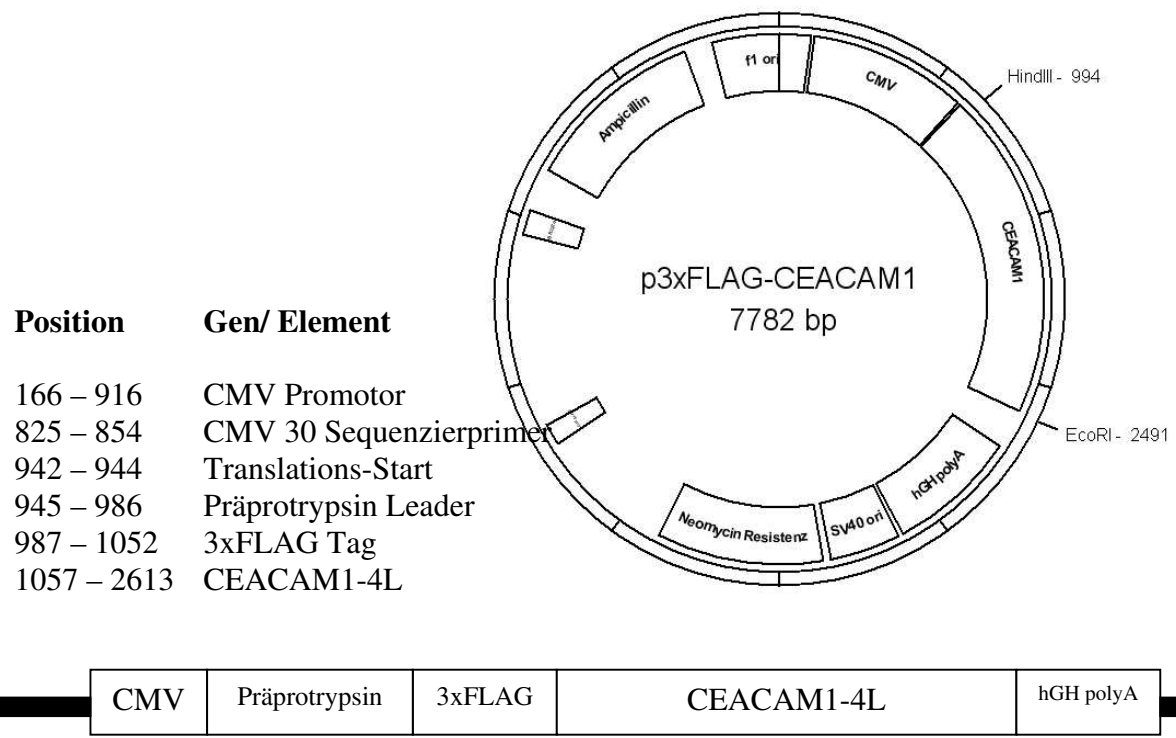
- Yamada, Y., N. Yoshimi, Y. Hirose, K. Matsunaga, M. Katayama et al.** (2001) Sequential analysis of morphological and biological properties of beta- catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* **61**, 1874-8.
- Yasui, W., N. Oue, S. Ono, Y. Mitani, R. Ito and H. Nakayama** (2003) Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **983**, 220-31.
- Yin, L., G. Kaevsky and C. Giardina** (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF- κ B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* **276**, 44641-44646.
- Yuan, P., M. H. Sun, J. S. Zhang, X. Z. Zhu and D. R. Shi** (2001) APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon. *World J Gastroenterol* **7**, 352-6.
- Zakeri, Z. and R. A. Lockshin** (2002) Cell death during development. *J Immunol Methods* **265**, 3-20.
- Zhou, G. Q., Y. Zhang and S. Hammarstrom** (2001) The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family in non-human primates. *Gene* **264**, 105-12.

7 Anhang

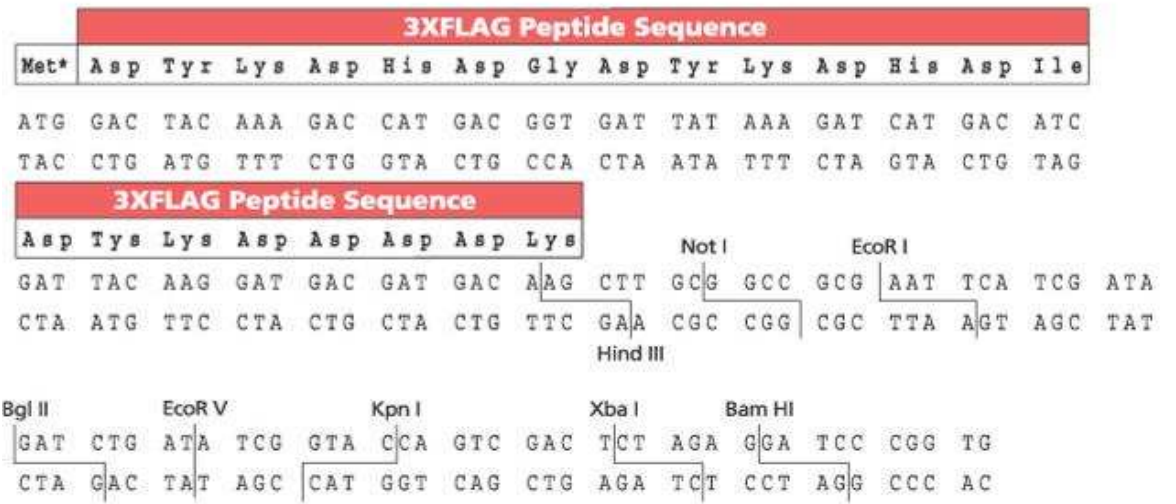
7.1 Vektorkarten

Plasmid CEACAM1-4L-FLAG

Expressionsvektor zur stabilen Expression von CEACAM1 mit einer N-terminalen 3xFLAG Markierung in eukaryotischen Zellen.



Multiple Klonierungsstelle des Vektors 3xFLAG-CMV der Firma Sigma:



Primer für die Klonierung der cDNA des humanen CEACAM1-4L

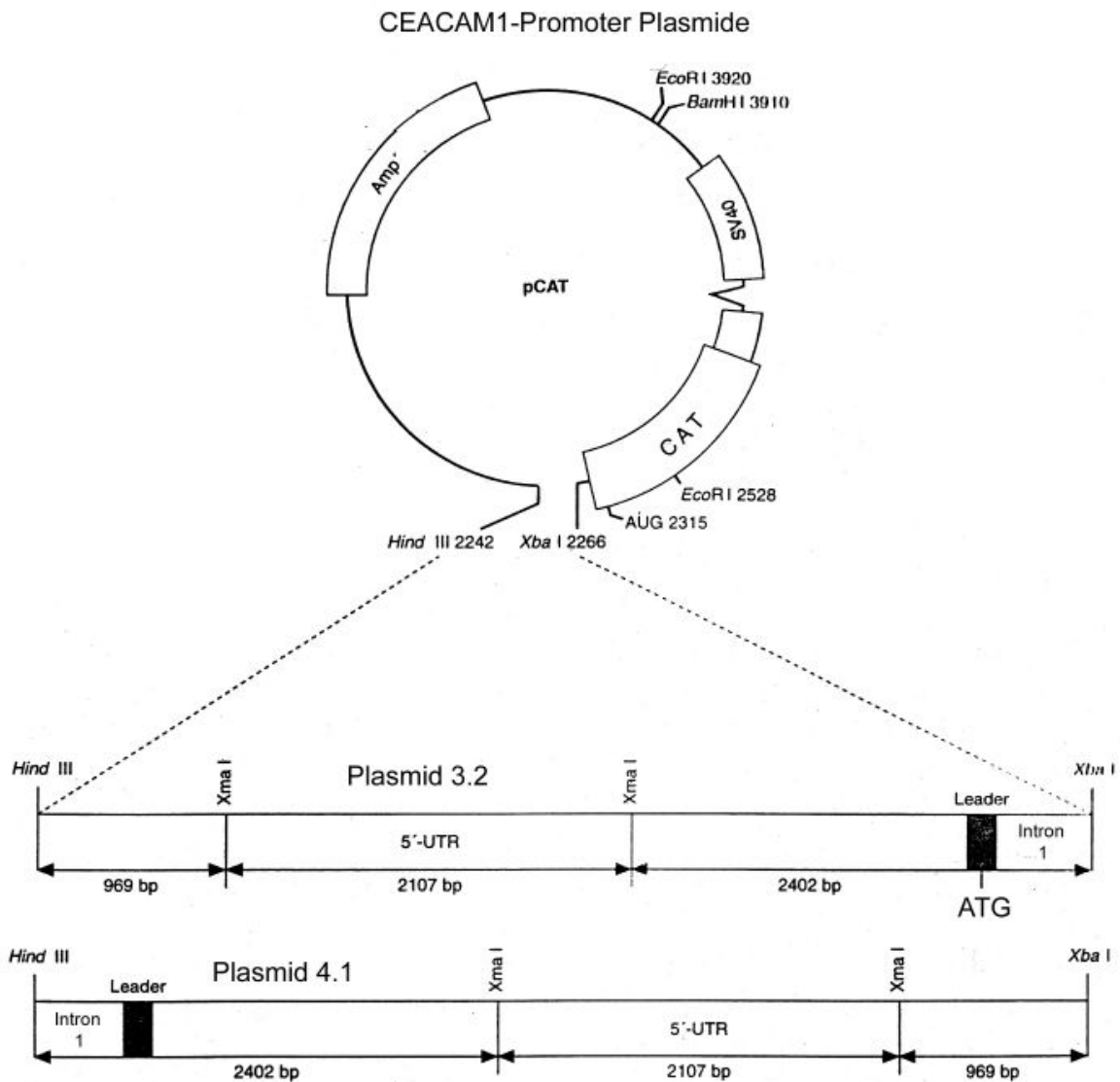
FLAG-BGP-HindIII

FLAG-BGP-EcoRI

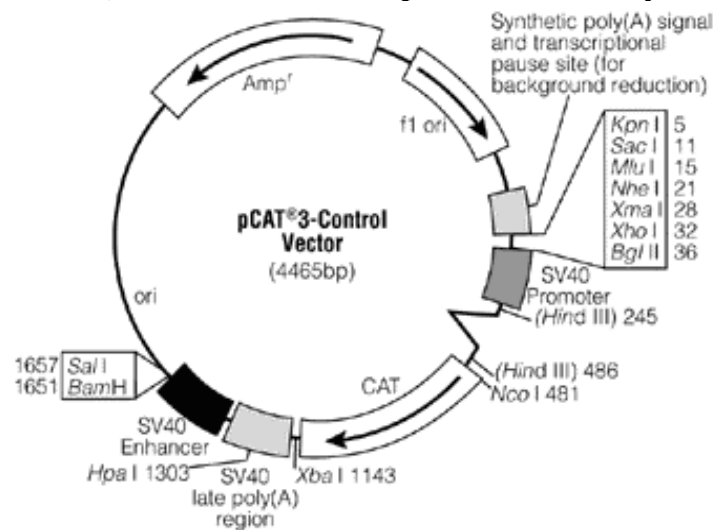
5'- GAC GAT GAC AAG CTT ACT GCC CAG CTC ACT ACT G -3'

5'- TCG ATG AAT TCT CAT CAT TAC TGC TTT TTT ACT TCT GA-3'

Plasmide p3.2 und p4.1



Plasmid CATcontrol (konstitutive CAT Expression in Eukaryoten, Promega)



Danksagung

Ich möchte Prof. Michael Neumaier für die großzügige Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danken. Seine Offenheit für unterschiedlichste Betrachtungsweisen und seine Diskussionsbereitschaft waren von unschätzbarem Wert. Auch für das entgegengebrachte Vertrauen in die vorliegende Arbeit und die fortgesetzte, großzügige Unterstützung der experimentellen Arbeit, insbesondere in der Zeit nach dem Wechsel an das Universitätsklinikum Mannheim, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich danke Prof. Renwanzt herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ohne die großzügige Unterstützung von Prof. John E. Shively aus dem Beckman Research Institute (City of Hope, Duarte, CA) in Form diverser transfizierter Zelllinien und Antikörper hätte die vorliegende Arbeit überhaupt nicht begonnen werden können.

Herrn Prof. Hanswalter Zentgraf und seiner Mitarbeiterin Carolin Böhm aus der Angewandten Tumorstudiologie des DKFZ möchte ich für die exzellente Zusammenarbeit bei der Herstellung des CEACAM1-4L Antikörpers 7-2.3 danken.

Herrn PD Dr. Erbersdobler aus dem Institut für Pathologie (UKE) danke ich für die Unterweisung in der Histopathologie des Kolongewebes, für die geduldige Zusammenstellung des Gewebekollektivs und die umfassenden Hilfestellungen bei der Identifizierung und Isolation der ACF. Ein besonderer Dank gilt auch der Diskussionsbereitschaft, die er mir dabei entgegen brachte.

Cornelia Ebisch sei herzlich gedankt für die phantastische Zusammenarbeit bei der Herstellung der Gewebeschnitte und die vielen kleinen Diskussionen bei der Etablierung unserer diversen immunchemischen Nachweise.

Nicht vergessen möchte diejenigen, die durch unzählige aufmunternde Worte und ihr Verständnis verhindert haben, dass ich an dieser Arbeit verzweifle: Theresa, Conny, Ulli, Sarah, Malti, Katharina, Martina, und Sabine. Auch den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Mannheim danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ihnen gebührt mein Dank ebenso wie diversen Praktikanten und Medizin- Doktoranden, die mir mit ihren unkonventionellen Fragen immer wieder vor Augen geführt haben, wie Spannend dieses Arbeitsgebiet sein kann.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich über die ganze Zeit unterstützt haben und an diese Arbeit geglaubt haben. Besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihr Verständnis, Vertrauen, unendliche Geduld und zahllose aufmunternde Worte während dieser Zeit.