

**Untersuchungen zur biologischen Funktion der
Glycostrukturen auf CEACAM1(CD66a)**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
an der Universität Hamburg**

vorgelegt von

**Andrea Kristina Horst
aus Hamburg**

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1997 bis Dezember 1999 in der Abteilung für Klinische Chemie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Wagener

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 20.01.2000

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	III
Einleitung	1
Material und Methoden	21
Material	21
Methoden	26
Proteinchemische Methoden	26
Immunologische Methoden	43
Zellbiologische Methoden	63
Molekularbiologische Methoden	69
Ergebnisse	85
1 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen	85
2 Mannose-spezifische Adhäsion gereinigter Typ-1-Fimbrien an humane Granulocyten	94
3 Nachweis von High-Mannose-Epitopen auf CEACAM1 und Interaktion von CEACAM1 aus Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien	103
4 Untersuchung der Wechselwirkung von Typ-1-Fimbrien mit neutrophilen Granulocyten in der Elektronenmikroskopie	108
5 Auswertung der Ergebnisse in der Immunfluoreszenz	112
6 Nachweis von Lactosaminoglycanen und den E-Selectin-Liganden Lewis^x und Sialyl-Lewis^x auf CEACAM1 aus humanen Granulocyten	117
7 Analyse der CEACAM1- und Sialyl-Lewis^x-Expression in Tumoren humaner Tumorcarcinomzelllinien nach Transplantation in <i>scid</i>-Mäuse	120
8 Untersuchung der biologischen Funktion der Sialyl-Lewis^x-Epitope von CEACAM1	133

Diskussion	141
1 Wechselwirkung von vitalen Granulocyten und isoliertem CEACAM1 mit Typ-1-Fimbrien aus <i>E. coli</i>	141
2 Experimentelles Modell zur Metastasierung humaner Tumorzelllinien in scid-Mäusen	148
3 CEACAM1 stimuliert die Chemotaxe humaner Endothelzellen	151
Zusammenfassung	154
Summary	156
Literatur	158
Anhang	I

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Ab bildung
abs.	abs olut
Ala	Ala nin
AP	Al kalische Ph osphatase
APS	Am monium pers ulfat
BCIP	5- B rom-4- Ch lor-3- I ndo yl phosphat di-Natriumsalz (X-Phosphat)
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BGA	Bl ut g as- A nalyse
bp	Bas en pa are
BSA	B ovines S erum al bumin
CD	C luster of D ifferentiation
cDNA	C odierende D N A
CEA	C arcinoembryonales A ntigen
CEACAM1	CEA - C ell a dhesion m olecule 1
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
d.h.	das hei ßt
DAB	3'- D iamin ob enzidin
dCTP	D esoxy- C ytosin tr iphosphat
DMF	Di methyl fo rmamid
DMSO	Di methyl su lfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	D esoxy n ucleosid tr iphosphat
DTAF	5-([4,6- D ichloro tr iazin-2-yl] a mino) fl uorescein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	E thylendiamin te tetra a cetat
ELISA	E nzyme- l inked i mmunosorbent a ssay

ETCC	<i>European Tissue Culture Collection</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	F luorescein i sothi c yanat
fMLP	F ormyl- M ethionyl- L eucyl- P henylalanin
Glu	G lutamin
GNA	<i>Galanthus nivalis Agglutinin</i>
h	Stunde(n)
HBSS	H anks´ b alanced salt solution
HDMEC	<i>H</i> uman <i>d</i> ermal <i>m</i> icrovascular <i>c</i> ells
Ig	I mmunglobulin
kD	K ilodalton
LB-Medium	L uria- B ertani-Medium
LRSC	L issamin TM - R hodaminsulfonylchlorid
mA	M illiampère
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
min.	M inute(n)
MOPS	3- M orpholin-1- p ropansulfonsäure
Mw	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MWCO	Molekulares Ausschlußvolumen (m olecular w eight c ut- o ff)
NBT	Nitrotetrazoliumblau
NCA	<i>Non-specific cross-reacting antigen</i>
NHS	N - H ydroxysuccinimid
OD	O ptische D ichte
OPD	O rtho- P henyl d iamin
PAMAM	P oly a mido a min
PAA	P oly a cryla m id
PB	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffer</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	P oly m ethylsulfonyl f luorid

POD	P eroxidase
PVA	P olyvinylalkohol
RIC	Relative inhibitorische Konzentration
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	R aumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>scid</i>	Bezeichnung für einen schweren kombinierten Immundefekt (<i>severe combined immunodeficient</i>)
SDS	S odiumdodecylsulfat
sLe ^x	S ialyl- L ewis ^x
SPA	Protein A aus <i>Staphylococcus aureus</i>
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat (<i>sodium chloride/sodium citrate</i>)
TAE	T ris- A cetate- E DTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TE	T ris- E DTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - T etramethylethyldiamin
TNF α	T umornekrosefaktor α
Tris	T ris[hydroxymehtyl]aminomethan
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
Upm	U mdrehungen p ro M inute
UTR	U ntranslatierte R egion
UV	U ltraviolett
V	V olt
v/v	Volumenanteil pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Einleitung

Glycoproteine und Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen

Kohlenhydrate kommen auf allen Säuger-Zellen in gebundener Form in Glycolipiden, Glycoproteinen und Proteoglycanen sowie als Bestandteil der extrazellulären Matrix vor. Glycoproteine sind Hauptkomponenten von Säuger-Zellmembranen. Sie sind Bestandteil multipler Kohlenhydrat-Erkennungssysteme, in denen ihr Proteintrückgrat als Gerüst für spezifische Glycane dient. Glycane bieten vielfältigere Möglichkeiten zur Speicherung von Informationen als z.B. DNA oder Polypeptidketten, da sie nicht nur als lineare Polymere, sondern auch als verzweigte, variabel verknüpfte Strukturen vorkommen können.

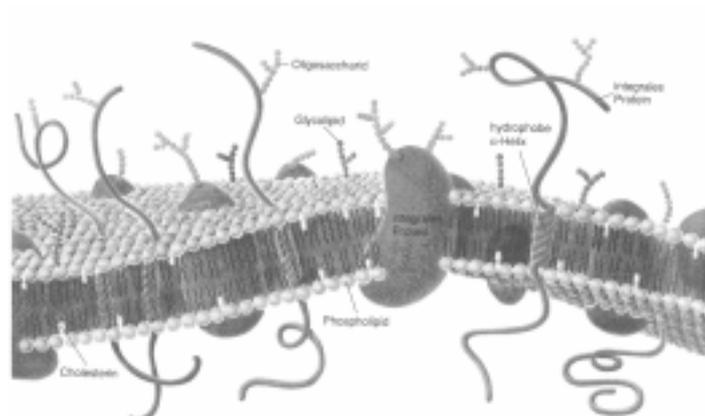
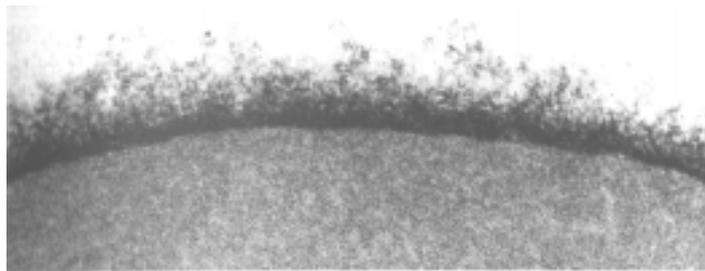


Abb. 1. Darstellung der Glycocalix von Säuger-Zellen.

Abb. 1 zeigt die Glycocalix eines humanen Erythrocyten (oben) und die schematische Darstellung einer Zellmembran (unten), in die Glycoproteine und Glycolipide integriert sind (Voet und Voet, 1995).

Die an Glycoproteine gebundenen Kohlenhydrate können in die O- und N-Glycane unterteilt werden. Bei N-Glycanen ist ein N-Acetylglucosaminyrest am reduzierenden Ende der Oligosaccharidkette an die Amidgruppe eines Asparagins (N-glycosidisch) gebunden. Dabei muß sich das Asparagin innerhalb eines definierten Aminosäurestrukturmotivs befinden (Asn-X-Thr/Asn-X-Ser, mit X = beliebige Aminosäure). In O-Glycanen werden die Saccharidketten über das reduzierende Ende an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin oder Threonin (O-glycosidisch) befestigt. N-Glycane sind über eine einheitliche *Core*-Region mit dem Peptidrückgrat verbunden; ihre Unterteilung in den High-Mannose, den hybriden oder komplexen Typ erfolgt entsprechend der Kohlenhydratstrukturen, die an dem *Core* befestigt sind.

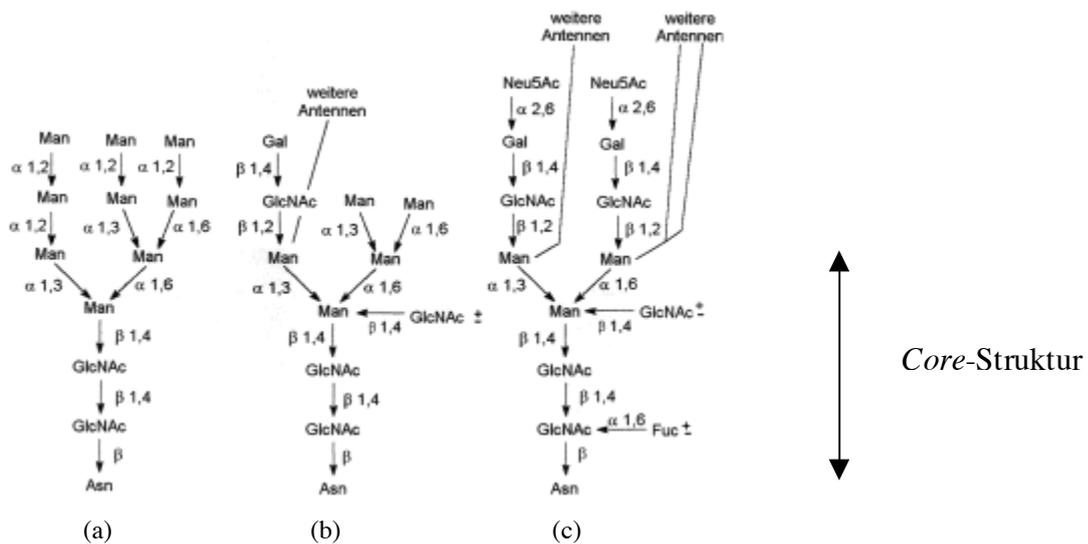


Abb. 2. Schematische Darstellung der Glycanstrukturen auf N-Glycanen. (a) High-Mannose-Glycan, (b) Hybrid-Typ, und (c) komplexer Typ.

Solche Kohlenhydrat-Erkennungssysteme sind an zahlreichen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt, wie sie u.a. während der verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung, der Differenzierung und Reifung von Zellen und Geweben, Entzündungsreaktionen, der Wundheilung, Immunität, der Blutgerinnung, neuronaler Erkennungsmechanismen, der Tumormetastasierung, und der Gefäßneubildung auftreten (Hynes, 1992; Ruoslathi, 1992; Gorski et al., 1994; Feizi, 1985; Springer, 1990; Schachner und Martini, 1995; Schachner, 1997; Brown, 1997).

Die auf der Zelloberfläche exprimierten Kohlenhydratstrukturen können je nach Entwicklungsstadium und Ort ihrer Expression unterschiedliche Funktionen besitzen. In adulten Organismen ist die Expression spezifischer Kohlenhydrate auf besondere Zelltypen beschränkt. Veränderungen der Zelloberflächenkohlenhydrate auf Glycoproteinen sind mit verschiedenen pathologischen Prozessen verknüpft, so z.B. bei Entzündungsreaktionen und der malignen Transformation.

Säuger-Lectine

Die Informationen, die die Glycane auf Glycoproteinen codieren, werden von kohlenhydratbindenden Proteinen, den Lectinen, durch Ausbildung nicht-kovalenter Komplexe abgegriffen. Sie verfügen über Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRD = *carbohydrate recognition domains*), die die Bindungsstelle für die Saccharide beinhalten. Lectine umfassen eine große Gruppe von Proteinen oder Proteindomänen, die Saccharide mit mehr oder weniger hoher Spezifität binden können. Die Einteilung der Lectine erfolgt gemäß ihrer Bindungsspezifität für Monosaccharid- oder Disaccharidstrukturen. Die Dissoziationskonstante für die gebundenen Zuckereinheiten liegen im millimolaren bis micromolaren Bereich (Toone, 1994). Pflanzen- und Microbenlectine sind seit langem bekannt. Säuger-Lectine wurden aufgrund von Homologien in ihrer Primärstruktur zu folgenden Familien zusammengefaßt (Drickamer, 1995; Crocker und Feizi, 1996):

- C-Typ-Lectine, deren Ligandenbindung von divalenten Kationen abhängig ist (Calcium),
- S-Typ-Lectine, in deren dreidimensionaler Struktur Thiolgruppen für die Ligandenbindung eine Rolle spielen,
- P-Typ-Lectine, die Mannose-6-Phosphat binden und
- I-Typ-Lectine, die Ähnlichkeit mit Immunglobulinen haben.

Lectinfamilie	Beispiel
C-type	Selectine (E-, L- P-Selectin) Collectine Proteoglycane Macrophagen-Mannose-Rezeptor Endocytose-Rezeptoren, z.B. Asialoglycoprotein-Rezeptor
P-type	Mannose-6-Phosphat-bindendes Protein
S-type	Galectine 1,2,3,4,5,6,7,8
I-type	CD22 Myelin-assoziiertes Glycoprotein

Tabelle 1. Beispiele für Säugerlectine nach Drickamer et al. (Drickamer und Taylor, 1993; Drickamer, 1995).

Aufgrund ihrer niedrig affinen Interaktionen mit Lectinen sind Kohlenhydratstrukturen oft modulierend an initialen Schritten von Adhäsionsprozessen beteiligt. Eine „tastende“ initiale interzelluläre Wechselwirkung kann dann dadurch zu höher affinen Interaktionen führen, daß Glycane aufgrund ihrer multiantennären Struktur, wie sie in Glycoproteinen realisiert ist, multivalente Wechselwirkungen mit ihren Zielrezeptoren eingehen.

Für eine multivalente Wechselwirkung müssen auch die Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRD; *carbohydrate recognition domains*) vielfach präsentiert oder in Gruppen (als „Cluster“) angeordnet sein (Abb. 3).

Fimbrielle Lectine, die intercalierend und terminal entlang der Fimbrien angeordnet sind, lassen sich entsprechend ihrer Saccharidbindungsspezifität in P-Fimbrien (Galabiosid-spezifisch), S-Fimbrien (Sialinsäure-spezifisch) und Typ-1-Fimbrien (Mannose-spezifisch) unterteilen.

Typ-1-Fimbrien sind helicale, fibrilläre Polymere, die aus einer strukturellen Hauptuntereinheit, dem FimA-Protein (16-18 kD) bestehen, welches zu ca. 98% am Aufbau der Fimbrien beteiligt ist. Zusätzlich ist das fimbrielle Lectin, das FimH-Protein (29-32 kD) Teil der Fimbrienstruktur sowie zwei weitere Proteine unbekannter Funktion, die als FimF und FimG bezeichnet werden (Krogfelt, 1990; Sokurenko et al., 1994; Klemm et al., 1985; Klemm, 1984). Für das fimbrielle Lectin wird eine dreigeteilte CRD postuliert, in die z.B. Trisaccharide gut passen, welche terminal einen Mannoserest tragen (Sharon, 1987). Zusätzlich werden in der Umgebung der CRD aromatische Aminosäuren vermutet. Diese Annahmen stützen sich auf Inhibitionsstudien, in denen die Adhäsion von Typ-1-Fimbrien und Typ-1-fimbrierten Bakterien durch verschiedene Mannose-enhaltende Oligosaccharide und α -Mannoside, die aromatische sowie nicht-aromatische Aglycon-Reste enthielten, gehemmt wurde. In diesen Experimenten waren bestimmte Trisaccharide und Aryl-Mannoside die wirksamsten Inhibitoren (Firon et al., 1982; Firon et al., 1987; Ofek, et al., 1986).

Die Adhäsion der Microben an das Wirtsepithel ist in vielen Fällen eine notwendige Voraussetzung für die kommensale Besiedelung des Darmepithels, aber auch für eine erfolgreiche Infektion. Typ-1-Fimbrien erwiesen sich als Pathogenitätsfaktor, da nur fimbrierte Stämme invasive pathogene Eigenschaften zeigen. Zu den Infektionen, die durch fimbrierte *E. coli*-Stämme hervorgerufen werden können, gehören Infektionen des Urogenitaltraktes, Sepsis, Diarrhoe und Neugeborenen-Meningitis (Hacker, 1990).

Es hat sich herausgestellt, daß klinische Isolate aus Patienten mit urogenitalen Infekten, in denen Typ-1-fimbrierte *E. coli*-Stämme gefunden wurden, zu einem schwerwiegenderen Krankheitsbild führten als nicht-fimbrierte Stämme. In murinen Cystitis-Modellen konnte dieser Befund bestätigt werden. Hier führte die aktive und passive Immunisierung der Mäuse mit Antikörpern, die gegen Typ-1-Fimbrien, Typ-1-

fimbriierten Bakterien, komplementäre Mannosestrukturen, oder das fimbrielle Lectin gerichtet waren, zu einer deutlichen Reduktion der urogenitalen Infektionen (Abraham et al., 1985; Thankavel et al., 1997; Langermann et al., 1997).

Bedeutung der Multivalenz natürlicher Glycane und die Entwicklung von Glycomimetica

Natürliche Glycane besitzen komplexe multiantennäre dreidimensionale Strukturen, welche oft bestimmte Oligosaccharide als Cluster präsentieren. Dadurch wird nicht nur die effektive Bindung an komplementäre Rezeptoren ermöglicht, sondern auch eine besondere Flexibilität und Feinregulation bei spezifischen Adhäsionsprozessen.

Mit Hinblick auf den multiantennären Charakter natürlicher N-Glycane wurden ebenfalls multivalente Glycomimetica entwickelt, in denen die vielfache Anordnung natürlicher Kohlenhydratepitope dreidimensional möglichst korrekt mimikriert werden soll. Dabei soll durch die Bündelung („*Clustering*“) z.B. monomerer Zucker eine hochaffine Bindung der multivalenten Glycomimetika an Zielrezeptoren ermöglicht werden, die für die vielfach angeordneten Zucker-Einheiten spezifisch sind. Die Bedeutung der Multivalenz in Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen wurde *in vitro* durch solche Neoglycokonjugate nachgewiesen. In einer Bindungsstudie konnte durch lineare Erhöhung der Anzahl der monomeren Saccharide auf einem BSA-Konjugat die Affinität zum Rezeptor logarithmisch erhöht werden. Dieses Phänomen, das zuerst für die Bindung hepatischer Säugerlectine an Galactoside beschrieben wurde, wird als *Cluster-Effekt* bezeichnet (Lee, 1978; Lee, 1993; Lee und Lee, 1995).

Zu den wichtigsten multivalenten Glycomimetica gehören die erwähnten BSA-Neoglycokonjugate, Glycodendrimere und Clusterglycoside. Bei Glycodendrimern handelt es sich um baumartig verzweigte Moleküle, die sich generationsweise aufbauen und vergrößern lassen und in der Peripherie mit Sacchariden funktionalisiert sind. Zu ihren prominentesten Vertretern gehören die PAMAM-Dendrimere (PAMAM = **Polyamidoamin**) (Tomalia et al., 1976; Tomalia et al., 1990). In Clusterglycosiden sind kleinere, verzweigte oligofunktionelle Kernmoleküle mit Zuckern glycosyliert.

Beispiele hierfür sind triantennäre Clusterglycoside, die als Kernstruktur Tris (**Tris**(hydroxymethyl)aminomethan) oder Titriplex I (Nitrilotriacetat) enthalten (Lindhorst, 1996; Roy, 1996). Der Vorteil von Glycodendrimeren und Glycoclustern gegenüber Neoglycokonjugaten und Glycopolymeren ist ihre Monodispersität: sie sind chemisch exakt definiert und ihre Valenz und Struktur sind synthetisch steuerbar und nicht nur statistisch vorhersagbar.

Synthetische Glycokonjugate bieten ein breites Spektrum therapeutischer Perspektiven. Sialinsäure enthaltende oligosaccharidische Cluster könnten z.B. zur Inhibition der Adhäsion des Influenza-Hämagglutinins an Wirtszellen eingesetzt wurden, was *in vitro* bereits gezeigt wurde. Ferner wurden synthetische Glycokonjugate zur Blockierung der Interaktion zwischen E-Selectin und Sialinsäure tragenden Glycanen auf Tumorzellen verwendet, um Tumormetastasierung zu inhibieren.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Entwicklung mannosidischer Clusterglycoside, welche zur Inhibition der Adhäsion Mannose-sensitiver Typ-1-Fimbrien von *E. coli* an Erythrocyten eingesetzt wurden (Lindhorst et al., 1998; Kötter et al., 1998). Diese Clustermannoside erwiesen sich um mehr als tausendfach wirksamer als die bekannten monosaccharidischen Referenzinhibitoren, so daß auf dieser Grundlage die Entwicklung noch höher affiner und damit wirksamerer Inhibitoren möglich sein sollte.

Humane Zelladhäsionsmoleküle

Zu den humanen Zelladhäsionsmolekülen gehören fünf Familien, die aufgrund von Sequenzhomologien wie folgt zusammengefaßt wurden:

1. Immunglobuline,
2. Integrine,
3. Selectine,
4. Cadherine, und

5. Mitglieder der CD44-Familie.

Zelladhäsionsmoleküle haben vielfältige Funktionen. Sie sind an morphogenetischen Prozessen während der Ontogenie beteiligt und an der zellulären Organisation von Geweben. Sie beeinflussen die Proliferation von Zellen, die Genexpression, Differenzierungsprozesse sowie Migration und Apoptose. Komplexe multizelluläre Ereignisse werden ebenfalls durch Adhäsionsmoleküle bestimmt, wie Entzündungsreaktionen, Tumormetastasierung, Embryonalentwicklung und Angiogenese (Horwitz et al., 1996). Vielfach werden diese Adhäsionsprozesse durch Protein-Kohlenhydrat-Erkennungsvorgänge vermittelt.

In dieser Arbeit steht ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie, CEACAM1, im Mittelpunkt. Ferner sind Wechselwirkungen zwischen CEACAM1 und E-Selectin relevant. Im folgenden wird daher näher auf diese beiden Adhäsionsmoleküle eingegangen.

CEACAM1

CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP, NCA-160; aktuelle Nomenklatur: CEACAM1, Beauchemin et al., 1999) ist ein Mitglied der CEA-Genfamilie (CEA = Carcinoembryonales Antigen) des CD66 Clusters von hochglycosylierten Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, die der Superfamilie der Immunglobuline angehört. Die CEA-Genfamilie läßt sich in zwei Gruppen einteilen, in die CEA-Familie und die PSG-Familie (PSG = pregnancy specific glycoprotein). Die CEA-Genfamilie ist auf dem humanen Chromosom 19 lokalisiert (q13.1-2) und besteht aus insgesamt 29 Genen, von denen 18 exprimiert werden (Hammarström, 1999). In der Domänenstruktur weisen die einzelnen Familienmitglieder der CEA-Familie hohe Homologien zueinander auf; sie verfügen über eine extrazelluläre N-terminale Domäne, die zu der variablen Domäne der Immunglobuline homolog ist (IgV) sowie über eine unterschiedliche Anzahl von extrazellulären Domänen, die den konstanten Domänen der Immunglobuline entsprechen (IgC2). Der Großteil der Moleküle ist über einen GPI-Anker in der Plasmamembran gebunden; CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4

verfügen über eine cytoplasmatische Domäne, die die Interaktion mit signaltransduktorischen Komponenten ermöglicht.

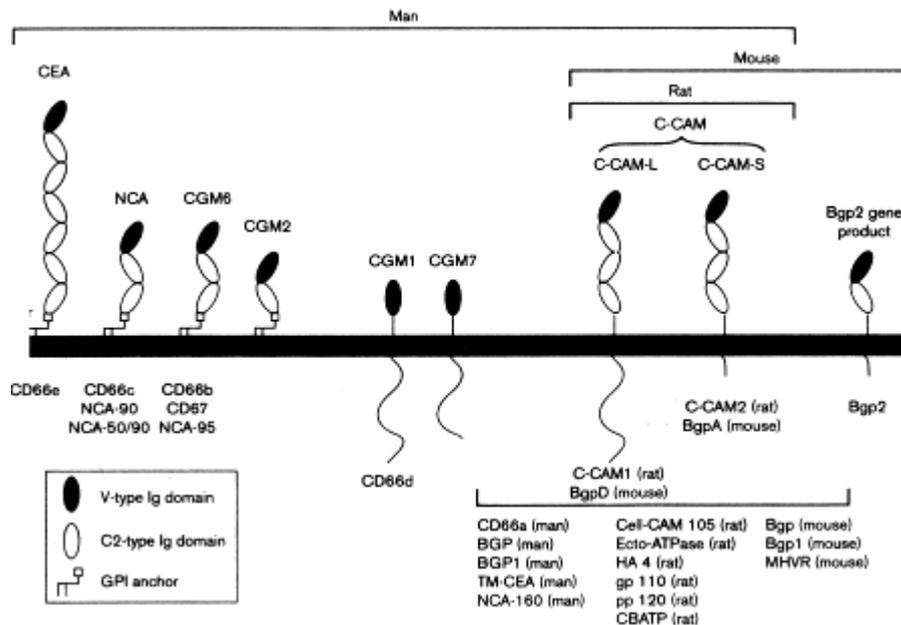


Abb. 4. Schematische Darstellung der Mitglieder der CEA-Genfamilie. Die einzelnen Mitglieder weisen hohe Homologien untereinander und zwischen verschiedenen Spezies auf (Öbrink, 1997).

CEACAM1 weist ein breites Expressionspektrum in humanen Epithelien auf (Gastrointestinaltrakt, Niere, Cervix, Endometrium, Blase). In der myeloischen Reihe wird CEACAM1 hauptsächlich durch Granulocyten exprimiert; auf Lymphocyten konnte es bisher nur in T-Zell-Leukämien und stimulierten T-Lymphocyten nachgewiesen werden (Hanenberg et al., 1994; Kammerer et al., 1998). CEACAM1 ist neben CEACAM3 und CEACAM4 das einzige Mitglied der CEA-Genfamilie, das neben einer transmembranösen Domäne auch über einen cytoplasmatischen Anteil verfügt, der Interaktionen mit Adaptermolekülen in intrazellulären Signaltransduktionskaskaden erlaubt.

CEACAM1 verfügt über eine cytoplasmatische Domäne, die sowohl Bindungsmotive für aktivierende als auch inhibitorische Komponenten in der Signaltransduktion enthält; dies ist ein Grund dafür, daß CEACAM1 Eigenschaften als Tumorsuppressor

und Differenzierungsmarker zugeschrieben werden können, und daß es in einigen Tumoren zur Hochregulation der CEACAM1-Expression kommt.

Als intrazelluläre Liganden, die an stimulatorische Adaptermoleküle der Signaltransduktion binden, wurden Mitglieder der src-Kinase-Familie identifiziert (c-src, lyn und fck). Sie binden nach Phosphorylierung zweier Tyrosinreste in einem ITAM-ähnlichen (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) Abschnitt in der cytoplasmatischen Domäne. Als negative regulatorische Komponenten, die an phosphorylierte Tyrosin- bzw. Serinreste in einem ITIM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) binden, wurden Phosphatasen (SHP1 und SHP2) identifiziert [(Brümmer et al., 1995; Skubitz et al., 1995; Beauchemin et al., 1997; Huber et al., 1999). Ferner konnte die Interaktion zwischen der Cytoskelettkomponente Actin und des cytoskelettbindenden, Ca²⁺-abhängigen Proteins Calmodulin mit CEACAM1 nachgewiesen werden (Da Silva-Azevedo et al., 1999; Edlund et al., 1996; Edlund und Öbrink, 1993).

Als Resultat der Bindung intrazellulärer signaltransduzierender Proteine und Kontakt zum Cytoskelett kann CEACAM1 modulierend auf Signaltransduktionskaskaden und die Organisation des Cytoskeletts einwirken. Dadurch kann es zur Veränderung der Genexpression kommen, womit CEACAM1 Einflüsse auf die Zellproliferation und -differenzierung nehmen kann.

Mitglieder der CEA-Familie sind komplex glycosylierte Proteine, deren Glycanstrukturen ausschließlich N-glycosidisch mit dem Protein verknüpft sind. Mindestens 35% des Molekulargewichtes von CEACAM1 (160 kD) sind durch die Glycosylierung bestimmt (Yamashita et al., 1987; Yamashita et al., 1989). CEACAM1 verfügt über 20 Motive für eine N-Glycosylierung (Hinoda et al., 1989; Hinoda et al., 1988). Domänenspezifische Glycosylierung ist bisher nur für die A2-Domäne bekannt, die High-Mannosereste trägt (Mahrenholtz et al., 1993;. Ferner wurden Lewis^x und Sialyl-Lewis^x-Determinanten nachgewiesen (Stocks und Kerr, 1993; Stocks et al., 1990).

Über die biologische Bedeutung des humanen CEACAM1 konnten bisher folgende Annahmen gemacht werden (Rojas et al., 1990; Prall et al., 1996; Frängsmyr et al., 1995; Hammarström, 1999; Virji et al., 1996; Virji et al., 1996):

- CEACAM1 vermittelt homo- und heterotypische Zell-Zell-Adhäsionsprozesse, bei denen divalente Kationen eine Rolle spielen könnten,
- in myeloischen Zellen und Darmepithelzellen ist es ein Differenzierungsmarker,
- CEACAM1 stimuliert die Aktivierung von Integrinen auf neutrophilen Granulocyten,
- es ist einer der prominenten Träger von CD15 und CD15s (Lewis^x/Sialyl-Lewis^x) Epitopen auf Granulocyten
- die Expression von CEACAM1 ist in malignen Geweben dysreguliert,
- CEACAM1 wird durch Endothelzellen in Kapillaren von Tumoren und im Endometrium, nicht aber in größeren Gefäßen exprimiert,
- CEACAM1 interagiert mit intrazellulären signaltransduktorisches Komponenten, die zu einer Veränderung der Genexpression führen könnten, und
- CEACAM1 wurde als zellulärer Rezeptor für *Neisserien* identifiziert.

Über die biologische Funktion einzelner Glycoepitope auf CEACAM1 ist jedoch wenig bekannt. Sie sollen Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit sein.

Selectine

Selectine („*Selective lectin-dependent cell adhesion molecules*“) sind drei eng miteinander verwandte Adhäsionsmoleküle, die Calcium-abhängige Zell-Zell-Interaktionen zwischen Leukocyten, Thrombocyten und Endothelzellen vermitteln.

Entsprechend ihrer Expression werden die Selectine als **E-Selectin** (exprimiert auf Cytokin- oder Endotoxin-aktiviertem Endothel), **L-Selectin** (konstitutiv exprimiert auf Leukocyten) und **P-Selectin** (Induktion der Expression nach Stimulation von Plättchen und Endothelzellen mit Gerinnungsfaktoren und Entzündungsmediatoren) bezeichnet.

Sie bestehen aus einer N-terminalen Lectindomäne, die denen der Calcium-abhängigen Lectine gleicht, gefolgt von einer Domäne, die homolog zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ist und einer variablen Anzahl von Konsensussequenzen komplementbindender Proteine. Die Selectine sind transmembranöse Proteine, die über eine cytoplasmatische Domäne verfügen (Nelson et al., 1995; Carlos et al., 1994; Lasky, 1992; McEver et al., 1995; McEver, 1994).

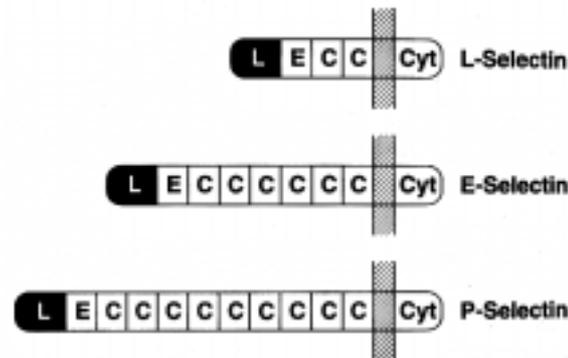


Abb. 5. Schematische Darstellung der drei Selectine, einer Gruppe von C-Typ-Lectinen. Die einzelnen Domänen sind mit L=Lectindomäne, E=dem epidermalen Wachstumsfaktor homologe Domäne, C=Komplementprotein-Konsensus-Domänen und Cyt=cytoplasmatische Domäne bezeichnet (Wagener, 1999).

Selectine binden an sialylierte, fucosylierte Lactosaminoglycane auf Glycoproteinen oder Glycolipiden. Der Prototyp des E-Selectin-Liganden ist das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x, das terminal auf komplexen Kohlenhydratseitenketten von Glycoproteinen auf Leukocyten, insbesondere Granulocyten, exprimiert wird. Sein Isomer, sialyl Lewis^a, wird ebenfalls von E-Selectin erkannt. Die Gegenwart von Fucose- und Sialinsäureresten ist für die Bindung an E-Selectin essentiell (Walz et al., 1990; Polley et al., 1991; Phillips et al., 1990; Tyrrell et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, daß die Adhäsion von Leukocyten an E-Selectin durch Sialyl-Lewis^x-Mimetica inhibierbar ist (Hallahan et al., 1997). Zu den biologischen Prozessen, die durch E-Selectin vermittelt werden, gehören die Adhäsion und Migration von Leukocyten an Endothelien, Tumormetastasierung sowie Angiogenese.

Adhäsion von neutrophilen Granulocyten an Endothelien

Selectine vermitteln regionale inflammatorische Antworten durch die Erkennung zellspezifischer Kohlenhydrate. Die Bindung von Selectinen an Zelloberflächenkohlenhydratliganden erlaubt zirkulierenden Leukocyten die kurzzeitige Anheftung und das Entlangrollen an Gefäßwänden. Durch diese niedrig-affinen Kontakte zur Gefäßwand werden die Leukocyten durch die dort sezernierten Chemokine und exprimierten Adhäsionsmoleküle stimuliert. Über ihre dadurch aktivierten Integrine adhären die Leukocyten hochaffin an Ig-Familienmitglieder (=Liganden) auf dem Endothel. Als Antwort auf einen chemotaktischen Gradienten, der durch Entzündungsmediatoren im aktivierten Endothel gebildet wird, benutzen die Leukocyten ihre Integrine, um durch das Endothel an den Ort der Entzündung zu wandern. Durch Signaltransduktionsprozesse, die von den Integrinen ausgelöst werden, wird die Reorganisation des Cytoskeletts der Leukocyten eingeleitet. Ein Abflachen der Zellen und ihr anschließender Durchtritt durch die Gefäßwände wird dadurch erleichtert (McEver, 1994; McEver et al., 1995; Carlos et al., 1994; Lasky, 1992; Varki, 1997; Imhof und Dunon, 1997).

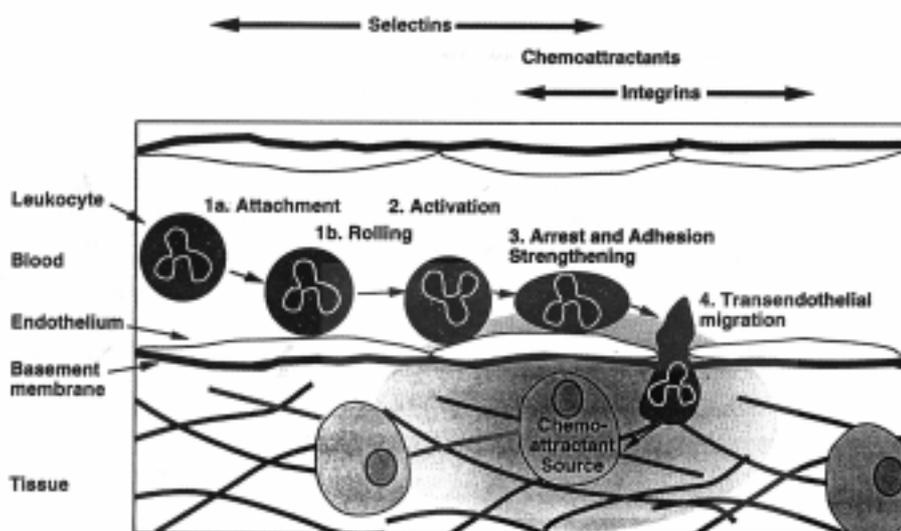


Abb. 6. Leukocytenextravasation in ein entzündetes Gewebe (Springer, 1994). Die Adhäsionsmoleküle, die in den einzelnen Phasen der Migration eine Rolle spielen, sind oben in der Abbildung erwähnt.

Mechanismen der Tumormetastasierung und Angiogenese

In der metastatischen Kaskade lösen sich Tumorzellen eines Primärtumors aus ihrem Verband, invadieren das umliegende Stroma und treten dann in das vaskuläre oder lymphatische System über. Um eine Metastase in einem entfernten Gewebe bilden zu können, müssen die disseminierten Zellen im Blutgefäßsystem zunächst überleben, bevor sie nach Adhäsion an das dortige Endothel in das Organ eindringen.

Viele dieser Schritte sind mit der Extravasation von Leukocyten in entzündete Gewebe vergleichbar oder auch mit der Gewebsneubildung bei der Wundheilung. In allen Fällen kommt es zu Veränderungen in der zellulären Adhäsion, zur Produktion proteolytischer Enzyme und zum Abbau des Stromas sowie zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, die zur Aktivierung von Stroma- und Endothelzellen führen (Bazzoni et al., 1999; Hanahan und Folkman, 1996; Meyer et al., 1998; Folkman, 1995; Woodhouse et al., 1997).

Angiogenese tritt im Adultus physiologischerweise nur während der Proliferation des Endometriums und der Reifung des Corpus Luteum auf; die im Verlauf des Tumorwachstums neugebildeten Gefäße unterscheiden sich von normalen Blutgefäßen dahingehend, daß sie höhere Permeabilität aufweisen, über weniger Basalmembrananteile verfügen und daß die Proliferationsrate höher ist als in Endothelien gesunder Gewebe (Hobson et al., 1984).

Den einzelnen Stadien der metastatischen Kaskade können regulatorische Einflüsse verschiedener Zelladhäsionsmoleküle zugeordnet werden (Strömblad und Cheresch, 1996; Bischoff, 1997): Im frühen Stadium der malignen Progression korreliert der Verlust des Zusammenhalts einzelner Zellen im Gewebe (Epithel) häufig mit einer Veränderung der Eigenschaften von Mitgliedern der Cadherinfamilie.

Bei der Wechselwirkung der auswandernden Zellen mit der extrazellulären Matrix spielen Integrine eine herausragende Rolle. Weitere Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie und/oder der Selectin-Familie, sind an der heterophilen Zell-Zell-Wechselwirkung von disseminierten Tumorzellen und dem

Endothel der Zielorgane beteiligt (Meyer et al., 1998; Bazzoni et al., 1999). Zu weiteren Glycan-Rezeptor-Interaktionen, die bei der Tumormetastasierung eine Rolle spielen, gehört die Wechselwirkung zwischen CD44-Molekülen und Glucuronsäuren sowie die Interaktion zwischen β -Galactosiden und Galectinen (Turner und Catteral, 1997).

Angiogenese

Die Gefäßneubildung (Angiogenese) wird durch ein komplexes Netzwerk aus angiogenetischen Stimulatoren und Inhibitoren reguliert. Von Folkman wurde die Hypothese aufgestellt, daß eine Gefäßneubildung das Ergebnis der Gleichgewichtsverschiebung der Konzentrationen solcher Stimulatoren und Inhibitoren zueinander ist („*Balance hypothesis of the angiogenic switch*“; (Hanahan, 1996)). Zu den angiogenetischen Stimulatoren gehören von Tumoren und entzündeten Geweben produzierte Substanzen, die zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Chemokine gehören (VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; FGF = Fibroblastenwachstumsfaktor oder TNF α = Tumornekrosefaktor α). Zu den Inhibitoren gehören Substanzen, die von gesunden Zellen und Geweben produziert werden, z.B. Endostatin und Retinsäure (Wagener, 1999).

Die Angiogenese kann in drei Phasen unterteilt werden (Strömblad und Cheresch, 1996):

1. **Initiation**, in der angiogenetische Stimulatoren (bFGF, VEGF) von dem Tumor/dem entzündeten Gewebe freigesetzt werden und die Invasions- und Proliferationsphase auslösen.
2. **Invasions- und Proliferationsphase**, in der die Endothelzellen stark proliferieren. Sie sezernieren proteolytische Enzyme und Komponenten der extrazellulären Matrix und exprimieren vermehrt Zelladhäsionsmoleküle. Die Sekretion von

Proteasen und Molekülen der extrazellulären Matrix führen nun zu einer Umbildung des extrazellulären Milieus. Dieses dient dazu, das Überleben und die Proliferation der Endothelzellen in den Gefäßen zu sichern sowie die Migration zu erleichtern. Die Migration der Zellen führt zur Einsprossung von Gefäßen in das Tumorporenchym. Der Prozess der Angiogenese wird durch die Reifungsphase abgeschlossen.

3. **Reifungsphase**, in der sich die Endothelzellen strecken und die abgeschlossene Gefäßstruktur bilden, indem sie Kontakt zu einer neusynthetisierten Basallamina aufnehmen.

Nachdem der durch E-Selectin und Sialyl-Lewis^x-Epitope vermittelte Mechanismus der Leukocytenadhäsion an aktivierte Endothelien bekannt war, wurde ein ähnlicher Mechanismus für die Metastasierung von Tumorzellen und die Migration von Endothelzellen während der Gefäßneubildung postuliert. Inzwischen gibt es zahlreiche Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen der Expression von E-Selectin, verstärkter Expression von Lewis-Antigenen und Tumormetastasierungsprozessen in experimentellen Modellen und auf der Basis von Patientendaten beschreiben. Zusammenfassend läßt sich daraus ein erhöhtes Metastasierungspotential primärer Tumoren ableiten, in denen die Lewis-Antigene, insbesondere Sialyl-Lewis^x, hochreguliert sind oder aber E-Selectin in den Endothelien vermehrt exprimiert wird. Dieses geht mit einer schlechten Prognose für an Colon- oder Lungencarcinom erkrankten Patienten einher. Die folgende Tabelle stellt einige der aktuellen Arbeiten zusammen:

Tumor(-zelllinie)	Referenz
Blasencarcinom	Skorstengaard et al., 1999
Coloncarcinom	Sawada et al., 1998
Coloncarcinom	Kim et al., 1999
Coloncarcinom/Adhärenz an HDMEC	Danecker et al., 1996
Coloncarcinom/Adhärenz an HUVEC	Sawada et al., 1994
Coloncarcinom/Lebermetastasen	Tanaka, et al., 1999
Coloncarcinom/Lebermetastasen	Weston et al., 1999
Coloncarcinom/Lebermetastasen	Nakamori et al., 1997
Coloncarcinom/Lebermetastasen	Matsushita et al., 1998
Coloncarcinom/Lebermetastasen	Ono et al., 1996
Coloncarcinom; sE-Selectin	Takahashi et al., 1998
Fibrosarkom/Adhärenz an HUVEC	Okada et al., 1994
Hals-und Kopfweichteilcarcinom	Farmer et al., 1998
Lungencarcinom	Fukuoka et al., 1998
Lungencarcinom	Martin-Satue et al., 1998
Lungencarcinom	Khatib et al., 1999
Lungencarcinom	Martin-Satue et al., 1999
Magencarcinom	Ikeda et al., 1996
Magencarcinom/Adhärenz an HUVEC	Nakashio et al., 1997
Magencarcinom/Lebermetastasen	Tatsumi et al., 1998
Magencarcinom; sE-Selectin	Benekli et al., 1998
Mammacarcinom	Renkonen et al., 1997
Mammacarcinom, sE-Selectin im Serum	Zhang et al., 1999
Mammacarcinom; sE-Selectin im Serum	Matsuura et al., 1997
Melanom	Araki et al., 1997
Melanom/Lungenmetastasen	Saiki et al., 1996
Prostatacarcinom	Jorgensen et al., 1997
Renales Carcinom/Adhärenz an HUVEC	Steinbach et al., 1996

Tabelle 2. Publikationen über die Beteiligung von Lewis-Antigenen und E-Selectin bei verschiedenen Metastasierungsprozessen.

Resümee und Fragestellung

Das humane Adhäsionsmolekül CEACAM1 (CD66a), das an zellulären Differenzierungs- und Aktivierungsprozessen beteiligt ist, verfügt über komplexe Glycane, die zu 35% zu seinem Molekulargewicht beitragen. Auf neutrophilen Granulocyten ist CEACAM1 ein prominenter Träger von Lewis-Antigenen (Lewis^x (CD15) und Sialyl-Lewis^x(CD15s)). Durch Massenspektrometrie konnten auch High-Mannose-Epitope auf CEACAM1 nachgewiesen werden. Über die biologische Funktion der Glycane auf CEACAM1 ist wenig bekannt. Da CEACAM1 auf zahlreichen Epithelien exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, daß es als ein ubiquitärer Bestandteil der Glycocalix von Epithelien nicht nur über strukturgebende Eigenschaften verfügt, sondern auch ein Kandidat für die Regulation der kommensalen Bakterienflora ist. In diesem Zusammenhang ist CEACAM1 auch ein möglicher Bindungspartner für pathogene Keime. Da es auf Epithelien und neutrophilen Granulocyten exprimiert wird, kann postuliert werden, daß CEACAM1 eine Rolle bei der angeborenen Immunität spielt.

Die Expression von Lewis-Antigenen macht CEACAM1 zu einem potentiellen Liganden für das C-Typ-Lectin E-Selectin. E-Selectin ist ein Adhäsionsmolekül, das an Entzündungsprozessen, der Leukocytenmigration, der Metastasierung von Tumoren und der Wanderung von Endothelzellen bei der Angiogenese beteiligt ist.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die biologische Funktion der Glycane, die auf CEACAM1 exprimiert werden, in einen physiologischen Zusammenhang einzuordnen. Die Schwerpunkte liegen hierbei auf der Interaktion von CEACAM1 mit Mannose-sensitiven Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* und der Bedeutung von CEACAM1 als Träger von Sialyl-Lewis^x-Epitopen.

Konkret wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Haben die High-Mannose-Gruppen von CEACAM1 eine Funktion als Rezeptor für Typ-1-fimbrierte Bakterien?
2. Spielen CEACAM1 und die Sialyl-Lewis^x-Gruppen von CEACAM1 eine Rolle bei der Metastasierung?
3. Welche Funktion haben die Sialyl-Lewis^x-Gruppen von CEACAM1 bei der Gefäßneubildung?

Material

Chemikalien

Sofern es nicht anders im Text an entsprechender Stelle erwähnt ist, wurden die verwendeten Chemikalien und Lösungen in analytischer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Es wurde für die Proteinchemie ausschließlich zweifach destilliertes Wasser eingesetzt. Für die immunologischen, zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden wurde steriles Wasser zu Injektionszwecken bzw. autoklaviertes Wasser als Reagenz und zum Ansetzen der Lösungen/Puffer benutzt.

Geräte

Analysewaagen	Mettler, Gießen
Autoklaven	Tecnomara, Fernwald
Bioreaktor, CellPharm (Hollow Fibre)	Heraeus/in vitro- Systems, Hanau
Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Zapf, Sarstedt
Chromatographieanlagen	DuoFlow, Fa. Biorad, München; FPLC, Pharmacia LKB, München
Durchflußcytometer	FACSCalibur, Becton und Dickinson, Vertrieb: Heidelberg
Elektronenmikroskop, CM100	Philips, Hamburg
ELISA-Platten-Photometer	SLT, Crailsheim
Filmkassetten und Röntgenfilme	Amersham/Pharmacia LKB, München
Gelkammern und Zubehör	Biometra, Göttingen
Heizblöcke	Flow Laboratories, Meckenheim
Hybridisierofen	Flow Laboratories, Meckenheim
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop	Zeiss (Zeiss Invers 410), Jena
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Mikrotom	Leica, Bensheim

PCR-Gerät, Minicycler	Biozym, Hamburg
pH-Meter	Beckman, München
Pipetten	eppendorf, Hamburg
Polaroid Kamera, Filme	Polaroid, Hertfordshire, UK
Säulenmäntel	Pharmacia LKB, München
Spannungsgerät für die Elektrophorese sterile Werkbank	Biometra, Göttingen Flow Laboratories, Meckenheim
Strahlungsmeßgerät	Berthold, München
Transilluminator (254 nm)	Herolab, St. Leon-Rot
UV-Spectralphotometer (UV-160)	Shimadzu, Japan
Wasserbad	Flow Laboratories, Meckenheim
Whatman-Papier	Whatman, Kent, UK
Zentrifugen	
Sorvall RC5C, Rotoren SS34 und GSA	Sorvall/DuPont,
Hettich Rotosilenta	Bad Homburg
eppendorf Tischzentrifugen	Hettich, Tuttlingen eppendorf, Hamburg
sonstige Verbrauchsmaterialien:	
Boyden-Kammer	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Dialyseschläuche (Ausschlußvolumen 16-20 kD)	Biomol, Hamburg
Glasgeräte (Flaschen, Küvetten)	Schott, Mainz
Nap-5-Säulen (Sephadex-G25)	Pharmacia LKB, München
Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
Nylonmembranen (Genescreen Plus)	NEN Du Pont, Bad Homburg
Scintillationszähler (Tricarb)	Canberra Packard, Frankfurt
sterile Plastikartikel	Falcon und Greiner, beide Vertrieb durch Merck, Darmstadt; Nunc, Wiesbaden; Braun, Melsungen; Becton und Dickinson, Vertrieb: Heidelberg; Sarstedt, Nürnbrecht
Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlußvolumen 5, 10, 30, 50 und 100 kD)	Amicon, Witten Millipore, Eschborn

Antikörper

Detektionsantikörper (primäre Antikörper)

Antikörper, Subklasse

Zielantigen

4D1/C2, muriner IgG1-Antikörper, Prof. Dr. C. Wagener

humanes CEACAM1

Polyclonales Kaninchen-Antiserum, Prof. Dr. J. Hacker

Typ 1 Fimbrien aus *E. coli*

T84.1, muriner IgG1-Antikörper, Prof. Dr. J. Shively, Prof. Dr. C. Wagener

humanes CEACAM1, CEACAM3, CEA, CEACAM4

2H5, muriner IgM-Antikörper, Becton und Dickinson, Heidelberg

humanes CD15s (Sialyl-Lewis^x)

MMA, IgM aus der Maus, Becton und Dickinson, Heidelberg

humanes CD15 (Lewis^x)

L5, IgM aus der Ratte, Prof. Dr. M. Schachner

humanes CD15 (Lewis^x)
humanes CEA,
CEACAM1

Lectine

Galectin-1, Prof. Dr. H.-J. Gabius

Lactosaminoglycane

Sekundäre, markierte und enzymgekoppelte Antikörper

Sekundärantikörper

Streptavidin-Peroxidase

DAKO, Hamburg

Streptavidin-LRSC

Dianova, Hamburg

Streptavidin-DTAF

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus-FITC

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus, Fc-Fragment-spezifisch-Peroxidase

DAKO, Hamburg

Ziege-anti-Maus, Fc-Fragment-spezifisch-Alkalische Phosphatase

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus, Fc-Fragment-spezifisch-DTAF

Dianova, Hamburg

Kaninchen-anti-Ratte, μ -Ketten-spezifisch-Peroxidase

Sigma, Deisenhofen

Ziege-anti-Maus, μ -Ketten-spezifisch-Peroxidase

Sigma, Deisenhofen

Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase

Dianova, Hamburg

Reagenzien für die Zellkultur und Immuncytochemie

Seren

Normales Schweineserum	DAKO, Hamburg
Fötales Rinderserum (FBS), normaler IgG-Gehalt	Life Technologies, Eggenstein
Fötales Rinderserum, reduzierter IgG-Gehalt	Life Technologies, Eggenstein

Zellkulturmedien

RPMI 1640	Life Technologies, Eggenstein
McCoy's modified Eagle Medium 5A	Life Technologies, Eggenstein
Endothelzellmedium (Earle's Medium 199)	Promocell, Heidelberg

Zelllinien

HT29	ETCC, <i>European Tissue Culture Collection</i> , Porton Down, UK
HT29mdr	Derivat von HT29, colchicinbehandelt
HDMEC	Promocell, Heidelberg
T84.1-Hybridoma	Prof. Dr. J. Shively, Prof. Dr. C. Wagener
4D1/C2-Hybridoma	Prof. Dr. C. Wagener

Bakterien

HB101, pPK14	Prof. Dr. P. Klemm, Prof. Dr. J. Hacker
--------------	---

Sonstige Chemikalien und Kits

Mycoplasmen-Detektionskit	Roche, Mannheim
XX-Biotin-SE (Biotinester mit C12-Spacer)	Molecular Probes, Leiden
Diff-Quick	Dade Behring, Schweiz
Collagen	Collagen Corp., Fremont, USA
MAPS-Puffer	Biorad, München

Enzyme

Taq-Polymerase (Amplitaq gold)	Perkin Elmer
PNGaseF	Roche, Mannheim
Klenow Fragment aus <i>E. coli</i>	Amersham/Pharmacia LKB, München

Versuchstiere

Scid/scid-Mäuse (Balb/c C57BL/Kalgh-I
scid/scid)

Tierhaltung UKE, Hamburg

Methoden

Proteinchemische Methoden

1 Gewinnung von Proteinen

1.1 Isolierung von Granulocyten aus Buffy Coats

Die Isolierung humaner Granulocyten wurde nach Stoffel et al. durchgeführt (Stoffel et al., 1993). Aus Buffy Coats wurde im Großmaßstab (ca. 500 Buffy Coats) die Granulocytenfraktion durch Zentrifugation in 11-Zentrifugenflaschen abgetrennt (Schwing-Rotor, Hettich-Kühlzentrifuge, 20 min., 2.000 Upm, 4°C). Der weiße Ring, der die Granulocyten enthielt, wurde abgeerntet und in frische 250ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die verbliebenen Erythrocyten wurden durch Resuspendieren der Zellen im fünffachen Volumen Ammoniumchlorid-Puffer lysiert. Die lysierten Erythrocyten wurden von den intakten Granulocyten durch Zentrifugation abgetrennt (Sorvall Kühlzentrifuge, GSA-Rotor, 1.500 Upm, 20 min., 4°C). Das Zellpellet wurde insgesamt drei Mal mit Ammoniumchlorid-Puffer gewaschen, bis es eine weißliche Färbung aufwies. Die Granulocyten wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, w.o. zentrifugiert und anschließend einer Detergenzienextraktion unterzogen.

1.1.1 Detergenzienextraktion von Membranproteinen aus Granulocyten

Die in PBS gewaschenen Leukocyten wurden 1:1 (v/v) mit zweifach konzentriertem Extraktionspuffer versetzt und über Nacht bei 4°C unter stetem Schütteln inkubiert. Die Extrakte wurden in der Sorvall-Zentrifuge bei 20.000 x g für 60 min. bei 4°C abzentrifugiert. Die löslichen Überstände wurden bei -20°C gelagert.

1.2 Extraktion von Proteinen aus Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde direkt nach der Operation in flüssigem Stickstoff eingefroren. In einem sterilen Mörser wurde das Gewebe, in Stickstoff gekühlt, zu einem feinen Pulver zerrieben und anschließend w.o. mit einfach konzentriertem Extraktionspuffer behandelt. Die lösliche Proteinfraction wurde nach Zentrifugation w.o. bei -20°C gelagert.

Lösungen:

Ammoniumchlorid-Puffer

155 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA

Extraktionspuffer, zweifach konzentriert, in PBS

2% Triton X-100 (w/v), 10 mM Benzamidin, 20 mM EDTA, 20 mM 6-Aminohexansäure, 4 mM PMSF

PMSF (Stocklösung 0,5M)

25 g PMSF werden in 288 ml Isopropanol gelöst und bei -20°C gelagert.

1.3 Isolierung der Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*

1.3.1 Anzucht von rekombinanten *E. coli* (HB101/pPK14)

Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* wurden aus dem Laborstamm HB101 isoliert, der mit dem Plasmid pPK14 transfiziert ist. HB101 weist per se keine mannose-spezifische Adhäsion auf, die erst nach Transfektion mit dem Plasmid pPK14 und Expression von mannose-spezifischen Typ-1-Fimbrien induziert wird. Das Plasmid pPK14 enthält den gesamten Gencluster für die Expression von Typ-1-Fimbrien (Klemm et al., 1989). Die Isolierung und Reinigung erfolgte durch Kombination verschiedener Originalmethoden (Dodd und Eisenstein, 1982; Eshdat et al., 1982; Eshdat et al., 1981, Ofek et al., 1986; Klemm et al., 1989). Auf 100 Petrischalen (Ø 15 cm, Nunc) mit je ca. 50 ml Luria-

Bertani-Medium (LB-Medium), 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, wurde der *E. coli* Stamm HB101 / pPKL4 mit einer Impföse auf LB-Agar/Ampicillin ausgestrichen und 48 h bei 37 °C bebrütet (Sambrook und Maniatis, 1989; Klemm et al., 1989).

1.3.2 Isolierung der Typ-1-Fimbrien

Der Bakterienrasen wurde mit einem Spatel abgenommen und in ein Becherglas überführt. Die Resuspension der Bakterienmasse erfolgte auf Eis mit 50 mM Tris/HCl, 0,05 % Natriumazid, pH 7,8. Die Suspension wurde für 20 min. bei 4°C, 5.000 Upm (4.068 x g) zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, GSA-Rotor). Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet w.o. in eisgekühltem 50mM Tris-Puffer resuspendiert. Es wurde in 60 ml 50 mM Tris-Puffer w.o. aufgenommen. Die Fimbrien wurden mechanisch in einem Omni-Mixer (Sorvall) auf Eis (Stufe 3, drei Mal 5 min.) abgeschert. Die Suspension wurde 20 min. bei 4 °C in der Sorvall Zentrifuge zentrifugiert (GSA Rotor, ca. 16.270 x g). Das Pellet wurde mit 50 mM Tris-Puffer (w.o.) gewaschen und resuspendiert und w.o. zentrifugiert. Die Überstände, die die Fimbrien enthielten, wurden auf Eis vereinigt.

Lösungen:

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)/NaOH, pH 7,5

10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco) und 5 g NaCl werden mit Wasser zu 1.000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

LB-Agar

LB-Medium, 1,5% (w/v) Agar, autoklavieren. Nach Abkühlen wurde Ampicillin w.o. zugesetzt.

Tris/HCl-Puffer, pH 7,8

10 mM Tris, 0,05% Natriumazid (w/v)

2 Reinigung von Proteinen

2.1 Ammoniumsulfatfällung der Typ-1-Fimbrien aus dem Überstand

Um die Fimbrien von anderen Proteinen in dem Überstand zu trennen, wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Hierbei können Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit bei verschiedenen Salzkonzentrationen selektiv ausgefällt werden ("*salting-out-effect*"; England et al., 1990). Die Ausfällung der Fimbrien aus dem Überstand wurde dieser bis zu einer Sättigung von ca. 12 % mit 10,5 g kristallinem Ammoniumsulfat versetzt (Dawson, 1986). Die Fimbrien bildeten einen weißen Niederschlag, während andere, kontaminierende Proteine in Lösung blieben. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (20 min, 4°C, 16.270 x g, Sorvall Zentrifuge, GSA-Rotor), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, aufgenommen und resuspendiert. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats aus der Proteinlösung wurden die Proben für 48 h bei 4 °C gegen eine 500fache Vorlage von 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,5 % Natriumdideoxycholat (Biozol) dialysiert. Der Puffer wurde jeweils nach 16 h erneuert.

Lösungen:

Dialysepuffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,5 % (w/v) Natriumdideoxycholat

2.2 Entfernung von Natriumdideoxycholat

Zur Entfernung des Detergenz Natriumdideoxycholat wurde ein Detergenz-adsorbierendes Granulat (Amberlite-Beads, XAD-16) eingesetzt. Die Fimbrienlösung wurde hierfür in Dialyseschläuche gegeben und wie oben gegen 10 mM Tris/HCl-Puffer dialysiert. In das Dialysebad wurde zusätzlich XAD-16 Detergenz-Absorber-Granulat gegeben. Die Lösung wurde unter zweimaligem Wechseln einer 500fachen Vorlage für 48h bei 4°C dialysiert.

2.3 Charakterisierung der Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*

Die gereinigten Typ-1-Fimbrien wurden durch Analyse in der Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung, Immunoblotting und Elektronenmikroskopie charakterisiert. Die funktionelle Charakterisierung, d.h. die Mannose-spezifische Adhäsion, wurde durch einen Hefe-Agglutinationstest überprüft.

2.4 Hefe-Agglutinationstest

Analog zu der von Lindhorst et al. beschriebenen Agglutination von Erythrocyten durch Typ-1-Fimbrien wurden die hier isolierten Typ-1-Fimbrien auf ihre Agglutinationsfähigkeit von intakten Hefezellen sowie Hefe-Mannan untersucht (Lindhorst et al., 1998). Lyophilisierte Hefe (*S. cerevisiae*) und Hefe-Mannan (Sigma) wurden zu einer Endkonzentration von 2mg/ml in PBS gelöst. Von den Suspensionen wurden je 100 μ l auf Objektträger getropft. Gereinigte Typ-1-Fimbrien wurden in verschiedenen Verdünnungen dazu gegeben.

2.5 Reinigung der monoklonalen Antikörper T84.1 und 4D1/C2 aus Zellkulturüberständen über immobilisiertes Protein A (Protein A-Sepharose)

Die Aufreinigung der mAb T84.1 und 4D1/C2 wurde an der Chromatographieanlage (DuoFlow, Biorad) bei 4°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast.

Die murinen Antikörper T84.1 und 4D1/C2 (beide IgG1-Subklasse) wurden durch Affinitätschromatographie aus Hybridomaüberständen über Protein A aus *Staphylococcus aureus* (SPA) aufgereinigt. Beide Hybridomalinien wurden detailliert beschrieben (Wagener et al., 1983; Drzeniek et al., 1991). SPA bindet Antikörper über die Fc-Region (Hjelm et al., 1972; Ey et al., 1978). Da die Affinität muriner Immunglobuline zu Protein A gering ist, wurde die Bindung an die Protein-A-Matrix durch Verwendung eines alkalischen, hochmolaren Salzpuffers unterstützt. Durch einen pH-Sprung wurden die gebundenen Immunglobuline eluiert. Zur Aufreinigung

wurde das Puffersystem der Firma Biorad verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde für 45 min. bei 4°C zentrifugiert (Sorvall-Zentifuge, GSA-Rotor, 10.000 x g) anschließend im Verhältnis 1:1 mit MAPS-Bindungspuffer (Biorad), pH 9,0 versetzt. Die Lösung wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min. auf die Protein A-Matrix (rekombinantes Protein A, *S. aureus*, Pharmacia) aufgetragen. Die Matrix wurde mit dem zehnfachen Volumen MAPS-Bindungspuffer gewaschen und mit dem fünffachen Volumen MAPS-Elutionspuffer (pH 3,0, Biorad) eluiert. Anschließend wurde die Matrix mit dem fünffachen Volumen an MAPS-Bindungspuffer reäquilibriert und mit dem zehnfachen Volumen 20%igem Ethanol zur Reinigung und Lagerung behandelt.

Die isolierten Antikörper wurden durch Auftrennung in der PAA-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung auf ihre Reinheit überprüft. Ihre Immunoreaktivität wurde im Western Blot getestet. Die Konzentration wurde im *Sandwich*-ELISA bestimmt (siehe Abschnitte **6.1** und **8.1** ff). Zur Lagerung wurden die Antikörper gegen PBS/Azid dialysiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen:

MAPS-Bindungspuffer, pH 9,0

Nach Angaben des Herstellers; 0,05% Natriumazid (w/v)

MAPS-Elutionspuffer, pH 3,0

Nach Angaben des Herstellers; 0,05 % Natriumazid (w/v)

2.6 Kopplung des mAb T 84.1 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Als feste Phase in der Affinitätschromatographie wurde Sepharose 4B, an die Cyanogenbromidgruppen gebunden waren, eingesetzt. Zur kovalenten Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern wurden diese über ihre primären Aminogruppen an die Matrix gekoppelt: Die Cyanogenbromidgruppen besitzen ein elektrophiles C-Atom, das nach Abspaltung von Bromwasserstoff durch Säurebehandlung in Form eines Cyanatesters vorliegt, der im sauren Milieu stabil ist (pH<4). Durch einen nucleophilen Angriff eines Stickstoffatoms (z.B. aus primären

Aminogruppen in Proteinen) wird das Amin kovalent als Isoharnstoffderivat an der Sepharose gebunden (Aslam und Dent, 1998; Wilcek, 1984).

Pro 1 ml gequollenem Gel (Sepharose 4B, CNBr-aktiviert, Pharmacia, entsprechend 0,33g Trockenmasse) wurden 2,5 mg T84.1 eingesetzt.

Vor der Kopplung an die Matrix wurde der Antikörper über Nacht bei 4°C gegen eine 500fache Vorlage an Kopplungspuffer dialysiert. Die Antikörperlösung (c=2,5 mg/ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit DMF versetzt, um Antikörper-Aggregate aufzulösen, die nach der Dialyse entstanden waren.

Vorbereitung der Affinitätsmatrix zur Kopplung:

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Die Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C.

Die Additive an der Matrix wurden durch 15 min. Quellen in 1 mM HCl, pH 2,8-3,0, bei Raumtemperatur, entfernt; pro Gramm Trockensubstanz wurde die Sepharose mit je 200 ml eiskalter 1 mM HCl gespült und in einer G3-Glasfritte trockengesaugt. Die Sepharose wurde zu der Antikörperlösung gegeben und die Kopplung wurde über Nacht bei 4 °C unter stetem Schütteln durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden an der Chromatographieanlage (Biorad, Biologic DuoFlow) mit einer Flußrate von 1 ml/min. bei 4 °C durchgeführt. Die Matrix wurde mit dem zehnfachen Volumen an Kopplungspuffer gespült, um ungebundenes Material zu entfernen. Nicht besetzte reaktive Gruppen wurden für 6 h bei 4°C in 1,0 M Ethanolaminlösung, pH 8,0, blockiert. Die Matrix wurde mit dem dreifachen Gelbettvolumen Ethanolaminlösung und anschließend mit drei Volumina DMF gespült, um Antikörper-Aggregate aufzulösen. Die Matrix wurde anschließend in fünf Gelbettvolumina Kopplungspuffer re-äquilibriert und in fünfmaligem Wechsel mit Natriumacetat-/Natriumchloridpuffer (pH 4,0) und TrisHCl-/Natriumchloridpuffer (pH 8,0) gewaschen. Danach wurde die Säule zwei Mal mit je zehn Gelbettvolumina PBS und fünf Gelbettvolumina 0,2 M Glycin blindeluiert. Zur Lagerung bei 4 °C wurde die Säule gründlich mit PBS, 0,05 % Azid, gespült.

Lösungen:

Kopplungspuffer, pH 8,5

0,1 M NaHCO₃; 0,75 M NaCl/NaOH, pH8,5

1,0 M Ethanolamin/HCl, pH 8,0

0,1 M Acetatpuffer/0,5 M NaCl, pH 4,0

0,5 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat, wasserfrei/Eisessig, pH 4,0

0,1 M Tris/HCl, pH 8,0

0,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0

PBS nach Dulbecco, pH 7,2- 7,4

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,15 mM KH₂PO₄

PBS nach Dulbecco, pH 7,2- 7,4 mit Azid:

0,05% NaN₃ (w/v) in PBS

0,2 M Glycin/HCl, pH 2,8

2.7 T 84.1-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von CEACAM1

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C mit sterilfiltrierten, entgasten und azidhaltigen Puffern (0,05 % NaN₃; w/v) durchgeführt. Soweit es nicht anders erwähnt ist, wurde die Biorad Biologic DuoFlow-Chromatographieanlage (Biorad) verwendet.

Nach Kopplung des monoklonalen Antikörpers T 84.1 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden Proteinrohextrakte (aus Tumorgewebe bzw. Granulocyten) mehrfach über die Säule zirkuliert (1 ml/min).

2.7.1 Präparative Isolierung von humanem CEACAM1 aus Granulocysten

Granulocystenrohextrakte wurden wie beschrieben aus Buffy coats hergestellt. Die erhaltenen Rohextrakte wurden zur Entfernung von Partikeln für 45 min. bei 20.000 x g (4°C, Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor) zentrifugiert. Das Material wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min. über eine 42,5 ml T84.1-Matrix in einem XK26-Säulenmantel (Pharmacia) gepumpt. Anschließend wurden ungebundene Proteine durch Waschen mit PBS (zehnfaches Säulenvolumen, 1 ml/min.), pH 7,4, entfernt, bis eine gleichmäßige Basislinie erreicht war. Die Elution erfolgte durch einen pH-Sprung in einem Stufengradienten mit 0,2 M Glycinpuffer (1 ml/min.), pH 2,8. Die Säule wurde anschließend mit dem fünffachen Säulenvolumen an PBS/Azid reäquilibriert.

Die Chromatographie wurde photometrisch bei 280 nm zur Detektion von Proteinen verfolgt. Gemäß des erhaltenen Elutionsprofils wurden proteinhaltige Fraktionen vereinigt und mit 2M NaOH neutralisiert.

Das Eluat wurde über Amicon 10-Filter (MWCO 5 kD, Amicon) um das Achtzig- bis Hundertfache aufkonzentriert und in PAA-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung und Western Blot analysiert.

2.7.2 Analytische Isolierung von CEACAM1 aus Tumorgewebe

Aufgrund der geringen Probenmengen wurde die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von CEACAM1 aus Tumorgewebe manuell durchgeführt. 300 µl Affinitätsmatrix wurden in mit Watte gestopfte 1ml-Spritzen gefüllt. Je 500 µl aufkonzentrierte Tumorextrakte wurden zweifach über die Säule zirkuliert. Die Matrix wurde mit 3 ml PBS gespült und anschließend mit 2 ml Glycinpuffer (pH 2,8) eluiert. Die Matrix wurde mit 3ml reäquilibriert. Das gewonnene Eluat wurde mit 2 M NaOH neutralisiert und für weitere Analysen (Western Blots, siehe Abschnitt 8.1 ff) verwendet.

2.8 Aufreinigung von CEACAM1 durch Affinitätschromatographie über das Mannose-spezifische Lectin GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*)

Zur analytischen Aufreinigung von CEACAM1 aus neutrophilen Granulocyten wurde an Sepharose 4B immobilisiertes GNA-Lectin verwendet (*Galanthus nivalis agglutinin*; Lectin aus dem Schneeglöckchen). Die Affinitätschromatographie wurde nach Shibuya et al. modifiziert (Shibuya et al., 1988).

An Agarose immobilisiertes GNA-Lectin (*Galanthus nivalis* Agglutinin; spezifisch für endständige Mannosylreste) wurde über Nacht bei 4°C mit CEACAM1 aus der T84.1 Affinitätschromatographie in Lectinbindungspuffer auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Matrix wurde in einen Säulenmantel gefüllt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden an der Chromatographieanlage (FPLC, Pharmacia) bei 4°C durchgeführt. Die Flußrate der Puffer betrug während der Aufreinigung 1 ml/min..

Die Matrix wurde mit dem zehnfachen Volumen an TBS gewaschen. Das gebundene Material wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen Elutionspuffer (0,5 M Methyl- α -D-Mannopyranosid in TBS) in einem Stufengradienten eluiert. Anschließend wurde die Matrix mit dem zehnfachen Volumen an TBS gespült.

Lösungen:

TBS, pH 7,5

50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (w/v) NaN_3

Lectinbindungspuffer, pH 7,5

TBS; je 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,5 M Methyl- α -D-Mannosid

0,5 M Methyl- α -D-Mannosid in TBS, pH 7,5

2.9 Gelfiltration von T84.1-affinitätschromatographisch gereinigten Proteinen

Alle verwendeten Puffer wurden vor Beginn der Arbeiten sterilfiltriert und entgast. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Für die Gelfiltration wurde eine Agarose-Dextran säule (Superdex200 Prep grade, Pharmacia) mit einem Gelbettvolumen von 320 ml in einem XK26-Säulenmantel (Pharmacia) verwendet. Mit diesem Material ist die Auftrennung von Molekülen in einem Bereich von 5-600 kD möglich (Stellwagen, 1990).

Zur Vorbereitung auf die Gelfiltration wurde die Superdex200 Säule mit 600 ml (ca. zweifaches Säulenvolumen) Gelfiltrationspuffer blindeluiert und äquilibriert.

Zur Gelfiltration von Affinitätschromatographieprodukten des T84.1 Eluats wurden 2 ml des konzentrierten Eluates über einen statischen Loop mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 ml/min. manuell auf die Säule geladen. Die Elution wurde ebenfalls mit einer Flußrate von 0,25 ml/min durchgeführt.

Nach 60 ml Elutionsvolumen wurden Fraktionen von je 4 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden über Nacht einzeln in Filtrationseinheiten (MWCO 10 kD, Amicon; Hettich-Kühlzentrifuge; 1.000 Upm, 4°C) um das Zehnfache aufkonzentriert und anschließend durch PAA-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung und Western Blot (siehe Abschnitte 4 und 8) analysiert.

Zur Reinigung und Lagerung der Säule bei 4°C wurde die Matrix mit je 800 ml 1,0 M NaOH und 20% Ethanol mit einer Flußrate von 0,25 ml/min. gespült.

Lösungen:

Puffer für die Gelfiltration (Äquilibrierung und Elution)

0,05 M Tris/HCl, 0,35 M NaCl, 0,1% Triton X-100 (w/v), pH 7,5

Regenerationslösungen

20% Ethanol (v/v) und 1 M NaOH

2.10 Entfernung von Triton-X-100 nach der Gelfiltration

Zur Entfernung des Triton-X-100 aus den aufkonzentrierten Elutionsfraktionen wurden die Proben mit PBS um den Faktor fünf verdünnt und anschließend in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon MWCO 100 kD) umgepuffert. Der Vorgang wurde vier Mal wiederholt.

2.11 Perchlorsäureextraktion der Eluate aus der Gelfiltration

Im Fall der Kontamination der Gelfiltrationsprodukte durch murine bzw. humane Immunglobuline wurden die Elutionsfraktionen 1:1 mit 0,3 M Perchlorsäure versetzt und für 20 min. bei 4°C unter stetem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5 M NaOH neutralisiert und in Amicon-Filtrationseinheiten gegen PBS dialysiert.

Lösungen:

0,3 M Perchlorsäure

3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.1 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch einen Farbstoff, der mit Seitenketten von Aminosäuren Komplexe bildet. Die Veränderung der Extinktion einer Proteinlösung kann im Photometer gemessen werden. Der saure Farbstoff Coomassie-Brilliantblau (G250) besitzt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, das sich in Gegenwart von Proteinen/Aminosäuren zu 595 nm verschiebt. Die Verschiebung wird durch die Komplexbildung zwischen

dem anionischen Farbstoff und den kationischen und nichtpolaren Seitenketten in Proteinen ausgelöst (Bradford, 1976).

Mit der Bradford-Methode lassen sich Proteinkonzentrationen von 0,05-0,5 $\mu\text{g/ml}$ nachweisen. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA hergestellt (1, 2, 5, 8, 10, 12 und 15 $\mu\text{g/ml}$). Der Leerwert wurde gegen das Milieu geeicht, in dem sich auch die zu bestimmende Proteinlösung befand.

Nach Angaben des Herstellers wurden 200 μl der Bradford-Reagenz-Lösung (Biorad) mit 800 μl der Verdünnungsreihe des Proteins/BSA versetzt, gemischt und für 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm im Photometer vermessen.

4 Charakterisierung von Proteinen

4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli

In der Gelelektrophorese werden in Polyacrylamidgelen Proteine ihres Molekulargewichts nach aufgetrennt. Dieses wird dadurch ermöglicht, daß in denaturierenden SDS-haltigen (*Sodiumdodecylsulfat*)-Gelen die Proteine in einem konstanten Ladungs-zu-Masse-Verhältnis vom negativ geladenen Detergenz SDS komplexiert werden. Je nach Vernetzungsgrad der Polyacrylamidgele und Anteil des Polyacrylamids erhält man nach der Auftrennung im elektrischen Feld einen Molekulargewichtsbereich, in dem die Auftrennung der einzelnen Proteine linear ist. Die Vernetzung und der Gehalt an Polyacrylamid werden gemäß des Molekulargewichtsbereichs ausgewählt, in dem die lineare Auftrennung erfolgen soll (z.B. 15% ige Trenngele für Proteine von 10-60 kD; 7-8%ige Gele für Proteine von 50-220 kD etc.). Die vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese wurde im diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli durchgeführt (Lämmli, 1970).

Lösungen:

Trenngel-Puffer, vierfach konzentriert

1,5M Tris/HCl, pH 8,8

Sammegel-Puffer, vierfach konzentriert

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Laufpuffer für die Elektrophorese, zehnfach konzentriert

1,92 M Glycin; 0,248 M Tris; 10% SDS (w/v); für die Gebrauchslösung wurde der Puffer 1:10 verdünnt.

Denaturierender Probenpuffer (zweifach konzentriert) nach Lämmli

50mM Tris/HCl, pH 6,8, 12% Glycerin (v/v), 4% SDS (w/v), 2% β -Mercaptoethanol (v/v), 0,01% Serva Blue (w/v)

Acrylamid-/Bisacrylamidlösung

40%ige Lösung (w/v), 19:1, Roche

TEMED, 10% (Biorad)

APS (Biorad)

10%ige Lösung (w/v)

SDS

10%ige Lösung (w/v)

Für ein Trenngel von 5 ml wurden folgende Ansätze zusammenpipettiert:

Substanz	7%	10%	12,5%	15%
Acrylamid- /Bisacrylamidlösung (40%)	0,875 ml	1,25 ml	1,565 ml	1,875 ml
Trenngel-Puffer, 4x	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
Wasser	2,825 ml	2,45 ml	2,135 ml	1,825 ml
SDS (10%ige Lösung)	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED (10%ige Lösung)	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l
APS (10%ige Lösung)	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

Tabelle 3. Pipettierschema für 7-15%ige Trenngele nach Lämmli.

Das Trenngel wurde nach Einfüllen zwischen die Glasplatten mit Butanol überschichtet und vollständig auspolymerisiert. Das Butanol wurde entfernt. Das Sammelgel wurde nach folgender Vorschrift zusammenpipettiert und auf das Trenngel gegossen:

Substanz	5%iges Sammelgel
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (40%)	310 μ l
Sammelgel-Puffer, 4x	625 μ l
Wasser	1,86 ml
SDS (10%ige Lösung)	25 μ l
TEMED	3,75 μ l
APS (10%ige Lösung)	7,5 μ l

Tabelle 4. Pipettierschema für ein 5%iges Sammelgel nach Lämmli.

Je nach Probenvolumen wurden Käme mit einem Fassungsvermögen von 20 oder 40 μ l Füllvolumen pro Tasche in das Sammelgel eingesetzt. Das Sammelgel wurde ausgehärtet und der Kamm wurde entfernt. Nach Aufkochen der Proben (5 min. im Wasserbad, 95°C) wurden diese in die Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei konstanter Stromstärke (10mA), ebenso die Auftrennung im Trenngel (20mA). Es wurden Molekulargewichtsstandards der Firma Sigma und Life Technologies verwendet.

Spezifische Proteine wurden nach Auftrennung im PAA-Gel und Western Transfer durch monoklonale Antikörper und Lectine nachgewiesen. Der Western Transfer und der immunologische Nachweis wurden zusammen in Abschnitt 8 beschrieben.

4.2 Darstellung von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung

Zur Detektion von Proteinen nach Auftrennung in der Gelelektrophorese wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. In der Silberfärbung können Proteinkonzentrationen bis in den Nanogramm-Bereich (bezogen auf eine Bande von ca. 0,5 cm) nachgewiesen werden. Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur entsprechend Tabelle 5 durchgeführt:

Vorgang	Lösung	Dauer
Fixieren	50% Methanol 10% Eisessig 40% Wasser	30 min.
Quellen	5% Methanol 7,5% Eisessig 87,5 % Wasser	10 min.
Waschen	Wasser	2x 5 min.
Sensitivieren/ Reduktion	0,02% Natriumthiosulfat in Wasser	1 min.
Waschen	Wasser	2 x 5 min.
Färben	0,02 % Silbernitrat 1 mM Formaldehyd	30 min. unter Lichtausschluß
Waschen	Wasser	2 x 1 min.
Entwickeln	6% Natriumcarbonat 6 mM Formaldehyd	bis Banden sichtbar werden
Stoppen	5 ml 2,3 M Citrat, 10 mM EDTA	
Aufbewahren	20% Ethanol, 5% Glycerin	

Tabelle 5. Protokoll für die Darstellung von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung.

5 Biochemische Modifikation von Proteinen

5.1 Biotinylierung von Proteinen

Für die Biotinylierung von Proteinen (Antikörper oder Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*) wurde eine modifizierte Methode von Guedson et al. verwendet (Guedson et al., 1979). Gereinigtes Protein wurde im Verhältnis 20:1 (w/w) mit einer frisch angesetzten Biotinlösung in trockenem DMF (Dimethylformamid) versetzt und für 2 h bei

Raumtemperatur unter stetem Schütteln inkubiert. (Verwendet wurde NHS-Biotin (N-Hydroxysuccinimidylester des Biotins bzw. ein langkettiger Succinimidylester des Biotins, 6-((6-biotinoyl)amino)hexanoyl)aminohexansäure)succinimidylester, Molecular Probes). Nicht gebundenes Biotin wurde durch Dialyse gegen PBS in Amicon-Filtereinheiten (MWCO 10kD, Amicon) entfernt. Die Kontrolle der Biotinylierungsreaktion erfolgte im Dot Blot (siehe Abschnitt 8.3). Die biotinylierten Proteine wurden bei -20°C gelagert.

Lösungen:

DMF zur Spektroskopie, Uvasol Grade (Merck)

Biotinsuccinimidoester in DMF

Die Biotinester wurden in einer Endkonzentration von $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMF gelöst und bei -20°C gelagert. Die Lösungen waren bis zu 14 Tagen stabil.

5.2 Enzymatische Deglycosylierung von CEACAM1

Für die Deglycosylierung (Abspaltung der N-Glycane) wurde CEACAM1 aus der Gelfiltration eingesetzt. Die Deglycosylierung wurde mit der Glycosidase F (PNGase F; E.C. 3.5.1.52 aus *Flavobacterium meningoseptum* rekombinant hergestellt in *E. coli*, Roche) nach Haselbeck et al. durchgeführt (Haselbeck et al., 1990).

Pro Ansatz wurden ca. $5\mu\text{g}$ des aufgereinigten Moleküls eingesetzt.

Die Proben wurden in einem Volumen von $50\mu\text{l}$ für 2 min. bei 95°C in 1%iger SDS-Lösung denaturiert. Danach wurden $450\mu\text{l}$ Endoglycosidase-F (PNGaseF, Roche)-Reaktionspuffer hinzugefügt, und der Reaktionsansatz wurde w. o. aufgekocht. Nach Abkühlen auf 37°C wurden 5, 10 und 20 Enzymeinheiten (*units*) PNGase F zugegeben. Die Ansätze wurden für 18 h bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Lösungen:

1% SDS-Lösung

Eine 10%ige SDS-Lösung wurde mit PBS (pH 7,4) 1:10 verdünnt.

Endoglycosidase-F-Reaktionspuffer

20 mM Natriumhydrogenphosphat/NaOH, pH 7,2, 0,5 % Nonidet-40(v/v), 5mM EDTA, 0,2 mM Natriumazid

Immunologische Methoden

6.1 ELISA zur Quantifizierung des Antikörpers T84.1 aus Zellkultur

Zur Quantifizierung des Antikörpers aus Zellkulturüberständen wurde ein Sandwich-ELISA (ELISA=*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Durch Verwendung eines "Fänger-Antikörpers", der spezifisch murine Immunglobuline erkennt, können diese auch in Gegenwart hoher Konzentrationen unspezifischer kompetitiver Proteine (FBS-Komponenten/bovine Immunglobuline) reproduzierbar bestimmt werden (Flemming und Pen, 1988; Macy et al., 1988).

Als Standardimmunglobuline wurden kommerzielle, gereinigte murine IgG1-Antikörper bzw. gereinigter T84.1 Antikörper bekannter Konzentration eingesetzt, die in den Konzentrationen von 0,1 μ g/ml seriell in Zweierschritten bis auf 0,002 μ g/ml verdünnt wurden. Als Referenzwert wurde 1% Milchpulverlösung in PBS bzw. Zellkulturmedium eingesetzt.

Die Verdünnung der Zellkulturüberstände variierte entsprechend der Zelldichte und Dauer der Kultur.

ELISA-Platten wurden mit einem Fänger-Antikörper (Kaninchen-anti-Maus Immunglobuline) in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS (je 100 μ l/Napf) beschickt.

Die Platten wurden für 15 min. auf einem ELISA-Schüttler bei 300 Upm und Raumtemperatur bewegt und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Ungebundenes Material wurde durch Abschlagen der Platten entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit je 200 µl 1% Milchpulverlösung in PBS für 2 h bei 37°C wie oben auf dem ELISA-Schüttler abgedeckt. Erneut wurden die Platten abgeklopft und mit je 100 µl der Standardverdünnung (gereinigte murine IgG) bzw. den Zellkulturüberständen in Milchpulver/PBS für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Detektionsantikörper (Ziege-anti-Maus, gekoppelt an Peroxidase) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Milchpulver/PBS wie oben inkubiert. Die Platten wurden fünf Mal mit frisch angesetztem Substratpuffer gewaschen (0,1 M Citratpuffer, pH 5,0). Die Darstellung der Peroxidase erfolgte mit dem löslichen Substrat OPD (o-Phenyldiamindihydrochlorid). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 M HCl nach ca. 5-10 min. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 492 nm im ELISA-Platten-Photometer gemessen.

Lösungen:

PBS, 1% Magermilchpulver (Glücksklee) (w/v)

Citratpuffer (fünffach konzentriert)

0,5 M Trinatriumcitratdihydrat (Lsg. A), 0,5 M Citrat (Lsg. B)

Puffer A mit Puffer B auf den pH von 5,0 einstellen

Substratpuffer

Der fünffach konzentrierte Citratpuffer wird 1:5 verdünnt; er ist max. 1 Woche bei 4°C stabil.

Reaktionslösung

1 OPD-Tablette (15 mg OPD) in 12,5 ml Substratpuffer, 5 µl 30%iges H₂O₂

6.2 ELISA zur Detektion von Mycoplasmen-Kontamination in Zellkultur

Mycoplasmentest

Zur Überprüfung der Zellen auf Kontamination durch Mycoplasmen wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Mycoplasmen sind prokaryontische Kontaminanten, die den Stoffwechsel, die Morphologie und das Wachstumsverhalten von Zellen negativ beeinflussen können. Der Test ist zum Nachweis der häufig vorkommenden Spezies *M. orale*, *A. laidii*, *M. arginini* und *M. hyorhina* geeignet. Alle verwendeten Lösungen wurden nach Rekonstitution dem Mycoplasmen-Detektions-Kit (Roche) entnommen. Der Mycoplasmentest wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Untersucht wurden Proben aus der Zellkultur, Wasser aus dem Brutschrank sowie das verwendete Zellkulturmedium. Alle Inkubationsschritte wurden auf dem ELISA-Platten-Schüttler bei 300 Upm durchgeführt.

Die ELISA-Platten wurden mit den Anti-Mycoplasmen-Antikörpern gegen die obengenannten Spezies als Fänger-Antikörper (je 250 μ l) beschichtet und für 2 h bei 37°C im ELISA-Platten-Schüttler inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Materials durch Abklopfen der Platte wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min. bei 37°C mit je 200 μ l Blockierungslösung abgedeckt. Die Blockierungslösung wurde abgeschlagen und die Platte drei Mal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Je 200 μ l der entsprechenden Proben und Positivkontrollen (inaktivierte Mycoplasmen) wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde w.o. gewaschen und für 2 h bei 37°C mit dem Detektionsantikörper (biotinylierte Anti-Mycoplasmen-Antikörper) beschickt. Nach viermaligem Waschen wurde an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (je 200 μ l) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen w.o. wurden je 200 μ l Substratlösung in die Näpfe pipettiert. Die Farbreaktion war nach 1 h abgeschlossen und wurde anschließend photometrisch bei 405 nm ausgewertet.

7 Immunpräzipitation

Lösliche Antigene können durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern präzipitiert werden, da sich in der Äquivalenzzone von Antigen- und Antikörperkonzentration unlösliche Komplexe bilden (Harlow und Lane, 1988). Die Komplexe wurden durch Immobilisierung der Antikörper an Protein A Agarosebeads isoliert und nach mehrmaligem Waschen in PBS nach PAA-Gelelektrophorese im Immunoblot analysiert.

7.1 Präzipitation von CEACAM1 durch Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*

Affinitätsgereinigtes CEACAM1 wurde gegen Lectinpuffer dialysiert und mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ biotinylierten Typ-1-Fimbrien über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Fimbrien wurden durch Streptavidin-Agarose (Upstate Biotechnologies) immobilisiert. Die Agarose wurde durch Zentrifugation (1 min., 13.000 Upm, Eppendorffzentrifuge, 4°C) pelletiert, drei mal mit TBS gewaschen und erneut pelletiert. Gebundenes Material wurde durch fünfminütiges Aufkochen in Probenpuffer für die Gelelektrophorese eluiert und im Immunoblot analysiert.

7.2 Immunpräzipitation von CEACAM1 durch E-Selectin.

Wie oben wurde CEACAM1 aus der Affinitätschromatographie gegen Lectinbindungspuffer dialysiert. Die Präzipitation erfolgte w.o. durch an Streptavidin immobilisiertes, biotinyliertes E-Selectin (20 μg ; Calbiochem; rekombinantes humanes E-Selectin aus CHO-Zellen; CHO=*chinese hamster ovary*).

8 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus PAA-Gelen auf Nitrocellulose (Western Blotting)

Nach der PAA-Gelelektrophorese wurden die Proteine aus den SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen zum immunologischen Nachweis spezifischer Antigene transferiert. Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose wurde elektrophoretisch nach Towbin et al. durchgeführt (Towbin et al., 1979). Die negativ geladenen Proteine werden dabei auf die positiv geladene Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer wird durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems unterstützt.

Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden passend auf die Gelgröße zugeschnitten (je 8 x 10 cm). Die Kathodenplatte der Apparatur wurde mit zehnfach konzentriertem Anodenpuffer (Anodenpuffer I) befeuchtet und luftblasenfrei mit drei in Anodenpuffer I getränkten Filtern belegt. Darauf folgten drei in einfach konzentriertem Anodenpuffer (Anodenpuffer II) getränkte Filter. Die in Anodenpuffer II äquilibrierte Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, BA85 Protran-Membran, 0,45 μ m Porengröße) wurde aufgelegt. Anschließend folgte das Gel. Auf der Membran wurden die Positionen des Molekulargewichtsstandards markiert. Das Gel wurde mit drei in Kathodenpuffer eingeweichten Whatman-Filtern bedeckt. Der Deckel der Apparatur, der die Anodenplatte enthielt, wurde fest verschlossen und mit Gewichten beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte über 45 min. mit 3 mA/cm².

Nach dem Transfer wurde das Gel verworfen und der Bereich der Nitrocellulosemembran abgetrennt, der den Molekulargewichtsstandard enthielt und mit Amidoschwarzlösung gefärbt (siehe Abschnitt **8.1**). Die übrige Membran wurde den Abschnitten **8.2** ff beschriebenen Methoden zum immunologischen Nachweis spezifischer Antigene unterzogen.

Puffer:

Millipore, 1995 Instructions Manuals, Protein Blotting protocols for Immobilon-P transfer membrane, Bedford, Massachusetts

Anodenpuffer I

0,3 M Tris/HCl, 10% Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer II

0,03 M Tris/HCl, 10% Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer

25 mM Tris/HCl, 192 mM 6-Aminohexansäure, 10% Methanol
pH 9,4

8.1 Unspezifische Detektion von Proteinen nach Western Transfer auf Nitrocellulose durch Amidoschwarzfärbung

Nach Western Transfer wurde der Molekulargewichtsstandard für 5 min. bei Raumtemperatur in Amidoschwarzlösung gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund in Entfärbelösung ausgewaschen, bis die Banden des Standards klar erkennbar waren.

Lösungen:

Amidoschwarz-Lösung

0,02 % (w/v) Naphtholblau, 40% Methanol, 10% Eisessig

Entfärbelösung

20% Methanol, 5% Eisessig

8.2 Immunologische Detektion spezifischer Antigene auf Nitrocellulosemembranen nach Western Transfer

Unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen wurden nach Western-Transfer für 2 h bei RT in 3% Milchpulver (Glücksklee) in PBS oder TBS (pH 7,4) unter Schütteln abgedeckt. Die Blockierungslösung wurde verworfen. Über Nacht wurden die Membranen mit dem entsprechenden Detektionsantikörper bei 4°C auf dem

Rotationsschüttler inkubiert (die entsprechenden Detektionsantikörper und ihre Konzentrationen sind im Ergebnisteil angegeben). Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min. bei RT in PBS oder TBS entfernt. Der Sekundärantikörper (konjugiert mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase) wurde für 2 h bei RT auf dem Rotationsschüttler mit den Membranen in einer Verdünnung von 1:2.000 – 1:5.000 (in PBS oder TBS) inkubiert.

8.2.1 Darstellung der Enzymaktivitäten der Sekundärantikörper im Western Blot

8.2.1.1 Chemilumineszenz-Reaktion zur Darstellung der Peroxidase-Reaktion

Für den sensitiven Nachweis der Peroxidase-Reaktion im Immunoblot wurde nach Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers ein Chemilumineszenz-taugliches Substrat verwendet (ECL-Kit, Amersham). Bei der Chemilumineszenz wird Luminol durch die Peroxidase oxidiert und dadurch aktiviert. Es sendet Licht aus und fällt anschließend in seinen Grundzustand zurück. Das emittierte Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Nach Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper wurden die Nitrocellulosemembranen über 3-4 h bei RT in TBS (pH 7,5; 0,05% Tween 20) gewaschen. Der Wechsel der Puffervorlage erfolgte alle 15 min.. Nach Angaben des Herstellers wurden die Substratlösungen zusammenpipettiert. Die Membranen wurden gleichmäßig mit der Substratlösung für genau 1 min. bedeckt; die Lösung wurde anschließend durch Abtropfen rückstandslos entfernt. Für einen variablen Zeitraum (je nach Signalstärke von 1 min. bis zu Expositionen über Nacht) wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm™) aufgelegt.

Lösungen:

Waschpuffer für die Chemilumineszenzreaktion

TBS, pH 7,5; 0,5 % Tween 20 (v/v)

8.2.1.2 Darstellung der Peroxidase in der DAB-Färbung

Nach Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper wurde die Membran für 2 h in TBS gewaschen. Die Vorlage wurde alle 15 min. gewechselt. Die Darstellung der Peroxidase erfolgte durch Umsetzung von DAB (3´Diaminobenzidin) nach Oxidation zu einem unlöslichen Farbstoff, der einen braunen Niederschlag bildet. Die Färbelösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Die Membran wurde unter Lichtausschluß gefärbt, bis Banden sichtbar wurden. Durch Schwenken in Wasser konnte die Reaktion gestoppt werden. Die Membran wurde zur Dokumentation auf Filterpapier getrocknet.

Lösungen:

Färbelösung

1 DAB-Tablette (entsprechend 15 mg DAB) in 15 ml TBS, 12 μ l 30% H₂O₂

8.2.1.3 Darstellung der Alkalischen Phosphatase (AP) im Immunoblot

Nach Inkubation mit einem AP-konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran drei Mal für je 10 min. bei RT in Substratpuffer (pH 9,8) äquilibriert. Die Reaktionslösung, die die Substrate NBT (Nitrotetrazoliumblau; Roche) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indoylphosphat; Roche) enthält, wurde so lange auf den Membranen belassen, bis eine Färbung (dunkelblauer Niederschlag) sichtbar war.

Lösungen:

Substratpuffer

0,1 M NaCl; 0,1 M Tris/HCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,8

Reaktionslösung für eine Membran

50 μ l NBT (Roche) und 37,5 μ l BCIP (Roche) in 10 ml Substratpuffer

8.3 Dot Blot

Bei einem Dot Blot werden die zu analysierenden Proteine direkt auf die Nitrocellulosemembran getropft und getrocknet. Nach Blockieren (30 min. bei Raumtemperatur in 3%iger Milchpulverlösung in PBS) wurde der Dot Blot mit dem Detektionsantikörper für 1 h bei RT in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Membran mit den sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut wie zuvor gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit den unlöslichen Substraten für die alkalische Phosphatase- oder die Meerrettich-Peroxidase (NBT/BCIP bzw. DAB).

8.4.1 Lectinblot zum *in vitro* Nachweis der Interaktion zwischen CEACAM1 und Typ-1-Fimbrien

Aufgereinigtes CEACAM1 wurde nach Gelelektrophorese auf Nitrocellulose transferiert. Die Membran wurde nach Blockieren in Milchpulver/TBS zwei Mal für je 15 min. bei RT in Lectinbindungspuffer (TBS mit je 1 mM CaCl₂, MgCl₂ und MnCl₂) äquilibriert. Für den Nachweis von CEACAM1 wurden anstelle des Detektionsantikörpers biotinylierte Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* eingesetzt. Die Inkubation mit den Typ-1-Fimbrien wurde über Nacht in Lectinbindungspuffer bei 4°C auf dem Rotationsschüttler durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min. in TBS wurde die Membran mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin inkubiert (1:2.000, 2 h, RT) und anschließend für 2 h in TBS gewaschen. Die Puffervorlage wurde jeweils nach 15 min. gewechselt. Die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität erfolgte in der Chemilumineszenz-Reaktion.

8.4.2. Lectinblot zum Nachweis der Interaktion von CEACAM1 und Galectin-1

CEACAM1 wurde wie beschrieben auf Nitrocellulose transferiert; nach Äquilibrieren der Membran in Lectinbindungspuffer wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit 5 µg biotinyliertem Galectin-1 inkubiert. Nach dem Waschen und Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:5.000) erfolgte die Darstellung der Peroxidase-Reaktion in der Chemilumineszenz.

9 Durchflußcytometrische Untersuchungen

Die durchflußcytometrischen Experimente wurden an einem FACSCalibur-Cytometer (Becton/Dickinson) durchgeführt und mit der installierten Software ausgewertet (CellQuest, Becton/Dickinson; WinMDI-Software). Alle Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Abbildung 7 stellt den Aufbau der durchflußcytometrischen Analysen schematisch dar:

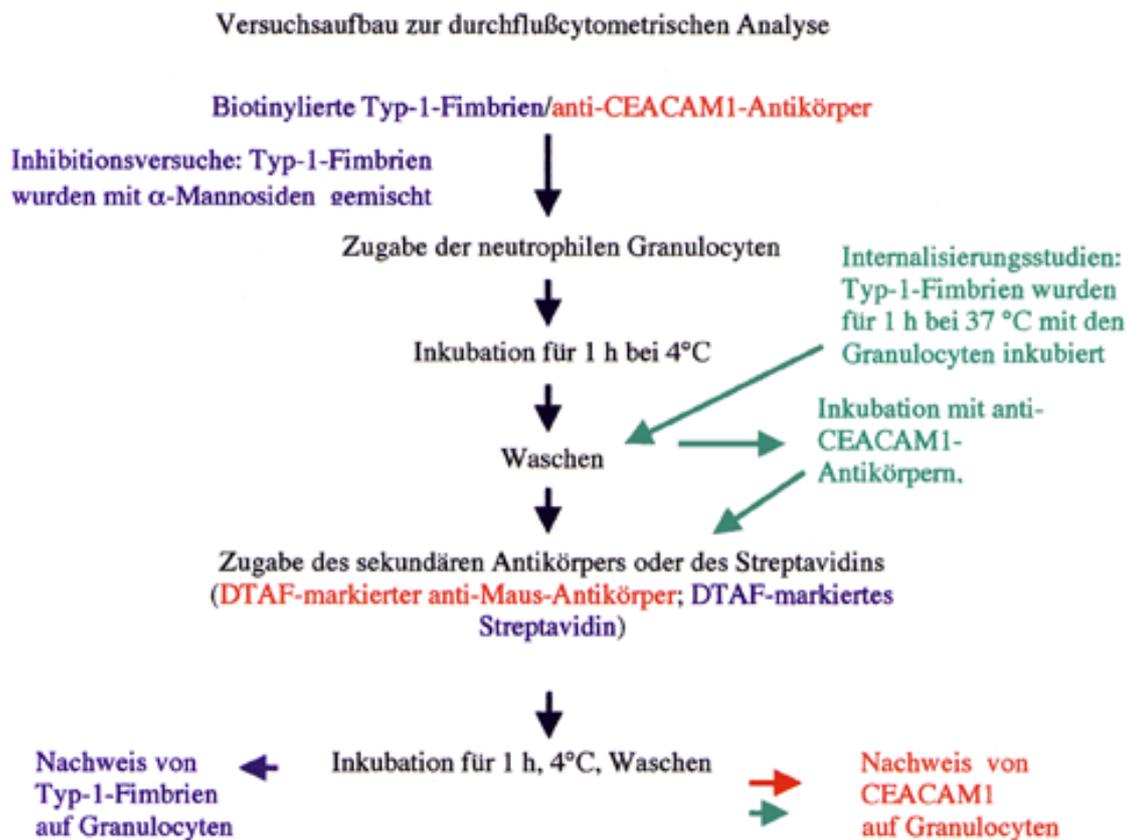


Abb. 7. Flußdiagramm zum Versuchsaufbau der Experimente in der Durchflußcytometrie. Die Experimente zur Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien durch α -Mannoside sind in blau unterlegt. Die Bindungsstudien für anti-CEACAM1-Antikörper an neutrophile Granulocyten sind in rot unterlegt. In grün ist der Ablauf des Experiments zur Analyse der Oberflächenexpression von CEACAM1 auf neutrophilen Granulocyten nach Inkubation mit Typ-1-Fimbrien gezeigt.

9.1 Bindung von anti-CEACAM1-Antikörpern oder biotinylierten Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* an Granulocyten aus Spenderblut

In durchflußcytometrischen Analysen wurde die Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten aus Spenderblut (siehe Abschnitt 17) untersucht. Für jedes Experiment wurden Zellen eines anderen Spenders präpariert.

Die Granulocyten (2×10^5 Zellen in $100 \mu\text{l}$ PBS, pH 7,2 mit 0,1 % BSA und je 1 mM CaCl_2 und MgCl_2) wurden für 1 h bei 4°C unter stetem Schütteln mit den Antikörpern 4D1/C2, T 84.1, oder 12-140-4 (je $4\mu\text{g}/\text{ml}$) oder biotinylierten Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* ($0,25 \text{ mg}/\text{ml}$) inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml 4°C kaltem PBS (w.o.) gewaschen und mit $300 \mu\text{l}$ FBS (Gibco; mit reduziertem IgG-Gehalt; $c(\text{bovines IgG}) \leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$) unterschichtet. Durch dieses Serumkissen wurden die Granulocyten in einer Kühlzentrifuge pelletiert (Hettich Rotixa; 1.500 Upm, ohne Bremse, 120 sec. Anlaufzeit, 4°C). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden in je $100 \mu\text{l}$ PBS (w.o.) zusammen mit dem sekundären Antikörper (für die Antikörper: DTAF-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, 1:200; für Typ-1-Fimbrien: Streptavidin, DTAF-markiert, 1:200; DTAF = 5-(4,6-Dichlorotriazinyl)aminofluorescein) resuspendiert und erneut w.o. inkubiert, gewaschen und zentrifugiert. Zur Messung im Durchflußcytometer wurden die Zellen in je $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und unter Lichtausschluß auf Eis gelagert.

9.1 Inhibitonsexperimente: Inhibition der Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* an humane Granulocyten durch α -D-Mannoside

Die Mannose-spezifische Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an vitale Granulocyten wurde in Gegenwart verschiedener mannosidischer Inhibitoren in der Durchflußcytometrie untersucht. Hierzu wurden die Granulocyten, die Inhibitoren und die Fimbrien für 1 h bei 4°C unter stetem Schütteln ko-inkubiert. Die Bindung der biotinylierten Fimbrien an die Zellen wurde w.o. durch DTAF-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Als Inhibitoren wurden Methyl- α -D-Mannopyranosid, p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, Benzyl- α -D-mannopyranosid, D-Mannose, D-Glucose sowie die

trivalenten Clustermannoside **5** und **6** in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Substanzen wurden vor jedem Versuch frisch in 50% wäßrigem Methanol (v/v) bzw. in Wasser gelöst und anschließend in PBS verdünnt.

9.2.1 Synthese der trivalenten Clustermannoside

Die Synthese der in den Inhibitionsstudien eingesetzten trivalenten Clustermannoside **5** und **6** wurde detailliert in der Literatur beschrieben (Kiebug et al., 1997; Kötter et al., 1998).

9.3 Veränderung der Oberflächenexpression von CEACAM1 auf neutrophilen Granulocyten nach Inkubation mit Typ-1-Fimbrien

Aus Spenderblut isolierte neutrophile Granulocyten wurden für 1 h bei 37°C mit biotinylierten Typ-1-Fimbrien inkubiert. Nach jeweils 10 min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml eiskaltem PBS gestoppt; die Zellen wurden gewaschen und zentrifugiert. Für 1 h wurden die Zellen (je 2×10^5) mit dem monoklonalen Antikörper 4D1/C2 bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurde die Bindung von 4D1/C2 an die Granulocyten durch einen DTAF-konjugierten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen.

10 Immuncytochemie

10.1 Transplantation humaner Tumorzelllinien in *scid* Mäuse.

Die Zellen der humanen Colocarzinomzelllinien HT29 und HT29mdr wurden vor der Injektion unter sterilen Bedingungen durch Trypsinieren geerntet und nach Waschen mit PBS auf ihre Vitalität durch Trypanblau-Färbung überprüft. Von jeder Zelllinie wurden $1-5 \times 10^7$ vitale Zellen in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert; davon wurden 100 μ l zwischen die Schulterblätter von *scid*-Mäusen (*scid=severe combined immunodeficient*; BALB/c C57BL/KaIgh-I *scid/scid*) subkutan injiziert (Schumacher, 1996). Die Mäuse wurden unter vollständig sterilen Bedingungen gehalten. Vor

Entfernung der Tumore wurden sie durch Genickbruch getötet. Nach ca. 3 Wochen wurden die von der Zelllinie HT29 abgeleiteten Tumore exzidiert; bei den langsamer wachsenden HT29mdr Tumoren fand die operative Entfernung nach ca. 6 Wochen statt. Zusätzlich wurden den Mäusen die Lungen entfernt, um das Metastasierungsverhalten der Tumoren beurteilen zu können.

10.2 Einbettung der Tumore in Paraffin und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Tumore wurden nach Excision geteilt. Ein Gewebestück wurde nach Gefrieren in kaltem 2-Methylbutan im Stickstoffbad zur Immunhistochemie konserviert und bis zur Einbettungsprozedur bei -200°C gelagert. Für die proteinchemischen Analysen und die RNA-Gewinnung wurden die Gewebestücke direkt in Stickstoff eingefroren.

Für die Einbettung in Paraffin (Paraplast Plus; Sherwood Medical) wurden die Tumoren in 4%igem Formalin in 0,1 M Phosphatpuffer über Nacht fixiert und über eine aufsteigende Reihe von Isopropanol in Paraffin eingebettet.

Die Lungen wurden auf Millimeterpapier mit einem Skalpell in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in 4%igem Agar (Agar noble, Difco) aufgenommen und über Isopropanol in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom (Leica) in 4-5 μ m dicke Scheiben geschnitten; die einzelnen Schnitte wurden in einem Wasserbad (Medax) bei 42 °C geglättet, auf einen silanisierten Objektträger (Histobond; Marienfeld) aufgebracht und anschließend auf einer Wärmebank (Medax) bei 40°C getrocknet.

Zur Fixierung erfolgte eine Inkubation der Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

10.3 Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte

Die Entparaffinierung und die Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch serielle Inkubation für jeweils 5 min. in einem Tauchbad von 100% Xylol (I) und (II),

100%igem Ethanol (Merck) (I), 100%igem Ethanol (II), 96%, 70%, 50% und 35%igem Ethanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate in destilliertem Wasser für 10 min. belassen.

10.4 Immunfärbungen

Vor der Immunfärbung wurden die Paraffinschnitte in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0, in der Mikrowelle einmal für 8 min. bei 750 Watt und je 2 min. bei 450 Watt aufgeköcht (Prall et al., 1996). Nach 15 min. Abkühlung bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter Puffer dazugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte.

10.4.1 Darstellung von CEACAM1 mit dem mAb 4D1/C2 durch Peroxidase-Reaktion

Die folgenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, soweit es nicht anders erwähnt ist. Alle Inkubationsschritte der Objektträger mit Antikörpern und Enzym-Konjugaten wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach Mikrowellenbehandlung wurden die Schnitte drei Mal für je 5 min. in TBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Hemmung der endogenen Peroxidase durch zwanzigminütige Inkubation in einem Bad aus 0,3% H₂O₂ in reinem Methanol. Erneut wurden die Präparate dreifach wie zuvor in TBS äquilibriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 20minütige Inkubation mit normalem Kaninchenserum oder normalem Schweineserum (10%ig in TBS, DAKO) abgedeckt. Von dem primären anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 wurden je 100 µl der Antikörperlösung in TBS (c= 4 µg/ml) auf die Schnitte geträufelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 min. in TBS erfolgte eine Inkubation von 30 min. mit dem Sekundärantikörper. Es handelt sich um einen biotinylierten Anti-Maus-Antikörper, der durch die hochaffine Bindung des Streptavidin-Enzymkomplexes eine Verstärkung der Detektion erlaubt. Der Sekundärantikörper wurde 1:40 in TBS verdünnt eingesetzt; je 100 µl wurden auf die einzelnen Schnitte aufgebracht (Ziege-anti-Maus-Biotin, DAKO). Ungebundene Immunglobuline wurden durch Waschen in TBS wie zuvor entfernt. Nach halbstündiger Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Streptavidin (in einer Verdünnung von 1:250, nach Angaben des

Herstellers; 100 μ l je Präparat, POD-ABC-Komplex, Vectastain ABC-Kit, Elite PK 6100 Standard, Vector Laboratories) und Waschen in 0,1 M PB-Puffer erfolgte die Darstellung der Peroxidase mit Hilfe einer durch Glucose-Oxidase verstärkten Reaktion, bei der ein schwarzer Niederschlag entsteht:

Pro Küvette wurden 60 mg NH_4Cl in 150 ml PB vollständig gelöst, und nacheinander 3 ml einer 0,05 M NiSO_4 -Lösung sowie 3 ml einer 10%igen Glucoselösung zugesetzt. Unter Lichtausschluß erfolgte die Zugabe von 75 mg DAB Pulver. Kurz vor Gebrauch wurden 500 μ l einer Glucoseoxidaselösung ($c=1,2$ mg/ml in H_2O) zugefügt.

Die Färbelösung wurde zwischen 7 und 20 min. auf den Präparaten belassen, bis eine schwarze Verfärbung zu beobachten war. Die Reaktion konnte durch Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser abgebrochen werden.

Im Falle einer Einzelfärbung wurden die Präparate anschließend mit Hämalaun-Lösung nach Mayer gegengefärbt, dehydriert und eingedeckt.

10.4.1.1 Bläuen der Schnitte in Mayers Hämalaunlösung

In einem Tauchbad von Mayers Hämalaunlösung (50%ig in destilliertem Wasser) wurden die Präparate für 10 Sekunden geschwenkt und danach in fließendem Wasser für 10 min. gebläut.

10.4.1.2 Dehydrieren und Eindecken von Präparaten nach Darstellung der Peroxidase durch Glucoseoxidase-Verstärkung

Die Dehydrierung wurde in Tauchbädern einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol vorgenommen: in 50%iger, 70%iger, und 95%iger Ethanollösung wurden die Schnitte je 5 min. inkubiert; es folgten Inkubationen in reinem Alkohol, je 2 Mal für 5 min. und anschließend in 100%igem Xylol für 5 min., 2 min. und 1 min.. Sie wurden mit Kunstharz (Clarion/Eukitt) eingedeckt.

10.4.2 Darstellung der Sialyl-Lewis^x Epitope mit dem mAb 2H5 durch Reaktion der alkalischen Phosphatase

Nach Aufkochen der Präparate in Citratpuffer wurden die Schnitte wie oben in TBS äquilibriert und in 10% Serum/TBS blockiert. Der primäre anti-Sialyl-Lewis^x Antikörper 2H5 wurde über Nacht bei 4°C in einer Konzentration von 12 µg/ml eingesetzt. Pro Präparat wurden je 100 µl der Antikörperlösung eingesetzt.

Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS entfernt. Der sekundäre Antikörper (anti-muriner µ-Ketten spezifischer Antikörper aus der Ziege) wurde in einer Verdünnung von 1:40 auf die Schnitte gebracht und für 20 min. inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit der Avidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase (Alkaline Phosphatase Standard, AK-5000, Vectastain ABC-Kit lt. Angaben des Herstellers). Nach Abspülen ungebundenen Materials mit TBS wurde die Farbreaktion durchgeführt: 7,5 ml einer 4%igen Natriumnitritlösung (Lösung 1) wurden mit 100 ml einer HCl-sauren Neufuchsinlösung (Lösung 2) vermischt. Nacheinander wurden 60 mg Levamisol, in 150 ml Tris-Puffer, pH 8,2, gelöst (Lösung 3) dazugegeben. Schließlich erfolgte noch die Zugabe des Substrates für die alkalische Phosphatase, 30 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 750 µl DMF (Lösung 4).

Die Färbung wurde für 20 min. unter Lichtausschluß durchgeführt und in fließendem Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden in Mayers Hämalaunlösung wie beschrieben gegengefärbt und gebläut. Wie bei der Peroxidase-Darstellung wurden die Präparate entwässert.

Die Konservierung der Präparate erfolgte in wasserhaltigem Eindeckmedium (Crystal Mount™). Die Objektträger wurden nach dem Eindecken bei 70-80°C getrocknet.

10.4.3 Doppelfärbungen: Serielle Darstellung der Peroxidase und alkalischen Phosphatase

Bei serieller Darstellung von CEACAM1 durch Peroxidase-Färbung und dem Sialyl-Lewis^x Antigen durch alkalische Phosphatase wurde die Färbung der alkalischen Phosphatase direkt an die Peroxidase-Färbung angeschlossen.

Das Eindecken erfolgte durch Konservierung in Crystal MountTM und ClarionTM.

Lösungen:

4%iger Agar in PB:

Agar noble (Difco Laboratories 0124-17-0) wurde zu 4% (w/v) in PB, pH 7,4, gelöst.

0,1 M PB-Puffer , pH 7,2-7,4

0,03 M KH₂PO₄, 0,1 M Na₂HPO₄x 2H₂O; Einstellen des pH Wertes durch Zugabe von kristallinem Na₂HPO₄x2H₂O auf 7,4.

Mayers Hämalaunlösung

50%ig (v/v) in Wasser

Citratpuffer, 10 mM/NaOH

10 mM Citrat-Monohydrat

TBS, pH 7,6/HCl

50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl

Lösung für die Peroxidase-Glucoseoxidase-Darstellung

60 mg NH₄Cl, 0,05 M NiSO₄, 10% Glucoselösung (w/v), 75 mg DAB, 1,2 mg Glucoseoxidase in 150 ml PB

Lösungen für die Darstellung der alkalischen Phosphatase

Lösung 1: 4% NaNO₂ in ddH₂O, 7,5 ml; Lösung 2: 5 g Neufuchsin in 100 ml 2 N HCl;
Lösung 3: 10 mM Tris, 300mM NaCl, pH 8,24, + 60 mg Levamisol; Lösung 4: 20-30 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 750 µl DMF abs..

Eindeckmedien

DePeX

Crystal Mount™ (Biomedica Corp.)

Clarion™ permanent mounting media (Biomedica Corp.)

10.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Aus Frischblut isolierte neutrophile Granulocyten wurden nach Inkubation mit biotinylierten Typ-1-Fimbrien in der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie untersucht. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Zeiss Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 410 invert) mit einem Ölimmersionsobjektiv (40 x 1,3) erstellt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der installierten Zeiss CLSM-Software digitalisiert, elektronisch mit verschiedenen Zoomfaktoren (1-4) vergrößert und mit Adobe Photoshop™ und Power Point bearbeitet.

Die Granulocyten und Typ-1-Fimbrien wurden wie in **1.1** und **17** beschrieben isoliert. Für Zeitintervalle von 1, 5, 10, 20, 30 und 40 min. wurden jeweils 1 x 10⁶ Granulocyten (in PBS mit je 1mM CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, pH 7,4) mit 10µg biotinylierten Typ-1-Fimbrien bei 37°C unter stetem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von je 2 ml eisgekühltem PBS wurden die Zellen bei 2.500 Upm (Hettich-Zentrifuge, 4°C, 10 min.) pelletiert und in je 200 µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Zur Immunfärbung wurden die Zellen auf Superfrost-Objektträgern verstrichen und bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde eine immuncytochemische Doppelfärbung zum Nachweis von CEACAM1 und biotinylierten Typ-1-Fimbrien durchgeführt:

Die Zellen wurden kurz in PBS gespült und anschließend für 10 min. bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (je 5 min.) wurden die Präparate in TBS/FBS/BSA blockiert und für 1 h mit dem

anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 (20 μ g/ml) inkubiert. Die Objektträger wurden drei Mal für je 5 min. in PBS gewaschen und erneut in TBS/FBS/BSA blockiert. Nach Spülen in PBS wurde der FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierte anti-Maus Antikörper (Dianova) für 30 min. aufgetragen (1:50 in PBS); nach Waschen w.o. erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-markiertem LRSC (LRSC=LissaminTM-Rhodamin B-Sulfonylchlorid; Dianova; 1:50; in PBS). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mikroskopiert.

Lösungen:

Fixierungslösung

4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS

Blockierungslösung

20%FBS, 12% BSA in TBS, pH 7,2

10.6 Elektronenmikroskopie

Aus Frischblut isolierte Granulocyten wurden zu Aliquots von 2×10^6 Zellen/ml in PBS mit je 1 mM CaCl_2 und MgCl_2 in 15 ml Greiner-Röhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von je 12,5 μ g Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* wurden die Zellen 1, 5, 10, 20, 30 und 40 min. inkubiert. Zur Fixierung wurden die Zellen in 3%igem Glutardialdehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Glutardialdehyd wurde in 0,1 M PB/0,1 M Saccharose ausgewaschen. Die Zellen wurden zwei Mal in PB/Saccharosepuffer gewaschen. Nach Pelletieren in der Eppendorffzentrifuge wurden die Zellen in PB aufgenommen und 1:1 mit 4%igem Agar (Agar noble, Difco) versetzt und sofort in der Eppendorffzentrifuge in ein Agarkissen hineinzentrifugiert. Die Granulocytenpellets wurden nach Fixation in 1%igem Osmiumtetroxid in Saccharose-PB-Puffer in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Alkohole unvergällt) dehydriert und über das Intermedium Propylenoxid in Glycidether (Epon812; Serva) nach der Methode von Luft, 1961, eingebettet. Nach Anfertigung von Semidünnschnitten mit einem Leica Ultracut Mikrotom wurden die Schnitte in 1%igem Toluidinblau in

1% Natriumtetraborat und 1% Pyrroninrot (3:2) bei 60°C gefärbt und unter dem Mikroskop begutachtet.

Nach Aufsuchen geeigneter Areale wurden Ultradünnschnitte von 60 nm angefertigt. Die Kontrastierung zur Elektronenmikroskopie erfolgte nach Reynolds mit wässrigem oder alkoholischem Uranylacetat (Reynolds, 1963).

Die Aufnahmen wurden mit einem Philips-Elektronenmikroskop (CM100) angefertigt. Die Bilder wurden auf AGFA Fotopapier abgezogen (AGFA Spezial BS 310RC glossy grade special).

Lösungen:

3% Glutardialdehyd in PB

3% Glutardialdehyd (w/v) in 0,1 M PB-Puffer

Saccharose-PB-Puffer

0,1 M PB, 0,1 M Saccharose

4% Agar in 0,1 PB

4% Agar (w/v) in PB

1% OsO₄ in PB

2% OsO₄ (w/v in Wasser), Saccharose-PB-Puffer (1:1)

Toluidin-Blau/Pyronin-Rot-Färbelösung

Lösung 1: 1% Toluidin Blau (w/v; Chroma) in 1% Dinatrium-Tetraborat-Decahydrat (w/v); Lösung 2: 1% Pyronin G (w/v); beide Lösungen vor Gebrauch im Verhältnis 3:2 mischen

Uranylacetat

1% Uranylacetat (w/v)

Bleicitrat

1% Bleicitrat (w/v)

Zellbiologische Methoden

11 Bestimmung von Zellzahlen in einer Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zelltitel wurde eine Zählkammer nach Neubauer eingesetzt. In PBS verdünnte Zellsuspensionen wurden auf den Objektträger pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden in dem groben Raster vier Großquadrate ausgezählt. Die so erhaltene Zellzahl wurde mit dem Faktor 10.000 sowie dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert; auf diese Weise wurde die Zellzahl/ml festgestellt ($4 \text{ Großquadrate} = 0,4 \text{ mm}^3$; $0,4 \text{ mm}^3 \times 2,5 \times 1.000 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$).

12 Trypsinieren von adhärenenten Zellen

Von einem konfluenten Zellrasen in einer T75-Flasche wurde das Medium vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,25%ig, Life Technologies) versetzt. Das Trypsin wurde verteilt und das Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium (mit 10% FBS; zweifaches Volumen) gestoppt. Die Zellen wurden bei 900 Upm bei Raumtemperatur pelletiert und mit Zellkulturmedium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen ausgesät oder in Experimente eingesetzt.

Lösungen:

Trypsin/EDTA (Life Technologies)

0,25% Trypsin (w/v), 1mM EDTA in HBSS (Hanks´ balanced salt solution)

13 Einfrieren und Auftauen von Zellen

13.1. Einfrieren von Zellen

2×10^6 Zellen wurden bei 900 Upm pelletiert. Sie wurden in 1 ml Einfriermedium (FBS, 10 % DMSO) resuspendiert und auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen bei -80°C für drei Tage eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -200°C gelagert.

13.2 Auftauen von Zellen

Durch langsames Schwenken in einem Wasserbad (37°C) wurden die Zellen aufgetaut und schnell in 10 ml konditioniertes Zellkulturmedium überführt. Die Zellen wurden bei 900 Upm (Sigma-Zentrifuge, Raumtemperatur) pelletiert und wiederholt in 10 ml Medium gewaschen. Danach wurden sie in entsprechender Dichte ausgesät und bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO_2 kultiviert.

14 Kultivierung von Zellen

14.1 Kultivierung humaner Endothelzellen (HDMEC)

HDMEC (HDMEC=*Human dermal microvascular endothelial cells*; PromoCell) wurden in Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen in Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell) mit 5% FBS mit je 1 U/ml Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) angezüchtet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert.

14.2 Kultivierung humaner Tumorzelllinien HT29 und HT29mdr

Die humanen Coloncancerzelllinien HT29 und die mit Colchicin behandelte Variante HT29mdr wurden in McCoy's modified medium 5A (Life Technologies) 10 % FBS Life Technologies) bei 37°C und 5% CO_2 in Zellkulturflaschen konfluent gezüchtet. Die Zelllinie HT29mdr zeichnet sich durch die Überexpression des

"multidrug resistance glycoproteins1" (mdr1) aus. Diese Eigenschaft kann durch die Behandlung mit Colchicin induziert werden (McCoy's modified medium 5A mit 0,15 mg Colchicin/50 ml).

14.3 Kultivierung der Hybridoma-Zelllinie T84.1

Die Hybridoma-Zelllinie T84.1 wurde in RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (Life Technologies), Penicillin und Streptomycin (je 1 U/ml; Life Technologies) und 10% FBS (reduzierter IgG-Gehalt, c(bovine IgG) ca. 2µg/ml; Life Technologies) bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert.

15 Klonierung der Hybridoma-Zelllinie T84.1

Hybridomazellen sind Fusionszellen aus murinen Milzzellen und einer Myelomzelllinie, die nach Fusion in Polyethylenglycol durch Selektionierung gewonnen wurden (Köhler und Milstein, 1975). Der gewünschte Klon wird durch verschiedene immunologische Methoden auf seine Antigenpezifität (z.B. Western Blot, ELISA; siehe hierzu die entsprechenden Abschnitte **8** und **6**) überprüft und anschließend in Massenkultur expandiert.

Details der Hybridomazelllinie T84.1 sind in der Literatur beschrieben (Wagener et al., 1983). Diese Zelllinie produziert einen murinen IgG1 Antikörper, der gegen CEA, CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM8 gerichtet ist (Wagener et al., 1983; Neumaier, et al., 1985).

Die Hybridomazellen (Prof. Dr. J. Shively) wurden in Aliquots von 2x10⁶ Zellen/ml unter ständigem Schwenken bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 15 ml RPMI-Medium (RPMI1640, Life Technologies, mit Glutamin, 10%FBS) Fötale Bovines Serum) resuspendiert. Um abgestorbene Zellen zu entfernen, wurden die lebenden Zellen bei 900 rpm (Hettich-Zentrifuge) pelletiert und wie zuvor in RPMI-Medium gewaschen und aufgenommen. Für die erste Expansion wurden je ca. 1x10⁵ Zellen in T75-Zellkulturflaschen (Nunc; 75cm² Oberfläche) ausgesät und im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Die Generationsdauer der Population betrug ca. 18-20h.

Nach Anzucht der Zellen wurden diese in 96-Loch-Platten vereinzelt, indem je 100 μ l einer Zellsuspension ($c=3$ Zellen/ml) in einen Napf pipettiert wurden. Statistisch enthielt jeder 3. Napf eine Zelle. Die Zellen wurden klonal zu Kolonien unter den obengenannten Bedingungen expandiert. Durch einen ELISA (siehe hierzu Abschnitt 6.1) wurde die Antikörperproduktion der einzelnen Klone kontrolliert. Die Immunreaktivität und Spezifität des Antikörpers wurde gegenüber Granulocyten-rohextrakten im Western Blot (Abschnitt 8) untersucht.

16 Produktion des mAb T84.1 im Hohlfaser-Bioreaktor-System (*Hollow Fibre*)

Für die Antikörperproduktion im Großmaßstab wurde nach Bestimmung der Antikörperkonzentration im Sandwich-ELISA der bestproduzierende Klon ausgewählt und expandiert. Hierfür erfolgte die Adaptierung an RPMI1640-Medium mit 10 % FBS (Life Technologies, reduzierter IgG-Gehalt), das einen erhöhten Glucosegehalt aufwies (Endkonzentration 4,5g/l), und in dem Glutamin zusätzlich in Form eines Dipeptides supplementiert wurde (GlutaMAXTM-II, L-Glycyl-L-Glutamin; Endkonzentration L-Glutamin gesamt: 4 mM).

Die Großkultur wurde in einem Cell-Pharm-System (In vitro-Systems) vorgenommen, in dem die Zellen in einem Bioreaktor semi-adhärenent an porösen Mikro-Hohlfasern entlang wuchsen, der über einen Kreislauf mit einem temperierten Medium- und Gasreservoir verbunden war. Für die Kultivierung der Zellen in dem Hohlfaserreaktor stand somit eine Oberfläche von ca. 17 m² (19ft²) zur Verfügung. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgte durch die Poren in den Fasern, die mit einem Ausschlußdurchmesser von 30 kD zwar den Durchtritt von Nährstoffen aus dem Medium erlaubten, jedoch Serumkomponenten und die von den Zellen produzierten Antikörper zurückhielten. Es wurde ein dreitägiger Vorlauf unter Kulturbedingungen durchgeführt, um die Sterilität des Systems zu überprüfen. Anschließend wurden einmalig 5×10^8 Zellen in den Reaktor eingesetzt. Die Mediumrezirkulationsrate im Reaktor wurde für die ersten 5 Tage auf 50 ml/min eingestellt, um das Anheften der Zellen zu erleichtern; später wurde die Rezirkulation des Mediums auf 300 ml/min gesteigert und nach Bedarf weiter bis auf 450 ml/min erhöht. Der Verbrauch des Mediums betrug zu Anfang des Laufes ca. 2 l/Tag. Er wurde entsprechend des

Wachstumsverhaltens der Zellen und des Bedarfs ebenfalls erhöht. Der durchschnittliche Mediumverbrauch belief sich auf 4,5 l/Tag.

Die Kultivierung erfolgte in dem beschriebenen Medium mit einem CO₂-Gehalt von 5% und bei 37°C. Der Stoffwechsel der Zellen im Bioreaktor wurde regelmäßig in einem BGA-Gerät (Blutgas-Analyse-Gerät) überprüft (überprüfte Parameter: O₂-Sättigung, CO₂-Sättigung, Glucose- und Lactatkonzentration, pH-Wert). Auf diese Weise konnte die tägliche Fütterungsrate sowie der CO₂-Verbrauch adaptiert werden. FBS wurde alle 2 Tage nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in einer Endkonzentration von 10% zugefüttert.

Die Antikörperproduktion wurde mit einem Sandwich-ELISA überprüft (siehe Abschnitt 6.1).

17 Isolierung vitaler humaner Granulozyten aus Spenderblut

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, Corning Costar) sterilisiert. Zum Ansetzen der Lösungen wurde steriles Wasser verwendet. Es wurden sterile Pipetten, Zentrifugenröhrchen und Glasgeräte benutzt.

30 ml Frischblut (abgenommen in Na⁺K⁺-EDTA-Röhrchen, S-Monovetten, Sarstedt) wurden im Verhältnis von 5:1 mit 3,8%igem Natriumcitrat gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. 3/8 des Volumens wurden an 37° C warmem PBS zugegeben (Blut/Natriumcitrat/PBS 4+1+3). Zur Auftrennung der Zellpopulationen im Ficollgradienten wurden je 17 ml auf 8 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) geschichtet (Böyum, 1968). Nach 40minütiger Zentrifugation bei 1.500 Upm bei 20°C mit 120 sec. Anlaufzeit und ohne Bremse (Hettich Rotixa Zentrifuge) wurde der Überstand, der Monozyten und das Serum enthielt, bis auf 3mm über dem Erythrocytensediment abgenommen und verworfen. Die Granulozytenpopulation wurde von dem Erythrocytensediment durch Absaugen mit einer sterilen Stabpipette abgenommen und in einen hohen 100 ml Meßzylinder gegeben. Der Meßzylinder wurde mit 1%iger PVA-Lösung (PVA = Polyvinylalkohol; in 0,9 %iger NaCl-Lösung) auf ca. 55 ml

aufgefüllt und die Zellen wurden gründlich resuspendiert. Zur Abtrennung der Erythrocyten von den Granulocyten durch Sedimentation wurde die Suspension für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 20°C für 20 min. bei 1.000 Upm, ohne Anlaufzeit und Bremse (Hettich Rotixa-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; das Pellet wurde zur Lyse der restlichen Erythrocyten in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen und schnell resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Wasser wurde das Röhrchen für genau 45 sec. geschwenkt. Zur Wiederherstellung der Osmolarität wurden 5 ml auf 37°C erwärmtes zweifach konzentriertes PBS zugegeben (Brandt et al., 1991).

Die Zellzahl wurde nach Verdünnung eines Aliquots (Verdünnung ca. 1:50) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Überprüfung der Vitalität erfolgte nach Anfärben der Zellen mit Trypanblau-Lösung; nur tote Zellen nehmen den Farbstoff auf, so daß durch Auszählen in der Neubauer-Kammer der prozentuale Anteil lebender Zellen bestimmt werden kann.

Die Zellzahl wurde mit PBS auf einen Titer von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Lösungen:

PBS nach Dulbecco, einfach und zweifach konzentriert, pH 7,2

Trypanblau

0,4% Trypanblau (w/v)

Citrat

3,8 % Trinatriumcitrat-dihydrat (w/v)

1% PVA

0,9% NaCl, 1% PVA

18 Chemotaxe-Assay zur Analyse des Migrationsverhaltens von Endothelzellen (HDMEC)

In der Angiogenese (Gefäßneubildung) ist Wanderung von Zellen ein essentieller Schritt, die durch verschiedene Angiogenese-Aktivatoren ausgelöst werden kann. Die chemotaktische Reaktion der Endothelzellen auf verschiedene aktivierende oder inhibierende Faktoren kann *in vitro* in Boyden-Kammern untersucht werden (Schmidt et al., 1998; Ergün et al., 1999).

Hierzu wurden in die unteren Näpfe einer 96-Loch-Boyden Kammer (Neuroprobe) unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanzen (VEGF, CEACAM1, sowie die Antikörper 4D1/C2 und 2H5) einzeln oder zusammen in verschiedenen Kombinationen pipettiert. Die Näpfe wurden mit einem Filter (8 μm Porengröße, Nucleopore filter) bedeckt, der zuvor über Nacht mit Vitrogen 100 (Collagen Corp.) getränkt worden war. Die Endothelzellen (HDMEC) wurden in je 50 μl serumfreiem Medium (Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell), 0,1 % BSA, aufgenommen und auf die Filter gesetzt. Nach Inkubation von 5-6 h bei 37°C wurde die Zahl der durch die Filter gewanderten Zellen nach Färbung mit Diff Quick (Dade) lichtmikroskopisch bestimmt.

Molekularbiologische Methoden

19 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der PCR können definierte DNA-Abschnitte einer Matrizen-DNA effektiv und sensitiv amplifiziert werden. Das zu amplifizierende Fragment wird durch sequenzspezifische Oligonucleotide (Starter-Moleküle oder *Primer*) für die DNA-Polymerase festgelegt, die die Einzelstränge jeweils in 5'-3'-Richtung verlängert. In der PCR werden thermostabile Polymerasen eingesetzt, die ihr Temperaturoptimum bei 72°C haben (Taq-, Tth-, Pfu, Vent-Polymerase) (Saiki et al., 1988; Chien et al., 1976; Mullis und Falcoona, 1987). Die Matrizen-DNA wird bei 95°C zu

Einzelsträngen denaturiert. Anschließend hybridisieren die *Primer* im Bereich ihrer entsprechenden Schmelztemperatur mit der denaturierten Matrize ("Annealing") auf dem codogenen und dem nichttranskribierten Strang. Die Polymerase verlängert beide Stränge in 3' Richtung. Der zwischen den *Primern* liegende Abschnitt wird hierbei amplifiziert. Der Zyklus aus Denaturierung der Matrize, Hybridisierung mit den *Primern* und Extension des Zielfragmentes wird ca. 30 mal wiederholt. Am Ende folgt ein finaler Extensionsschritt von 10 min., um unvollständige PCR-Fragmente zum vollständigen Amplifikat zu polymerisieren.

Für eine größtmögliche Spezifität der Amplifizierung von DNA-Fragmenten ist u.a. die Hybridisierungstemperatur der *Primer* entscheidend. Zur Abschätzung der optimalen Annealingtemperatur wurde folgende Formel verwendet:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Für jedes GC-Paar wird hierbei eine Schmelztemperatur von 4°C angenommen, für jedes A/T-Paar eine Schmelztemperatur von 2°C. Lag die errechnete Annealing-Temperatur oberhalb von 65°C, wurden 65°C als Anlagerungstemperatur gewählt, um noch eine effiziente Verlängerung zu erreichen.

20 Synthese von *Primern* für die PCR

Die *Primer* für CEACAM1-cyt 3'UTR sowie für die α -2,3-Sialyltransferase wurden an einem Pharmacia-Synthesizer nach der Phosphoramiditmethode hergestellt und anschließend über Chromatographie aufgereinigt.

21.1 Herstellung einer CEACAM1-spezifischen Sonde für die Hybridisierung im Northern Blot

Für die Hybridisierung im Northern Blot wurde durch PCR eine Sonde für humanes CEACAM1 aus CEACAM1 cDNA hergestellt (Dr. Peter Nollau; Gen-Datenbank-Zugangs-Nr. D12502, X16354). Die Sonde codiert für einen 258 bp großen Bereich in

der 3' untranslatierten Region im CEACAM1-Gen (Frängsmyr et al., 1995; Barnett et al., 1989).

Für die PCR wurde die Taq^{gold} Polymerase (Perkin Elmer) sowie die hierzu supplementierten Reaktionspuffer verwendet. Sie liegt inaktiv vor und kann durch einen Heiß-Start (*Hot Start*) in der PCR durch Hitzedenaturierung aktiviert werden.

Reaktionsansatz:

Reagenz	Volumen
10fach konzentrierter PCR-Puffer (Perkin Elmer)	5 μ l
2,0 mM dNTPs	5 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
5' Primer 20 pmol	1 μ l
3' Primer 20 pmol	1 ml
Polymerase (Taq ^{gold} ; 5U/ μ l)	0,5 μ l
Matrizen-DNA	1 μ l
Wasser ad 50 μ l	33,5 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Tabelle 6. Pipettierschema für die PCR zur Amplifizierung der 3'UTR von CEACAM1.

Der Reaktionsansatz wurde mit 2 Tropfen (ca. 50 μ l) Mineralöl überschichtet. Die Reaktion wurde in einem Biozym Minicycler mit dem folgenden Programm durchgeführt (Tabelle 7).

Vorgang	Temperatur	Dauer
(1) initiales Denaturieren	95°C	10 min.
(2) Denaturieren	95°C	1 min.
(3) Anlagerung der Starter-Moleküle	55°C	1 min.
(4) Elongation	72°C	1 min.
(5) finale Elongation	72°C	10 min.

Tabelle 7. Programm zur Amplifizierung der 3'UTR von CEACAM1 durch PCR.

Es wurden 35 Zyklen (Schritte (2)-(5)) durchgeführt.

Primer:

5' Primer: 5'AGGG GT GGG GAC AGA AACA A3'

3' Primer: 5'CTC ATT CCT TCC CAC CCC CA3'

21.2 Herstellung einer DNA-Sonde für die humane α -2,3-Sialyltransferase durch PCR

Nach Sasaki et al. wurde durch PCR eine DNA-Sonde für die α -2,3-Sialyltransferase (Gen-Datenbank-Zugangs-Nr. X74570) hergestellt. Als Matrizen-DNA wurde cDNA aus einer Leukocytenbibliothek (Dr. P. Nollau) verwendet (Sasaki et al., 1994).

Das Amplifikat ist ein 0,9 kb großes Fragment, das die C-terminale Region der α -2,3-Sialyltransferase ((E.C. 2.4.99.6) CMP-N-acetylneuraminate:N-acetylglucosaminide α 2,3-sialyltransferase; (Gal- β 13(4)GlcNAc- α 2,3-sialyltransferase; ST4) beinhaltet (Aminosäuren 31-329). Die hier beschriebene Sialyltransferase ist *in vitro* an der Synthese von Sialyl-Lewis^x-Gruppen beteiligt (Sasaki et al., 1994).

Reaktionsansatz:

Reagenz	Volumen
10fach konzentrierter PCR-Puffer	5 μ l
2,0 mM dNTPs	5 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
5' Primer, 20 pmol	1 μ l
3' Primer, 20 pmol	1 μ l
Polymerase	0,5 μ l
Matrizen-DNA	1 μ l
Wasser ad 50 μ l	33,5 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Tabelle 8. Pipettierschema zur Herstellung eines Fragmentes der α -2,3-Sialyltransferase durch PCR.

Der Reaktionsansatz wurde mit 2 Tropfen (ca. 50 μ l) Mineralöl überschichtet. Die Reaktion wurde in einem Biozym Minicycler durchgeführt. In der Negativkontrolle wurde die Matrizen-DNA weggelassen. In Tabelle 9 ist das PCR-Programm für die Amplifizierung des Zielfragments beschrieben.

Vorgang	Temperatur	Dauer
(1) initiales Denaturieren	95°C	10 min.
(2) Denaturieren	95°C	1 min.
(3) Anlagerung der Primer	65°C	1 min.
(4) Elongation	72°C	1 min.
(5) finale Elongation	72°C	10 min.

Tabelle 9. PCR-Programm für die Amplifikation eines Fragmentes der α -2,3-Sialyltransferase.

Insgesamt wurden 30 Zyklen (Schritt (2)-(5)) durchgeführt.

Primer:

5'Primer: 5'GTTTTATTTTCCCATCCCAGAGAAGAAGGAG3'

3'Primer : 5'AGGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTT3'

21.3 Verwendung der cDNA für humanes β -Actin als Kontrollsonde in Northern Blots

Die vollständige humane β -Actin cDNA (1,8 kb; Zugangs-Nummern in der Gen-Datenbank: M10278; X00351) wurde von der Firma Clontech bezogen. Sie diente bei der Hybridisierung von Northern Blots als Kontrollsonde, um den gleichmäßigen Transfer der RNA auf die Nylonmembran zu überprüfen.

25 ng der β -Actin cDNA wurden zur radioaktiven Markierung eingesetzt.

22 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA und RNA

22.1 Gelelektrophorese von doppelsträngiger DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem horizontalen Agarosegel. Wie auch im Polyacrylamidgel zur Auftrennung von Proteinen gibt es in Agarosegelen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Größe der Moleküle und der Wanderungsdistanz im Gel. (Verhältnis des Logarithmus (\log_{10}) der Länge des linearen, doppelsträngigen Fragmentes und der Wanderungsdistanz; siehe Tabelle 10).

Agarosekonzentration (in % w/v)	Optimaler Auftrennungsbereich linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente (in kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle 10. Übersicht zur Verwendung von verschiedenen konzentrierten Agarosegelen zur Auftrennung von DNA.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle aufgelöst. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromidlösung (5µl/100 ml Gel) zugesetzt. Das Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und vollständig auspolymerisiert. Die Proben wurden mit zehnfach konzentriertem DNA-Ladungspuffer versetzt und direkt auf das Gel geladen. Als Größenstandard wurde eine 100bp-Leiter eingesetzt (Life Technologies; 100-1500 bp, in 100 bp-Schritten).

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (70V) durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Zur Dokumentation wurde das Gel auf dem UV-Illuminator fotografiert.

22.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

Agarosegele unter den obengenannten Bedingungen lassen sich ebenfalls zur Größenauftrennung von RNA verwenden. Die Auftrennung in einem nativen Agarosegel wie oben für DNA beschrieben läßt sich jedoch nur zur Qualitätskontrolle präparierter RNA verwenden, da RNA über Wasserstoffbrückenbindungen multiple Sekundärstrukturen ausbilden kann, die das Laufverhalten verändern. Vor dem Northern Blot wurde daher ein denaturierendes Formaldehydgel verwendet (siehe Abschnitt 27.1).

Lösungen:

TAE-Puffer, 50fach konzentriert

242 g Trizma Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

DNA-Ladungspuffer, 5fach konzentriert

30% Glycerin (v/v), 50 mM EDTA, 0,001% Bromphenolblau (w/v)

23 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurden Glasmilchsäulen (GlassMAX™ DNA Isolation Spin Cartridge System) und die hierzu supplementierten Puffer der Firma Life Technologies benutzt. Nach dem Prinzip eines Anionenaustauschers binden Silicate DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die DNA kann nach dem Waschen mit TE-Puffer oder Wasser von der Glasmatrix eluiert werden. Soweit es nicht anders erwähnt ist, wurden die folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Agarosegelelektrophorese wurde das entsprechende DNA-Fragment auf dem UV-Illuminator aus dem Gel ausgeschnitten. Pro 0,1 g Gelmaterial wurden 450 μ l Natriumiodid (Bindungslösung) zugegeben. Die Agarose wurde bei 50°C geschmolzen. Die Lösung wurde auf eine Glasmilchsäule aufgetragen und für 20 sec. bei 13.000 Upm in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Danach wurde die Säule drei Mal mit 0,4 ml Waschpuffer gewaschen und w.o. zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule für 1 min. bei 13.000 Upm trocken zentrifugiert. Mit 50 μ l auf 65°C vorgewärmtem TE-Puffer (pH 8,0) wurde die DNA in ein frisches Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, 13.000 Upm, 20 sec.) eluiert. Zur Optimierung der Ausbeute wurde dieser Schritt wiederholt. Die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Lösungen:

Natriumiodid (Bindungslösung)

6 M NaI-Lösung in Wasser

Waschpuffer

Nach Angaben des Herstellers wurden 4 ml des Waschpufferkonzentrates mit 71 ml Wasser und 85 ml 100%igem Ethanol zu einer Gebrauchslösung ergänzt. Der Waschpuffer wurde bei 4 °C gelagert.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0

24 Sequenzierung von PCR-Produkten nach Sanger

Die zu charakterisierenden PCR Produkte wurden nach Agarosegelelektrophorese über Glasmilch-Säulen aufgereinigt (s.o.). Die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (s. Abschnitt **26**).

Zur Sequenzierung nach Sanger wurden die DNA-Fragmente in einer PCR mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Nucleotiden markiert. Der Einbau der markierten Didesoxynucleotide während der Elongation führt zum Kettenabbruch (Sanger et al., 1977). Statistisch lassen sich die Bedingungen so wählen, daß Fragmente entstehen, die sich in ihrer Länge jeweils um ein Nucleotid unterscheiden. In einem Polyacrylamidgel können sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Während der elektrophoretischen Auftrennung werden die markierten Nucleotide durch einen Laser angeregt und vermessen.

Für den Einbau Fluoreszenzfarbstoff-markierter Nucleotide wurde das Cycle-Sequencing BigDye KitTM der Firma Perkin Elmer verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde folgender Ansatz gewählt (Tabellen 11 und 12):

Reagenz	Volumen
4 μ l Terminator Reaction Mix	4 μ l
4 μ l Erganzungslosung	4 μ l
Matrizen-DNA in TE-Puffer	x μ l (ca. 200 ng PCR-Produkt)
<i>Primer*</i>	1 μ l (15 pmol)
Wasser ad 20 μ l	y μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Tabelle 11. Pipettierschema für eine PCR zur Sequenzierung von PCR-Produkten.

(*Je nachdem, ob vom 5'Ende oder vom 3'Ende des PCR-Produktes sequenziert werden sollte, wurde der *Primer* für die Hybridisierung mit dem codogenen oder nichttranslatierten Strang verwendet).

PCR-Programm:

Vorgang	Temperatur	Dauer
(1) initiales Denaturieren	95°C	5 min.
(2) Denaturieren	95°C	10 sec.
(3) Anlagerung der Primer	50°C	15 sec.
(4) Elongation	60°C	1 min.
(5) finale Elongation	60°C	4 min.

Tabelle 12. PCR-Protokoll für den Einbau Fluoreszenz-markierter Didesoxynucleotide in die Matrizen-DNA.

Von den Schritten 2-5 wurden 25 Cyclen durchgeführt.

25 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen

Alle verwendeten Geräte und Reagenzien wurden vor Gebrauch sterilisiert. Die Lösungsmittel besaßen entsprechende Reinheit für molekularbiologische Zwecke.

Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen wurde nach Angaben des Herstellers mit TrizolTM-Reagenz (Life Technologies) nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Zusätzlich wurde die durch die Trizol-Methode erhaltene RNA einer Lithiumchloridfallung unterzogen.

25.1 RNA-Gewinnung aus Gewebe

Für den Gewebeaufschluß wurden die Gewebestücke direkt nach der Operation in flüssigen Stickstoff eingefroren und unmittelbar vor der Aufarbeitung in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen.

25.2 RNA-Gewinnung aus Zellen

Bei der Isolierung von RNA aus Zellen wurde der konfluent gewachsene Zellrasen zunächst mit PBS gespült und anschließend direkt mit Trizol behandelt.

Pro 50 mg Gewebe bzw. 1×10^6 Zellen wurden jeweils 800 μ l Trizol eingesetzt. Nach Zugabe von 1 μ l Glycogen (Roche) und 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 160 μ l Chloroform dazugegeben. Die Proben wurden gevortext und nach 3 min. Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. zentrifugiert (Sorvall RC5C, SS34-Rotor, 10.000 Upm, 4°C). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 400 μ l Isopropanol versetzt. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut w.o. für 10 min. zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 1,0 ml kaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Nach 5 min. Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge (7.500 Upm, 4°C) wurde das RNA-Pellet in 500 μ l 4 M Lithiumchlorid resuspendiert und gevortext. Die Proben wurden für 10 min. zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 6.000 Upm, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l TE/1%SDS resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurden die Proben gevortext und erneut für 10 min. zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 6.000 Upm, RT). Der Überstand wurde zur Fällung der RNA mit 13 μ l 3 M Essigsäure (pH 5,2) und 200 μ l Isopropanol versetzt und für 10 min. bei RT stehen gelassen. Nach Pelletieren der RNA (Eppendorfszentrifuge, 15 min., 10.000 Upm, RT) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Es wurde in 50 μ l TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen, resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde nach Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel begutachtet.

26 DNA- und RNA-Quantifizierung in der Photometrie

Zur Quantifizierung von RNA und DNA wurden die Proben mit Wasser verdünnt und im Photometer bei 260 und 280 nm vermessen. Der Leerwert wurde gegen Wasser geeicht. Bei 260 nm kann die Konzentration der Nucleinsäuren ermittelt werden, da hier Nucleotide ihr Absorptionsmaximum haben; die Extinktion bei 280 nm entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen und gibt Aufschluß über die Stärke der Kontamination der präparierten Nucleinsäuren durch Proteine. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung einen Wert (OD_{260}/OD_{280}) von 2,0 (Maniatis und Sambrook, 1989).

1 OD_{260} entspricht $50\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und $40\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA.

Die Konzentration an Nucleinsäuren läßt sich nach der Formel

$$c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

mit OD_{260} =gemessener OD-Wert, V =Verdünnungsfaktor, und F =Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA, 37 für ssDNA) berechnen.

27 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Alle Geräte und Puffer wurden vor Beginn der Arbeiten zur Inaktivierung von RNasen autoklaviert. Das Zubehör für die Gelelektrophorese wurde in 0,5 M NaOH eingeweicht und anschließend mit sterilem Wasser gespült.

Zur Auftrennung der Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, das 1,1% Formaldehyd enthielt. Das Formaldehyd dient zur Denaturierung der RNA, da es durch Bildung von Schiffschen Basen mit den Nucleotiden die Bildung von Sekundärstrukturen über Wasserstoffbrücken verhindert. Die RNA kann somit allein aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer eingesetzt (3-Morpholino-1-propansulfonsäure); der denaturierende Probenpuffer, der Formamid enthält, zerstört bereits vorhandene

Basenpaarungen in der RNA und ermöglicht so die Reaktion mit dem Formaldehyd zur Schiffischen Base.

27.1 Denaturierendes Formaldehydgel

1g Agarose wurden in 85 ml Wasser in der Mikrowelle aufgelöst und unter Rühren auf ca. 70°C abgekühlt. Unter dem Abzug wurden 10 ml 10fach konzentrierter MOPS-Puffer und 5,4 ml frisches Formaldehyd (37%ig, pH>4) zugegeben und verrührt. Das Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und vollständig polymerisiert. In der Gelkammer wurde das Gel mit 1fachem MOPS-Puffer bedeckt und bei 70V für 10 min. äquilibriert.

27.2 Probenvorbereitung

15 µg Gesamt-RNA wurden in der Vakuumzentrifuge vollständig eingetrocknet. Die Pellets wurden in je 20 µl Ladepuffer aufgenommen und gevortext. Zur Denaturierung wurden die Proben für 3 min. auf 95 °C erhitzt und jede Minute durch Vortexen gemischt. Um eine Renaturierung zu Verhindern, wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und unverzüglich auf das Gel geladen.

27.3 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde über 4 h bei 70 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront des Ladepuffers ca. 80% der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Das Gel wurde für 10 min. in wässriger Ethidiumbromidlösung (20 mg/ml) gefärbt und anschließend für 1 h in Wasser entfärbt. Zur Überprüfung der Auftrennung und der Qualität der RNA wurde ein Foto mit Maßstab (Lineal, RNA-Größenstandard) angefertigt. Das Gel wurde anschließend für 2 h weiter entfärbt, da Ethidiumbromid den Transfer auf die Nylonmembran (Genescreen Plus membranes, NEN Life Science Products) behindert.

27.4 Northern Blotting

Für den Kapillartransfer der RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran wurden in einer Wanne trockene Papierhandtücher und Whatman-Filter aufeinander geschichtet. Auf die trockenen Whatman-Filter wurden zwei Lagen in Transferpuffer zehnfach konzentrierter SSC-Puffer; (*Sodiumchlorine/sodiumcitrate*) äquilibrierte Whatman-Filter gebracht. Darauf wurde die in Wasser und zehnfach konzentriertem SSC-Puffer getränkte Nylonmembran gelegt und an einer Ecke markiert. Das in Transferpuffer äquilibrierte Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit feuchten Whatman-Filtern belegt. Auf die Filter wurden zwei in Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Der Aufbau wurde mit einer Folie zugedeckt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Zu Überprüfung des Transfers wurde das Gel auf den UV-Illuminator gelegt; die Nylonmembran wurde zur Fixierung der RNA bei 80°C für 2 h im Vakuumofen gebacken und bis zur Hybridisierung zwischen Filterpapier gelagert.

Lösungen:

10fach konzentrierter MOPS-Puffer/NaOH, pH 7,2

0,4 M MOPS (3-Morpholine-1-propansulfonsäure), 0,1 M Natriumcitrat, 6,4 mM EDTA; nach dem Autoklavieren wurde der Puffer bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

RNA-Ladepuffer

14,4 ml Formamid (deionisiert), 3,2 ml 10facher MOPS-Puffer, 5,2 ml Formaldehyd (37%), 3,6 ml Glycerol, mit Wasser auf 30 ml auffüllen und 75 mg Bromphenolblau zugeben.

10fach konzentrierter SSC-Puffer, pH 7,0

1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat-Dihydrat

Ethidiumbromidlösung

Pro 100 ml Wasser wurden 20 mg Ethidiumbromid zugesetzt.

28 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung im Northern Blot

Für die radioaktive Markierung der DNA-Sonden wurde das Random Megaprime™ Labelling Kit der Firma Amersham verwendet. Die Vorgehensweise entsprach im Wesentlichen den Angaben des Herstellers.

25 ng der entsprechenden DNA-Sonde wurden für die Hybridisierungen im Northern Blot eingesetzt. Die DNA wurde in einer Polymerasekettenreaktion radioaktiv mit γ dCTP³² markiert (Polymerasekettenreaktion: siehe entsprechender Abschnitt). Hierfür wurden Zufalls-Hexamere (*random primers*) als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli* benutzt, die das radioaktiv markierte Nucleotid in die neu synthetisierte DNA einbaut.

25 ng der über Glasmilch gereinigten PCR-Produkte wurden im Markierungsansatz als Matrizen-DNA benutzt. Die Matrizen-DNA wurde für 5 min. bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden der Reaktionspuffer, die Primer-Lösung und das Enzym auf Eis dazu pipettiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten Nucleotids wurde der Ansatz für 45 min. bei 37°C inkubiert (siehe Pipettierschema, Tabelle 13). Die markierte Sonde wurde in 450 μ l TE-Puffer aufgenommen und über eine mit TE-Puffer äquilibrierte Nap-5-Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Der Durchlauf, der die nicht eingebauten Nucleotide enthielt, wurde verworfen; das Eluat (in 1 ml TE-Puffer) wurde im Szintillations-Zähler nach Cerenkov vermessen.

Reagenz	Volumen
Matrizen-DNA	x μ l (entspr. 25 ng)
Primer-Lösung	5 μ l
Reaktionspuffer (5fach konzentriert)	10 μ l
Enzym (Klenow-Fragment)	2 μ l
Wasser ad 50 μ l	y μ l
(dCTP ³² (DuPont, NEG503Z)	5 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Tabelle 13. Pipettierschema für den Einbau radioaktiv markierter Desoxynucleotide in cDNA-Sonden durch PCR.

Für die Hybridisierung im Northern Blot wurden jeweils 10^6 cpm/ml Hybridisierungspuffer (Rapid Hyb Buffer, Amersham) eingesetzt; die Blots wurden jeweils in 10 ml Hybridisierungspuffer inkubiert.

29 Radioaktivitätsmessungen

^{32}P -markierte DNA-Sonden wurden im P-Kanal eines Packard Tricarb Szintillationszählers in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Packard) vermessen.

30 Hybridisierung von Northern Blots mit DNA-Sonden

Die Vorhybridisierung der Membranen wurde für alle drei Sonden über Nacht in je 10 ml Hybridisierungspuffer (Rapid-Hyb-Buffer, Amersham) bei 65°C im Hybridisierungs-ofen durchgeführt. Die Hybridisierung mit der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde wurde ebenfalls über Nacht bei 65°C in 10 ml Hybridisierungspuffer vorgenommen. Von jeder Sonde wurden insgesamt 10^7 cpm eingesetzt.

Vor dem Auflegen des Röntgenfilms (HyperfilmTM, Amersham) wurden die Blots wie folgt gewaschen und anschließend exponiert:

	CEACAM1 3'UTR	α-2,3- Sialyltransferase	β-Actin
Hybridisierungstemperatur	65°C	65°C	65°C
Waschen:			
2xSSC/1%SDS 42°C	1 x 5 min	1 x 5 min.	1 x 15 min.
0,1x SSC/1%SDS 50°C	1 x 15 min.	1 x 20 min.	1 x 20 min.
Exposition des Films	1-3 Tage, -80°C	1-3 Tage, -80°C	2 h, RT

Tabelle 14. Zusammenfassung der Hybridisierungs- und Waschprotokolle für die cDNA-Sonden des humanen CEACAM1 (3'UTR), der α -2,3-Sialyltransferase und β -Actin.

Da nacheinander drei verschiedene Sonden mit der gleichen Nylonmembran hybridisiert wurden, wurde sie vor jeder neuen Hybridisierung über Nacht bei 65°C in

0,1xSSC/1%SDS-Waschpuffer gewaschen, um die vorhandenen Signale zu entfernen.
Der Vorgang wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (2 Tage, -80°C) überprüft.

Lösungen:

2xSSC, 1 % SDS (w/v)

0,1xSSC, 1% SDS (w/v)

Ergebnisse

1 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

Für die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*, die monoklonalen Antikörper 4D1/C2 und T84.1, sowie aufgereinigtes CEACAM1 benötigt. Die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung dieser Proteine ist im Folgenden beschrieben.

1.1 Isolierung und Charakterisierung von Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*

1.1.1 Darstellung der strukturellen Hauptuntereinheit der Typ-1-Fimbrien, dem FimA-Protein, im Silbergel.

Die Reinheit der isolierten Fimbrien aus *E. coli* wurde in einem 12,5 %igen Silbergel überprüft. Um die 0,2 -1 μm langen Fibrillen in ihre Untereinheiten zu zerlegen, wurden die Fimbrien vor dem Auftragen auf das Gel in 0,2 M HCl, pH 1,8, für 5 min. bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden mit einfach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli versetzt und in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend einer Silberfärbung unterzogen.

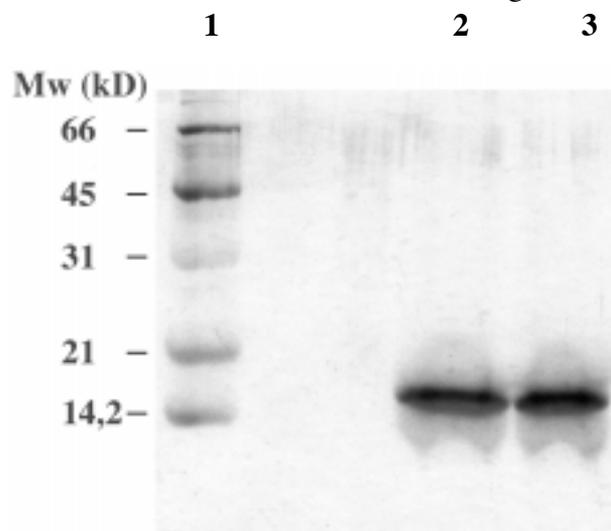


Abb. 8. Silberfärbung der fimbriellen Proteine aus *E. coli*. Zu sehen ist in den Bahnen 2 und 3 eine Bande auf der Höhe von ca. 16-17 kD, die dem Molekulargewicht der strukturellen Hauptuntereinheit der Typ-1-Fimbrien, dem FimA-Protein, entspricht (Klemm, 1984). In Bahn 1 wurde der Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Das fimbrielle Adhesin, das FimH-Protein (32 kDa), ist nicht zu detektieren.

1.1.2 Immunologische Charakterisierung der Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* im Western Blot

Die immunologische Reaktivität der Typ-1-Fimbrien wurde im Western Blot nach Gelelektrophorese in einem 12,5 %igen Gel analysiert. Als Detektionsantikörper wurde ein polyklonales Kaninchen-Antiserum in einer Verdünnung von 1: 1.000 in PBS verwendet, das gegen das FimA-Protein gerichtet ist (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jörg Hacker, Würzburg). Die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität erfolgte durch DAB-Färbung nach Inkubation (2h, RT, 1: 2.000 in PBS) mit einem POD-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper.

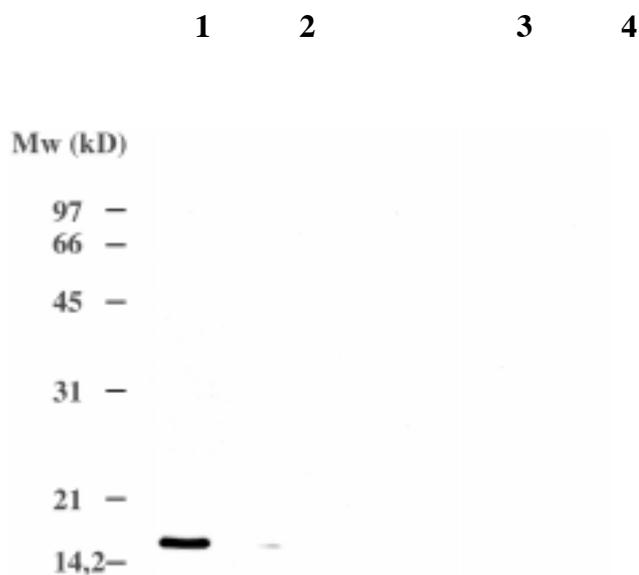


Abb. 9. Detektion des FimA-Proteins aus gereinigten Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* im Western Blot. Aufgetragen wurde in Bahn 1 die unverdünnte Probe und in Bahn 2 die um den Faktor 10 verdünnte Probe. In den Bahnen 3 und 4 wurden die gleichen Proben aufgetragen; zur Kontrolle unspezifischer Reaktionen des sekundären Antikörpers wurde hier das FimA-Antiserum weggelassen.

1.1.3. Agglutinationstest von gereinigten Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* mit Mannan und lyophilisierter Hefe (*S. cerevisiae*)

Um die Funktionsfähigkeit der gereinigten Typ-1-Fimbrien, an natürliche Mannose-Epitope zu binden, sicherzustellen, wurde ihre Bindung an Hefe-Mannan und intakte Hefesporen (*S. cerevisiae*) in einem Agglutinationstest untersucht. Nach Verstreichen der Fimbrien mit der aufgelösten Hefe/dem Mannan auf Objektträgern war eine Agglutination durch Schlierenbildung zu erkennen, die bei geringer werdender Konzentration der Fimbrien abnahm. Durch Lösen der Typ-1-Fimbrien in mannose-

haltigem Puffer (0,5 M α -D-Methylmannosid in PBS) konnte die Agglutination der Hefe/des Mannans unterbunden werden.

1.2 Aufreinigung monoklonaler muriner Antikörper aus Hybridomaüberständen

1.2.1 Aufreinigung der mAbs 4D1/C2 und T84.1.

Die monoklonalen anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 und T84.1 wurden durch Affinitätschromatographie durch die Bindung an immobilisiertes Protein A aus *Staphylococcus aureus* (SPA) aufgereinigt. Zellkulturüberstände der Hybridomakultur wurden nach Zentrifugation im Verhältnis 1:1 mit MAPS-Bindungspuffer (Biorad) versetzt und mit einer Flußrate von 1ml/min über eine Protein A-Säule (Pharmacia, 5 und 50ml Gelbettvolumen) aufgetragen. Es wurde bei einer Flußrate von 1,5 ml/min. mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Bindungspuffer gewaschen und mit dem zehnfachen Volumen MAPS-Elutionspuffer eluiert. Die Elutionsfraktionen, die gemäß der steigenden Absorption bei 280 nm Proteine enthielten, wurden gepoolt, neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden nach PAA-Gelelektrophorese in der Silberfärbung und im Western Blot untersucht. Die Konzentration der Antikörper wurde im *Sandwich*-ELISA bestimmt. Exemplarisch ist die Aufreinigung des mAb 4D1/C2 in der folgenden Abbildung gezeigt:

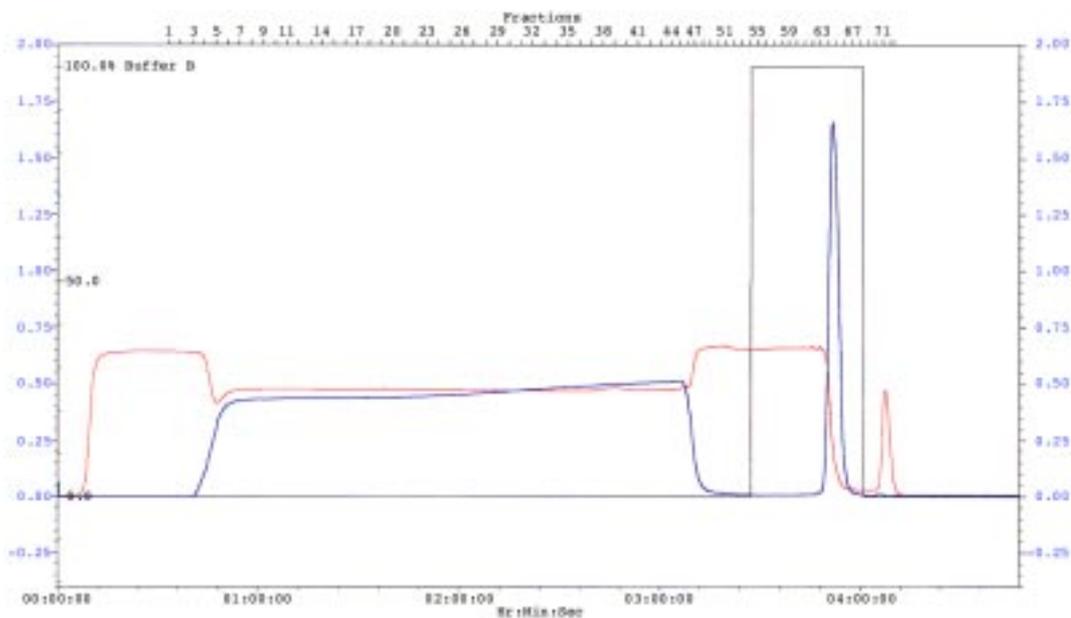


Abb. 10. Chromatogramm zur Aufreinigung des mAb4D1/C2. Die blaue Linie beschreibt die UV-Absorption bei 280nm, die rote Linie die Leitfähigkeit. Auf der Ordinate sind die UV-Absorptionseinheiten angegeben. Die Abzisse stellt den zeitlichen Verlauf dar. Der Stufengradient des Elutionspuffers ist durch eine graue Linie gekennzeichnet. Die Fraktionen 64-68 (à 3,5 ml) wurden

gepoolt und weiter aufgearbeitet. Das Maximum der UV-Absorption liegt bei 1,6 Einheiten, entsprechend einer Proteinkonzentration von 2,48 mg/ml. Die Proteinkonzentration von Immunglobulinen beträgt 1,42 mg/ml bei einer Absorption von 1 (gemessen bei 280 nm; (Harlow und Lan, 1988)).

1.2.2 Überprüfung der Reinheit der Antikörper nach PAA-Gelelektrophorese in der Silberfärbung

Die Reinheit des aufgereinigten Antikörpers 4D1/C2 wurde nach Gelelektrophorese eines 10%PAA-Gels in der Silberfärbung analysiert (Abb. 11). Es wurden 5 μ l bzw. 10 μ l der Antikörperlösung 1:1 mit 1fach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli versetzt und auf das Gel aufgetragen.

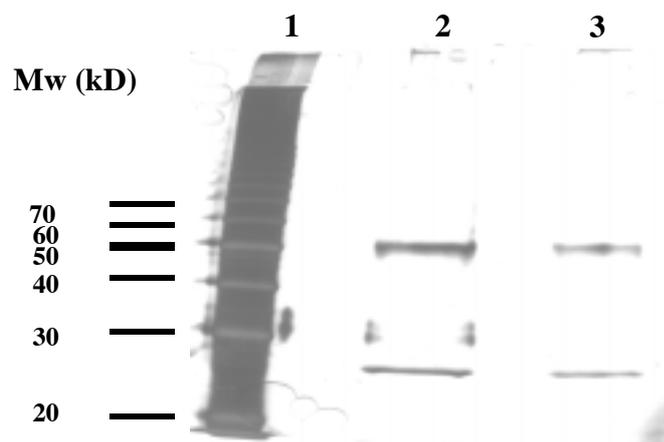


Abb. 11. Silberfärbung des aufgereinigten Antikörpers 4D1/C2. In Bahn 1 wurde der Marker aufgetragen, in Bahn 2 10 μ l und in Bahn 3 5 μ l des aufgereinigten Proteins. Zu sehen sind 2 Banden in der Höhe von ca. 50 und 25 kD, die dem Molekulargewicht der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline entsprechen.

In Abb. 12 ist in der Silberfärbung der Vergleich zwischen Proben aus Zellkulturüberständen und über Protein A aufgereinigtem Antikörper T84.1 gezeigt.

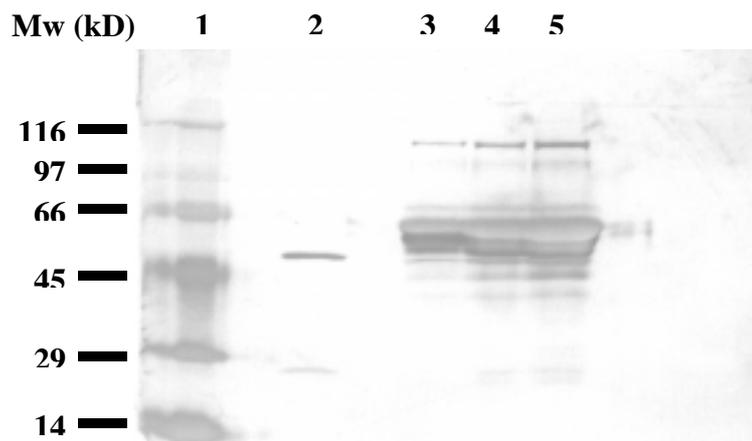


Abb. 12. Vergleich der Zellkulturüberstände (Bahnen 3-5) aus T84.1-Hybridomakulturen mit dem über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigten mAb T84.1. In Bahn 1 ist der Molekulargewichtsstandard aufgetragen, in Bahn 2 der gereinigte Antikörper, von dem sich die schweren Ketten (50kD) und die leichten Ketten (25 kD) des Immunglobulins darstellen lassen.

1.2.3 Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Antikörper im Sandwich-ELISA

Die Konzentration der gewonnenen Immunglobuline wurde im ELISA bestimmt. Aus einer Verdünnungsreihe kommerzieller muriner Immunglobuline (IgG1-Subtyp) wurde eine Eichreihe erstellt, aus der dann die Konzentration der aufgereinigten Immunglobuline abgelesen werden konnte:

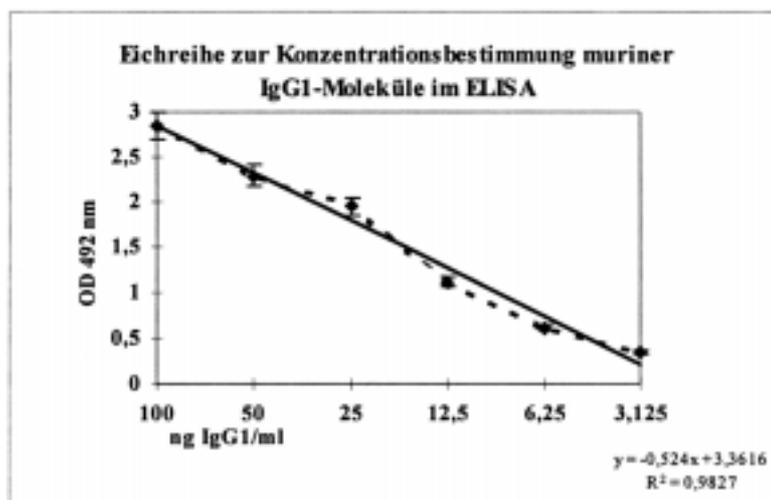


Abb. 13. Eichreihe zur Konzentrationsbestimmung muriner IgG1-Moleküle im ELISA.

Entsprechend der Eichreihe wurden die Konzentrationen der aufgereinigten Antikörper berechnet. Es wurden insgesamt 100 mg 4D1/C2 und 1,2 g T84.1 gewonnen.

1.3 Affinitätschromatographie von Granulocytenrohextrakten über eine T84.1 Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von CEACAM1

Zentrifugierte Granulocytenrohextrakte wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min. auf die T84.1-Affinitätsmatrix aufgetragen. Die Matrix wurde mit PBS gespült und mit Glycin eluiert. Anschließend wurde die Matrix mit PBS reäquilibriert. Die Elutionsfraktionen wurden nach Aufkonzentrieren über einen Biomax 5-Filter (MWCO 5 kD, Millipore) um den Faktor 80-100 nach Auftrennung in einem 7%igen PAA-Gel in der Silberfärbung und im Western Blot analysiert.

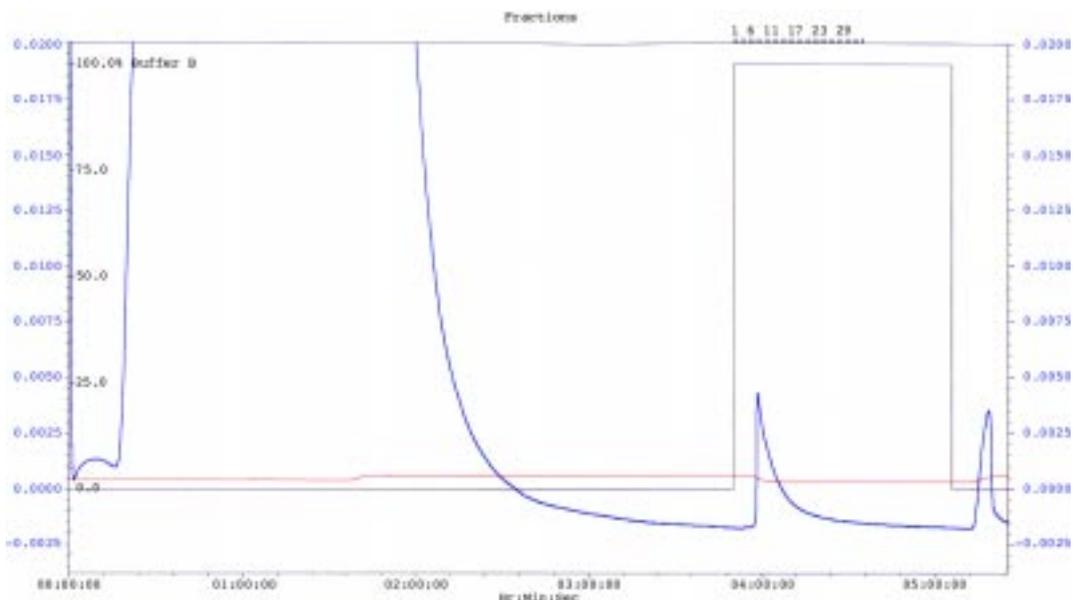


Abb. 14. Chromatogramm zur Aufreinigung von Granulocytenmembranextrakten über eine T84.1-Affinitätschromatographiesäule. Der blaue Graph bezeichnet die UV-Absorption bei 280 nm zur Detektion von Proteinen. Der rote Graph stellt die Leitfähigkeit dar. Die graue Linie gibt den prozentualen Anteil an Elutionspuffer („Puffer B“) wieder. Der erste breite Peak dokumentiert den Durchlauf der Granulocytenrohextrakte, der zweite Peak beinhaltet Proteine, die im Elutionspuffer von der Säule gewaschen werden. Der dritte Peak beinhaltet unspezifisch an die Säule gebundene Proteine. Der Elutionspeak wurde gepoolt, neutralisiert und nach Aufkonzentrieren um den Faktor 80-100 (MWCO 5, Biomaxmembran, Millipore) in PAA-Gelelektrophorese (Abb. 17) und Western Blot (Abb. 15) analysiert.

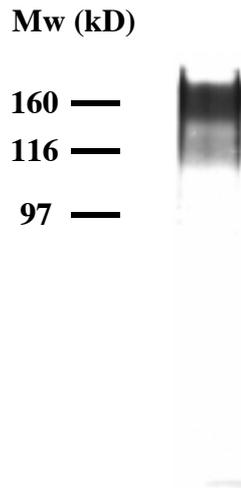


Abb. 15. Detektion von CEACAM1 aus der Affinitätschromatographie (aufkonzentriertes Eluat; Faktor 100) im Western Blot nach Auftrennung in einem 7%PAA-Gel mit dem mAb 4D1/C2 (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Die Immunoreaktivität wurde in der alkalischen Phosphatase-Reaktion entwickelt (anti-Maus-AP -Konjugat; 1:2.000).

Von dem aus der Affinitätschromatographie erhaltenen Material, das um den Faktor 100 aufkonzentriert worden war, wurden 2 ml über einen statischen Loop auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und aufgetrennt. Die Elution von CEACAM1 erfolgte nach ca. 135ml bzw. 9 h. Auf dem Chromatogramm konnte dieses nicht verfolgt werden, da Triton X-100 bei einer Wellenlänge von 280 nm mit der Absorption von Proteinen interferiert (Abb. 16).

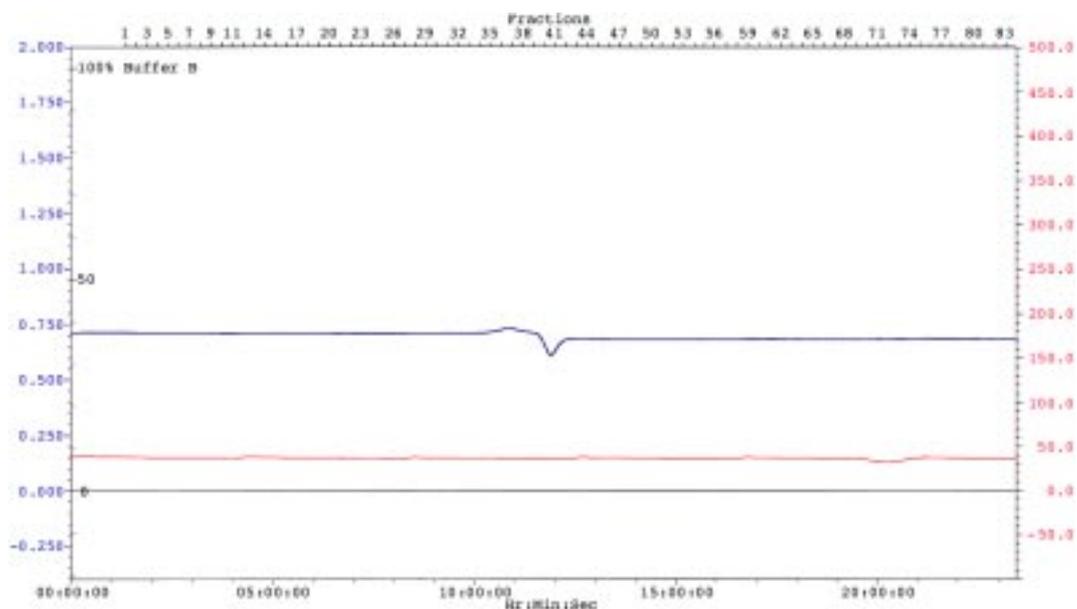


Abb. 16. Chromatogramm zur Aufreinigung von Produkten aus der Affinitätschromatographie über eine Superdex-200 Gelfiltrationssäule.

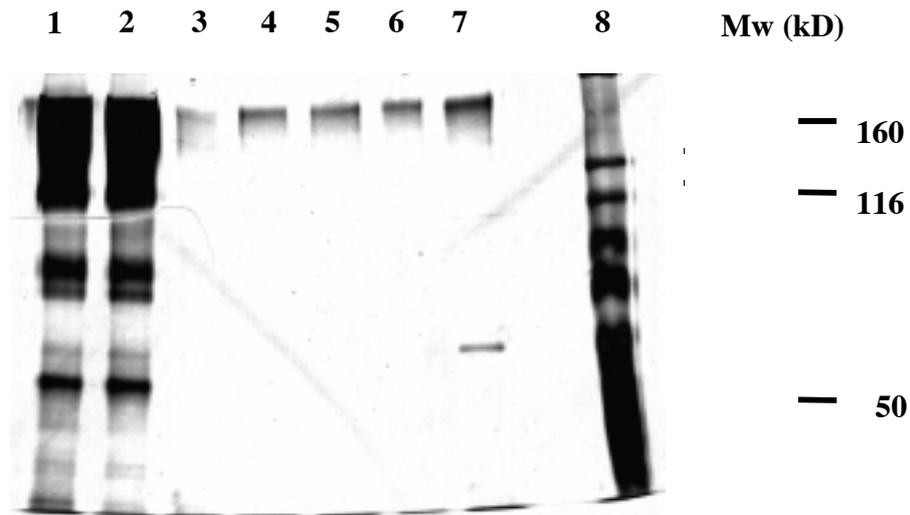


Abb. 17. 10%iges PAA-Gel zu Analyse der Elutionsfraktionen aus der Affinitätschromatographie und der Gelfiltration. Nach Gelelektrophorese wurden die Proteine im Gel durch Silberfärbung dargestellt. Aufgetragen wurden in den Bahnen 1 und 2 Produkte aus der Affinitätschromatographie, in den Bahnen 3-7 sind jeweils 10 μ l einzelner Fraktionen (Fraktion 25, 27, 29, 31, und 33) aus der Gelfiltration aufgetragen, die jeweils um den Faktor 20 aufkonzentriert wurden (Amicon MWCO 100 kD). Bahn 8 beinhaltet den Molekulargewichtsstandard. Als kontaminierende Proteine nach der Affinitätschromatographie waren vor allem Serumalbumin und humane Immunglobuline vorhanden, die durch Western Blot identifiziert werden konnten (nicht gezeigt).

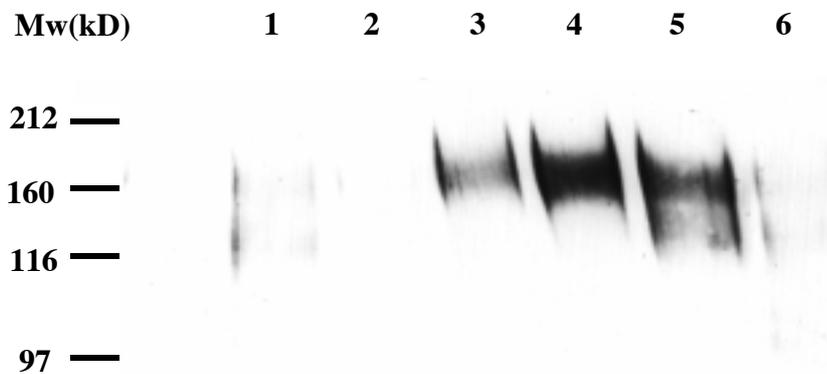


Abb. 18. Analyse einzelner Fraktionen aus der Gelfiltration im Western Blot mit dem mAb 4D1/C2. In den Bahnen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 wurden die aufkonzentrierten Fraktionen 20-22, 23-24, 25-27, 28-30, 31-33 und 34-36 aufgetragen. Der Nachweis der Bindung von 4D1/C2 erfolgte in der alkalischen Phosphatase-Reaktion.

1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach der Methode von Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Zur Aufnahme einer Eichreihe wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 1-15 μg in dem Puffer verdünnt, in dem sich auch das zu analysierende Protein befand (Abb. 19). Der Leerwert wurde gegen diesen Puffer geeicht. Die Extinktion wurde im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Die Konzentrationen der Analytlösungen wurden rechnerisch durch Umformen der erhaltenen Gleichung ermittelt.

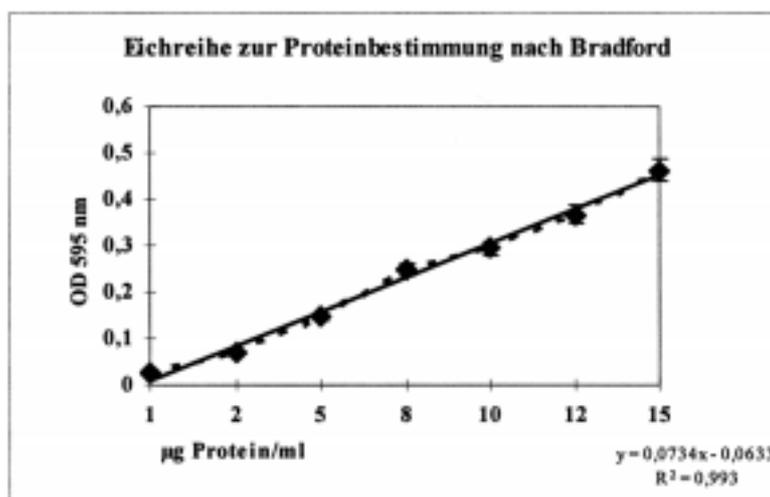


Abb. 19. Eichgerade zur Proteinbestimmung nach Bradford.

Es wurden 1, 2, 5, 8, 10, 12, und 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA-Lösung zur Erstellung der Eichgerade eingesetzt. Bei gemessener OD_{595} lässt sich die Konzentration des Analyts durch die Gleichung $x = (\text{OD}_{595} + 0,0633) / 0,0734$ berechnen.

2 Mannose-spezifische Adhäsion gereinigter Typ-1-Fimbrien an humane Granulocyten

In der durchflußcytometrischen Analyse wurden aus Spenderblut isolierte neutrophile Granulocyten auf ihre Bindungsfähigkeit für Typ-1-Fimbrien von *E. coli* untersucht. Die Mannose-spezifische Bindung der Typ-1-Fimbrien von *E. coli* wurde durch monomere α -Mannoside und trivalente Clustermannoside inhibiert.

Auswertung der in der Durchflußzytometrie erhaltenen Daten

Die im FACSCalibur-Durchflußzytometer (Becton/Dickinson) aufgenommenen Daten wurden mit dem Programm CellQuestTM (Becton/Dickinson) verarbeitet. Pro Messung wurden insgesamt 10.000 Ereignisse (10.000 Zellen wurden gezählt) aufgenommen und verarbeitet. Zur Auswertung wurden die Programme WinMDI- und Power Point verwendet. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte zusammenfassend in Histogrammen. Zur statistischen Auswertung wurden die Histogramme rechnerisch zu Populationswolken (*Dot Plots*) umgewandelt, um die quantitative Erfassung bzw. Trennung von Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (auf Signal- und Hintergrundniveaus) zu erreichen. In den Abbildungen 20a und 20b sind *Dot Plots* gezeigt, in denen Zellpopulationen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität in Quadranten zusammengefaßt wurden. Im Statistikprogramm der installierten Software konnten so die prozentualen Anteile einzelner Populationen an der Gesamtpopulation ermittelt werden. Um den Vergleich der Wirkung der unterschiedlichen Inhibitoren in einer Abbildung zusammenfassen zu können, wurde die Histogramm-Darstellung gewählt.

2.1 Bindung von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten

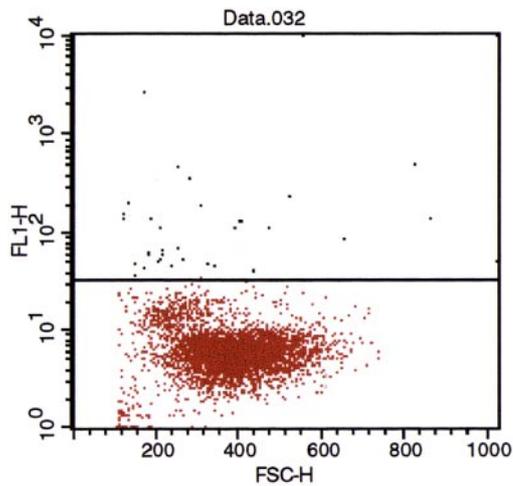


Abb. 20a.

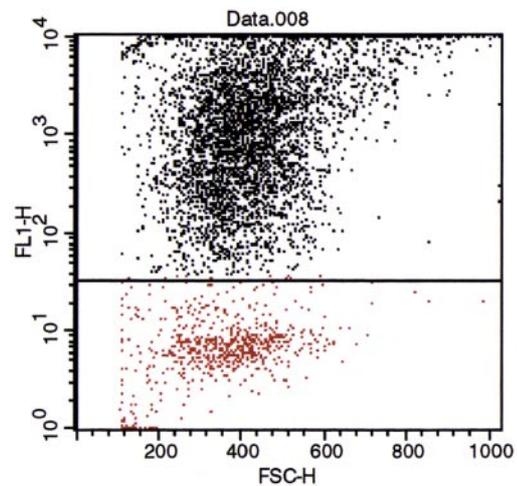


Abb. 20b.

Abb. 20. Darstellung der Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten in der Dot Plot Analyse. 20a zeigt die Negativkontrolle, in der die unspezifische Bindung von DTFA-markiertem Streptavidin an die Zellen dargestellt ist, 20b zeigt die Bindung der biotinylierten Typ-1-Fimbrien an die Granulocyten.

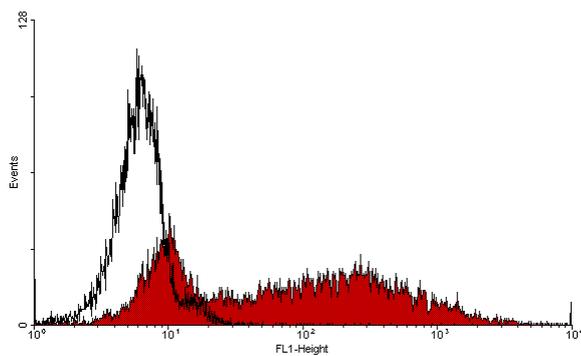


Abb. 21. Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* an neutrophile Granulocyten in der durchflußzytometrischen Analyse. Dargestellt ist ein Histogramm, in dem die Fluoreszenzintensität (*FL1-Height*) gegen die Anzahl der Ereignisse (*Events*) aufgetragen ist. Das weiße Integral (*Peak*) stellt die Negativkontrolle dar, in der die Bindung von DTAF-markiertem Streptavidin an die Granulocyten gemessen wurde. Die rot unterlegte Fläche repräsentiert das Bindungsmuster der Typ-1-Fimbrien an die neutrophilen Granulocyten.

2.2 Inhibition der Mannose-spezifischen Bindung der Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* an humane neutrophile Granulocyten durch α -Mannoside und α -Mannosyl-Cluster

Die Mannose-spezifische Adhäsion der Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* wurde durch verschiedene monovalente und trivalente α -Mannoside gehemmt. Hierzu wurden je 12,5 μ g biotinylierter Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren gemischt und anschließend mit den aus Spenderblut isolierten Granulocyten inkubiert (siehe Abb. 21). An die Granulocyten gebundene Typ-1-Fimbrien wurden durch DTAF-gekoppeltes Streptavidin nachgewiesen.

Um die Mannose-spezifische Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten zu hemmen, wurden die folgenden Saccharide als Inhibitoren eingesetzt: D-Mannose, Methyl- α -D-Mannosid, Benzyl- α -D-Mannosid, p-Nitrophenylmannosid sowie die trivalenten Clustermannoside Tris{2-[3'-[p-(α -D-mannopyranosyloxy)phenyl]thioureido]}amin und Tris{2-[6'-deoxy-1'-O-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl-carbamoyl]ethyl}nitromethan. D-Glucose diente als Negativkontrolle.

In Abb. 22 sind die Strukturformeln der einzelnen Verbindungen aufgeführt. Entsprechend der dort angegebenen Bezifferung wird im Folgenden auf die Nummern der Substanzen verwiesen: D-Mannose (**1**), Methyl- α -D-Mannosid (**2**), Benzyl- α -D-Mannosid (**3**), p-Nitrophenylmannosid (**4**), Tris{2-[3'-[p-(α -D-mannopyranosyloxy)phenyl]thioureiden]}amin (**5**), Tris{2-[6'-deoxy-1'-O-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl-carbamoyl]ethyl}nitromethan (**6**), und Glucose (**7**).

Die Inhibitoren wurden wie folgt in sterilem PBS verdünnt und in den Inhibitionsversuch eingesetzt:

Inhibitor	verwendete Endkonzentration (mM)
1	10, 5, 1, 0,1, 0,01
2	50, 10, 5, 1, 0,1
3	0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001
4	0,1, 0,05, 0,01, 0,0005, 0,001
5	0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001
6	0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001
7	200, 100, 50

Tabelle 15. Endkonzentrationen der einzelnen Inhibitoren im Versuchsansatz.

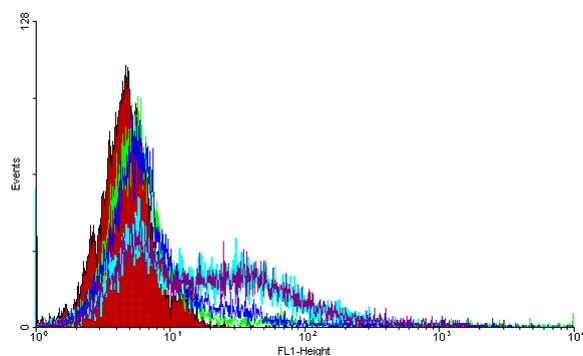


Abb. 23. Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulozyten durch D-Mannose. Die bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors erhaltenen Histogramme wurden in der Darstellung aufeinander projiziert (*Overlay*). Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulozyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulozyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das grüne Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer 10 mM D-Mannose-Lösung, das blaue in einer 1 mM und das violette Areal in einer 0,1 mM Lösung.

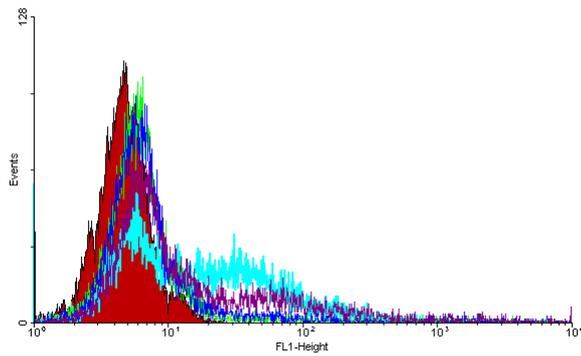


Abb. 24. Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten durch Methyl- α -D-Mannosid. Die bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors erhaltenen Histogramme wurden in der Darstellung aufeinander projiziert (*Overlay*). Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulocyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulocyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das grüne Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer 50 mM Methylmannosid-Lösung, das blaue in einer 10 mM und das violette Areal in einer 1 mM Lösung.

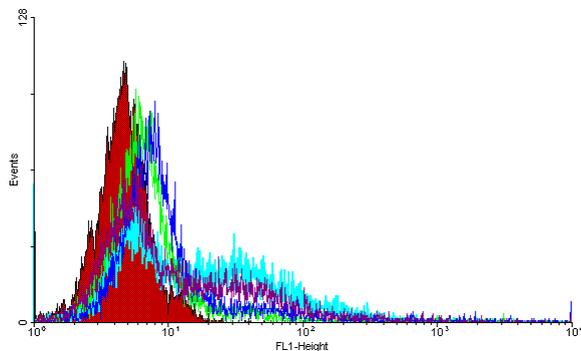


Abb. 25. Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten durch α -Benzyl- α -D-Mannosid. Die bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors erhaltenen Histogramme wurden als *Overlay* zusammengefaßt. Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulocyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulocyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das grüne Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer 100 μ M Benzylmannosid-Lösung, das blaue in einer 50 μ M und das violette Areal in einer 10 μ M Lösung.

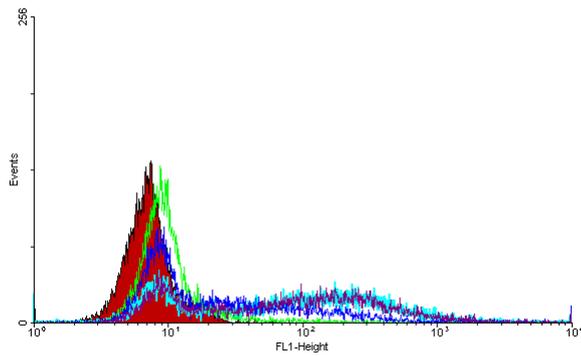


Abb. 26. Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten durch p-Nitrophenylmannosid. Die bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors erhaltenen Histogramme wurden als *Overlay* zusammengefaßt. Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulocyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulocyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das grüne Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer 100 μM p-Nitrophenylmannosid-Lösung, das blaue in einer 10 μM und das violette Areal in einer 1 μM Lösung.

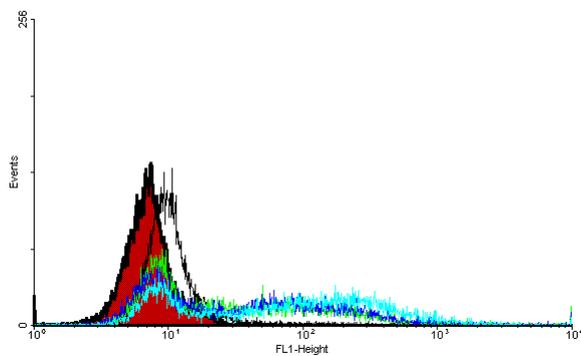


Abb. 27. Inhibition der Adhäsion von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten durch Clustermannosid 5. Die bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors erhaltenen Histogramme wurden als *Overlay* zusammengefaßt. Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulocyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulocyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das schwarze Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer 10 μM Lösung der Verbindung **5**, das grüne in einer 0,1 μM und das blaue Areal in einer 0,01 μM Lösung.

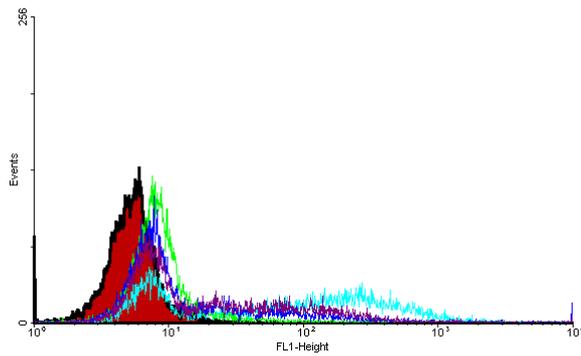


Abb. 28. Inhibition der Fimbrienbindung durch Clustermannosid 6. Das rot unterlegte Integral repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten der Granulozyten bei 100%iger Inhibition der Fimbrienbindung, das türkis gekennzeichnete Areal beschreibt die Fluoreszenz der Granulozyten nach Bindung von Typ-1-Fimbrien, ohne Gegenwart von Inhibitoren. Das grüne Areal repräsentiert die Fluoreszenzintensitätsverteilung in einer $10 \mu\text{M}$ Lösung der Verbindung **6**, das blaue in einer $0,1 \mu\text{M}$ und das violette Areal in einer $0,01 \mu\text{M}$ Lösung.

Um die relativen Inhibitionskonzentrationen (RIC_{50}) zu erhalten, wurden die Zellen, die ohne Zugabe eines Inhibitors Fluoreszenzintensitäten oberhalb des Hintergrundniveaus besaßen, mit einer Inhibition von 100% gleichgesetzt. Dieser Wert repräsentierte die Zellpopulation der neutrophilen Granulozyten, die Typ-1-Fimbrien gebunden hatte. In Gegenwart der Inhibitoren wurde der prozentuale Anteil der Typ 1-bindenden Zellen an dieser Population berechnet. Der RIC_{50} -Wert gibt die Konzentration des entsprechenden Inhibitors wieder, bei der die Anzahl der Zellen, die Typ-1-Fimbrien gebunden hatten, um 50% reduziert war. Tabelle 16 faßt die Inhibitionsdaten der einzelnen Inhibitoren zusammen. α -D-Methylmannosid diente als Referenzsubstanz, zu der die anderen Inhibitoren in Korrelation gesetzt wurden. Unter Berücksichtigung der Äquivalente an verfügbaren Mannoseresten in monovalenten und trivalenten Inhibitoren wurden valenzbereinigte relative Inhibitionskonzentrationen ermittelt. Sie sind in Abb. 29 in einem Säulendiagramm dargestellt.

Getestete Verbindung	Inhibitortiter (mmol)	Standardabweichung	Relative Inhibitor-Konzentration (RIC; bezogen auf Methyl- α -D-mannosid als Standard)	RIC bezogen auf Mol Mannose (valenzbereinigt)
1	8,05	1,11	3,66	3,66
2	29,42	9,63	1	1
3	0,0850	0,0082	346,12	346,12
4	0,0596	0,0076	493,62	493,62
5	0,0057	0,00046	5161,40	1720,47
6	0,0089	0,00048	3305,62	1101,87
7	≤ 200 keine Inhibition	-	-	-

Tabelle 16. Zusammenfassung der Daten aus den Inhibitionsanalysen. Die relativen Inhibitorkonzentrationen beziehen sich auf Methyl- α -D-Mannosid (Verbindung 2) als Referenzsubstanz. Die relative Inhibitorkonzentration von Methyl- α -D-Mannosid wurde gleich 1 gesetzt. Die hier erhaltenen RIC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

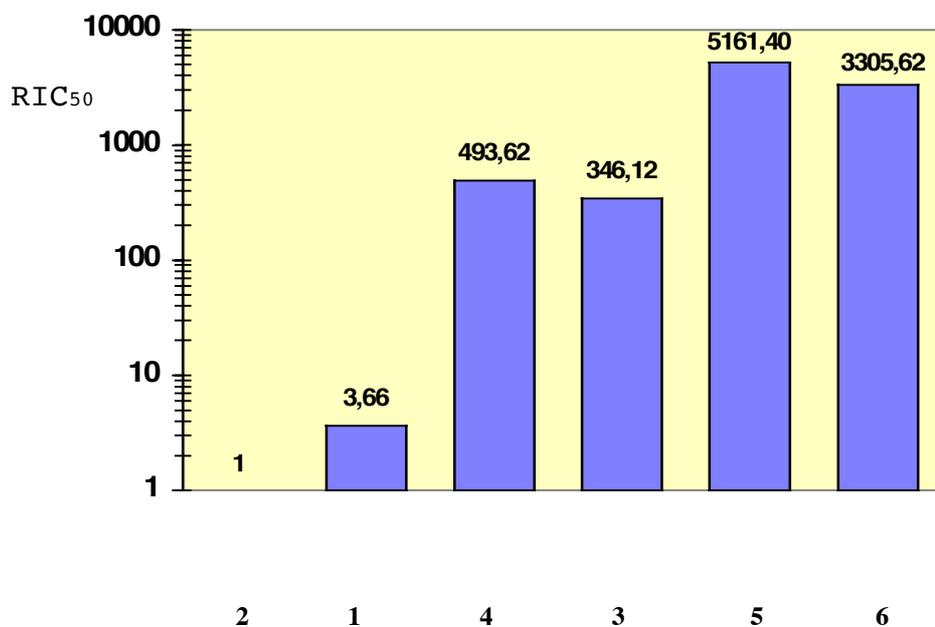


Abb. 29. Vergleich der valenzbereinigten, relativen Inhibitorkonzentrationen (RIC₅₀) der eingesetzten Inhibitoren.

3 Nachweis von High-Mannose-Epitopen auf CEACAM1 und Interaktion von CEACAM1 aus Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien

Für den Nachweis der Interaktion von Mannose-sensitiven Typ-1-Fimbrien mit CEACAM1 aus Granulocyten wurden zunächst High-Mannose-Epitope auf CEACAM1 charakterisiert. Die Interaktion von Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 wurde durch *in vitro*-Experimente belegt.

3.1 Nachweis von High-Mannose-Epitopen auf CEACAM1 aus Granulocyten durch GNA-Affinitätschromatographie

Für den Nachweis von high-Mannose-Epitopen auf CEACAM1 wurden Produkte aus der T84.1-Affinitätschromatographie über das für endständige Mannosereseste spezifische Lectin GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*, Schneeglöckenlectin) aufgereinigt. Nach Inkubation der Probe mit der GNA-Matrix in Lectinbindungspuffer über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler wurde die Matrix an der FPLC-Anlage (Pharmacia) mit TBS gewaschen und mit 0,5 M Methyl- α -D-Mannopyranosid eluiert (siehe Abb. 30).

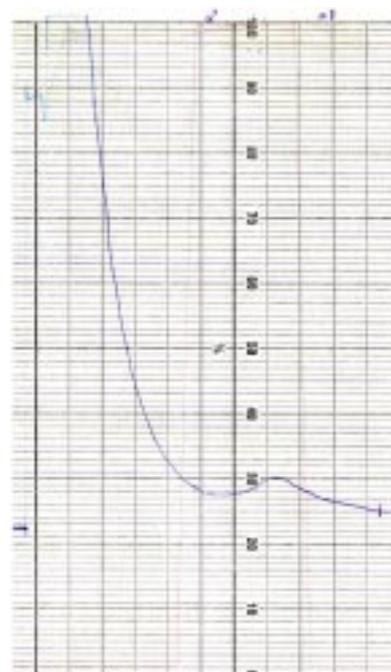


Abb 30. Chromatogramm zur Aufreinigung von CEACAM1 über eine GNA-Sepharosematrix (Sigma). Der blaue Graph beschreibt die UV-Absorption bei 280 nm, der rote Graph dokumentiert den prozentualen Anteil des Elutionspuffers. Die Fraktionen im Bereich des Peaks wurden vereinigt und um den Faktor 20 aufkonzentriert (Amicon MWCO 10, 4°C).

Das aufkonzentrierte Eluat wurde nach Auftrennung der Proben in einem 7%igen PAA-Gel im Western Blot mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 untersucht (Abb. 31).

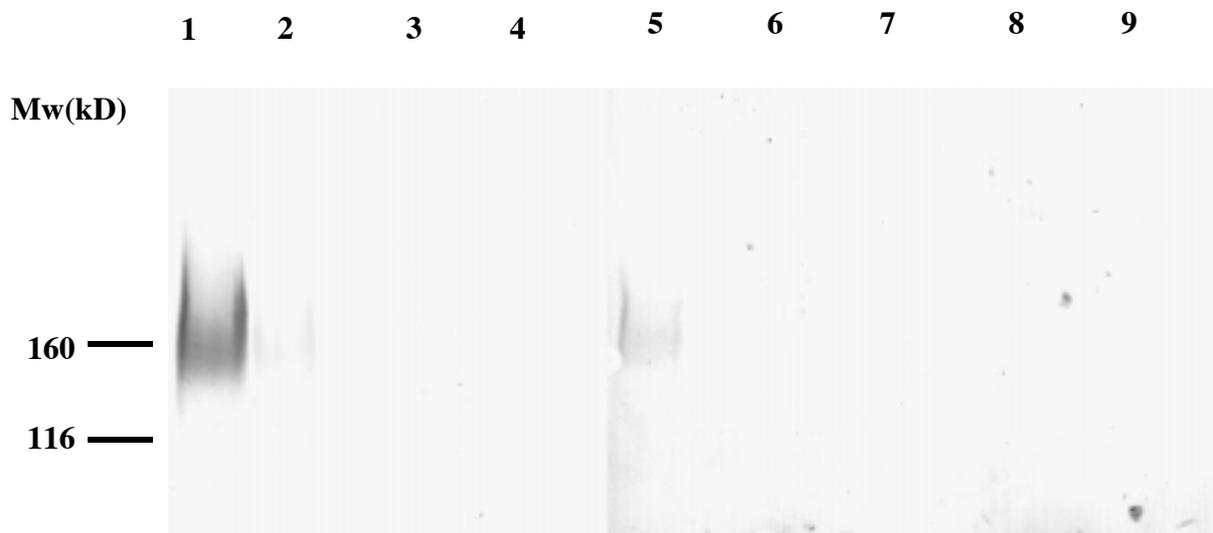


Abb. 31. Analyse der Proben aus der GNA-Affinitätschromatographie im Western Blot. In Bahn 1 sind als Positivkontrolle Granulocytenrohextrakte aufgetragen, in den Bahnen 2-4 ist der Durchlauf nach Auftragen der Probe gezeigt. Bahn 5 enthält das Eluat; in den Bahnen 6-9 sind die Waschfraktionen aufgetragen. Der Nachweis von CEACAM1 erfolgte mit dem Antikörper 4D1/C2. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-Antikörper eingesetzt (1: 2.000). Die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde mit BCIP/NBT dargestellt.

3.2 Nachweis der Interaktion von CEACAM1 aus Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien *in vitro*

3.2.1 Nachweis der Interaktion von Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 im Lectinblot

Für den Nachweis einer Bindung von Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* an gereinigtes CEACAM1 aus Granulocyten wurden biotinylierte Typ-1-Fimbrien anstelle eines Detektionsantikörpers im Western Blot zur Bindung an gereinigtes CEACAM1 (aus T84.1-Affinitätschromatographie) verwendet (Abb. 32).

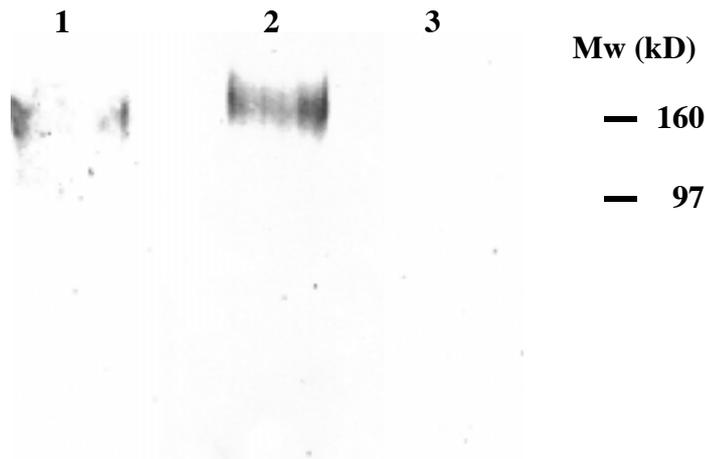


Abb. 32. Nachweis der Interaktion zwischen Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 im Lectinblot. Es wurde die Bindung des mAb 4D1/C2 (Bahn 1; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Lectinbindungspuffer) an CEACAM1 sowie die Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien (Bahn 2; 15 $\mu\text{g/ml}$ Lectinbindungspuffer) an CEACAM1 gezeigt. Die Darstellung der Peroxidase-reaktion erfolgte nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern (Ziege-anti-Maus, Peroxidase-konjugiert, 1:2.000; Streptavidin, Peroxidase-konjugiert, 1:2.000) in der DAB-Färbung. In Bahn 3 ist die Kontrolle zur unspezifischen Bindung des Peroxidase-konjugierten Streptavidins an CEACAM1 abgebildet.

3.2.2. Nachweis der Interaktion von Typ-1-Fimbrien mit CEACAM1 durch Immunpräzipitation

CEACAM1 konnte aus Lösung durch Inkubation mit immobilisierten Typ-1-Fimbrien präzipitiert werden. Hierzu wurden Typ-1-Fimbrien biotinyliert und an Streptavidin-Agarose gebunden. Aus Granulocyten aufgereinigtes CEACAM1 wurde in Lectinbindungspuffer zugegeben. Die Präzipitate wurden nach PAA-Gelelektrophorese im Western Blot mit dem mAb 4D1/C2 analysiert (Abb. 33).

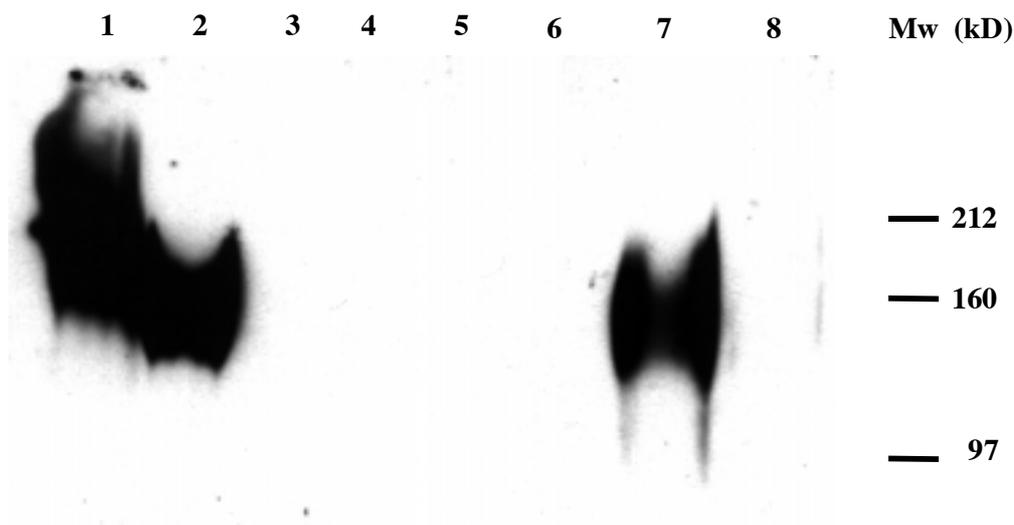


Abb. 33. Immunpräzipitation von CEACAM1 durch Typ-1-Fimbrien. CEACAM1 wurde durch den mAb 4D1/C2 nachgewiesen ($0,5\mu\text{g/ml}$ TBS). Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1: 5.000 in TBS) verwendet. Die Darstellung der Peroxidase-reaktion erfolgte durch Chemilumineszenz. In Bahn 1 wurden Granulocytenrohextrakte aufgetragen, in Bahn affinitätschromatographisch (T84.1) gereinigtes CEACAM1, wie es auch zur Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Die Bahnen 3-6 beinhalten Waschfraktionen, in denen ungebundenes CEACAM1 entfernt werden sollte. Bahn 7 enthält das Eluat, das nach Elution gebundenen Materials von immobilisierten Typ-1-Fimbrien erhalten wurde, Bahn 8 beinhaltet die Negativkontrolle, in der die Bindung von CEACAM1 an immobilisiertes BSA untersucht wurde.

3.3 Nachweis der Oberflächenexpression von CEACAM1 auf neutrophilen Granulocyten nach Stimulation mit Typ-1-Fimbrien

Aus Spenderblut isolierte neutrophile Granulocyten wurden über 1 h bei 37°C mit Typ-1-Fimbrien aus *E.coli* inkubiert. Alle 10 min. wurden Aliquots entnommen und nach Waschen in kaltem PBS mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 inkubiert. Der Nachweis von CEACAM1/4D1/C2 auf den neutrophilen Granulocyten erfolgte in der Durchflußcytometrie durch FITC-markierte anti-Maus-Immunglobuline. Die Daten wurden statistisch erfaßt und in der Abb. 34 graphisch dargestellt:

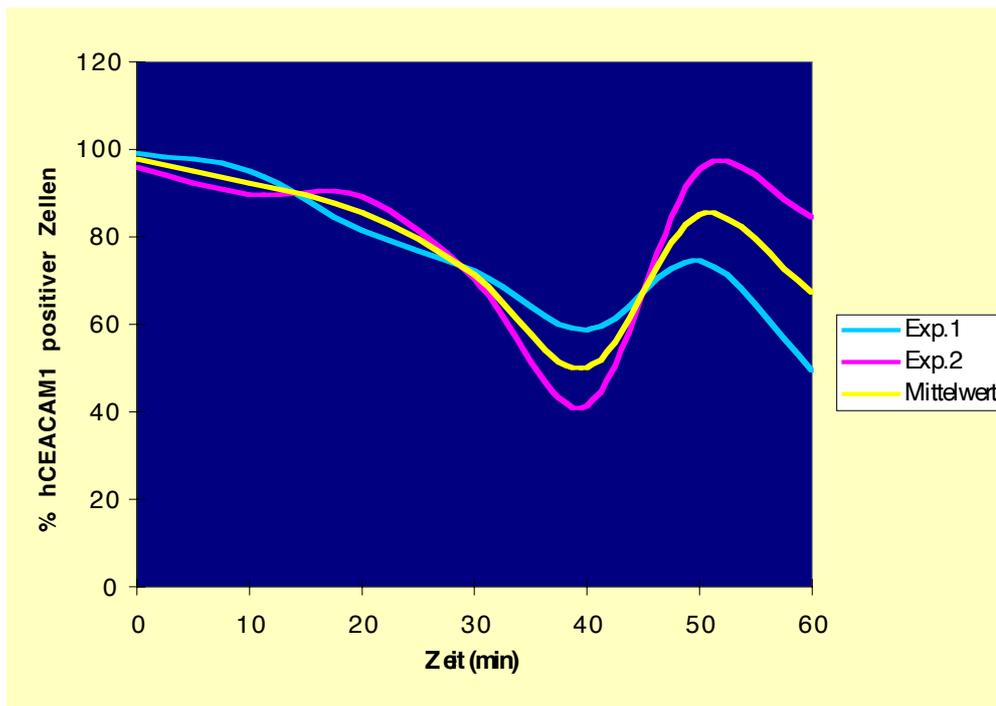


Abb. 34. Analyse der Oberflächenexpression von CEACAM1 auf neutrophilen Granulocyten nach Stimulation mit Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*. Ausgewertet wurden Zellen, die den Antikörper 4D1/C2 gebunden hatten. Sie wurden als CEACAM1-positive Zellen in die Auswertung aufgenommen. Zu erkennen ist, daß die Oberflächenexpression von CEACAM1 nach 25 min abnimmt, nach 40 min. ein Minimum erreicht hat und dann auf ihr Ursprungsniveau zurückkehrt.

4 Untersuchung der Wechselwirkung von Typ-1-Fimbrien mit neutrophilen Granulocyten in der Elektronenmikroskopie

Für den Nachweis der Aufnahme von Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* durch Granulocyten wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

In der Elektronenmikroskopie wurden aus Spenderblut isolierte neutrophile Granulocyten aufgenommen, die zuvor mit Typ-1-Fimbrien inkubiert wurden. Über einen Zeitraum von 40 min. wurden die Granulocyten mit Typ 1 Fimbrien bei 37°C inkubiert. Jeweils nach 1, 10, 20, 30 und 40 min. wurden 2 ml eisgekühlter PBS dazugegeben, die Zellen wurden bei 2.500 Upm pelletiert und fixiert. Nach Einbettung in Epon und Anfertigung von Ultradünnschnitten (60 nm) wurden die Präparate in der Elektronenmikroskopie begutachtet. Während der Inkubation mit Typ-1-Fimbrien kam es mit zunehmender Dauer der Inkubation zur vermehrten Bildung intrazellulärer Granulae. Es waren Ausstülpungen der Cytoplasmamembran (Pseudopodien) zu beobachten, die mit anhaltender Stimulierung der Zellen durch Typ-1-Fimbrien zahlreicher wurden. Es war die Formierung intrazellulärer Vakuolen zu beobachten, die bereits nach kurzer Exposition der Zellen mit Typ-1-Fimbrien auftraten. Nach längerer Inkubation der Zellen mit den Fimbrien kam es zur Ausbildung interzellulärer Kontakte und zur Veränderung der Zellform: Zu Beginn der Stimulierung der Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien wiesen die Zellen eine gleichmäßig kugelige Form auf. Bei längerer Exposition mit Typ-1-Fimbrien nahmen die Zellen eine unregelmäßige Form an und bildeten Aggregate (Übersichtsaufnahmen, siehe Abb. 35-37). Um die Typ-1-Fimbrien in den Aufnahmen besser darstellen zu können, wurden die Schnitte nicht nur in wäßriger, sondern zusätzlich in alkoholischer Uranylacetatlösung kontrastiert. Dieses war notwendig, da sich reine Proteinstrukturen (hier: Typ-1-Fimbrien) nach Fixation in Osmiumtetroxid nur schwach durch wäßrige Uranylacetatlösung kontrastieren lassen. Die Typ-1-Fimbrien ließen sich im Bereich der Extravagationen der Zellmembran, innerhalb der Vakuolen und direkt an der Zellmembran der Granulocyten nachweisen (Abb. 38-40).

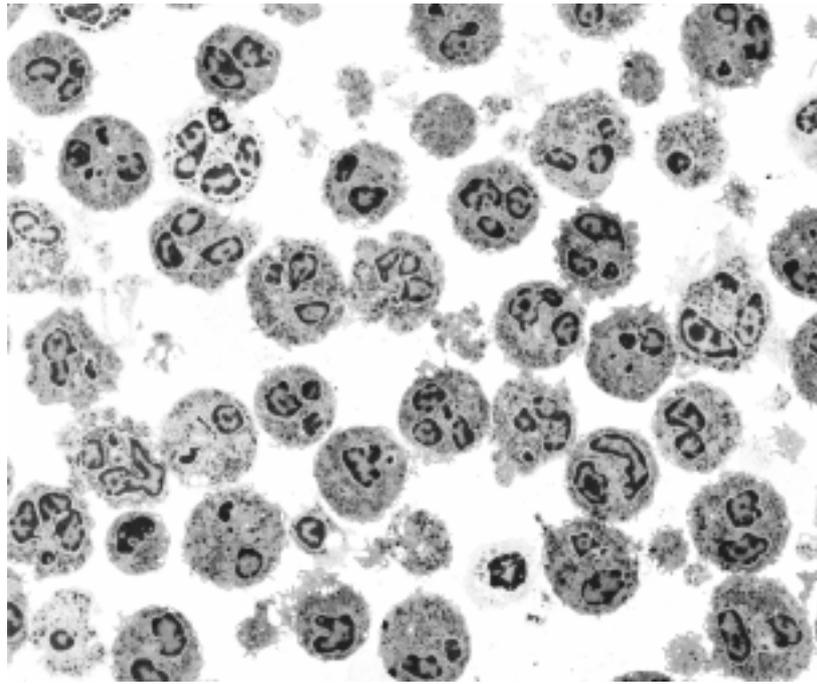


Abb. 35. Neutrophile Granulocyten nach 1 min Inkubation mit Typ-1-Fimbrien. Wäßrige Uranylacetat-Kontrastierung, x 3.000. Die Zellen weisen eine gleichmäßige, runde Form auf. Bei einigen Zellen ist die Bildung von Pseudopodien zu erkennen.

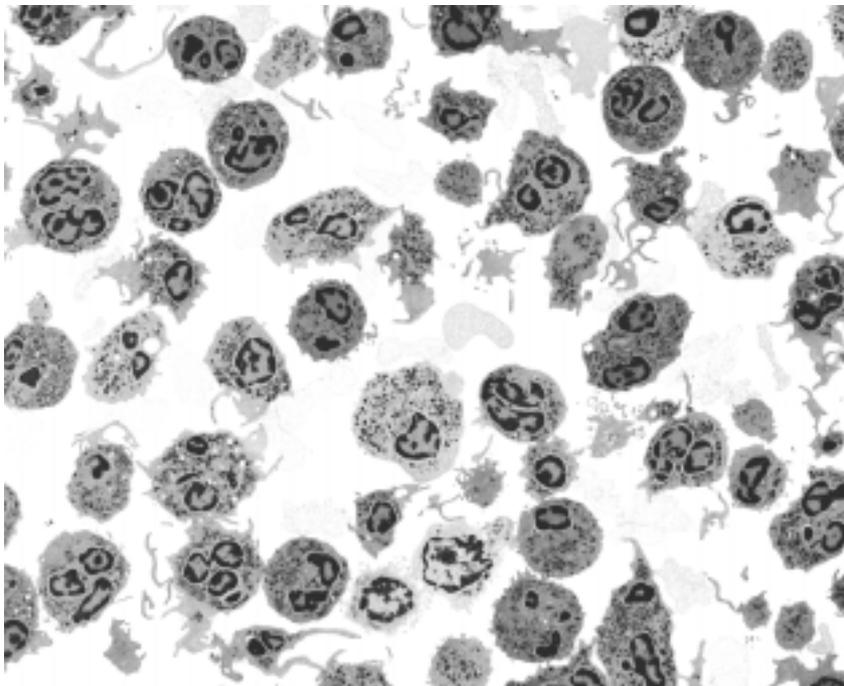


Abb. 36. Neutrophile Granulocyten nach 10 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*. X 3.000. Die Granulocyten weisen zahlreiche, deutlich ausgeprägte Pseudopodien auf, und es sind intrazelluläre Vakuolen erkennbar.

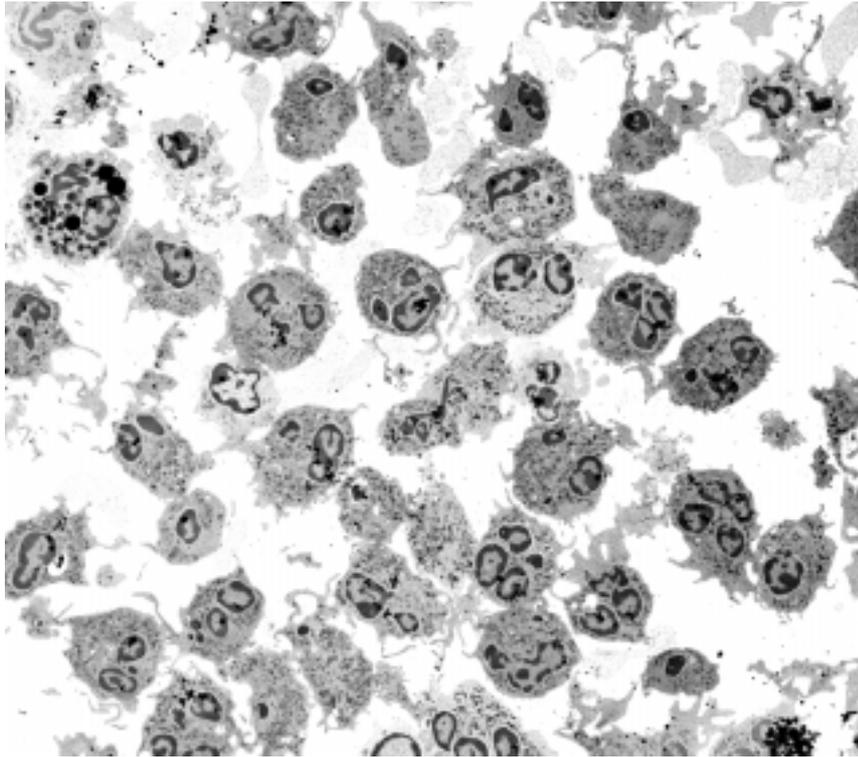


Abb. 37. Neutrophile Granulocyten nach 20 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien aus *E.coli*. Die Zellen weisen eine gestreckte Form auf und haben zum Teil Aggregate gebildet.

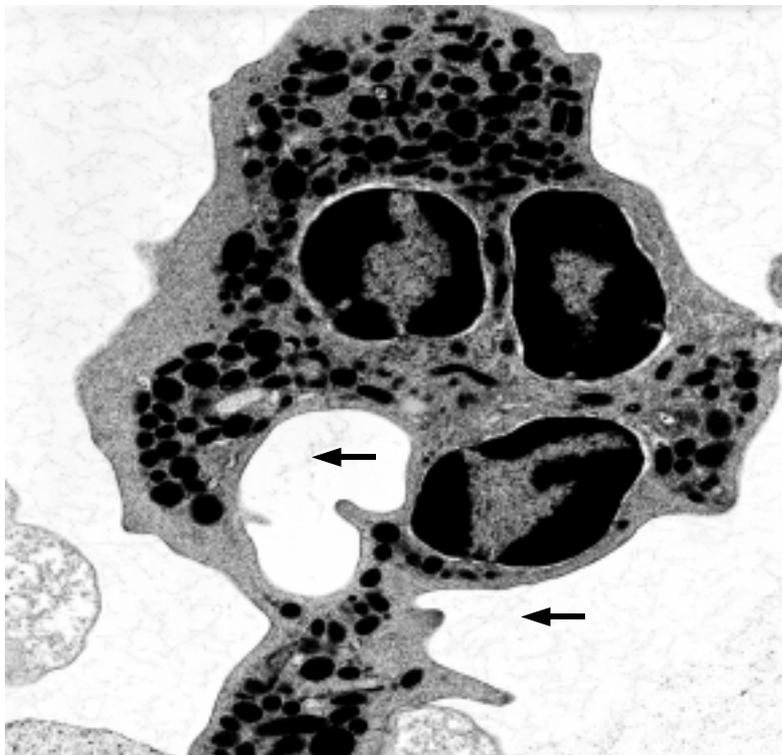


Abb. 38. Neutrophiler Granulocyt nach 10 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien. Es ist eine große intrazelluläre Vakuole zu erkennen, in der sich Typ-1-Fimbrien befinden (Pfeil). X 22.250 nach alkoholischer Kontrastierung. Typ-1-Fimbrien sind ebenfalls im Extrazellulärraum nachweisbar.

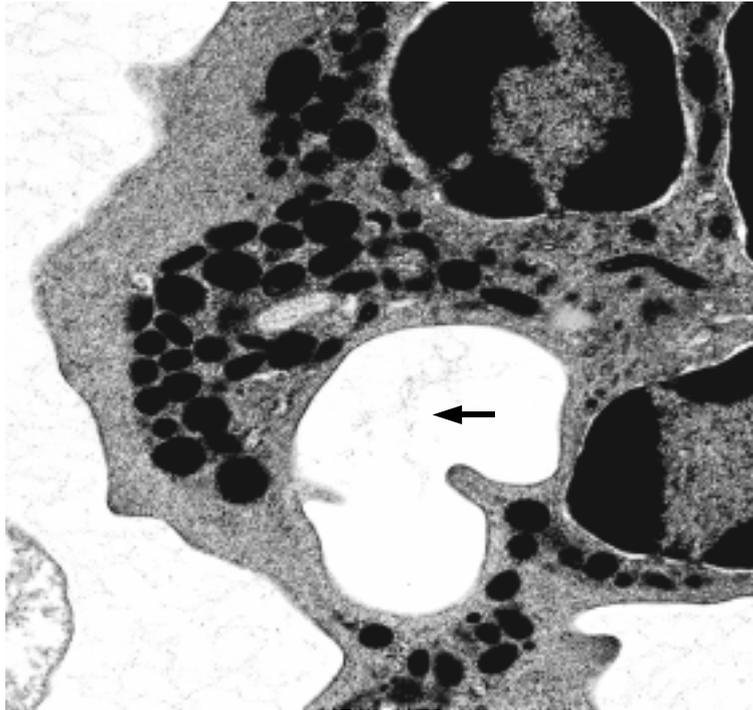


Abb. 39.

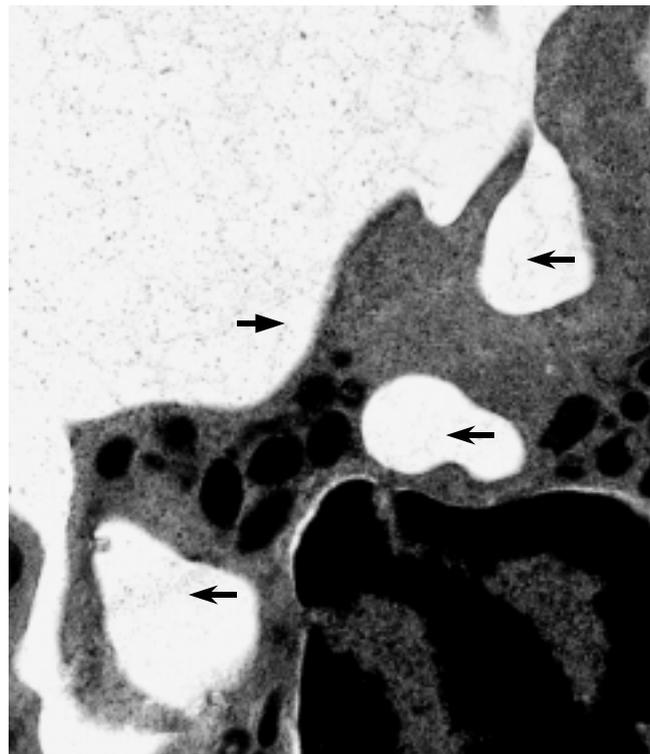


Abb. 40.

Abb. 39 und 40. Typ-1-Fimbrien in Vakuolen und Invaginationsbereichen der Zellmembran.

Die Aufnahmen in Abb. 39 und 40 zeigen Ausschnitte der Membranregion zweier neutrophiler Granulocyten nach 10 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien aus *E.coli*. Die Schnitte wurden in alkoholischer Uranylacetatlösung kontrastiert. X 40.000. Die Pfeile indizieren Fimbrien, die sich in Invaginationsbereichen der Zellmembranen und innerhalb von Vakuolen befinden.

5 Auswertung der Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz

Kolokalisierung von Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 auf Granulocyt

Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie sollte nach immunocytochemischer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw. fluoreszenzmarkiertem Streptavidin eine Kolokalisation von biotinylierten Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 in neutrophilen Granulocyt dargestellt werden. Durch den Vergleich der Lokalisierung beider Antigene sollte untersucht werden, ob CEACAM1 an der Aufnahme der Typ-1-Fimbrien durch die Granulocyt beteiligt ist. Aus Spenderblut isolierte neutrophile Granulocyt (je 1×10^6 Zellen) wurden für 0, 1, 5, 10, 20, 30 und 40 min. mit jeweils 5 μg biotinylierten Typ-1-Fimbrien inkubiert. Nach jedem Zeitintervall wurden die Granulocyt in eiskaltem PBS gewaschen, pelletiert und in PBS resuspendiert. Sie wurden auf Objektträgern ausgestrichen und in Einzelfärbungen sowie in Doppelfärbungen mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 und Streptavidin inkubiert. Der Nachweis der Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien an die Zellen erfolgte durch Streptavidin, das mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff markiert war (LissaminTM-Rhodaminsulfonylchlorid (LRSC)); die Bindung des anti-CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 wurde durch einen anti-Maus-Antikörper detektiert, der mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert war (FITC(Fluorescein-Isothiocyanat)-markierter anti-Maus-Antikörper). Zur Darstellung einer Kolokalisation beider Antigene wurden die Aufnahmen für die Einzelfärbungen überlagert. In diesen *Overlay*-Aufnahmen wurden die Regionen, in denen beide Antigene detektiert werden konnten, gelb dargestellt. Auf die Abbildung der Aufnahmen vor Zugabe (0 min.) der Typ-1-Fimbrien zu den Granulocyt wurde verzichtet, da die Immunfärbung im Wesentlichen dem Erscheinungsbild nach 1 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien entsprach.

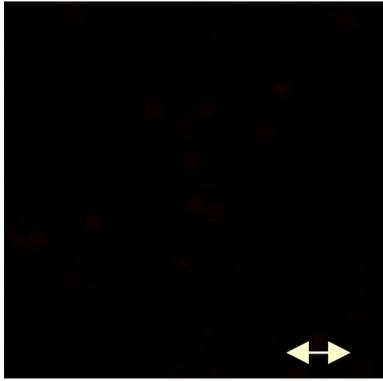


Abb. 41 a

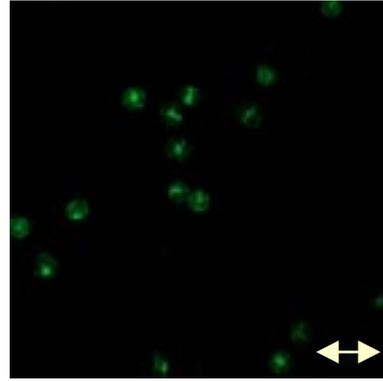


Abb. 41 b

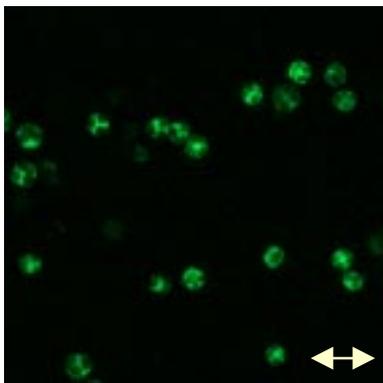


Abb. 41 c

Abb. 41. Fluoreszenzfärbung der neutrophilen Granulocyten nach 1 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien. In Abb. 41 a ist die Färbung der Typ-1-Fimbrien dargestellt, die nach 1 min. noch keine Bindung an die Granulocyten zeigen. In Abb. 41 b die Färbung für CEACAM1 und in Abb. 41 c die Überlagerung beider Fluoreszenzen. Der gelbe Pfeil bezeichnet eine Distanz von 25 μm .

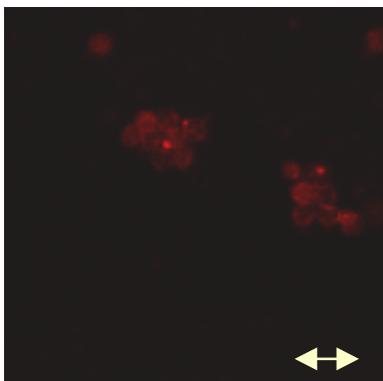


Abb. 42 a

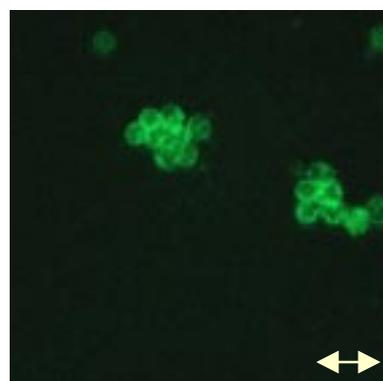


Abb. 42 b

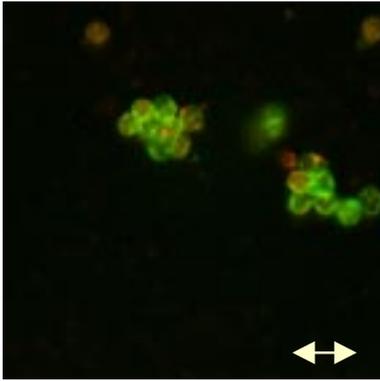


Abb.42 c

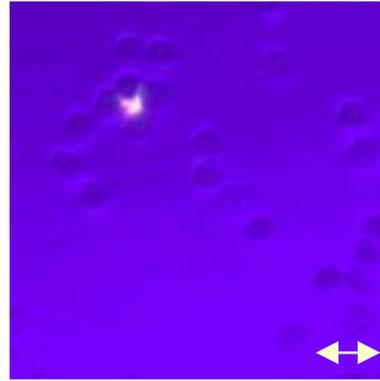


Abb. 42 d

Abb. 42. Immunfluoreszenzfärbung der neutrophilen Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien nach 5 min. Inkubation bei 37°C. In Abb. 42 a ist die Bindung der Typ-1-Fimbrien an die Zellen gezeigt, in Abb. 42 b die Färbung von CEACAM1 durch den mAb 4D1/C2. Abb. 42 c repräsentiert die Überlagerung der Bilder a und b, was in Abb. 42 d in einer Phasenkontrastaufnahme gezeigt ist. Der gelbe Pfeil bezeichnet eine Distanz von 25 μm .

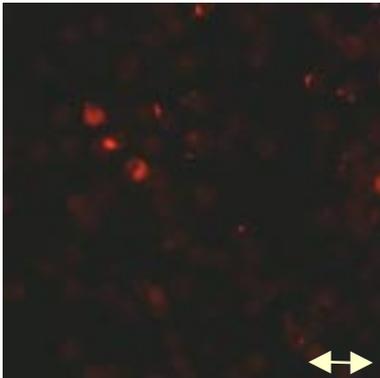


Abb. 43 a

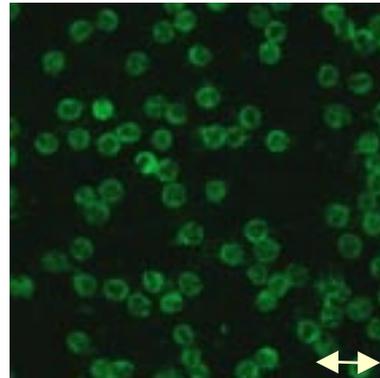


Abb. 43 b

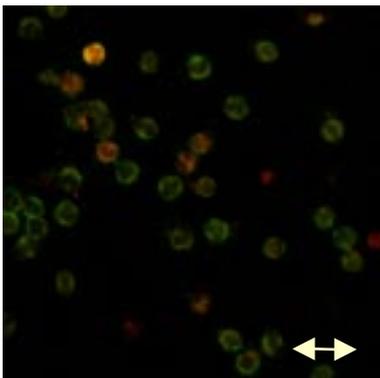


Abb. 43 c

Abb. 43a-c. Darstellung der Bindung von Typ-1-Fimbrien und dem mAb 4D1/C2 nach 10 min. Inkubation der Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien. Abb. 43 c zeigt die Overlay-Darstellung. In der oberen linken Bildhälfte ist deutlich eine gelb gefärbte Zelle zu erkennen. Der gelbe Pfeil entspricht einer Distanz von 25 μm .

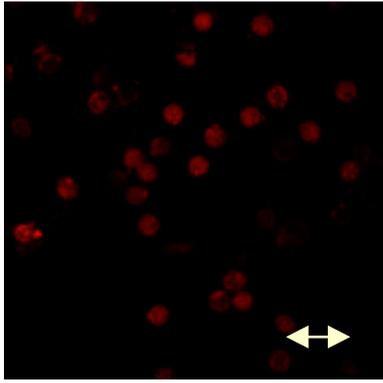


Abb. 44 a

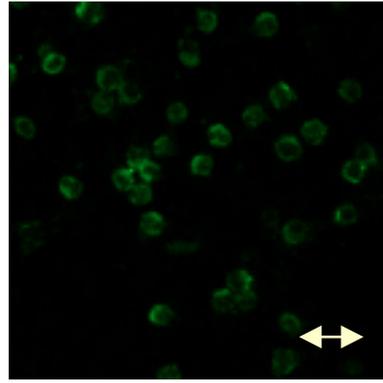


Abb. 44 b

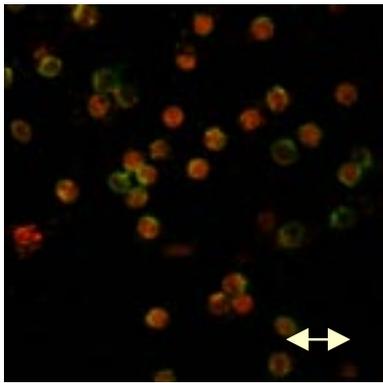


Abb. 44 c

Abb. 44 a-c. Immunfluoreszenz der Bindung von Typ-1-Fimbrien und 4D1/C2 an neutrophile Granulocyten nach 20 min. . In Abb. 44 a und Abb. 44 b ist die Bindung der Typ-1-Fimbrien bzw. die Bindung des mAb 4D1/C2 an die Zellen dargestellt. Abb. 44 c zeigt die *Overlay*-Darstellung zur Kolokalisierung beider Antigene nach 20 min. Inkubation der Zellen mit Typ-1-Fimbrien. Der gelbe Pfeil bezeichnet eine Distanz von 25 μm .

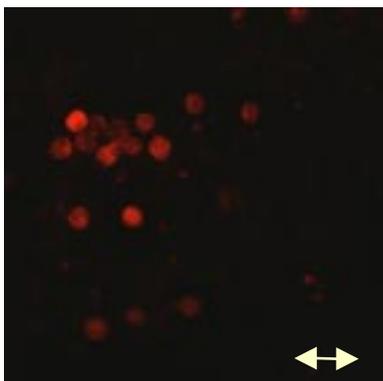


Abb. 45 a

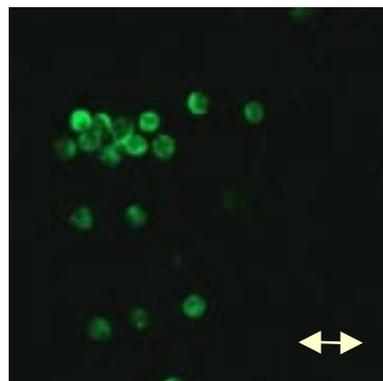


Abb. 45 b

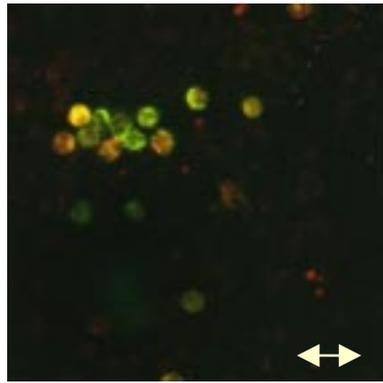


Abb. 46 c

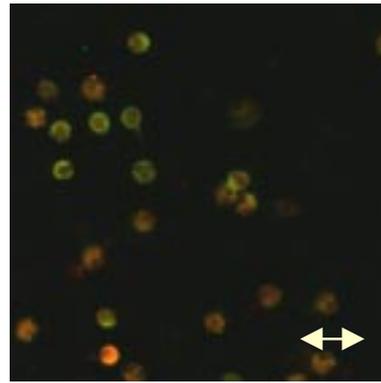


Abb. 46 d

Abb. 46. Fimbrienbindung und Expression von CEACAM1 auf neutrophilen Granulocyten nach 30 min. Inkubation mit Typ-1-Fimbrien. Die Abb. 46 a und 46 b zeigen die Einzelfärbungen, Abb. 46 c und 46 d die Overlay-Darstellung beider Färbereaktionen aus zwei verschiedenen Arealen. Der gelbe Pfeil entspricht einer Distanz von 25 μm .

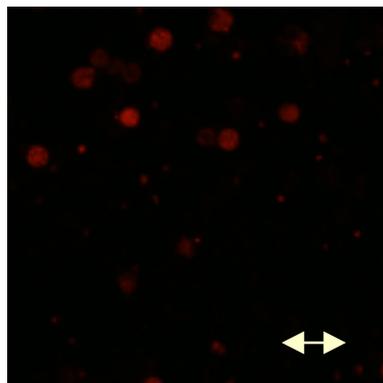


Abb. 47 a

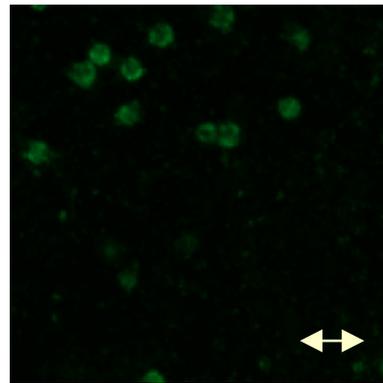


Abb. 47 b

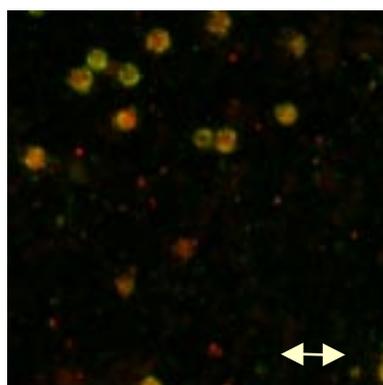


Abb. 47 c

Abb. 47. Bindung von Typ-1-Fimbrien und Expression von CEACAM1 nach 40 min. Inkubation neutrophiler Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien. In Abb. 47 a und 47 b sind die Einzelfärbungen, in Abb. 47 c ist die Overlay-Aufnahme abgebildet. Der gelbe Pfeil bezeichnet eine Distanz von 25 μm .

6 Nachweis von Lactosaminoglycanen und der E-Selectin-Liganden Lewis^x und Sialyl-Lewis^x auf CEACAM1 aus humanen Granulocyten

Der Nachweis von Lactosaminoglycanen und Lewis-Antigenen auf CEACAM1 erfolgte in Western Blots, in denen über T84.1-Affinitätschromatographie gereinigtes CEACAM1 aus Granulocyten eingesetzt wurde.

6.1 Nachweis der Interaktion von CEACAM1 mit Galectin-1

Für den Nachweis von Lactosaminoglycanen auf CEACAM1 wurde das isolierte Lectin Galectin-1 (Prof. Dr. H.-J. Gabius) verwendet.

Im Western Blot wurde anstelle eines Detektionsantikörpers biotinyliertes Galectin-1 zum Nachweis von CEACAM1 verwendet. Die Membran wurde nach dem Blockieren in Lectinsbindungspuffer äquilibriert. Galectin-1 wurde über Nacht bei 4°C (1µg/ml Lectinbindungspuffer) auf der Membran belassen. In der Kontrolle erfolgte die Detektion von CEACAM1 mit dem mAb 4D1/C2. Die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers und des Streptavidins (Streptavidin-Peroxidase, anti-Maus-Peroxidase, 1:2.000) wurde in der Chemilumineszenzreaktion dargestellt (Abb. 48).

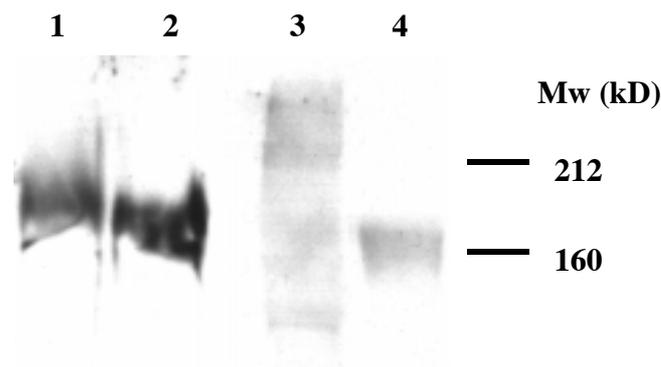


Abb. 48. Darstellung von CEACAM1 mit dem mAb 4D1/C2 und Galectin-1. In Bahn 1 und 2 wurde CEACAM1 aus Granulocytenextrakten und in aufgereinigter Form mit dem mAb 4D1/C2 nachgewiesen; in den Bahnen 3 und 4 wurde Galectin-1 zur Detektion von CEACAM1 in Granulocytenrohextrakten (Bahn 3) und von affinitätsgereinigtem CEACAM1 eingesetzt.

6.2 Nachweis von Lewis^x und Sialyl-Lewis^x – Epitopen auf CEACAM1 aus humanen Granulocyten

Zum Nachweis terminaler Lewis^x und Sialyl-Lewis^x Epitope auf CEACAM1 wurden Granulocytenrohextrakte und aufgereinigtes CEACAM1 im Western Blot untersucht. Gegen Lewis^x Epitope wurden die monoklonalen Antikörper L5 (Prof. Schachner) und MMA (Becton/Dickinson) verwendet. Zum Nachweis von Sialyl-Lewis^x-Epitopen wurde der monoklonale Antikörper 2H5 (Becton/Dickinson) eingesetzt (Abb. 49 und Abb. 50).

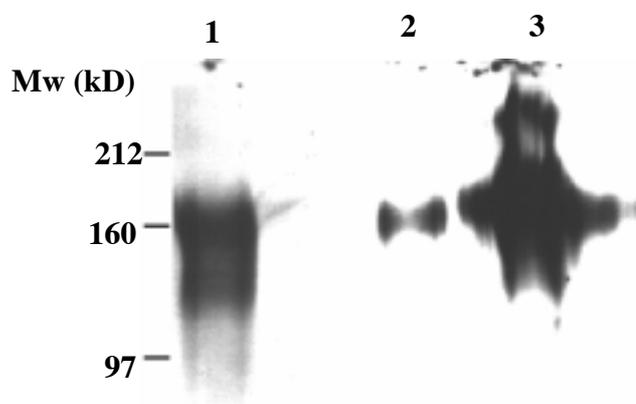


Abb. 49. Nachweis von CEACAM1 im Western Blot durch den anti-Lewis^x-Antikörper L5. Die Bindung des Anti-Lewis^x-Antikörpers L5 (IgM aus der Ratte aus Hybridomaüberstand, 1:50 in PBS) und des mAb 4D1/C2 (0,5 µg/ml PBS) wurde nach Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Sekundäantikörpern (anti-Ratten-Antikörper, µ-Ketten-spezifisch aus der Ziege, 1:5.000 in PBS und anti-Maus-Antikörper aus der Ziege, Fcγ-Fragment-spezifisch, 1:5.000 in PBS) in der Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Bahn 1 zeigt affinitätschromatographisch gereinigtes CEACAM1, das durch den mAb 4D1/C2 detektiert wurde. In den Bahnen 2 und 3 sind gereinigtes CEACAM1 bzw. Granulocytenrohextrakt aufgetragen und mit dem mAb L5 detektiert worden.

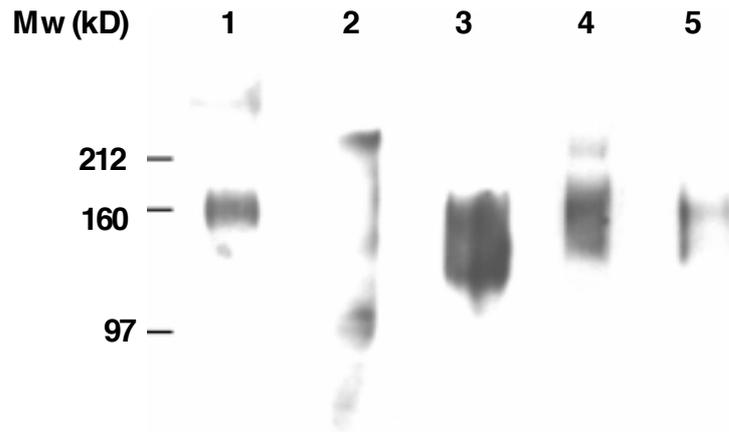


Abb. 50. Nachweis von Lewis^x und Sialyl-Lewis^x-Epitopen auf CEACAM1 aus neutrophilen Granulocyten. In Bahn 1 ist der Nachweis von CEACAM1 durch den mAb 4D1/C2 gezeigt, in den Bahnen 2 und 3 wurden Lewis^x-Epitope in Granulocytenrohextrakten (2) und auf affinitätschromatographisch gereinigtem CEACAM1 (3) durch Bindung des mAb MMA dargestellt. In den Bahnen 4 und 5 wurden Sialyl-Lewis^x-Epitope in Granulocytenmembranpräparationen und auf CEACAM1 durch den mAb 2H5 nachgewiesen. Zur Detektion von CEACAM1 durch die mAbs MMA und 2H5 wurde die Nitrocellulosemembran mit 10 µg Antikörper/ml PBS inkubiert. Die Darstellung der Peroxidase-reaktion des Sekundärantikörpers (anti-µ-Ketten-spezifischer anti-Maus-Antikörper aus der Ziege; 1:5.000 in PBS) erfolgte durch Chemilumineszenzreaktion.

7 Analyse der CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Expression in Tumoren humaner Colonicarcinomzelllinien nach Transplantation in *scid*-Mäuse

Der Ausgangspunkt für die Analyse der Expression von Sialyl-Lewis^x-Epitopen und CEACAM1 in einem experimentellen Tumormetastasierungsmodell ist, daß CEACAM1 in humanen Colonicarcinomen herunterreguliert ist und daß die Sialylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden mit der Metastasierung von Primärtumoren korreliert. Für ein Enzym, das an der Synthese von Sialyl-Lewis^x-Epitopen beteiligt ist, die α -2,3-Sialyltransferase, wurde auf genetischer Ebene eine Herabregulation der Expression in humanen Colonicarcinomen nachgewiesen (Zhang et al., 1997). Da CEACAM1 Sialyl-Lewis^x-Epitope trägt, sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase bzw. Sialyl-Lewis^x-Epitopen und dem Metastasierungspotential humaner Tumorzelllinien in *scid*-Mäusen gibt.

Hierfür wurden zwei humane Tumorzelllinien, die von Colonicarcinomen abgeleitet wurden, in *scid*-Mäuse implantiert und dort zu soliden Tumoren etabliert. *Scid*-Mäuse verfügen über einen schwerwiegenden kombinierten Immundefekt, so daß sie keine Immunabwehrreaktionen gegen die artfremden Zellen erzeugen können. Die Colonicarcinomzelllinie HT29 wurde bereits mehrfach in diesem *scid*-Maus-Modell untersucht. Sie metastasiert nach Transplantation und Etablierung solider Primärtumoren in die Lungen (Schumacher et al., 1994; Mitchell et al., 1997; Mitchell et al., 1998; Schumacher und Adam, 1998). Zusätzlich wurde eine mit Colchicin behandelte Variante der HT29-Zelllinie, HT29mdr, verwendet. Sie unterscheidet sich von der Linie HT29 dadurch, daß sie das *multiple drug-resistance glycoprotein 1* (mdr) überexprimiert. Nach Transplantation in die Mäuse wurden solide Tumoren etabliert. Die Tumoren wurden nach 3-6 Wochen exzidiert. Zusätzlich wurde den Mäusen die Lungen entfernt, um das Metastasierungsverhalten der Primärtumoren beurteilen zu können. Die Tumoren hatten ein Gewicht von 0,3g-1,2g. Die metastasierenden Tumoren waren im Allgemeinen größer als die nichtmetastasierenden Tumoren. Im Gegensatz zu den HT29-Tumoren konnte bei den HT29mdr-Tumoren keine

Metastasierung in die Lungen der Mäuse festgestellt werden. Die Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase bzw. Sialyl-Lewis^x-Epitopen wurde in der Immuncytochemie, auf RNA-Ebene und im Western Blot untersucht.

7.1 Vergleich der Expression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x in HT29 und HT29mdr Tumoren und Lungenmetastasen in der Immuncytochemie

Nach Einbettung in Paraffin wurden immuncytochemische Färbungen von den Primärtumoren und den Lungenmetastasen angefertigt. Nach Darstellung der Expression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen in Einzelfärbungen mit den mAbs 4D1/C2 und 2H5 wurde eine serielle Doppelfärbung durchgeführt, um eine mögliche Kolokalisierung beider Antigene aufzuzeigen. Die Abbildungen 51-53 zeigen die Glucose-Oxidase-Färbungen (schwarz) zur Darstellung von CEACAM1 nach Bindung des mAb 4D1/C2. In den Abbildungen 54-56 sind die Sialyl-Lewis^x-Epitope durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase dargestellt, die nach Bindung des anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörpers 2H5 entwickelt wurde (rot). In den Abbildungen 57-59 sind die Doppelfärbungen zur Kolokalisierung für beide Antigene gezeigt.

7.1.1 Darstellung der Expression von CEACAM1 in der Glucose-Oxidase-Färbung

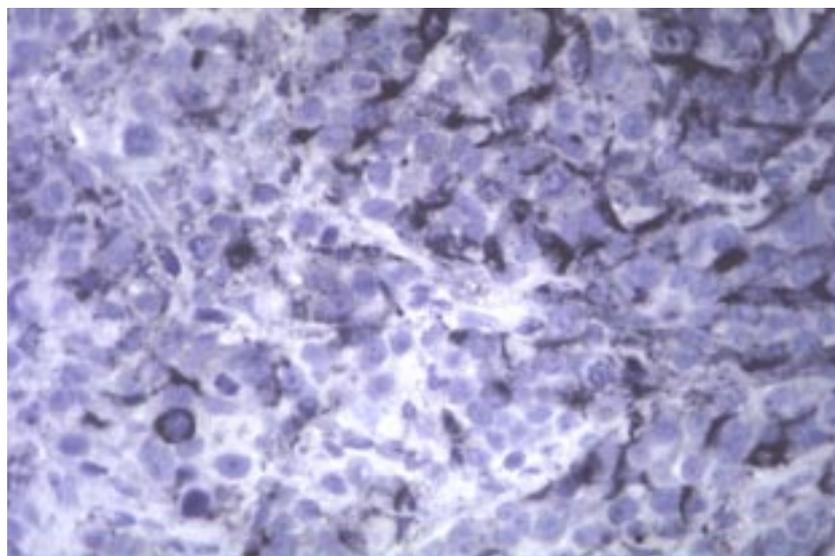


Abb. 51. Darstellung von CEACAM1 (schwarz) in einem HT29-Tumor in der Glucose-Oxidase-Färbung (x800). Die Farbreaktionen treten diffus und nicht in allen Arealen des entdifferenzierten Tumors auf, sondern sind auf Foci beschränkt. CEACAM1 ist sowohl in den Zellmembranen einiger Tumorzellen exprimiert, als auch in peripheren Arealen des Cytoplasmas. Vereinzelt sind Zellen vorhanden, in denen CEACAM1 den gesamten Zellkorpus ausfüllt.

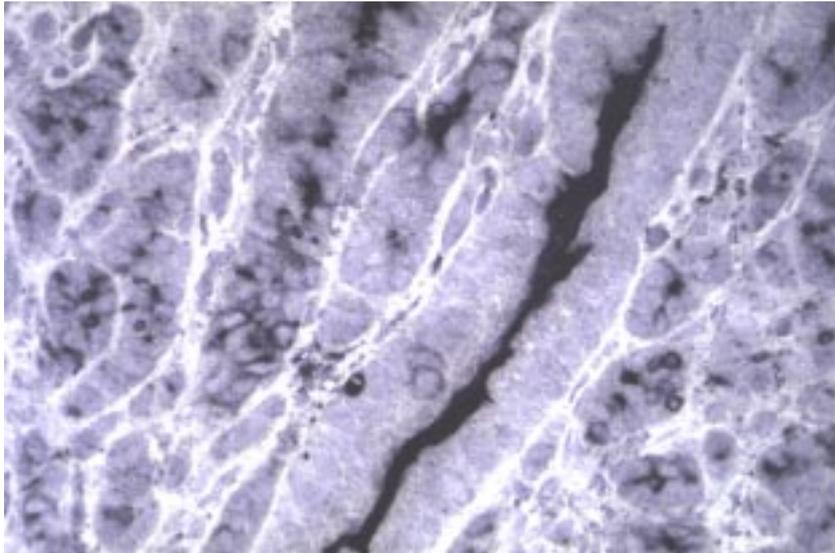


Abb. 52. Darstellung von CEACAM1 in einem HT29mdr-Tumor in der Glucose-Oxidase-Färbung (800x). Im Gegensatz zum HT29-Tumor weist der HT29mdr-Tumor pseudotubuläre Differenzierungsstrukturen auf. Die Tubuli sind klar durch Bindegewebsstrukturen voneinander abgeteilt. Die Lokalisierung der CEACAM1 Epitope ist auffällig auf die apikalen Seite der Lumina konzentriert. Zusätzlich ist eine deutliche Membranreaktion in einzelnen Zellen vorhanden.

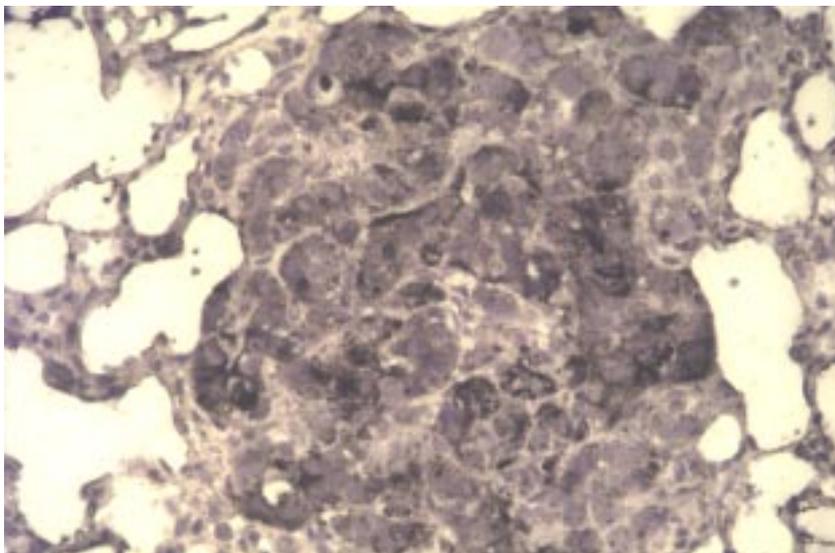


Abb. 53. Aufnahme einer Lungenmetastase eines HT29-Tumors in 800facher Vergrößerung. Wie im Primärtumor läßt sich in der Metastase eine fokale Expression von CEACAM1 nachweisen. Auch hier läßt sich CEACAM1 sowohl in Zellmembranen als auch im Cytoplasma in der Glucose-Oxidase-Färbung darstellen.

7.1.2 Darstellung der Expression von Sialyl-Lewis^x-Epitopen durch Reaktion der alkalischen Phosphatase

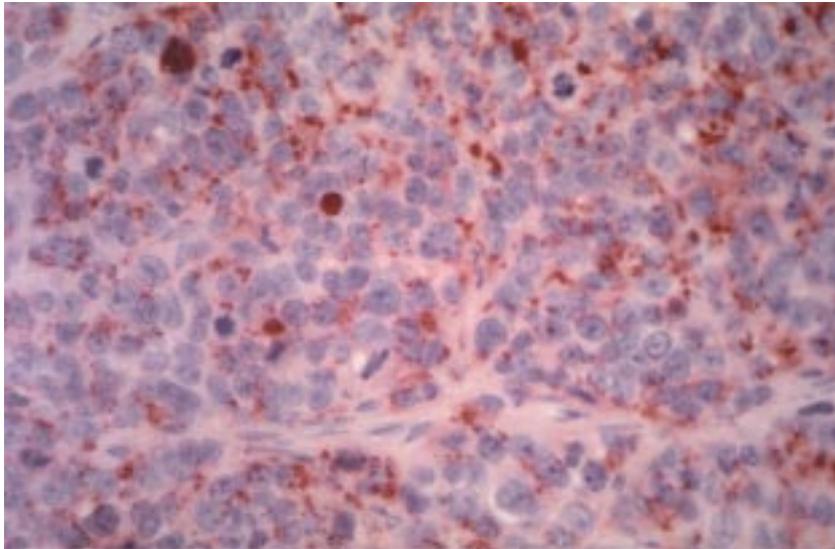


Abb. 54. Darstellung der Sialyl-Lewis^x-Epitope (rot) mit dem mAb 2H5 nach Entwicklung der alkalischen Phosphatase-Reaktion in einem HT29-Tumor. Die Expression der Sialyl-Lewis^x-Epitope ist in allen Tumorregionen in gleichem Maße zu finden. Die Reaktion ist in Zellmembranen sowie in cytoplasmatischen Granulae nachweisbar. Vereinzelt sind Zellen vorhanden, deren Morphologie mit der Mucus-produzierender Zellen vergleichbar ist und die sich vollständig anfärben lassen.

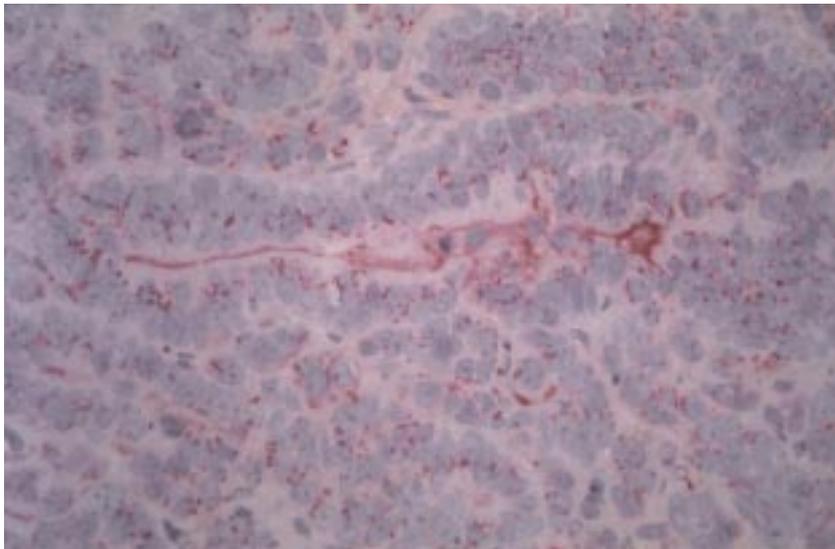


Abb. 55. Immunfärbung für Sialyl-Lewis^x-Epitope in einem HT29mdr-Tumor (x800). Wie auch in der Färbung von CEACAM1 im selben Tumor tritt eine prominente Reaktion an der apikalen Seite des Lumens der Pseudotubuli auf. Zusätzlich zu vereinzelt Membranreaktionen sind intrazelluläre Granulae gefärbt. Mucoide Zellen treten im Gegensatz zum HT29 Tumor nicht auf.

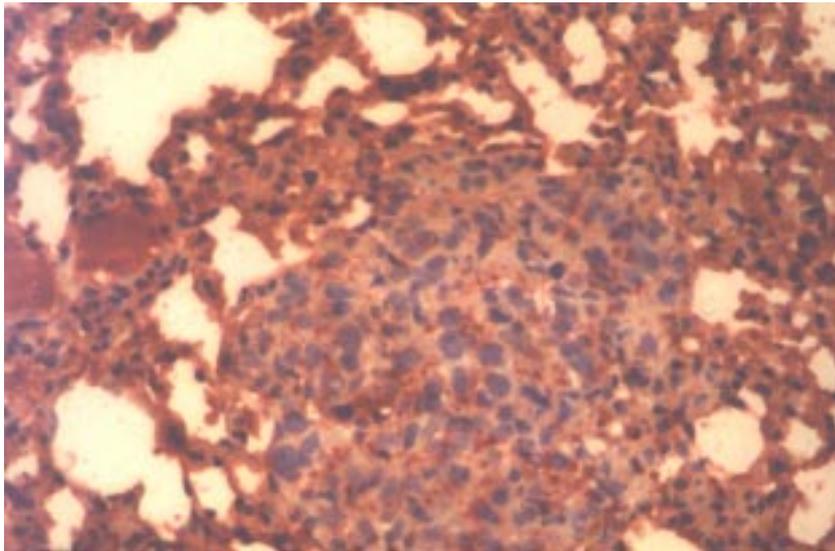


Abb 56. Darstellung der Sialyl-Lewis^x-Epitope in einer Lungenmetastase eines HT29-Tumors (x800). Das Färbemuster entspricht dem des Primärtumors. Die dominierende Färbung tritt im Cytoplasma innerhalb granulärer Strukturen auf.

7.1.3 Immuncytochemische Doppelfärbung von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x Epitopen

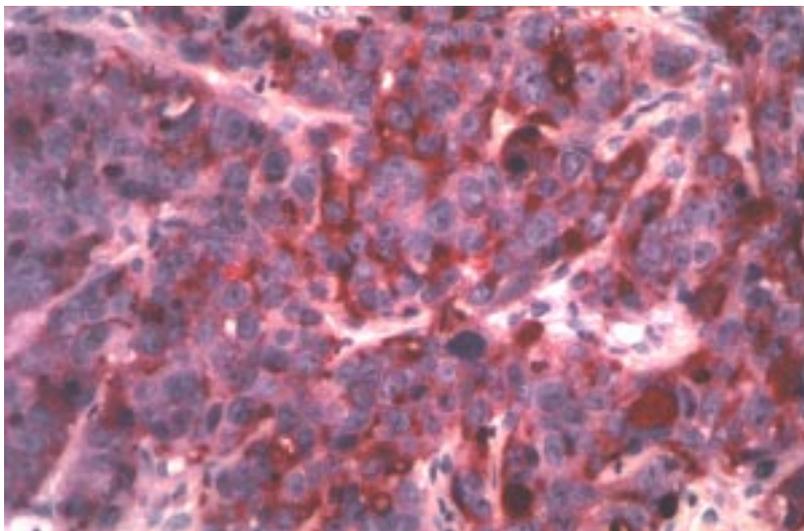


Abb. 57. Immuncytochemische Doppelfärbung von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen in einem HT29 Tumor (x800). Die schwarze Färbung (CEACAM1) und die rote Färbung (Sialyl-Lewis^x) treten am deutlichsten in der Zellmembran der Tumorzellen auf (violette Bereiche). Teilweise ist auch im Cytoplasma eine Kolokalisierung der beiden Antigene zu beobachten. Das Verteilungsmuster der kolokalisierenden Bereiche entspricht im Wesentlichen dem Expressionsmuster von CEACAM1.

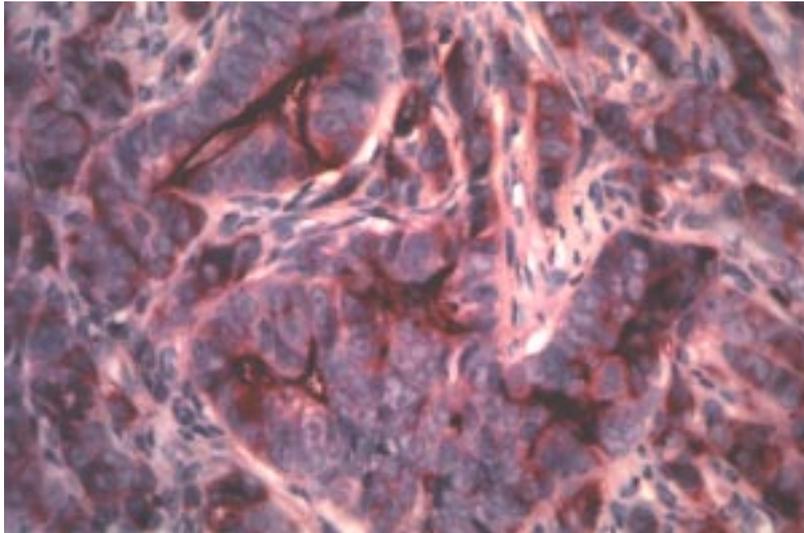


Abb. 58. Doppelfärbung von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen in einem HT29mdr-Tumor (violett, x800). Es kommt zu einer intensiven Doppelfärbung beider Antigene auf der Lumenseite der Pseudotubuli. Das Koloalierungsmuster beider Antigene entspricht dem in der Einzelfärbung beobachteten Expressionsmuster von CEACAM1. Wie in der Einzeldarstellung der Sialyl-Lewis^x-Epitope sind auch bei der Doppelfärbung intrazelluläre Granulae sichtbar, die sich durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase anfärben lassen.

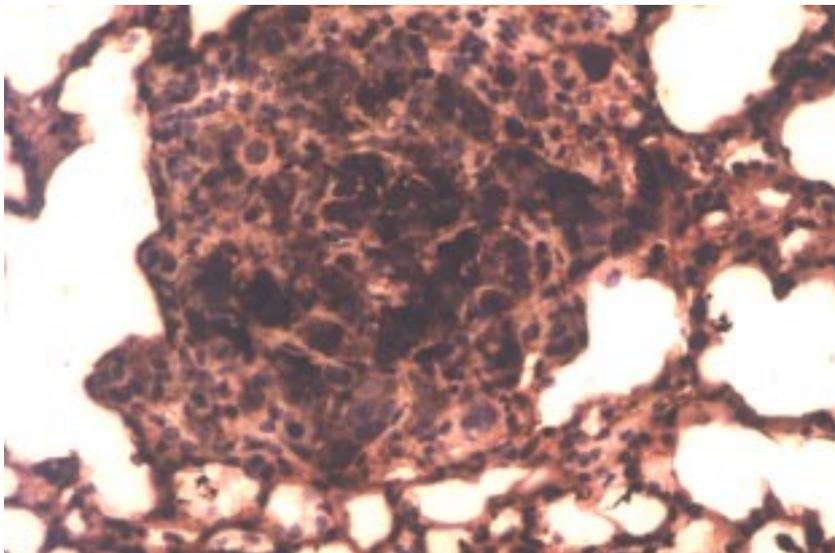


Abb. 59. Doppelfärbung von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x in einer Lungenmetastase eines HT29-Tumors (x800). Die Reaktion in koloalierenden Arealen (violett) ist mit dem Färbemuster beider Antigene in den Einzelfärbungen in der Metastase und damit im Primärtumor identisch.

7.2 Analyse der Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase auf RNA-Ebene

7.2.1 Charakterisierung der DNA-Sonden für die Hybridisierung im Northern Blot

Zur Hybridisierung im Northern Blot wurden DNA-Sonden für die 3′untranslatierte Region (3′UTR) des humanen CEACAM1 sowie für die humane α -2,3-Sialyltransferase durch PCR hergestellt, über Silica-Säulen aufgereinigt und durch Überprüfung der Größe der Amplifikate im Agarosegel charakterisiert. Die Sequenz für die 3′UTR von CEACAM1 wurde bereits charakterisiert und beschrieben. Die Sonde wurde aus dem nicht translatierten Bereich der CEACAM1 cDNA gewählt, da sie eine hohe Spezifität bei der Hybridisierung ermöglicht und keine Kreuzhybridisierungen auftreten (Barnett et al., 1989; Frängsmyr et al., 1995). Die DNA-Sonde, die für den cytoplasmatischen Anteil der α -2,3-Sialyltransferase codiert, wurde nach der Amplifizierung nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß diese Sialyltransferase an der Synthese der Sialyl-Lewis^x-Determinante beteiligt ist (Sasaki et al., 1994).

7.2.2 Herstellung einer DNA-Sonde für die α -2,3-Sialyltransferase

Das durch PCR hergestellte DNA-Fragment, das die Sequenz für die cytoplasmatische, katalytische Domäne der α -2,3 Sialyltransferase (905 bp; Aminosäuren 31-329 der α -2,3-Sialyltransferase) enthielt, wurde durch Auftrennung in einem präparativen, 1,2%igen Agarosegel charakterisiert und über Silica-Säulen aufgereinigt (Abb. 60). Das gereinigte Fragment wurde durch Sequenzierung nach Sanger charakterisiert (Abb. 61).

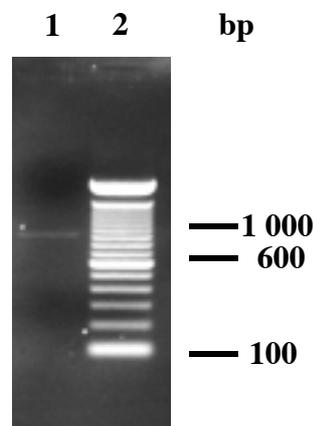


Abb.60. Gereinigtes Produkt aus der PCR für die α -2,3-Sialyltransferase. 10 μ l wurden auf das Gel

geladen. Bahn 1 zeigt das Produkt, dem durch den Größenstandard (100 bp-Leiter) in Bahn 2 eine relative Größe von ca. 900 bp zugeordnet werden konnte.

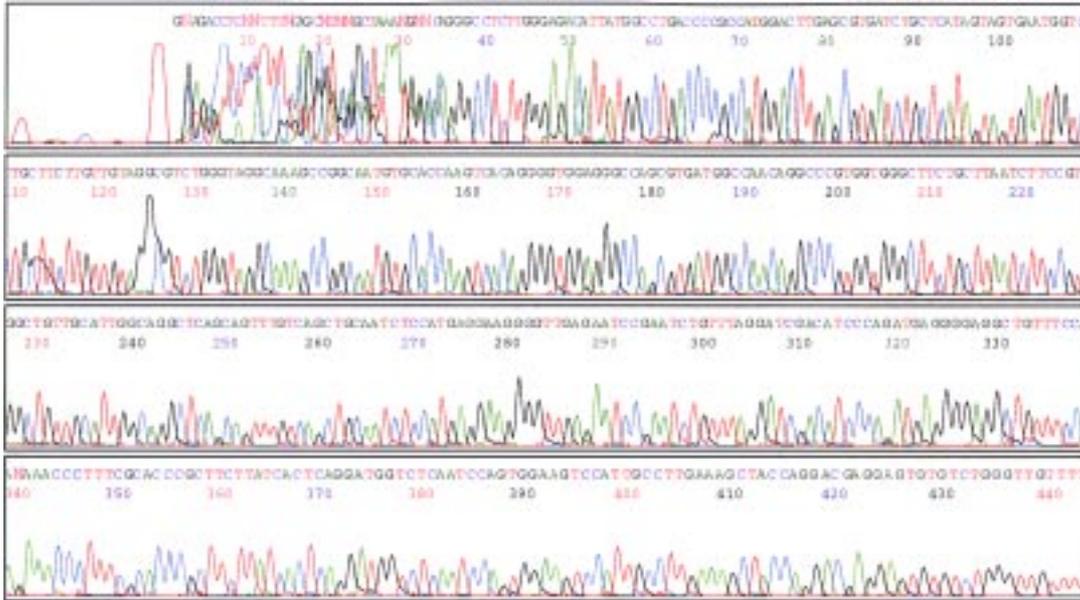


Abb. 61. Sequenzierungsprotokoll für das aufgereinigte PCR-Produkt. Die erhaltene Sequenz codiert einen Teil des nichttranslatierten Stranges. Abzulesen ist die Sequenz des amplifizierten Fragmentes im Bereich der Nucleotide 526-934 der cDNA für die vollständige α 2,3-Sialyltransferase, die für die Aminosäuren 176 (Glu) bis 311 (Ala) codiert (Sasaki et al., 1994).

7.2.3 Charakterisierung der DNA-Sonde für die 3'UTR von CEACAM1

Zur Analyse des durch PCR erhaltenen Fragmentes wurden 10 μ l des über Silica-Säulen gereinigten PCR-Produktes auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 62). Das durch die *Primer* definierte Amplifikat sollte eine Größe von 258bp haben (Barnett et al., 1989; Frängsmyr et al., 1995).

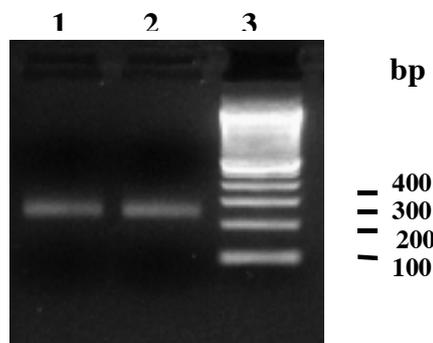


Abb. 62. Aufgereinigtes Amplifikat aus der PCR für die 3'UTR des humanen CEACAM1. Mit Hilfe des Größenstandards (Bahn 3; 100 bp-Leiter) Amplifikate einer Größe von ca. 260 bp zugeordnet werden.

7.2.4 cDNA-Sonde für humanes β -Actin

Zur Analyse der β -Actin-Expression wurde die cDNA-Sonde der Firma Clontech gemäß der Angaben des Herstellers zur Hybridisierung im Northern Blot eingesetzt.

7.2.5 Extraktion der RNA und Analyse ihrer Qualität im Agarosegel

Nach Isolierung der RNA aus HT29 und HT29mdr Tumoren sowie HT29 und HT29mdr Zellen mit Hilfe von TrizolTM wurde die RNA einer Lithiumchloridfällung unterzogen und in einem analytischen Agarosegel (1,5% Agarose) aufgetrennt (Abb. 63 und Abb. 64). Von jeder Präparation wurden je 5 μ l mit 4 μ l Wasser und 1 μ l Ladungspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

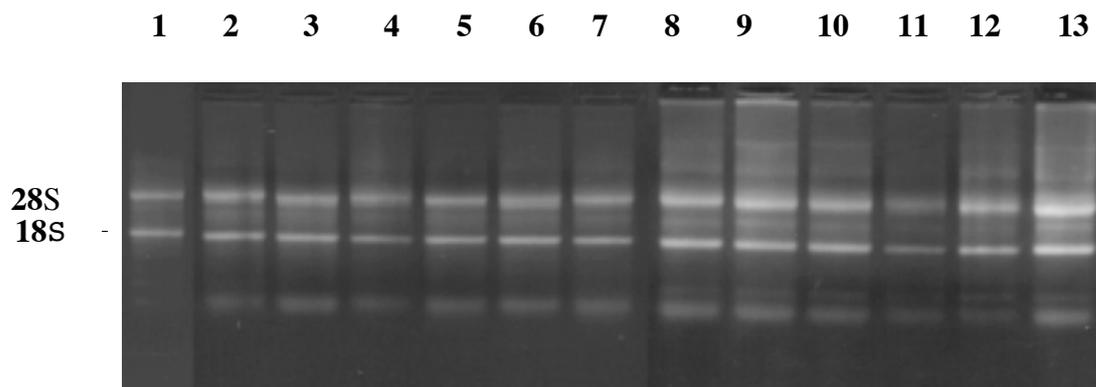


Abb. 63. Analytisches 1,5%iges Agarosegel zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA aus Tumorgewebe, Lebergewebe und Zelllinien. Zu sehen sind hauptsächlich die 18S und 28 S-RNA-Banden. Die einzelnen Proben wurden wie folgt aufgetragen: Bahn 1: Maus-Leber, Bahn 2: HT29mdr-Tumor 31-1, Bahn 3: HT29mdr-Tumor 31-2, Bahn 4: HT29mdr-Tumor 31-3, Bahn 5: HT29mdr-Tumor 32-7, Bahn 6: HT29mdr-Tumor 32-8, Bahn 7: HT29mdr-Tumor 31-2, Bahn 8: HT29-Tumor 29-4, Bahn 9: HT29-Tumor 29-3, Bahn 10: HT29-Tumor 29-5, Bahn 11: HT29mdr-Tumor 32-4, Bahn 12: HT29-Tumor 1-99-V, Bahn 13: HT29-Tumor 1-99-I.

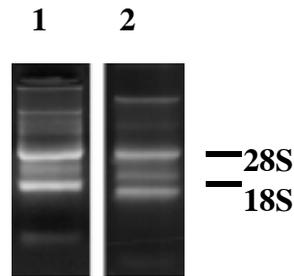


Abb. 64. Aus HT29-Zellen und HT29mdr-Zellen präparierte RNA nach Auftrennung in einem 1% TAE/Agarosegel. In Bahn 1 ist die RNA aus HT29-Zellen, in Bahn 2 die RNA aus HT29mdr-Zellen gezeigt.

7.3 Analyse der Genexpression von CEACAM1, der α -2,3-Sialyltransferase und β -Actin im Northern Blot

Für den Northern Blot wurde die isolierte RNA in einem denaturierenden Formamid-Agarosegel aufgetrennt. Die Qualität der Auftrennung wurde nach Anfärben der RNA mit Ethidiumbromid begutachtet (Abb. 65). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde diese mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden für CEACAM1, der α -2,3-Sialyltransferase und β -Actin hybridisiert. Die Signale wurden auf einem Röntgenfilm detektiert (Abb. 66).

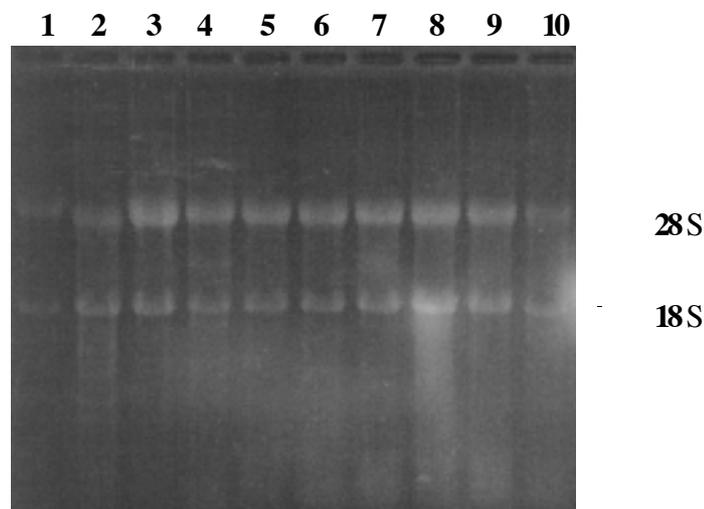


Abb. 65 RNA-Proben aus HT29-/HT29mdr-Tumoren und -Zelllinien in einem denaturierenden Formamidgel. Die RNA wurde nach Wässern zur Entfernung des Ethidiumbromids im Northern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Bahn 1: Positivkontrolle, SW498-Zellen; Bahn 2: Leber aus einer *scid*-Maus; Bahn 3: HT29 Zellen; Bahn 4: HT29mdr-Zellen; Bahn 5: HT29 Tumor 1-99-I; Bahn 6: HT29 Tumor 29-3; Bahn 7: HT29 Tumor 29-4; Bahn 8: HT29 mdr-Tumor 31-2; Bahn 9: HT29mdr-Tumor 31-3; Bahn 10: HT29mdr Tumor 31-4.

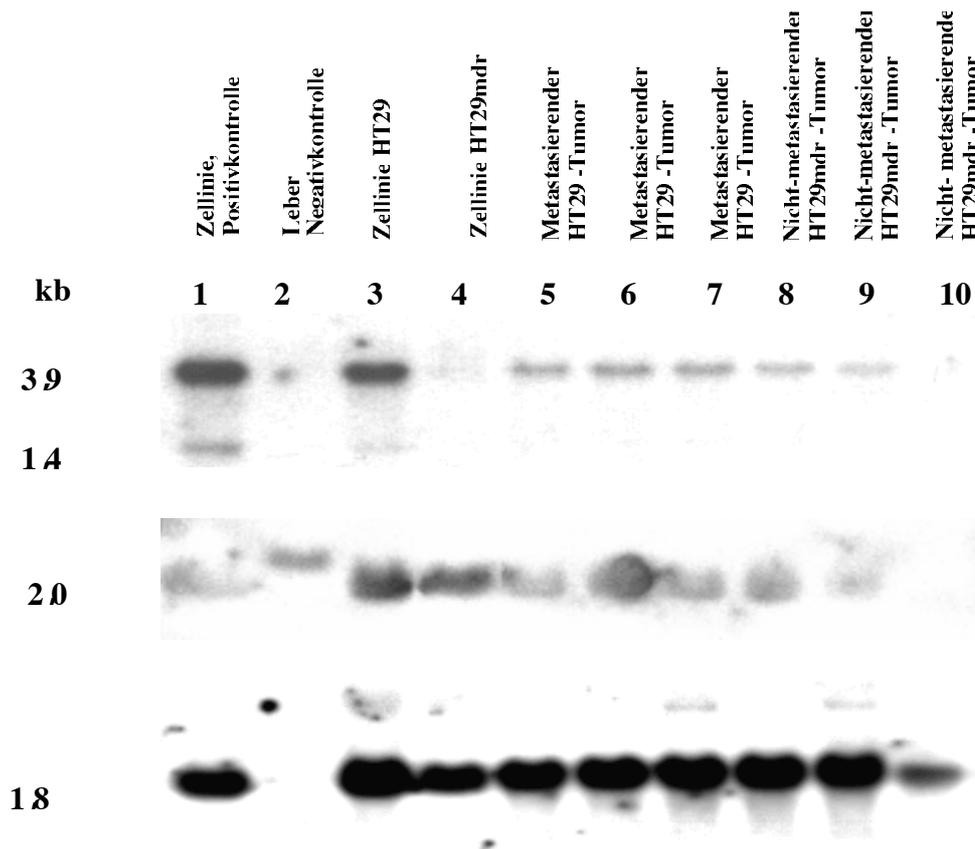


Abb. 66. Hybridisierung des Northern Blots mit cDNA-Sonden für die Detektion von CEACAM1 (oben), die α 2,3-Sialyltransferase (Mitte) und β -Actin (unten). In der Hybridisierung mit der CEACAM1-spezifischen Sonde sind zwei Signale zu detektieren, die einer Messenger-Größe von 1,4 und 3,9 kb entsprechen. In der Hybridisierung mit der cDNA-Sonde für die α -2,3-Sialyltransferase läßt sich ein Transkript von 2,0 kb detektieren. Es kommt mit dieser Sonde zu einer Kreuzhybridisierung mit einem Messenger aus der Mäuseleber (Bahn2), das einer Größe von ca. 2,2 kb entspricht. In der Kontrollhybridisierung mit der cDNA, die für humanes β -Actin codiert, ist ein Signal zu detektieren, das einer Messenger-Größe von 1,8 kb entspricht. Bahn 1: Positivkontrolle, SW498-Zellen; Bahn 2: Leber aus einer *scid*-Maus; Bahn 3: HT29 Zellen; Bahn 4: HT29mdr-Zellen; Bahn 5: HT29 Tumor 1-99-I; Bahn 6: HT29 Tumor 29-3; Bahn 7: HT29 Tumor 29-4; Bahn 8: HT29 mdr-Tumor 31-2; Bahn 9: HT29mdr-Tumor 31-3; Bahn 10: HT29mdr Tumor 31-4.

7.3 Analyse der Expression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen in HT29- und HT29mdr-Tumoren im Western Blot

Proteinrohextrakte, die aus HT29- und HT29mdr-Tumoren durch Detergenzienextraktion gewonnen wurden, wurden nach Auftrennung in einem 7%igen PAA-Gel im Western Blot analysiert.

Auf das Gel wurden jeweils 20 μ g des Proteinrohextraktes aufgetragen. Für die Detektion von CEACAM1 wurde der mAb 4D1/C2 eingesetzt (Abb. 67). Sialyl-Lewis^x-Epitope wurden mit dem mAb 2H5 detektiert (Abb. 68). Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte nach Entwicklung der Peroxidase-Reaktion der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Antikörper, Fc γ -Fragment-spezifisch und Ratte-anti-Maus-Antikörper, μ -Ketten-Spezifisch, je 1:5.000) in der Chemilumineszenzreaktion.

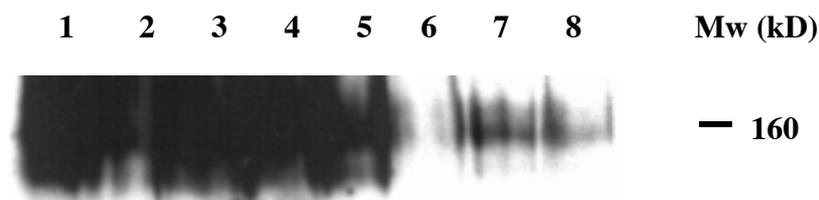


Abb. 67. Detektion von CEACAM1 in HT29- und HT29mdr-Tumoren mit dem mAb 4D1/C2.

In den Bahnen 1-4 sind metastisierende HT29-Tumoren aufgetragen, in den Bahnen 5-8 sind die nichtmetastisierenden HT29mdr-Tumoren gezeigt. CEACAM1 läßt sich in beiden Tumorspezies auf einer Höhe von ca. 160 kD detektieren.

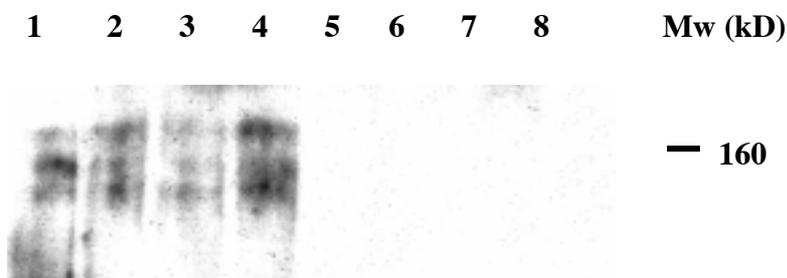


Abb. 68. Detektion von Sialyl-Lewis^x-Epitopen in HT29- und HT29mdr-Tumoren mit dem mAb 2H5. In den Bahnen 1-4 sind metastisierende HT29-Tumoren aufgetragen, in den Bahnen 5-8 sind die

nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren gezeigt. Das Sialyl-Lewis^x-Epitop läßt sich nur in den metastasierenden Tumoren detektieren. Es sind hier drei Banden zu erkennen, von denen eine das Molekulargewicht von CEACAM1 besitzt (160 kD).

8 Untersuchung der biologischen Funktion der Sialyl-Lewis^x-Epitope von CEACAM1

In Endothelzell-Migrationsassays wurde das chemotaktische Potential von CEACAM1 aus Granulocyten untersucht. Dabei stand die funktionelle Betrachtung von CEACAM1 als Träger von Sialyl-Lewis^x-Epitopen im Vordergrund. Als Kontrollsubstanz wurde VEGF eingesetzt, der bekanntermaßen zu einer Stimulation der Migration von Endothelzellen führt (Folkman und D'Amore, 1996; Veikkola und Alitalo, 1999). Als weitere Testsubstanzen wurde aus Granulocyten isoliertes CEACAM1 eingesetzt sowie der CEACAM1-spezifische Antikörper 4D1/C2 und der anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper 2H5. Um Hinweise darauf zu erhalten, welches Epitop auf CEACAM1 durch den mAb 4D1/C2 erkannt wird, wurde aus Granulocyten aufgereinigtes CEACAM1 enzymatisch deglycosyliert. Anschließend wurde die Bindung von 4D1/C2 an die deglycosylierte Form im Western Blot untersucht.

Aus Endothelzellüberständen konnten zwei lösliche Isoformen von CEACAM1 im analytischen Maßstab isoliert werden, von denen die eine starke Reaktivität mit dem anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper 2H5 im Western Blot zeigte. Es wurde daher *in vitro* modellhaft für die granulocytäre Form von CEACAM1 untersucht, ob CEACAM1 ein Ligand für E-Selectin ist.

8.1 Migrationsverhalten von Endothelzellen nach Stimulation mit CEACAM1 aus neutrophilen Granulocyten

In dem Versuch zur Migration von Endothelzellen wurde das im Rahmen dieser Arbeit isolierte CEACAM1 aus Granulocyten verwendet. Das Experiment wurde von Frau Dr. N. Kilic und Herrn PD Dr. S. Ergün (Anatomisches Institut, UKE) durchgeführt.

Die Migrationsversuche wurden in Boyden-Kammern durchgeführt. In der Auswertung wurden die Zellen gezählt, welche durch den Filter hindurch gewandert waren. Für jede Substanz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. In der Negativkontrolle wurde Zellkulturmedium ohne Zusätze verwendet. Die Ergebnisse

der Experimente sind in der folgenden Tabelle (Tab. 17) und in Abb. 69 zusammengefaßt:

Substanz	Anzahl gewanderter Zellen	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle ohne Zusatz	67	62,7	3,2
	63		
	58		
VEGF 50 ng/ml	129	128,7	1,8
	131		
	126		
CEACAM1 1 μ l	120	120,3	1,1
	122		
	119		
CEACAM1 2 μ l	137	133,3	5,8
	124		
	139		
CEACAM1 5 μ l	138	138,7	2,2
	142		
	136		
4D1/C2	63	65	1,9
	68		
	64		
Anti-sLe ^x	64	65,3	1,1
	67		
	65		
CEACAM1 1 μ l 4D1/C2	82	81,7	1,8
	84		
	79		
CEACAM1 2 μ l 4D1/C2	80	88,7	5,4
	94		
	92		
CEACAM1 5 μ l 4D1/C2	93	94	0,82
	94		
	95		
CEACAM1 1 μ l Anti-sLe ^x	84	82	1,6
	80		
	82		
CEACAM1 2 μ l Anti-sLe ^x	87	86,3	0,41
	86		
	86		
CEACAM1 5 μ l Anti-sLe ^x	87	88	0,82
	89		
	88		

Tabelle 17. Ergebnisse der Migrationsstimulation von Endothelzellen (HDMEC).

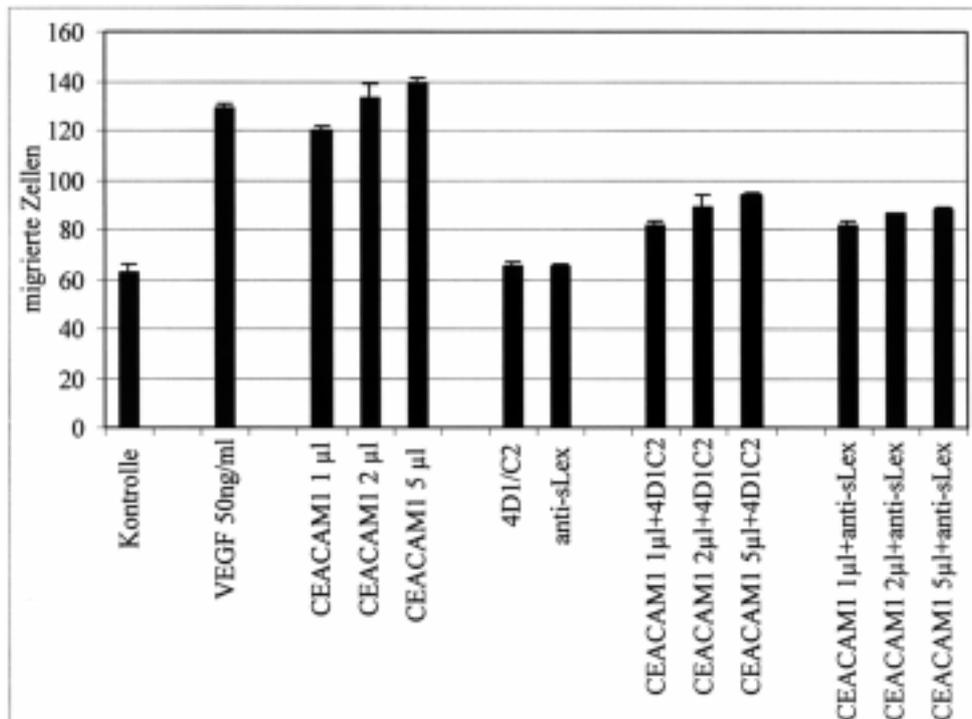


Abb. 69. Darstellung der Ergebnisse der Migrationsversuche im Säulendiagramm. Auf der Abszisse sind die im Migrationsassay zugefügten Substanzen erwähnt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der migrierten Zellen verzeichnet. In das Diagramm wurde jeweils der Mittelwert aus drei Migrationsexperimenten eingetragen (vgl. Tabelle 17).

8.2 Untersuchung der Expression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x in Endothelzellüberständen im Western Blot

Im Western Blot wurde CEACAM1 aus Granulocysten und Endothelzellüberständen (HDMEC-Zellen) untersucht, das durch Affinitätschromatographie über eine T84.1-Matrix aufgereinigt worden war. Die Proteine wurden in einem 7%igen PAA-Gel aufgetrennt. Im Western Blot erfolgte die Detektion von CEACAM1 mit dem mAb 4D1/C2; Sialyl-Lewis^x-Epitope wurden mit dem mAb 2H5 analysiert (Abb. 70).

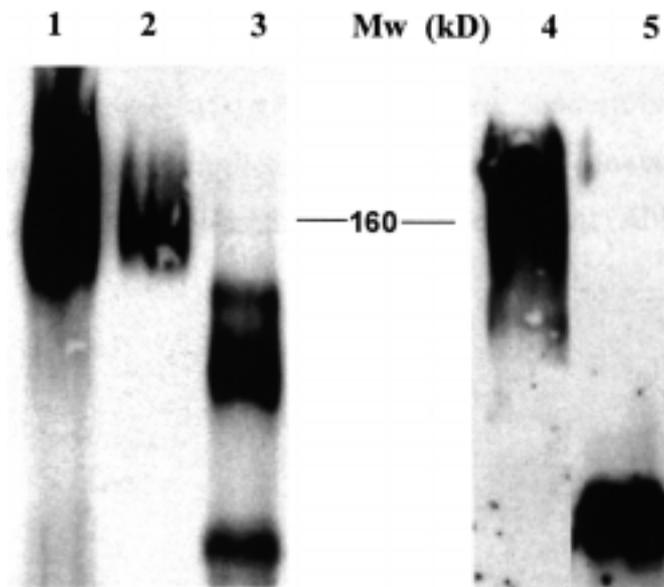


Abb. 70. Detektion von affinitätschromatographisch gereinigtem CEACAM1 aus Granulocyten und Endothelzellüberständen im Western Blot. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von $0,5\mu\text{g/ml}$ (4D1/C2) und $12,5\mu\text{g/ml}$ (2H5) eingesetzt. Die enzymatische Aktivität der Sekundärantikörper (jeweils 1:5.000) wurde nach Reaktion der alkalischen Phosphatase dargestellt. In den Bahnen 1-3 wurde der mAb 4D1/C2 eingesetzt; Bahn 1: Granulocytenrohextrakt; Bahn 2: aufgereinigtes CEACAM1 aus Granulocyten, Bahn 3: CEACAM1 aus Endothelzellüberständen in zwei Isoformen mit den relativen Molekulargewichten von 120 und 50 kD. Bahn 4-5: Detektion von Sialyl-Lewis^x-Epitopen auf CEACAM1(Bahn 4, aufgereinigt aus Granulocyten) und aus Endothelzellüberständen, in denen nur die Isoform von 50kD eine deutliche Reaktion zeigt (Bahn 5).

8.3 Deglycosylierung von CEACAM1 aus Granulocyten

Das in die Migrationsexperimente aufgereinigte CEACAM1 aus Granulocyten wurde mit der Endoglycosidase F (PNGase F) verdaut, um die Epitoperkennung des mAb 4D1/C2 näher definieren zu können. Im Vordergrund stand die Frage, ob der mAb 4D1/C2 nicht nur Proteinepitope, sondern auch Glycananteile erkennt. Dieses sollte dazu dienen, näher zu definieren, ob der inhibitorische Effekt des Antikörpers auf die Zellmigration auf der Blockierung eines Proteinepitopes auf CEACAM1 oder aber möglicherweise auf der Abschirmung von Glycanstrukturen, insbesondere Lewis^x und Sialyl-Lewis^x, beruht.

Nach dem Verdau wurde die Reaktion mit dem Lewis^x-Antikörper L5 kontrolliert (Abb. 71). CEACAM1 wurde nicht nur durch den anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 nachgewiesen, sondern auch durch den mAb T84.1, der an mehrere Mitglieder der CD66-Familie bindet und wahrscheinlich ein Proteinepitop in der N-terminalen Domäne erkennt (Abb. 72 und 73).

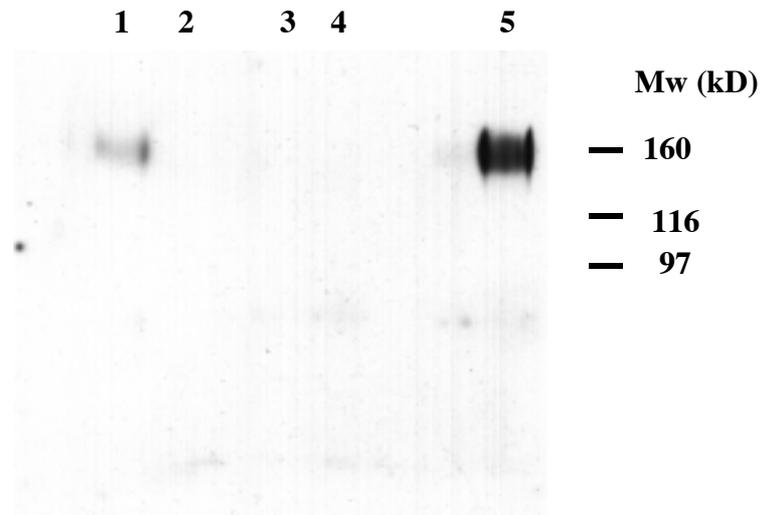


Abb. 71. Deglycosylierung von CEACAM1 mit PNGaseF. Gezeigt ist die Kontrolle der Deglycosylierung mit dem anti-Lewis^x-Antikörper L5 (Prof. Schachner). Bahn 1 zeigt die Kontrollprobe, die ohne Enzym behandelt wurde. In den Bahnen 2,3, und 4 wurden 5, 10 und 20 U Enzym eingesetzt. Bahn 5 zeigt als Positivkontrolle unverdautes CEACAM1 aus Granulocyten. Die Detektion der enzymatischen Aktivität des Sekundäntikörpers (anti-Ratten- μ -Ketten spezifischer Antikörper aus der Ziege, 1:5.000) erfolgte in der Chemilumineszenzreaktion.

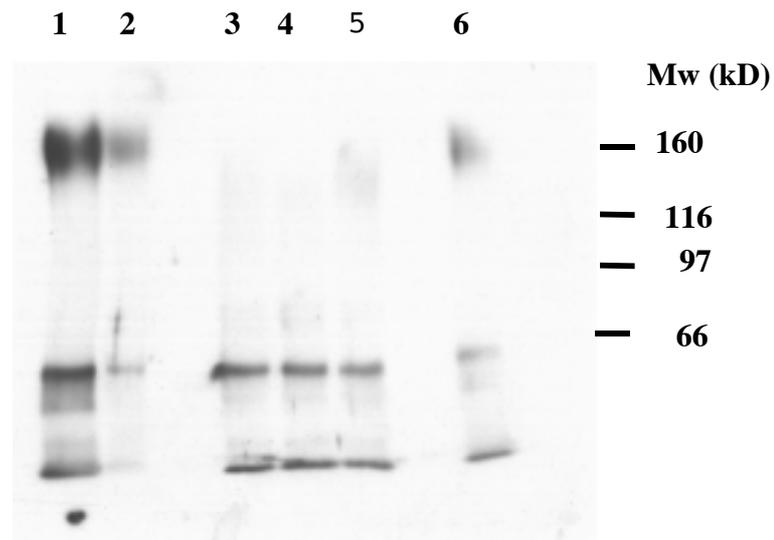


Abb. 72. Nachweis von CEACAM1 vor und nach Verdau mit PNGase F mit dem mAb 4D1/C2. Bahn 1 zeigt die Kontrolle mit unverdaulichem Material, Bahn 2 die Kontrolle ohne Enzym im Ansatz; in den Bahnen 3-5 sind die verdauten Proben aufgetragen. Im Gegensatz zum Nachweis von CEACAM1 durch T84.1 findet in der mit 5 U Enzym verdauten Probe eine Reaktion des Antikörpers mit partiell dem deglycosylierten Protein statt. Ferner sind in allen mit PNGase F behandelten Proben Banden zu detektieren, die einem Molekulargewicht von 65 und 60 kD entsprechen. Ferner ist in allen Proben eine Bande bei ca. 50 kD zu detektieren, die dem Molekulargewicht einer schweren Kette eines Immunglobulins entspricht. Es handelt sich hierbei um den Antikörper T84.1, der nach der Affinitätschromatographie und Gelfiltration nicht vollständig von CEACAM1 getrennt werden konnte. Diese Bande konnte auch in den Negativkontrollen detektiert werden, in denen nur der sekundäre anti-Maus-Antikörper mit Spezifität für die γ -Ketten eingesetzt wurde (nicht gezeigt).

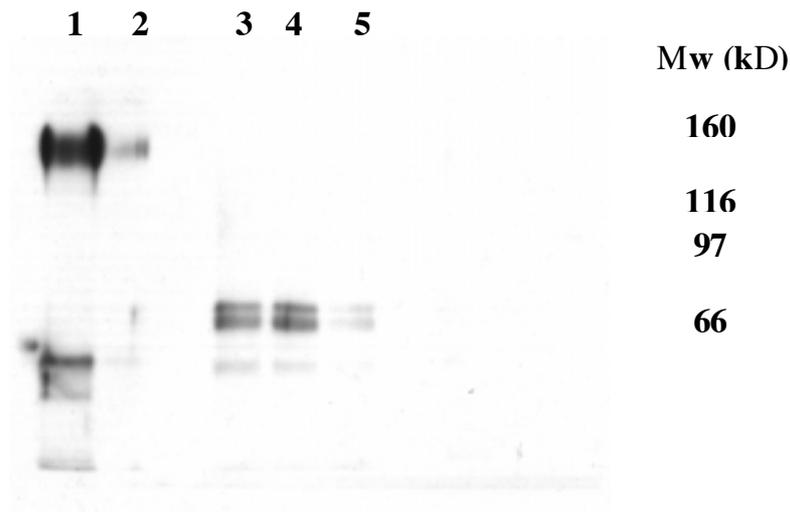


Abb. 73. Detektion von CEACAM1 nach Behandlung mit PNGaseF. Die Detektion von CEACAM1 und seiner deglycosylierten Form erfolgte mit dem anti-CEACAM1-spezifischen mAb T84.1. In Bahn 1 wurde die Positivkontrolle (unverdautes CEACAM1) aufgetragen, in Bahn 2 der Kontrollansatz ohne Enzym. Die Bahnen 3-5 beinhalten die verdauten Proben (20, 10 und 5 U PNGase F), in denen zwei Banden auf der Höhe von ca. 65 kD und ca. 60 kD nachzuweisen sind. Es taucht keine Bande auf, deren Molekulargewicht dem des unverdauten Moleküls entspricht.

8.4 Invitro-Nachweis der Interaktion zwischen CEACAM1 und E-Selectin

Für den Nachweis der Interaktion zwischen CEACAM1 aus Granulocytin und E-Selectin wurde eine Immunpräzipitation mit biotinyliertem, an Streptavidin-Agarose gebundenem E-Selectin (rekombinant aus CHO-Zellen, Calbiochem) durchgeführt.

Als Negativkontrolle wurde BSA biotinyliert und ebenfalls an eine Streptavidin-Matrix gekoppelt. Der Nachweis von CEACAM1 in den Präzipitaten und Eluatn erfolgte im Immunoblot mit dem mAb 4D1/C2 (Abb. 74). Die Peroxidasereaktion des sekundären Antikörpers (1:5.000) wurde durch Chemilumineszenz dargestellt.

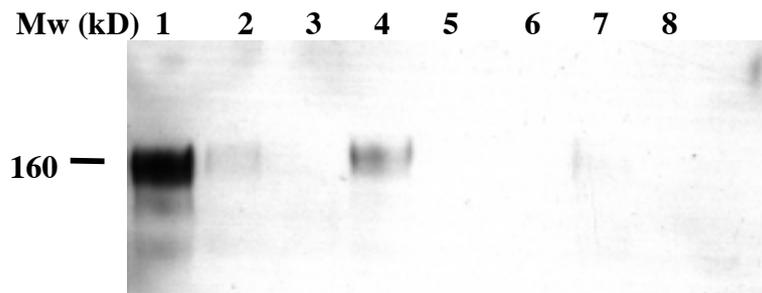


Abb. 74. Nachweis der Interaktion zwischen E-Selectin und CEACAM1 aus neutrophilen Granulocyten durch Immunpräzipitation. Bahn 1: zur Immunpräzipitation eingesetztes CEACAM1, Positivkontrolle; Bahn 2: unspezifische Bindung von CEACAM1 an Streptavidin-Agarose mit immobilisiertem BSA; Bahn 3: Eluat von der BSA-Streptavidin-Matrix; Bahn 4: Eluat von der E-Selectin-Matrix; Bahn 5: Waschfraktion von der BSA-Streptavidin-Matrix; Bahn 6: Waschfraktion 1 von der E-Selectin-Matrix; Bahnen 7-8: Waschfraktionen 2 und 3 von der E-Selectin-Matrix nach Präzipitation von CEACAM1.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten Hinweise zur biologischen Funktion der Oberflächen-Glycane des humanen Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 erbracht werden. Hierzu wurde CEACAM1 aus humanen Granulozyten aufgereinigt und die Glycostrukturen wurden immunologisch durch Western Blots und Lectin-Affinitätschromatographie definiert. (Vorarbeiten hierzu wurden in der Diplomarbeit geleistet). Verschiedene zellbiologische, immunologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden anschließend unter besonderer Berücksichtigung jeweils eines spezifischen Glycoepitops vorgenommen, um die biologischen Funktionen von CEACAM1-Glycanen näher zu definieren.

Für die spezifischen Glycoepitope, die auf CEACAM1 exponiert werden, ergaben sich inhaltlich sehr unterschiedliche Resultate in Hinsicht auf einen biologischen Kontext. In der Diskussion werden daher die Befunde zusammengefaßt, welche jeweils mit einer Kategorie von Glycoepitopen in Verbindung stehen.

1 Wechselwirkung von vitalen neutrophilen Granulozyten und isoliertem CEACAM1 mit Typ-1-Fimbrien aus *E. coli*

Symbiotische und pathogene *E. coli*-Stämme, die Mannose-spezifische Fimbrien (Typ-1-Fimbrien) tragen, können sowohl nach Opsonisierung mit Serumkomponenten von Phagozyten durch einen Komplement- bzw. Fc-Rezeptor aufgenommen werden als auch durch einen von Opsoninen unabhängigen Prozeß. Dieser Vorgang, die Lectinophagocytose, wird durch die spezifische Interaktion von microbiellen Lectinen und Glycanen auf Wirtszellen vermittelt (Ofek und Sharon, 1988). Bisher konnte nur der auf neutrophilen Granulozyten exprimierte Komplex CR3 (Mac-1), der sich aus den Integrinen CD11b und CD18 zusammensetzt, als Rezeptor für Mannose-sensitive Typ-1-Fimbrien identifiziert werden (Gbahrah et al., 1991; Rodriguez-Ortega et al., 1987). Der CD11b/CD18-Antigenkomplex verfügt über N-Glycane, die zu 38% aus High-Mannose-Glycanen bestehen (Asada et al., 1991).

High-Mannose-Epitope wurden auf humanem CEACAM1 durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Mahrenholtz et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß die High-Mannose-Gruppen in der für CEACAM1 spezifischen A2 Domäne, proximal zur Zellmembran, lokalisiert sind. Für verschiedene Mitglieder der CEA-Familie konnte in ELISA-Experimenten die Bindung von Typ 1 fimbrierten Bakterien in Mannose-sensitiver Weise nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um die Bindung an Antigene des CD66-Clusters, die aus humaner Milz, Lebermetastasen von humanen Coloncanceromen oder aus humaner Galle durch Perchlorsäureextraktion und anschließende Affinitätschromatographie (T84.1) gewonnen wurden (Leusch et al., 1990; Leusch et al., 1991; Sauter et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wechselwirkung von CEACAM1 mit Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* durch Experimente mit isoliertem CEACAM1 aus Granulocyten und an intakten Zellen nachgewiesen werden. Die Verfügbarkeit der High-Mannose-Epitope auf CEACAM1 konnte durch Wechselwirkung mit dem Mannose-spezifischen Lectin GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) nachgewiesen werden.

1.1 Mannose-spezifische Typ-1-Fimbrien binden *in vitro* an CEACAM1 aus neutrophilen Granulocyten

Um zu demonstrieren, daß die High-Mannose-Epitope auch im nativen Molekül aus Granulocyten für Mannose-spezifische Interaktionen zugänglich sind, wurde CEACAM1 über das Mannose-spezifische Lectin GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Im Eluat war nur CEACAM1 vertreten, nicht aber die anderen Mitglieder der CD66 Familie, die auf Granulocyten exprimiert sind. Hierzu gehören außer CEACAM1 auch CEACAM3 (CD66d, CGM1), CEACAM6 (CD66c, NCA) und CEACAM8 (CD66b, CGM6). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß High-Mannose-Epitope spezifisch auf CEACAM1 exprimiert werden und damit für Interaktionen mit extrazellulären Mannose-spezifischen Liganden zur Verfügung stehen.

Durch Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien an CEACAM1 aus humanen Granulocyten im Western Blot und Präzipitation von CEACAM1 aus Lösung durch immobilisierte Typ-1-Fimbrien konnte CEACAM1 als Rezeptor für Typ-1-Fimbrien identifiziert werden.

1.2 Die Bindung von Typ-1-Fimbrien an vitale humane Granulocyten kann konzentrationsabhängig durch α -Mannoside und Clustermannoside inhibiert werden

Zur Inhibition der Bindung biotinylierter Typ-1-Fimbrien an intakte Granulocyten wurden monovalente Mannoside und synthetische trivalente Clustermannoside in durchflußcytometrischen Experimenten eingesetzt. Die Analyse der Bindung von Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten zeigte ein heterogenes Bindungsmuster der Fimbrien an die Zellen; ca. 20-25 % der Zellpopulation wiesen keinerlei Bindung auf. Das breite Verteilungsmuster in der Fimbrien-positiven Population wies auf starke quantitative Unterschiede hinsichtlich der Adhäsion der Fimbrien an einzelne Zellen hin. Typ-1-Fimbrien binden an endständige, nichtreduzierende α -Mannosylreste auf Wirtszellen über ein Lectin, dem FimH-Protein. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Typ-1-Fimbrien an die Zellen durch verschiedene Mannose-enthaltende Verbindungen in konzentrationsabhängiger Weise inhibiert werden konnte. Dadurch kann bestätigt werden, daß Typ-1-Fimbrien an die Zellen allein durch die Wechselwirkung des fimbriellen Lectins, FimH, mit High-Mannose-exponierenden Liganden auf den Zellen binden. Dieser Befund ist deshalb von Bedeutung, da somit eine unspezifische Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Proteinen des dominierenden Strukturproteins, FimA, das etwa 98% der Fimbrienproteine ausmacht, und der Zellmembran, ausgeschlossen werden kann. Das fimbrielle Lectin, das interkalierend und an der Spitze der Typ-1-Fimbrien angeordnet ist, trägt zu nur etwa 0,5 % zum fimbriellen Gesamtprotein bei (Krogfelt, 1990; Abraham et al., 1988; Abraham et al., 1987).

Die Bindung der Typ-1-Fimbrien an zelluläre Rezeptoren hängt sowohl von der Beschaffenheit der Rezeptoren ab als auch von der Feinstruktur des FimH Lectins. Alle *fimH* Allele, die bisher untersucht wurden, codieren für fimbrielle Untereinheiten,

die an trimere mannosidische Strukturen binden (Abraham et al., 1987). Um die strukturellen Voraussetzungen für die Bindung des fimbriellen Lectins an seine potentiellen Zielepitope analysieren zu können, wurden trivalente Clustermannoside synthetisiert, die die dreidimensionale Struktur der natürlichen zellulären Rezeptoren mimikrieren sollen. Im Gegensatz zu Neoglycoproteinen (z.B. BSA-Neoglycoproteine) sind Clustermannoside chemisch exakt definiert. In den Inhibitionsstudien wurden trivalente Clustermannoside eingesetzt, da für die Ligandenbindungstasche im fimbriellen Lectin eine dreiteilige Struktur postuliert wird, in die ein Trisaccharid paßt, welches terminal einen nichtreduzierenden Mannosylrest exponiert (Sharon, 1987). Für die Bindungsregion wird die Gegenwart hydrophober Aminosäurereste gefordert, da Inhibitoren mit aromatischen Anteilen im Aglycon in niedrigeren Konzentrationen wirksam waren als ihre Analoga ohne aromatische Anteile (Firon et al., 1982; Firon et al., 1987; Sharon, 1987). In früheren Studien wurden Clustermannoside verschiedener Valenzen zur Inhibition der Bindung von Typ-1-Fimbrien an Meerschweinchen-Erythrocyten eingesetzt (Lindhorst et al., 1998; Kötter et al., 1998). In diesem System waren trivalente Clustermannoside die effektivsten Inhibitoren. Dieser Befund führte zur Synthese einer Reihe verschiedener trivalenter Clustermannoside, von denen der effektivste für die Bindungsstudien von Typ-1-Fimbrien und Granulocyten in der Durchflußcytometrie ausgewählt wurde (Kötter et al., 1998). Methyl- α -D-Mannosid diente als Standardinhibitor, auf den in der statistischen Auswertung die relativen Inhibitionstiter der anderen Inhibitoren bezogen wurden. Zusätzlich wurden die aromatischen Mannosederivate Benzyl- α -D-Mannosid und p-Nitrophenylmannosid sowie zwei trivalente Clustermannoside, von denen die Verbindung **5** Phenylreste im Aglycon enthielt, eingesetzt. Die peptidisch verbrückte Verbindung **6** verfügte dagegen nicht über aromatische Anteile. Die Synthesen der Clustermannoside wurden in der Literatur beschrieben (Kötter et al., 1998; Lindhorst et al., 1998).

Die Konzentrationen der Inhibitoren, bei denen die Fimbrienbindung um 50% reduziert war, waren wie folgt: 29,4 mmol für Methyl- α -D-Mannosid, 8,1 mmol für α -D-Mannosid, 59,6 μ mol für p-Nitrophenylmannosid, und 85 μ mol für Benzyl- α -D-Mannosid. α -D-Glucose wurde bis zu einer Konzentration von 200 mmol getestet und zeigte keinerlei Hemmung. Bei dem peptidisch verknüpften Clustermannosid **6** war die Fimbrienbindung bei einer Konzentration von 8,9 μ mol um 50 % herabgesetzt. Bei

dem Clustermannosid **5** betrug der entsprechende Wert $5,7 \mu\text{mol}$. Die in der Durchflußcytometrie ermittelten relativen Inhibitionskonzentrationen sind mit den in ELISA-Bindungsstudien bzw. Meerschweinchenerythrocyten-Agglutinationstests erhaltenen Werten vergleichbar.

Wie der Vergleich der verschiedenen Inhibitoren zeigt, wiesen Benzyl- α -D-Mannosid und p-Nitrophenylmannosid geringere Inhibitionskonzentrationen auf als der Standard-Inhibitor Methyl- α -D-Mannopyranosid oder α -D-Mannose. Das Clustermannosid **5**, das Phenylgruppen im Aglycon enthält, zeigte bessere inhibitorische Eigenschaften als das Clustermannosid **6**, das nicht über aromatische Anteile verfügt. Es wird vermutet, daß die aromatischen Anteile der Inhibitoren über ihre π -Elektronen mit hydrophoben Aminosäuren in der Bindungstaschenregion stabilisierend in Wechselwirkung treten und damit die Interaktion stabilisieren.

Im Vergleich zum monovalenten Standardinhibitor Methyl- α -D-Mannosid sind die Clustermannoside **5** und **6** um mehr als den Faktor 1.000 wirksamer bei der Inhibition der Bindung der Typ-1-Fimbrien an neutrophile Granulocyten. Bezogen auf die molare Konzentration der Mannosereste liegt die relative inhibitorische Konzentration der Clustermannoside **5** und **6** um den Faktor 1720 bzw. 1101 niedriger als die des Methyl- α -D-Mannosids. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Oligosaccharide, die auf granulocytären Rezeptoren exponiert werden, eine ähnliche dreidimensionale Anordnung aufweisen, wie sie durch die Clustermannoside präsentiert wird und daher eine effiziente Bindung an die Typ-1-Fimbrien ermöglichen. Der Einsatz trivalenter Clustermannoside zur Inhibition der Bindung von Typ-1-Fimbrien an Wirtszellen soll nicht nur zur Entwicklung effizienter Inhibitoren dienen, sondern auch zur näheren Definition der strukturellen Beschaffenheit der Mannosebindungstasche im fimbriellen Lectin.

Wie die Inhibitionsstudien zeigen, scheint die Heterogenität der Fimbrienbindung an die Zellen nicht in dem Vorhandensein verschiedener Subpopulationen oder in der unterschiedlichen Beschaffenheit der Rezeptoren auf den Zellen begründet. Möglicherweise liegt die Ursache in der differentiellen Oberflächenexpression zellulärer Rezeptoren auf den Granulocyten, die als Aktivierungsantigene nach

Kontakt mit den Fimbrien zunehmend exprimiert werden könnten. CEACAM1 gehört zu Aktivierungsantigenen auf neutrophilen Granulocyten, die nach Kontakt mit chemotaktischen Substanzen, z.B. fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Prolin) oder dem Ionophor A23187, hochreguliert werden (Skubitz et al., 1992).

Es wurde gezeigt, daß humanes CEACAM1 High-Mannose-Epitope präsentiert und die Bindung von Typ-1-Fimbrien an vitale Granulocyten allein durch Mannose-enhaltende Verbindungen inhibiert werden kann. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen und Kolokalisierungsstudien in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie sollte weiter untersucht werden, ob die High-Mannose-Epitope auf CEACAM1 bei der Interaktion mit Typ-1-Fimbrien eine Rolle spielen.

1.3 Typ-1-Fimbrien werden durch humane Granulocyten internalisiert

Die Bindung gereinigter Typ-1-Fimbrien an vitale Granulocyten wurde nach Einbettung der Zellen in Epon in der Elektronenmikroskopie untersucht. Von Silverblatt et al. konnte gezeigt werden, daß fimbrierte Bakterien aus klinischen Isolaten und Laborstämmen in Abwesenheit von Serumkomponenten (Opsoninen) mit Leukocyten assoziieren und endocytiert werden (Silverblatt et al., 1979; Silverblatt und Ofek, 1983). Die Aufnahme der Bakterien in die Zellen zeigte sich abhängig von der Expression der Fimbrien und war in Gegenwart einer 0,1 M α -D-Mannoselösung deutlich zu reduzieren. Aus diesen und anderen Befunden wurde die Hypothese der Lectinophagocytose entwickelt (s.o.).

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß isolierte Typ-1-Fimbrien mit der Plasmamembran der Granulocyten assoziieren, und daß Typ-1-Fimbrien durch Invaginationen der Zellmembran in intrazelluläre Vakuolen aufgenommen werden. Die Aufnahme der Fimbrien durch Invagination der Zellmembran in intrazelluläre Vakuolen konnte bereits nach 10 min. Inkubation der Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien beobachtet werden. Mit fortschreitender Inkubation veränderte sich die Zellform; die Zellen entwickelten zunehmend Pseudopodien, was zu einer Streckung der Zellen führte. Es konnte auch die Bildung von Zellaggregaten

beobachtet werden, wie sie im Zusammenhang mit Phagozytoseprozessen beschrieben wurde (Henricks et al., 1984).

1.4 Typ-1-Fimbrien und CEACAM1 kolokalisieren während des Phagozytoseprozesses

Unter identischen experimentellen Bedingungen wie für die Elektronenmikroskopie wurden neutrophile Granulozyten mit Typ-1-Fimbrien inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CEACAM1 und die Lokalisierung der Typ-1-Fimbrien in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht.

Die Internalisierung der Typ-1-Fimbrien sowie das Lokalisierungsmuster von CEACAM1 wurde über einen Zeitraum von 40 min. verfolgt. Zu Beginn der Beobachtungen, nach 1 min. Inkubation der Zellen mit Typ-1-Fimbrien, konnte zunächst nur CEACAM1 auf den Granulozyten detektiert werden; besonders auffällig war die starke Expression von CEACAM1 an den Zellpolen sowie in Bereichen der Plasmamembran. Nach 5 min. Inkubation konnte eine starke Bindung der Typ-1-Fimbrien an die Zellen detektiert werden; eine eindeutige Zuordnung zu definierten Arealen in den Zellen war jedoch nicht möglich. Eine Kolokalisation konnte nur im Phasenkontrast an Kontaktzonen zwischen einzelnen Zellen nachgewiesen werden.

Die erste Kolokalisierung beider Antigene konnte nach 10 min. detektiert werden, und zwar in den Bereichen der Zellpole und der Zellmembran; dieses waren Bereiche, in denen in der Einzelfärbung auch eine starke Expression von CEACAM1 gefunden wurde. Typ-1-Fimbrien in den Zellen waren hier nur an den Zellkappen nachzuweisen. Nach 20 min. war eine deutliche Zunahme der Kolokalisierung beider Antigene, vor allem im Bereich der Membran, zu beobachten. Zusätzlich waren einige Zellaggregate zu erkennen. Dieses entspricht im Wesentlichen auch dem Befund nach 30 und 40 min. Inkubation der Granulozyten mit den Typ-1-Fimbrien. Auffällig war die Heterogenität der Kolokalisierungsphänomene in der Population.

In Verbindung mit den in der Durchflußcytometrie erhaltenen Daten, in denen die CEACAM1-Expression nach Inkubation neutrophiler Granulocyten mit Typ-1-Fimbrien untersucht wurde, ist es interessant, daß die Oberflächenexpression von CEACAM1 nach 20 min. langsam absinkt und nach 40 min. ein Minimum erreicht hat. In diesem Zeitintervall ist auch die Kolokalisierung beider Antigene in der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie am intensivsten.

Zusammenfassend lassen sich die erhaltenen Befunde so interpretieren, daß es möglicherweise zwei verschiedene Phagozytoseprozesse für Typ-1-Fimbrien durch Granulocyten gibt, an der unterschiedliche Rezeptoren beteiligt sein können. Weiterhin läßt sich schlußfolgern, daß es mindestens zwei verschiedene Rezeptoren für Typ-1-Fimbrien auf Granulocyten gibt, denn Zellen, die sich sowohl durch den Nachweis von Typ-1-Fimbrien als auch CEACAM1 anfärben lassen, zeigen nicht immer Kolokalisierungsphänomene für beide Antigene. Die Kolokalisierung ist auf eine Subpopulation der Zellen begrenzt.

2 Experimentelles Modell zur Metastasierung humaner Tumoren in *scid*-Mäusen

In einem *scid*-Maus-Modell wurde die Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase, die an der Synthese von Sialyl-Lewis^x-Epitopen beteiligt ist, nach Transplantation der humanen Colocarzinom-Zelllinien HT29 und HT29mdr verglichen. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob CEACAM1, das Sialyl-Lewis^x-Gruppen trägt, in Tumoren der metastasierenden Zelllinie HT29 ein anderes Expressionsmuster aufweist als die nicht metastasierende Zelllinie HT29mdr. Ferner war zu untersuchen, ob CEACAM1 ein mögliches Substrat für die α -2,3-Sialyltransferase ist, d.h. daß die Expression von CEACAM1 mit der Expression der α -2,3-Sialyltransferase korreliert.

In den immunhistochemischen Experimenten konnte in den metastasierenden entdifferenzierten HT29-Tumoren eine diffuse Expression von CEACAM1 nachgewiesen werden. In diesen Tumoren gab es eine diffuse Expression von

CEACAM1 sowie Areale, in denen keine Reaktion mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 zu detektieren war. Im Gegensatz dazu konnte in den höher differenzierten HT29mdr-Tumoren, deren Gewebestruktur der eines Darmepithels ähnelt, eine prominente apikale Färbung in tubulären Strukturen nachgewiesen werden. Im humanen Colon stellt sich die Expression von CEACAM1 vergleichbar dar (Prall et al., 1996; Frängsmyr et al., 1995). Die Expression von CEACAM1 war in den metastasierenden HT29-Tumoren quantitativ höher als in den nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren. In Lungenmetastasen der HT29-Tumoren war das Bindungsmuster des anti-CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 mit dem in den Primärtumoren identisch.

Die Expression von Sialyl-Lewis^x-Epitopen wurde mit dem anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper 2H5 untersucht. Die Bindung des Antikörpers war in den metastasierenden Tumoren intensiver als in den differenzierten, nichtmetastasierenden Tumoren. In den HT29-Tumoren war wie für CEACAM1 eine diffuse Farbreaktion erkennbar; Mucusproduzierende Zellen ließen sich mit dem anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper vollständig anfärben. Zellen mit einem ähnlichen Färbemuster waren in den HT29mdr-Tumoren nicht nachzuweisen. In den HT29-Tumoren waren ferner zahlreiche intrazelluläre Granulae positiv für Sialyl-Lewis^x-Epitope. Diese Sialyl-Lewis^x-Epitope enthaltenden Granulae waren ebenfalls in den HT29mdr-Tumoren zu detektieren, jedoch in einem deutlich geringeren Umfang. Die Verteilung der Expression der Sialyl-Lewis^x-Epitope in den Lungenmetastasen entsprach dem Bild, das in den Primärtumoren erhalten wurde.

In beiden Tumorspezies und in den Lungenmetastasen der HT29-Tumoren konnte in der seriellen Doppelfärbung eine Kolokalisierung von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen dargestellt werden. In den nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren war die Koexpression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-sehr deutlich an der apikalen Seite der Lumina zu detektieren. Isolierte Sialyl-Lewis^x-Epitope traten nur schwach im Cytoplasma vereinzelter Zellen auf. In den metastasierenden HT29-Tumoren und den Lungenmetastasen war in der Doppelfärbung die gleiche diffuse Reaktion erkennbar, die auch in den Einzelfärbungen aufgetreten war. Im Gegensatz zu den HT29mdr-

Tumoren sind deutliche intrazelluläre Farbreaktionen durch den anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper nachweisbar.

Die Analyse der Expression der α -2,3-Sialyltransferase und CEACAM1 auf mRNA-Ebene führte zu dem Ergebnis, daß die α -2,3-Sialyltransferase im Vergleich zu den Zelllinien HT29 und HT29mdr in den Tumoren über ein niedrigeres Expressionsniveau verfügt. In den untersuchten Spezies war jeweils eine Bande zu detektieren, die einer Messenger-Größe von ca. 2,0 kb entsprach, wie sie in der Literatur beschrieben ist (Sasaki et al., 1994). Die Intensität des Signals ist in den HT29mdr-Tumoren geringer als in den HT29-Tumoren. Dieses korreliert mit den aus der Immunhistochemie erhaltenen Daten, in denen die Sialyl-Lewis^x-Expression in den HT29-Tumoren stärker ist als in den HT29mdr-Tumoren. Für CEACAM1 ergab sich in der HT29-Zelllinie eine höhere Expression als in den abgeleiteten Tumoren; in den HT29mdr-Zellen war dagegen nur ein sehr schwaches Signal zu detektieren. In den HT29mdr-Tumoren war die Intensität der Signale für den CEACAM1-Messenger geringer als in den metastasierenden HT29-Tumoren. Die Signale entsprachen mit einer relativen Messenger-Größe von 3,9 kb dem Haupttranskript des CEACAM1-Gens (Barnett et al., 1989). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen aus den immunhistochemischen Untersuchungen, in denen in den metastasierenden HT29-Tumoren eine stärkere Expression von CEACAM1 als in den nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren nachzuweisen war.

In den Western Blots, in denen die Proteinextrakte der HT29- und HT29mdr-Tumoren untersucht wurden, konnten mit dem anti-CEACAM1-Antikörper 4D1/C2 und anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörpern stärkere Signale in den HT29-Tumoren erhalten werden als in den HT29mdr-Tumoren.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Befunden ableiten, daß CEACAM1 in den metastasierenden Tumoren im Vergleich zu den HT29-Zelllinien auf mRNA-Ebene herunterreguliert ist. Dieses ist vergleichbar mit den Daten, die für humane Coloncancerome erhalten wurden (Neumaier et al., 1993). Dagegen kommt es bei den nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren im Vergleich zu den HT29mdr-Zelllinien zu einer Heraufregulation der CEACAM1-Expression. Die Intensität des Signals ist in

den differenzierten HT29mdr-Tumoren, die ein distinktes Färbemuster für CEACAM1 in der Immunhistochemie gezeigt haben, niedriger als in den entdifferenzierten HT29-Tumoren. Die Expression der α -2,3-Sialyltransferase ist in allen Tumorspezies im Vergleich zu den Zelllinien herabreguliert. Auf Proteinebene konnte eine stärkere Expression von CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitopen für die metastasierenden HT29-Tumoren gefunden werden als für die nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren.

Aufgrund der Kolo-kalisierung in der Immunhistochemie könnte CEACAM1 als ein Substrat für die α -2,3-Sialyltransferase in Frage kommen. Ferner korrelieren die quantitativen Verhältnisse der Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase bzw. den Sialyl-Lewis^x-Epitopen in den HT29- und HT29mdr-Tumoren in allen Untersuchungen. Um letztendlich klären zu können, ob CEACAM1 ein Träger von Sialyl-Lewis^x-Epitopen in HT29- und HT29mdr-Tumoren ist, müssen die Proteinrohextrakte der Tumorspezies über Affinitätschromatographie mit einem CEACAM1-spezifischen Antikörper aufgereinigt werden. Weiterhin wäre zu untersuchen, ob andere Enzyme, die an der Synthese von Sialyl-Lewis^x-Determinanten beteiligt sind, z.B. andere Isoformen der α -2,3-Sialyltransferase oder Fucosyltransferasen, eine Dysregulation in experimentellen Tumormetastasierungsmodellen zeigen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen CEACAM1-Expression und der Metastasierung von HT29-Tumoren kann aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden.

3 CEACAM1 stimuliert die Chemotaxe humaner Endothelzellen

Aus Granulocyten isoliertes CEACAM1 wurde in Chemotaxe-Experimenten mit humanen Endothelzellen eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß CEACAM1 in konzentrationsabhängiger Weise zur Stimulation der Migration der Endothelzellen führt, in gleichem Maße wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), einem potenten Induktor der Angiogenese (Veikkola und Alitalo, 1999). Bei

Verwendung des anti-CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 und des anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörpers 2H5 konnte die Migration der Zellen auf ein Niveau reduziert werden, das dem der Negativkontrolle entsprach, in der nur Zellkulturmedium als „Stimulans“ zugegeben wurde. Das läßt den Rückschluß zu, daß die durch CEACAM1 präsentierten Sialyl-Lewis^x Epitope einen Beitrag zu der chemotaktischen Wirkung von CEACAM1 leisten. Die Ursache für die inhibitorische Wirkung des anti-CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 kann einerseits darin liegen, daß der Antikörper zum Teil für CEACAM1 spezifische Kohlenhydratstrukturen erkennt. Dieses würde den Ergebnissen der Deglycosylierungsexperimente entsprechen, in denen 4D1/C2 auch unvollständig verdaute Formen von CEACAM1 erkennt, dagegen aber schwach mit der vollständig deglycosylierten Form reagiert. Im Gegensatz dazu reagiert T84.1, der an die N-terminale Domäne der Moleküle des CD66 Clusters bindet, ausschließlich mit der vollständig verdauten Form und der intakten Form von CEACAM1. Daher könnte CEACAM1 an zwei verschiedene Rezeptoren auf Endothelzellen binden, nämlich an E-Selectin über die Sialyl-Lewis^x- oder Lewis^x-Determinanten und an einen unbekanntem Rezeptor, der mit dem Proteinanteil von CEACAM1 interagiert.

Wurden steigende Konzentrationen CEACAM1 mit jeweils konstanten Konzentrationen von 4D1/C2 oder 2H5 inkubiert, kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung des migrativen Verhaltens der Zellen. Diese Inhibition konnte durch Zugabe steigender Konzentrationen von CEACAM1 revertiert werden. Diese Befunde unterstreichen die funktionelle Bedeutung der Sialyl-Lewis^x-Epitope, die durch CEACAM1 präsentiert werden.

Um die Korrelation zwischen der Induktion der Angiogenese und CEACAM1 darzustellen, wurden die aus Endothelzellüberständen gewonnenen Formen im Western Blot untersucht. Für die Chemotaxe-Assays stand zu Beginn der Experimente nur CEACAM1 in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung, das aus Granulocyten aufgereinigt worden war. Nach Aufreinigung von Endothelzellüberständen durch T84.1 Affinitätschromatographie konnten zwei Isoformen von CEACAM1 durch den mAb 4D1/C2 identifiziert werden, mit relativen Molekulargewichten von 120 kD bzw. 50 kD, von denen die 50 kD-Form starke Reaktivität mit dem anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper 2H5 zeigte. Daß beide Formen von

Endothelzellen sezerniert werden, erinnert an die Sekretion von VEGF durch Tumorzellen, die dann parakrin an die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 im benachbarten vaskulären Endothel binden (Ferrara et al., 1992; Ferrara et al., 1993; Morishita et al., 1995). Im Fall der sialylierten Form könnte diese an E-Selectin auf Endothelien im angrenzenden Gewebe adhären und so die Proliferation der Endothelzellen stimulieren. Für CEACAM1 aus humanen Granulocyten konnte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion mit rekombinantem E-Selectin *in vitro* durch Immunpräzipitation gezeigt werden. Die erhaltenen Daten können auf folgende *in vivo*-Situationen übertragen werden:

In entzündeten Geweben kommt es zur verstärkten Expression von E-Selectin auf Endothelzellen. Dieses erleichtert die Adhäsion neutrophiler Granulocyten über den E-Selectin-Liganden CEACAM1 an das aktivierte Endothel und die anschließende Migration der Zellen durch die Gefäßwand, die durch einen chemotaktischen Gradienten und die Expression von Adhäsionsmolekülen und ihren Rezeptoren gesteuert wird. CEACAM1 könnte in diesem Zusammenhang nicht nur zur Adhäsion der Zellen an das Endothel beitragen, sondern auch ihre Motilität beeinflussen. Vergleichbare Zelladhäsions- und Zellwanderungs-Ereignisse sind auch an der Angiogenese beteiligt, wie sie im Verlauf von Entzündungsprozessen und der Etablierung primärer Tumoren und Metastasen auftritt. In Hinsicht auf die Bedeutung von CEACAM1 bei der Gefäßneubildung ist interessant, daß CEACAM1 in Gefäßen humaner Tumoren exprimiert wird, jedoch nicht in größeren etablierten Gefäßen in gesunden Geweben (Prall et al., 1996). Da eine von Endothelzellen sezernierte Form von CEACAM1 Sialyl-Lewis^x-Epitope exprimiert, ist eine Interaktion mit E-Selectin auf angrenzenden Endothelien möglich, wodurch proliferative Signale an Endothelzellen übertragen werden können. Es konnte gezeigt werden, daß Sialyl-Lewis^x-Epitope direkt an Kapillarbildungsprozessen beteiligt sind und daß diese durch Applikation von Sialyl-Lewis^x-Analoga unterbunden werden können (Nguyen et al., 1993; Ogawa et al., 1994). Da über die Signaltransduktion von E-Selectin selbst wenig bekannt ist, bleibt unklar, welche zellulären Mechanismen der proliferativen Wirkung von E-Selectin-Liganden, z.B. CEACAM1, zugrunde liegen.

Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die auf dem humanen Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 exprimierten Glycane zu charakterisieren und anschließend ihre biologische Funktion näher zu definieren.

Durch Immunoblotting und Lectinaffinitätschromatographie wurden High-Mannose-Epitope, Lactosaminoglycane sowie Lewis^x und sialyl Lewis^x-Epitope auf CEACAM1 aus humanen Granulocyten identifiziert.

Auf intakten neutrophilen Granulocyten und in Western Blot Analysen konnte CEACAM1 als Rezeptor für Mannose-sensitive Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* identifiziert werden. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen in der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie wurde gezeigt, daß Typ-1-Fimbrien durch vitale Granulocyten internalisiert werden. Ferner wurde die Mannose-sensitive Adhäsion von Typ-1-Fimbrien durch monovalente α -Mannoside und trivalente Clustermannoside in konzentrationsabhängiger Weise spezifisch inhibiert. Die synthetischen trivalenten Clustermannoside zeigten eine mehr als tausendfach höhere inhibitorische Potenz als die getesteten monovalenten Glycoside und der Standardinhibitor Methyl- α -D-Mannosid.

Durch Untersuchungen in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie konnte durch die Kolokalisation von CEACAM1 mit Typ-1-Fimbrien aus *E. coli* gezeigt werden, daß CEACAM1 ein Rezeptor für Typ-1-Fimbrien ist.

In einem experimentellen Tumormetastasierungsmodell wurde die Expression von CEACAM1 und der α -2,3-Sialyltransferase bzw. Sialyl-Lewis^x-Epitopen in der metastasierenden humanen Colocarcinomzelllinie HT29 und der nichtmetastasierenden Zelllinie HT29mdr und den hiervon abgeleiteten Tumoren in *scid*-Mäusen untersucht. Für CEACAM1 und Sialyl-Lewis^x-Epitope bzw. der α -2,3-Sialyltransferase konnte in immunhistochemischen, molekularbiologischen und proteinchemischen Untersuchungen eine höhere Expression in den metastasierenden HT29-Tumoren im Vergleich zu den nichtmetastasierenden HT29mdr-Tumoren

gefunden werden. Direkte Hinweise darauf, daß CEACAM1 als Träger von Sialyl-Lewis^x-Epitopen bei dem Metastasierungsprozeß eine Rolle spielt, müssen durch zukünftige Untersuchungen belegt werden.

CEACAM1 aus Granulocyten konnte durch Immunpräzipitation als Ligand für E-Selectin identifiziert werden. In Migrationsexperimenten mit humanen Endothelzellen zeigte CEACAM1, das aus neutrophilen Granulocyten aufgereinigt worden war, chemotaktische Eigenschaften, die mit denen des vaskulären Wachstumsfaktors (VEGF) vergleichbar waren. Die Migration der Endothelzellen konnte signifikant durch den Einsatz monoklonaler anti-CEACAM1- oder anti-Sialyl-Lewis^x-Antikörper gehemmt werden. Im Endothel werden zwei lösliche Formen von CEACAM1 synthetisiert, die aus Zellkulturüberständen durch Affinitätschromatographie über den anti-CEACAM1-Antikörper T84.1 isoliert wurden. Die kleinere der Isoformen, die über ein Molekulargewicht von ca. 50 kD verfügt, exprimiert Sialyl-Lewis^x-Epitope. Dieses impliziert, daß CEACAM1 nicht nur an der Adhäsion neutrophiler Granulocyten an E-Selectin auf aktivierten Endothelzellen, sondern auch an Zellwanderung und Zelladhäsion in frühen Stadien der Angiogenese beteiligt ist.

Summary

In this thesis, glycans of the cellular adhesion molecule CEACAM1 were to be defined and their biological function was to be elucidated.

Amongst the glycostructures displayed on CEACAM1 isolated from human neutrophilic granulocytes, high-mannose, lactosaminoglycans, Lewis^x and sialyl Lewis^x antigens were defined in immunoblotting and lectin affinity chromatography procedures.

On vital neutrophilic granulocytes and in Western blot analysis, CEACAM1 proved to be a cellular receptor for mannose-sensitive type 1 fimbriae from *E. coli*. In electron microscopy and confocal laser-scanning microscopy, type 1 fimbriae were shown to be subjected to phagocytosis. Furthermore, mannose-sensitive adhesion of fimbriae to neutrophilic granulocytes was inhibited specifically by monovalent and trivalent α -mannosides in a concentration dependent manner. Synthetic trivalent cluster mannosides exhibited an inhibitory potency which exceeded that of monovalent glycosides and the reference inhibitor methyl α -D mannoside by a factor greater than 1000.

In an experimental model, the metastasising potential of the human colonic carcinoma cell lines HT29 and HT29mdr was investigated. In solid tumours established in *scid* mice, expression of CEACAM1, α -2,3-sialyltransferase and sialyl Lewis^x epitopes was analysed by immunohistochemical, molecular biological and biochemical procedures. In general, CEACAM1-expression and the expression of α -2,3-sialyltransferase or sialyl Lewis^x epitopes, respectively, was shown to be up-regulated in metastasising HT29-tumours in comparison to the non-metastasising HT29mdr-tumours. Direct evidence for CEACAM1 as a carrier of sialyl Lewis^x epitopes in metastasising tumours and a resulting positive correlation with their metastasising potential will need further investigation.

CEACAM1 isolated from neutrophilic granulocytes proved to be a ligand for E-selectin. In migration experiments using human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC), CEACAM1 exhibited chemotactic qualities that were comparable to those of VEGF (vascular endothelial growth factor). Migration of endothelial cells could be inhibited significantly by monoclonal antibodies directed against CEACAM1 or sialyl Lewis^x epitopes, respectively. From the culture medium of endothelial cells, two soluble forms of CEACAM1 were isolated by affinity chromatography using immobilised anti-CEACAM1 antibody T84.1. The smaller of the two forms, a 50 kD glycoprotein, showed strong reactivity with anti-sialyl Lewis^x antibody. These results indicate that CEACAM1 may not only promote adhesion of neutrophilic granulocytes to E-selectin on activated endothelia but may also induce endothelial cell migration in early stages of angiogenesis.

Literatur

Abraham, S. N., Babu, J.P., Giampapa, C.S., Hasty, D.L., Simpson, W.A., Beachey, E.H. (1985). Protection against *E. coli*-induced urinary tract infections with hybridoma antibodies directed against type I fimbriae or complementary D-mannose receptors. *Infect. Immun.* *48*, 625-628.

Abraham, S. N., Goguen, J.D., Sun, D., Klemm, P., Beachey, E.H. (1987). Identification of two ancillary subunits of *E. coli* type 1 fimbriae by using antibodies against synthetic oligopeptides of fim gene products. *J. Bacteriol.* *169*, 5530-5536.

Abraham, S. N., Sun, D., Dale, J.B., Beachey, E.H. (1988). Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type I fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature* *336*, 682-684.

Araki, M., Araki, K., Biancone, L., Stamenkovic, I., Izui, S., Yamamura, K., Vassalli, P. (1997). The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo. *Leukemia* *11*, 209-212.

Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Kobata, A. (1991). Structural study of the surface chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry* *30*, 1561-1571.

Aslam, M., Dent, A. (1998). Bioconjugation - Protein coupling techniques for the biomedical sciences. Macmillan Reference Ltd., London, Basingstoke, UK.

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

Bazzoni, G., Dejana, E., Lampugni, M.G. (1999). Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr. Op. Cell Biol.* *11*, 573-581.

Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E., Veillette, A. (1997). Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* *14*, 783-790.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarsröm, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.-H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Öbrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A. (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* *252*, 243-249.

-
- Benekli, M., Güllü, I.H., Tekuzman, G., Savas, M.C., Hyaran, M., Hascelik, G., Firat, D. (1998). Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin levels in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 78, 267-271.
- Bischoff, J. (1997). Cell adhesion and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 373-376.
- Bloch, C. A., Orndorff, P.E. (1990). Impaired colonization and full invasiveness of *Escherichia coli* K1 bearing a site-directed mutation in the type 1 pilin gene. *Infect. Immun.* 58, 275-278.
- Bloch, C. A., Stocker, B.A., Orndorff, P.E. (1992). A keyrole for type 1 pili in enterobacterial communicability. *Mol. Microbiol.* 6, 697-701.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, E. J. (1997). Adhesive interactions in the immune system. *Trends Cell Biol.* 7, 289-295.
- Brümmer, J., Neumaier, M., Göpfert, C., Wagener, C. (1995). Association of pp60src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11, 1649-1655
- Bøyum, A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97, 31-50.
- Carlos, T. M., Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.
- Chien, A., Egar, D.B., Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127, 1550-1557.
- Crocker, P. R., Feizi, T (1996). Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr. Op. Struct. Biol.* 6, 679-691.
- Daneker, G. W., Lund, S.A., caughtman, S.W., Staley, C.A., Wood, W.C. (1996). Anti-metastatic protacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression. *Clin Exp. Metastasis* 14, 230-238.
- Da Silva-Azevedo, L., Reutter, W. (1999). The long isoform of the cell adhesion molecule C-CAM binds to actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 404-408.
-

- Daneker, G. W., Lund, S.A., Caughman, S.W., Staley, C.A., Wood, W.C. (1996). Anti-metastatic prostacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 230-238.
- Drickamer, K. (1995). Increasing diversity of animal lectin structures. *Curr. Op. Struct. Biol.* 5, 612-616.
- Drickamer, K., Taylor, M. E. (1993). Biology of animal lectins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 237-264.
- Drzeniek, Z., Lamerz, R., Fenger, U., Wagener, C., Haubeck, H.-D. (1991). Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett.* 56, 173-179.
- Edlund, M., Blikstad, I., Öbrink, B. (1996). Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J. Biol. Chem.* 271, 1393-1399.
- Edlund, M., Öbrink, B. (1993). Evidence for calmodulin binding to the cytoplasmic domains of two C-CAM forms. *FEBS Lett.* 327, 90-94.
- Englard, S., Seiffer, S. (1990). Precipitation techniques. *Meth. Enzymol.* 182, 285-300.
- Ergün, S., Kilic, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurmbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C. (2000). Human carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule (CEACAM1): An effective angiogenic factor. *Mol. Cell, in press*
- Ey, P. L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15, 429-436.
- Farmer, R. W., Richtsmeier, W.J., Scher, R.L. (1998). Identification of sialyl Lewis^x in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 20, 726-731.
- Feizi, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314, 53-57.
- Ferrara, N., Houk, K., Jakeman, L., Leung, D.W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth family of proteins. *Endocr. Rev.* 13, 18-32.
- Ferrara, N., Winer, J., Burton, Rowland, A., Siegel, M., Phillips, H.S., Terrell, T. Keller, Levinson, A.D. (1993). Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. *J. Clin. Invest.* 91, 160-170.

- Firon, N., Ashkenazi, S., Mirelman, D., Ofek, I., Sharon, N. (1987). Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type I fimbriated *E.coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 55, 472-476.
- Firon, N., Ofek, I., Sharon, N. (1982). Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1426-1432.
- Flemming, J. O., Pen, L.B. (1988). Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 110, 11-18.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-31.
- Folkman, J., D'Amore, P.A. (1996). Blood vessel formation: What is the molecular basis? *Cell* 87, 1153-1155.
- Frängsmyr, L., Baranov, V., Prall, F., Yeung, M.M.-W., Wagener, C., Hammarström, S. (1995). Cell- and region-specific expression of BGP and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Research* 55, 2963-2967.
- Fukuoka, K., Narita, N., Saijo, N. (1998). Increased expression of sialyl Lewis^x antigen is associated with distant metastasis in lung cancer patients: immunohistochemical study on bronchofibrosopic biopsy specimens. *Lung Cancer* 20, 109-116.
- Gabius, H.-J., Kayser, K., Gabius, S. (1995). Protein-Zucker-Erkennung. *Naturwissenschaften* 82, 533-543.
- Gbarah, A., Ghamberg, C.G., Ofek, I., Jacobi, U., Sharon, N. (1991). Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptors for type I fimbriated (mannose-specific) *E. coli*. *Infect. Immun.* 59, 4524-4530.
- Göbel, U., Burdach, S., Grunert, F. (1994). Expression of the CEA gene family members NCA50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* 8, 2127-2133.
- Gorski, A. (1994). The role of cell adhesion molecules in immunopathology. *Immunol. Today* 6, 251-255.
- Hacker, J. (1990). Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151, 1-27.
- Hallahan, D. E., Kuchibhotla, J., Wyble, C. (1997). Sialyl Lewis^x mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells. *Radiation Res.* 147, 41-47.

- Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem. Canc. Biol.* 9, 67-81.
- Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during angiogenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanenberg, H., Baumann, M., Quentin, I., Nagel, G., Grosse-Wilde, H., von Kleist, S., Göbel, U., Burdach, S., Grunert, F. (1994). Expression of the CEA gene family members NCA50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* 8, 2127-2133.
- Harlow, E., Lan, D. (1988). *Antibodies- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 424.
- Hasegawa, A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J., Brandley, B.K. (1991). Structural requirements for the carbohydrate ligand for E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10372-10376.
- Haselbeck, A., Schickaneder, E., von der Eltz, H., Hösel, W. (1990). Structural characterization of glycoprotein carbohydrate chains by using digoxigenin-labeled lectins on blots. *Anal. Biochem.* 191, 25-30.
- Henricks, P. A. J., van der Tol, M.E., Verhoef, J. (1984). Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis of bacteria. *Immunology* 52, 671-686.
- Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S.A., Drzeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L.J.F., Shively, J.E., Paxton, R.J. (1989). Corrections: Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: Primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with CEA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1668.
- Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S.A., Drzeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L.J.F., Shively, J.E., Paxton, R.J. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: Primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with CEA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6959-6963.
- Hjelm, H., Hjelm, K., Sjoquist, J. (1972). Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lts.* 28, 73-76.
- Hobson, B. D., J. (1984). Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labelling studies. *Br. J. Cancer* 49, 405-413.
- Horwitz, A. F., Hunter, T. (1996). Cell adhesion: integrating circuitry. *Trends Cell Biol.* 6, 460-461.

-
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., Beauchemin, N. (1999). The carboxy-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 335-344.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 68, 11-25.
- Ikeda, Y., Mori, M., Kajiyama, K., Haraguchi, Y., Sasaki, O., Sugimachi, K. (1996). Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis^x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* 62, 171-176.
- Imhof, B. A., Dunon, D. (1997). Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm. Metab. Res.* 29, 614-621.
- Izumi, Y., Taniuchi, Y., Tsuji, T., Smith, C.W., Nakamori, S., Fidler, I.J., Irimura, T. (1995). Characterization of human colon carcinoma variant cells selected for sialyl Lex carbohydrate antigen: liver colonization and adhesion to vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 216, 215-221.
- Jorgensen, T., Kanagasingham, Y., Kaalhus, O., Tveter, K.J., Bryne, M., Skjorten, F., Berner, A., Danielsen, H.E. (1997). Prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer: experience from the Scandinavian Prostatic Cancer Group Study-2. *J. Urol.* 158, 164-170.
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B., Luo, J.S., von Kleist, S. (1998). Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28, 3664-3674.
- Kannagi, R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate J.* 14, 577-584.
- Khatib, A. M., Kontogiannia, M., Fallavollita, L., Jamison, B., Meterissian, S., Brodt, P. (1999). Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 59, 1356-1361.
- Kieburg, C., Lindhorst, T. K. (1997). Glycodendrimer synthesis without using protective groups. *Tetrahedron Lett.* 38, 3885-3888.
- Kim, Y. J., Borsig, L., Han, H.-L., Varki, N.M., Varki, A. (1999). Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes and endothelium. *Am. J. Pathol.* 155, 461-472.

-
- Klemm, P. (1984). The *fimA* gene encoding the type I fimbrial subunit of *E.coli*. *Eur. J. Biochemistry* 143, 395-399.
- Klemm, P. (1994). Fimbriae-adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines, 1st Edition, P. Klemm, ed., Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press.
- Klemm, P., Jorgensen, B.J., van Die, I., de Ree, H., Bergmans, H. (1985). The *fim* genes responsible for synthesis of type I fimbriae in *E. coli*, cloning and genetic organization. *Mol. Gen. Genetics* 199, 410-414.
- Köhler, G., Milstein., C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kötter, S., Krallmann-Wenzel, U., Ehlers, S., Lindhorst, T.K. (1998). Multivalent ligands for the mannose-specific lectin on type I fimbriae of *E. coli*: syntheses and testing of trivalent α -D-mannoside clusters. *J. Chem. Soc. Perk. Trans.1*, 2193-2200.
- Krogfelt, K. A., Bergmans, H., Klemm, P. (1990). Direct evidence that the *fimH* protein is the mannose-specific adhesin of *E. coli* type I fimbriae. *Infect. Immun.* 58, 1995-1998.
- Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L.J.W., NAgel, G., van der Schoot, C.E., Grunert, F., Roos, D. (1992). CD66 Nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J. Cell Biology* 118, 457-466.
- Lämml, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J.S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C.H., Hultgren, S. (1997). Prevention of mucosal *E.coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 276, 607-611.
- Lasky, L. A. (1992). Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258, 964-969.
- Lee, Y. C. (1978). Synthesis of some cluster glycosides suitable for attachment to proteins or solid matrices. *Carbohydrate Res.* 67, 509-514.
- Lee, Y. C. (1993). Sweet and shapely: Ligands for animal lectins. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 460-464.
- Lee, Y. C., Lee. R.T. (1995). Carbohydrate-protein-interactions: Basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 28, 321-327.
- Lindhorst, T. K. (1996). Glycodendrimere. *Nachr.Chem.Tech.Lab.* 44, 1073-1079.

- Lindhorst, T. K., Kieburg, C., Krallmann-Wenzel, U. (1998). Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *E. coli* to erythrocytes by multiantennary α -mannosyl clusters: The effect of multivalency. *Glycoconjugate J.* 15, 605-613.
- Lindhorst, T. K., Kötter, S., Kubisch, J., Krallmann-Wenzel, U., Ehlers, S., Kren, V. (1998). Effect of p-substitution of aryl- α -D-mannosides on inhibiting mannose-sensitive adhesion of *E. coli* - Syntheses and testing. *Eur. J. Org. Chem.*, 1669-1674.
- Lowe, J. B. (1997). Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. *Kidney Int.* 51, 1418-1426.
- Macy, E., Kemeny, M., Saxon, A. (1988). Enhanced ELISA: how to measure less than 10 picograms of a specific protein (immunoglobulin) in less than eight hours. *FASEB J.* 2, 3003-3009.
- Mahrenholtz, A. M., Yeh, C.H., Shively, J.E., Hefta, S.A. (1993). Microsequence and mass spectral analysis of nonspecific cross-reacting antigen 160, a CD15-positive neutrophil membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 13015-13018.
- Martin-Satue, M., de Castellarnau, C., Blanco, J. (1999). Overexpression of alpha (1,3)fucosyltransferase VII is sufficient for the acquisition of lung colonization phenotype in human lung adenocarcinoma HAL-24Luc cells. *Br. J. Cancer* 80, 1169-1174.
- Martin-Satue, M., Marrugat, R., Cancelas, J.A., Blanco, J. (1998). Enhanced expression of alpha(1,3)-fucosyltransferase genes correlates with E-Selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Canc. Res.* 58, 1544-1550.
- Matsushita, Y., Kitajima, S., Goto, M., Tezuka, Y., Sagara, M., Imamura, H., Tanabe, G., Tanaka, S., Aikou, T. Sato, E. (1998). Selectins induced by interleukin-1 β on the human liver endothelial cells act as ligands for sialyl Lewis^x-expressing human colon cancer cell metastasis. *Cancer Lett* 133, 151-160.
- Matsuura, N., Narita, T., Mitsuoka, C., Kimura, N., Kannagi, R., Imai, T., Funahashi, H., Takagi, H. (1997). Increased concentration of soluble E-selectin in the sera of breast cancer patients. *Anticancer Res.* 17, 1367-1372.
- McEver, R. P. (1994). Selectins. *Curr. Op. Struct. Biol.* 6, 75-84.
- McEver, R. P., Moore, K.L., Cummings, R.D. (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* 270, 11025-11028.
- Meyer, T., Hart, I.R. (1998). Mechanisms of tumour metastasis. *Eur. J. Cancer* 34, 214-221.

- Mitchell, B. S., Brooks, S.A., Leathem, A.J.C., Schumacher, U. (1998). Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? *Cancer Ltt.* 123, 113-119.
- Mitchell, B. S., Horny, H.-P., Adam, E., Schumacher, U. (1997). Immunophenotype of human HT29 colon cancer cell metastases in the lungs of *scid* mice: Spontaneous versus artificial metastases. *Inv. Metastasis* 17, 75-81.
- Morishita, K., Johnson, D.E., Williams, L.T. (1995). A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor(flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 270, 27948-27953.
- Mullis, K. B., Falcoona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.
- Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishihawa, O., Sasaki, Y., Izumi, Y., Irimura, T. (1997). Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis (x) in colorectal cancer metastasis. *Dis. Colon Rectum* 40, 420-431.
- Nakashio, T., Narita, T. Sato, M., Akiyama, S., Kasai, Y., Fujiwara, M., Ito, K., Takagi, H., Kannagi, R. (1997). The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res.* 17, 293-299.
- Nelson, R. M., Venot, A., Bevilacqua, M.P., Linhardt, R.J., Stamenkovic, I. (1995). Carbohydrate-protein interactions in vascular biology. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11, 601-631.
- Neumaier, M., Fenger, U., Wagener, C. (1985). Monoclonal antibodies for CEA as a model system: Identification of two novel CEA-related antigens in meconium and colorectal carcinoma tissue by western blot and differential immunoaffinity chromatography. *J. Immunol.* 135, 3604-3609.
- Neumaier, M., Paulutat, S., Chan, A., Mattaes, P., Wagener, C. (1993). BGP, a potential human adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10744-10748.
- Nguyen, M., Eilber, F.R., Defrees, S. (1996). Novel synthetic analogs of sialyl Lewis^x can inhibit angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 228, 716-723.
- Nguyen, M., Strubel, N.A., Bischoff, J. (1993). A role for sialyl Lewis - X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* 365, 267-269.
- Öbrink, B. (1997). CEA-adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Op. Cell Biol.* 9, 616-626.

- Ofek, I., Courtney, H.S., Schifferli, D.M., Beachey, E.H. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay for adherence of bacteria to animal cells. *J. Clin. Microbiol.* *24*, 512-516.
- Ofek, I., Sharon, N. (1988). Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* *56*, 539-547.
- Ogawa, J. I., Inoue, H., Koide, S. (1997). alpha-2,3-Sialyltransferase type 3N and alpha-1,3-fucosyltransferase type VII are related to sialyl Lewis(x) synthesis and patient survival from lung carcinoma. *Cancer* *79*, 1678-1685.
- Ogawa, J., Tsurumi, T., Yamada, S., Koide, S., Shohtsu, A. (1994). Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewis^x and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. Relation to postoperative recurrence. *Cancer* *73*, 1177-1183.
- Okada, T., Okuno, H., Mitsui, Y. (1994). A novel in vitro assay system for transendothelial tumor cell invasion: significance of E-selectin and $\alpha 3$ integrin in the transendothelial invasion by HT1080 fibrosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* *12*, 305-314.
- Ono, M., Sakamoto, M., Ino, Y., Moriya, Y., Sugihara, K., Muto, T., Hirohashi, S. (1996). Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer* *78*, 1179-1186.
- Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S.I., Paulson, J.C. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl Lewis^x. *Science* *250*, 1130-1132.
- Polley, M. J., Phillips, M.A., Wayner, E., Nudelman, E., Singhai, A.K., Hakomori, S.-I., Paulson, J.C. (1991). CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis^x. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 6224-6228.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.-D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Löning, T., Wagoner, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the CEA family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* *44*, 35-41.
- Renkonen, J., Paavonen, T., Renkonen, R. (1997). Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis^x and sialyl Lewis^a in lesions of breast carcinoma. *Int. J. Cancer* *74*, 296-300.
- Reynolds, E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* *17*, 208-212.

- Rodriguez-Ortega, M., Ofek, I., Sharon, N. (1987). Membrane glycoproteins of human polymorphonuclear leukocytes that act as receptors for mannose-specific *E. coli*. *Infect. Immun.* 55, 968-973.
- Rojas, M., Fuks, A., Stanners, C.P. (1990). Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca²⁺ dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Diff.* 1, 5227-533
- Roy, R. (1996). Glycodendrimers: A new class of biopolymers. *Polymer News* 21, 226-232.
- Roy, R. (1996). Synthesis and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates. *Curr. Op. Struct. Biol.* 6, 692-702.
- Ruoslathi, E. (1992). Extracellular matrix/growth factor interactions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 57, 309-315.
- Saiki, R. K., Gelfrand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.
- Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N., Nishi, T. (1994). Expression cloning of a novel α 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis^x carbohydrate determinants in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 14730-14737.
- Sauter, S. L., Rutherford, S.M., Wagener, C., Shively, J.E., Hefta, S.A. (1991). Binding of nonspecific cross reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to *E.coli* expressing type I fimbriae. *Infect. Immun.* 59, 2485-2493.
- Sawada, R., Lowe, J.B., Fukuda, M. (1998). E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels. *J. Biol. Chem.* 268, 12675-12681.
- Sawada, R., Tsuboi, S., Fukuda, M. (1994). Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 269, 1425-1431.
- Schachner, M. (1997). Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Op. Cell. Biol.* 9, 627-634.

Schachner, M., Martini, R. (1995). Glycans and the modulation of neural recognition molecule function. *Trends Neurosci.* *18*, 183-191.

Schmidt, N. O., Westphal, M., Hagel, C., Ergün, S., Stavrou, D., Rosen, I.M., Lamszus, K. (1999). Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int. J. Cancer (Pred.Oncol.)* *84*, 10-18.

Schumacher, U., Adam, E. (1998). Immunohistochemical detection of the MUC1 gene product in human cancers grown in *scid* mice. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 127-134.

Schumacher, U., Adam, E., Horny, H.-P., Dietl, J. (1996). Transplantation of human ovarian cystoadenocarcinoma into *severe combined immunodeficient mice*-formation of metastases without significant alteration of the tumor phenotype. *Int. J. Exp. Pathol.* *77*, 219-227.

Schumacher, U., Mohamed, M., Mitchell, B.S. (1994). Differential expression of carbohydrate residues in human breast and colon cancer cell lines grown *in vitro* and *in vivo* in *scid mice*. *Cancer J.*, *9*, 247-254.

Sharon, N. (1987). Bacterial lectins, cell-cell-recognition and infectious disease. *FEBS Lett.* *217*, 145-157.

Shibuya, N., Goldstein, I.J., van Damme, E.J.M., Peumans, W.J. (1988). Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J. Biol. Chem.* *263*, 728-734.

Silverblatt, F. J., Dreyer, J.S., Schauer, S. (1979). Effect of pili on susceptibility of *E.coli* to phagocytosis. *Infect. Immun.* *24*, 218-223.

Silverblatt, F. J., Ofek, I. (1983). Interaction of bacterial pili and leukocytes. *Infection* *4*, 235-238.

Skorstengaard, K., Vestergaard, E.M., Langkilde, N.C., Christensen, L.L., Wolf, H., Orntoft, T.F. (1999). Lewis antigen mediated adhesion of freshly removed human bladder tumors to E-selectin. *J. Urol.* *161*, 1316-1323.

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

Skubitz, K. M., Campbell, K.D., Skubitz, A.P.N. (1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J. Leukocyte Biology* *60*, 106-117.

-
- Skubitz, K. M., Ducker, T.P., Goueli, S.A. (1992). CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine-containing protein bearing a CEA cross-reacting antigen on the surface of human neutrophils. *J. Immunol.* *148*, 852-860.
- Sokurenko, E. V., Courtney, H.S., Ohman, D.E., Klemm, P., Hasty, D.L: (1994). FimH family of type I fimbrial adhesins: Functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J. Bacteriol.* *176*, 748-755.
- Springer, T. (1990). Adhesion receptors in the immune system. *Nature* *346*, 425-434.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* *76*, 301-314.
- Steinbach, F., Tanbe, K., Alexander, J., Edlinger, M., Tubbs, R., Brenner, W., Stockle, M., Novick, A.C., Klein, E.A. (1996). The influence of cytokines on the adhesion of renal cancer cells to endothelium. *J. Urol.* *155*, 743-748.
- Stellwagen, E. (1990). Gel filtration. *Meth. Enzymol.* *182*, 317-328.
- Stocks, S. C., Albrechtsen, M., Kerr, M.A. (1990). Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-N-acetylactosamine, Le^x) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *Biochem. J.* *268*, 275-280.
- Stocks, S. C., Kerr, M.A. (1993). Neutrophil NCA-160 (CD66) is the major protein carrier of selectin binding carbohydrate groups Lewis^x and Sialyl Lewis^x. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *195*, 478-483.
- Stocks, S. C., Ruchaud-Sparagano, M.-H., Kerr, M.A., Grunert, F., Haslett, C., Dransfield, I. (1996). CD66: Role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* *26*, 2924-2932.
- Stoffel, A., Neumaier, M., Gaida, F.-J., Fenger, U., Drzeniek, Z., Haubeck, Wagener, C. (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 CEA gene family. *J. Immunol.* *150*, 4978-4984.
- Strömblad, S., Cheresh, D.A. (1996). Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol.* *6*, 462-467.
- Takahashi, Y., Masayoshi, M., Wanatabe, M., Tokiwa, M., Nishioka, K. (1998). Relationship between serum ELAM-1 and metastasis among patients with colon cancer. *Dis. Colon Rectum* *41*, 770-774.

- Tanaka, K., Togo, S., Nanko, M., Ishiawa, T., Ichikawa, Y., Yamaoka, H., Shimada, H. (1999). Sialyl Lewis^x expression in vascular permeating lesions as a factor for predicting colorectal cancer metastasis. *Hepatogastroenterology* 46, 875-882.
- Tatsumi, M., Wanatabe, A., Sawada, H., Yamada, Y., Shino, Y., Nakano, H. (1998). Immunohistochemical expression of the sialyl Lewis^x antigen on gastric cancer cell correlates with the presence of liver metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 743-750.
- Thankavel, K., Madison, B., Ikeda, T., Malaviya, R., Shah, A.H., Arumugam, P.M., Abraham, S.N. (1997). Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J. Clin. Invest.* 100, 1123-1136.
- Toone, E. J. (1994). Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes. *Curr. Op.Struct. Biol.* 4, 719-728.
- Tomalia, D. A., Baher, H., Dewald, J.M., Hall, M., Kallos, G, Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1986). Dendritic molecules: Synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 19, 2466-2468.
- Tomalia, D. A., Naylor, A.M., Goddard III, W.A. (1990). Starburst-Dendrimere: Kontrolle von Größe, Gestalt, Oberflächenchemie, Topologie und Flexibilität beim Übergang von Atomen zu makroskopischer Materie. *Angew. Chem.* 102 (29; *Int. Ed. Engl.*), 119-157 (113-121).
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- Turner, G. A., Catteral, J.B. (1997). Surface-carbohydrates involved in the adhesive interactions of metastatic cells. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 234-241.
- Tyrrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J., Brandley, B.K. (1991). Structural requirements for the carbohydrate ligand for E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10372-10376.
- Varki, A. (1997). Selectin Ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* 99, 158-162.
- Veikkola, T., Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Sem. Canc. Biol.* 9, 211-220.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., Watt, S.M. (1996). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *neisseriae*. *Mol. Microbiol.* 22, 941-950.

- Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonass, R. (1996). The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* 22, 929-939.
- Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Wagener, C., Yang, Y.H.J., Crawford, F.G., Shively, J.E. (1983). Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen and related antigens as a model system: a systematic approach for the determination of epitope specificities of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 130, 2308-2315.
- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., Seed, B. (1990). Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250, 1132-1135.
- Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1988). Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426-431.
- Weston, B. W., Hiller, K.M., Mayben, J.P., Manousos, G.A., Bendt, K.M., Liu, R., Cusack, J.C. jr. (1999). Expression of human $\alpha(1,3)$ fuosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 59, 2127-2135.
- Wilcek, A. (1984). Affinity chromatography. *Meth. Enzymol.* 104, 3-53.
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R.F., Liotta, L.A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer, Suppl.* 80, 1529-1537.
- Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Endo T., Kobata, A. (1989). Carbohydrate structures of nonspecific cross-reacting antigen 2 - a glycoprotein purified from meconium as an antigen cross-reacting with anti-carcinoembryonic antigen antibody. *J. Biol. Chem.* 264, 17873-17880.
- Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Ueda, I., Kobata, A. (1987). Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res.* 47, 3451-3458.
- Zhang, G. J., Adachi, I. (1999). Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in metastatic breast carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Int. J. Oncol.* 14, 71-77.
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-1272.

Gefahrenstoffe

Die Sicherheitsdaten für die Gefahrenstoffe wurden Chemikalienkatalogen sowie Sicherheitsdatenbanken (Merck) entnommen.

Gefahrstoff/Symbol/ besondere Hinweise	R-Sätze	S-Sätze
β -Mercaptoethanol (T,N)	24-20/22-41-37/38	53-45-26-36/37/39
Acrylamid- /Bisacrylamidlösung (T)	45-46/23/24/25	53-36/37-45
BCIP (T)	61-20/21-36	53-45
Bleinitrat (T)	20/22 33-62	53-45
Chloroform (Xn)	22-38-40-48/20/22	36/37
DAB (T)	22-36/37/38	26-26-22
Ethidiumbromid (T+)	22-26-36/37/38-40	26-28. 2-36/37-45
Formaldehyd (T)	23/24/25-34-40-43	26-36/37/39-45
Formamid (T)	61	53-24/25-37-45
Glycidether (Epon) (Xi)	37/38/39	-
Methanol (F,T)	11-23/25	7-16-24-45
Natriumazid (T+)	28-32	28. 1-45
NBT (T)	61-20/21-36	53-45
NiSO ₄ (Xn)	22-40-42/43	22-36/37
OPD (T)	45-20/21/22-36/37/38-43	45-26-36/37/39
Phenol (T)	25/25-34	28.6-45
PMSF (T)	26/27/28-34-5	45-36/37/39-22
Radioaktiv markierte Nucleotide (³² P γ dCTP)	Der Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen erfolgte gemäß der Strahlenschutzverordnung vom 30.06.1989.	
SDS (Xn)	22-36/38	-
Uranylacetat (T+)	26/28-33	20/21-45
Xylol (Xn)	10-20/21-38	25

Publikationen

Originalarbeiten:

Ergün, S., Kilic, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurmbach, J.-H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C. (2000) Human carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule (CEACAM1): An effective angiogenic factor. *Mol. Cell, in press*

Posterbeiträge:

Horst, A.K., Jojovic, M., Feldhaus, S., Schumacher, U., Wagener, C. (1998). Immunohistochemical double labelling of C-CAM and sialyl Lewis^x in human cancers grown in *scid* mice. Glycostructures in Biological Systems – Preparation and Function. Symposium of the Program Project Grant (SFB 470), University of Hamburg, Dept. Chemistry, Dec. 2-4, 1998

Horst, A.K., Lindhorst, T.K., Wagener, C. (1998). Interaction of human C-CAM on neutrophilic granulocytes with type 1 fimbriae of *E. coli*: Inhibition of the fimbrial adhesion by trivalent cluster mannosides. Glycostructures in Biological Systems – Preparation and Function. Symposium of the Program Project Grant (SFB 470), University of Hamburg, Dept. Chemistry, Dec. 2-4, 1998

Kilic, N., Horst, A., Ziegeler, G., Hansen, A., Wurmbach, J.-H., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C., Ergün, S. (1999) Human cell adhesion molecule (CEACAM1) acts as a ligand for E-selectin. 10th International CEA-Workshop, Sept. 2-5, 1999, Karolinska Institutet, Stockholm

Horst, A.K., Grage, B., Feldhaus, S., Schumacher, U., Wagener, C. (1999). Are the sialyl Lewis^x glycostructures of CEACAM1 involved in metastases of experimental colorectal carcinomas? 10th International CEA-Workshop, Sept. 2-5, 1999, Karolinska Institutet, Stockholm

Horst, A.K., Lindhorst, T.K., Schumacher, U., Wagener, C. (1999). Biologische Funktion der Glycostrukturen auf CEACAM1. Symposium des SFB 470, 31.8.1999, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Erklärung

Hiermit versichere ich ausdrücklich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich erkläre hiermit, daß ich diese Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 01.12.1999

Andrea Kristina Horst

Bedanken möchte ich mich bei

- Herrn Prof. Dr. J. Thiem und Herrn Prof. Dr. C. Wagener für die Ermöglichung dieser Arbeit und ihre Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt dem Vertrauen, das sie mir entgegengebracht haben sowie ihrer fortwährenden, wohlwollenden Unterstützung. Prof. Dr. C. Wagener danke ich für die Realisierung der zahlreichen Kooperationen, die dazu beitrugen, diese Arbeit sehr abwechslungsreich und vielschichtig zu gestalten.

- Frau PD Dr. Thisbe Lindhorst für ihre multivalente Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. U. Schumacher, Herrn Prof. Dr. U. Mangold, und Frau Susanne Feldhaus für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die interessante Kooperation.
- Herrn PD Dr. S. Ergün, Herrn Dr. J. Weil, Nerbil, Malti und Jan für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.
- Herrn PD Dr. Stefan Ehlers und Frau Dr. U. Krallmann-Wenzel für ihre freundliche Unterstützung und die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.
- Herrn Prof. Dr. H.-D. Flad, Herrn PD Dr. E. Brandt, Andreas, Birgit, Tobias, Irina und Christine für die Hilfe bei den durchflußcytometrischen Analysen und ihre freundliche Unterstützung.
- Herrn PD Dr. G. Unteregger für die Erstellung der Aufnahmen in der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie.
- Frau Schäfer für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
- Prof. Dr. M. Neumaier und seiner Gruppe für ihre Hilfsbereitschaft.
- den Freunden und Kollegen im Hormonlabor, mit denen es viel Spaß gemacht hat, zusammen zu arbeiten: Birgit H., Christa, Krimhild, Birgit G., Barbara, Arne (dem Hansi), Sabine, Julica, Kerstin, Nicole, Katja, Anja, Carsten, Raid, Ebi, Rabia, Philipp, Hedi, Regi, Martina, Dorothee, Vicky, Jens, Thomas, David und den „Docs“: Roman, Jens, Peter N., Peter T. und Munif.
- Jörgonsson
- Sabine Wuttke für die Dias und das Einscannen zahlreicher Abbildungen.
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 470) für die Förderung dieses Projektes.
- meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und besonders dafür, daß sie mich in jeder Hinsicht unterstützt haben!!!!!!