

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse),
Arbeitsgruppe für Endokrinologie und Stoffwechsel des Alters,
des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf

**Vergleichende Untersuchungen zur Regulation und Funktion des
Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in dem extravillösen Trophoblasten
der Plazenta und in leukämischen T- Lymphozyten**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Thorsten Heilmann
aus Osnabrück

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: **10.11.2010**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

Prof. Dr. C. Bamberger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Dr. K. Milde- Langosch

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. U. Schumacher

Note: **magna cum laude**

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

2. Grundlagen und Stand der Forschung

2.1 Grundlagen der physiologischen Plazentation

2.1.1 Die menschliche Plazenta

2.1.2 Der Extravillöse Trophoblast

2.2 Das Adhäsionsmolekül CEACAM1

2.2.1 Grundlagen der Adhäsionsmoleküle

2.2.2 CEACAM1: Vorkommen und Funktion

2.3 Die menschliche Plazenta als Tumormodell

3. Zielstellung

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

4.1.1.1 Hybridomzelllinien ACI 81 und 88

4.1.1.2 Jurkat- Zelllinie

4.1.2 Plasmide

4.1.3 Zellextrakte

4.1.4 Antikörper

4.1.5 verwendete Reagenzien

4.1.6 sonstige Materialien

4.2 Methoden

4.2.1 Zellen

4.2.1.1 Zellkultur

4.2.1.2 Ausplattieren von Zellen

4.2.1.3 Stimulation von Zellen

4.2.1.4 Ernte der Zellen

4.2.2 Western Blot

4.2.2.1 Proteinkonzentration

4.2.2.2 SDS- Page

4.2.2.3 Probenvorbereitung

4.2.2.4 Gellauf

4.2.2.5 Western Blot

4.2.2.6 Detektion

4.2.3 Transfektionen

4.2.3.1 Maxipräparation der Plasmide

4.2.3.2 Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle

4.2.3.3 Transfektion mittels Lipofectamin

4.2.3.4 Elektroporation

4.2.3.5 Stimulation

4.2.3.6 Auswertung mittels Luciferasemessung

4.2.4 Invasionsassays

4.2.4.1 Versuchsaufbau

4.2.4.2 Durchführung der Invasionsassays

4.2.4.3 Auswertung der Invasionsassays

5. Ergebnisse

5.1 Regulation von CEACAM1 auf Proteinebene

5.1.1 CEACAM1 in der Hybridomzelllinie ACI 81

5.1.2 Kombination von Stimulantien in der Hybridomzelllinie ACI 81

5.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Induktion durch Ionomycin

5.1.4 CEACAM1 in der Hybridomzelllinie ACI 88

5.1.5 CEACAM1 in Jurkat- Zellen

5.2 Regulation des CEACAM1- Promotors

5.2.1 Transfektion der Promotorplasmide in der Hybridomzelllinie ACI 88

5.2.2 Transfektion der Promotorplasmide in Jurkat- Zellen

5.2.3 Vergleich der Plasmidkonstrukte

5.2.3.1 Übersicht der Transfektionsergebnisse in der Hybridomzelllinie ACI 88

5.2.3.2 Übersicht der Transfektionsergebnisse in der Jurkat- Zelllinie

5.3 Einfluss von CEACAM1 auf die Invasivität der Hybridomzelllinie ACI

88

6. Diskussion

6.1 Plazenta

6.2 Jurkat

6.3 CEACAM1 auf Proteinebene

6.4 CEACAM1 auf Promotorebene

6.5 CEACAM1 und Invasivität

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

7. Zusammenfassung

8. Quellennachweis

9. Abkürzungsverzeichnis

Anhang

1. Einleitung

Die physiologische Plazentation ist äusserst komplex und nur in Anfängen verstanden. Für das Einwachsen der Plazenta in den mütterlichen Uterus ist eine Vielzahl von Faktoren von grundlegender Bedeutung. Hierzu zählen die Empfängnisbereitschaft des Endometriums, bestimmte Konstellationen von Hormonen sowie ein grosses Repertoire der beteiligten Zelltypen an Proteinen und Enzymen, die ein invasives Wachstum ermöglichen. Darüber hinaus ist ebenfalls eine Immunmodulation notwendig, damit die sich einnistende Blastozyste nicht vom mütterlichen Organismus als „fremd“ erkannt und abgestossen wird. Trotz dieses komplizierten Zusammenspiels zwischen dem Trophoblasten und der mütterlichen Dezidua kommt es in nur einem kleinen Teil der Fälle zu Komplikationen während oder nach der Nidation.

Im Gegensatz zur der streng festgelegten Proliferation und Invasion der menschlichen Plazenta hat sich ein maligner T- Zell- Klon den Kontrollmechanismen des Körpers weitestgehend entzogen. Während die Plazenta nur in der ersten Hälfte der Schwangerschaft in die Dezidua einwächst und sich dann nicht weiter invasiv verhält, wachsen maligne Tumoren meist unkontrolliert und destruierend. Diese Tumoren respektieren keine Organgrenzen, entziehen sich einer Immunantwort und hemmen den eigenen Zelltod. Im Rahmen einer T- Zell- Leukämie führt diese ungehinderte Vermehrung eines T- Zell- Klons zu Verdrängungserscheinungen, Immunschwäche und schliesslich zum Tod des häufig jungen Patienten.

Die Diskrepanz zwischen dem kontrollierten Wachstum der Plazenta und dem unkontrollierten Wachstum maligner Tumoren ist offensichtlich. Entscheidend scheint jedoch zu sein, dass die molekularen Mechanismen, mit denen die Zellen invasiv wachsen und sich der Immunantwort oder Apoptose entziehen können, in grossen Teilen identisch sind. Grundlage dieser Promotionsarbeit ist die Hypothese, dass ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge an der Invasionsfront der Plazenta zu neuen Ansätzen und Therapien in der Behandlung maligner Tumoren führen kann.

Die hierbei durchgeführten Untersuchungen beschränken sich auf ein Schlüsselprotein des Invasionsvorganges. Dieses Protein CEACAM1 (*Carcinoembryonales Zell- Adhäsionsmolekül 1*) ist ein Adhäsionsmolekül aus der Superfamilie der Immunglobuline. Es wird auf der Oberfläche einer Vielzahl von Geweben exprimiert und hat einige bedeutsame Funktionen. So wurde nachgewiesen, dass CEACAM1 eine Rolle spielt bei der Invasion von Geweben durch Zellen und eine modulierende Funktion auf die Immunabwehr hat. Das Protein hat einen Einfluss auf die Regulation der Entstehung neuer Blutgefäße und des selbst induzierten Zelltodes. Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist die Entdeckung, dass CEACAM1 spezifisch in dem Extravillösen Trophoblasten der Plazenta gefunden wurde, dass heisst dem Teil der Plazenta, der für das invasive Wachstum verantwortlich ist. Damit erfüllt das Protein die Voraussetzung, sowohl im Rahmen der Plazentation als auch bei dem fortschreitenden Wachstum verschiedener Tumoren eine zentrale Rolle zu spielen.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Expression und Regulation von CEACAM1 an der Invasionsfront besser zu verstehen und diese mit dem Verhalten von CEACAM1 in einer malignen Zelle zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden 3 verschiedene Zelllinien untersucht: zwei Plazenta-Hybridomzelllinien als Trophoblastmodell sowie ein Zellklon einer leukämischen T- Zelle. Letztere stellt das Tumormodell dar und verfügt über alle Qualitäten einer malignen Zelle. Diese Zellen werden in einer Zellkultur *in vitro* im Hinblick auf das Ansprechen der CEACAM1- Expression auf verschiedene Stimulantien untersucht. Dabei sollen mögliche Unterschiede bzgl. der Regulationsmechanismen aufgedeckt werden. Die Versuche betreffen zunächst die Expression von CEACAM1 auf Proteinebene. In einem weiteren Schritt soll der Promotor des Proteins auf seine Aktivierbarkeit durch die jeweiligen Stimulantien untersucht werden. Das Ergebnis dieser Versuche könnte eine Aussage darüber zulassen, welche Stimulantien in den jeweiligen Zellsystemen einen Einfluss auf die CEACAM1- Expression haben und über welche molekularen Mechanismen dieser Einfluss vermittelt wird.

Darüber hinaus soll ermittelt werden, ob die Expression von CEACAM1 in den Trophoblastzellen einen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen hat, fremde Gewebe zu invadieren. Somit wird neben der Regulation noch ein möglicher funktioneller Aspekt des Proteins berücksichtigt, der auch hinsichtlich eines Tumorwachstums einen entscheidenden Stellenwert haben könnte.

Die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit sollen Aufschluss darüber geben, inwiefern ein besseres Verständnis der Regulation und Funktion von CEACAM1 im uteroplazentaren System neue Ansätze bieten kann für die Therapie maligner Erkrankungen wie der T- Zell- Leukämie.

2. Stand der Forschung

2.1 Grundlagen der physiologischen Plazentation

2.1.1 Die menschliche Plazenta

Die Plazenta entwickelt sich im Laufe der Schwangerschaft zu einem Stoffwechselorgan ersten Ranges. Mit einer inneren Oberfläche von etwa 10-15m² und einem kompletten Austausch ihres dreifachen Blutvolumens in der Minute ist sie gut geeignet, als Kontaktstelle zwischen dem mütterlichen und fetalen Kreislauf zu funktionieren. Der Übergang verschiedener Stoffe von mütterlichem zu kindlichem Blut findet dabei über aktive wie passive Austauschmechanismen statt. Das Kind wird auf diese Weise mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und der Abtransport von Blutgasen wie Stoffwechselprodukten gewährleistet. Auch Medikamente, Blutbestandteile und Immunglobuline sind in der Lage, die Plazentaschranke zu passieren. Neben der Versorgungsfunktion übernimmt die Plazenta Aufgaben der Hormonsekretion. So werden hier sowohl die Proteohormone hCG (*humanes Choriongonadotropin*), hPL (*humanes Plazentalaktogen*) und hCT (*humanes Chorionthyreotropin*) als auch Steroidhormone wie Gestagene, Östrogene und Glukokortikoide gebildet, die bei entsprechender Diagnostik eine gezielte Aussage über den Stand und die Entwicklung der Schwangerschaft erlauben. Zu den wichtigsten und klinisch relevantesten Erkrankungen der Plazenta gehören die akute oder chronische Plazentainsuffizienz, pathologische Plazentation (z.B. als Grundlage einer Präeklampsie) bzw. vorzeitige Plazentalösung und die Entstehung von Plazentatumoren.

Die Entwicklung der Plazenta beginnt mit der Nidation der befruchteten Eizelle am 5ten- 7ten Tag post conceptionem (p.c.). Zu diesem Zeitpunkt besteht die Blastozyste aus einem zentral angeordneten Embryoblasten und dem umgebenden Trophoblasten. Aus dem Embryoblasten wird sich der Embryonalkörper, aus dem Trophoblasten Chorion und Plazenta entwickeln. Der Trophoblast differenziert nach der Nidation in den Zytotrophoblasten und den Synzytiotrophoblasten. Während der Zytotrophoblast die dem Embryo zugewandte Seite bildet und aus teilungsaktiven Zellen besteht, zeichnet sich

2. Stand der Forschung

der umgebende Synzytiotrophoblast durch eine vielkernige Zellmasse ohne erkennbare Zellgrenzen aus, die nachfolgende Zellen aus dem Zytotrophoblasten bezieht. Der Synzytiotrophoblast zählt zu den hormonell aktivsten Geweben im uteroplazentaren System. Er übernimmt v. a. die Produktion des hCG. Die Aufgabe dieses Hormons ist es, die Funktion des schwangerschaftserhaltenden Corpus luteum zu sichern. Auch das hPL, welches aufgrund kontinuierlich steigender Spiegel Rückschlüsse auf die Plazentaleistung zulässt, wird in diesem Trophoblastenteil synthetisiert. Gegen Ende der Schwangerschaft steigt die hPL- Konzentration im Serum der Mutter drastisch an und bereitet den mütterlichen Körper auf die Geburt vor.

Der der sich einnistenden Blastozyste zugewandte Teil der Gebärmutterschleimhaut wird als Dezidua bezeichnet, bestehend aus einer auf eine Schwangerschaft vorbereiteten Funktionalis. Man unterscheidet die Dezidua formell in eine Decidua basalis, capsularis und parietalis, wobei Letztere im Laufe der Schwangerschaft fusionieren. Entscheidend ist, dass ab der 8ten Schwangerschaftswoche (SSW) die Zotten des Trophoblasten nur an der Seite der Decidua basalis, d.h. der dem Myometrium des Uterus zugewandten Seite einsprossen und als „Chorion frondosum“ den fetalen Anteil der Plazenta bilden. Zuvor waren ab dem 13ten Tag p.c. Primärzotten durch das invasive Wachstum des Synzytiotrophoblasten und die Proliferation des Zytotrophoblasten entstanden. Durch die weitere Reifung von Blutgefäßen und Anschluss an die mütterliche Blutzirkulation entstehen Gebilde aus sogenannten Sekundär- und schliesslich Tertiärzotten. Etwa ab dem 21sten Tag p.c. beginnt in eben diesen Zotten die embryonale Blutzirkulation. In der 14ten Woche erreicht die Plazenta ihre endgültige Struktur, ab dem 5ten Monat mit 2- 4cm ihre endgültige Dicke. Zum Geburtstermin liegt das Gewicht der Plazenta um 500g bei einem Durchmesser von 20cm.

2.1.2 Der Extravillöse Trophoblast

Während der Entwicklung der Plazenta entstehen topographisch und funktionell unterschiedliche Gewebetypen. Die Chorionplatte bildet den der Amnionhöhle zugewandten Teil, während die Plazenta in Richtung Uterus durch

2. Stand der Forschung

die Basalplatte begrenzt wird. Der Bereich, in dem die Chorion- und die Basalplatte randständig verschmelzen, wird als Marginalzone bezeichnet. Zwischen den beiden Anteilen befindet sich das Plazentaparenchym, in dem mit der Ausbildung des Zottengewebes von dem 13ten bis 21ten Tag p.c. der eigentliche Blutaustausch stattfinden wird.

Die Chorionplatte stellt den fetalen Teil der Plazenta dar und liegt direkt der Amnionhöhle an. Sie besteht aus verschiedenen Schichten, zu denen Amnionepithel und –bindegewebe sowie Trophoblastenanteile auf der uterusnahen Seite zählen. In der dazwischenliegenden Bindegewebsschicht verlaufen Blutgefäße von den Stammzotten zum Nabelschnuransatz. Die Basalplatte hingegen wird von kindlichen und mütterlichen Geweben gebildet. Hier finden sich auf der fetalen Seite die Trophoblastanteile, die für die Untersuchung des invasiven Verhaltens der Plazenta von besonderer Bedeutung sind. Der Trophoblast erreicht in der Basalplatte über eine sogenannte Fibrinoidschicht, in der sich auch die Spiralarterien befinden, die Dezidua. Darüber hinaus ragen von der Basalplatte ausgehend Septen weit in das Plazentaparenchym hinein. Zu ihren Füßen münden die mütterlichen Spiralarterien in den Zwischenzottenraum. Eine ähnliche Struktur zeigen die sogenannten Inseln; auch hier finden sich trophoblastäre als auch deziduale Anteile. Die Langerhans'schen Zellen des Zytotrophoblasten bilden die Stammzellen für den Synzytiotrophoblasten und den Extravillösen Trophoblasten. Sobald die Zellen die Stammzotten verlassen ergeben sich zwei Möglichkeiten der weiteren Differenzierung. Bei Kontakt dieser Stammzellen mit dem Synzytiotrophoblasten fusionieren sie mit diesem, wohingegen sie bei Verlust des Kontaktes zur Basalmembran ohne Synzytiotrophoblastkontakt ihre Polarität einbüßen und zu Zellen des Extravillösen Trophoblasten werden. Je weiter sich die Zellen dabei von der Membran entfernen, desto grösser wird dabei ihr invasives Potential bei abnehmender Proliferativität.

Die Zottenstrukturen der Plazenta werden von dem Zytotrophoblasten und dem Synzytiotrophoblasten gebildet. Zu dem Extravillösen Trophoblasten zählen die Teile der Plazenta, die sich ausserhalb der Zotten befinden. Dieses betrifft die Trophoblastzellen der Chorion- und der Basalplatte, der Septen und Inseln, des

Chorion leave und der Spiralarterien. Diese Anteile stellen bis zur Hälfte des gesamten Plazentavolumens dar. Der Extravillöse Trophoblast wird mitunter als Intermediärtrophoblast bezeichnet, da er sowohl Merkmale des Zytotrophoblasten als auch des Synzytiotrophoblasten aufweist. Die Nomenklatur bezieht sich darüber hinaus oftmals auf die Lokalisation der Trophoblastanteile. So entstanden Begriffe wie z.B. „interstitieller“ oder „intravaskulärer“ Trophoblast. Die Aufgabe des „intravaskulären“ Trophoblasten besteht in der Modellierung der mütterlichen Blutgefäße. So lässt das Einwachsen dieses Trophoblastanteils in die Spiralarterien ein adaptiertes Gefässsystem entstehen, das sich durch einen herabgesetzten Widerstand und eine erhöhte Durchflussmenge auszeichnet.

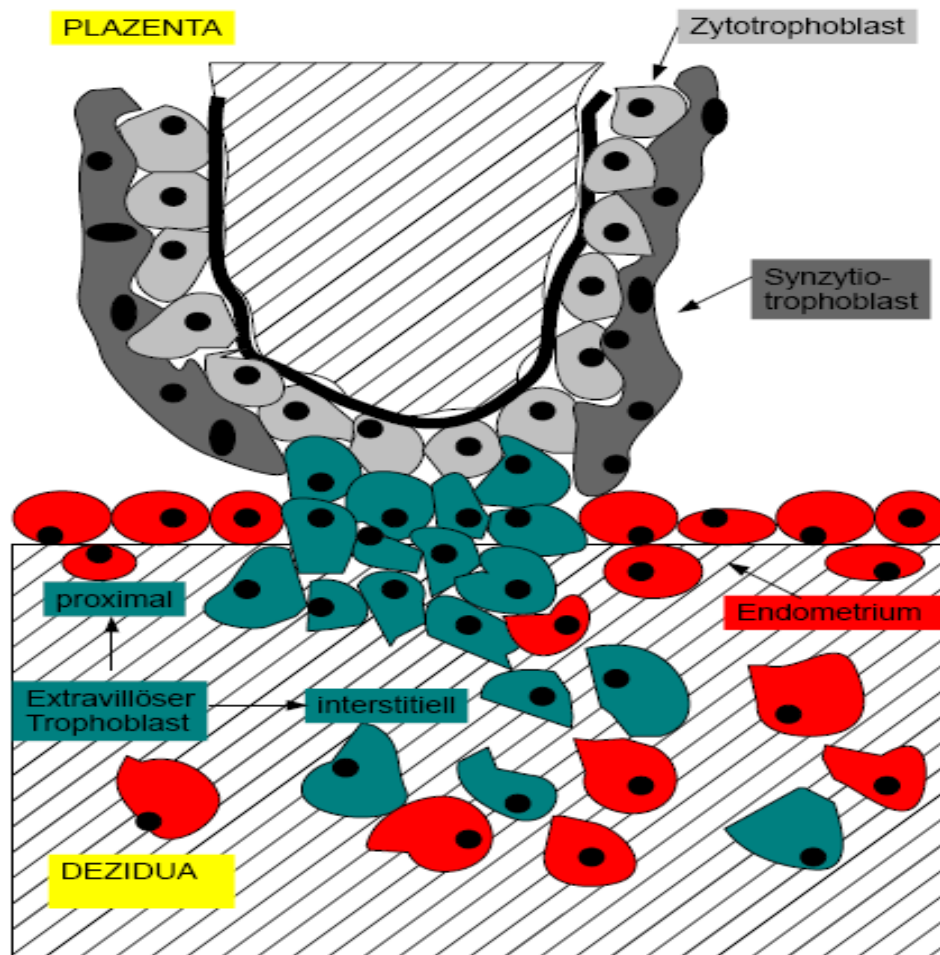


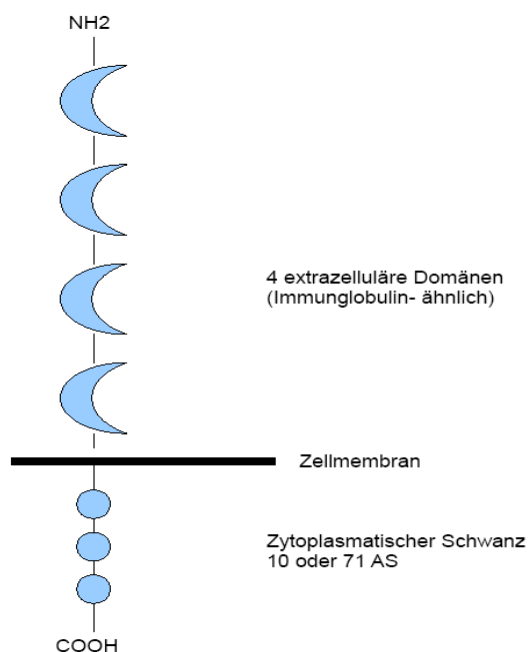
Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Ankerzotte. Zu unterscheiden ist der invasive Trophoblast von dem vielkernigen Synzytiotrophoblasten; beide Trophoblastanteile entstehen aus dem stammzellähnlichen Zytotrophoblasten

Das Wachstum und die Differenzierung der Plazenta bzw. des Extravillösen Trophoblasten reichen bis in die 18te SSW. Die molekularen Grundlagen dieses höchst komplexen Prozesses sind nur in Anfängen verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollen einige Aspekte Berücksichtigung finden, die im Zusammenhang mit der Regulation des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 eine Rolle spielen könnten (Kaufmann *et al*, 2003; Lunghi *et al* 2007; Buchangaben siehe Anhang).

2.2 Das Adhäsionsmolekül CEACAM1

2.2.1 Grundlagen der Adhäsionsmoleküle

Das Adhäsionsmolekül CEACAM1 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Herstellung bzw. der Aufrechterhaltung eines Zell- Zell- Kontaktes sowie als Rezeptor für extrazelluläre Proteine. Diese Eigenschaft ist eine grundlegende Voraussetzung für die Entstehung von Organen und Geweben, sowie für eine



Vielzahl zellulärer Prozesse wie Migration, Immunabwehr oder Signaltransduktion. Über einen intrazytoplasmatischen Aminosäurenschwanz können die Adhäsionsmoleküle mit Stoffwechselwegen in der Zelle interagieren und somit Signale in die Zelle weiterleiten (Pignatelli *et al*, 1994; Hauck *et al*, 2002).

Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 mit einem transmembranösen Aufbau

Die Zelladhäsionsmoleküle lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Hierzu zählen Integrine, Cadherine, Selektine und eben die Immunglobulin-Superfamilie. Das grosse Spektrum an verschiedenen Varianten dieser Rezeptoren ergibt sich aus der Vielzahl von Spleissvarianten. Während Cadherine vorwiegend für die Ausbildung Kalzium- abhängiger Zell- Zell-Kontakte verantwortlich sind und als Tumorsuppressoren fungieren können (Frixen *et al*, 1991) finden sich die Integrine hauptsächlich in epithelialen Zellen und als Rezeptor für Kollagene und Fibronektine. Deshalb sind sie auch Schlüsselproteine bei Entzündungsreaktionen und Wundheilungsvorgängen (Hynes *et al*, 1992). Zu der Superfamilie der Immunglobuline gehören neben CEACAM1 auch die MHC (*major histocompatibility*)- Moleküle, der CSF1 (*colony stimulating factor1*)- Rezeptor, die T- Zell- Rezeptoren und verschiedene Adhäsionsmoleküle (Hunkapiller *et al*, 1989).

2.2.2 CEACAM1: Vorkommen und Funktionen

CEACAM1 wurde im menschlichen Körper, da zunächst in den Gallengängen der Leber und der Gallenblase entdeckt, ursprünglich als BGP (*biliary glycoprotein*) beschrieben. Als sich herausstellte, dass das homologe Protein in der Ratte (C- CAM) für den Zell- Zell- Kontakt von Hepatozyten verantwortlich ist, entstand der Name „CEACAM1“ für das Protein, das auch unter den Begriffen „CD66a“ und „pp120“ bekannt ist. Mittlerweile sind dem Protein eine Vielzahl von Ursprungsgeweben und Funktionen zugeordnet worden, die ein einheitliches Schema der Funktionsweise erschweren. Entscheidend scheint jedoch zu sein, dass CEACAM1 sowohl auf extrazelluläre Prozesse wie Invasivität oder Zelladhäsion als auch auf intrazelluläre Prozesse im Rahmen einer Signaltransduktion Einfluss nehmen kann. Als gezeigt werden konnte, dass CEACAM1, welches vorwiegend auf Epithelien, Endothelien und Zellen der Hämatopoese gefunden wird, scheinbar auch spezifisch von dem äusseren, invasiven Teil der menschlichen Plazenta exprimiert wird, entstand die Idee, die Regulation des Proteins in der Plazenta mit dessen Regulation bei tumorös entarteten Zellen zu vergleichen. Die wichtigsten Funktionen von CEACAM1 in diesem Zusammenhang sollen nun dargestellt werden.

CEACAM1 und Tumorgenese:

Viele Ergebnisse aktueller Forschungsprojekte deuten darauf hin, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle im Rahmen der Entstehung von Tumoren zukommt. Die Arbeiten, die sich auf unterschiedliche, spezifische Gewebe beziehen, konnten jedoch kein einheitliches Schema für die Funktionsweise dieses Proteins erstellen. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Ursprungsgewebe scheint CEACAM1 mal tumorsupprimierend, mal –fördernd zu wirken. Darüber hinaus werden CEACAM1 eine Reihe von Funktionen zugeschrieben, die das Verhalten physiologischer wie pathologischer Gewebe beeinflussen.

Untersuchungen zum *in- vivo*- Verhalten von CEACAM1 stützen die These, dass CEACAM1 tumorsupprimierend wirkt. So zeigten Leung *et al* (2006), dass es in CEACAM1- Knockout- Mäusen nach Kanzerogenexposition zu einer gesteigerten Frequenz von Kolonkarzinomen und einer herabgesetzten Apoptoserate kommt. Die Transfektion von CEACAM1 in eine Kolonkarzinomzelllinie führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums (Kunath *et al*, 1995) und weitere Arbeiten legten den Verdacht nahe, dass spezielle Aminosäuren (z.B. Serin) innerhalb des langen zytoplasmatischen Schwanzes des Proteins für diesen Effekt unabdingbar sind (Fournes *et al*, 2001). Bamberger *et al* (2006) gelang der Nachweis, dass die Entartung von Endometriumzellen mit einem Verlust der basalen CEACAM1- Expression einhergeht. Ein ähnliches Verhalten wurde 2004 von Oliveira- Ferrer *et al* für die Rolle von CEACAM1 bei der Entstehung von Blasenkrebs beschrieben. Während das physiologische Übergangsepithel der Blase viel CEACAM1 exprimiert, geht diese Expression in frühen Tumorstadien verloren. Interessanterweise findet eine Re- Induktion statt, sobald der Tumor invasive Stadien erreicht, und die Expression von CEACAM1 scheint mit der Ausbildung neuer Gefäße zu korrelieren. CEACAM1 hat in den geschilderten Fällen also eine überwiegend tumorprotektive Wirkung. Für Zellen der weiblichen Brust konnte sogar die physiologische Relevanz des Proteins nachvollzogen werden. So gelang es Kirshner *et al* (2004) zu zeigen, dass eine Mammakarzinom- Zelllinie, die im Rahmen der Entartung ihre basale CEACAM1- Expression

2. Stand der Forschung

verloren hatte, erst nach Transfektion mit CEACAM1-4S- Konstrukten wieder in der Lage war, Lumina auszubilden. Kleinerman *et al* (1995) wiesen CEACAM1 ausserdem in Drüsenstrukturen der Prostata nach und postulierten einen entscheidenden Einfluss auf deren Entwicklung. Da auch in diesem Fall die CEACAM1- Expression bei fortschreitender Entartung der Zellen während der Tumorgenese verloren ging, wurden weitere Untersuchungen angestrebt. Eine Transfektion von CEACAM1 führte hierbei zu einer deutlichen Verminderung des Wachstums von Prostatakarzinomzellen. Weiterhin interessant war die Beobachtung von Hsieh *et al* (1994), dass die Expression von C- CAM1 in der Prostata der Ratte durch den Einfluss von Androgenen unterdrückt wird. Diese Arbeiten bieten somit vielversprechende Ansätze zur Erklärung einer möglichen tumorsupprimierenden Wirkung von CEACAM1.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen gibt es eine Reihe von Geweben, die erst nach maligner Transformation einen bestimmten CEACAM1- Gehalt aufweisen. Dies gilt unter anderem für Melanome (Brümmer *et al*, 2001), Adenokarzinome des Magens (Kinugasa *et al*, 1998), Nicht- kleinzellige Bronchialkarzinome (Laack *et al*, 2002) und einige hepatische Tumoren (Hokari *et al*, 2007). Ebrahimnejad *et al* (2004) wiesen für Melanomzellen nach, dass die gesteigerte CEACAM1- Expression direkt mit deren Invasivität korreliert und eine präzisere Aussage über die Metastasierungstendenz erlaubt, als dies bisher über die Tumordicke der Fall war (Thies *et al*, 2002). Eine unmittelbare Beeinflussung des zellulären Verhaltensmusters fand sich auch bei der Untersuchung von Schilddrüsenkarzinomen (Liu *et al*, 2007). Während CEACAM1 in der normalen Schilddrüse und auf Adenomen nicht vorkommt, bewirkt die Expression auf Karzinomen eine gesteigerte Zell- Matrix- Adhäsion und Invasivität. Der CEACAM1- exprimierende Tumor zeigte ein geringeres Grössenwachstum und Zellzyklusarrest bei gesteigerter Metastasierungstendenz, CEACAM1- „Silencing“ mittels siRNA führte wiederum zu gesteigertem Zellzyklusumsatz und grösseren Tumoren. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass CEACAM1 ebenfalls spezifisch vom extravillösen Trophoblasten, d.h. dem für die Invasivität verantwortlichen Teil der Plazenta exprimiert wird (Bamberger *et al*, 2000).

Brümmer *et al* (2001) konnten zeigen, dass CEACAM1 zusammen mit Integrin b3 direkt an dem invasiven Potential der Plazenta beteiligt ist.

CEACAM1 und Invasivität:

Im Hinblick auf das invasive Verhalten von Melanom- Zellen konnten Ebrahimnejad *et al* (2004) zeigen, dass das invasive Potential mit der CEACAM1- Expression korrelierte. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch von Liu *et al* (2007) für Schilddrüsenkarzinome beobachtet. In Bezug auf die Funktionsmechanismen der Invasivität durch CEACAM1 spielt bei den Melanomen die Co- Lokalisation und Interaktion mit Integrin b3 eine entscheidende Rolle (Brümmer *et al*, 2001). Über die Wechselwirkung dieser beiden Proteine steigert sich das invasive Potential der Zelle. In der Plazenta wiesen Bamberger *et al* (2006) CEACAM1 spezifisch im Extravillösen Trophoblasten nach. Dieser Teil ist verantwortlich für das Einwachsen des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua. Das durch CEACAM1 vermittelte invasive Potential scheint hierbei abhängig zu sein von dem Einfluss durch CRH (*Corticotropin- Releasing Hormone*), welches sowohl von kindlichen wie auch von mütterlichen Teilen der Plazenta hergestellt wird (Bamberger *et al*, 2006). Briese *et al* (2005) konnten zeigen, dass die Zugabe des Proteins Osteopontin zu mit CEACAM1- Konstrukten transfizierten Plazentazellen zu einer Zunahme des invasiven Potentials führte. CEACAM1 als Adhäsionsmolekül scheint also in verschiedenen Geweben eine Schlüsselrolle bei dem invasiven Potential der Zellen innezuhaben.

CEACAM1 und Immunsystem:

-
CEACAM1 wird auf verschiedenen Zellen des weissen Blutbildes exprimiert und als einziges Mitglied der CEACAM- Familie auf T- Zellen bei Aktivierung hochreguliert (Kammerer *et al*, 1998), jedoch finden sich bezüglich der Funktion von CEACAM1 bei der Regulation einer möglichen Immunantwort unterschiedliche Angaben.

Chen *et al* (2004) wiesen eine reziproke Beziehung zwischen CEACAM1-Aktivierung und der IL-2-Produktion der entsprechenden Zelle nach. Dieser Umstand würde bedeuten, dass CEACAM1 eine inhibitorische Funktion übernehmen kann. Nagaishi *et al* (2006) bestätigten diese Vermutung. Nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors, z.B. durch fremde MHC-Moleküle, hat CEACAM1 einen koinhibitorischen Effekt, der zu einer verminderten Zellproliferation, Zytokinausschüttung und einer verspäteten Immunantwort führt. Ein komplettes Ausschalten von CEACAM1 hat eine überschüssige Immunantwort zur Folge, wie sie zum Beispiel bei autoreaktiven Darmerkrankungen zu beobachten ist. Chen *et al* (2004) konnten zeigen, dass der lange zytoplasmatische Schwanz von CEACAM1 über mehrere ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) verfügt und über diese Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle nimmt. Weiterhin führt eine Aktivierung von CEACAM1 zu einer Herabregulierung des IL-2-Rezeptors. Dass der inhibitorische Effekt abhängig von Aminosäuresequenzen der CEACAM1-4L-Form ist, wurde durch Transfektion verschiedener Isoformen in leukämische Jurkat-Zellen bestätigt. Demgegenüber wurde für die CEACAM1-4S-Form eine eher stimulierende Wirkung beschrieben. Da diese Form jedoch in nur geringerer Masse von Zellen exprimiert wird, überwiegt vermutlich der inhibitorische Effekt.

Einen weiteren interessanten Aspekt im Bezug auf immunologische Wirkung bietet die Beobachtung, dass die Bindung von Neisserien und anderen Bakterien an CEACAM1 zu einer transienten Hemmung der Lymphozytenfunktion führt. Boulton *et al* (2002) wiesen nach, dass es auch hierbei zu einer Phosphorylierung der ITIMs auf dem zytoplasmatischen Schwanz kommt. Dabei haben die Opa (*opacity-associated*)-Proteine der Neisserien den gleichen Effekt wie ein spezifischer Anti-CEACAM1-Antikörper: die Proliferation der Lymphozyten wird deutlich gehemmt. Einem ähnlichen Mechanismus könnte auch die Immuntoleranz des menschlichen Körpers gegenüber einigen Tumoren oder der Plazenta unterliegen. So vermuten Ebrahimnejad *et al* (2004), dass sich das stark CEACAM1-exprimierende Melanom durch CEACAM1-CEACAM1-Interaktionen einer Immunantwort

entzieht. Diese Art von Interaktionen sind für das invasive Wachstum der Plazenta bereits nachgewiesen worden (Markel *et al*, 2002), wobei der hohen Expression von CEACAM1 auf dem extravillösen Trophoblasten einerseits und den dezidualen Lymphozyten andererseits eine zentrale Rolle zukommt.

CEACAM1 als mikrobieller Rezeptor:

Wie bereits erwähnt dient CEACAM1 als Oberflächenprotein verschiedenen Pathogenen als Rezeptor. Hierzu zählen neben Neisserien, Salmonellen oder *Escherichia coli* auch *Hämophilus influenzae*. Dabei führt die Bindung dieser Mikroben nicht nur zu einer festen Anhaftung an die Zelloberfläche, sondern fördert zugleich deren Internalisierung und den Einfluss auf die Regulation spezifischer Gene (Muenzner *et al*, 2005). Dass CEACAM1 als spezifischer Rezeptor fungieren kann, wurde von Dveksler *et al* (1993) gezeigt. Im Tiermodell stellte sich heraus, dass eine CEACAM1- Spleissvariante als Angriffspunkt für das Maus- Hepatitis- Virus diente. Mäuse ohne die entsprechende Spleissvariante waren immun.

Die Mechanismen, die im Menschen zu einer Aufnahme der Bakterien führen, sind nicht abschliessend untersucht. Für die pathogenen Neisserien weiss man, dass sie spezifisch über Opa- Proteine an CEACAM1 binden (Virji *et al*, 1996). Muenzner *et al* (2001) erbrachten den Nachweis, dass Lipopolysaccharide aus der Zellmembran der Bakterien in Endothelzellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führen, was wiederum eine Steigerung der CEACAM1- Expression zur Folge hat. Die Bakterien sind somit in der Lage, mit CEACAM1 ihren eigenen Rezeptor und damit ihre Aufnahme in die Zelle bzw. die Transzytose zu induzieren. Diese bakterielle Bindung an CEACAM1 auf CD4- Lymphozyten bewirkt darüber hinaus ITIM- vermittelt eine verminderte Proliferationsrate, und damit letztlich eine verzögerte Immunantwort (Boulton *et al*, 2002).

CEACAM1 und Apoptose:

Einer der am besten untersuchten Zusammenhänge zwischen der Funktion von CEACAM1 und dem Apoptoseverhalten von Zellen wurde von Kirschner *et al* (2003) beschrieben. Im Rahmen der Lumenformation von Brustzellen scheint CEACAM1 eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde nachgewiesen, dass normale Brustzellen mit Hilfe ihrer CEACAM1- Expression physiologischerweise in der Lage sind, durch Apoptose Lumina zu formen, während Mammakarzinomzellen, die kein CEACAM1 mehr exprimieren, diese Fähigkeit verlieren. Eine Re- Induktion von CEACAM1 führt bei den Karzinomzellen wiederum zu der Ausbildung von Lumina. Interessanterweise wurde die Vermutung, dass die CEACAM1-4S- Form, die über nur 12- 14 Aminosäuren als zytoplasmatischen Schwanz verfügt, für die Signaltransduktion im Rahmen der Apoptose verantwortlich ist, von Chen *et al* (2007) durch Mutationanalysen bestätigt. Die von CEACAM1-4S eingeleitete Apoptose wird vor allem durch eine Bax- Translokation in die Mitochondrien bedingt.

Entgegen diesen Beobachtungen wurde CEACAM1 aber auch eine Apoptose hemmende Wirkweise zugeschrieben. Singer *et al* (2005) konnten zeigen, dass der Anteil der frühapoptotischen gegenüber den spätapoptotischen Granulozyten in der Ratte bei Aktivierung von CEACAM1 zunimmt. Im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion auf eine Infektion könnte der physiologische Sinn der hohen CEACAM1- Spiegel auf den Abwehrzellen darin bestehen, dass aktivierte Abwehrzellen der Immunabwehr länger zur Verfügung stehen, indem sie sich der Apoptose entziehen. In entsprechenden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass CEACAM1 bei Aktivierung einige der Schlüsselenzyme der Apoptose, wie z.B. die Caspase 3, hemmt. Eine ähnliche Funktion wurde auch in einem anderen Zusammenhang beschrieben. So vermuten Ebrahimnejd *et al* (2004), dass besonders hohe CEACAM1- Expression auf Melanomzellen zu einer Hemmung der Apoptose und damit zu einer Verlängerung von deren Überleben führt.

CEACAM1 und Angiogenese:

Die Tatsache, dass CEACAM1 auch auf verschiedenen Blutgefäßen gefunden wurde, lässt vermuten, dass CEACAM1 eine regulatorische Rolle im Rahmen der Angiogenese übernimmt. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang das spezifische Verteilungsmuster. Während in ausgereiften Gefäßen kaum vorhanden, lässt sich CEACAM1 in Blutgefäßen von Geweben finden, die einem starken Umbau unterliegen. Dies gilt unter anderem für Gefäße des Endometriums und der Plazenta, sowie für neu entstehende Gefäße in der Wundheilung. Darüber hinaus wurde CEACAM1 aber auch in kleinen Blutgefäßen von soliden Tumoren gefunden. Diese Umstände lassen darauf schließen, dass CEACAM1 besonders während der Neoangiogenese eine Rolle spielt (Horst *et al*, 2006).

Bei Untersuchungen der Umstände, die zu einer Neubildung von Gefäßen führen, konnten Ergün *et al* (2000) *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass CEACAM1 die Angiogenese fördert. Mit Hilfe von HDME (*human dermal microvascular endothelial*)- Zellen wurde ein chemotaktischer Effekt von CEACAM1 gezeigt, der sich bei Zugabe von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) noch verstärkte. Dieses synergistische Verhalten liess sich dadurch erklären, dass VEGF in der Lage ist, die CEACAM1- Expression hochzuregulieren und somit die Neubildung von Gefäßen zu fördern.

Einen ähnlichen Zusammenhang konnten Oliveira- Ferrer *et al* (2004) bei der Untersuchung von Tumoren der menschlichen Blase beschreiben. Im Rahmen der Entartung von Urothelzellen kam es zu einem Verlust der CEACAM1- Expression, was eine vermehrte Freisetzung von VEGF- Isotypen zur Folge hatte. Die daraufhin entstehenden Tumorgefäße besaßen ihrerseits wieder viel CEACAM1, ein Umstand, der für physiologische Blutgefäße der Blase nicht galt. Diese Beobachtungen legen den Verdacht nahe, dass CEACAM1 in physiologischem Gewebe eher eine Angiogenese- hemmende Wirkung hat, ein Mechanismus, der auch für das Prostatakarzinom beschrieben wurde. Die tumorsupprimierende Wirkung von CEACAM1 könnte hierbei unter anderem auf einer verminderten Angiogenese beruhen (Volpert *et al*, 2002).

Horst *et al* (2006) gelang es darüber hinaus, CEACAM1- defiziente Knockout-Mäuse zu züchten und anhand dieser nachzuweisen, dass CEACAM1 essentiell wichtig für die Neuentstehung kleiner Kapillaren ist. Dieser Zusammenhang wurde in vivo im Rahmen einer Revaskularisierung nach einem Myokardinfarkt bestätigt. Bemerkenswerterweise fand sich bei den Knockout- Mäusen jedoch keine Beeinträchtigung physiologischer Gefäße sowie der Fertilität. Diese Beobachtungen legen den Verdacht nahe, dass der Einfluss von CEACAM1 auf die Angiogenese sich in besonderem Masse auf die durch Mediatoren vermittelten frühen Stadien der Neuentstehung von Gefäßen bezieht.

2.3 Die menschliche Plazenta als Tumormodell

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation und Funktion des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in Hybridomzellen der menschlichen Plazenta untersucht. Dieser Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass sich ein Teil an der Invasionsfront der Plazenta im Bezug auf Invasivität, Immunmodulation und Induktion von Angiogenese ähnlich verhält wie eine maligne Zelle (Burrows *et al*, 1996). Dieser Teil an der Kontaktstelle zwischen kindlichem und mütterlichem Gewebe wird als Extravillöser Trophoblast bezeichnet und exprimiert als einziger Teil der Plazenta das Protein CEACAM1 (Bamberger *et al*, 2000). Die Regulation der Implantation und des Wachstums des Trophoblasten in die Dezidua zu Beginn einer Schwangerschaft ist bisher nur in Teilen verstanden. Einer Reihe von Faktoren wie z.B. der Expression von Adhäsionsmolekülen, einer Extrazellulärmatrix oder Matrix- Metalloproteinasen werden in diesem Zusammenhang wichtige Funktionen zugeschrieben. In diesem Abschnitt der Arbeit sollen einige zentrale Aspekte genannt werden, die dafür sprechen, dass die Untersuchungen in Zellen des Extravillösen Trophoblasten als ein plausibles Modell für das Studium tumorähnlichen Verhaltens betrachtet werden können, das jedoch einer „physiologischen“ Regulation unterliegt.

CEACAM1 als Adhäsionsmolekül gehört zu der Familie der Immunglobuline. Es sollen hier weitere Vertreter dieser Gruppe diskutiert werden, die sowohl mit dem Wachstum der Plazenta als auch der Expression auf Neoplasien in Verbindung gebracht werden. Hierzu gehört Mel-CAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*), ein Protein, das CEACAM1 im Aufbau sehr ähnlich ist, jedoch über eine längere extrazelluläre Domäne verfügt. Mel-CAM wurde in der Plazenta ausschliesslich in dem invasiven Trophoblasten, sowie in einer Reihe von Plazentatumoren nachgewiesen. Dieses Muster legt die Vermutung nahe, dass Mel-CAM eine Rolle bei der Invasion und Ausbreitung des Trophoblasten spielt (Shih *et al*, 1996). Luca *et al* (1998) erbrachten den Nachweis, dass Mel-CAM eben diese Funktionen auch auf Melanomzellen übernimmt. Die Gruppe konnte zeigen, dass Mel-CAM physiologischerweise durch den Transkriptionsfaktor AP-2 reguliert wird, dieser Mechanismus aber im Rahmen der Tumorgenese an Bedeutung verliert. In Plazenten von Frauen, die unter einer Präeklampsie litten, wurden darüber hinaus verminderte Level des Proteins gefunden, ein Umstand, der eine zentrale Rolle von Mel-CAM während der Plazentation unterstützt (Liu *et al*, 2004). Weitere artverwandte Proteine zeigen ein ähnliches Verhalten, so z.B. ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*), VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) oder PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*). Letzteres ist ein Glykoprotein, welches hauptsächlich auf Zellen des Gefässsystems, namentlich Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten vorkommt (Baldwin *et al*, 1994). PECAM wird besonders stark exprimiert in dezidualen Gefässen der Plazenta, in denen sich der Trophoblast ausgebreitet hat, um sie entsprechend der Versorgungsbedürfnisse des Embryos zu modulieren (Coukos *et al*, 1998). Aber auch das Potential dieses Proteins machen sich Tumorzellen zunutze, um eine adäquate Blutversorgung sicherzustellen. So konnte in einem Mausmodell *in vivo* gezeigt werden, dass eine Blockade von PECAM-1 zu einer verminderten Angiogenese bei drei verschiedenen Tumorentitäten führte (Zhou *et al*, 1999). Es lässt sich somit festhalten, dass eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen (sog. CAMs) auf der Plazenta und in malignen Zellen identische Funktionen erfüllen.

2. Stand der Forschung

Neben den Zelladhäsionsmolekülen gehören unter anderem die Integrine zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und sind mit einer Vielzahl von Funktionen wie Adhäsion, Kontakt mit der Extrazellulärmatrix, Invasion oder Signaltransduktion assoziiert (Burghardt *et al*, 2002). Damsky *et al* (1994) konnten zeigen, dass unterschiedliche Muster von Integrinformen in der Plazenta exprimiert werden und deren Zusammenspiel über das invasive Verhalten von Zellen bestimmen kann. Im Mausmodell führte eine Blockade des Integrins $\beta 3$ mittels Antikörper zu einer verminderten Implantation der Plazenta (Illera *et al*, 2000). Für die humane Plazenta wurde gezeigt, dass CEACAM1 an der Invasionsfront des Trophoblasten ko- lokalisiert ist mit Integrin $\beta 3$ (Brümmer *et al*, 2001). Es wird vermutet, dass die Invasivität von Zellen durch die Interaktion der beiden Proteine gesteigert wird und dieser Effekt von der Phosphorylierung eines Tyrosinrestes auf dem zytoplasmatischen Schwanz von CEACAM1 abhängig ist. Besonders interessant ist diese Beobachtung, da das gleiche Zusammenspiel von CEACAM1 und Integrin $\beta 3$ auch auf Melanomzellen nachgewiesen werden konnte (Ebrahimnejad *et al*, 2004). Ein Verlust (bzw. die Blockade) dieses Proteinkomplexes führte zu einer Verminderung des invasiven Potentials der Tumorzellen. Zudem scheint die Expression von Integrin $\beta 3$ auch eine gesteigerte Expression von CEACAM1 nach sich zu ziehen, ein Umstand, der auch für eine physiologische Rolle der Interaktion spricht.

Einige Enzyme haben für das Wachstum der Plazenta eine ebenso grundlegende Bedeutung. So sind die Metalloproteinasen ein wichtiger Bestandteil für das invasive Potential einer Zelle, da sie als Zink- abhängige Peptidasen in der Lage sind, die Proteine des zu invadierenden Gewebes zu verdauen (Burrows *et al*, 1996). Es zeigte sich, dass das Wachstum des Extravillösen Trophoblasten physiologischer Weise durch TGF- β (*Decidua-derived Transforming Growth Factor*) gehemmt werden kann. Dieser Wachstumsfaktor wird von der mütterlichen Seite der Plazenta produziert und wirkt über eine Aktivierung von TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloprotease*) und PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor*) auf den Trophoblasten. Auf diese wichtige Regulationsmöglichkeit sprechen jedoch maligne Zellen und verschiedene Plazentatumoren nicht an (Lala *et al*, 2002), eine Beobachtung, die das destruierende Verhalten dieser Neoplasien erklären könnte. Auch

2. Stand der Forschung

Stetler- Stevenson *et al* (1993) diskutierten die Rolle der Metalloproteinasen im Rahmen von Metastasierungen von Tumoren im Vergleich zu physiologischen Funktionen. Sie kamen zu dem Schluss, dass der Mechanismus der Invasion der gleiche, dessen Regulation und das etwaige Vorhandensein von Inhibitoren (z. B. TIMP-1) jedoch entscheidend für das Verhalten der Zellen ist. Den Nachweis, dass diese Enzyme einen entscheidenden Einfluss auf die Invasivität von Trophoblastzellen haben, erbrachten Librach *et al* (1991). Sie zeigten, dass die Zugabe von Stoffen und Antikörpern, die eine Metalloproteinase Typ4 spezifisch hemmen, zu einer Abnahme des invasiven Potentials in der Zellkultur führten. Die Metalloproteinasen sind somit essentiell für den regelrechten Ablauf der Plazentation; Lim *et al* (1997) zeigten verminderte Level von MMP-9 mRNA in prä- eklamtischen Plazenten und führten dies auf ein mangelndes Wachstum des Trophoblasten in die mütterlichen Gefäße zurück. Aber auch die Interaktion mit den dezidualen Zellen scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Campell *et al* (2003) untersuchten in einem Kokulturmodell von Dezidua und Trophoblast den Einfluss der Expression von Metalloproteinase-9 auf Seiten der Mutter und fanden heraus, dass diese einen eher hemmenden Effekt auf das migratorische Verhalten des Trophoblasten haben. Andererseits wiesen Wilhelm *et al* (1989) nach, dass diese Proteinase in Lungenfibroblasten durch Phorbol ester zu induzieren ist und somit einem ähnlichen Regulationsmuster wie CEACAM1 in den Trophoblastzellen unterliegt. Diese Beobachtung wurde durch Bischof *et al* (2003) bestätigt. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Expression der Metalloproteinase-9 in Trophoblastzellen; bei Stimulationsversuchen stellte sich heraus, dass auch hier die Proteinase durch TPA induzierbar war, ein Umstand, für den vermutlich zwei Bindungsstellen für AP-1-Faktoren auf dem dazugehörigen Promotor verantwortlich sind. Ein gleichsinniger Effekt der Metalloproteinasen und des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 auf die Invasivität der Plazenta ist also wahrscheinlich.

Als weiteres Beispiel für eine mögliche Steuerung des Einwachsens des Trophoblasten sei hier eine Arbeit von Queenan *et al* (1987) angeführt. Diese Arbeitsgruppe erbrachte den Nachweis, dass Trophoblastzellen in der Lage sind, uPA (*Urokinase- type Plasminogen Activator*) zu produzieren, ein Enzym, dass ähnlich den Metalloproteinasen in physiologischen und pathologischen

2. Stand der Forschung

Zellsystemen für ein Eindringen in Fremdgewebe verantwortlich ist. Aktuelle Arbeiten belegen, dass sowohl die Metalloproteinasen als auch die Plasminogenaktivatoren essentiell für das Wachstum von Tumoren sind. Miyake *et al* (2009) konnten erst kürzlich zeigen, dass die Herabregulation der beiden Enzyme unter hypoxischen Bedingungen im Mausmodell für rektale Karzinome zu einer Verminderung des Grössenwachstums und der Metastasierungsrate führte. Gleichzeitig ist der Trophoblast aber in der Lage, PAI-1 und -2 zu exprimieren, die diesem Verhalten entgegen wirken können, wobei PAI-1 im Gegensatz zu PAI-2 im Extravillösen Trophoblasten vorkommt (Feinberg *et al*, 1989). Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass besonders PAI-1 eine wichtige regulatorische Bedeutung zukommt.

Neben den Proteinen und Enzymen, die bei der Einnistung der Plazenta eine wichtige Rolle spielen, soll im Folgenden nun der Einfluss von relevanten Wachstumsfaktoren beschrieben werden. EGF (*Epidermal Growth Factor*) z.B. ist seit einiger Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Es wurde gezeigt, dass EGF in gut einem Drittel aller epithelialen Karzinome stark exprimiert wird und dass der EGF- Rezeptor als geeignetes Target für verschiedene Ansätze monoklonaler Antikörpertherapien für Krebsleiden unterschiedlichster Art betrachtet wird. Der Erfolg dieser Therapien zeigt sich im Zellmodell durch vermindertes Tumorwachstum, herabgesetzte Angiogenese, weniger Produktion von Metalloproteinasen und besseres Ansprechen auf Chemotherapeutika (Mendelsohn, 2001; Lui *et al*, 2000). Interessant ist, dass dieser Wachstumsfaktor auch massgeblich an dem Wachstum der Plazenta beteiligt ist. So steigert die Expression von EGF die Invasion des Trophoblasten, unter anderem durch eine Induktion von Metalloproteinasen 2 und 9 sowie des (urokinase- type) Plasminogenaktivators (Bass *et al*, 1994; Staun- Ram *et al*, 2004; Anteby *et al*, 2004). Maruo *et al* (1995) konnten zeigen, dass EGF als Wachstumsfaktor autokrin auf die Trophoblastenzellen wirkt und somit das Wachstum und Funktion der Plazenta entscheidend beeinflusst. Die Regulation von Zellsystemen durch EGF und dessen Rezeptor ist ein sehr praktisches Beispiel dafür, dass die Beeinflussung des Wachstums, der Differenzierung und der Funktion des Extravillösen Trophoblasten in vielerlei Hinsicht exakt der Beeinflussung in verschiedenen malignen Zellen entspricht.

2. Stand der Forschung

Verschiedene Therapieansätze in der Krebstherapie zielen heute darauf ab, im Karzinom die Mechanismen zu unterbinden, die für eine erfolgreiche Plazentation unabdingbar sind. Interessant im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist eine Untersuchung von Abou- Rjaily *et al* (2004), die nachweisen konnten, dass die Isoform CEACAM1-L als Substrat für den EGF-Rezeptor dienen kann. Durch die Phosphorylierung des langen zytoplasmatischen Schwanzes wirkt CEACAM1 wiederum hemmend auf die EGF-Expression und könnte somit als potentieller Angriffspunkt zur Regulation von EGF dienen. Ein weiterer, wichtiger Wachstumsfaktor im Rahmen der Implantation ist VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Die mRNA dieses Faktors kann schon in den frühesten Stadien des Embryos nachgewiesen werden und ist essentiell wichtig für eine adäquate Blutversorgung im Rahmen der Plazentation (Krüssel *et al*, 2003). Dies erklärt auch die vermehrte Expression des Faktors in hypoxischem Plazentagewebe (Shore *et al*, 2003). Ähnlich wie EGF bietet sich auch der Faktor VEGF als Angriffspunkt zur Therapie der Angiogenese von Tumoren wie beispielsweise Brustkrebs oder das Kolonkarzinom an (Shinkaruk *et al*, 2003). Auch in diesem Fall könnte sich das im Extravillösen Trophoblasten exprimierte CEACAM1 als Schlüsselprotein herausstellen. Ergün *et al* (2000) konnten zeigen, dass das Protein angiogenetische Fähigkeiten besitzt und als einer der Haupteffektoren von VEGF für das Wachstum von neu gebildeten Gefäßen verantwortlich ist. Diese Hypothese wird auch durch eine Knockout- Maus- Modell gestützt. Es stellte sich dabei heraus, dass die Tiere im Bezug auf die Fähigkeit zur Neubildung von Gefäßen grosse Unterschiede aufwiesen. Während Mäuse, bei denen CEACAM1 genetisch ausgeschaltet war unter einem Mangel an Neoangiogenese nach Ligatur von Arterien litten, führte die Überexpression zu einer verstärkten Gefäßneubildung (Horst *et al*, 2006). Dieser Versuch veranschaulicht gut die mögliche Rolle von CEACAM1 im Zusammenspiel mit VEGF.

Die hier aufgeführten Proteine, Enzyme und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen Plazentation. Dabei hängt das systematische und geordnete Eindringen des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua und deren Gefäße von dem komplexen Zusammenspiel der einzelnen

2. Stand der Forschung

Faktoren ab. Als besonders interessant gestaltet sich die Untersuchung des Extravillösen Trophoblasten an der Invasionsfront der Plazenta. Wie in diesem Abschnitt dargestellt bedient sich dieser bei seinem invasiven Wachstum ähnlichen, wenn nicht sogar identischen Mechanismen wie viele maligne Tumoren. Der Extravillöse Trophoblast ist somit als Modell prädestiniert, um Erkenntnisse über die Tumorgenese zu gewinnen und verschiedene Angriffspunkte möglicher Therapieansätze zur Heilung oder Linderung von Krebsleiden unter „physiologischen“ Bedingungen zu untersuchen.

3. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression und Regulation des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in zwei verschiedenen Zellsystemen untersucht. Bei diesen Zellen handelt es sich einerseits um Plazenta- Hybridomzellen, d.h. Zellklone, die *in vitro* hauptsächlich die Charakteristika des humanen Extravillösen Trophoblasten aufweisen. Diese Zellen spiegeln idealerweise die Verhältnisse an der Invasionsfront der Plazenta wider. Auf der anderen Seite wurden Jurkat- Zellen untersucht, die von einem T- Zell- Klon einer akuten T- Zell- Leukämie stammen und somit einen malignen Gegenspieler des sich „physiologisch“ verhaltenden Plazentaklons darstellen. Das zu untersuchende Protein CEACAM1 wird als Zelladhäsionsmolekül auf verschiedenen Zelloberflächen nachgewiesen. Deshalb ist das erste Ziel dieser Arbeit der Nachweis von CEACAM1 in den verschiedenen Zelltypen mit und ohne zusätzliche Stimulation. Als Stimulantien werden Tetraborbolester, Calcium Ionophore, Progesteron, Estradiol sowie Dexamethason eingesetzt; der Nachweis einer möglichen Wirkung der Stimulantien soll auf Proteinebene mit Hilfe von Western- Blot- Analysen quantifiziert werden. In dem zweiten Schritt wird untersucht, über welche molekularen Mechanismen ein etwaiger Einfluss auf Promotorebene vermittelt wird. Zu diesem Zweck werden unterschiedlich lange Konstrukte des CEACAM1- Promotors mit Hilfe von Luciferase- Assays in beiden Zellsystemen auf ihre Aktivierbarkeit überprüft. Die vergleichende Auswertung unter Berücksichtigung möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen kann Hinweise geben auf die molekularen Regulationsmechanismen von CEACAM1. Weiterhin soll ein funktioneller Aspekt von CEACAM1 untersucht werden. Mittels standardisierter Invasions- Assays kann nachgewiesen werden, ob die vermehrte CEACAM1- Expression in den Plazenta- Hybridomzellen zu einer Steigerung des invasiven Potentials führt. Auch hierbei sollen die entsprechenden Stimulantien Verwendung finden.

Zusammenfassend soll unter Berücksichtigung aktueller Literatur diskutiert werden, inwiefern sich mögliche Unterschiede bzgl. der Expression und Regulation von CEACAM1 im „physiologischen“ Plazentamodell und malignen Jurkat- Zellen erklären lassen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

4.1.1.2 Hybridomzelllinie als Plazentamodell

Die Plazenta- Hybridomzellen ACI 81 und 88 stammen aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Kaufmann von der Technischen Universität in Aachen. Es handelt sich dabei um Zellen, die durch Hybridisierung zweier Ursprungszellreihen entstanden (Gaus *et al*, 1997; Funayama *et al*, 1997). Als Grundlage diente eine Primärkultur von Zellen des extravillösen Trophoblasten, die zwar in der Lage sind, die für die Invasivität der Plazenta notwendige Extrazellulärmatrix zu sezernieren, aber als Zelle keiner Proliferation mehr unterliegen und sich dementsprechend nicht mehr teilen. Zusätzlich wurde eine ständig proliferierende Tumorzelllinie verwendet, die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3, die einem malignen Gegenstück des extravillösen Trophoblasten entspricht. Diese Eigenschaften der Ursprungszellen bedingen die Entstehung der beschriebenen Hybridomzelllinien. Die daraus hervorgegangenen Klone, die letztendlich als Plazentamodell für die Zellkultur geeignet waren, sind in der Lage, eine Extrazellulärmatrix zu sezernieren und somit das Verhalten des invasiven extravillösen Trophoblasten zu simulieren. Darüber hinaus haben diese Zellen die Proliferationsfähigkeit des Chorionkarzinoms übernommen, so dass sie dauerhaft in Kultur gehalten werden können. Die Klone „81“ und „88“ sind für die zugrundeliegende Arbeit besonders interessant, da sie über eine unterschiedliche Basalexpression von CEACAM1 verfügen.

Die extravillösen Trophoblastzellen wurden aus dem Chorion laeve des dritten Trimenons gewonnen, welches frei von villösen Trophoblastzellen und sich teilenden Stammzellen ist. Die Zellen wurden aufgearbeitet und anhand von Immunmerkmalen selektiert, da ausschliesslich die Zellen des extravillösen Trophoblasten in der Plazenta das Enzym hPLAP (*human placental alkaline phosphatase*) exprimieren. Die Zellen der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 ihrerseits wurden so vorbehandelt, dass sie nicht mehr über ein Enzym namens

HGPRT (*Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase*) verfügen, ein entscheidendes Enzym im Zusammenhang mit dem Purinbasenabbau. Eine nach der Hybridisierung durchgeführte Behandlung mit Azaserin konnten nur diejenigen Tumorzellen überstehen, die tatsächlich mit den Zellen des extravillösen Trophoblasten fusioniert waren und von deren Wildtyp- Variante des Enzyms profitieren. Somit wurde gewährleistet, dass die neu entstandenen Hybridomzellen nicht von sich schneller teilenden Chorionkarzinomzellen überwuchert werden.

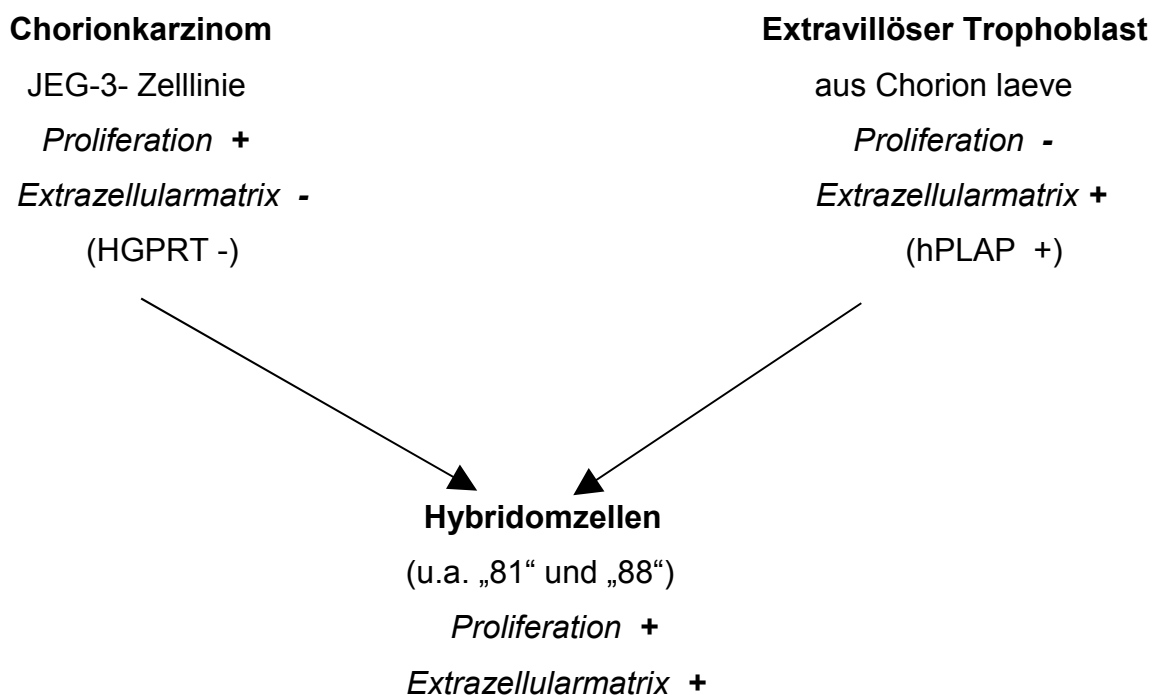


Abbildung 4.1: Schema der Entstehung der Hybridomzelllinie durch Mutation, Selektion und Klonierung

4.1.1.2 Jurkat- Zellen

Bei der Jurkat- Zelllinie handelt es sich um käuflich erworbene Zellen einer akuten T- Zelleukämie eines 14jährigen männlichen Patienten. Der Klon mit der Bezeichnung E6-1 kann über die American Type Culture Collection, Manassa, USA, bezogen werden. In der vorliegenden Arbeit dient diese Zelllinie als Tumormodell.

4.1.2 Plasmide

Die einzelnen Plasmide waren im Labor der Arbeitsgruppe Bamberger als Bakterienstock bei -80°C vorhanden und wurden wie im Methodenteil beschrieben vermehrt. Darüber hinaus konnte mittels eines Restriktionsenzymverdau und einer Sequenzierung der spezifische Nachweis der jeweiligen Plasmide in den verschiedenen Ansätzen gewährleistet werden.

Das Grundgerüst für die Reportervektoren stellte der pGL3- Basic- Vektor der Firma Promega (Madison, USA) dar. Die Plasmide unterschieden sich in der Grösse der Inserts, dass heisst in diesem Fall der Grösse der unterschiedlichen Promotorabschnitte.

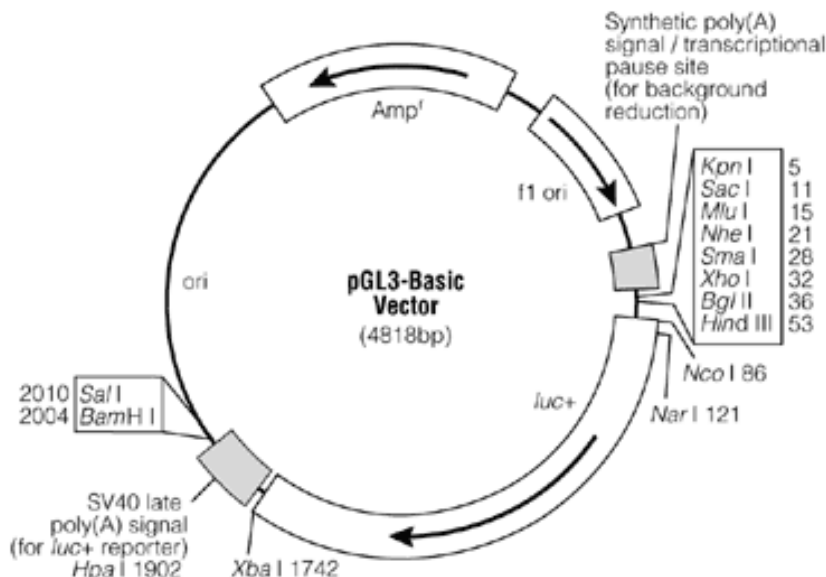


Abb. 4.2: Schema der Firma Promega (Madison, USA) für den pGL3- Basic- Vektor (4818 bp) mit entsprechenden Enzymbindungsstellen

<u>Plasmid</u>	<u>Grösse des Inserts</u>	<u>Enzym</u>
Plasmid # 1	4500 bp	Xma1
Plasmid # 2	2600 bp	Xma, Xba1
Plasmid # 3	545 bp	Acc1
Plasmid # 4	369 bp	Xoh1, Hind1
Plasmid # 5	198 bp	Xoh1, Hind1

Die einzelnen Plasmide sind nachfolgend in Relation zum CEACAM1- Promotor dargestellt. Die 2600 Basenpaare vor der Translationsstartstelle bzw. dem Luciferasegen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Diese sind entscheidend

4. Material und Methoden

für die Ergebnisse der Plasmidversuche und sind dementsprechend mit aufgeführt.

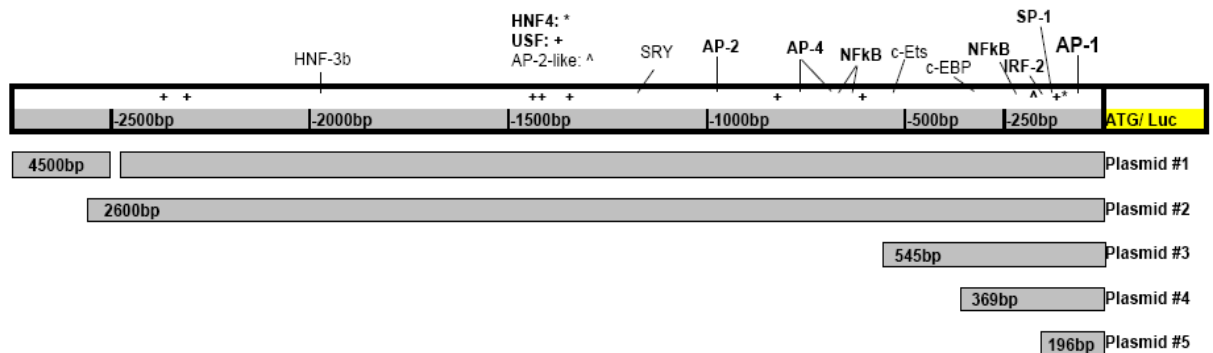


Abb. 4.3: Lage und Grösse der einzelnen Plasmide sowie mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen

4.1.3 Zellextrakte

Als Positivkontrolle für die Auswertung der Zellysate im Rahmen der Western-Blot- Untersuchungen diente das Zellextrakt der Melanomzelllinie „G 361“. Dieses Extrakt stammte aus der Abteilung für Klinische Chemie (UKE, Hamburg) und zeichnet sich durch einen besonders hohen Anteil an CEACAM1- Proteinen aus.

4.1.4 Antikörper

Der primäre Antikörper gegen CEACAM1 trägt den Namen 4D₁C₂ und stammt ebenfalls aus der Abteilung für Klinische Chemie (UKE, Hamburg). Charakteristisch für diesen monoklonalen Antikörper ist, dass er spezifisch CEACAM1, aber keine weiteren Vertreter der verwandten Immunglobulin Familie bindet.

4.1.5 verwendete Reagenzien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller/ Vertrieb</u>
Agarose Nu- Sieve	Bio- Rad Laboratories, USA
Ampicillin	Gibco, Paisley, UK
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Beta- Actin- Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bromphenolblau	Sigma, USA/ Steinheim
Cell Culture Lysis Reagent	Promega, USA
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva Electrophor. GmbH, Heidelberg
DNA Molecular Weight Marker VII	Roche, Mannheim
Dulbeccos Modified Eagles Medium	Cambrex, Bio Science, Belg.
Dulbecco´s Phosphat Buffered Saline	Gibco, Paisley, UK
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, England
ECL Anti-mouse IgG (with peroxidase)	GE Healthcare UK Limited, UK
Essigsäure, zur Analyse, 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	J.T.Baker, Holland
Ethidiumbromid	Sigma, USA/ Steinheim
Fetal Bovine Serum	Gibco, Paisley, UK
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt granuliert	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L- Glutamin 200mM (100x)	Gibco, Paisley, UK
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol, zur Analyse	J.T.Baker, Holland
Natriumchlorid, zur Analyse	Merck, Darmstadt
NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen, Carlsbad, USA

4. Material und Methoden

NuPAGE SeeBlue Plus2	Invitrogen, Carlsbad, USA
Längenmarker	
NuPAGE Transfer Buffer (20X)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nutrient Mixture F-12 HAM	Sigma, USA/ Steinheim
Penicillin- Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
Plus Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Reporter Lysis Buffer, 5x	Promega, USA
RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodium Chloride	J.T.Baker, Holland
TAE/ TBE- Puffer	Roth, Karlsruhe
TEMED	Bio- Rad Laboratories, USA
Tris-Buffered Saline (TBS), 10x	Bio- Rad Laboratories, USA
Tris	Sigma, USA/ Steinheim
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco, Paisley, UK
Trizma base, minimum 99,9% titration	Sigma, USA/ Steinheim
Trypsin- EDTA (1x)	Gibco, Paisley, UK
Trypton- Wasser	Merck, Darmstadt
TWEEN 20	USB Corporation, USA
Weight Marker (rainbow coloured)	Amersham Biosciences, England

4.1.6 sonstige Materialien

6- und 24- well- plates	Sarstedt, Nürnberg
12- well- plates	Nunc, Denmark
BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
BD BIOCOAT Cell Culture Inserts	BD, Bedford, MA, USA
BD BIOCOAT Matrigel Invasion Chamber	BD, Bedford, MA, USA
Gel Blotting Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Gene Pulser Küvette	Bio- Rad Laboratories, USA
Halb- Mikro- Küvette	Sarstedt, Nürnberg
Hyperfilm	Amersham Biosciences, England
Millipore Membran	Millipore Corporation, USA

NuPAGE 4- 12% Bis- Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Präzisionsküvette aus Quarz	Hellma, Müllheim
Safeseal Tips Premium	Biozym, Wien
Serological Pipets, Falcon advantage	Becton Dickinson Labware, France
Zellkulturflaschen 25 und 75cm ²	Sarstedt, Nürnberg

4.2 Methoden

4.2.1 Zellen

4.2.1.1 Zellkultur

Hybridome:

Die Hybridomzelllinien mit der Bezeichnung „81“ und „88“ wurden in 25- 75cm² Zellkulturflaschen für adhärent wachsende Zellen gehalten. Im Zellinkubator (HERAcell, Heraeus Instruments) wuchsen die Zellen bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% als Monolayer bis zu einer Konfluenz von 90- 95%, um dann „gesplittet“, d.h. auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt zu werden. Hierzu wurde das Kulturmedium (Nutrient Mixture F-12 HAM, DMEM mit 4,5g/L Glukose, 10% FCS, 1% L- Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) mit Pasteurpipetten abgesaugt, die Zellen mit PBS (Gibco) gewaschen und mit Trypsin- EDTA (Gibco) benetzt, um die Zellkontakte zu lösen. Das Trypsin- EDTA wurde dann mit einer entsprechenden Menge Nährmedium inaktiviert und im Rahmen eines Mediumwechsels am darauffolgenden Tag vollständig entfernt. In Abhängigkeit von der ausplattierten Zellzahl wurde dieser Vorgang zweimal die Woche durchgeführt.

Jurkat:

Im Gegensatz zu den Hybridomen handelt es sich bei der Jurkat- Zelllinie um Tumorzellen, die in Suspension wachsen. Das Kulturmedium bestand aus RPMI- Medium (Gibco) mit 10% FCS, 1% L- Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden in Abhängigkeit von ihrer Konfluenz zweimal die Woche in neue 75cm²- Zellkulturflaschen für Suspensionszellen (Sarstedt) umgesetzt. Hierfür wurde ein Teil der ursprünglichen Zelllösung mit zwei Teilen

frischen Kulturmediums ausgedünnt und bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator (HERAcell, Heraeus Instruments) kultiviert.

4.2.1.2 Ausplattieren der Zellen

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen in 6- oder 12- well- Platten ausplattiert. Hierzu wurden die zur gewünschten Konfluenz gewachsenen Zellen, nachdem sie gelöst, gewaschen und abzentrifugiert wurden, in Suspension genommen. Ein Teil dieser Suspension wurde mit Trypan- Blau verdünnt und die Zellzahl mit der Neubauer- Zählkammer (Labor Optik) ermittelt. Der Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadrat multipliziert mit dem Faktor 10.000 und verrechnet mit der Vorverdünnung ergab die Anzahl der Zellen pro ml Suspension. Diesem Ergebnis entsprechend wurde das Ausplattieren der gewünschten Zellzahl des anstehenden Versuches vorgenommen.

4.2.1.3 Stimulation der Zellen

Die für die Versuche bestimmten Zellen wurden wie beschrieben ausplattiert und über Nacht in FCS- haltigem Medium inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurde das Medium gegen ein Stimulationsmedium (Hybridome: DMEM und HAM F-12; Jurkats: RPMI- Medium) ohne weitere Zusätze ausgetauscht und wiederum für 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit vorbereitetem Medium bedeckt, das wiederum die gewünschten Stimulantien in Form von Hormonen und Zytokinen, jedoch kein FCS enthielt. Die Stimulationsdauer im Zellinkubator betrug circa 18 Stunden, so dass die Zellen am nächsten Tag geerntet und weiterverarbeitet werden konnten.

4.2.1.4 Ernte der Zellen

Die Zellen wurden zum Ende eines Versuchs geerntet und zwecks Lyse in einem speziellen Puffer tiefgekühlt. Während die adhärent wachsenden Hybridome mit Hilfe eines „Cell Scrapers“ (Sarstedt) vom Boden der well-Platten gelöst werden mussten, konnten die Jurkats als Suspension einfach abpipettiert werden. In beiden Fällen wurden die Zellen abzentrifugiert (5000rpm für 5 Minuten, Biofuge pico, Heraeus Instruments) und mit PBS- Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden das Zellpellet in 50- 100µl CCLR- Puffer aufgenommen und bei -20°C weggefroren. Für die Transfektionsversuche kam im Sinne der Auswertung der Reporter Lysis Buffer zur Anwendung.

4.2.2 Western Blots

4.2.2.1 Proteinmessung

Die für die Analyse im Rahmen einer Western Blot- Analyse notwendige Konzentration der Zelllysate wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay- Kits von Pierce gemessen. Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurde zunächst eine Standardkurve erstellt, deren Werte bei der Messung als Referenzen dienen sollten. Die Zelllysate (in CCLR- Puffer) wurden aufgetaut und 5 Minuten bei 13.000rpm in der Biofuge pico (Heraeus Instruments) abzentrifugiert, bevor der Überstand in ein neues Tube überführt wurde. Die einzelnen Proben wurden 1: 10 mit Aqua dest. verdünnt und auf zwei Tubes a 50µl verteilt. Diese und die Proben der Standardkurve wurden mit 1ml BC Assay- Reagenz (Reagenz A: Reagenz B= 50:1) ergänzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die dabei entstehende Veränderung der Färbintensität korrelierte zum Proteingehalt der Probe und konnte mit Hilfe eines Spektrometers (SmartSpec 3000, Biorad) bei Raumtemperatur und 565 Nanometer gegen die Standardkurve gemessen werden. Aus den doppelten Ergebnissen einer Probe wurde der Mittelwert gebildet.

4.2.2.2 SDS-Page

Im nächsten Schritt wurden die Proteine einem Western Blot- System zugeführt, das eine Auftrennung des Zelllysats entsprechend des Molekulargewichtes einzelner Proteine ermöglicht. Grundlage hierfür war die sogenannte NuPAGE- Kollektion der Firma Invitrogen, die aufgrund fertig gegossener Gele und angesetzter Lösungen eine optimale Qualität und Vergleichbarkeit der Methode gewährleistete.

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der Tatsache, dass ein anionisches Detergens (Natriumdodecylsulfat- SDS) an durch Hitzebehandlung denaturierte Proteine bindet. Die Anzahl der sich anlagernden SDS- Moleküle steht in direkter Korrelation zu dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins. Die Höhe des Molekulargewichtes wurde bestimmt durch einen ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Längenmarker.

4.2.2.3 Probenvorbereitung

Um die CEACAM1- Expression in den einzelnen Proben vergleichen zu können war es entscheidend, jeweils die gleiche Menge an Proteinen aus den Zelllysaten einzusetzen. Diese Menge betrug zwischen 20µg und 50µg, in Abhängigkeit von den vorausgegangenen Konzentrationsbestimmungen. Da ebenfalls ein definiertes Gesamtvolumen (20µl bis 30µl) für jede Probe angestrebt wurde glich man die Differenz der entsprechend höher konzentrierten Proben mit CCLR- Puffer aus, der schon beim Ernten der Zellen Anwendung fand. Ergänzt wurde dieser Ansatz durch den Probenpuffer und das Sample Reducing Reagenz. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte der Melanomzelllinie „G361“ (Klinische Chemie, UKE, Hamburg), deren CEACAM1- Gehalt jedoch so hoch war, dass pro Gel nur 5µg Protein eingesetzt wurden.

Im Wasserbad wurden die Proben für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, danach kurz auf Eis gekühlt und zwecks besserer Handhabung abzentrifugiert.

4.2.2.4 Gellauf

Die einzelnen Proben und die Positivkontrolle wurden wie beschrieben vorbereitet und für den Gellauf in die Taschen des Gels (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, 1.0mm X 10well, Invitrogen) pipettiert. Die Gradientengele boten den Vorteil, dass durch die höher konzentrierten Abschnitte im unteren Bereich des Gels mehr Proteine mit geringerem Molekulargewicht einer Detektion zugeführt werden konnten, während die hochmolekularen Proteine wie CEACAM1 im oberen Abschnitt des Gels gut aufgetrennt wurden. Als Längenmarker wurde der SeeBlue- Standardmarker der Kollektion verwendet und mit 10µl mit auf das Gel genommen. Die Gele wurden in einer Laufkammer fixiert, die einen geschlossenen Stromkreis darstellte und mit Laufpuffer aufgefüllt war. Die Laufzeit betrug bei 200 Volt in der von aussen mit Eis gekühlten Kammer circa 120 Minuten.

4.2.2.5 Blot

Nachdem eine Auftrennung innerhalb des Gels in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht stattgefunden hatte wurden die Proteine mit Hilfe einer Blot-Vorrichtung (Invitrogen) auf eine PVDF (polyvinylidene fluoride)-Transfermembran (Immobilon- P, Millipore) übertragen. Die Proteine wanderten hierbei von der Anode zur Kathode, wobei das Gel und die Membran von Schwämmen umgeben waren, die vorher circa 20 Minuten lang in Transfer-Puffer equilibriert wurden. Die Membran wurde vor Benutzung kurz in Methanol und Aqua dest. geschwenkt. Die Feldstärke betrug 30 Volt, die Dauer des Vorgangs 240 Minuten. Nach dem Blot wurden die Membranen an der Luft getrocknet und im Kühlschrank bei 4°C bis zur Entwicklung aufbewahrt.

4.2.2.5 Entwicklung der Blots

Die auf die Membran geblotteten Proteine wurden im letzten Schritt mit Antikörpern markiert und mit Hilfe einer gekoppelten Lichtreaktion ausgewertet.

4. Material und Methoden

Hierfür legte man die Membranen kurz in Methanol und spülte sie mit Aqua dest., bevor sie für 1 Stunde in PBST (Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline, Gibco, mit 0.1% TWEEN 20, USB Corporation) mit 5% Magermilchpulver inkubiert wurden. Dieser Vorgang diente dem Absättigen unspezifischer Bindungen. Nach dieser Zeit wurden die Membranen für 5 und 10 Minuten mit PBST gewaschen.

Der spezifisch CEACAM1 bindende Antikörper 4D1C2 (Klinische Chemie, UKE, Hamburg) wurde in 1:500 verdünnt und in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml in PBST mit 2,5% Magermilchpulver auf die Membranen gegeben. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden diese für 2x 5 und 1x 10 Minuten in PBST gewaschen. Der zweite Antikörper, der an den monoklonalen Antikörper gegen CEACAM1 bindet, war an ein Enzym gekoppelt, mit dessen Aktivität eine Detektion ermöglicht wurde (ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, GE Healthcare, UK). Dieser Antikörper wurde 1:8000 verdünnt und ebenfalls in PBST mit 2,5% Magermilchpulver für 1,5 Stunden inkubiert, bevor die Membranen für 1x 5 und 2x 10 Minuten mit PBST gewaschen wurden. Um die gebundenen Antikörper mittels einer Chemilumineszenz- Reaktion detektieren zu können, wurden die Membranen kurz mit einem Substratgemisch beträufelt, dessen Reaktion mit dem Enzym des Sekundärantikörpers eine Lumineszenz hervorruft, und in Klarsichtfolie eingeschweisst. Die Entstehung der kleinen Lichtblitze am Antikörper-komplex führte zu einer „Belichtung“ von ansonsten mittels Röntgenkassette von Licht geschützten Röntgenfilmen. Nach Belichtungszeiten, die den Versuchsvoraussetzungen entsprachen, wurden die Röntgenfilme in einer Photoentwicklungsmaschine verarbeitet und ausgewertet.

Nach der Entwicklung beabsichtigte man, die Membranen für weitere Detektionen zu verwenden. Für diesen Zweck wurden diese „gestrippt“, d.h., es wurden die Antikörper heruntergewaschen. Nachdem die Membranen kurz in TBS und für 30 Minuten in TBS mit 5% Magermilchpulver eingelegt wurden erfolgte nach einem Waschgang mit Aqua dest. der Stripvorgang mit Hilfe eines speziellen Puffers (83ml 3M NaCl+ 402ml Aqua dest.+ 15ml Essigsäure) für 20 Minuten. Dieser Vorgang wurde beendet, indem der Strip- Puffer gegen einen

Stop- Puffer (1,5M Tris-HCl, pH 7,5) ausgetauscht wurde. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Membranen mit Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet bzw. einer erneuten Detektion zugeführt.

Die für CEACAM1 entwickelten Membranen wurden alle in einem zweiten Schritt mit einem Antikörpernachweis gegen β - Actin (Invitrogen, USA) detektiert. Hierbei handelt es sich um ein Strukturprotein, das in grosser Menge in allen Zellen vorkommt und über dessen Detektion gewährleistet werden kann, dass auf allen Banden initial die gleich Menge an Protein aufgetragen wurde.

4.2.3 Transfektionsversuche

4.2.3.1 Maxipräparation der Plasmide

Das Ziel einer Maxipräparation ist die Vervielfältigung von Plasmiden, mit denen zuvor eine Bakterienkultur angeimpft worden war. Die Bakterienkulturen, die entsprechende Plasmide in sich trugen, wurden bei -80°C in einem Glycerolstock gelagert. Zum Zwecke der Präparation wurden die Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit einer sterilen Pipettenspitze in ein vorgewärmtes Kulturmedium überführt, welches aus 5g/L NaCl, 5g/L Hefe-Extrakt und 10g/L Trypton- Wasser in Aqua dest. bestand. Nach dem Autoklavieren dieser Lösung wurde diese mit $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin versetzt, um den Plasmid- haltigen Bakterien, die ein Resistenzgen trugen, einen Selektionsvorteil zu gewährleisten. Zur Vermehrung der Plasmide wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C unter ständigem Schwenken im Nährmedium inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die eigentliche Gewinnung der Plasmide mit Hilfe eines Präparationskits der Firma Qiagen (Plasmid Maxi Kit, Qiagen). Die Bakterien wurden in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) bei 4°C und 6000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Verarbeitung der Zellpellets erfolgte nach Anleitung des Quiagen- Kits und basierte auf einem System von Puffern, das eine Elution der DNA aus den lysierten Bakterien

ermöglichte. Zur anschließenden Präzipitation der DNA wurden die Suspensionen durch Isopropanol ergänzt und 45 Minuten lang in der Kühlzentrifuge bei 11.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in eisgekühltem 70%igen Ethanol gewaschen und abermals für 10 Minuten bei 11.000rpm zentrifugiert. Zum Abschluss wurde der Überstand abpipettiert und das luftgetrocknete DNA- Pellet in TE8- Puffer (10mM Tris/ HCl, pH 7,5) aufgenommen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 2 Tagen mit Hilfe einer Quarzküvette (Präzisionsküvette, Hellma) und eines Spektrometers (SmartSpec 3000, Bio-Rad).

4.2.3.2 Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung

Um die einzelnen Plasmidpräparationen auf ihren spezifischen Gehalt zu überprüfen wurde ein Verdau mittels Restriktionsenzymen vorgenommen. Die verwendeten Enzyme leisten dabei einen „Diagnostic cut“, welcher eine Auswertung mit einem Agarosegel ermöglicht. Für das Schneiden der Plasmide wurden folgende Enzyme im dazugehörigen Enzympuffer benutzt:

Plasmid # 126: PstI; # 127: XmaI; # 130: EcoRI; # 131: BamHI. Die Restriktionsenzyme der Firma Roche (USA) wurden mit entsprechenden Puffersystemen verwendet.

Die Ansätze wurden jeweils für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 1%- iges Agarosegel (Agarose in TBE- Puffer, Ethidiumbromid) aufgetragen. Zuvor wurden sie mit Bromphenolblau (Sigma) und einem Lastmarker versetzt. Der Gellauf betrug 2 Stunden bei 80V, die Auswertung erfolgte photographisch mit Hilfe einer UV- Kamera (UVP, San Gabriel, USA).

Darüber hinaus wurden die einzelnen Plasmide einer weiteren Untersuchung unterzogen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Universität in Toronto,

Kanada, fand eine Sequenzierung der Plasmidansätze statt, die eine abschliessende Beurteilung des Gengehalts der unterschiedlichen Konstrukte ermöglichte.

4.2.3.3 Transfektionen mit Lipofectamine

Um die adhärent wachsenden Plazentazellklone mit den Plasmiden des CEACAM1- Promotors zu transfizieren wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Das Prinzip dieser Anwendung besteht darin, dass durch Ultraschallbehandlung hergestellte Liposomen es der zugefügten DNA ermöglichen, über die Zellmembran in den Zellkern zu gelangen. Die in den Transfektionsversuchen verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Invitrogen (Lipofectamine Reagent und Plus Reagent, Invitrogen, USA). Das Plus Reagenz diente dazu, die DNA durch Komplexbildung für die kationische Lipofektion vorzubereiten und somit die Methode zu optimieren. Da für die Messung der Aktivität jeweils der Mittelwert aus drei Proben bestimmt werden sollte, wurden die Hybridomzellen wie beschrieben in 12- well- Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag begann man mit der Transfektion bei einer Konfluenz der Zellen von 50- 70%. Hierbei wurde das Kulturmedium gegen das Transfektionsmedium ausgetauscht, das in definierten Schritten entsprechend dem Invitrogen- Protokoll für eine 12- well- Platte zubereitet wurde:

1. Reaktion der Plasmid- DNA (0,7µg Plasmid pro well) mit dem Plus Reagenz (5µl Reagenz pro well) in ausreichend Stimulationsmedium (DMEM und HAM F-12, ohne weitere Zusätze) für 15 Minuten
2. Zugabe des vorverdünnten Lipofectamine Reagenz (2µl Reagenz pro well) und erneute Inkubation für 15 Minuten
3. Auffüllen des Ansatzes mit vorgewärmtem Stimulationsmedium auf ein Transfektionsvolumen von 0,5ml pro well

Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst mit Waschpuffer gewaschen und dann mit dem

Transfektionsansatz überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂, bevor der Transfektionsansatz durch das Stimulationsmedium mit den entsprechenden Stimulantien ersetzt wurde. Nach einer Stimulationsdauer von 15- 20 Stunden wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und mit Hilfe eines Lyse- Puffers bis zur Auswertung bei -80°C gefroren.

4.2.3.4 Transfektionen mit Elektroporation

Im Gegensatz zu den adhärent wachsenden Plazentazellen eigneten sich die T- Lymphome der Jurkat- Zellreihe als Suspensionszellen gut für die Methode der Elektroporation. Zum Zwecke der Transfektion einer Zelle mit den gewünschten CEACAM1- Promotorkonstrukten wurde diese einem elektrischen Impuls ausgesetzt, der die Zellmembran kurzzeitig permeabel machte und den Durchtritt der Plasmide ermöglichte. Die Jurkat- Zellen wurden bei entsprechender Konfluenz abzentrifugiert und in Stimulationsmedium (RPMI 1640, Gibco, UK, ohne weitere Zusätze) gewaschen und schliesslich resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl wurde in 0,4ml Stimulationsmedium aufgenommen und mit den Plasmiden versetzt. Die eingesetzte Plasmidmenge betrug zwischen 5µg und 20µg pro Ansatz. Nach dem Durchmischen des Ansatzes wurde dieser in eine spezielle Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, Bio- Rad) übertragen. Der eigentliche Vorgang der Elektroporation wurde mit Hilfe des Gene Pulser II der Firma Bio- Rad (Bio- Rad Laboratories, USA) vollzogen. Die Dauer des Stromstosses betrug bei 0,25kV und 0,95F zwischen 20ms und 30ms. Nach der Applikation des Stromes überführte man die Zellen in 20ml vorgewärmtes Kulturmedium, um eine Regenerationsphase von 1h bis 3h zu ermöglichen. Die offensichtlich durch die Behandlung zerstörten Zellen wurden zuvor mittels einer sterilen Pipettenspitze entfernt. Im Anschluss an die Regenerationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und in Medium ohne Zusätze für die Stimulation aufgenommen.

4.2.3.5 Stimulation nach Transfektion

Nachdem in den jeweiligen Zellsystemen eine Transfektion stattgefunden hatte wurden die Zellen mit Zytokinen und Hormonen stimuliert. Der Zweck dieser Stimulationen bestand darin, den Einfluss der Stimulantien auf den zu untersuchenden Promotorabschnitt nachzuweisen. Darüber hinaus erhoffte man sich, durch die Aktivierung der einzelnen Konstrukte Rückschlüsse über die Wirk- und Stoffwechselmechanismen treffen zu können. Für die Stimulationen wurden die Zellen weitestgehend von zusätzlichen Stimulationsfaktoren befreit, indem man das entsprechende Basismedium ohne Zusätze wie FCS, Antibiotika oder Glutamin verwendete. In diesem „Stimulationsmedium“ wurden folgende Zytokine und Hormone verdünnt: TPA, Ionomycin und Progesteron.

Die Werte der Stimulationen wurden gegen einen Leerwert gemessen, in diesem Fall Zellen, die zwar transfiziert, jedoch in Stimulationsmedium ohne Stimulanzen gehalten wurden.

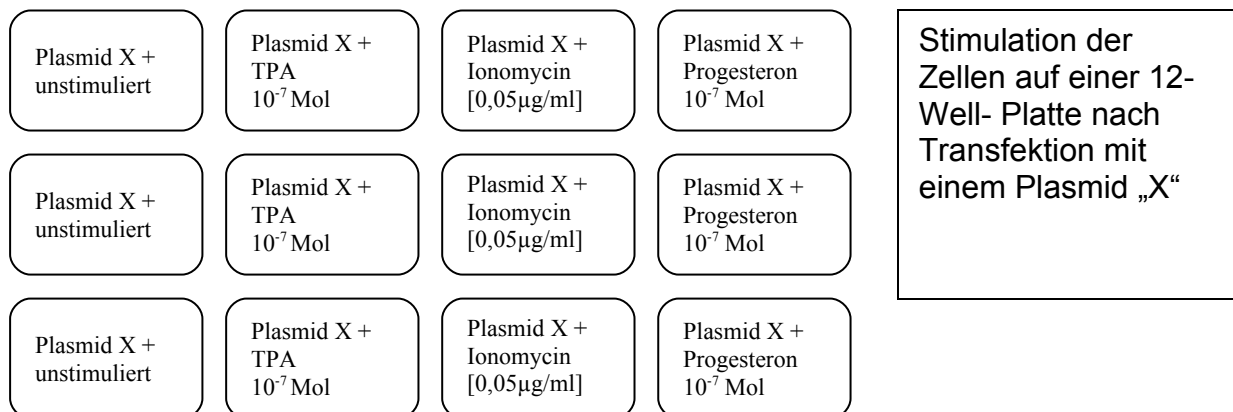


Abb. 4.4: Schema eines möglichen Versuchsaufbaus

Die Stimmulationszeiten betragen zwischen 17 und 20 Stunden. Anschliessend erfolgte die Ernte und Lyse der Zellen wie beschrieben.

4.2.3.6 Auswertung der Luciferase- Reaktion

Die Luciferasereaktion beruht auf einer enzymatischen Lichtreaktion, die aus den Glühwürmchen bekannt ist. Um die Zelllysate auswerten zu können wurden diese aufgetaut und kurzzeitig bei 13.000rpm (Biofuge pico, Heraeus) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 20µl in die Reaktionsgefässe eines Luminometers (Lumat LB 9507, EGG Berthold) pipettiert. In diesen Gefässen verursachte die in den Zelllysaten enthaltene Luciferase zusammen mit einer Substratlösung (Luciferase Assay System, Promega) eine Lichtreaktion, die proportional zu der Promotoraktivität in den Zellen ist. Diese wurde vom Gerät gemessen und Zahlenwerte umgesetzt. Sämtliche Luciferaseversuche wurden in Triplets angesetzt, aus denen automatisch der Mittelwert samt Standardabweichung gebildet wurde.

4.2.4 Invasionsassay

4.2.4.1 Versuchsaufbau

Mit Hilfe von „Invasionassays“ sollte abschliessend eine funktionelle Rolle des Proteins CEACAM1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 88 einem Versuchsaufbau zugeführt, der es ermöglichte, deren invasives Potential zu messen. Hierfür wurde die „BD BIOCOAT Matrigal Invasion Chamber“ verwendet, die nachfolgend als Invasionsassay bezeichnet werden soll.

Das Prinzip dieses Versuchsaufbaus ist es, eine definierte Zahl an Zellen auf einer künstlichen Basalmembran auszusetzen und nach entsprechender Inkubationszeit die Zellen auszuzählen, die aufgrund ihres invasiven Potentials in der Lage waren, die Basalmembran zu durchdringen. Diese *in vitro*-Membran wird gebildet von Basalmembrananteilen aus Engelbreth-Holm-Swarm- Sarkomzellen der Maus und befindet sich auf Poren mit einer Grösse von jeweils 8 µm. Anteile von Kollagen Typ4, Laminin, Heparansulfatproteoglykan, Entactin und verschiedenen Wachstumsfaktoren sorgen dafür, dass diese Membran ausschliesslich von invasiven Zellen

überwunden werden kann. Es erfolgte jeweils eine Verrechnung mit einem Kontrollwert.

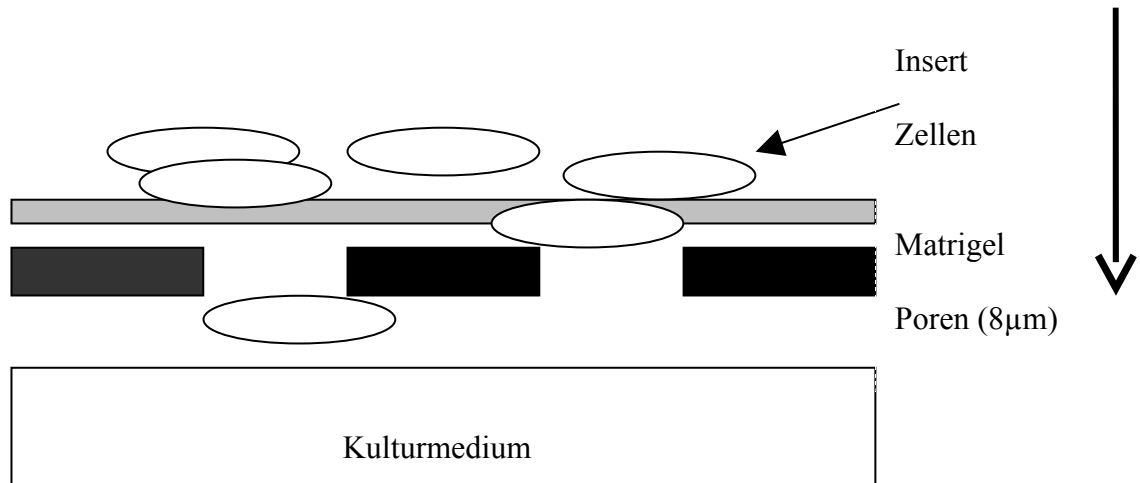


Abb. 4.5: Schematische Darstellung eines wells bzw. einem Insert mit den von Matrigel bedeckten Poren

4.2.4.2 Durchführung der Invasionsassays

Die Zellen wurden vor der Durchführung des Assays wie bereits beschrieben in der Zellkultur vorbereitet und mit entsprechenden Zusätzen stimuliert. Hierbei fanden die gleichen Hormone und Zytokine wie bei den vorangehenden Versuchen Verwendung, namentlich TPA [$10^{-7}M$], Ionomycin [$0,05\mu g/ml$], Progesteron [$10^{-7}M$] sowie der CEACAM1- spezifische Antikörper 4D1C2 [$1\mu g/ml$]. Während der hierfür benötigten Inkubationszeit wurde das Invasionsassay-Kit von $-20^{\circ}C$ auf Raumtemperatur gebracht und die Matrigel Matrix in den Inserts mit $500\mu l$ $37^{\circ}C$ warmen Basalmedium (entsprechend dem Kulturmedium) rehydriert. Im Anschluss wurde die Invasionskammer für 2 Stunden im Inkubator erwärmt.

Die Zellen wurden dann wie beschrieben aus den wells gelöst und gezählt, da jeweils nur ca. 50.000 Zellen pro Insert Verwendung fanden. Die Inserts wurden dem Versuchsaufbau entsprechend so angeordnet, dass jedem Matrigel-Insert ein Kontrollinsert ohne Membran zugeordnet wurde. In die dazugehörigen wells

gab man 750µl frisches Nährmedium. Nachdem in diese präparierten Inserts die gewünschte Zahl an Zellen pipettiert wurde, fand eine 48stündige Inkubation bei 37°C statt.

Im Rahmen der Auswertung dieser Versuche wurden die Inserts nun zunächst gefärbt. Hierfür fand eine vorgefertigte Färbereihe der Firma Dade Behring (Düdingen, Schweiz) Verwendung, die eine Fixierlösung, zwei Färbelösungen sowie zwei Spülgänge mit Aqua dest. beinhaltet. Die so gefärbten Membranen wurden dann an der Luft getrocknet und mit Hilfe eines Skalpells aus den Inserts gelöst. Anschliessend wurden die Membranen auf einem Objektträger fixiert und wiederum für 20 Minuten getrocknet.

4.2.4.3 Auswertung der Invasionsassays

Für die Auswertung der Invasionsassays mussten die getrockneten und auf einem Objektträger fixierten Membranen einer mikroskopischen Zählung zugeführt werden. Hierbei wurden jeweils drei unterschiedliche Bereiche einer Membran ausgezählt, um über den Mittelwert die Zellmenge, die in der Lage war, die Membran zu überwinden, möglichst genau erfassen zu können. Analog wurde mit den Kontrollmembranen verfahren, so dass nach der Zählung eine Aussage darüber getroffen wurde, wie hoch der Anteil der invasiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe war. Alle Versuche wurden drei Mal wiederholt. Als interne Kontrolle dienten die invasiven MDA- Zellen einer Mammakarzinomzellreihe.

5. Ergebnisse

In dem folgenden Teil der Arbeit sollen die Ergebnisse der Versuchsauswertungen dargestellt werden. Die Reihenfolge ist bestimmt durch den Aufbau der Untersuchungen.

5.1 Regulation von CEACAM1 auf Proteinebene

In diesem Versuchsteil wurde die Regulation von CEACAM1 auf Proteinebene untersucht. Mit Hilfe von Western Blots wurde zunächst die endogene, also unstimulierte CEACAM1- Expression in verschiedenen Zellreihen ermittelt, welche im Folgenden gesondert beschrieben werden soll. In weiteren Schritten wurden unterschiedliche Stimulationsschemata (TPA, Ionomycin, Progesteron, Estradiol, Dexamethason) getestet, um mögliche Ansätze für die Regulation der CEACAM1- Expression zu testen. Die Variation der Menge der zugegebenen Stimulantien, deren Kombination sowie die Einwirkdauer auf verschiedene Zellsysteme waren entscheidende Parameter für die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. Die Hybridomzelllinie diente als Tumormodell, das im Rahmen einer Schwangerschaft einer physiologischen Regulation unterliegen soll. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Regulation von CEACAM1 in der Plazenta mit der Regulation in malignen Jurkat- Zellen zu vergleichen, um etwaige Unterschiede aufzudecken.

5.1.1 CEACAM1 in der Hybridomzelllinie ACI 81

Die Versuche zur Expression und Stimulierbarkeit von CEACAM1 wurden zunächst mit Hilfe der Plazenta- Hybridomzelllinie „ACI 81“ durchgeführt. Die Abb. 5.1.1 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Untersuchung. Der Balken in der Bande Nr. 1 zeigt die endogene Expression von CEACAM1 der „ACI 81“- Zellen nach Inkubation in Stimulationsmedium ohne weitere Zusätze. Zu bemerken ist die relativ schwache Expression im Vergleich zur Positivkontrolle in Bande Nr. 7 (s. u.). Interessanterweise färbt sich CEACAM1 in diesem

Zellsystem bei einer Molekulargröße von circa 95 Kilodalton an. Die Anfärbung in der 2. Bande entspricht der Expression von CEACAM1 nach 24- stündiger Stimulation mit TPA in einer Konzentration von $10^{-7}M$. Hierbei lässt sich als wichtiges Ergebnis festhalten, dass es zu einer deutlichen Induktion, d. h. einer das endogene Vorkommen übersteigenden Expression von CEACAM1 kommt. Die Banden Nr. 3- 6 hingegen zeigen, dass folgende Zytokine und Hormone alleine keinen reproduzierbaren Einfluss auf die CEACAM1- Expression haben: Ionomycin, Progesteron, Estradiol und Dexamethason. Die Bande Nr. 7 entspricht der Anfärbung der Melanomzelllinie „G361“ als Positivkontrolle. Da dieses Zellextrakt über eine hohe endogene Konzentration von CEACAM1 verfügt wurde bei Auftragen der Gele nur ein Bruchteil der Proteinmenge des übrigen Blots verwendet (circa $5\mu g$). Dies verdeutlicht die relativ schwache Expression von CEACAM1 in den Hybridomzellen.

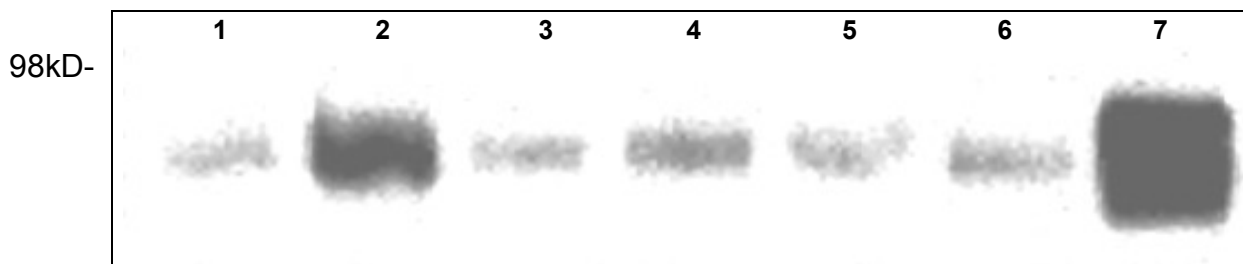


Abb. 5.1.1: Western- Blot- Analyse von Lysaten der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 81

1. nicht stimuliert
2. TPA [$10^{-7}M$]
3. Ionomycin [$0,01\mu g/ml$]
4. Progesteron [$10^{-7}M$]
5. Estradiol [$10^{-7}M$]
6. Dexamethason [$10^{-7}M$]
7. Positivkontrolle G361

Die Auswertung des Western- Blots setzt voraus, dass in allen Banden des Gels die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Diese Vergleichbarkeit kann durch eine zweite Anfärbung des Blots mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Strukturprotein "beta- Actin" gewährleistet werden. Die Abb. 5.1.2 zeigt diese Färbung des zuvor beschriebenen Blots und soll exemplarisch dargestellt werden. Wie bereits erwähnt zeigt sich in Bande Nr. 7 nur ein sehr geringer Proteinanteil.

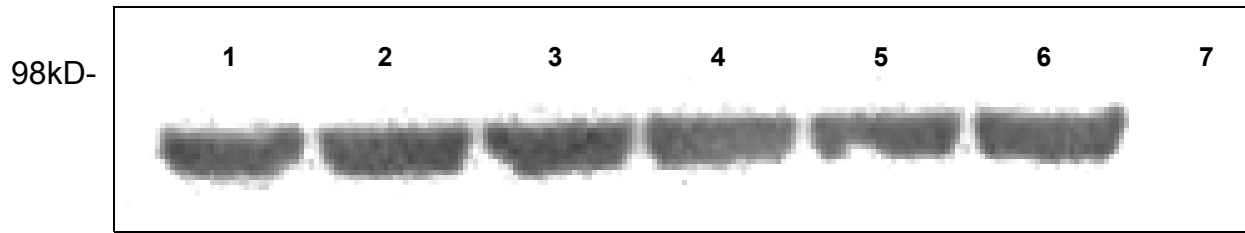


Abb. 5.1.2: Western- Blot- Analyse von Lysaten der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 81, beta-Actin- Ladungskontrolle

5.1.2 Kombination von Stimulantien in der Hybridomzelllinie ACI 81

In den vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass von den getesteten Stimulantien nur TPA eine entscheidende Zunahme der CEACAM1-Expression bewirkt. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern sich die TPA- induzierte CEACAM1- Expression durch weitere Stimulantien (Ionomycin, Progesteron, Estradiol und Dexamethason) beeinflussen lässt und ob eventuelle Wechselwirkungen auftreten. Die Abb. 5.1.3 stellt das Ergebnis des entsprechenden Versuchs dar. Wie bereits zu Abb. 5.1.1 erläutert befindet sich in Bande Nr. 1 die endogene CEACAM1- Expression der Hybridomzellreihe ACI 81. Diese schwache Expression liess sich durch eine 24- stündige Inkubation mit TPA ($10^{-7}M$) deutlich steigern (Bande Nr. 2). Im Weiteren sind Banden aufgeführt, die alle mit TPA und weiteren Substanzen inkubiert wurden. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, dass sich die TPA- induzierte Expression von CEACAM1 durch Zugabe von Ionomycin mit einer Konzentration von $0,01\mu g/ml$ weiter steigern liess (s. auch Abb. 5.1.4, Banden Nr. 4, 6, 8). In den Banden Nr. 3- 6 wurden TPA und Ionomycin, die zu einer maximalen CEACAM1- Induktion führten, mit weiteren Hormonen kombiniert. Während Estradiol und Dexamethason keinen reproduzierbaren Einfluss auf die CEACAM1- Expression hatten, konnte für Progesteron ein hemmender Effekt nachgewiesen werden. In der Bande Nr. 4 wurde diese Hemmung für die Kombination mit TPA und Ionomycin, in Abb. 5.1.5 nur in Kombination mit TPA nachgewiesen. Dieser Effekt ist insofern bemerkenswert, als dass die Wirkung von Progesteron alleine im Hybridomzellsystem keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von CEACAM1 hatte (vgl. Abb. 5.1.1).

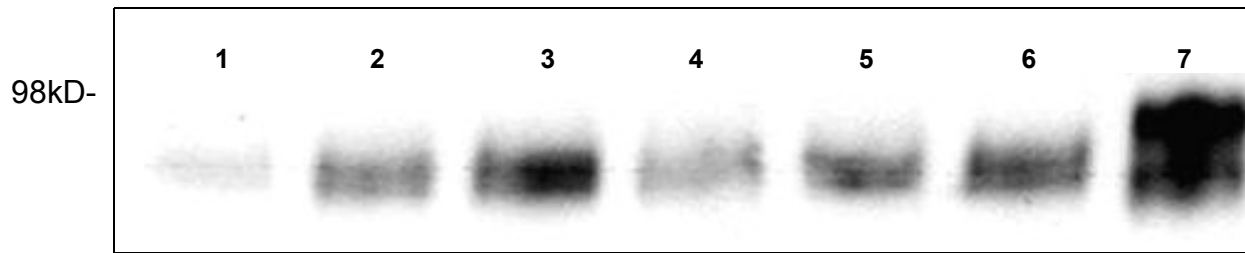


Abb. 5.1.3: Western-Blot- Analyse von Lysaten der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 81

1. nicht stimuliert
2. TPA [$10^{-7}M$]
3. TPA [$10^{-7}M$] + Ionomycin [$0,01\mu g/ml$]
4. TPA [$10^{-7}M$] + Ionomycin [$0,01\mu g/ml$] + Progesteron [$10^{-7}M$]
5. TPA [$10^{-7}M$] + Ionomycin [$0,01\mu g/ml$] + Estradiol [$10^{-7}M$]
6. TPA [$10^{-7}M$] + Ionomycin [$0,01\mu g/ml$] + Dexamethason [$10^{-7}M$]
7. Positivkontrolle G361

5.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Induktion durch Ionomycin

In Abb. 5.1.3 wurde bereits gezeigt, dass Ionomycin einen stimulierenden Einfluss auf die CEACAM1- Expression in der Hybridomzelllinie ACI 81 hatte. Während die Zugabe von Ionomycin alleine die Expression nicht beeinflusste (vgl. Abb. 5.1.1), liess sich in Abb. 5.1.3 ein deutlicher Effekt in Kombination mit TPA nachweisen. Um dieses Verhalten genauer beurteilen zu können, wurde die Abhängigkeit der Induktion von der Konzentration von Ionomycin untersucht. Die Abb. 5.1.4 zeigt folgendes Ergebnis: In der ersten Bande findet sich die kaum vorhandene endogene CEACAM1- Expression der Hybridomzellreihe ACI 81. Diese basale Expression liess sich durch die alleinige Zugabe von Ionomycin in verschiedenen Konzentrationen nicht steigern (Bande Nr. 3, 5, 7). Die Bande Nr. 2 zeigt die Induktion der CEACAM1- Expression durch TPA ($10^{-7}M$). In den Banden Nr. 4, 6 und 8 wurde nun diese Induktion mit abfallenden Ionomycinkonzentrationen kombiniert. Das überraschende Ergebnis dieses Versuches ist, dass die niedrigste Konzentration von Ionomycin ($0,01\mu g/ml$ in Bande Nr. 8) über 24 Stunden Inkubation zu einer stärkeren Induktion zusammen mit TPA führte als höhere Konzentrationen (Bande Nr. 4 und 6).

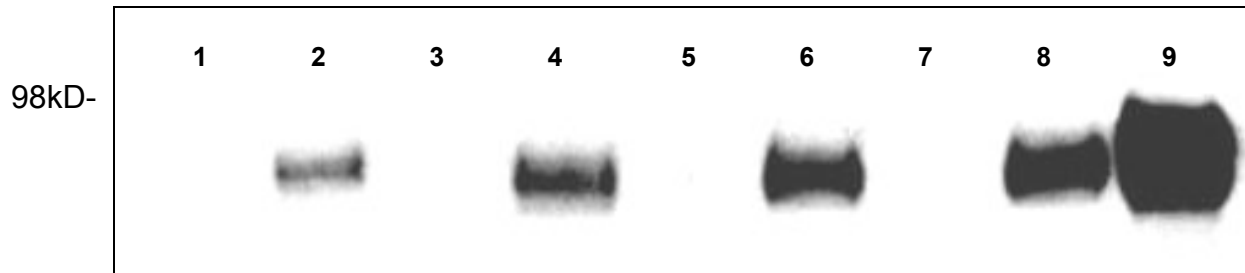


Abb. 5.1.4: Western- Blot- Analyse von Lysaten der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 81

1. nicht stimuliert
2. TPA [10⁻⁷M]
3. Ionomycin [0,1µg/ml]
4. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,1µg/ml]
5. Ionomycin [0,05µg/ml]
6. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,05µg/ml]
7. Ionomycin [0,01µg/ml]
8. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,01µg/ml]
9. Positivkontrolle G361

5.1.4 CEACAM1 in der Hybridomzelllinie ACI 88

Um auszuschliessen, dass die beschriebenen Effekte der Stimulationen mit Zytokinen und Hormonen spezifisch für die Hybridomzelllinie ACI 81 sind, wurde ein weiterer Klon untersucht (s. auch Material und Methoden). Besonders interessant für diese Versuche war die Hybridomzelllinie ACI 88, die über keine basale Expression von CEACAM1 verfügt. Das an der Zelllinie ACI 81 verwendete Stimulationsschema wurde nun an diesen Zellen getestet. Die Abb. 5.1.5 zeigt ein Ergebnis dieser Versuche. Die Bande Nr. 1 zeigt die praktisch nicht vorhandene Basalexpression der Hybridomzelle ACI 88. Nach 24 stündiger Inkubation mit Ionomycin war auch hier keine relevante Induktion nachweisbar (Bande Nr. 2). In Bande Nr. 3 spiegelt sich die Induzierbarkeit der CEACAM1- Expression durch TPA wieder, ein Effekt, der durch Progesteron antagonisierbar war (Bande Nr. 4). Wie auch in der Zelllinie ACI 81 hatten Estradiol und Dexamethason keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Regulation von CEACAM1. Den Nachweis, dass es sich bei den beschriebenen Banden um das gesuchte Protein handelt, erbringt die Positivkontrolle in Bande Nr. 7. Aus diesem Versuch lässt sich schliessen, dass die dargestellten Nachweise zur Stimulierbarkeit der CEACAM1- Expression durch Zytokine und Hormone für verschiedene Plazenta- Hybridomzelllinien gilt, unabhängig vom endogenen CEACAM1- Expressionsmuster.

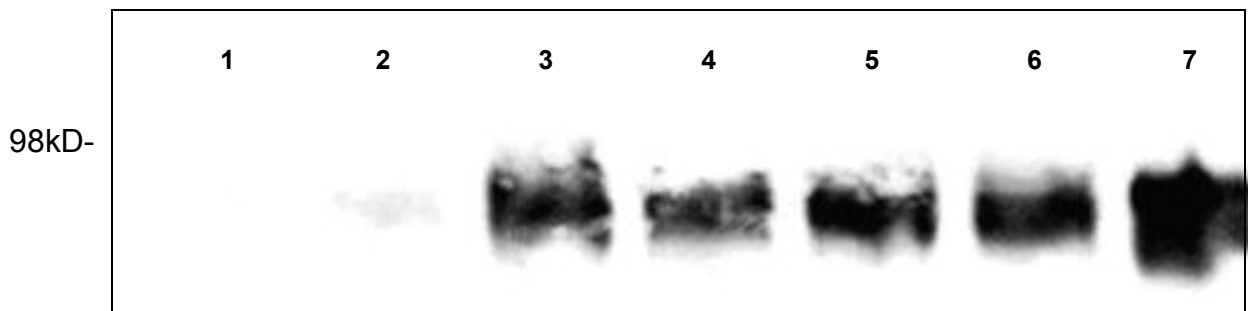


Abb. 5.1.5: Western- Blot- Analyse von Lysaten der Plazenta- Hybridomzelllinie ACI 88

1. nicht stimuliert
2. Ionomycin [0,01µg/ml]
3. TPA [10^{-7} M]
4. TPA [10^{-7} M] + Progesteron [10^{-7} M]
5. TPA [10^{-7} M] + Estradiol [10^{-7} M]
6. TPA [10^{-7} M] + Dexamethason [10^{-7} M]
7. Positivkontrolle G361

5.1.5 CEACAM1 in Jurkat- Zellen

In der vorliegenden Arbeit dient der Extravillöse Trophoblast als physiologisches Tumormodell für maligne Verhaltensmuster wie beispielsweise Invasivität und Beeinflussung von Immunantwort oder Angiogenese. Nachdem die Regulation des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in zwei Plazenta-Hybridomzelllinien auf Proteinebene untersucht wurde, sollten die gewonnenen Ergebnisse auf ein malignes Zellsystem übertragen werden. Hierbei handelte es sich um „Jurkat- Zellen“, eine Zellreihe von leukämischen T- Lymphozyten, die die Anforderung an die destruirenden Eigenschaften eines Malignoms erfüllen. Diese in Suspension wachsenden Zellen wurden nach entsprechender Vorbehandlung (s. Material und Methoden) den Stimulantien ausgesetzt, die bei der Untersuchung der Plazentazelllinien bereits Verwendung fanden. Die Western- Blot- Auswertung ist in Abb. Nr. 5.1.6 dargestellt. Als erstes Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Jurkat- Zellen über eine kaum vorhandene endogene Expression von CEACAM1 verfügten (Bande Nr. 1). Bande Nr. 2 zeigt, dass sich diese Expression durch die Zugabe von TPA deutlich steigern lässt. Dies ist ein Effekt, der auch bei den Hybridomzellen ACI 81 und 88 nach 24 Stunden beobachtet werden konnte. Interessant ist jedoch, dass sich die durch TPA induzierte Mehrexpression nicht durch eine zusätzliche Stimulation mit Ionomycin (0,01µg/ml) steigern liess. Dieser in Bande Nr. 3 zu

beobachtende Effekt steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem „physiologischen“ Plazentasystem. Die Zugabe von Progesteron zu TPA führte wiederum zu einer leicht verminderten Expression (Bande Nr. 4). Wie auch bei den Plazentazellen liess sich für die Hormone Estradiol und Dexamethason kein eindeutiger Effekt nachweisen. Die im Vergleich zur Positivkontrolle („G361“ in Bande Nr. 7) leicht veränderte Molekulargrösse von CEACAM1 lässt sich am ehesten durch unterschiedliche Glykolisierungszustände in verschiedenen Zellsystemen erklären.

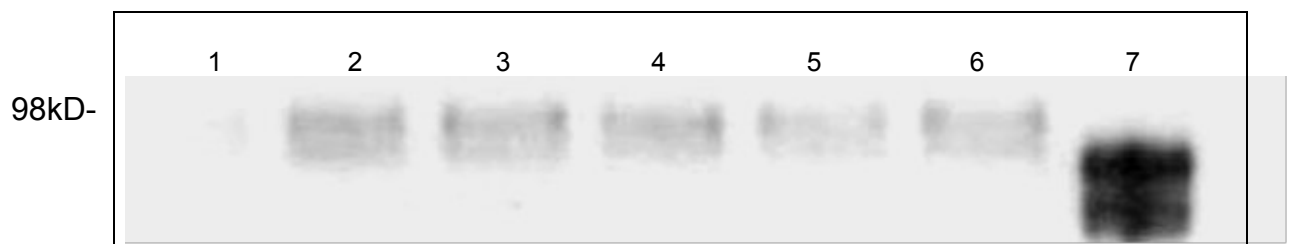


Abb. 5.1.6: Western- Blot- Analyse von Lysaten der Jurkat- T- Lymphomzelllinie

1. nicht stimuliert
2. TPA [10⁻⁷M]
3. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,01µg/ml]
4. TPA [10⁻⁷M] + Progesteron [10⁻⁷M]
5. TPA [10⁻⁷M] + Estradiol [10⁻⁷M]
6. TPA [10⁻⁷M] + Dexamethason [10⁻⁷M]
7. Positivkontrolle G361

5.2 Regulation des CEACAM1- Promotors

In den vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die CEACAM1-Expression auf Proteinebene durch verschiedene Zytokine und Hormone beeinflusst werden kann. Dies galt sowohl für die Plazenta- als auch für die Jurkat- Zelllinien. Im Rahmen der Transfektionen von Plasmiden sollte nun untersucht werden, welche Abschnitte des CEACAM1- Promotors durch die jeweiligen Stimulantien aktiviert werden. Zu diesem Zweck fanden verschieden lange Promotorabschnitte Verwendung, die im Abschnitt „Material und Methoden“ schon beschrieben wurden. Hier sollen die unterschiedlichen Insert-Grössen rekapituliert werden:

Plasmid # 1: 4500 Basenpaare

Plasmid # 2: 2600 Basenpaare

Plasmid # 3: 545 Basenpaare

Plasmid # 4: 369 Basenpaare

Plasmid # 5: 196 Basenpaare

Alle Abschnitte wurden in einen pGL-3-basic- Vektor (Promega) kloniert, der im Folgenden als Leerwert diente.

Als Stimulantien wurden die Substanzen eingesetzt, die schon bei den Western- Blot- Versuchen eine Wirkung auf die CEACAM1- Expression aufgewiesen hatten. Dies betraf TPA, Ionomycin und Progesteron. Die Hybridome wurden mittels Lipofectation, die Jurkat- Zellen mittels Elektroporation mit den Plasmiden transfiziert und über einen definierten Zeitraum mit den zu untersuchenden Stimulantien inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und der Auswertung mit Hilfe eines Luminometers zugeführt.

5.2.1 Transfektionen der Promotorplasmide in Hybridomzelllinie ACI 88

Wie auch im Rahmen der Western Blot- Versuche sollten die Transfektionen von Plasmiden zunächst in den Plazentazellen untersucht werden. Diese wurden entsprechend präpariert (s. Material und Methoden) und mit Lipofectamine versetzt, welches ein Eindringen der verschiedenen Plasmidkonstrukte in die Zellen ermöglichte. Die Abb. 5.2.1 zeigt die Auswertung eines Transfektionsversuches mit dem Plasmid # 2, welches über ein Insert von 2600 Basenpaaren verfügt. Dieses Plasmid beinhaltet den zweitgrössten Abschnitt des CEACAM1- Promotors (die genaue Lage inclusive verschiedener Bindungsstellen ist in den Abb. 5.2.5 und 5.2.6 dargestellt). Die systematische Aufarbeitung erlaubte einen Vergleich von vier Stimulationsansätzen auf einer 12- well- Platte. Die erste Bande in dem Schema zeigt die Höhe der Luciferaseaktivität in „Relative Light Units“, einer Einheit, die mit der Aktivität des jeweiligen Promotorabschnittes korreliert. In diesem Fall ergibt sich aus dem Wert die Grundaktivität, d. h. die Aktivität des 2600bp- langen Promoterabschnittes in den ACI „88“. Die zweite Bande zeigt den Wert dieses Promotorabschnittes nachdem die transfizierten Zellen für 24 Stunden mit TPA inkubiert wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Stimulation zu einer erhöhten Promotoraktivität ($p > 0,05$) führte. Analog zu den Stimulationsschemata aus den Western Blots wurde der Stimulation mit TPA Ionomycin hinzugefügt. Auf Proteinebene liess sich für die Hybridomzelllinien

eine deutliche Mehrinduktion nachweisen (vgl. Abb. 5.1.5). Die Abb. 5.2.1 lässt eine solche Interpretation für eine Aktivitätssteigerung des untersuchten Promotorabschnittes nicht zu (Bande Nr. 3), jedoch zeigte sich in der in Abb. 5.2.5 dargestellten Zusammenschau für die ACI 88, dass sich bei der Auswertung der verschiedenen Versuche sehr wohl eine leichte Induktion nachvollzogen werden kann. In der Bande Nr. 4 findet sich das Ergebnis für die Promotoraktivität nach Stimulation von TPA und Progesteron. Hierbei scheint die Aktivität des 2600bp- langen CEACAM1- Promotorabschnittes durch Progesteron nicht deutlich beeinflusst zu werden. Insbesondere lässt sich also festhalten, dass die Aktivität des untersuchten Promotorabschnittes durch TPA und Ionomycin zu steigern ist.

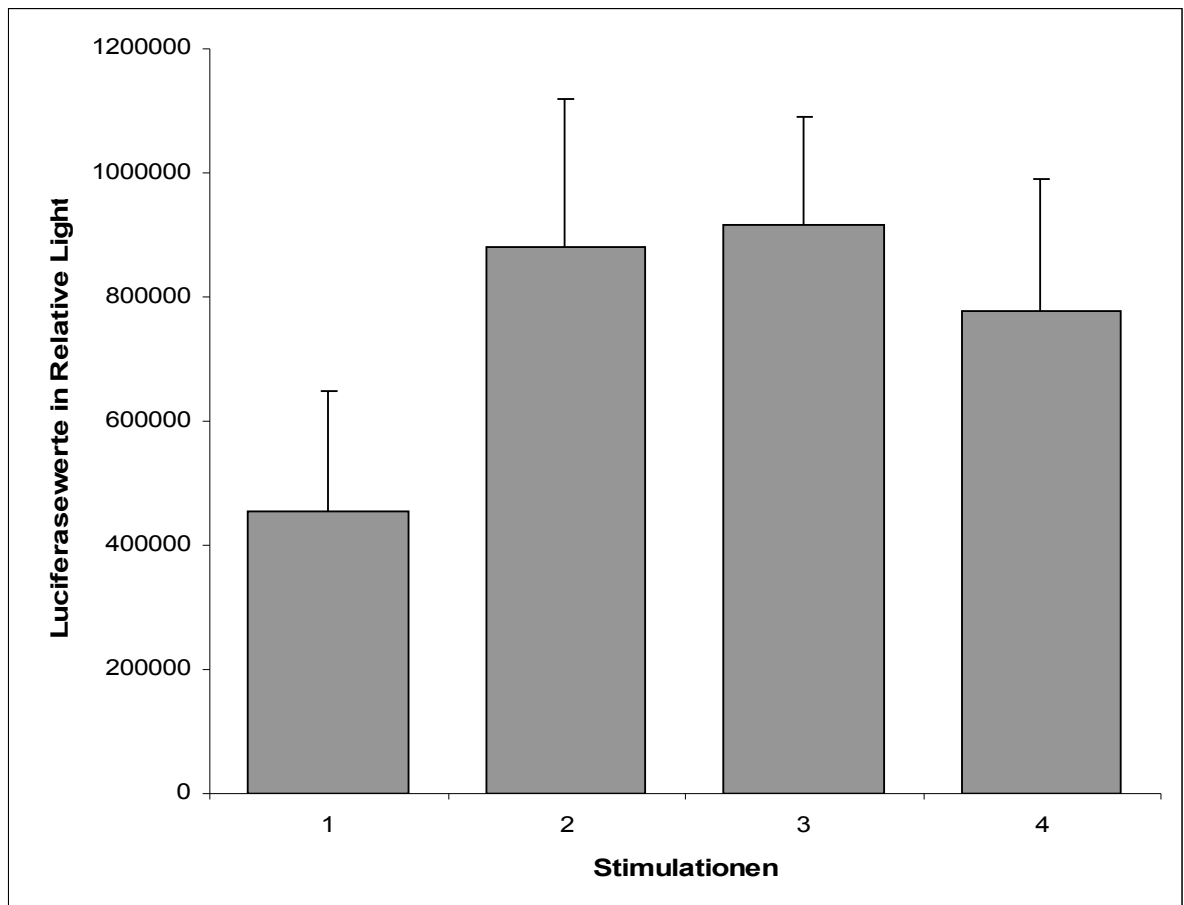


Abb. 5.2.1: Ergebnisse der Luciferasemessung für das Plasmids # 2 mit 2600bp in der Hybridomzelllinie ACI 88 nach 24h Stimulation

1. nicht stimuliert
2. TPA [10⁻⁷M]
3. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,05µg/ml]
4. TPA [10⁻⁷M] + Progesteron [10⁻⁷M]

In weiteren Versuchen wurden Promotorabschnitte unterschiedlicher Länge in die Plazentazelllinie ACI 88 transfiziert und den gleichen Substanzen ausgesetzt. Durch den Vergleich der Ergebnisse für verschiedene Abschnitte konnten genauere Aussagen über die spezifischen Stellen der Aktivierung getätigt werden. Die Abb. 5.2.2 zeigt die Auswertung eines im Vergleich eher kurzen Promotorabschnitts. Das Insert von Plasmid # 4 beträgt lediglich 369 Basenpaare und repräsentiert einen Abschnitt des CEACAM1- Promotors unmittelbar vor dem Beginn des Luciferasegens. Die Bande Nr. 1 zeigt abermals die Aktivität des Promotorabschnittes in den ACI 88 ohne dass eine zusätzliche Stimulation vorgenommen wurde. Eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Promotoraktivität liess sich durch eine Zugabe von TPA erreichen, wie in Bande Nr. 2 dargestellt. Wurde nun TPA mit Ionomycin kombiniert zeigte sich eine leichte Steigerung (Bande Nr. 3, vgl. Abb. 5.2.5), im Vergleich zur unstimulierten Aktivität nun deutlich signifikant ($p < 0,01$). Ein hemmender Einfluss von Progesteron liess sich auch für diesen Abschnitt des CEACAM1- Promotors nicht nachweisen. Die Auswertung dieses Versuches gibt Hinweise auf mögliche Bindungsstellen der Endprodukte der Stoffwechselwege von TPA und Ionomycin. Es ist also festzuhalten, dass der Einfluss der Stimulantien sowohl auf Plasmid # 2 als auch auf Plasmid # 4 einen gleichsinnigen Effekt hat, sich die Induktion in Bezug auf die Absolutwerte jedoch unterscheidet.

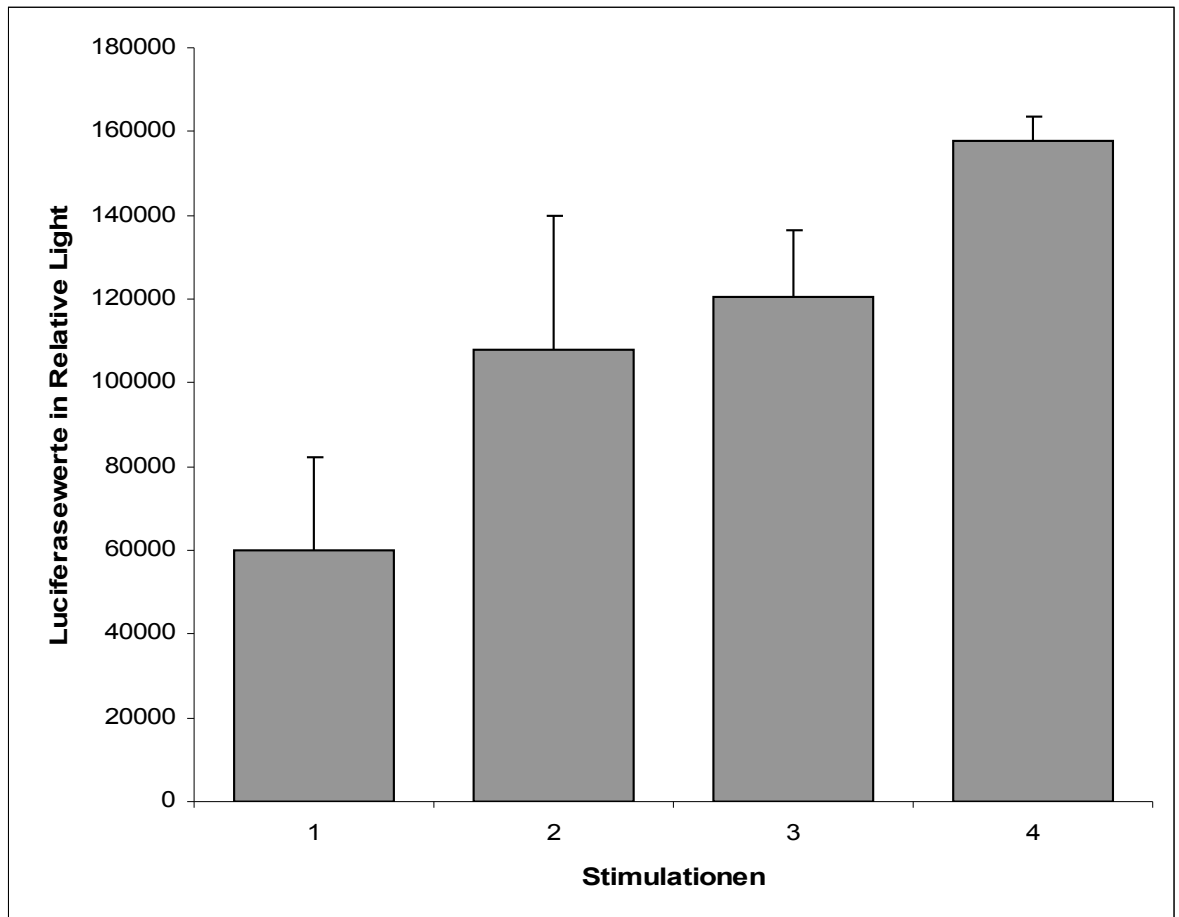


Abb. 5.2.2: Ergebnisse der Luciferasemessung für das Plasmids # 4 mit 369bp in der Hybridomzelllinie ACI 88 nach 24h Stimulation

1. nicht stimuliert
2. TPA [$10^{-7}M$]
3. TPA [$10^{-7}M$] + Ionomycin [$0,05\mu g/ml$]
4. TPA [$10^{-7}M$] + Progesteron [$10^{-7}M$]

5.2.2 Transfektionen in Jurkat- Zellen

Wie schon bei den Western Blot- Versuchen sollte nun untersucht werden in wie weit sich die Ergebnisse aus den Plazentahybridomen auf das maligne Jurkat- Zellsystem übertragen liessen. Ein Problem der direkten Vergleichbarkeit beider Zelltypen bestand in der Methode der Transfektion. Während die adhärent wachsenden Hybridomzellen mittels Lipofectation transfiziert wurden fand bei den Jurkat- Zellen die Elektroporation Anwendung, die Methode der Wahl für Zellen in Suspension. Daraus ergibt sich, dass die Absolutwerte bei der Auswertung der Luciferasemessung beider Zellsysteme nicht direkt verglichen werden können.

Die Abb. 5.2.3 zeigt das Ergebnis einer Transfektion des längsten Plasmids # 1 (4500bp des CEACAM1- Promotors) in die Jurkat- Zellen. Das Stimulationsschema entspricht dem Versuchsaufbau der vorangehenden Versuche. In der Bande Nr. 1 findet sich die Grundaktivität dieses Promotorabschnittes. Bei einer Stimulation der transfizierten Zellen mit TPA ergibt sich nach 24 Stunden eine signifikante ($p < 0,01$) Zunahme der Promotoraktivität. Diese Zunahme ist in Bande Nr. 2 dargestellt und entspricht in etwa dem Verhalten in den Plazentazellen.

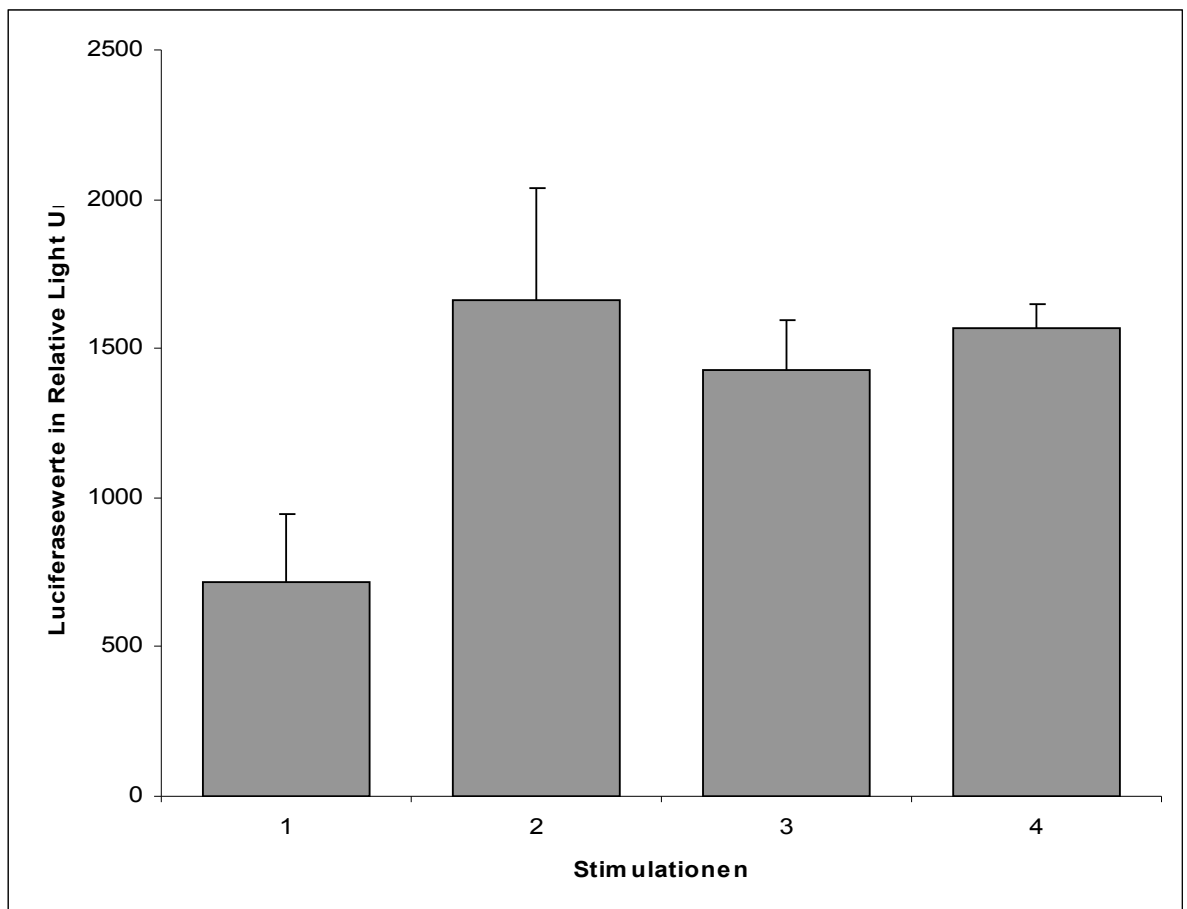


Abb. 5.2.3: Ergebnisse der Luciferasemessung für das Plasmid # 1 mit 4500bp im Jurkat-Zellsystem nach 24h Stimulation:

1. nicht stimuliert
2. TPA [10⁻⁷M]
3. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,05µg/ml]
4. TPA [10⁻⁷M] + Progesteron [10⁻⁷M]

Wie schon auf Proteinebene beobachtet, kann somit festgehalten werden, dass die Regulation des CEACAM1- Promotors in malignen Jurkat- Zellen der Regulation in den Plazenta- Hybridomzellen entspricht. Die Bande Nr. 3 zeigt das Ergebnis einer zusätzlichen Stimulation mit Ionomycin. Die CEACAM1-

Expression wurde in den Jurkat- Zellen auf Proteinebene nur schwach beeinflusst. Und auch bei der Bestimmung der Promotoraktivität scheint Ionomycin einen im Vergleich zu den Plazentazellen eher abgeschwächten Effekt zu haben. In der Bande Nr. 4 spiegelt sich der Einfluss von Progesteron auf die durch TPA gesteigerte Aktivität dieses Plasmids wider. Wie schon bei den ACI 88 lässt sich der hemmende Einfluss auf der Ebene des CEACAM1-Promotors nicht nachvollziehen.

In den Versuchen zur Regulation der CEACAM1- Expression stellte sich heraus, dass Ionomycin eine eher konzentrationsabhängige Wirkung hat (Abb. 5.1.4). Da sich nun zeigte, dass der Promotor durch Ionomycin nicht deutlich beeinflusst werden konnte, wurde versucht, die Aktivität eines Promotorabschnittes in Abhängigkeit von der Ionomycin- Konzentration darzustellen. Zu diesem Zweck wurden die Jurkat- Zellen mit dem 4500 Basenpaaren- langen Plasmid # 1 transfiziert und über 24 Stunden inkubiert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 5.2.4 dargestellt. Im Gegensatz zu den vorausgehenden Versuchen wurde die Promotoraktivität nicht gegen einen Grundwert gemessen, sondern gegen die Stimulation mit TPA. Dieser Wert findet sich in Bande Nr. 1. Die Banden Nr. 2 bis Nr. 4 zeigen nun die Ergebnisse der Aktivität für aufsteigende Ionomycin- Konzentrationen. Während in Bande Nr. 2 noch eine leichte Steigerung der Aktivität zu verzeichnen war nahm diese bei höheren Konzentrationen signifikant ($p < 0,01$) ab.

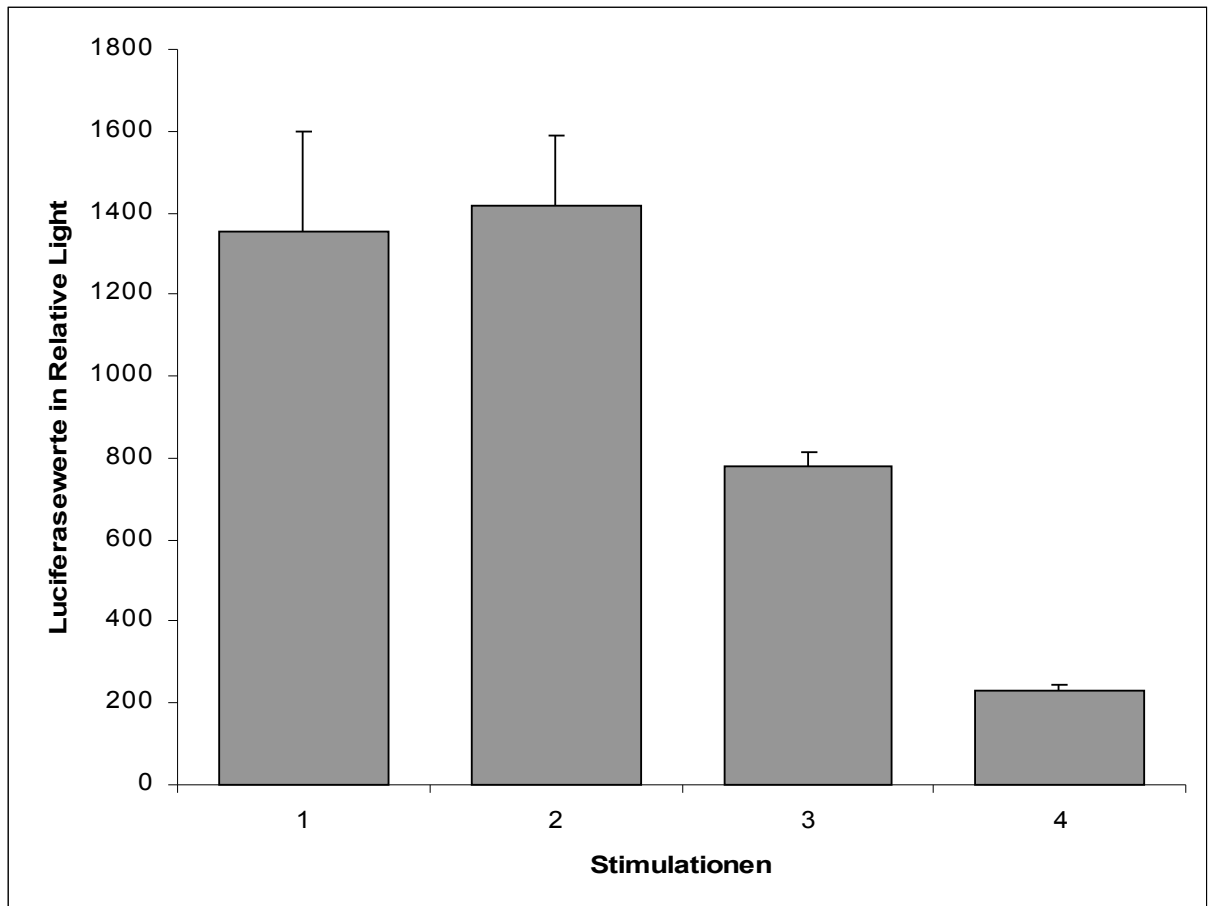


Abb. 5.2.4: Ergebnisse der Luciferasemessungen für das Plasmid # 1 mit 4500bp im Jurkat-Zellsystem nach 24h Stimulation:

1. TPA [10⁻⁷M]
2. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,05µg/ml]
3. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,1µg/ml]
4. TPA [10⁻⁷M] + Ionomycin [0,5µg/ml]

5.2.3 Vergleich der Plasmidkonstrukte in beiden Zelllinien

In den beiden vorangehenden Kapiteln wurden die Transfektionsversuche in den Hybridomzellen der Plazenta und in leukämischen T- Lymphozyten (Jurkat) beschrieben. Hierfür fanden Plasmide mit Inserts unterschiedlicher Grösse Verwendung, wobei die Inserts Abschnitte des CEACAM1- Promotors darstellten. Dieser Promotor ist die Grundlage für die folgenden Abbildungen, welche veranschaulichen sollen, wie die entsprechenden Plasmide lokalisiert sind und welche möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sie aufweisen. Zudem enthalten die Abbildungen Balkendiagramme, in denen sich die jeweilige Aktivität mit und ohne Stimulation widerspiegelt. Zweck dieser Graphiken ist es herauszufinden, welche Abschnitte des Promotors für die

Regulation von CEACAM1 entscheidend sind. Die Auswertung soll für die Zellsysteme einzeln besprochen werden.

5.2.3.1 Übersicht der Transfektionsergebnisse in der Hybridomzelllinie ACI 88

Die Abb. 5.2.5 stellt eine systematische Übersicht der Ergebnisse für die einzelnen Plasmidkonstrukte dar. Die letzten 2500bp der insgesamt 4000bp vor dem Luciferasegen sind besonders genau dargestellt, da hier vermutlich die entscheidenden Bindungsstellen für die Stimulation gefunden werden. Einige Bindungsstellen sind von besonderem Interesse: AP1, AP2, AP4, IRF-2, SP-1, c-Ets. Bemerkenswert ist, dass in jedem Plasmid mindestens eine AP1-Bindungsstelle enthalten ist, wie die Lage der fünf Inserts (Plasmid # 1- # 5) verdeutlicht. Der Plasmidgrösse auf der linken Seite der Abbildung sind jeweils drei Banden zugeordnet, welche verschiedene Aktivitätszustände darstellen. Der oberste (rote) Balken veranschaulicht die Basalaktivität des Plasmids. Es lässt sich als Ergebnis festhalten, dass alle Plasmide eine stimulationsunabhängige Promotoraktivität aufwiesen, welche von der Länge des Inserts abzuhängen scheint. Somit hatte das längste Plasmid # 1 (4500bp) die grösste Basalaktivität, das kleinste Plasmid # 5 (196bp) die geringste. Zu beachten ist jedoch, dass der Unterschied der Aktivität im direkten Vergleich trotz der hohen Differenz der Insertgrössen vergleichsweise gering ist. Die Plasmide # 2, # 3 und # 4 weisen eine fast identische Aktivität auf, sodass bei der Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen für die Regulation von CEACAM1 die entscheidenden Promotorabschnitte in dem Bereich von – 2600bp bis kurz vor dem Luciferasegen besonders berücksichtigt wurde. Die Suche nach Transkriptionsfaktoren, die in diesem Bereich des Promotors binden können, ergab eine Vielzahl von möglichen Regulationswegen. Es findet sich eine AP1- Faktor- Bindungsstelle unmittelbar vor dem Gen, sowie AP2-, NF-k- oder IRF-2- Bindungsstellen im Verlauf des Promotors.

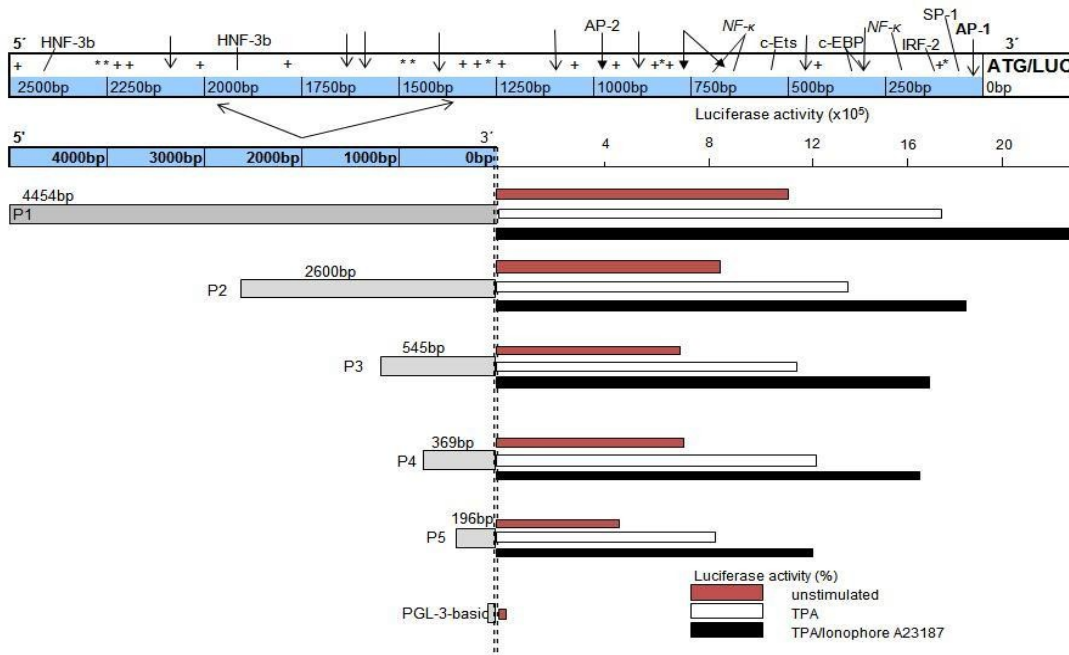


Abb. 5.2.5: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Luciferasemessungen in der Plazenta-Hybridomzelllinie ACI 88 für fünf Plasmide und dem pGL3- Leervektor

Neben der basalen Aktivität wurde diese auch nach Stimulation mit TPA und Ionomycin bestimmt. Wie schon in den Einzelversuchen beschrieben konnte eine gesteigerte Aktivität des Promotors nach Inkubation mit TPA gezeigt werden. Dieser Zugewinn an Aktivität fällt für die unterschiedlichen Plasmide ähnlich hoch aus. Ähnlich stellt sich auch die Stimulation durch Ionomycin dar, dessen zusätzlicher Effekt sich in den schwarzen Balken des Diagrammes wieder findet. Um auszuschliessen, dass die gezeigten Effekte durch den Plasmidvektor anstatt der Inserts hervorgerufen wurden, wurde als Kontrollwert ein pGL-3- Leerwert verwendet. Dieser ist mit seiner Basalaktivität unter den Plasmiden aufgetragen.

5.2.3.2 Übersicht des Transfektionsergebnisse in der Jurkat- Zelllinie

Analog zur Auswertung der Transfektionsversuche im Hybridomzellsystem wurden auch für die Jurkat- Zellen die einzelnen Versuche in einer Übersicht

zusammengefasst, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Abb. 5.2.6 veranschaulicht das Verhalten der schon bekannten Plasmide in einem malignen Zellsystem. Auch in diesem Fall lässt sich festhalten, dass jedes der Plasmide über eine Basalaktivität verfügt, die die Aktivität des pGL-3- Vektors deutlich übersteigt. Jedoch ist auch hier zu bemerken, dass diese Grundaktivität zwar abhängig von der Grösse des Plasmids zu sein scheint, aber nicht direkt mit dieser korreliert. Wie schon bei den Plazentazellen erwähnt könnte dieser Umstand dafür sprechen, dass auch im malignen Zellsystem die Regulation des CEACAM1- Promotors in grossen Teilen auf der Aktivierung der Genabschnitte beruht, die direkt vor dem Luciferasegen liegen, d.h. der Abschnitte, die auch das Plasmid # 5 mit dem kleinsten Insert von 196bp noch beinhaltet. Im Vergleich zu der Stimulation der Zellen mit TPA in den Plazentazellen erscheint der Aktivitätszugewinn in den Jurkat- Zellen etwas höher, wohingegen die Induktion der Aktivität durch Zugabe von Ionomycin eher etwas schwächer ausfällt. Bemerkenswert bleibt jedoch, dass alle Plasmide auf die Stimulantien angesprochen haben. Dies spricht dafür, dass die für die Stimulation mit TPA und Ionomycin entscheidenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf dem CEACAM1- Promotor nahe der Translationsstelle liegen.

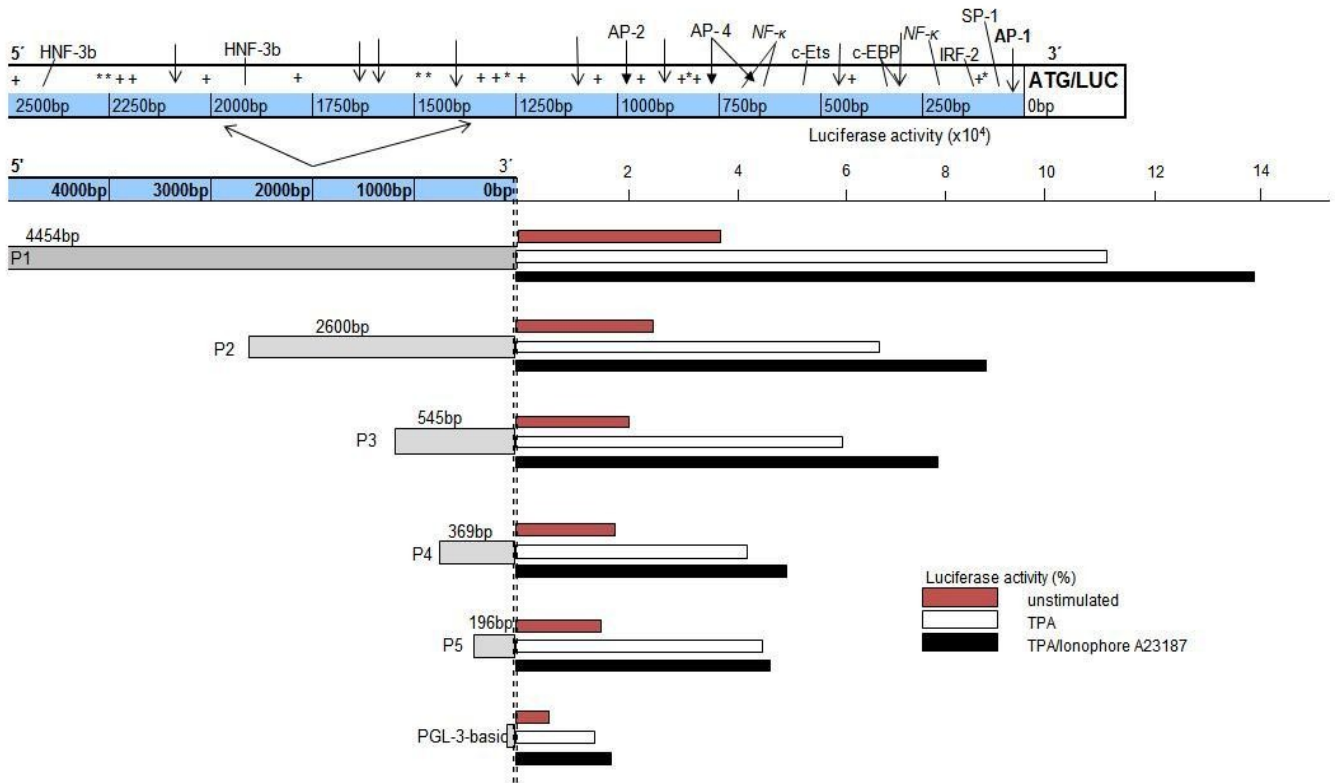


Abb. 5.2.6: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Luciferasemessungen in den Jurkat-Zellen für fünf Plasmide und dem pGL3- Leervektor

5.3 Auswertung der Invasionsassays

In den vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zytokine und Hormone einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation von CEACAM1 haben. Darüber hinaus ist bekannt, dass CEACAM1 mitbestimmend ist für die Invasivität von Zellen. Während die Hybridomzelllinie ACI 88 kaum eigenes invasives Potential besitzt führte eine Transfektion mit einem CEACAM1- Plasmid zu einer vermehrten Invasivität. Auf Proteinebene wurde bereits nachgewiesen, dass diese Zelllinie über eine geringe endogene CEACAM1- Expression verfügt, diese aber durch entsprechende Stimulation induziert werden kann (vgl. Abb. 5.1.3). Im Rahmen von standardisierten Matrigel- Invasionsassays sollte nun geprüft werden, ob die Stimulation mit Zytokinen und Hormonen einen Einfluss auf das invasive Potential der Placentazelllinie ACI 88 hat. Das Ergebnis dieses Versuches findet sich in Abb. 5.3.1.

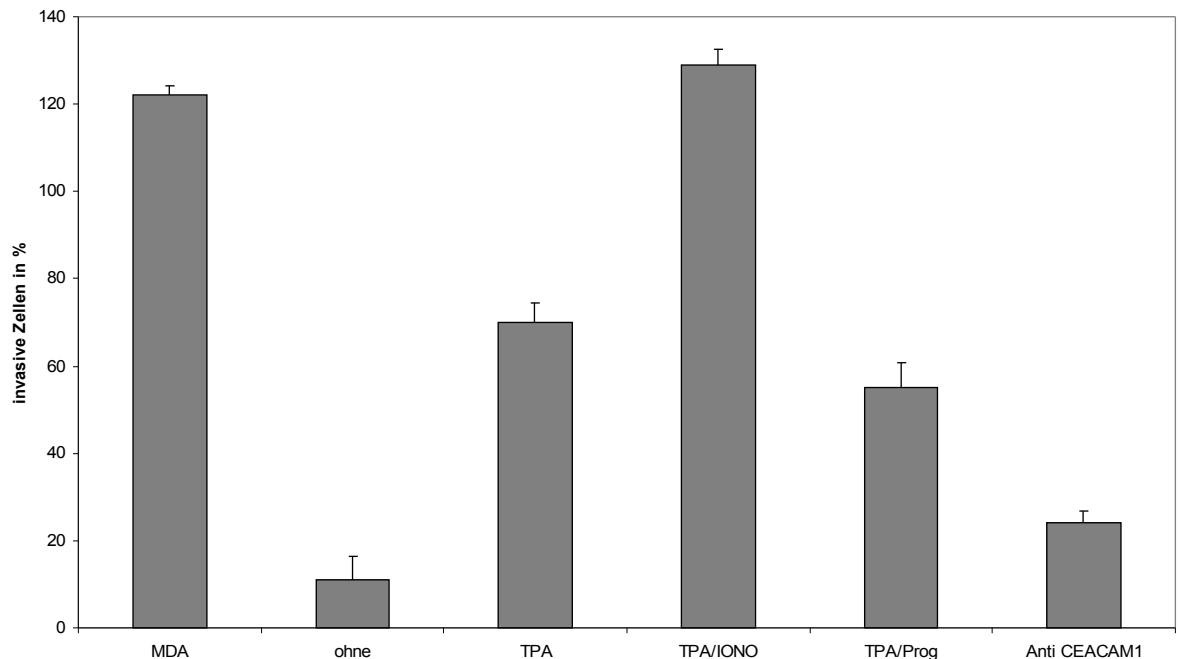


Abb. 5.3.1: Auswertung des Matrigel- Invasionsassays für die Plazentazellen ACI 88 ohne und mit Stimulationen über 18 h als Nachweis des invasiven Potentials von CEACAM1

1. MDA- Mammakarzinomzelllinie als Positivkontrolle
2. ACI 88, nicht stimuliert
3. ACI 88 nach Zugabe von TPA [10⁻⁷M]
4. ACI 88 nach Zugabe von TPA [10⁻⁷M] und Ionomycin [0,05µg/ml]
5. ACI 88 nach Zugabe von TPA [10⁻⁷M] und Progesteron [10⁻⁷M]
6. ACI 88 nach Zugabe von TPA [10⁻⁷M] und anti- CEACAM1 (4D1C2) [1µg/ml]

In der ersten Bande der Abbildung findet sich die Positivkontrolle in Form von MDA- Zellen, einer Zelllinie mit ausgesprochen invasivem Potential. In den restlichen Banden werden die ACI 88 dargestellt, die an sich kaum Invasivität besitzen (Bande Nr. 2). Wurden diese Zellen jedoch vor Beginn der Durchwachsung der Matrigel- Membranen für circa 18 Stunden mit TPA (10⁻⁷M) stimuliert zeigte sich eine drastische Veränderung des Verhaltens. War ohne Stimulation nur ein geringer Teil der Zellen in der Lage, die Membranen zu durchdringen, so zeigt die Bande Nr. 3 ein vielfach erhöhtes Potential ($p < 0,01$). Bei einer zusätzlichen Stimulation mit Ionomycin verstärkte sich die Invasivität abermals signifikant ($p < 0,01$) (Bande Nr. 4), während die Zugabe von Progesteron einen hemmenden Effekt hatte, wie in Bande Nr. 5 dargestellt. Um nachweisen zu können, dass der Zugewinn des invasiven Potentials auch wirklich auf eine verstärkte Expression von CEACAM1 zurückzuführen ist, wurde abschliessend ein Ansatz mit einem spezifischen Antikörper versetzt. Dieser monoklonale Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der

Invasivität der zuvor stimulierten Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass die schwach invasiven Plazenta- Hybridomzellen ACI 88 durch eine Behandlung mit CEACAM1- induzierenden Stimulantien an Invasivität gewannen. Dieser Effekt war durch Hormone, die hemmend auf die Expression wirken, bzw. durch Zugabe von CEACAM1- spezifischen Antikörpern partiell reversibel.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Regulation und Funktion des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in der Plazenta und in leukämischen Jurkat-Zellen untersucht, um etwaige Unterschiede zwischen der Regulation sowie der Expression in einem „physiologischen“ und malignen Kontext darzustellen. Als physiologisches Modell dienten Plazenta- Hybridomzellen, die in ihrer Regulation und Funktion dem Extravillösen Trophoblasten der Plazenta entsprechen. Als malignes Modell fanden leukämische Jurkat- Zellen Verwendung. Die Diskussion der Ergebnisse soll unter Berücksichtigung aktueller Forschungsergebnisse entsprechend dem Aufbau der Versuche vorgenommen werden.

6.1 Plazentapathologien

Die kontrollierte Proliferation und das Einwachsen der Plazenta in das Endometrium des Uterus ist für den Schwangerschaftsverlauf von essentieller Bedeutung. Es konnte in vielerlei Hinsicht gezeigt werden, dass Krankheitsbilder der Plazentation mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität für Fetus und Mutter assoziiert sind. Lim *et al* (1997) beschrieben diesen Zusammenhang als Grundlage für die Entstehung einer Prä- Eklampsie. Das fehlende Vermögen des Trophoblasten, die maternalen Strukturen in frühen Phasen der Schwangerschaft adäquat zu invadieren, führt zu einer erhöhten Rate an Bluthochdruckproblematiken mit Nieren- und Leberschädigungen. Die gleiche Arbeitsgruppe hatte zuvor nachgewiesen, dass dieser Effekt hauptsächlich dadurch zustande kommt, dass der Trophoblast in diesem Fall aufgrund fehlender Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen nicht in der Lage ist, das notwendige „Remodelling“ der Spiralarterien zu vollziehen (Zhou *et al*, 1997). Dieser Umstand ist auch aus einem anderen Krankheitsbild bekannt: bei der IUGR (*intra- uterine growth restriction*) kommt es zu einem verminderten Wachstum des Feten aufgrund eines erhöhten Gefässwiderstandes im uteroplazentaren Blutkreislauf. Dies ist u.a. Folge einer mangelnden Invasion maternaler Gefäße durch den Trophoblasten (Anthony

et al, 2001). Andererseits kann eine vermehrte Proliferation und Invasion des Trophoblasten jedoch zu einer Überschreitung der Schleimhautschichten führen und als Plazenta increta das Myometrium infiltrieren oder sogar über den Uterus hinaus wachsen (Plazenta percreta) (Norwitz *et al*, 2001). Zusätzlich gibt es eine Reihe von semi- malignen und malignen Plazentatumoren, die als Neoplasien von Trophoblastanteilen zu werten sind. Als Beispiele seien hier die invasive Blasenmole, placental- site- Tumoren oder das Chorionkarzinom angeführt (Shih *et al*, 2002). Das Chorionkarzinom stellt in diesem Zusammenhang den aggressivsten Tumor dar und kann schon in frühen Stadien distante Filiarisierungen v.a. in die Lunge setzen. Diese Tumorentitäten sprechen aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität gut auf zytostatische Therapien an und bieten mit der Produktion von b-hCG einen guten Parameter für eine Verlaufskontrolle (Escobar *et al*, 2003).

6.2 T- Zell- Leukämie

Die in dieser Arbeit verwendete, maligne Jurkat- Zelllinie stammt von einem Klon einer menschlichen leukämischen T- Zelle. Dies ist eine Zelle des lymphatischen Systems, deren maligne Entartung zu dem klinisch dramatischen Bild einer Leukämie führen kann. T- Zell- Leukämien machen gut ein Viertel aller akuten lymphatischen Leukämien aus. Die akuten lymphatischen Leukämien treten vorzugsweisen im Kindesalter auf und äussern sich durch allgemeine Schwäche, eine erhöhte Infektanfälligkeit und eine gesteigerte Blutungsneigung. Die Therapie der Wahl ist eine Polychemotherapie, unter der sich einer 5- Jahres- Überlebensrate von ca 80% der Patienten einstellt. Entscheidenden Einfluss auf das Langzeitüberleben haben das Krankheitsstadium bei Diagnose sowie das Ansprechen auf die initiale Induktionstherapie (Herold, 2005). Das bessere Verständnis der Dysregulation von Proteinen wie z.B. CEACAM1, die in vielerlei Hinsicht mit dem malignen Verhalten der Zellen in Verbindung gebracht werden, könnte zu einer früheren Diagnostik sowie zur Kontrolle des Therapieerfolges führen. Darüber hinaus könnte CEACAM1 als Oberflächenprotein als Target einer immunmodulatorischen Therapie in Betracht kommen.

6.3 CEACAM1 Expression und Regulation auf Proteinebene

Die Expression und Regulation von CEACAM1 wurde in zwei Zellreihen untersucht. Hierbei sollte ein Vergleich gezogen werden zwischen der physiologischen Expression im Rahmen der Plazentation und dem Vorkommen auf malignen Zellen, in diesem Fall leukämischen Jurkat- Zellen. Entscheidend für das Konzept dieser Arbeit ist eine Beobachtung von Bamberger *et al* (2000), die beschreiben konnten, dass CEACAM1 spezifisch im Extravillösen Trophoblasten exprimiert wird, dem Teil der Plazenta, der massgeblich für das tumorähnliche Eindringen des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua verantwortlich ist. Inwiefern die Expression und Regulation dieses Proteins in gutartigen oder malignen Zelltypen einem einheitlichen Schema unterliegt, soll Inhalt des folgenden Abschnittes der Diskussion sein.

Zelladhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Architektur, Polarität, Invasion und der Differenzierung von Geweben. Diese Eigenschaft lässt ihnen eine besondere Bedeutung bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumoren zukommen, da sich ihr Expressionsmuster bei der Entartung von Zellen oftmals stark verändert (Pignatelli *et al*, 1994; Hirohashi *et al*, 2003). Jedoch lässt sich für viele Adhäsionsmoleküle nicht immer vorhersagen, inwiefern sie im Rahmen einer Tumorgenese vermehrt oder vermindert exprimiert werden. So verhält es sich auch mit CEACAM1, einem Protein, das für verschiedenste Gewebe epithelialen, endothelialen oder hämatopoetischen Ursprungs beschrieben wurde. So findet sich CEACAM1 unter anderem in der menschlichen Brust (Kirshner *et al*, 2004), im Übergangsepithel der Blase (Oliveira- Ferrer *et al*, 2004), in den Gallengängen der Leber und in der Gallenblase (Svenberg *et al*, 1979), auf Leukozyten (Singer *et al*, 2002) oder im Darm (Phan *et al*, 2004) und in der Plazenta (Bamberger *et al*, 2000). Trotz der Vielzahl von Geweben, in denen CEACAM1 eine physiologische Funktion übernimmt, lässt sich keine eindeutige Rolle bei der Entstehung von Tumoren bestimmen. In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Regulationsmechanismen dieses Proteins in zwei Zellsystemen auf Proteinebene dargestellt werden. So führte eine Stimulation der Plazenta-Hybridomzellen mittels TPA zu einer deutlich gesteigerten Expression von

CEACAM1. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Ionomycin verstärkt, überraschenderweise jedoch durch Progesteron abgeschwächt werden. Ein Einfluss von Estradiol und Dexamethason auf die Regulation von CEACAM1 wurde nicht beobachtet. In den leukämischen Jurkat- Zellen hingegen liess sich bei einer niedrigen Basalexpression auch ein stimulatorischer Effekt von TPA feststellen, ein stimulatorischer Einfluss von Ionomycin dagegen konnte nur in geringeren Konzentrationen und hemmender Effekt von Progesteron überhaupt nicht nachvollzogen werden. Dies würde bedeuten, dass ein massgeblicher Einfluss auf die CEACAM1- Expression, nämlich durch Induktion mittels TPA, sowohl im physiologischen Tumormodell der Plazentazellen als auch in leukämischen T- Zellen Geltung hat. Zellspezifische Unterschiede erklären jedoch die unterschiedliche Wirkung von Ionomycin und Progesteron.

Um diese widersprüchliche Regulation des Adhäsionsmoleküls zu beleuchten, sollen hier einige Zellsysteme genauer betrachtet werden. Zhang *et al* (1997) konnten in einer gross angelegten Untersuchung zeigen, dass CEACAM1 zu den zwanzig Genen gehört, die bei Kolonkarzinomen am häufigsten herabreguliert sind. Auch Takahashi *et al* (1993) beschäftigten sich mit dieser Fragestellung und wiesen nach, dass die Re- Expression des Proteins in Kolonkarzinomzelllinien durch eine Stimulation mit Interferon γ (*IFN* γ) herbeigeführt werden kann und dass sich diese von der Regulation von CEA (*Carcinoembryonales Antigen*) unterscheidet. Es stellte sich heraus, dass dieser Effekt bei einer Zervixkarzinomzelllinie nicht zu beobachten ist und somit keine generelle Gültigkeit für andere Zellsysteme besitzt. Chen *et al* (1996) vermuteten, dass die Regulation über sogenannte ISREs (*Interferon- sensitive Response Elements*) auf dem CEACAM1- Promotor vermittelt wird. Die folglich tumorsuppressive Wirkung von CEACAM1 ist in Kolonkarzinomzellreihen abhängig von dem Verhältnis der natürlichen Spleissvarianten CEACAM1-4L bzw. -S mit einem langen bzw. kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Kunath *et al*, 1995; Turbide *et al*, 1997). Besonders interessant scheint hierbei die Phosphorylierung des Ser503- Restes auf dem CEACAM1-4L durch Phorbolester zu sein, dessen Mutation *in vivo* zu einem verstärkten Tumorstadium führte (Fournes *et al*, 2001), ein Effekt, der im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einer Induktion durch TPA eine

entscheidende Funktion zukommen lassen könnte. Die gleiche Arbeitsgruppe wies 2006 (Leung *et al*) weiterhin nach, dass der Verlust von CEACAM1 im Mausmodell zwar nicht alleine zu der Entstehung von Kolonkarzinomen führt, diese aber stark begünstigt. Ähnliche Beschreibungen, die die Hypothese stützen, dass CEACAM1 vornehmlich inhibitorisch auf die Tumorigenese wirkt, wurden ebenfalls für das Hepatozelluläre Karzinom (Cruz *et al*, 2005), Prostata- (Lin *et al*, 1999) und Endometriumkarzinom (Bamberger *et al*, 2006) geliefert. Es sind jedoch auch Zellsysteme bekannt, in denen CEACAM1 im Rahmen der Entartung vermehrt exprimiert wird. So konnten Laack *et al* (2001) in einer klinischen Studie zeigen, dass die starke Expression von CEACAM1 in Adenokarzinomen der Lunge mit einer signifikant schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht. Eine andere Arbeitsgruppe zog aus einer ähnlichen Studie den Schluss, dass CEACAM1 in NSCLCs (*Non Small Cell Lung Cancers*) also keine tumorhemmende Wirkung hat, sondern im Gegenteil zu einer Tumorprogression führt (Sienel *et al*, 2003). Während in normalem Lungengewebe die CEACAM1-4L- Spleissvariante überwiegt, ist in den NSCLCs das Verhältnis zu Gunsten der kürzeren S- Variante verschoben (Xi *et al*, 2008). Dieses Ergebnis könnte dafür sprechen, dass nicht die absolute Expression des Proteins, sondern die Relation der Spleissvarianten zueinander Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hat. Auch aus der Schilddrüse ist das Phänomen der Überexpression bekannt. Die forcierte Expression von CEACAM1 führt zu einer vermehrten Adhäsion und Invasivität der Tumorzellen, während der Verlust des Proteins andererseits zu einer gesteigerten Zellvermehrung und Tumorwachstum führte (Liu *et al*, 2006). Dieses komplexe Verhalten könnte bei der Rolle von CEACAM1 in der Plazenta von entscheidender Bedeutung sein. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Stimulation der Plazenta- Hybridomzellen mittels Phorbol ester und Ionomycin zu einer Vergrößerung des invasiven Potentials führte. Die möglicherweise zugrunde liegenden Signaltransduktionswege und Interaktionen sollen ausführlich im folgenden Kapitel über die Promotoraktivität diskutiert werden. Die Vermutung, dass die spezifische Expression im Extravillösen Trophoblasten einen physiologischen Prozess bedingt, wird zudem gestützt durch die Untersuchung von verschiedenen Pathologien des Trophoblasten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die gutartigen

Trophoblasttumoren im Gegensatz zu entdifferenzierten Tumoren wie dem Chorionkarzinom zu einem hohen Prozentsatz CEACAM1 exprimieren (Bamberger *et al*, 2001). Obwohl CEACAM1 also für das physiologische Verhalten des Trophoblasten mitverantwortlich zu sein scheint, hat das Protein auch in der Plazenta eine eher tumorsuppressive Wirkung. Deshalb ist es auch verwunderlich, dass Progesteron, bekannt als „schwangerschaftserhaltendes Hormon“ in den Western Blot- Versuchen einen negativen Einfluss auf die Expression von CEACAM1 hat. Bamberger *et al* (1996) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Aktivität von AP-1- Promotorkonstrukten und der Zugabe von Progesteron bzw. dessen Rezeptor in Endometriumkarzinomzellen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass Progesteron einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren hat, die vermutlich massgeblich an der Regulation von CEACAM1 beteiligt sind. Dieser Umstand könnte einen Ansatz für die Erklärung der verminderten Expression des Proteins in den Plazentazellen nach Zugabe von Progesteron bieten.

Das Tumormodell der vorliegenden Arbeit wird von Jurkat- Zellen, das heisst leukämischen T- Lymphozyten gebildet. Einerseits bestand so die Möglichkeit, die Regulation des Proteins in einer malignen Zellreihe zu untersuchen. Andererseits ist von diesem Adhäsionsmolekül bekannt, dass es eine physiologische Rolle im Rahmen einer stattfindenden Immunantwort übernimmt. Möller *et al* (1996) wiesen CEACAM1 in geringen Mengen auf menschlichen T- Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen nach; Kammerer *et al* beschrieben 1998 das Vorhandensein des Proteins als einzigem Mitglied der CEA- Familie auf T- Lymphozyten, die zuvor mittels IL-2 (*Interleukin 2*) stimuliert wurden. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die Aktivierung von T- Zellen und konnte zeigen, dass die Aktivierung von CEACAM1 auf der Zelloberfläche einen kostimulatorischen Effekt bei der CD3- induzierten Proliferationssteigerung hat und somit in der frühen Phase einer Immunreaktion eine regulatorische Rolle übernimmt. Interessant ist weiterhin, dass die Expression von CEACAM1 auf nativen T- Lymphozyten sowohl PKC- abhängig (mittels des PMA als Substrat) als auch - unabhängig über eine Stimulation mittels IL2 induziert werden kann (Kammerer *et al*, 1998). Im Gegensatz hierzu konnten Boulton *et al* (2002) zeigen, dass das Bakterium *Neisseria gonorrhoe*

mit Hilfe von bestimmten Opa (*Opacity-associated*)- Proteinen spezifisch an CEACAM1 auf CD4- Zellen binden und über eine Inhibition der Proliferation zu einer verzögerten Immunantwort führen. Dieses ist nachweisbar über eine verminderte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den Zellen. Es sind wahrscheinlich zwei sogenannte ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) auf dem zytoplasmatischen Schwanz des Proteins von Bedeutung, die eine Lymphozytenaktivierung durch eine Rekrutierung von Tyrosin- Phosphatasen hemmt. Eine ähnliche Beobachtung machten Morales *et al* (1999), die postulieren konnten, dass die zytolytische Fähigkeit von NK (natürlichen Killerzellen)- Zellen und T- Zellen im Darmepithel bei Aktivierung durch CEACAM1- Interaktionen gedrosselt wird. In einem in vivo- Modell wiesen Nagaishi *et al* (2006) nach, dass der hemmende Einfluss von CEACAM1 auf die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten im Rahmen einer Kolitis abhängig ist von dem Vorhandensein von SHP1 (*Src homology 2 domain-containing Protein Tyrosine- Phosphatase 1*) in der T-Zelle. Diese Mechanismen könnten eine Antwort auf die Frage bieten, warum der stark CEACAM1- exprimierende Trophoblast nicht von deziduaständigen Abwehrzellen angegriffen wird (Markel *et al*, 2002). Chen *et al* (2004) untersuchten den widersprüchlichen Einfluss von CEACAM1 im Rahmen der T-Zell- Aktivierung mittels Transfektionsversuchen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Regulation in einem Jurkat- Zellsystem von der Expression der Spleissvarianten abhängt. Während CEACAM1-L mit dem zwei ITIMs enthaltenden langen zytoplasmatischen Schwanz eine hemmende Wirkung hat, übernimmt CEACAM1-4S eine kostimulatorische Funktion, sofern überwiegend vorhanden. Zudem konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 im Jurkat- Zellsystem einen drosselnden Effekt auf die Produktion von IL2 hat, ein weiterer Faktor, der für einen inhibitorischen Einfluss der CEACAM1- Aktivierung auf die Immunantwort spricht (Chen *et al*, 2004). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Regulation von CEACAM1 in Jurkat- Zellen auf Proteinebene. Wie schon vorbeschrieben findet sich kaum eine basale Expression. Donda *et al* (2000) wiesen nach, dass sich die Aktivität der Transskriptionsfaktoren AP1 und NFkB in Jurkat- Zellen steigerte, sobald diese mit anti-CD3 und einem Antikörper gegen CEACAM1 stimuliert wurden. Es ist also denkbar, dass die Regulation von CEACAM1 einem autokrinen Regelkreislauf unterliegt, der in Abhängigkeit

von dem jeweiligen Stimulus eine überwiegend koaktivierende als auch hemmende Wirkung auf die Aktivierungszustand der Abwehrzelle hat. Donda *et al* (2000) zeigten in diesem Zusammenhang einen hohen CEACAM1- Gehalt auf T- Lymphozyten des Darms bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Ergebnisse der Western- Blots der vorliegenden Arbeit lieferten jedoch den Hinweis, dass die Expression von CEACAM1 auf Jurkat- Zellen durch TPA induzierbar ist. TPA ist als Phorbol-ester ein Substrat der Proteinkinase C und wirkt vermutlich über diesen Mechanismus stimulierend auf den CEACAM1- Promotor. Als anderes Beispiel für ein malignes Zellsystem sei hier die Re- Expression in Endometriumkarzinomen nach Stimulation mit TPA genannt (Bamberger *et al*, 2006). Diese Wirkweise wurde 2004 schon von Chen *et al* für PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*) beschrieben, ebenfalls ein Substrat der Proteinkinase C. In den Hybridomzellen der Plazenta führte die zusätzliche Zugabe von Ionomycin zu TPA- stimulierten Zellen zu einer Steigerung der CEACAM1- Expression. Dieser Umstand könnte ebenfalls als Involvierung der Proteinkinase C in der Signaltransduktion gedeutet werden, da die Aktivität von einigen ihrer Isoformen durch einen erhöhten intrazellulären Calciumgehalt verstärkt wird (Castagna *et al*, 1981). Die zusätzliche Wirkung durch Ionomycin lässt sich aber nicht identisch auf das Jurkat- Zellsystem übertragen. Wie aus den Ergebnissen der Stimulationsversuche ersichtlich, führen selbst hohe Ionomycin- Konzentrationen bei einer langen Einwirkdauer zu keiner starken Induktion bzw. senken sogar die Aktivität des CEACAM1- Promotors. Die Vermutung, dass dieser Einsatz der Stimulantien toxisch auf die Jurkat- Zellen wirken und somit eine Apoptose induzieren könnte, wurde schon von Kim *et al* (2002) geäußert. Andererseits untersuchten Sherrington *et al* (1997) TLI SA1 (*T lineage- specific activation antigen*), ein Protein, das ebenfalls in der frühen Phase einer Immunantwort exprimiert wird. Die Gruppe konnte zeigen, dass dieses Antigen ähnlich der Regulation von CEACAM1 in Jurkat- Zellen durch TPA induziert, durch die weitere Zugabe von Ionomycin jedoch gehemmt wird. Der Vergleich der sehr ähnlichen Regulation beider Proteine könnte darauf schließen lassen, dass CEACAM1 eine wichtige physiologische Rolle bei der frühen Aktivierung von T- Zellen zukommt.

6.4 Regulation von CEACAM1 auf Promotorebene

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Effekte von Zytokinen und Hormonen auf die Expression von CEACAM1 in Plazenta- und Jurkat- Zellen nachgewiesen werden. Um weiteres Verständnis möglicher Regulationswege zu erhalten, wurden die zwei Zellsysteme mit unterschiedlich langen Konstrukten des CEACAM1- Promotors transfiziert, deren Aktivität nach Inkubation mit entsprechenden Stimulantien gemessen wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Promotoraktivität aller Plasmide mittels TPA und Ionomycin verstärkt werden konnte. Dies bedeutet, dass selbst die kleinsten Konstrukte Basenabschnitte des Promotors enthalten, die für die Regulation von CEACAM1 von entscheidender Bedeutung sind. Hierbei handelt es sich vermutlich um Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die oftmals die Endstrecken verschiedenster Stoffwechselwege darstellen.

Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählt man die AP-1 (*Activating Protein-1*)-Faktoren, die mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung gebracht werden. Sie beeinflussen die Proliferation, Transformation und das Überleben der Zelle (Angel *et al*, 1991), indem sie als Proteinkomplexe an deren DNA- Strukturen binden. Proteine aus der Jun- Familie (c-Jun, JunB, JunD) und der Fos- Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) bilden hierbei Homo- oder Heterodimere, die in der Lage sind, z.B. auf Wächterproteine wie p53 Einfluss zu nehmen (Scherer *et al*, 2000). Die stabilsten Komplexe werden hierbei von Jun/ Fos- Dimeren gebildet. Während jedoch z.B. c-Jun durch Unterdrückung von Expression und Funktion tumorsuppressiver Gene ein positiver Einfluss auf die Zellproliferation zugeschrieben wird, findet sich für JunB ein antagonistischer Effekt (Shaulian *et al*, 2001). Bamberger *et al* untersuchten das Expressionsmuster der AP-1- Faktoren in der menschlichen Plazenta. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, dass sich der Grossteil der verschiedenen AP-1- Faktoren spezifisch im Extravillösen Trophoblasten fand. So wurde beispielsweise in fast allen Zellkernen des Extravillösen Trophoblasten eine Expression von JunD, Fra2 und c-Jun gefunden, während sich in den restlichen Teilen der Plazenta nur vereinzelt AP-1- Faktoren nachweisen liessen (Bamberger *et al*, 2004). Dieses Expressionsmuster entspricht in etwa dem für das Protein CEACAM1. Bei einer

bei einer vergleichbaren Untersuchung zeigte sich, dass CEACAM1 spezifisch vom EVT exprimiert wurde, ein Umstand der einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von AP-1- Faktoren und dem Expression vermuten lässt (Bamberger *et al*, 2000; 2006). Über die genauen Regulationswege ist jedoch nicht viel bekannt. Angel *et al* (1987) konnten zeigen, dass die AP-1- Faktoren u.a. an TREs (*TPA- Responsive Elements*) binden, welche 9 Basenpaare lange Strukturen auf den Zielgenen darstellen, die durch TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) aktiviert werden. Dieser Mechanismus ist ein wichtiger Ansatz für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit. Die Aktivierung des CEACAM1- Promotors durch TPA würde sich in diesem Zusammenhang gut durch das Vorhandensein der AP-1- Bindungsstelle kurz vor Beginn des Genabschnitts erklären lassen. Der zugrunde liegende Weg der Signaltransduktion umfasst vermutlich die Beteiligung von Proteinkinasen und wurde 1994 schon von Tseng *et al* beschrieben. Die Proteinkinasen führen über Phosphorylierungen von Proteinen zu einer Signalweiterleitung innerhalb der Zelle. Buchner wies 2000 nach, dass Isoformen der PKC in der Lage sind, die Transkription verschiedener Gene durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, AP-2, AP-3 oder NFkB zu induzieren, für die sich Bindungsstellen auf den untersuchten Promotorabschnitten finden. Einige der PKC- Isoformen werden wiederum von TPA und Ionomycin stimuliert, was den additiven Effekt auf die Aktivität des CEACAM1- Promotors nach Stimulation mit eben diesen Substanzen und die Induktion von CEACAM1 auf Proteinebene erklären könnte (Wolf *et al*, 1985). Ein weiteres Indiz für die Relevanz der Proteinkinasen erbrachte die Untersuchung von Uteruskarzinomzelllinien. Bamberger *et al* wiesen nach, dass die Proliferation und morphologische Veränderung als Ergebnis einer Stimulation mit TPA massgeblich abhängig war von dem Expressionsmuster der einzelnen PKC- Isoformen (Bamberger *et al*, 1996). Somit scheint die Aktivierung der AP-1- Transkriptionsfaktoren ein zentrales Element bei der Regulation des CEACAM1- Promotors zu sein. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung von Ionomycin auf den Promotor im Jurkat- Zellsystem nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist weder für CEACAM1 noch für die AP-1- Faktoren beschrieben. Einen Erklärungsansatz kann aber eine Arbeit von Scott *et al* (1994) bieten. Hierbei

wurde gezeigt, dass der induzierende Effekt von TPA auf die frühe Zellaktivierung von Jurkatzellen durch Ionomycin antagonisierbar ist. Dabei scheinen Gensequenzen von Bedeutung zu sein, die den Genen für die AP-1-Faktoren JunB und JunD ähneln. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für das Oberflächenmolekül TLiSA1 in Jurkat- Zellen beschrieben, dessen Struktur mit der von CEACAM1 vergleichbar ist (Sherrington *et al*, 1997). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Stimulation mit Hilfe von Ionomycin eine für die leukämischen T- Lymphozyten spezifische Wirkung auf die Regulation von Zellproliferation und –aktivität hat, bei dem AP-1- Faktoren Rolle spielen könnten. Ein Abgleich der Basensequenz des Promotors für das Protein CEACAM1 mit potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (s.a. Material und Methoden) ergab, dass sich eine Bindungsstelle für AP-1-Faktoren nur circa 60 Basenpaare vor Beginn der Translationssequenz („ATG“-Codon) findet, die somit auf allen untersuchten Promotorkonstrukten repräsentiert ist und eine Erklärung für das Stimulationsverhalten mit TPA und Ionomycin bieten könnte. Der Einfluss der AP-1- Faktoren auf die Proliferation einer Zelle wurde auch in anderen Zusammenhängen beobachtet, so z.B. in den einer ständigen Veränderung unterliegenden Endometriumzellen. Bamberger *et al* (1996) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Aktivität von AP-1- Promotorkonstrukten und der Zugabe von Progesteron bzw. dessen Rezeptor in Endometriumkarzinomzellen. Das überraschende Ergebnis war, dass der Progesteronrezeptor als Hormonrezeptor alleine zu einer starken Aktivierung des AP-1- Promotors führte, während die Stimulation mit dessen Substrat diesen Effekt rückgängig machte. Während in der vorliegenden Arbeit ein inhibitorischer Einfluss von Progesteron auf die Expression von CEACAM1 als Protein nach Stimulation mittels TPA nachgewiesen wurde, fand sich kein reproduzierbarer Effekt auf den CEACAM1- Promotor. Dieser Umstand legt nahe, dass der Einfluss von Progesteron auf die Regulation von CEACAM1 anderen, bisher nicht untersuchten Einflüssen unterliegt.

Die AP-1- Faktoren sind jedoch nicht die einzigen interessanten Transkriptionsfaktoren. So wurde bei der Untersuchung von kolorektalen Karzinomen, in denen CEACAM1 im Sinne eines Tumorsuppressors herabreguliert ist, gezeigt, dass auch AP-2- Faktoren in der Lage sind, die

Aktivität des CEACAM1- Promotors zu erhöhen (Hauck *et al*, 1994). Gleiches gilt für HNF4 (Sladek *et al*, 1990) und USF (Gregor *et al*, 1990), ebenfalls Transkriptionsfaktoren, für die sich Bindungsstellen auf dem Promotor des Proteins finden. Diese Faktoren wurden auch von Nedellec *et al* (1995) beschrieben, wobei der Vergleich zwischen dem humanen CEACAM1- Genom (auch „BGP“) und dem Korrelat in der Maus („bgp1“) mit dem Ergebnis gezogen wurde, dass beide Promotoren trotz unterschiedlicher Genabschnitte grob den selben Regulationsmechanismen unterliegen. Tanaka *et al* (1997) wiesen einen stimulatorischen Effekt durch die von dem Faktor SP-1 initiierte Signalkaskade in Zellen eines Hepatozellulären Karzinoms nach. Der Transkriptionsfaktor SP-2 hingegen wurde in Prostatakarzinomzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass dieser Faktor entscheidend für die inhibitorischen Effekt auf die Expression von CEACAM1 und die Aktivierung des Promotors ist (Phan *et al*, 2004). Zuvor hatte die gleiche Arbeitsgruppe einen fördernden Einfluss für Androgene bzw. die Bindung des Androgenrezeptors an den Promotor gefunden und einen wichtigen Zusammenhang mit dem Verhalten von Prostatazellen vermutet (Phan *et al*, 2001). Chen *et al* (1996) wiesen nach, dass der stimulatorische Effekt von IFN γ auf den CEACAM1- Promotor in einer Kolonkarzinomzelllinie über ein „Interferon- Sensitive Response Element/ ISRE“ vermittelt wird, wobei als Transkriptionsfaktor IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor*) dient. Auch der Transkriptionsfaktor NF κ B (*Nuclear Factor κ B*) scheint bei der Regulation des CEACAM1- Promotors eine Rolle zu spielen. So konnten Muenzner *et al* (2001, 2002) zeigen, dass das Binden des Bakteriums *Neisseria gonorrhoe* an CEACAM1 als Oberflächenrezeptor der Zielzelle zu einer vermehrten CEACAM1- Expression im Sinne eines autokrinen Kreislaufes führte, wobei NF κ B als entscheidender Transkriptionsfaktor involviert ist.

Die Luciferasemessungen der Untersuchungen mit verschiedenen grossen Abschnitten des CEACAM1- Promotors können also vor dem Hintergrund aktueller Forschungsergebnisse und Veröffentlichungen gut interpretiert werden. Ein ausgiebig untersuchter Stoffwechselweg führt über die Aktivierung verschiedener Isoformen der Proteinkinase C zu einem Effekt von AP-1- Faktoren an nachgewiesenen Bindungsstellen des Promotors. Da die Wirkungen von TPA und Ionomycin auf die Proteinkinasen beschrieben sind,

wird vermutet, dass die Regulation durch AP-1- Faktoren bei den durchgeführten Stimulationen einen grossen Teil der beobachteten Aktivitätssteigerungen bedingt. Entscheidend für die Interpretation ist, dass der CEACAM1- Promotor für diese Faktoren gemeinsam mit anderen Faktoren wie beispielsweise AP-2, SP-1, NFkB, HNF-4 oder USF, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die Regulation des CEACAM1- Proteins haben, innerhalb der letzten 1000 Basenpaare Bindungsstellen aufweist. Dass die Plasmide, die über längere Promotorabschnitte verfügen, eine im Vergleich zu den kürzeren eine leicht erhöhte Aktivität aufweisen, spricht dafür, dass die Regulation des Promotors nicht von einem spezifischen, sondern einem Zusammenspiel von verschiedenen Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass sich die Regulationsmechanismen mittels Transkriptionsfaktoren nicht ohne weiteres auf andere Zellsysteme übertragen lassen, sondern nur den Zustand einer Zelllinie beschreiben (Bamberger *et al*, 2006). Zu untersuchen, inwieweit auch diese anderen Transkriptionsfaktoren durch TPA und Ionomycin induzierbar sind, kann Aufgabe weiterer Arbeiten sein.

6.5 CEACAM1 und Invasivität

Neben der Regulation des Proteins und der Aktivierung von dessen Promotor sollte in der vorliegenden Arbeit noch ein funktioneller Aspekt von CEACAM1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde mit Invasionsassays gearbeitet, die das invasive Potential von Zellen in Abhängigkeit des Expressionsmusters einzelner Proteine zu quantifizieren vermögen. Hierbei zeigte sich, dass eine Stimulation der Plazenta- Hybridomzellen mittels Phorbol ester zu einer Vergrösserung von deren Invasivität führte. Dieser Effekt konnte analog zu der Expression von CEACAM1 in den Western Blot- Versuchen durch Zugabe von Ionomycin verstärkt und Progesteron abgeschwächt werden. Da die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen CEACAM1 das invasive Verhalten der Zellen hemmen konnte, ist zu vermuten, dass CEACAM1 bei diesem Prozess eine zentrale Rolle spielt. Ebrahimnejad *et al* (2004) wiesen diesen Effekt bereits an Melanomzellen nach; auch hier wurde die Invasion und Migration von

Melanomzellen durch CEACAM1 gesteigert. Die Expression des Proteins hatte einen entscheidenden klinischen Einfluss auf das Risiko einer metastatischen Streuung. Unabdingbar für diesen Effekt scheint ein Tyr-488- Rest auf dem langen zytoplasmatischen Schwanz von CEACAM1-4L zu sein. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CEACAM1 in diesen und anderen Zellen kolokalisiert ist mit Integrin $\beta 3$ und die Interaktion der beiden Proteine eine Schlüsselfunktion bei der Invasion von Melanomzellen übernimmt (Brümmer *et al*, 2001). Dieses gilt auch für den Extravillösen Trophoblasten der Plazenta und könnte dessen tumorähnliches Wachstum erklären. Bamberger *et al* (2006) untersuchten diesen Zusammenhang und konnten zeigen, dass die Invasion des Trophoblasten mittels CEACAM1 durch CRH (*Cortico- releasing Hormone*) beeinflusst wird, einem Hormon, das sowohl vom Trophoblasten selbst als auch von der mütterlichen Dezidua produziert wird und auf die Regulation des Implantationsprozesses eine limitierende Wirkung haben könnte. Briese *et al* (2005) wiesen nach, dass es weitere Proteine gibt, deren Interaktionen mit CEACAM1 dessen Verhalten beeinflussen. So wurde die Invasivität von mit CEACAM1 transfizierten Plazentazellen durch Zugabe des Proteins Osteopontin verstärkt. CEACAM1 scheint also für die physiologische Invasion des Trophoblasten mitverantwortlich zu sein. Mit Hilfe der Invasionsassays konnte in der vorliegenden Arbeit zudem der Nachweis erbracht werden, dass das gesteigerte invasive Potential von Plazentazellen, nach TPA vermittelter Mehrexpression von CEACAM1, durch Progesteron negativ beeinflusst wurde. Die Wirkung von Progesteron auf die Expression von CEACAM1 an der Invasionsfront der Plazenta könnte also in der Tat zu einer Hemmung eines überschüssig malignen Verhaltens des Trophoblasten führen, da dieses Hormon besonders in der ersten Hälfte der Schwangerschaft erhöht und für eine geregelte Plazentation essentiell ist. Bamberger *et al* (1996) konnten bereits zeigen, dass der Progesteronrezeptor die Aktivität von AP1- Faktoren und somit potentiell auch die Promotoraktivität von CEACAM1 in Endometriumkarzinomen steigert, während die Zugabe von Progesteron diesen Effekt rückgängig macht. Ein CEACAM1- unabhängiger Effekt dieses Hormons auf die Invasivität wurde jedoch von Shimonovitz *et al* (1998) beschrieben, die zeigen konnten, dass Progesteron über eine verminderte Expression von Metalloproteinasen in Trophoblastzellen deren invasives Verhalten zu hemmen

vermag. Es bleibt zu klären, zu welchem Zeitpunkt der Schwangerschaft und über welche Mechanismen dieser hemmende Einfluss von Progesteron auf die Expression von CEACAM1 eine Rolle spielt.

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Untersuchungen von Proteinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren in der menschlichen Plazenta werden zurzeit sehr intensiv betrieben. Die Grundidee, dass Teile der Plazenta ein physiologisches Modell für das Verständnis von Tumorcharakteristika darstellen könnten, existiert dagegen schon seit einigen Jahrzehnten. Eines der grössten Probleme bei der Arbeit mit menschlichen Plazenten ist ein Ethisches. Da es nahezu unmöglich ist, die Plazenta eines Menschen *in vivo* zu untersuchen, ist die Wissenschaft auf Zellkultur- und Tiermodelle angewiesen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es vornehmlich der Extravillöse Trophoblast ist, der für das tumorähnliche Verhalten der Plazenta verantwortlich ist. Genau wie viele Tumoren verfügt dieser Teil an der Invasionsfront in die mütterliche Dezidua über ein immenses Aufgebot an verschiedenen Proteinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren, die beispielsweise eine Adhäsion, Invasion, Immunmodulation und Induktion von Angiogenese ermöglichen oder modulieren. Eines dieser Proteine, nämlich das Adhäsionsmolekül CEACAM1, wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Da dieses Protein mit seiner Vielzahl von Funktionen und Einflüssen beispielhaft im Rahmen der Invasivität einer Zelle ist, könnte ein Verständnis von dessen Regulation die Prozesse der Implantation der Plazenta weiter aufdecken. Denn nach wie vor ist als entscheidende Frage ungeklärt, warum der Trophoblast, nachdem er Schleimhautanteile der mütterlichen Dezidua (oder teilweise sogar darüber hinaus) invadiert hat, ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr weiter wächst. Wir konnten im Hinblick auf die Regulation von CEACAM1 in dieser Arbeit feststellen, dass die Einflüsse von TPA, Ionomycin und Progesteron an der Expression beteiligt sind und vermuten hierfür Stoffwechselwege, die in erster Linie durch AP1- Transkriptionsfaktoren vermittelt sind. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass diese Regulationsmechanismen sowohl die „physiologischen“ Trophoblastzellen als auch die malignen Jurkat- Zellen

betreffen, jeweils mit zelltypspezifischen Einschränkungen. Die sich folglich stellende Frage ist, ob es möglich sein wird, das maligne Potential von CEACAM1 im Rahmen einer Krebstherapie mit Hilfe von Antikörpern zu „blocken“. Diese Therapieform wird seit einigen Jahren überaus erfolgreich für die Wachstumsfaktoren EGF und VEGF verwendet, die ähnliche Voraussetzungen im Bezug auf Expression und Funktion in der Plazenta aufweisen. Für CEACAM1 findet sich jedoch ein widersprüchliches Verhalten: mal werden dem Protein tumorsuppressive, mal tumorfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Einen interessanten Ansatz verfolgten Horst *et al* im Jahre 2006. Die Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit den angiogenetischen Fähigkeiten von CEACAM1 und etablierte zu diesem Zweck ein Mausmodell mit CEACAM1-Knockout- Mäusen. Das überraschende Ergebnis war, dass die Mäuse sich normal entwickelten und ausschliesslich die forcierte Neoangiogenese gestört war. Dieser Umstand macht CEACAM1 zu einem möglichen Target für eine Vielzahl von Therapieansätzen. Die Bedeutung dieses Proteins reicht von der Invasion gutartiger und maligner Tumoren über die Entstehung von chronisch- inflammatorischen Darmkrankheiten und der Induktion der Angiogenese bis zu der Regulation der Wirkung von Insulin.

Das grosse therapeutische Potential von CEACAM1 setzt bei der Vielzahl von Ursprungsgeweben jedoch ein grundlegendes Verständnis der Regulation und Interaktion im physiologischen wie pathologischen Zusammenhängen voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige wichtige und grundlegende Mechanismen aufgedeckt, die sowohl die Induzierbarkeit dieses Proteins in der Plazenta als auch in leukämischen T- Zellen beeinflussen. Diese Ergebnisse werden dazu beitragen, zu einem besseren Verständnis der Funktion von CEACAM1 als möglichem Ziel zukünftiger Therapieansätze zu gelangen, sowohl was die Regulation der physiologischen bzw. fehlgesteuerten Plazentation angeht als auch Rahmen der Therapien von T- Zell- Leukämien.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Expression, Regulation und Funktion des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 untersucht. Grundlage für diese Untersuchungen war die Beobachtung, dass dieses Adhäsionsmolekül spezifisch von dem Extravillösen Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird, d.h. dem Teil, der für das invasive, tumorartige Eindringen der Plazenta in die Gebärmutter verantwortlich ist. Zudem ist eine Dysregulation dieses Proteins bei einer Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben. Ziel dieser Promotionsarbeit war deshalb die Untersuchung von CEACAM1 auf Proteinebene mittels Western- Blot und auf Promotorebene mittels Luciferase- Assays, jeweils im Vergleich der „physiologisch“ wachsenden Trophoblastzellen mit einer malignen Tumorzelle, in diesem Fall eine leukämischen T- Lymphozytenklons. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Mehrinduktion von CEACAM1 auf das invasive Wachstum von Trophoblastzellen auswirkt.

Im ersten Teil der Promotionsarbeit wurde die Expression und Stimulierbarkeit von CEACAM1 auf Trophoblastzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Plazentazellklone über nur eine geringe endogene CEACAM1-Expression verfügten. Diese basale Expression liess sich deutlich steigern durch die Inkubation der Zellen mit TPA (Tetraphorbolester), einem Substrat der Proteinkinase C. Eine weitere Expressionszunahme konnte durch die Zugabe von Ionomycin (Calcium Ionophore) erreicht werden, wobei sich ein maximaler Effekt bei einer Dosis von 0,01µg/ml und einer 24stündigen Inkubationszeit zeigte. Die Stimulation mit Ionomycin alleine hatte jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die CEACAM1- Expression. Während eine Stimulation der Zellen mit Estradiol und Dexamethason keinen zusätzlichen Effekt erbrachte liess sich für Progesteron in physiologischen Konzentrationen ein hemmender Einfluss auf die Proteinexpression nachweisen. Diese Ergebnisse liessen sich nur mit Einschränkungen auf die Jurkat- Zellen übertragen. Zwar hatte auch hier TPA bei einer geringen Basalexpression einen steigernden Einfluss auf die CEACAM1- Expression. Die Effekte von Ionomycin und Progesteron konnten hier aber nicht gezeigt werden, Ionomycin hatte in diesem Zellsystem sogar einen eher gegensätzlichen Effekt.

7. Zusammenfassung

Nachdem man auf Proteinebene nachgewiesen hatte, welche Stimulantien die CEACAM1- Expression beeinflussten, wurden im zweiten Teil der Arbeit molekulare Mechanismen dieser Effekte auf Promotorebene untersucht. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich lange Abschnitte des CEACAM1- Promotors auf ihre Basalaktivität und Stimulierbarkeit getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Basalaktivität der einzelnen Konstrukte zwar mit deren Länge abnahm, jedoch selbst die kleinsten Promotorabschnitte auf die jeweilige Stimulation ansprachen. Bei dem Abgleich der Basensequenz des Promotors fand sich eine Bindungsstelle für die AP-1- Transkriptionfaktoren unmittelbar vor dem Gen. Die Regulation der Aktivität des CEACAM1- Gens durch diese Faktoren könnten das Aktivierungsmuster gut erklären. Die Induktion der Promotoraktivität durch Stimulation mit TPA konnte in beiden Zellsystemen gezeigt werden, während Ionomycin in den Hybridomzellen einen fördernden, in den Jurkat- Zellen einen konzentrationsabhängig hemmenden Einfluss hatte. Ein Einfluss von Progesteron auf die Aktivität des Promotors konnte nicht nachvollzogen werden.

Mit Hilfe von „Invasions- Assay“- Kits wurde weiterhin das invasive Potential von Hybridomzellen in Abhängigkeit von der CEACAM1- Expression untersucht. Während die unstimulierten Plazentazellen ein geringes invasives Verhalten aufwiesen, durchwuchsen deutlich mehr Zellen die künstliche Basalmembran, nachdem sie mit TPA vorbehandelt wurden. Analog zu den Western- Blot- Versuchen steigerte sich die Invasivität nach Stimulation mit Ionomycin, während Progesteron einen hemmenden Einfluss hatte. Durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers wurde der Nachweis erbracht, dass dieser Effekt massgeblich durch CEACAM1 vermittelt wurde.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass sich die CEACAM1- Expression sowohl in den Plazentazell- Klonen als auch in den malignen Jurkat- Zellen durch die Stimulation von mittels TPA steigern lässt. Ein Unterschied von physiologischer zur pathologischen Regulation lässt sich hierbei nicht ausmachen. Die Muster der Induzierbarkeit von CEACAM1 auf Protein- und auf Promotorebene sprechen am ehesten für eine Aktivierbarkeit des Gens durch den Stoffwechselweg über die Proteinkinase C. Vermittelt wird

7. Zusammenfassung

dieser Effekt vermutlich durch die AP1- Transkriptionsfaktoren, für die sich eine entscheidende Bindungsstelle auf dem CEACAM1- Promotor findet. Die Abweichungen bzgl. der Regulation in den verschiedenen Zellreihen könnten sich am ehesten durch zelltypspezifische Eigenschaften erklären lassen.

8. Quellenangaben

Abou-Rjaily GA, Lee SJ, May D, Al-Share QY, Deangelis AM, Ruch RJ, Neumaier M, Kalthoff H, Lin SH, Najjar SM: CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor--mediated cell proliferation. *J Clin Invest.* 2004 Oct;114(7):944-52.

Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57.

Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Khudyak V, Ariel I, Yagel S: Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol Hum Reprod* 2004, 10(4):229-235

Anthony RV, Limesand SW, Jeckel KM: Transcriptional regulation in the placenta during normal and compromised fetal growth. *Biochem Soc Trans* 2001, 29:42-48.

Baldwin, S, Shen, HM, Chung, A: Platelet-endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and its alternatively spliced isoforms are expressed during early mammalian cardiovascular development. *Development*, 1994, 120, 2539–2553.

Bamberger AM, Bamberger CM, Wald M, Kratzmeier M, Schulte HM: Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Oct 14;123(1):81-8.

Bamberger AM, Bamberger CM, Gellersen B, Schulte HM: Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):6169-74.

Bamberger AM, Briese J, Götze J, Erdmann I, Schulte HM, Wagener C, Nollau P: Stimulation of CEACAM1 expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and calcium ionophore A23187 in endometrial carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2006 Mar;27(3):483-90.

Bamberger AM, Sudahl S, Wagener C, Löning T: Expression pattern of the adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM, CD66a, BGP) in gestational trophoblastic lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 2001 Apr;20(2):160-5.

Bamberger AM, Bamberger CM, Aupers S, Milde-Langosch K, Löning T, Makrigiannakis A: Expression pattern of the activating protein-1 family of transcription factors in the human placenta. *Mol Hum Reprod.* 2004 Apr;10(4):223-8.

Bamberger AM, Briese J, Götze J, Erdmann I, Schulte HM, Wagener C, Nollau P. Stimulation of CEACAM1 expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and calcium ionophore A23187 in endometrial carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2006 Mar;27(3):483-90.

Bamberger AM, Minas V, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Löning T, Charalampopoulos I, Brümmer J, Wagener C, Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, Makrigiannakis A: Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol.* 2006 Jan;168(1):141-50.

Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ: Human Cytotrophoblast Invasion Is Up-regulated by Epidermal Growth Factor: Evidence That Paracrine Factors Modify This Process. *Developmental Biology* 1994, 164:550-561.

Bischof P, Truong K, Campana A: Regulation of trophoblastic gelatinases by proto-oncogenes. *Placenta.* 2003 Feb-Mar;24(2-3):155-63.

Boulton IC, Gray-Owen SD: Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):229-36.

8. Quellenangaben

- Briese J, Oberndoerfer M, Paetschenik C, Schulte HM, Makrigiannakis A, Loening T, Bamberger AM: Osteopontin Is Colocalized with the Adhesion Molecule CEACAM1 in the Extravillous Trophoblast of the Human Placenta and Enhances Invasion of CEACAM1-Expressing Placental Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(9):5407–5413.
- Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Löning T, Bamberger AM, Wagener C: Cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):537-46.
- Buchner K: The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000 Jan;126(1):1-11.
- Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW : Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs.* 2002;172(3):202-17.
- Burrows TD, King A, Loke YW: Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update.* 1996 Jul-Aug;2(4):307-21.
- Campbell S, Rowe J, Jackson CJ, Gallery ED: In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer: the role of matrix metalloproteinases. *Placenta.* 2003 Apr;24(4):306-15.
- Castagnag M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizukag Y: Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The Journal Of Biological Chemistry.* Vol. 257, No. 13, Issue of July 10 1982, pp. 7847-7851.
- Chen CJ, Lin TT, Shively JE: Role of interferon regulatory factor-1 in the induction of biliary glycoprotein (cell CAM-1) by interferon-gamma. *J Biol Chem.* 1996 Nov 8;271(45):28181-8.
- Chen D, Iijima H, Nagaishi T, Nakajima A, Russell S, Raychowdhury R, Morales V, Rudd CE, Utku N, Blumberg RS: Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3535-43.
- Chen CJ, Shively JE : The cell-cell adhesion molecule carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 inhibits IL-2 production and proliferation in human T cells by association with Src homology protein-1 and down-regulates IL-2 receptor. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3544-52.
- Chen CJ, Kirshner J, Sherman MA, Hu W, Nguyen T, Shively JE: Mutation analysis of the short cytoplasmic domain of the cell-cell adhesion molecule CEACAM1 identifies residues that orchestrate actin binding and lumen formation. *J Biol Chem.* 2007 Feb 23;282(8):5749-60.
- Coukos G, Makrigiannakis A, Amin K, Albelda SM, Coutifaris C: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 is expressed by a subpopulation of human trophoblasts: a possible mechanism for trophoblast-endothelial interaction during haemochorial placentation. *Mol Hum Reprod.* 1998 Apr;4(4):357-67
- Cruz PV, Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Hatakeyama K: Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression is an adverse prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005 Jul 15;104(2):354-60.
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ: Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development.* 1994 Dec;120(12):3657-66.
- Donda A, Mori L, Shamshiev A, Carena I, Mottet C, Heim MH, Beglinger C, Grunert F, Rochlitz C, Terracciano L, Jantschke P, De Libero G: Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur J Immunol.* 2000 Sep;30(9):2593-603.

8. Quellenangaben

Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, Basile AA, Elia PE, Holmes KV: Mouse hepatitis virus strain A59 and blocking antireceptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1716-20.

Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst AK, Wagener C, Bamberger AM, Brümmer J: CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1781-7.

Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C: CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):311-20.

Escobar PF, Lurain JR, Singh DK, Bozorgi K, Fishman DA: Treatment of high-risk gestational trophoblastic neoplasia with etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, and vincristine chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2003 Dec;91(3):552-7.

Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE, Queenan JT Jr, Wun TC, Strauss JF 3rd, Kliman HJ: Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest*. 1989 Jul;61(1):20-6.

Fournès B, Sadekova S, Turbide C, Létourneau S, Beauchemin N. The CEACAM1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene*. 2001 Jan 11;20(2):219-30.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991 Apr;113(1):173-85.

Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Fuezesi L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG: Parent cells for trophoblast hybridization 2: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT- negative mutants of the choriocarcinoma cell line JEG-3. *Trophoblast Research* 10:191-201, 1997

Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG: Parent cells for trophoblast hybridization1: Isolation of extravillous trophoblast cells from human chorion leave. *Trophoblast research* 10:181-190, 1997

Gregor, P. D., Sawadogo, M. & Roeder, R. G. (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes & Dev*. 4, 1730-1740.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003 Jul;94(7):575-81.

Hauck W, Nedellec P, Turbide C, Stanners C, Barnett T, Beauchemin N: Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur. J. Biochem*. 223, 529-541 (1994)

Hauck CR: Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol*. 2002 Oct;191(2):55-62. Review.

Hokari M, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Sato M, Tsuchiya A, Takamura M, Yamagiwa S, Suzuki K, Ohkoshi S, Ichida T, Kawachi H, Aoyagi Y: Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*. 2007 Jul 4;81(4):336-45.

8. Quellenangaben

Horst AK, Ito WD, Dabelstein J, Schumacher U, Sander H, Turbide C, Brümmer J, Meinertz T, Beauchemin N, Wagener C: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1596-605.

Hsieh JT, Lin SH: Androgen regulation of cell adhesion molecule gene expression in rat prostate during organ degeneration. C-CAM belongs to a class of androgen-repressed genes associated with enriched stem/amplifying cell population after prolonged castration. *J Biol Chem.* 1994 Feb 4;269(5):3711-6.

Hunkapiller T, Hood L: Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol.* 1989;44:1-63. Review.

Hynes RO: Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev.* 1992 Aug;2(4):621-4. Review.

Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA: Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1285-90.

Kammerer R, Hahn S, Singer BB, Luo JS, von Kleist S: 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.* 1998 Nov;28(11):3664-74.

Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, Kim KW, Bandyopadhyay A, Hong YM, Kim DH, Cho C, Liu JO, Snyder SH, Jung YK : Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9870-5.

Kinugasa T, Kuroki M, Takeo H, Matsuo Y, Ohshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Matsuoka Y: Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. *Int J Cancer.* 1998 Mar 30;76(1):148-53.

Kirshner J, Chen CJ, Liu P, Huang J, Shively JE: CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 21;100(2):521-6.

Kirshner J, Hardy J, Wilczynski S, Shively JE: Cell-cell adhesion molecule CEACAM1 is expressed in normal breast and milk and associates with beta1 integrin in a 3D model of morphogenesis. *J Mol Histol.* 2004 Mar;35(3):287-99.

Kleinerman DI, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh JT: Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res.* 1995 Mar 15;55(6):1215-20.

Kunath T, Ordoñez-García C, Turbide C, Beauchemin N: Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene.* 1995 Dec 7;11(11):2375-82.

Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C: Regulation of embryonic Implantation. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2003, 110:2-9.

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Brümmer J, Schumacher U, Hossfeld DK: Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2002 Nov 1;20(21):4279-84.

Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C: Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002 Feb;80(2):142-9.

Leung N, Turbide C, Olson M, Marcus V, Jothy S, Beauchemin N: Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to

8. Quellenangaben

colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene* 2006 Sep 7;25(40):5527-36.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ: 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol.* 1991 Apr;113(2):437-49.

Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ: Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in preeclampsia. *Am J Pathol.* 1997 Dec;151(6):1809-18.

Lin SH, Pu YS: Function and therapeutic implication of C-CAM cell-adhesion molecule in prostate cancer. *Semin Oncol.* 1999 Apr;26(2):227-33.

Liu Q, Yan X, Li Y, Zhang Y, Zhao X, Shen Y: Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. *Lab Invest* 2004, 84(2):221-228.

Liu W, Wei W, Winer D, Bamberger AM, Bamberger C, Wagener C, Ezzat S, Asa SL: CEACAM1 impedes thyroid cancer growth but promotes invasiveness: a putative mechanism for early metastases. *Oncogene.* 2007 Apr 26;26(19):2747-58.

Luca MR, Bar-Eli M: Molecular changes in human melanoma metastasis. *Histol Histopathol.* 1998 Oct;13(4):1225-31.

Lui VW, Grandis JR: EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res.* 2000, 22:1-11.

Markel G, Wolf D, Hanna J, Gazit R, Goldman-Wohl D, Lavy Y, Yagel S, Mandelboim O: Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J Clin Invest.* 2002 Oct;110(7):943-53.

Maruo T, Matsuo H, Otani T, Mochizuki M: Role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in the development of the human placenta. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(6):1465-70.

Mendelsohn J: The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Mar;8(1):3-9.

Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H: Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 Feb 12.

Moller MJ, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S: Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer.* 1996 Mar 15;65(6):740-5.

Morales VM, Christ A, Watt SM, Kim HS, Johnson KW, Utku N, Texeira AM, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Russell GJ, Russell SE, Bhan AK, Freeman GJ, Blumberg RS: Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a). *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1363-70.

Muenzner P, Naumann M, Meyer TF, Gray-Owen SD: Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):24331-40.

Muenzner P, Billker O, Meyer TF, Naumann M: Nuclear factor-kappa B directs carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 receptor expression in *Neisseria gonorrhoeae*-infected epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7438-46.

8. Quellenangaben

Muenzner P, Rohde M, Kneitz S, Hauck CR: CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005 Aug 29;170(5):825-36.

Nagaishi T, Iijima H, Nakajima A, Chen D, Blumberg RS: Role of CEACAM1 as a regulator of T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Aug;1072:155-75.

Nedellec P, Turbide C, Beauchemin N: Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein 1 gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur. J. Biochem.* 1995. 231,104-114.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ: Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001, 345:1400-1408.

Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M, Ergün S: Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):8932-8.

Phan D, Sui X, Chen DT, Najjar SM, Jenster G, Lin SH: Androgen regulation of the cell-cell adhesion molecule-1 (Ceacam1) gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Nov 26;184(1-2):115-23.

Phan D, Cheng CJ, Galfione M, Vakar-Lopez F, Tunstead J, Thompson NE, Burgess RR, Najjar SM, Yu-Lee LY, Lin SH: Identification of Sp2 as a Transcriptional Repressor of Carcinoembryonic Antigen- Related Cell Adhesion Molecule 1 in Tumorigenesis. *Cancer Research* 2004, May 1, 64, 3072–3078.

Pignatelli M, Vessey CJ: Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol.* 1994 Sep;25(9):849-56.

Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T, Wagener C: CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1996 Jan;44(1):35-41.

Queenan JT Jr, Kao LC, Arboleda CE, Ulloa-Aguirre A, Golos TG, Cines DB, Strauss JF 3rd: Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *J Biol Chem.* 1987 Aug 15;262(23):10903-6.

Scott JL, Dunn SM, Zeng T, Baker E, Sutherland GR, Burns GF: Phorbol ester-induced transcription of an immediate-early response gene by human T cells is inhibited by co-treatment with calcium ionophore. *J Cell Biochem.* 1994 Feb;54(2):135-44.

Scherer SJ, Maier SM, Seifert M, Hanselmann RG, Zang KD, Muller-Hermelinki HK, Angel P, Welter C, Scharl M: P53 and c-Jun Functionally Synergize in the Regulation of the DNA Repair Gene *hMSH2* in Response to UV: The Journal Of Biological Chemistry Vol. 275, No. 48, Issue of December 1 2000, pp. 37469–37473.

Shaulian E, Karin M: AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2390-400. Review.

Sherrington PD, Scott JL, Jin B, Simmons D, Dorahy DJ, Lloyd J, Brien JH, Aebersold RH, Adamson J, Zuzel M, Burns GF: TLISA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression. *J Biol Chem.* 1997 Aug 29;272(35):21735-44.

Shih IM, Kurman RJ: Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast. *Lab Invest.* 1996 Sep;75(3):377-88.

Shih IM, Kurman RJ: Molecular basis of Gestational Trophoblastic Diseases. *Curr Mol Med* 2002, 2:1-12.

8. Quellenangaben

- Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S: Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998, 178:457-461.
- Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Délérís G: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2003 Mar;3(2):95-117.
- Shore VH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS: Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997,18:657-665.
- Sienel W, Dango S, Woelfle U, Morresi-Hauf A, Wagener C, Brümmer J, Mutschler W, Passlick B, Pantel K: Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2260-6.
- Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Obrink B: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5139-46.
- Singer BB, Klaile E, Scheffrahn I, Müller MM, Kammerer R, Reutter W, Obrink B, Lucka L: CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1949-59.
- Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E. & Darnell, J. E. Jr : Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily, *Genes & Dev*. 1990, 4,2353-2365.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E: Expression and importance of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004, 2(1):59.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr: Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J*. 1993 Dec;7(15):1434-41.
- Svenberg T, Hammarstrom S, Zeromski J: Immunofluorescence studies on the occurrence and localization of the CEA-related biliary glycoprotein I (BGP I) in normal human gastrointestinal tissues *Clin. exp. Immunol*. (1979) 36, 436-441.
- Takahashi H, Okai Y, Paxton RJ, Hefta LJ, Shively JE: Differential regulation of carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein by gamma-interferon. *Cancer Res*. 1993 Apr 1;53(7):1612-9.
- Tanaka K, Hinoda Y, Takahashi H, Sakamoto H, Nakajima Y, Imai K: Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*. 1997 Feb 20;74(1):15-9.
- Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38(13):1708-16.
- Tseng CP, Kim YJ, Kumar R, Verma AK: Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible genes modulated by AP-1 or non-AP-1 transacting factors. *Carcinogenesis*. 1994 Apr;15(4):707-11..
- Turbide C, Kunath T, Daniels E, Beauchemin N: Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res*. 1997 Jul 1;57(13):2781-8.
- Volpert O, Luo W, Liu TJ, Estrera VT, Logothetis C, Lin SH: Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35696-702.

8. Quellenangaben

Wilhelm SM, Collier IE, Marmor BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*. 1989 Oct 15;264(29):17213-21.

Wolf M, LeVine H 3rd, May WS Jr, Cuatrecasas P, Sahyoun N: A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters. *Nature*. 1985 Oct 10-16;317(6037):546-9.

Xi L, Feber A, Gupta V, Wu M, Bergemann AD, Landreneau RJ, Litle VR, Pennathur A, Luketich JD, Godfrey TE: Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic Acids Res*. 2008 Nov;36(20):6535-47

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*. 1997 May 23;276(e316):1268-72.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*. 1997 May 1;99(9):2152-64.

Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM: Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*. 1999;3(2):181-8.

Literaturangaben zu Kapitel 2.1:

1. K. Benirschke und P. Kaufmann, Pathology of the Human Placenta, 4th Edition, Springer
2. M. Vogel, Atlas der morphologischen Plazentadiagnostik, 2te Auflage, Springer
3. Kaufmann P, Black S, Huppertz B: Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction* 69, 1-7 (2003)
4. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F: Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007, 5:6

Buchangaben:

1. G. Herold, Innere Medizin 2005, Köln

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP1/ 2	Activating protein 1/ 2
Aq. dest.	Aqua destillata
BD	Becton Dickinson
BGP	Biliäres Glykoprotein
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CAM	Cell Adhesion Molecule
C- CAM	Cell- Cell Adhesion Molecule
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonic antigen
CEACAM1	CEA- related cell adhesion molecule 1
CO ₂	Kohlendioxid
CSF1	Colony stimulating factor
CRH	Corticotropin- releasing hormone
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonucleid acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
Et al.	Et alter
FCS	Foetal calf serum
g/l	Gramm pro Liter
hCG	Humanes Choriongonadotropin
hCT	Humanes Chorionthyreotropin
HDME	Human dermal microvascular endothelial cells
HGPRT	Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase
HNF4	Hepatocyte nuclear factor 4
hPL	Humanes Plazentalaktogen
hPLAP	Human placental alkaline phosphatase
ICAM	Intracellular cell adhesion molecule

9. Abkürzungsverzeichnis

IL-2	Interleukin 2
IFN γ	Interferon gamma
IRF-1	Interferon regulatory factor 1
ISRE	Interferon responsive element
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
IUGR	Intra uterine growth restriction
kD	Kilodalton
mAB	Monoklonal Antibody
Mel- CAM	Melanoma cell adhesion molecule
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
μ l/ μ g	Mikroliter/ Mikrogramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear factor "k light chain enhancer" of B-Cells
NSCLC	Non small cell lung cancer
PAI1	Plasminogen activator inhibitor 1
PBS	Phosphat buffered saline
p.c.	Post conceptionem
PDGFR	Platelet- derived growth factor receptor
PECAM	Platelet- endothelial cell adhesion molecule
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol- 12- myristate- 13- acetate
RNA	Ribonucleid acid
rpm	Rounds per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline- Tween
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloprotease
TLISA1	T- lineage specific activation antigen

9. Abkürzungsverzeichnis

TPA	Tetraphorbolester
uPA	Urokinase- type plasminogen activator
USF	Upstream transcription factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Bamberger und bei Frau PD Dr. med. Ana- Maria Bamberger für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas sowie für die Nutzung der Laboratorien.

Zudem bedanke ich mich für die exzellente Betreuung, die vielen Ratschläge und Rückfragen in regelmässigen Labortreffen sowie das ständige Interesse an kleineren und grösseren Problemen.

Mein grosser Dank gilt weiterhin Dr. med. Juliane Briese. Sie war mir als Betreuerin und Ansprechpartnerin immer eine grosse Hilfe. Ihre Bemühungen und Geduld, die aufkommenden Probleme notfalls per Briefverkehr über den Atlantik zu regeln, waren stets Motivation für mich. Gleiches gilt für die Anregung zu Kongressteilnahmen, Postervorstellung und Schreiben von Anträgen. Vielen Dank für die Vermittlung des „wissenschaftlichen Handwerkes“.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. HaJo Paust für die vielen hilfreichen Tipps und Vermittlung biologischer Grundlagen, ohne die die praktische Durchführung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Ebenso bedanke ich mich bei den medizintechnischen Assistentinnen und Doktorandenkolleginnen und –kollegen für den regen Austausch, die konstruktive Kritik und die Hilfsbereitschaft im Alltag.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. med. C. Wagener aus dem Institut für Klinische Chemie des UKE für die freundliche Bereitstellung von Antikörpern und Plasmidkonstrukten als wichtigem Teil dieser Arbeit.

Letztlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken. Ich schätze mich sehr glücklich, dass ich so viel Vertrauen und Zuwendung, aber auch elterliche Besorgnis und notwendiges Hinterfragen erfahren durfte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Kiel, 18.11.2010

Thorsten Heilmann