

Aus der Abteilung für Gynäkopathologie
Institut für Pathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

**Die Rolle des Adhäsionsmoleküls CEACAM1
im Rahmen der Invasivität plazentarer Zellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Jessica Radde
aus Stade

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

1	Einleitung	1
1.1	Implantation und Entwicklung der humanen Plazenta	1
1.2	Die Differenzierung des Trophoblasten	4
1.2.1	Der villöse Zytotrophoblast	4
1.2.2	Der villöse Synzytiotrophoblast	5
1.2.3	Der proximale extravillöse Trophoblast	6
1.2.4	Der interstitielle extravillöse Trophoblast	6
1.3	Adhäsionsmoleküle	10
1.3.1	Das Adhäsionsmolekül CEACAM1	12
1.3.2	CEACAM1-Expression in der humanen Plazenta.....	16
1.4	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1.1	Zelllinien.....	18
2.1.2	Plasmide	20
2.1.3	Zellextrakte.....	20
2.1.4	Antikörper.....	21
2.1.5	verwendete Reagenzien	21
2.1.6	sonstige Materialien.....	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Maxipräparation des Plasmids.....	23
2.2.2	Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle des Plasmids nach Maxipräparation	23
2.2.3	Zellkulturtechnik	24
2.2.4	Ausplattieren von Zellen für die Transfektion	24
2.2.5	Transfektion.....	25
2.2.6	Ernten der Zellen für die Western Blot-Analyse.....	26
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.8	Probenvorbereitung	27
2.2.9	Western Blot.....	28
2.2.10	Detektion	28
2.2.11	Invasionsassay	29
2.2.12	Auswertung des Invasionsassays.....	32

3	Ergebnisse	33
3.1	Transfektion von Hybridomzellen mit dem CEACAM1-L- Expressionsvektor	33
3.2	Untersuchungen zur möglichen Funktion von CEACAM1 im Rahmen der Invasivität plazentarer Zellen.....	35
4	Diskussion	42
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	48
7	Publikationen	59
8	Anhang	60
8.1	Abbildungsverzeichnis	60
8.2	Abkürzungsverzeichnis	61
9	Danksagung	64
10	Lebenslauf	65

1 Einleitung

1.1 Implantation und Entwicklung der humanen Plazenta

Oberstes Gebot für die menschliche Blastozyste ist der schnelle und störungsfreie Zugang an das mütterliche Gewebe. Die Zeitspanne zwischen der erfolgreichen Befruchtung und einer möglichen Einbettung in das Endometrium ist jedoch begrenzt und wird als „Implantationsfenster“ bezeichnet. Der ideale Zeitraum für diesen Vorgang liegt zwischen dem fünften und siebten Tag post conceptionem (p.c.) (Hustin & Franchimont 1992, Kliman & Feinberg 1992). Am vierten Tag p.c. erreicht die Blastozyste das Uteruslumen. Zu diesem Zeitpunkt besteht sie aus einer Fruchthöhle mit zwei sich voneinander abgrenzenden Zellhaufen, dem Embryoblasten und dem Trophoblasten. Der Embryoblast, aus dem später der Embryonalkörper entsteht, befindet sich zentral. Der Trophoblast dagegen, aus dem sich die Plazenta und das Chorion entwickeln, liegt außen und umschließt die Blastozystenöhle.

Der Implantationsvorgang an sich ist von verschiedenen äußeren Faktoren abhängig, so z. B. von einer erfolgreichen Entwicklung des Corpus luteums und von einer ausreichend hohen Progesteron-Produktion (Critchley et al. 1990). Auch die Reduzierung des elektronegativen Potentials an der apikalen Seite der oberflächlich gelegenen Epithelzellen des Endometriums sowie das Vorhandensein von verschiedenen Zuckern wie beispielsweise Fucose, Galactose und Acetylgalactosaminyl spielen eine wichtige Rolle bei der Einnistung der Frucht. Schon bevor es zu einem ersten Kontakt des Embryos mit dem mütterlichen Gewebe kommt, beginnen sich die endometrialen Bindegewebszellen der Funktionalisschicht unter dem hormonellen Einfluß von Progesteron in die sog. Dezidua umzuwandeln. Die Zellen werden größer, nehmen eine polygonale, epitheloide Gestalt an und beginnen, verstärkt Lipide und Glykogen einzulagern (Kühnel 1999). Die Dezidua hat die Aufgabe, das invasive Wachstum der Trophoblasten durch die Ausbildung einer physikalischen Barriere und durch die Schaffung eines bestimmten lokalen Zytokinmilieus zu kontrollieren (Jansen et al. 1985, Aplin 1991, Graham & Lala 1992, Hustin & Franchimont 1992, Clark 1993, Kliman 2000).

Der Implantationsort ist in den meisten Fällen die mittlere fundusnahe Korpusrückwand, wobei sich der Embryonalpol dem Endometrium zuerst anheftet. Während des Vorgangs

der Einnistung wandelt sich der außen liegende einschichtige Trophoblast überall dort, wo er in Kontakt mit dem mütterlichen Gewebe tritt, zu Synzytium um, so dass nun zwei verschiedene Trophoblastformen entstehen: der Zyto- und der Synzytiotrophoblast. Letzterer entsteht nicht durch eigene Kern- mit nachfolgender Zellteilung, sondern nur durch Nachschub aus dem sich teilenden Zytotrophoblasten, so dass sich eine vielkernige, das endometriale Stroma invasiv durchdringende, Zellmasse bildet, die am Implantationspol als besonders dick imponiert (Kaufmann 1997).

Die Implantation wird als abgeschlossen bezeichnet, sobald sich die Blastozyste vollständig in das endometriale Bindegewebe eingenistet, und das Endometriumepithel sich wieder über der Frucht geschlossen hat. Dies findet etwa um den 12. Tag p. c. statt.

Noch vor Beendigung des Implantationsvorgangs beginnt die Entwicklung der Plazenta. Ungefähr um den achten bis neunten Tag p. c. herum beginnen sich im Synzytiotrophoblasten am Implantationspol eine Vielzahl von miteinander konfluierenden Lakunen zu bilden. Die in diesem Bereich noch erhaltenen synzytiotrophoblastären Anteile werden nun als Trabekel bezeichnet. Zwischen ihnen und der Blastozystenöhle befindet sich jetzt die primäre Chorionplatte, von der aus ab dem 12. Tag p. c. die Trabekel vom Zytotrophoblasten zentral ausgehöhlt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die im Endometrium befindlichen Gefäße durch das immer weiter fortschreitende invasive Wachstum des Synzytiotrophoblasten so angegriffen, dass aus ihnen nun mütterliches Blut austritt und sich in die Lakunen zwischen den Trabekeln ergießt. Dies bedeutet den Anschluss des fetalen an das mütterliche Blut und sogleich auch eine deutliche Verbesserung der Ernährung des Trophoblasten, die nun, bedingt durch die relativ große Kontaktoberfläche der Trabekel mit dem Blut der Mutter, entscheidend gesteigert wird. Dies führt zu einer verstärkten Synzytiotrophoblastbildung, aufgrund derer es am 13. bis 14. Tag p. c. zu einer Lateralaussprossung von Primärzotten kommt, die auch als Chorionzotten bezeichnet werden. Die Trabekel werden nun zu primären Stammzotten. Das das mütterliche Blut enthaltende Lakunensystem wird ab jetzt zum sog. intervillösen Raum. An das Primärzottenstadium schließt sich ab dem 15. Tag p. c. das Sekundärzottenstadium an, welches durch aus extraembryonalem Mesoderm in die Zotten einwachsendes Mesenchym charakterisiert ist. Der basale Anteil der Zotten wird dabei ausgespart und bildet fortan die sog. Anker- oder Haftzotten. Innerhalb des Mesenchymkerns bilden sich etwa ab dem 18. Tag p. c. Kapillaren aus, die den Beginn des

Tertiärzottenstadiums darstellen. Ab dem 21. Tag p. c. ist sowohl die Tertiärzottenbildung als auch die Kapillarbildung abgeschlossen, und die embryonale Blutzirkulation setzt ein. Das morphologische Bild der Zotten ist demnach charakterisiert durch einen mesenchymalen Kern mit Kapillaren und funktionierender Blutzirkulation, einer dünnen, meist durchgehenden Schicht aus teilungsaktivem villösem Zytotrophoblasten und einer dicken, den Zotten außen anliegenden, synzytiotrophoblastären Zellschicht (Aplin 1991, Jauniaux et al. 1992, Kaufmann 1997, Stauber & Weyerstahl 2001).

Ab der 14. Woche p. c. hat die Plazenta zwar noch nicht ihre terminale Größe, aber ihre endgültige Struktur erreicht und ist somit in der Lage, ihre Hauptaufgabe als Stoffwechselorgan ersten Ranges mit einer inneren Oberfläche von rund 12,5 m² einzunehmen. Hierbei steht die Austauschfunktion an erster Stelle. Weitere wichtige Aufgaben sind die Bildung von Hormonen wie z. B. hCG (*humanes Choriongonadotropin*), hPL (*humanes Plazentalaktogen*) und Steroidhormone, die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes und die immunologische Schutzfunktion. Die sog. Plazentaschranke, die als Trennschicht zwischen dem kindlichen und dem mütterlichen Blutkreislauf besteht, wird bis zu der 16. Woche p. c. aus Endothel und Basalmembran der fetalen Blutgefäße, dem mesenchymalen Zottenkern und sowohl von Zyto- als auch von Synzytiotrophoblast gebildet. Da die Zellschicht des Zytotrophoblasten im Laufe der weiteren Entwicklung jedoch kontinuierlich abgebaut wird, legen sich Teile der kindlichen Kapillaren direkt an den Synzytiotrophoblasten an, so dass der Stoffaustausch zwischen mütterlichem und kindlichem Blut deutlich erleichtert wird. Aufgrund der Tatsache, dass sich in der menschlichen Plazenta eine choriale Trennschicht zwischen fetalem und mütterlichem Blut befindet, wird die Plazenta auch als „hämochorial“ bezeichnet (Schiebler & Kaufmann 1997, Stauber & Weyerstahl 2001).

Der erfolgreiche Abschluß derartiger komplexer Vorgänge wie Implantation und Plazentaentwicklung sind von großer klinischer Bedeutung. Eine Störung in einem dieser beiden Prozesse kann zu Spontanaborten führen, oftmals schon bevor die Schwangerschaft überhaupt nachweisbar ist (Cross et al. 1994, Stauber & Weyerstahl 2001).

1.2 Die Differenzierung des Trophoblasten

1.2.1 Der villöse Zytotrophoblast

Als sog. „Stammzelle der Plazenta“ wird der undifferenzierte mononukleäre Zytotrophoblast bezeichnet, der ursprünglich von der äußeren Ummantelung der Blastozyste stammt. Er weist eine hohe proliferative Aktivität auf und bildet die innere Schicht der Tertiärzotten. Lichtmikroskopisch lassen sich kubische bis längliche Zellen mit erhaltenen Zellgrenzen und rundlichen Zellkernen beobachten (Kurman et al. 1984, Kurman 1991). Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen, die der Trophoblast im menschlichen utero-plazentaren System einnimmt, findet eine Differenzierung in drei Hauptpopulationen statt (Kliman et al. 1990b, Kliman & Feinberg 1992, Kliman 2000, Tarrade et al. 2001a). Eine Übersicht zeigt die Abbildung 1.1:

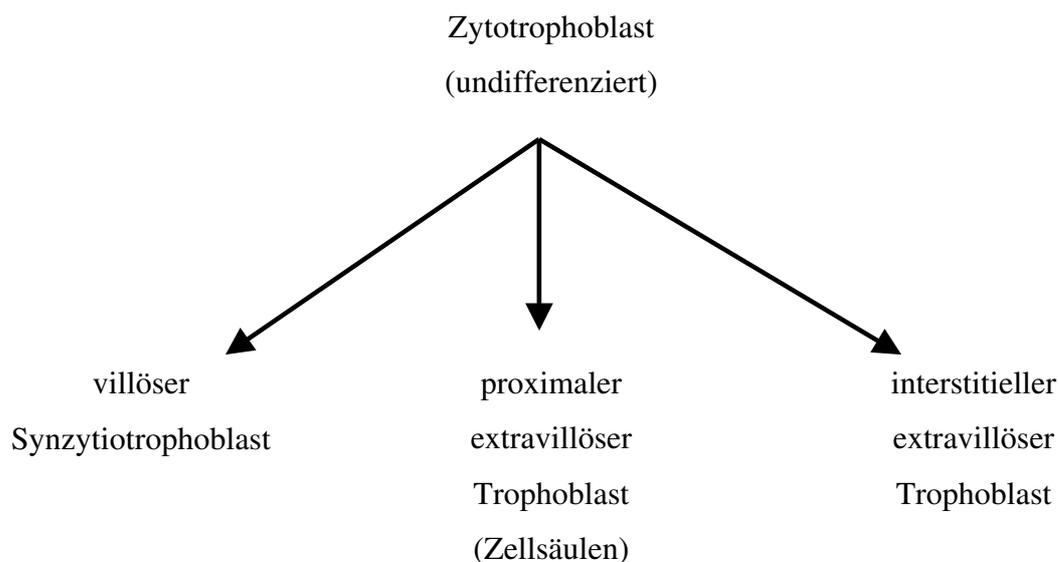


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Differenzierung des Zytotrophoblasten in die drei Hauptpopulationen: villöser Synzytiotrophoblast, proximaler extravillöser Trophoblast und interstitieller extravillöser Trophoblast.

Interessanterweise finden sich während des gesamten Verlaufs der Schwangerschaft in den Zotten eine bestimmte Anzahl von Zytotrophoblasten, die undifferenziert bleiben (Kliman & Feinberg 1992).

1.2.2 Der villöse Synzytiotrophoblast

Diese Zellform entwickelt sich, wie bereits beschrieben, direkt aus dem villösen Zytotrophoblasten und bildet die äußere Schicht der Chorionzotten. Der villöse, terminal differenzierte Synzytiotrophoblast stellt sich als vielkernige Zellmasse mit großen hyperchromatischen und unregelmäßig geformten Zellkernen dar. Zellgrenzen lassen sich nicht mehr beobachten (Kurman et al. 1984, Kurman 1991). Diese Trophoblastzellen gelten als die hormonell aktivsten Zellen des utero-plazentaren Systems des Menschen. Sie sezernieren eine Vielzahl von Hormonen, von denen das am häufigsten untersuchte das hCG darstellt (Kliman & Feinberg 1992). HCG ist ein Glykoprotein, welches äußerst wichtig ist für die Erhaltung der Schwangerschaft. Es ist das am frühesten vom Trophoblasten sezernierte Hormon und dient aus diesem Grund auch als immunologischer Marker für den Schwangerschaftsnachweis in Urin- oder Blutproben der Mutter. Die Aufgabe des hCGs ist es, während der Frühschwangerschaft in den ersten sechs bis zwölf Wochen p. c., in der es alle zwei Tage zu einer hCG-Verdopplung im Serum kommt, die Rückbildung bzw. die Lyse des Corpus luteum zu verhindern. Das Corpus luteum sorgt in dieser Zeit für die Produktion des zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft essentiellen Progesterons durch Granulosazellen des Ovars. Es kommt zu einem hCG-Peak während der zehnten bis zwölften Woche p. c. Nach diesem Zeitpunkt ist der villöse Synzytiotrophoblast selbst in der Lage, für eine ausreichende Progesteron-Produktion zu sorgen (Kliman et al. 1986, Kliman et al. 1987, Aplin 1991, Kliman 2000, Stauber & Weyerstahl 2001).

Ein weiteres wichtiges Hormon, welches hauptsächlich vom villösen Synzytiotrophoblasten sezerniert wird, stellt das hPL dar. Dieses wird während der gesamten Schwangerschaft in kontinuierlich steigender Menge ins maternale Blut abgegeben und gibt Auskunft über den funktionellen Zustand der Plazenta. Es besteht eine Korrelation zwischen dem hPL-Wert im Blut der Mutter und der Menge an funktionsfähigen Synzytiotrophoblastzellen. Die hPL-Produktion steigt ab der 36. Woche p. c. stark an (Aplin 1991, Kliman & Feinberg 1992, Stauber & Weyerstahl 2001).

Dieses Hormon wird jedoch nicht nur vom villösen Synzytiotrophoblasten sezerniert, sondern lässt sich immunhistochemisch auch im interstitiellen extravillösen Trophoblasten nachweisen, wo es als erster klar definierter Marker benutzt wurde, um invasive

Trophoblastzellen aus dem ersten Trimenon darzustellen (Kurman et al. 1984, Kliman 2000).

1.2.3 Der proximale extravillöse Trophoblast

Diese Population des Trophoblasten entwickelt sich während der ersten Schwangerschaftswochen, indem sie die synzytiotrophoblastäre Schicht der Tertiärzotten durchwandert und Kontakt zu der dezidualisierten Schicht des Endometriums aufnimmt. An der Grenze zwischen der Plazenta und dem mütterlichen Gewebe lassen sich dichte Zellmassen beobachten, die oftmals als längliche Strukturen imponieren. Aus diesem Grund wird diese Trophoblastform auch als Zellsäulen (*cell columns*) bezeichnet (Feinberg et al. 1991, Kliman & Feinberg 1992). Es handelt sich hierbei um große mononukleäre Zellen mit rundem bis ovalem Zellkern (Kurman et al. 1984, Kurman 1991).

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass proximal extravillöse Trophoblastzellen die Fähigkeit besitzen, spezifisch mit Kollagen Typ I und IV, Fibronektin und Laminin in Kontakt zu treten. Dies hat zu der Mutmaßung geführt, dass diese Trophoblastenpopulation über spezifische Rezeptoren für Extrazellulärmatrixproteine verfügt (Kao et al. 1988, Kliman & Feinberg 1992, Huppertz et al. 1996). So beginnen Tertiärzotten, die in einem Primärzellkultur-Modell in direkten Kontakt mit Deziduagewebe gebracht werden, die charakteristischen Zellsäulen auszubilden, was darauf schließen lässt, dass es eine Signalwirkung aus der Extrazellulärmatrix der Dezidua geben muß, die die Umwandlung vom undifferenzierten Zytotrophoblasten zum proximal extravillösen Trophoblasten einleitet (Vicovac et al. 1995, Kliman 2000).

1.2.4 Der interstitielle extravillöse Trophoblast

Die dritte Population des Zytotrophoblasten stellt der, für diese Arbeit besonders wichtige, invasive, interstitielle extravillöse Trophoblast dar. Diese Zellform durchwandert invasiv das mütterliche Endo- und Myometrium mit dem Ziel, das Gefäßendothel der uterinen Spiralarterien zu durch- und letztlich auch zu ersetzen, um aus den ursprünglichen *low-capacity/high-resistance* Gefäßen *high-capacity/low-resistance* Gefäße entstehen zu lassen, die dem steigenden Blutfluß des Uterus gewachsen sind. Ab diesem Zeitpunkt wird

der interstitielle extravillöse Trophoblast auch als endovaskulärer extravillöser Trophoblast (*endovascular trophoblast*) bezeichnet. Diese Invasion geschieht in zwei Schüben (*first and second wave*). Der erste Schub findet während des ersten Trimenons statt, der zweite während des zweiten Trimenons und ist bis zur 18. Woche p. c. abgeschlossen. Die Invasionstiefe ist dabei auf das obere Drittel des Uterus begrenzt und selbstlimitierend (Pijnenborg 1990, Aplin 1991, Kliman & Feinberg 1992, Kliman 2000).

Die interzellulären Vorgänge während dieser zeitlich limitierten Invasion sind noch nicht vollständig im Detail bekannt. In *in vitro* Versuchen wurden die Interaktionen zwischen den interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen und der Extrazellulärmatrix des Uterus genauer untersucht. Man kam zu der Schlußfolgerung, dass die interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen möglicherweise Proteine sezernieren, die in der Lage sind, die Extrazellulärmatrix, also Kollagen Typ IV und Laminin, zu zersetzen. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt durch 8-Bromo-cAMP sowohl inhibieren als auch gänzlich aufheben. 8-Bromo-cAMP reguliert in undifferenzierten Zytotrophoblastzellen normalerweise die Entwicklung zu einem nicht-invasiven villösen synzytiotrophoblastären Phänotyp (Kliman & Feinberg 1990a, Aplin 1991, Kliman & Feinberg 1992).

Welche genauen Faktoren aber die Trophoblast-vermittelte Proteolyse steuern ist noch ungeklärt. Bekannt ist, dass proteolytisch wirkende Enzyme, wie z. B. der Plasminogen-Aktivator (PA), eine Rolle im invasiven Geschehen von Trophoblastzellen spielen. Die Aktivität dieses Enzyms wird über sog. PA-Inhibitoren (PAIs) gesteuert. Dies sind Glykoproteine der SERPIN (Serin-Protease-Inhibitor) -Familie, die kovalent an PA binden und dieses inhibieren. Auch scheint die Fibrinolyse innerhalb der intervillösen Anteile der Plazenta über PA-PAI-Interaktionen gesteuert zu werden (Loskutoff et al. 1986, Wun & Reich 1987, Feinberg et al. 1989, Kliman & Feinberg 1992).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch PPAR γ /RXR α -Heterodimere möglicherweise eine Funktion bei der kontrollierten Invasion spielen. PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) gehört zu der Kernrezeptor-Superfamilie, die große Teile der Genexpression ligandenabhängig steuert. Eine Heterodimerisierung mit einem anderen Kernrezeptor, dem RXR (*retinoid X receptor*), ist dabei obligat. PPAR γ kontrolliert eine

vielfältige Bandbreite an zellulären Vorgängen, wie z. B. Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Entzündungsreaktionen (Desvergne & Wahli 1999, Tarrade et al. 2001b).

Auch für die Implantation der Frucht und die Entwicklung der Plazenta sind PPAR γ /RXR-Heterodimere vermutlich notwendig. So zeigte sich in an Mäusen durchgeführten Versuchen, dass das Fehlen von RXR α und RXR β in einen frühzeitigen embryonalen Tod mündet, da eine plazentare Entwicklung nicht mehr möglich ist. Dasselbe gilt für das Fehlen von PPAR γ (Barak et al. 1999, Wendling et al. 1999, Tarrade et al. 2001b).

Generell ist zu bemerken, dass Unregelmäßigkeiten im invasiven Prozess der interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen oder ein fehlerhafter Umbau des Gefäßendothels der uterinen Spiralarterien zu Frühaborten, intrauteriner Wachstumsretardierung und vor allem zu dem Krankheitsbild der Präeklampsie führen (Kliman et al. 1990b, Aplin 1991, Levy et al. 2000, Reister et al. 2001).

Die Abbildung 1.2 verdeutlicht abschließend noch einmal schematisch die einzelnen Zelltypen des utero-plazentaren Systems des Menschen.

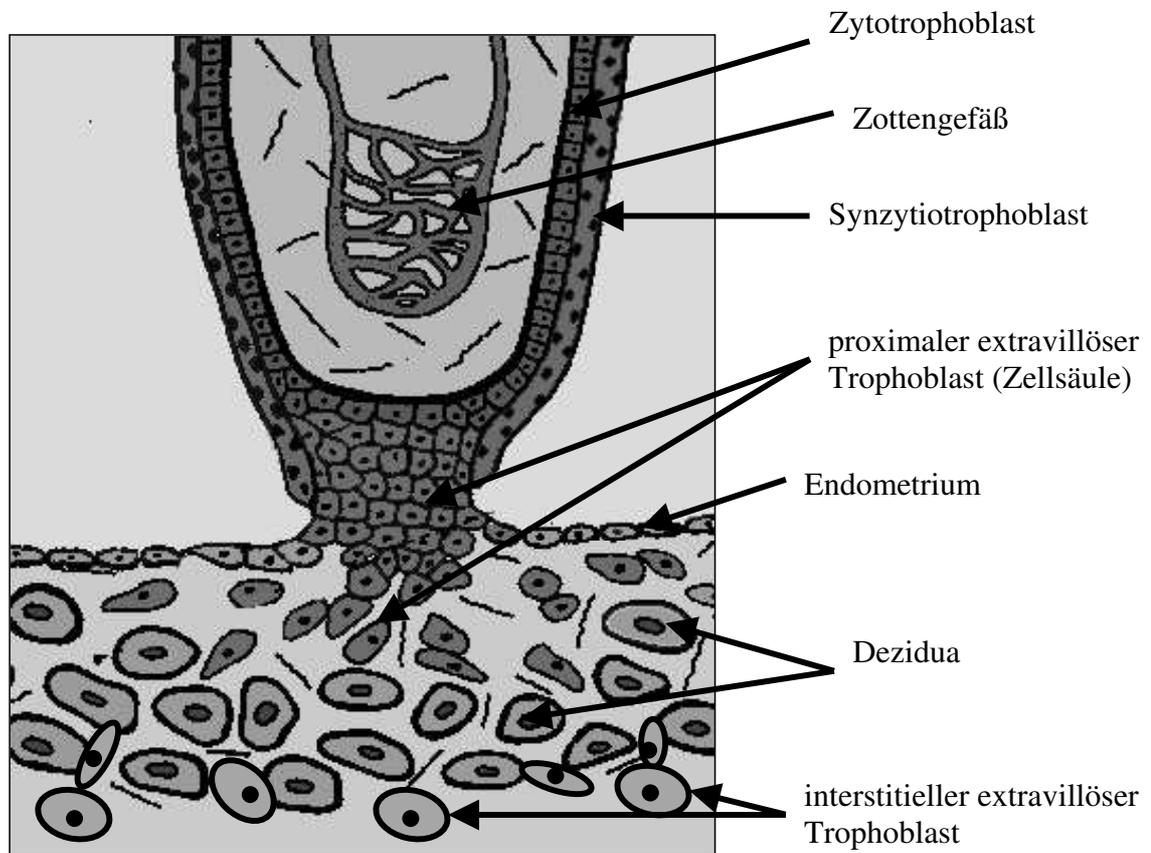


Abb. 1.2: Zelltypen des utero-plazentaren Systems des Menschen. Dargestellt ist eine typische Ankerzotte im Tertiärstadium der Plazentaentwicklung mit dem zweischichtigen Epithel bestehend aus dem innen liegenden Zyto- und dem außen anliegenden Synzytiotrophoblasten. Im Innern der Zotte befindet sich ein Zottengefäß. An der Kontaktstelle des Zytotrophoblasten mit der mütterlichen Dezidua kommt es zur Ausbildung des proximalen extravillösen Trophoblasten. Als interstitieller extravillöser Trophoblast invadiert er das mütterliche Endo- und Myometrium.

1.3 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind transmembranöse Glykoproteine und spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen der Ausbildung zellulärer Architektur und Differenzierung, indem sie sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Verbindungen vermitteln. Ihre Bedeutung, besonders im Hinblick auf maligne Prozesse, wächst ständig. Es hat sich gezeigt, dass gerade diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen Unregelmäßigkeiten in neoplastischen Zellen aufweisen (Pignatelli & Vessey 1994).

Zur Zeit sind fünf verschiedene Familien von Adhäsionsmolekülen bekannt: Integrine, Cadherine, die Immunglobulin-Superfamilie, Selektine und CD44.

Integrine

Diese Adhäsionsmoleküle werden hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert und bestehen aus nicht-kovalent gebundenen $\alpha\beta$ -Heterodimeren. Die Mehrzahl der Integrine vermittelt Zell-Matrix-Verbindungen mit Kollagen, Laminin und Fibronectin und findet sich bevorzugt in epithelialen Zellen. Eine kleinere Anzahl von ihnen vermittelt Zell-Zell-Verbindungen und wird in Leukozyten exprimiert. Integrine spielen eine Rolle bei Entzündungsvorgängen, Wundheilung und Zellentwicklung (Hynes 1992, Pignatelli & Vessey 1994).

Cadherine

Sie spielen die wichtigste Rolle bei der Ausbildung von kalziumabhängigen homologen Zell-Zell-Verbindungen. Das am besten untersuchte von ihnen ist das epitheliale E-Cadherin, welches als Tumorsuppressorgen fungiert. Diese Fähigkeit wurde in diversen humanen Karzinomen epithelialen Ursprungs nachgewiesen (Karzinome der Blase, Lunge, Mamma und des Pankreas). Weitere Cadherine sind N-, P-, V- und T-Cadherin (Frixen et al. 1991, Vleminckx et al. 1991, Pignatelli & Vessey 1994).

Immunglobulin-Superfamilie

Allen diesen Molekülen ist eine extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne mit einer Aminosäuresequenz von 70 – 110 AS Länge und einer β -Faltblattstruktur gemein. Zu

dieser Familie gehören zum einen die MHC-Moleküle (*major histocompatibility molecules*), der T-Zell-Rezeptor, der PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), der CSF-1-Rezeptor (*colony-stimulating factor-1 receptor*) und die Moleküle, die innerhalb dieser Familie für die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen zuständig sind: NCAM (*neural*), VCAM (*vascular*), ICAM1 (*intercellular*) und CEA (*carcinoembryonic antigen*) (Williams & Barclay 1988, Hunkapiller & Hood 1989, Pignatelli & Vessey 1994).

Selektine

Diese Moleküle besitzen eine N-terminale Lektin-Domäne, mit der sie in Anwesenheit von Kalzium heterologe Zell-Zell-Verbindungen eingehen. Zu ihnen gehören P-Selektin und E-Selektin (Bevilacqua et al. 1991, Pignatelli & Vessey 1994).

CD44

CD44 ist ein Zelloberflächenmolekül, welches unter anderem eine Rolle spielt bei der Aktivierung von T-Zellen und der Adhäsion mit Hyaluronaten und Matrixproteinen. Es existieren zwei Isoformen: zum einen die 85 kD Isoform „CD44H“, welche sich auf Fibroblasten, hämatopoetischen Zellen und in mesenchymalen und neuroektodermalen Tumoren findet, und zum anderen die 150 kD Isoform, welche sich nur auf einer Auswahl von epithelialen Zellen finden lässt (Aruffo et al. 1990, Stamenkovic et al. 1991, Pignatelli & Vessey 1994).

Die Familie des karzinoembryonalen Antigens mit der Immunglobulin-Superfamilie gehört zu den funktionell bedeutendsten Adhäsionsmolekülen. Bereits gut untersuchte Mitglieder der CEA-Genfamilie sind unter anderem das Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül-1 (PECAM-1, *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*), auch als CD31 bezeichnet (De Lisser et al. 1994, Coukos et al. 1998), und das Melanom-Zelladhäsionsmolekül (Mel-CAM, *melanoma cell adhesion molecule*), auch bekannt als MUC18 (Shih & Kurman 1996).

PECAM-1 stellt ein transmembranöses Glykoprotein dar, welches hauptsächlich von Zellen des Gefäßsystems exprimiert wird (De Lisser et al. 1994, Coukos et al. 1998). Außerdem wird ihm eine Rolle bei der Angiogenese (Muller et al. 1989) und der Entzündungsreaktion zugesprochen (Muller et al. 1993, Coukos et al. 1998). Auch in

humanen Trophoblastzellen konnte dieses Adhäsionsmolekül nachgewiesen werden, weshalb man möglicherweise davon ausgehen kann, dass dieses Adhäsionsmolekül einen Platz im Rahmen des Implantationsvorgangs einnimmt. Weiterhin scheint es auch für die Entstehung der Präeklampsie und der EPH-Gestose funktionell von Bedeutung zu sein (Coukos et al. 1998).

Das Adhäsionsmolekül Mel-CAM wird in Geweben wie Haarfollikeln, im zerebellären Kortex, im Gefäßendothel und in glatten Muskelzellen exprimiert (Pignatelli & Vessey 1994, Shih et al. 1996). Aber auch im Rahmen von Neoplasien spielt es eine Rolle. In Melanomen konnte es in einer Vielzahl der Fälle nachgewiesen werden, wobei der Expressionslevel mit dem Invasivitäts- und Metastasierungspotential der Melanomzellen assoziiert war (Luca et al. 1993, Shih et al. 1994, Shih et al. 1996). Auch in Angiosarkomen, Leiomyosarkomen und in extravillösen Trophoblastzellen fand man eine Mel-CAM-Expression (Shih et al. 1996, Shih & Kurman 1996).

Für die vorliegende Arbeit war vor allem das Adhäsionsmolekül CEACAM1 von besonderer Bedeutung, welches nun im folgenden genauer beschrieben wird.

1.3.1 Das Adhäsionsmolekül CEACAM1

Die Abkürzung CEACAM1 steht für „*CEA-related cell adhesion molecule 1*“ und ist der derzeit gebräuchliche Name für dieses Adhäsionsmolekül nach einer Neuordnung der Nomenklatur im Jahre 1999 (Beauchemin et al. 1999). In früheren Publikationen findet man unter anderem die Bezeichnungen C-CAM (*cell-cell adhesion molecule*), BGP (*biliäres Glykoprotein*) oder CD66a. CEACAM1 gehört zu der CEA-Genfamilie, die als eine Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie fungiert. Die Existenz von CEACAM1 wurde erstmals in der Ratte beschrieben. Dort wurde es als C-CAM bezeichnet (Ocklind & Öbrink 1982). Unabhängig davon wurde ein zur CEA-Familie gehörendes Glykoprotein aus humanen Gallengangsepithelien isoliert, welches den Namen „BGP“ erhielt. Nachdem die DNA des C-CAM-Moleküls der Ratte kloniert und sequenziert worden war, erkannte man, dass es sich bei dem BGP-Molekül um das humane Äquivalent handelte (Aurivillius et al. 1990). Als dieses Glykoprotein dann auch noch in humanen Granulozyten

nachgewiesen werden konnte und dort als CD66a bezeichnet wurde, erfolgte die bereits oben beschriebene Neuordnung der Nomenklatur.

CEACAM1 besteht aus vier extrazellulären, tandem-ähnlich hintereinander angeordneten Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranösen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne und ist in der Lage, sowohl homologe als auch heterologe Zell-Zell-Verbindungen auszubilden (Markel et al. 2002). Es existieren zwei Isoformen: CEACAM1-L und CEACAM1-S, die sich in der Länge der Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen COOH-Endes unterscheiden und durch unterschiedliches Splicen eines Exons entstehen (Edlund et al. 1993). Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L (*long*) besitzt 71 Aminosäuren und von CEACAM1-S (*short*) 10 Aminosäuren, wobei sechs dieser Aminosäuren mit der Sequenz der L-Form identisch sind. Diese beiden Isoformen werden in den meisten Geweben, in denen CEACAM1 vorkommt, koexprimiert, allerdings in jeweils unterschiedlichen Anteilen.

Die Abbildung 1.3 verdeutlicht schematisch den Aufbau von CEACAM1.

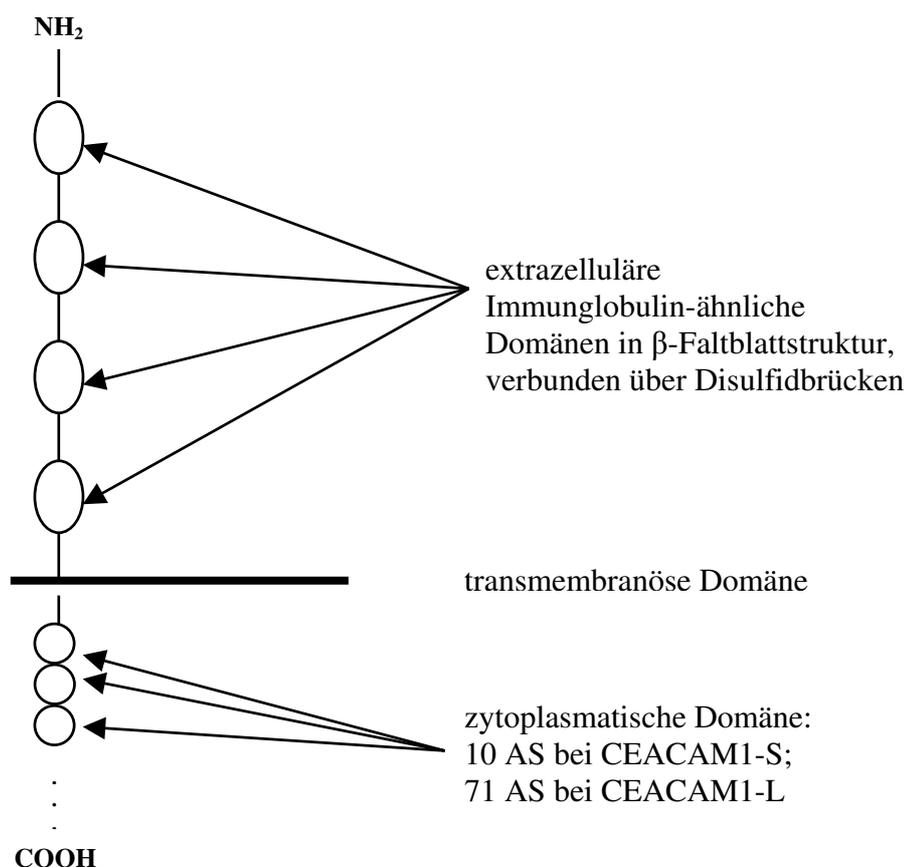


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des Adhäsionsmoleküls CEACAM1. Man erkennt die vier extrazellulären tandem-ähnlich hintereinander angeordneten Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Es folgt die transmembranöse Domäne. Die zytoplasmatische Domäne besteht bei CEACAM1-S aus 10 Aminosäuren und bei CEACAM1-L aus 71 Aminosäuren.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass epitheliale Zellen verstärkt die kurze Isoform CEACAM1-S exprimieren. Auffallend am Muster der CEACAM1-Expression ist, dass die L-Form sowohl apikal als auch lateral an den Zelloberflächen exprimiert wird, wohingegen die S-Form ausschließlich apikal vorkommt. Aufgrund des eben beschriebenen Expressionsmusters findet in epithelialen Zellen die stärkste CEACAM1-Expression also apikal statt (Sundberg & Öbrink 2002). Es besteht hierbei allerdings ein Unterschied, ob es sich um proliferierende Zellen oder um ruhende Zellen handelt, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden. Bei proliferierenden Zellen liegt die CEACAM1-Expression niedriger als in Zellen in der Ruhephase (Cheung et al. 1993, Baum et al. 1996, Öbrink 1997, Singer et al. 2002, Sundberg & Öbrink 2002).

CEACAM1 wird in einer Vielzahl von menschlichen Geweben exprimiert, so z. B. in der Leber, im Pankreas, in der Prostata, im Endometrium und in der Mamma, aber auch in Zellen myeloischen Ursprungs und im extravillösen Trophoblasten der Plazenta (Prall et al. 1996, Bamberger et al. 2000, Ebrahimnejad et al. 2000, Singer et al. 2002, Sundberg & Öbrink 2002). Eine wichtige Rolle spielt CEACAM1 als mikrobieller Rezeptor für Bakterienproteine, so z. B. für *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Hämophilus influenzae* und Opacity-assoziierten Proteinen pathogener *Neisseriae*, wie *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*. Bei Infektion mit einem dieser Erreger kommt es in Granulozyten zur Aktivierung einer Signalkaskade (N-terminale Jun-Kinase), die zu erhöhter Phagozytose der Bakterien führt. Auch das Maus-Hepatitis-Virus benutzt CEACAM1 bzw. Ceacam1 in der Maus als Rezeptor (Dveksler et al. 1993, Hauck et al. 1998, Ebrahimnejad et al. 2000, Muenzner et al. 2001, Singer et al. 2002).

Es handelt sich bei CEACAM1 um ein äußerst multipotentes Molekül, welches für eine Vielzahl von Zellaktivitäten von Bedeutung ist. So ist es mit seiner zytoplasmatischen Domäne unter anderem an der Regulation von Tyrosinkinase-abhängigen Signalkaskaden beteiligt. Die Phosphorylierung eines oder zweier Tyrosinreste (Tyr-488 und Tyr-515), die im übrigen bei der kurzen Isoform CEACAM1-S nicht vorhanden sind, durch verschiedene Proteinkinasen führt zu einer Assoziation mit den Proteintyrosinkinasen (PTKs) der Src-Familie und den Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) SHP-1 und -2. Über diese Interaktionen scheint CEACAM1 an der Signaltransduktion teilzunehmen, wobei die genauen Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt sind (Brümmer et al. 1995, Huber et al. 1999, Ebrahimnejad et al. 2000, Singer et al. 2000, Singer et al. 2002, Sundberg &

Öbrink 2002). Weitere Bereiche, auf die CEACAM1 vermutlich einen Einfluß nimmt, sind unter anderem Zellproliferation und Apoptose (Huang et al. 1999, Singer et al. 2000, Singer et al. 2002), T-Zell-vermittelte Zytotoxizität (Markel et al. 2002, Singer et al. 2002), Angiogenese (Ebrahimnejad et al. 2000, Ergün et al. 2000) und Tumorwachstum (Bamberger et al. 1998, Bamberger et al. 2001, Brümmer et al. 2001, Estrera et al. 2001).

Eine scheinbar sehr wichtige und mittlerweile auch vielfach gut untersuchte Besonderheit von CEACAM1 ist seine Herabregulierung in Tumoren epithelialen Ursprungs, welche unter anderem in hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen festgestellt wurde (Hixson et al. 1985, Neumaier et al. 1993, Kunath et al. 1997). Eine Studie, in der kolorektale Karzinome und die jeweils dazugehörige normale, nicht befallene Kolonmukosa hinsichtlich der CEACAM1-Expression untersucht wurden, zeigte in über 80 % der Fälle eine Herabregulierung der CEACAM1-Expression im Vergleich zur nicht befallenen Mukosa. Die Annahme, dass eine Herabregulierung oder ein Verlust der CEACAM1-Expression zu stärkerem invasiven Wachstum und einem gesteigerten Befall an Lymphknoten führt, konnte in diesem Fall ebenfalls bestätigt werden (Neumaier et al. 1993).

Auch in Prostata- (Pu et al. 1993), Mamma- (Riethdorf et al. 1997) und Endometriumkarzinomen (Bamberger et al. 1998) konnte diese Herabregulierung nachgewiesen werden, was zu der Frage führte, ob CEACAM1 möglicherweise als Tumorsuppressor fungieren könnte. Eine Rolle in diesem bisher fast ungeklärten Mechanismus spielt die Aminosäure Serin (Ser503) an der zytoplasmatischen Domäne der langen CEACAM1-Isoform (CEACAM1-L). Eine experimentell durchgeführte Mutation dieser Aminosäure zu Alanin in verschiedenen Karzinomzelllinien führte zu einem vermehrten Wachstum dieser Zelllinien im Gegensatz zu den Zelllinien, die den CEACAM1-L-Wildtyp exprimierten (Estrera et al. 2001, Fournès et al. 2001). Vollständig geklärt ist die Wirkungsweise von CEACAM1 noch nicht. Es hat sich gezeigt, dass CEACAM1 indirekt an das Aktinzytoskelett gebunden ist. Mögliche Bindungspartner sind zum einen Paxillin, ein Multidomänenadaptorprotein, welches eine wichtige Funktion in der Erhaltung von Zellstruktur, -motilität und -teilung sowie in der Ausbildung von homophilen und heterophilen Zellkontakten einnimmt, indem extrazelluläre Bindungspartner an das Aktinzytoskelett gebunden werden (Turner 1998, Ebrahimnejad et al. 2000). Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von CEACAM1 ist Integrin β_3 . Man

findet eine Koexpression und Koloakalisation von CEACAM1 und Integrin β_3 in extravillösen Trophoblastzellen während der Entwicklung der Plazenta und in der Invasionsfront von malignen Melanomen (Brümmer et al. 2001, Thies et al. 2002).

1.3.2 CEACAM1-Expression in der humanen Plazenta

In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass CEACAM1 während der Schwangerschaft in glandulären Zellen und im Endothel kleinerer Gefäße des Endometriums exprimiert wird, während Deziduazellen keine derartige Expression aufweisen. Im Gewebe normal entwickelter Plazenta wird CEACAM1 spezifisch vom extravillösen Trophoblasten exprimiert, wobei die stärkste Positivität im proximalen extravillösen Trophoblasten der Haftzotten zu beobachten ist. Aber auch in tieferen interstitiellen Trophoblastansammlungen, den sogenannten *Trophoblast-Inseln*, in Trophoblastproliferationen der distalen Enden der Tertiärzotten (auch als *capping mass* bezeichnet) und im Endothel villöser Kerngefäße lässt sich CEACAM1 nachweisen. Das villöse Mesenchym und der villöse Zyto- und Synzytiotrophoblast sind dagegen negativ (Bamberger et al. 2000).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die spezifische Lokalisation von CEACAM1 im extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta gab den Anlaß, dieses Molekül im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner möglichen Beteiligung im Implantationsprozeß und bei der Entwicklung der Plazenta zu untersuchen. Der extravillöse interstitielle Trophoblast ist in der Lage, das mütterliche Gewebe invasiv zu durchdringen. Im Gegensatz zu malignen Tumorzellen ist dieser Vorgang hinsichtlich der räumlichen Ausdehnung und des Zeitrahmens jedoch streng limitiert. Die genauen Mechanismen, die für diese exakte Kontrolle notwendig sind, sind noch nicht geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 im Rahmen des physiologisch ablaufenden invasiven Prozesses während der plazentaren Entwicklung des Menschen zu untersuchen. Dafür wurde ein auf humanen extravillösen Trophoblastzellen basierendes Hybridomzellkulturmodell verwendet, mit Hilfe dessen die Frage untersucht werden sollte, ob CEACAM1 in der Lage sein würde, mittels Transfektion mit einem CEACAM1-Expressionsvektor das invasive Potential dieser humanen Zellen plazentaren Ursprungs zu stimulieren. Die Invasivität wurde dabei unter Verwendung der BIOCOAT[®] Matrigel[®] Invasion Chamber von Becton Dickinson untersucht.

2 Material und Methoden

2.1.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Hybridomzelllinie mit der Bezeichnung Klon „88“ verwendet (Herkunft: Prof. Dr. med. Peter Kaufmann, Technische Universität, Aachen), die aus einem Klon der Choriokarzinomzelllinie Jeg-3 und primär extravillösen Trophoblastzellen aus dem Chorion laeve des dritten Trimenons entstanden ist (Funayama et al. 1997, Gaus et al. 1997). Das Chorion laeve wurde aus zwei Gründen als Gewebe zur Extraktion der benötigten Zellen ausgewählt. Zum einen ist es primär frei von villösen Trophoblastzellen, und zum anderen ist es zusätzlich weitestgehend frei von sich noch teilenden trophoblastären Stammzellen. Als Marker, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um die gewünschten extravillösen Trophoblastzellen handelte, wurde das Enzym hPLAP (*human placental alkaline phosphatase*) verwendet, welches im Chorion laeve ausschließlich von extravillösen Trophoblastzellen exprimiert wird. Da die extrahierten Trophoblastzellen keine Fähigkeit mehr zur Proliferation aufwiesen, mussten sie mit geeigneten malignen Tumorzellen zusammengebracht werden. In diesem Fall handelte es sich um Choriokarzinomzellen der Zelllinie Jeg-3. Grundvoraussetzung für jede Hybridomzellkultur ist es, die nicht zu Hybridomen fusionierten malignen Tumorzellen zu eliminieren, da diese ansonsten die langsamer wachsenden Hybridome aufgrund ihrer wesentlich schnelleren Teilungsfähigkeit überwuchern würden. Dieses wird durch die Verwendung von Tumorzellmutanten erreicht, die nicht mehr in der Lage sind, das Enzym HGPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*) zu exprimieren. Dieses Enzym stammt aus dem Purinbasenabbau und ist verantwortlich für die Umwandlung von Hypoxanthin und Guanin in IMP bzw. GMP. Die nicht fusionierten, HGPRT-negativen malignen Tumorzellen können dann durch eine Behandlung mit Azaserin eliminiert werden. Die erfolgreich entstandenen Hybridome dagegen können den Verlust von HGPRT durch die normale Enzymaktivität im Wildtyp ihres Fusionspartners, in diesem Fall die extravillösen Trophoblastzellen, ausgleichen und überleben (Funayama et al. 1997, Gaus et al. 1997).

Der Klon „88“ dieser Hybridomzelllinie, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wuchs adhärent als Monolayer in den Zellkulturflaschen. Die Morphologie dieser Zellen kann man als leicht kugelig mit vereinzelt spindeligen Ausläufern beschreiben.

Die Abbildung 2.1 skizziert die Entstehung der Hybridomzellen.

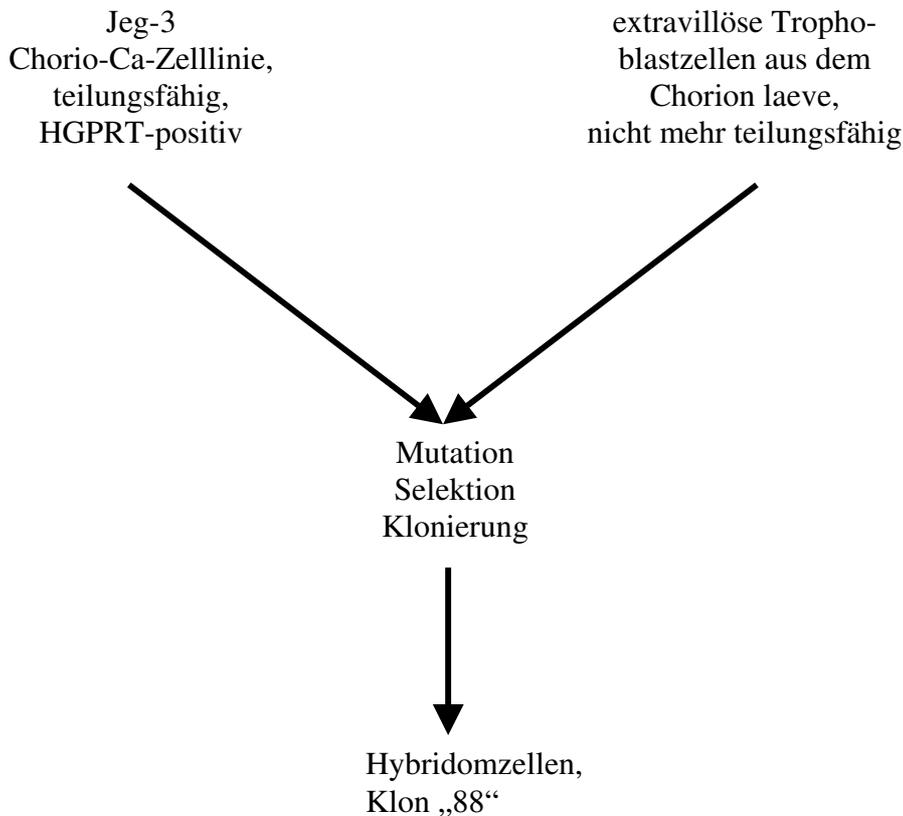


Abb. 2.1: Entstehung der Hybridomzellen, Klon „88“. Die Hybridomzellen entstanden aus der teilungsfähigen Choriokarzinomzelllinie „Jeg-3“ und nicht mehr teilungsfähigen extravillösen Trophoblastzellen aus dem Chorion laeve.

Weiterhin wurde die Zelllinie „HT-1080“ verwendet (Herkunft: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abt. für Klinische Chemie, UKE), die als Positivkontrolle für das Invasionsassay diente. Bei diesen Zellen handelte es sich um Fibrosarkomzellen mit stark invasivem Potential, die ebenfalls als Monolayer in den Zellkulturflaschen wuchsen und eine stark spindelige Morphologie aufwiesen. Diese Zelllinie wurde vom Hersteller der BIOCOAT[®] Matrigel[®] Invasion Chamber offiziell als Positivkontrolle empfohlen.

2.1.2 Plasmide

<u>Name</u>	<u>Größe</u>	<u>Herkunft</u>
CEACAM1-L cDNA	1677 bp	Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abt. für Klinische Chemie, UKE

<u>Name</u>	<u>Größe</u>	<u>Herkunft</u>
pcDNA 3.1(-)	5,4 kb	Invitrogen, San Diego, CA, USA

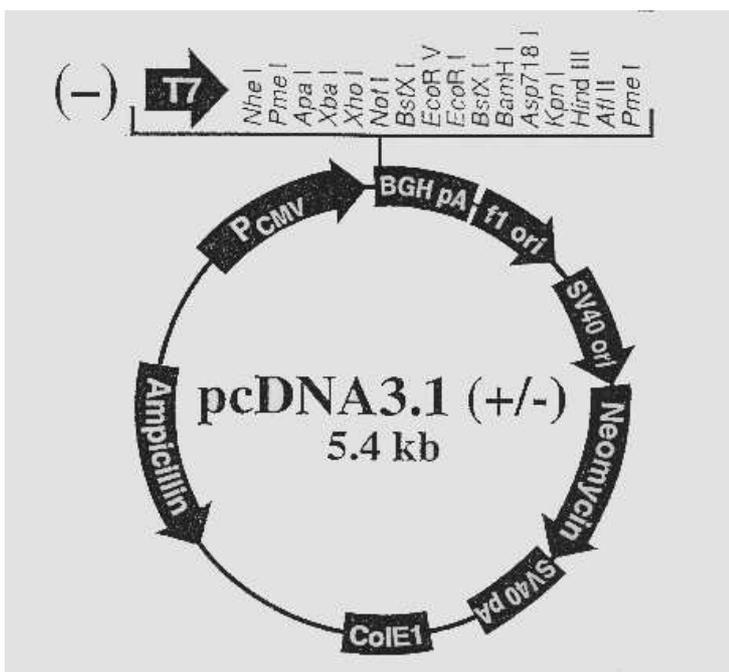


Abb. 2.2: Vektor pcDNA 3.1 (-). Klonierungsvektor für die CEACAM1-L-cDNA.

Das CEACAM1-L-Insert mit einer Größe von 1677 bp wurde mittels Xho und Hind III in den Vektor pcDNA 3.1 (-) hineinkloniert. Dieses Ergebnis wurde in der Abteilung für Gynäkopathologie mehrfach durch Sequenzierungsanalysen bestätigt.

2.1.3 Zellextrakte

Es wurden lysierte Zellextrakte der Melanomzelllinie „G361“ (Herkunft: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abt. für Klinische Chemie, UKE) als Positivkontrolle für den Western Blot verwendet (Aufbewahrung bei -20°C).

2.1.4 Antikörper

Anti-CEACAM1,
mAb 4D₁C₂

monoklonaler Antikörper, der
spezifisch das CEACAM1-Protein
erkennt

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abt.
für Klinische Chemie, UKE

2.1.5 verwendete Reagenzien

Acrylamid/bis-Acrylamid

Sigma-Aldrich, Steinheim

Agarose NuSieve 3:1

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Ammoniumpersulfat

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Ampicillin

Gibco BRL, Paisley, UK

Blockingreagenz

Roche, Mannheim

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich, Steinheim

DMEM (mit 4,5 g/L Glucose)

Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

DMEM (mit Phenolrot)

Gibco BRL, Paisley, UK

Ethanol

Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid

Sigma-Aldrich, Steinheim

Eukitt

O. Kindler, Freiburg

FCS

Gibco BRL, Paisley, UK

Glycerin

Merck, Darmstadt

Glycin

Roth, Karlsruhe

Isopropanol

Merck, Darmstadt

L-Glutamin

Gibco BRL, Paisley, UK

Lipofectamin/Plus Reagenz

Invitrogen, San Diego, CA, USA

Luria Broth Base

Gibco BRL, Paisley, UK

Maleinsäure

Serva, Heidelberg

2-Mercaptoethanol

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Methanol

Merck, Darmstadt

Natriumchlorid

Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland

Natriumhydroxidplättchen

Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland

Nutrient Mixture F-12 HAM	Sigma, St. Louis, MO, USA
PBS Dulbecco's	Gibco BRL, Paisley, UK
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Paisley, UK
Rainbow coloured protein molecular weight marker	Amersham, Buckinghamshire, UK
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Serva, Heidelberg
Thimerosal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tricine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Paisley, UK
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

2.1.6 sonstige Materialien

BIOCOAT [®] Cell Culture Inserts	Becton Dickinson, Bedford, MA, USA
BIOCOAT [®] Matrigel [®] Invasion Chamber	Becton Dickinson, Bedford, MA, USA
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilm „Hyperfilm ECL“	Amersham, Buckinghamshire, UK
Transfermembran	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
Zellkulturflaschen Nunclon Surface 25 cm ² , 75 cm ²	Nunc, Roskilde, Denmark
Zellkulturplatten (six-well-plates)	Costar Incorp., Corning, NY, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Maxipräparation des Plasmids

Zur Vervielfältigung von Plasmiden verwendet man die Methode der sogenannten Maxipräparation. Hierbei wird unter Verwendung eines standardisierten Verfahrens mittels eines Plasmid Maxi Kits die gewünschte Menge eines bestimmten Plasmids gewonnen. Zur Maxipräparation des CEACAM1-L-Expressionsvektors wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit von Quiagen, Hilden, benutzt.

Zuerst wurde das Medium (Luria Broth Base) mit 1 µl Ampicillin pro ml Medium versetzt. Danach wurde das Plasmid „CEACAM1-L“ hinzugegeben und das Medium bei 37°C im Schüttelwasserbad über Nacht inkubiert. Das Ampicillin wurde verwendet, um das Wachstum aller nicht plasmidtragenden Bakterien zu verhindern.

Am nächsten Tag fand dann die Maxipräparation des Plasmids unter Verwendung des QIAfilter Plasmid Maxi Kits von Quiagen statt. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Bakterienpellets wurden mit den angegebenen Puffern des Quiagen Kits resuspendiert und in ein Falcon umgefüllt. Während der darauffolgenden Inkubationszeit wurden die Quiafilter-Spritzen equilibriert. Daran schloß sich zuerst die DNA-Elution und dann die DNA-Präzipitation an, die durch Zugabe von Isopropanol und anschließendem Zentrifugieren bei 15.000 rpm in der Kühlzentrifuge durchgeführt wurde. Die entstandenen Pellets wurden mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde unter gleichen Bedingungen noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und die DNA wurde luftgetrocknet, bevor sie in TE8-Puffer (10 mM Tris / HCl, pH 8) aufgenommen und ein bis zwei Tage bei 4°C gelagert wurde.

Nach der Lagerungszeit wurde die DNA mit TE8-Puffer so lange verdünnt, bis sich photometrisch eine Endkonzentration von 1 µg DNA /µl ergab.

2.2.2 Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle des Plasmids nach Maxipräparation

Nach einer Maxipräparation sollte kontrolliert werden, ob sich das Plasmid noch an der richtigen Stelle im Vektor befindet. Hierzu führt man einen Restriktionsverdau durch. Die Kontrolle erfolgt anschließend mittels Agarosegelelektrophorese.

Es wurden sowohl die DNA als auch der Leervektor für den Verdau eingesetzt. Dem Ansatz wurden ein Puffer für den Verdau und die Enzyme XhoI, Hind III und RNase (Life Technologies, Paisley, UK) hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Wasserbad.

Am nächsten Tag wurde das entstandene Produkt auf einem 1%-igen Agarosegel (Agarose NuSieve, TAE-Puffer pH 7,8, Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen, wobei diese aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA in einem elektrischen Feld zur Anode wandern.

Nach der vollständigen Auspolymerisierung des Gels wurden die Proben zusammen mit einem Lastpuffer und einem Marker zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Moleküle auf das Gel aufgebracht. Die Laufzeit des Gels betrug 1 Std. bei 80 Volt. Danach wurde das Gel mittels einer UV-Kamera (UVP, San Gabriel, USA) fotografiert.

2.2.3 Zellkulturtechnik

Die für diese Arbeit verwendeten Hybridomzellen mit der Bezeichnung Klon „88“ wurden bei 37°C und 5% CO₂-Beimischung im Inkubator (Kendro, Hanau) in Kultur gehalten. Die Zellen wurden zweimal die Woche bei einer Konfluenz von 90 – 95 % in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Das Nährmedium (Nutrient Mixture F-12 HAM, DMEM mit 4,5 g/L Glucose, FCS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin) wurde jeweils am darauffolgenden Tag gewechselt. Für das Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA verwendet. Die Handhabung der ebenfalls verwendeten Zelllinie „HT-1080“ unterschied sich nur dadurch, dass am Tag nach dem Umsetzen der Zellen in neue Zellkulturflaschen ein Wechsel des Nährmediums (Nutrient Mixture F-12 HAM, DMEM mit Phenolrot, FCS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin) unterblieb.

2.2.4 Ausplattieren von Zellen für die Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in six-well-plates ausplattiert, wobei die Menge der Zellen pro well 500.000 Zellen / 2 ml Medium betrug.

Dazu wurden die konfluent gewachsenen Zellen mittels Trypsin-EDTA abgelöst. Am Mikroskop (Hundt, Wetzlar) wurde eine kleine Menge der Suspension auf eine Fuchs-

Rosenthal-Zählkammer gegeben, und es wurden drei ausgezeichnete Quadrate (die jeweils insgesamt aus 16 Quadraten bestanden) ausgezählt. Für diese drei Werte wurde der Mittelwert errechnet, welcher dann mit dem Faktor 5000 multipliziert wurde. Somit ergab sich definitionsgemäß die Zahl der Zellen pro ml. Ausgehend von dieser Zahl konnte dann das Verhältnis von Zellsuspension und Nährmedium berechnet werden, welches für das Ausplattieren der Zellen benötigt wurde.

2.2.5 Transfektion

Die Transfektion dient dem Einbringen von Fremd-DNA in Zellen. Sie wird 24 Std. nach dem Ausplattieren durchgeführt. Ein Teil der Zellen wird mit dem Plasmid transfiziert, bei dem anderen Teil wird eine sogenannte „mock-Transfektion“ mit dem Leervektor ohne DNA als Negativkontrolle durchgeführt. Die Transfektion wurde mithilfe der Lipofectamin Plus Reagenz vorgenommen, wobei die Plus-Reagenz die Aufgabe hat, die DNA zu entspiralisieren, um das Einbringen der Fremd-DNA zu erleichtern. Die später hinzugegebene Lipofectamin-Reagenz optimiert dann den Vorgang der DNA-Liposomen, in ihren natürlichen Ausgangszustand als DNA-Doppelhelix zurückzukehren.

Als erstes wurde FCS-freies Nährmedium hergestellt, welches aus gleichen Teilen DMEM mit 4,5 g/l Glucose und Nutrient Mixture F-12 HAM bestand.

Die Reaktionsgemische wurden in sterilen Eppendorfgläsern angesetzt. Hierfür galten folgende Standardmengen:

100 µl FCS-freies Medium / well
1 µl Plasmid bzw. Leervektor / well
6 µl Plus Reagenz / well

Für den Lipofectamin-Ansatz galten die folgenden Standardmengen:

100 µl FCS-freies Medium / well
4 µl Lipofectamin Reagenz / well

Die Inkubationszeit für jedes Reaktionsgemisch betrug 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurde jeweils die Hälfte des Lipofectaminansatzes in den Plasmid- und in den Leervektoransatz gegeben. Es erfolgte eine erneute 15-minütige Inkubation.

In der Zwischenzeit wurden die sich noch im Inkubator befindenden six-well-plates mit PBS gewaschen und mit FCS-freiem Medium überschichtet.

Nach Beenden der Inkubationszeit wurden in jedes well 211 µl des Plasmid- bzw. des Leervektoransatzes direkt auf die Zellen pipettiert. Diese definierte Menge setzt sich wie folgt zusammen und gilt pro well:

200 µl FCS-freies Medium

1 µl Plasmid bzw. Leervektor

6 µl Plus Reagenz

4 µl Lipofectamin Reagenz

Die six-well-plates wurden daraufhin wieder in den Inkubator (37°C, 5 % CO₂-Beimischung) gestellt. Nach drei Std. wurde jedes well mit Nährmedium aufgefüllt, welches jetzt 20 % FCS enthielt.

2.2.6 Ernten der Zellen für die Western Blot-Analyse

Am nächsten Tag, 24 Std. nach erfolgter Transfektion, wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die six-well-plates zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 500 µl Lysepuffer (0,5 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, Saccharose) überschichtet. Die Zell-Lysate wurden mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der wells gelöst, in vorgekühlte sterile Eppendorfgläser überführt und bei -80°C eingefroren. Anhand dieser Lysate konnte auch die für den Western Blot vorher durchzuführende Proteinbestimmung ausgeführt werden. Hierfür wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und basiert auf der Bindung des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine, welche durch die Hitzebehandlung denaturieren. Dabei wird die Auftrennung der Moleküle im elektrischen Feld dadurch ermöglicht, dass sich die Anzahl der sich anlagernden SDS-Moleküle proportional zu dem Molekulargewicht der Polypeptide verhält (Hashimoto et al. 1983). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgt anhand eines Markers mit einer Laufstrecke bekannter Proteine. In dieser Arbeit wurde dafür der Rainbow coloured protein molecular weight marker von der Firma Amersham verwendet.

Als erstes wurden zwei Spacer zwischen zwei Glasplatten gelegt, mit Klammern fixiert und auf ein Fußteil geschraubt, damit die Polyacrylamid-Lösung nicht auslaufen konnte. Dann wurde ein 6%-iges Trenngel (Glycerin, Gelpuffer mit SDS, Acrylamid/bis-acrylamid, APS, TEMED) gegossen, welches zwischen die beiden Glasplatten pipettiert wurde. Nach einer Polymerisationszeit von 30 – 60 min bei Raumtemperatur wurde auf das Trenngel das in der Zwischenzeit vorbereitete Sammelgel (Gelpuffer mit SDS, Acrylamid/bis-acrylamid, APS, TEMED) pipettiert. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die durch einen eingesetzten Kamm entstandenen Taschen von Gelresten gesäubert, und die Glasplatten wurden in die Gelelektrophoresekammer (Amersham, San Francisco, USA) eingesetzt und mit frisch angesetztem Kathodenpuffer (Tris, Tricine, SDS) überschichtet.

2.2.8 Probenvorbereitung

Es wurden sowohl für jede Probe als auch für den Marker und für die Positivkontrolle ein Eppendorfgefäß vorbereitet. In diese wurden als erstes der Probenpuffer 1 (0,5 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, Saccharose) und der Probenpuffer 2 (0,5 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, Bromphenolblau, 2-Mercaptoethanol) vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen Proteinproben. Ausgehend von 60 µg Protein/µl betrug das Gesamtvolumen der einzelnen Proben 200 µl. Als Positivkontrolle wurde die Melanomzelllinie mit der Bezeichnung „G361“ verwendet.

Die Proben wurden im Thermoblock (Biometra, Göttingen) für 8 min auf 99°C erhitzt. Dann erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 20 sec bei 13.000 rpm. Anschließend

wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert, dessen Laufzeit dann 20 Std. bei 60 Volt betrug.

2.2.9 Western Blot

Der entscheidende Vorgang beim Western Blot ist die elektrophoretische Überführung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose- oder eine vergleichbare Membran. Dort werden sie an der Oberfläche gebunden und sind in der Lage, mit bestimmten Antikörpern zu reagieren (Towbin et al. 1979).

Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines Transferpaketes auf eine PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran überführt. Das Transferpaket wurde in festgelegter Reihenfolge in einem Gelhalter zusammengesetzt. Eine Außenseite des Pakets wurde von einem Faserschwamm gebildet, auf den drei Schichten Blotting Papier gelegt wurden, welches zuvor in Transferpuffer (Trizma Base, Glycin) inkubiert worden war. Daraufhin wurde das Gel aufgelegt, und es folgte die Membran, die in Methanol, Aq. dest. und Transferpuffer equilibriert wurde. Als nächstes wurden erneut drei in Transferpuffer getränkte Schichten Blotting Papier aufgelegt. Zum Abschluß folgte ein Faserschwamm, und der gesamte Gelhalter wurde so in die Transferkammer (Amersham, San Francisco, USA) eingesetzt, dass die Membran zur Anode zeigte. Nachdem die Transferkammer mit Transferpuffer aufgefüllt wurde, lief der Transfer für 5 – 6 Std. bei 400 mA.

2.2.10 Detektion

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in Methanol geschwenkt und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte eine erneute Equilibrierung in Methanol und Aq. dest., bevor sie in eine mit Blockierungspuffer (Maleinsäure, NaCl, NaOH-Plätzchen, Blockingreagenz) gefüllte Box überführt wurde, in der sie über Nacht bei 4°C inkubierte. Dieser Vorgang diente dem Absättigen unspezifischer Bindungen.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem CEACAM1-Primär-Antikörper 4D₁C₂ in einer Verdünnung von 1:500 in TBST (10x TBS, 10 % Tween 20) und Blockierungspuffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es handelte sich hierbei um einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch das CEACAM1-Gen erkennt und nicht mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie kreuzreagiert (Drzeniek et al. 1991).

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 2 Std. in regelmäßig gewechseltem TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper Anti-Mouse (Santa Cruz, CA, USA) in der Verdünnung 1:4000 in TBST und Blockierungspuffer für 2 Std. bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Membran erneut für den Zeitraum von einer Stunde mit regelmäßig gewechseltem TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Detektionslösungsgemisch (Pierce, Rockford, IL, USA) bestehend aus einer Peroxidlösung und einer Luminol-Enhancer-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur. Dann wurde die Membran lichtgeschützt in eine Röntgenkassette gelegt. In dieser wurden in der Dunkelkammer dann Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiten belichtet und mit einem Entwicklungsgerät (Protec, Oberstenfeld) entwickelt.

2.2.11 Invasionsassay

Für das Invasionsassay wurde zum einen die BD BIOCOAT[®] Matrigel[®] Invasion Chamber, folgend als Matrigel Invasionsassay bezeichnet, und zum anderen die BIOCOAT[®] Cell Culture Inserts als sogenannte Kontrollinserts verwendet.

Mit Hilfe des Matrigel Invasionsassays ist es möglich, die Invasivität sowohl von malignen als auch von nicht-malignen Zellen *in vitro* zu untersuchen. Der Boden der Inserts des Matrigel Invasionsassays besteht aus einer PET-Membran mit 8 µm großen Poren und einem Durchmesser von 0,3 cm², die mit einer sogenannten Matrigel Basement Membrane Matrix (Matrigel Matrix) beschichtet sind. Diese Matrix besteht aus gelösten Basalmembrananteilen, welche aus Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomen der Maus extrahiert wurden. Sie enthält Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglykane, Entactin und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF-β. Diese Matrigel Matrix dient *in vitro* als Äquivalent einer Basalmembran, wie man sie *in vivo* finden würde. Sie verschließt die Poren der PET-Membran und verhindert so die Migration von nicht-invasiven Zellen. Zellen mit invasivem Potential hingegen sind in der Lage, diese Matrigel Matrix zu zerstören und durch sie hindurchzuwandern.

Die bei diesen Untersuchungen parallel verwendeten Kontrollinserts enthalten am Boden ebenfalls eine PET-Membran mit identischer Porengröße, die jedoch nicht von einer Matrix verschlossen sind. Das Prinzip des Invasionsassays verdeutlicht die Abbildung 2.3.

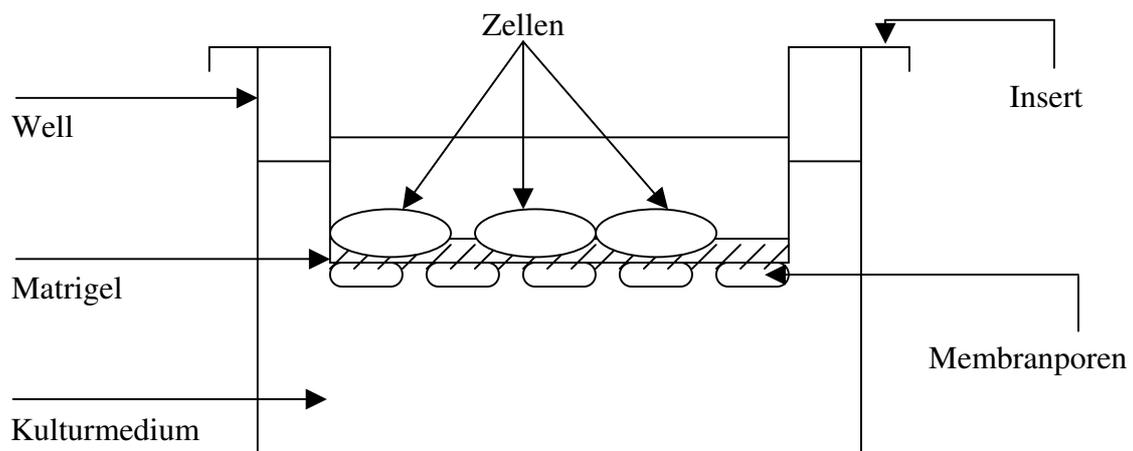


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Invasionsassays. Man erkennt das sich im well befindende Insert, welches die Zellen des Klons „88“ enthält. Am Boden des Inserts befinden sich die Membranporen, die von der Matrigel Matrix verschlossen sind.

Das Invasionsassay wurde exakt 24 Std. nach durchgeführter Transfektion gestartet. Als erstes wurde die Invasionskammer, die bei -20°C aufbewahrt wurde, bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurden die Inserts mit 37°C warmem Basalmedium gefüllt, um die Matrigel Matrix zu rehydratisieren. Das Basalmedium bestand zu gleichen Teilen aus DMEM mit 4,5 g/L Glucose bzw. DMEM mit Phenolrot und Nutrient Mixture F-12 HAM. In jedes well und jedes Insert wurden $500\ \mu\text{l}$ dieses Basalmediums gegeben. Dann wurde die Invasionskammer für 2 Std. in den Inkubator (37°C , 5%- CO_2 -Beimischung) gestellt.

Die Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt noch auf den six-well-plates. Von diesen wurden sie mittels Trypsin-EDTA abgelöst, in Nährmedium aufgenommen und in sterile Falcons überführt. Am Mikroskop wurden die Zellen dann mittels der Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Für das sich anschließende Invasionsassay wurden 50.000 Zellen/ml Nährmedium benötigt. Nach Beendigung der zweistündigen Inkubationszeit wurde die Invasionskammer wieder aus dem Inkubator genommen, und das gesamte Basalmedium wurde abgesaugt. Dann wurden in jedes well $750\ \mu\text{l}$ komplettes Nährmedium vorgelegt und die jeweils benötigten Inserts mit einer sterilen Pinzette eingesetzt. Dabei wurden jeweils in der Reihe unter den mit der Matrigel Matrix beschichteten Inserts die Kontrollinserts eingesetzt, so dass sich für ein in Abbildung 2.4 dargestelltes typisches Experiment folgendes Bild ergab:

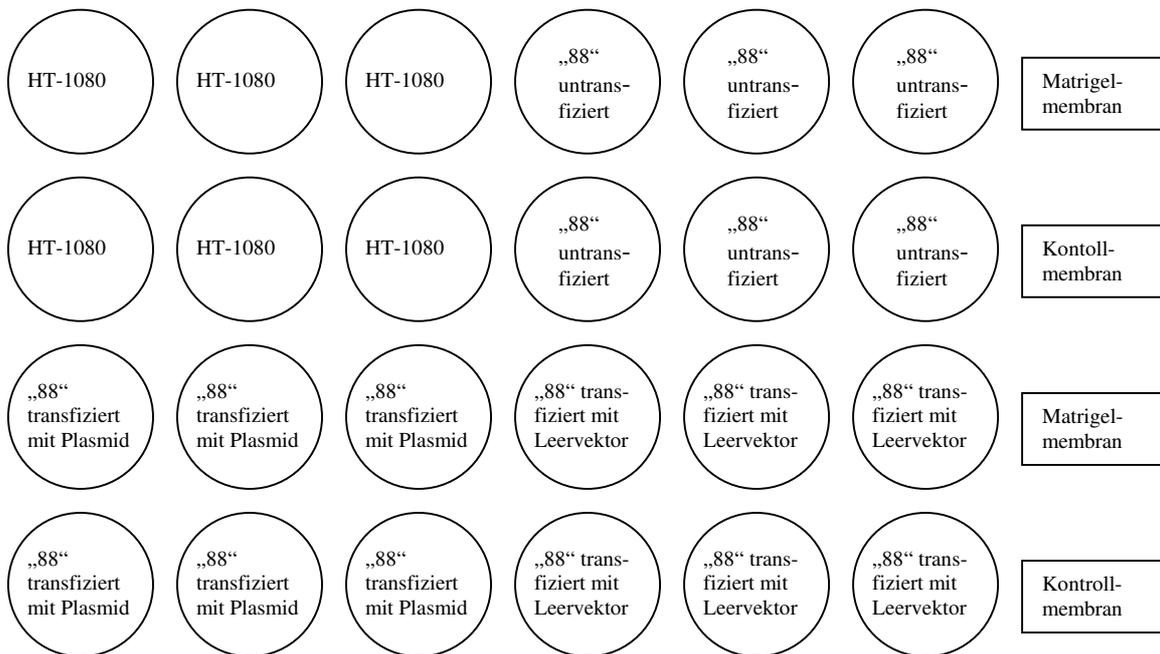


Abb. 2.4: Invasionsassay Beispiel. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Auf die jeweiligen Inserts mit der Matrigel Matrix Membran folgt die dazugehörige Kontrollmembran, deren Poren nicht von einer Matrigel Matrix verschlossen sind. Als erstes wurden die HT-1080-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. Danach folgten die untransfizierten Zellen des Klon „88“, dann die mit dem CEACAM1-L-Plasmid transfizierten und abschließend die mit dem Leervektor transfizierten Zellen des Klon „88“.

Daraufhin wurden in jedes Insert 500 µl der jeweils vorbereiteten Zellsuspensionen pipettiert, und es folgte eine 48-stündige Inkubationszeit im Inkubator. Danach wurden das sich noch in den Inserts befindende Nährmedium und die sich noch auf der Oberfläche der PET-Membran befindenden Zellen mittels einem Wattestäbchen entfernt.

Als nächstes wurden die Inserts einer Färbereihe zugeführt, die mit dem Diff Quick[®] Färbeset von Dade Behring (Düdingen, Schweiz) durchgeführt wurde. Dieses Set bestand aus einer Fixierlösung, zwei Färbelösungen (Eosin, Thiazin) und abschließend zwei Wasserreihen (Aq. dest.). Die Inkubationszeit der einzelnen Inserts betrug jeweils 2 ½ min. Nach Abschluß der Färbereihe mussten die Inserts an der Luft trocknen. Dann wurden die getrockneten Membranen mit einem Skalpell abgelöst, mit der Unterseite auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas und etwas Eukitt abgedeckt. Abschließend wurden alle Objektträger für mindestens 20 min in einen Trockenschrank gelegt. Danach

konnten die sich auf den Objektträgern befindenden gefärbten Membranen mit dem Mikroskop ausgewertet werden.

2.2.12 Auswertung des Invasionsassays

Um das invasive Potential in Prozent bestimmen zu können, wurden die einzelnen Membranen mittels eines Zähllokulars am Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden von einer Membran jeweils drei unterschiedliche, aber gleich große Bereiche ausgezählt. Gezählt wurden dabei die sich in diesem Bereich befindenden Zellen, die repräsentativ für die durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderten, also invasiven Zellen, standen. Mit den dazugehörigen Kontrollmembranen wurde auf die gleiche Art verfahren. Aus den jeweils drei ausgezählten Bereichen wurde ein Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der mit der Matrigel Matrix beschichteten Membran wurde durch den dazugehörigen Mittelwert der Kontrollmembran dividiert, und man erhielt so den prozentualen Wert für die Invasion.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektion von Hybridomzellen mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor

In den als erstes durchgeführten Western Blot-Analysen stellte sich heraus, dass es in dem in dieser Arbeit verwendeten Klon „88“ der Hybridomzelllinie keine endogene CEACAM1-Expression gab, das heißt, diese Zellen waren CEACAM1-negativ. Somit stellten sie ein geeignetes Modell dar, um im Rahmen von Transfektionsexperimenten die Funktion von CEACAM1 zu untersuchen.

Als Positivkontrolle wurden bei den Western Blot-Analysen Proteinextrakte einer CEACAM1-exprimierenden Zelllinie verwendet. Bei diesen Zellen handelte es sich um eine Melanomzelllinie mit der Bezeichnung „G361“.

Die folgende Abbildung zeigt einen Western Blot, auf dem zu erkennen ist, dass der Klon „88“ keine endogene CEACAM1-Expression besitzt. Die ersten beiden Banden stellen die untransfizierten Zellen des Klons „88“ dar. Das Zellmaterial, welches auf die erste Spur aufgetragen wurde, wurde bei einer Konfluenz von 50 % geerntet, die Zellen, die auf die zweite Spur aufgetragen wurden, bei 95 % Konfluenz. Es fällt auf, dass sich sowohl bei der etwas schwächeren als auch bei der stärkeren Konfluenz keine Unterschiede ergeben. CEACAM1 wird in keinem Fall exprimiert. Die letzte Bande zeigt die Positivkontrolle „G361“ mit einer positiven Expression bei ungefähr 218 kD, was der Größe des CEACAM1-Proteins entspricht.

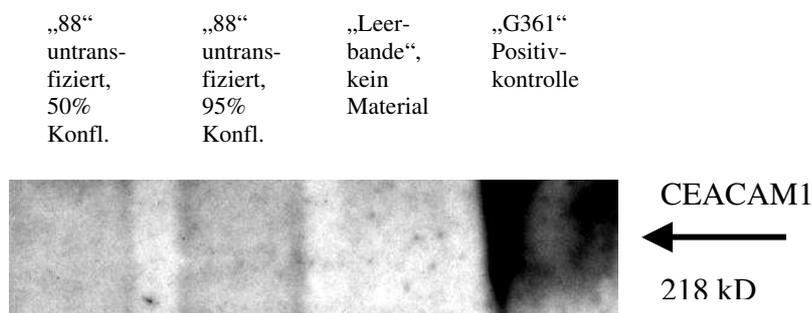


Abb. 3.1: Western Blot zur Darstellung der nicht vorhandenen endogenen CEACAM1-Expression im verwendeten Klon „88“.

Nach Transfektion des ursprünglich CEACAM1-negativen Klons „88“ mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor ließ sich im Western Blot eine deutliche CEACAM1-Expression der Hybridomzellen nachweisen. Die untransfizierten Zellen dieser Zelllinie und die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, zeigten hingegen keine CEACAM1-Expression.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für nach Transfektion durchgeführte Western Blots. Auf die jeweils ersten Spuren wurden die untransfizierten Zellen des Klons „88“ aufgetragen. Als nächstes folgen die mit dem CEACAM1-Expressionsvektor transfizierten Zellen und danach die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Als Positivkontrolle dienten auch hier wieder die Melanomzellen „G361“, die die richtige Größe von ca. 218 kD bestätigen.

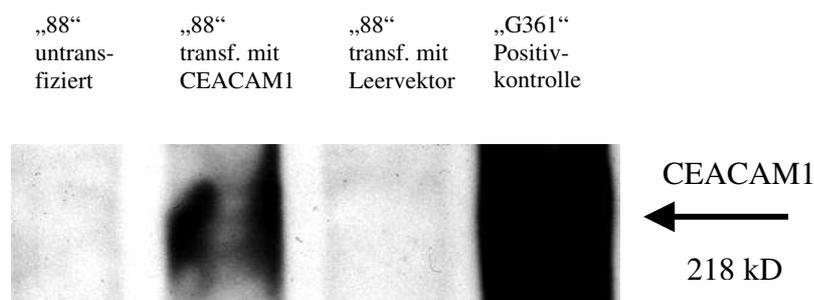


Abb. 3.2: Beispiel 1: Western Blot nach Transfektion. Dieser Western Blot wurde nach einer Transfektion des Klons „88“ mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor durchgeführt. Es zeigt sich nach der Transfektion eine deutliche CEACAM1-Expression im Klon „88“.

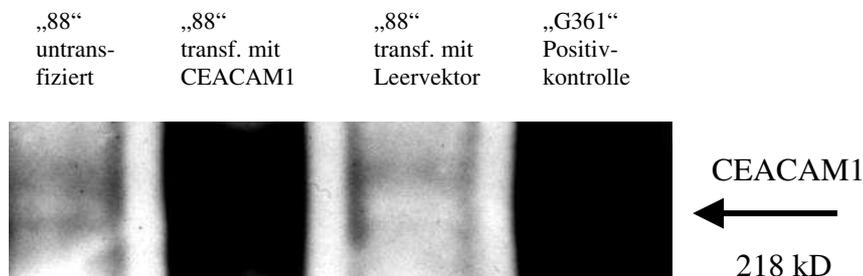


Abb. 3.3: Beispiel 2: Western Blot nach Transfektion. Dieser Western Blot wurde ebenfalls nach einer Transfektion der „88“er Zellen mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor durchgeführt. Auch hier zeigt sich nach der Transfektion eine deutliche CEACAM1-Expression im Klon „88“.

3.2 Untersuchungen zur möglichen Funktion von CEACAM1 im Rahmen der Invasivität plazentarer Zellen

Um Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von CEACAM1 im Rahmen der Invasion plazentarer Zellen ziehen zu können, wurden Invasionsassays mit untransfizierten und mit dem CEACAM1-Plasmid transfizierten Zellen des Klons „88“ durchgeführt.

Bei jedem Invasionsassay gab es eine Positivkontrolle. Hierzu wurde die Zelllinie „HT-1080“ verwendet. Bei diesen Zellen handelte es sich um Fibrosarkomzellen, die offiziell als Positivkontrollzellen für dieses Assay empfohlen wurden. Diese Zellen besitzen ein sehr starkes invasives Potential und sind in der Lage, die Matrigel Matrix zu zersetzen und durch die Membranporen hindurchzuwandern. Durch die dazugehörige Kontrollmembran wanderte eine größere Anzahl an Zellen hindurch als durch die Matrigel Matrix, da die Poren bei der Kontrollmembran nicht von einer Matrigel Matrix verschlossen waren.

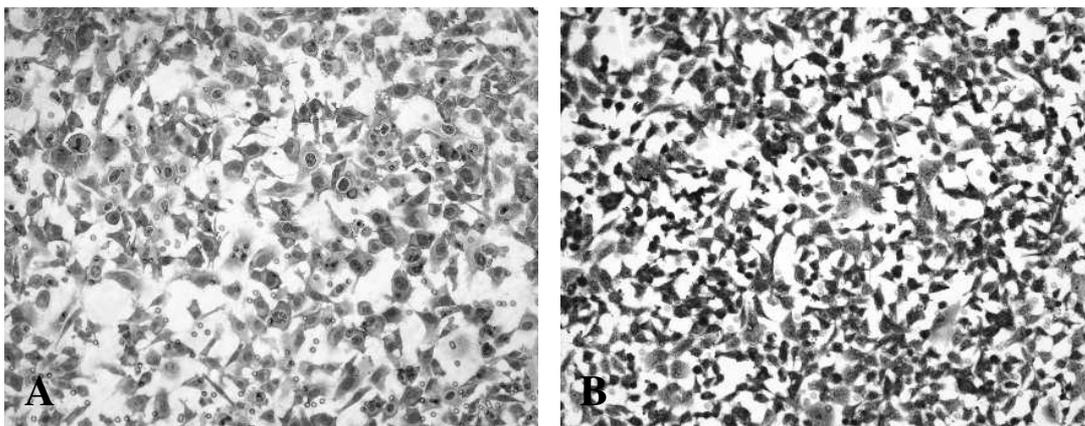


Abb. 3.4: Darstellung der Positivkontrollzellen HT-1080. **A:** Durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderte Zellen der Zelllinie HT-1080 (x200). **B:** Dasselbe Experiment zeigt die durch die dazugehörige Kontrollmembran hindurchgewanderten HT-1080-Zellen (x200).

Bei den untransfizierten Zellen des Klons „88“ fiel auf, dass sie kein invasives Potential zeigten. Nach Anfärben der Membranen und mikroskopischer Auswertung zeigte sich, dass die Zellen nicht in der Lage waren, die Matrigel Matrix zu zersetzen und durch die Poren der PET-Membran hindurchzuwandern. Durch die dazugehörige Kontrollmembran hingegen waren jedoch eine erhebliche Menge an Zellen hindurchgewandert, was zeigte, dass es sich um vitale, proliferierende, aber eben nicht invasive Zellen handelte.

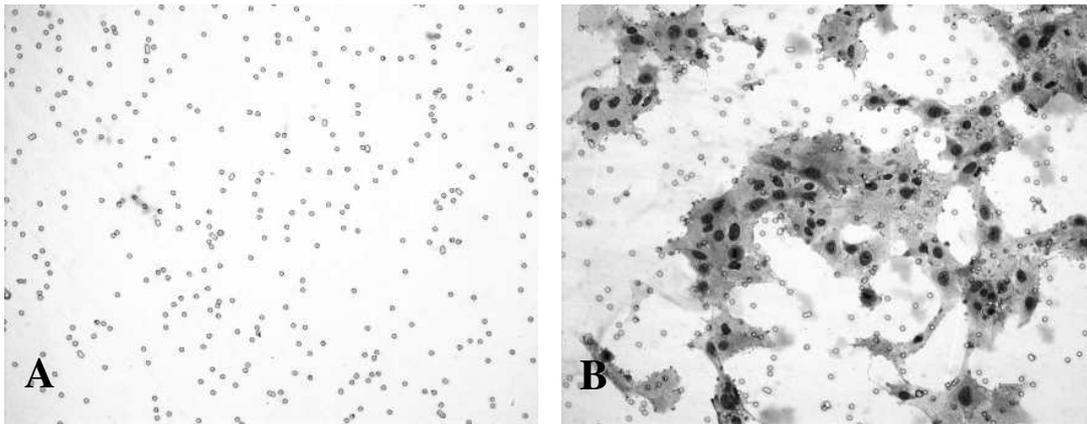


Abb. 3.5: Darstellung der untransfizierten Zellen des Klons „88“. **A:** Durch die Matrigel Matrix sind keine Zellen hindurchgewandert, d. h., es ist kein endogenes invasives Potential in diesen Zellen vorhanden. Die untransfizierten Zellen besitzen keine endogene CEACAM1-Expression (x200). **B:** Durch die dazugehörige Kontrollmembran hindurchgewanderte Zellen. Bei diesen Zellen handelt es sich um proliferierende, aber nicht invasive Zellen (x200).

Auffällig war das Ergebnis, welches sich bei den mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen des Klons „88“ zeigte. Hier sah man, im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen, dass die nach Transfektion nun CEACAM1 exprimierenden Zellen in der Lage waren, die Matrigel Matrix zu zersetzen und durch die PET-Membran hindurchzuwandern. Das ließ die Vermutung zu, dass durch CEACAM1 eine Steigerung der Invasivität bewirkt werden konnte. Auch hier waren wieder mehr Zellen durch die dazugehörige Kontrollmembran hindurchgewandert.

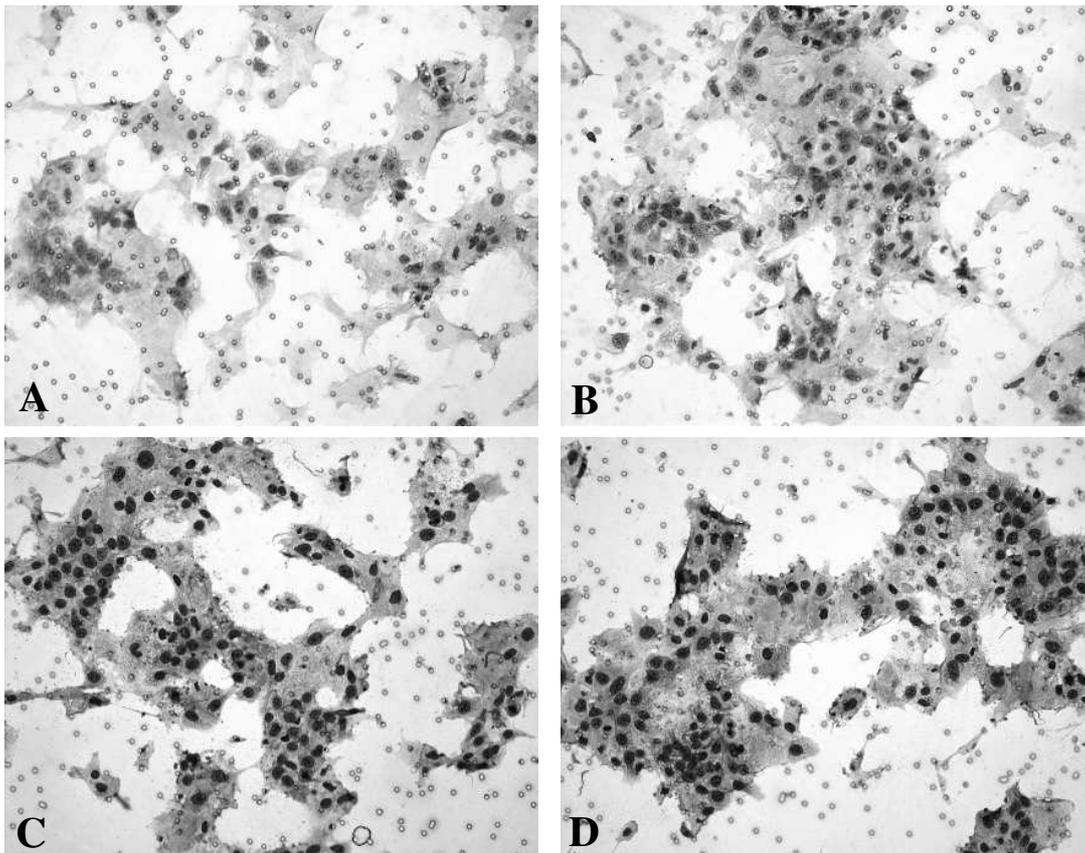


Abb. 3.6: Darstellung der mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen des Klons „88“. **A/B:** Hindurchgewanderte transfizierte Zellen durch die Matrigel Membran (x200). **C/D:** Hindurchgewanderte transfizierte Zellen durch die dazugehörige Kontrollmembran (x200).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Zellen des Klons „88“, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, kein invasives Potential. Auch hier waren die Zellen nicht in der Lage, die Matrigel Matrix zu zersetzen und konnten so nicht durch die PET-Membran hindurchwandern. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den untransfizierten Zellen. Somit konnte man ausschließen, dass der auf die Invasivität positive Effekt, der bei den mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen erzielt werden konnte, allein auf den Vorgang der Transfektion zurückzuführen war.

Auch hier waren, wie erwartet, wieder mehr Zellen durch die dazugehörige Kontrollmembran hindurchgewandert.

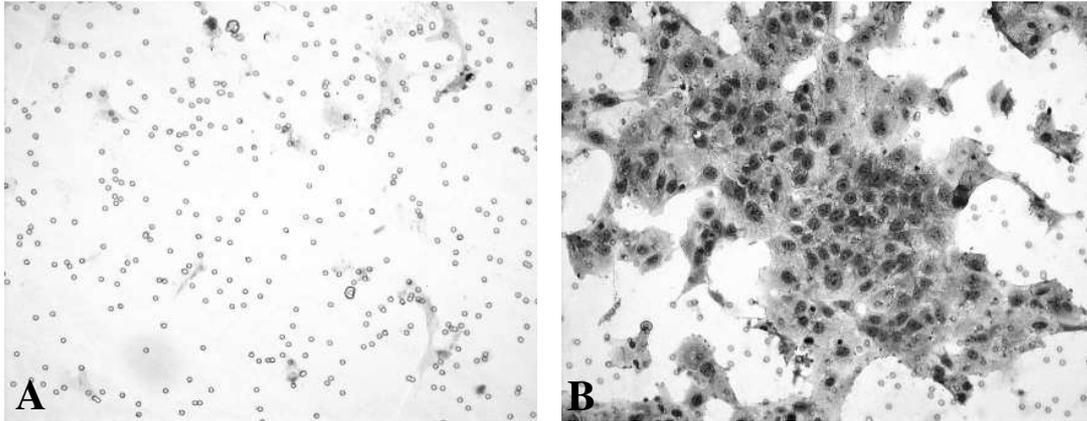


Abb. 3.7: Darstellung der mit dem Leervektor transfizierten Zellen des Klons „88“. **A:** Durch die mit der Matrigel Matrix beschichtete Membran sind nach der Transfektion mit dem Leervektor keine Zellen hindurchgewandert. Es ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den untransfizierten Zellen (x200). **B:** Durch die dazugehörige Kontrollmembran sind deutlich mehr Zellen hindurchgewandert. Ein Zeichen dafür, dass es sich um proliferierende Zellen ohne invasives Potential handelt (x200).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob sich die Zunahme der Invasivität durch die Transfektion mit dem CEACAM1-Plasmid durch Zugabe des entsprechenden Antikörpers hemmen ließ. Dazu wurden jeweils 1 µg / ml Medium des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers auf die mit dem CEACAM1-Plasmid transfizierten Zellen gegeben. In der Auswertung zeigte sich, dass die durch die Transfektion gesteigerte Invasivität durch Zugabe des Antikörpers gehemmt werden konnte.

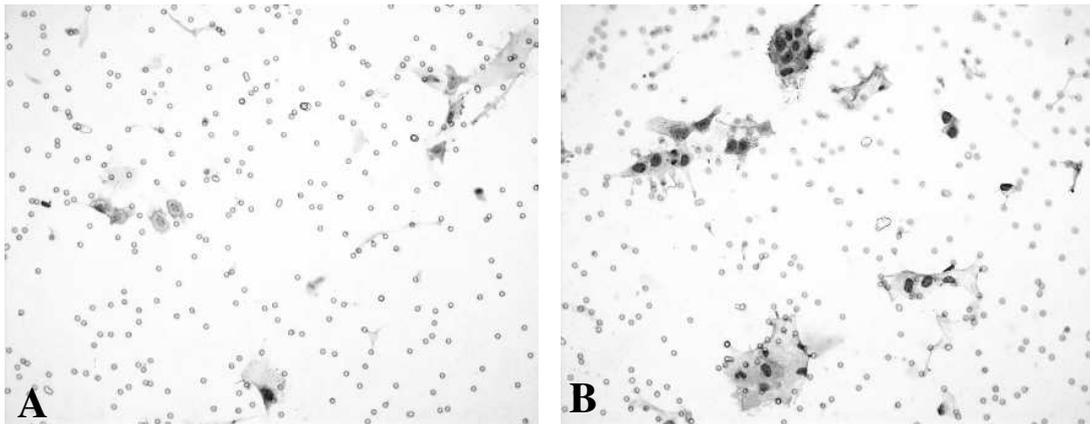


Abb. 3.8: Darstellung der Hemmung der Invasivität der mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen durch Zugabe des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers. **A:** Die Invasivität der transfizierten Zellen geht durch Zugabe des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers deutlich zurück. Gezeigt ist die Matrigel Matrix Membran (x200). **B:** Auch durch die dazugehörige Kontrollmembran wandern weniger transfizierte Zellen nach Zugabe des Antikörpers hindurch (x200).

Nachfolgend sind graphische Auswertungen der Resultate ausgewählter Invasionsassays zur Verdeutlichung aufgeführt.

Auf der Abszisse der Abbildung 3.9 ist die Invasion in Prozent angegeben, die sich, wie bereits beschrieben, als Quotient aus dem Mittelwert der durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderten Zellen und dem Mittelwert der durch die Kontrollmembran hindurchgewanderten Zellen ergibt. Auf der Ordinate wurde die jeweilige Behandlung der Zellen (untransfiziert, transfiziert mit dem Expressionsvektor CEACAM1-L bzw. transfiziert mit dem Leervektor) aufgetragen.

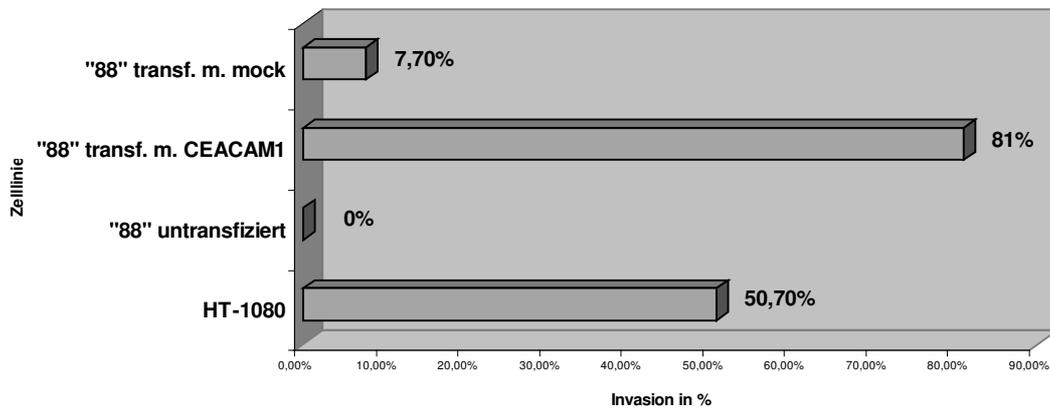


Abb. 3.9: Beispiel 1: Auswertung Invasionsassay. Dargestellt ist die Invasion in Prozent (%).

Auf der Abbildung 3.10 ist auf der Abszisse der absolute Wert der durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderten Zellen als Mittelwert angegeben. Auf der Ordinate wurde, wie bereits bei der vorangehenden Abbildung beschrieben, die Behandlung der Zellen aufgetragen.

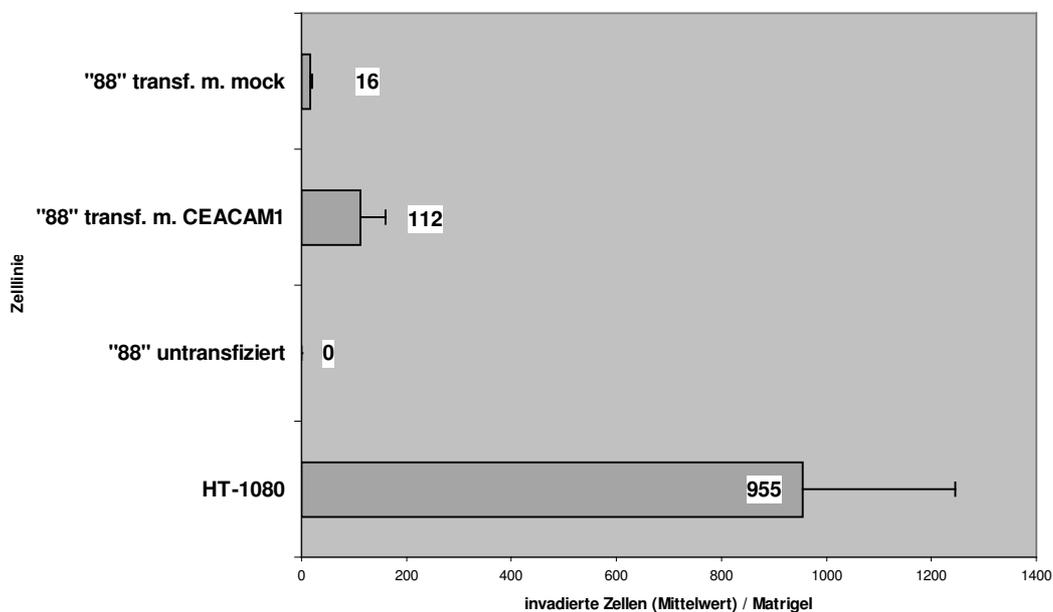


Abb. 3.10: Beispiel 2: Auswertung Invasionsassay. Angegeben ist der absolute Wert der durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderten Zellen mit Standardabweichungen.

Die Abbildung 3.11 zeigt die Hemmung der durch CEACAM1-Transfektion gesteigerten Invasivität durch die Zugabe des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers.

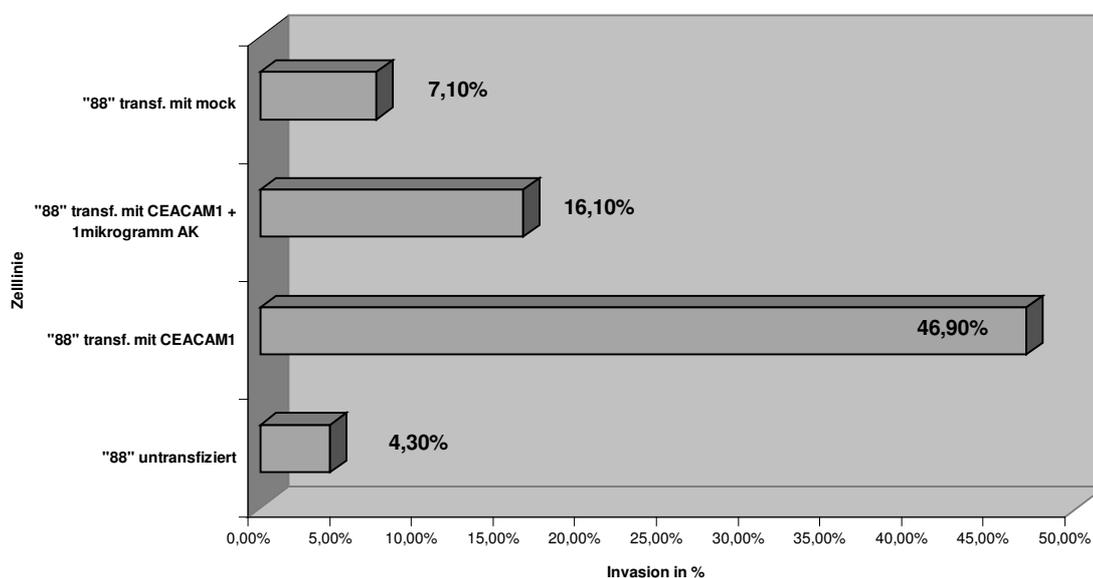


Abb. 3.11: Beispiel 3: Auswertung Invasionsassay mit Antikörper-Zugabe. Dargestellt ist die Änderung der Invasion in Prozent (%) durch Zugabe des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers.

Die teilweise großen Standardabweichungen ergeben sich dadurch, dass in der jeweiligen Membran verschiedene repräsentative Bereiche ausgezählt wurden, wobei jedoch berücksichtigt werden mußte, dass sich die Zellen beim Hindurchwandern durch die Matrigel Matrix und die Poren der PET-Membran nicht gleichmäßig verteilt haben. So befanden sich in einigen auszählenden Bereichen sehr viele Zellen, wohingegen in anderen Bereichen auf derselben Membran wesentlich weniger Zellen zu sehen waren. Bei diesem Experiment muß jedoch das Gesamtbild betrachtet werden, da jeder repräsentative Bereich berücksichtigt werden muß. Auch Bereiche mit einer kleineren Anzahl von durch die Matrigel Matrix hindurchgewanderten Zellen zeugen von invasivem Potential.

4 Diskussion

Die Tatsache, dass neben CEACAM1 auch andere Mitglieder der CEA-Genfamilie in trophoblastären Strukturen der Plazenta exprimiert werden, lässt die Vermutung zu, dass diese Adhäsionsmoleküle möglicherweise eine funktionelle Rolle im Implantationsvorgang und vor allem in physiologischen invasiven Prozessen während der plazentaren Entwicklung im Menschen spielen.

Die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass durch das Einbringen von CEACAM1-DNA in Zellen plazentaren Ursprungs, die vor Transfektion keine endogene CEACAM1-Expression zeigten, eine Steigerung der Invasivität erreicht werden konnte. Zusätzlich ließ sich eine Hemmung der Invasivität durch die Zugabe eines monoklonalen CEACAM1-Antikörpers beobachten.

In Anbetracht der Tatsache, dass das Adhäsionsmolekül CEACAM1 im extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta exprimiert wird, gelangt man aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu der Annahme, dass dieses Molekül möglicherweise eine entscheidende Rolle im plazentaren Entwicklungsprozeß spielt.

Wie bereits erwähnt, ist CEACAM1 nicht der einzige Vertreter der CEA-Genfamilie, dem eine Rolle in invasiven Prozessen während der plazentaren Entwicklung zugesprochen wird. Ein im Hinblick auf diese Fragestellung bereits sehr intensiv untersuchtes Molekül ist Mel-CAM (*melanoma cell adhesion molecule*), welches CEACAM1 im Aufbau ähnelt, wobei Mel-CAM allerdings fünf statt vier Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen besitzt. Seine Expression konnte bisher in Haarfollikeln, im zerebellären Kortex, im Gefäßendothel und in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Pignatelli & Vessey 1994, Shih & Kurman 1996). Aber auch im Rahmen invasiver und metastasierender Prozesse scheint es eine Rolle zu spielen. Eine Mel-CAM-Expression fand sich beispielsweise in malignen kutanen Melanomen, Angiosarkomen und Leiomyosarkomen (Luca et al. 1993, Shih et al. 1994). Eine 1996 von Shih et al. durchgeführte immunhistochemische Untersuchung an Gewebeproben normaler humaner Plazenta zeigte eine Mel-CAM-Expression im proximalen extravillösen Trophoblasten des ersten und zweiten Trimenons. Die Expressionsstärke in den Mel-CAM-positiven Zellen nahm von proximal nach distal zu, wobei auffällig war, dass sowohl der villöse Zyto- als auch der villöse Synzytiotrophoblast keine Mel-CAM-Expression aufwiesen. Dies führte zu der

Annahme, dass die Mel-CAM-Aktivität möglicherweise die Differenzierung des extravillösen Trophoblasten in die einzelnen Subpopulationen widerspiegelte. Ebenfalls Mel-CAM-negativ waren die Deziduazellen, die Zellen des endometrialen Oberflächenepithels ebenso wie die Endothelzellen der Endometriumdrüsen und sich im Stroma befindliche Entzündungszellen.

Die immunhistochemische Färbung zeigte die für die Adhäsionsmoleküle typische Lokalisation an der Zelloberfläche. Da die Mel-CAM-Aktivität scheinbar von proximal, also von dem Ursprungsort der Ankerzotten, nach distal hin zunahm, fand sich eine gleichmäßig starke Mel-CAM-Expression vor allem im invasiven interstitiellen Trophoblasten und im endovaskulären Trophoblasten, der die Spiralarterien auskleidet. Die genaue biologische Rolle, die Mel-CAM im extravillösen, genauer im invasiven interstitiellen Trophoblasten spielt, ist noch nicht geklärt, aber da der interstitielle Trophoblast Gemeinsamkeiten mit neoplastischen Zellen aufweist, wie beispielsweise die rasche Proliferation und die Fähigkeit, benachbartes Gewebe inklusive der Basalmembranen invasiv durchdringen zu können, kann vermutet werden, dass Mel-CAM eine Rolle in invasiven Prozessen spielen könnte (Shih & Kurman 1996, Yagel et al. 1988).

Ähnliche Ergebnisse fanden Coukos et al., die 1998 ein weiteres Adhäsionsmolekül, nämlich PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*), bezüglich seiner Expression in trophoblastären Zellen der normal entwickelten humanen Plazenta untersuchten. PECAM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches hauptsächlich von Zellen des Gefäßsystems, wie beispielsweise Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, exprimiert wird. Die immunhistochemischen Untersuchungen an humanen Trophoblastzellen zeigten eine starke PECAM-1-Expression an der Zelloberfläche im endovaskulären extravillösen Trophoblasten innerhalb der Spiralarterien der Dezidua. Eine besonders starke PECAM-1-Aktivität zeigten vor allem Faktor VIII-positive Endothelzellen in durch Trophoblastzellen vollständig umgebauten Deziduagefäßen. Der villöse Zyto- und Synzytiotrophoblast stellten sich PECAM-1-negativ dar.

Das Hauptziel des extravillösen interstitiellen Trophoblasten ist es, aus den ursprünglichen *low-capacity/high-resistance* Gefäßen des Uterus *high-capacity/low-resistance* Gefäße entstehen zu lassen, die dem steigenden Blutfluß des Uterus gewachsen sind. Dies geschieht, indem die Trophoblastzellen die Basalmembran der Endothelzellen in den

Spiralarterien zu zersetzen beginnen, um sie später vollständig zu ersetzen (Pijnenborg 1990). Coukos et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass PECAM-1 vermutlich eine Rolle bei der Adhäsion dieser Trophoblastzellen mit den uterinen Endothelzellen spielt. Dafür wurde ein Zellkulturmodell mit frisch isolierten humanen Zytotrophoblastzellen etabliert, in dem sich diese Zellen *in vitro* zu invasiven interstitiellen Trophoblastzellen differenzierten, die das PECAM-1-Molekül sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene exprimierten. Im Gegensatz dazu gab es keine PECAM-1-Expression in den frisch isolierten Zytotrophoblastzellen. Mittels indirekter Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass nur ein bestimmter Anteil dieser invasiven interstitiellen Trophoblastzellen das PECAM-1-Molekül *in vitro* exprimierte. Eine Erklärung konnte dafür nicht gefunden werden, aber diese Tatsache führt zu der Annahme, dass möglicherweise nur bestimmte extravillöse Trophoblastzellen in der Lage sind, sich zu endovaskulären Trophoblastzellen zu differenzieren. Ein weiterer wichtiger Fund war, dass das PECAM-1-Molekül erst in Gegenwart von Endothelzellen an die Oberfläche migrierte. Darüber hinaus wurde PECAM-1 in Richtung des Trophoblast-Endothel-Zellkontakts polarisiert, was die Vermutung bestärkte, dass PECAM-1 an der Ausbildung dieser heterophilen Zell-Zell-Verbindung beteiligt ist. Interessanterweise ist die Expression dieses Moleküls auf vaskuläre Zellen beschränkt. PECAM-1 ließ sich bei homophilen Zell-Zell-Kontakten zwischen einzelnen Trophoblastzellen nicht nachweisen (Coukos et al. 1998).

Eine weitere wichtige Rolle, die CEACAM1 möglicherweise innehaben könnte, ist die Beteiligung an der Angiogenese. Der erste Beweis dafür, dass CEACAM1 von Endothelzellen produziert wird, wurde 1994 von Sawa et al. erbracht, die nachweisen konnten, dass CEACAM1 von Mikrogefäßen des zentralen Nervensystems der Ratte exprimiert wird (Sawa et al. 1994). Weiterhin konnte eine CEACAM1-Expression in Endothelzellen plazentarer Gefäße, in mütterlichen Gefäßen der Dezidua und in Granulationsgewebe während der Wundheilung beobachtet werden. Auch in Mikrogefäßen vieler humaner Tumoren, wie beispielsweise in Nierenzellkarzinomen, in Prostatakarzinomen oder auch in Leydigzelltumoren, konnte CEACAM1 nachgewiesen werden. Dabei war auffällig, dass die Expression dieses Moleküls nur auf die kleinen Blutgefäße beschränkt war, während größere Gefäße CEACAM1-negativ waren (Daniels et al. 1996, Prall et al. 1996, Ergün et al. 2000). Die Tatsache, dass CEACAM1 von Endothelzellen kleiner Gefäße in regenerierendem Gewebe, wie Plazenta, Endometrium

oder Granulationsgewebe nach Verletzung, exprimiert wird, führt zu der Annahme, dass CEACAM1 eine mögliche Rolle in der Angiogenese spielt. Wagener et al. untersuchten anhand eines extra etablierten Zellkulturmodells die mögliche Funktion von CEACAM1 auf die Angiogenese und verglichen diese mit der Rolle von VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Dafür wurde das CEACAM1-Molekül aus humanen Granulozyten, aus Endothelzellen und aus HEK293-Zellen, die mit aller für das CEACAM1-Gen kodierenden Exons enthaltenden DNA transfiziert worden waren, extrahiert und mit HDME-Zellen (*human dermal microvascular endothelial cells*) zusammengebracht. In den darauffolgend durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass CEACAM1 die Proliferation der HDME-Zellen stimulierte und einen chemotaktischen Effekt auf diese ausübte, welcher vergleichbar war mit dem von VEGF. Weiterhin zeigte sich bei einer Kombination von CEACAM1 und VEGF ein additiver Effekt auf die Angiogenese, die in diesem Experiment durch Bildung röhrenartiger Strukturen der HDME-Zellen in einem dreidimensionalen Gel aus Kollagen I definiert war. Verglich man die beiden Faktoren unabhängig voneinander, so war der Effekt von CEACAM1 alleine schwächer als der von VEGF. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass sich die Aktivität von VEGF durch Zugabe eines monoklonalen CEACAM1-Antikörpers vollständig inhibieren ließ, was zu der Vermutung führte, dass die CEACAM1-Expression der Endothelzellen abhängig ist von der Menge an VEGF. VEGF erhöht die CEACAM1-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Da sich diese *in vitro*-Ergebnisse nicht einfach auf die Vaskulo- und Angiogenese *in vivo* übertragen lassen, sind die genauen Funktionen von CEACAM1 in diesem Punkt noch ungeklärt. Versuche mit Knockout-Mäusen sind bisher fehlgeschlagen, aber die *in vitro* erhobenen Daten lassen vermuten, dass CEACAM1 in irgendeiner Form an der Angiogenese beteiligt sein könnte (Ergün et al. 2000, Wagener & Ergün 2000).

Eine wichtige Frage, insbesondere in Bezug auf die bisher diskutierten Punkte und die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, ist die Rolle von CEACAM1 im humanen Implantationsprozess und in der Entwicklung der Plazenta. Svalander et al. haben die Expression von cell-CAM 105, dem Homolog von CEACAM1 in der Ratte, bezüglich seines Vorkommens in unterschiedlichen Stadien des Rattenembryos mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Im frühen Morula-Stadium konnte cell-CAM 105 nicht nachgewiesen werden, dafür aber in normal entwickelten Blastozysten kurz vor und während des Implantationsvorgangs im Uterus der Ratte. Hier wurde cell-CAM 105

gleichmäßig verteilt exprimiert, wobei eine deutliche Polarisierung in Richtung der polaren Region der Trophoblastzellen zu verzeichnen war. Möglicherweise scheint hier eher das Verschwinden von cell-CAM 105 von der Zelloberfläche, also eher die Ab- als die Anwesenheit des Moleküls für den Implantationsvorgang wichtig zu sein (Svalander et al. 1987). Auf der anderen Seite konnte cell-CAM 105 in glandulären uterinen Epithelzellen der Ratte zum Zeitpunkt der Implantation der Blastozyste nachgewiesen werden, hier allerdings an der apikalen Oberfläche (Svalander et al. 1990).

Ähnliche Ergebnisse fanden Bamberger et al. bei immunhistochemischen Untersuchungen von normal entwickeltem humanem Plazentagewebe. In Epithelzellen von endometrialen Drüsen während des ersten Trimenons konnte eine starke CEACAM1-Expression an der apikalen Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Expression fand man zum gleichen Zeitpunkt auch in Oberflächenepithelien des Endometriums und in Endothelzellen kleiner Blutgefäße im uterinen Stroma. Dieses Ergebnis scheint den Verdacht zu bestätigen, dass CEACAM1 eine mögliche Rolle im humanen Implantationsvorgang spielt (Bamberger et al. 2000).

Für die vorliegende Arbeit war die Tatsache von Bedeutung, dass CEACAM1 spezifisch vom invasiven interstitiellen Trophoblasten der humanen Plazenta exprimiert wird (Bamberger et al. 2000). Darauf stützte sich die Annahme, dass CEACAM1 möglicherweise eine wichtige Rolle während dieses physiologisch ablaufenden invasiven Prozesses spielt. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Invasionsassays haben deutlich gezeigt, dass eine Stimulation der Invasivität durch Transfektion der verwendeten Zellen mit dem CEACAM1-Expressionsvektor möglich war. Weiterhin ließ sich eine Hemmung der Invasivität durch Zugabe eines monoklonalen CEACAM1-Antikörpers beobachten. Man kann anhand dieser Ergebnisse vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der CEACAM1-Expression extravillöser Trophoblastzellen und dem invasiven Potential dieser Zellen gibt. Da aber die genauen molekularen Mechanismen des Implantationsvorgangs und der plazentaren Entwicklung noch nicht vollständig geklärt sind, lassen sich über die Rolle von CEACAM1 noch keine eindeutigen Aussagen tätigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 im Rahmen der plazentaren Entwicklung des Menschen untersucht werden. Ausgehend von der Tatsache, dass CEACAM1 in invasiven extravillösen Trophoblastzellen der humanen Plazenta exprimiert wird (Bamberger et al. 2000), wurden Transfektionsexperimente mit einem CEACAM1-L-Expressionsvektor an einem auf humanen extravillösen Trophoblastzellen basierenden Hybridomzellkulturmodell durchgeführt. Die verwendeten Zellen zeigten keine endogene CEACAM1-Expression. Um die Auswirkung von CEACAM1 auf die Invasivität plazentarer Zellen zu untersuchen, wurde ein mit einer Matrigel Matrix beschichtetes Invasionsassay verwendet, anhand dessen beobachtet werden konnte, inwiefern CEACAM1 das invasive Potential beeinflusste. Die ursprünglich CEACAM1-negativen Zellen, die für die Untersuchungen verwendet wurden, wiesen im Invasionsassay kein invasives Potential auf. Nach dem Einbringen von CEACAM1-DNA in die Zellen kam es zu einer erheblichen Steigerung der Invasivität. Um auszuschließen, dass es sich in diesem Fall um einen durch die Transfektion artefiziell herbeigeführten Effekt handelte, wurde zeitgleich eine Transfektion der Zellen mit dem dazugehörigen Leervektor durchgeführt. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den untransfizierten Zellen. Ein weiteres Experiment, welches durchgeführt wurde, war die Zugabe eines monoklonalen CEACAM1-Antikörpers auf die mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen. Dabei zeigte sich ein Rückgang der Invasivität.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Einbringen von CEACAM1-DNA in Zellen plazentaren Ursprungs zu einer Steigerung der Invasivität führte. Berücksichtigt man dabei das spezifische Expressionsmuster von CEACAM1 in der humanen Plazenta, gelangt man zu der Annahme, dass CEACAM1 eine Rolle im physiologisch invasiv ablaufenden Implantationsprozeß und in der plazentaren Entwicklung spielt.

Abschließend ist allerdings zu bemerken, dass über die Fähigkeit von CEACAM1, invasives Potential zu steigern oder entstehen zu lassen, nur Vermutungen angestellt werden können, da die komplexen Regulationsmechanismen dieser Vorgänge noch nicht im Detail bekannt sind.

6 Literaturverzeichnis

Aplin JD "Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro", *J Cell Sci* (1991), 99: 681-692

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate", *Cell* (1990), 61: 1303-1313

Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MB, Bock E, Öbrink B "The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily", *FEBS Lett* (1990), 264: 267-269

Bamberger A-M, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C, Löning T "Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer", *Am J Pathol* (1998), 152 (6): 1401-1406

Bamberger A-M, Sudahl S, Löning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A "The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast", *Am J Pathol* (2000), 156 (4): 1165-1170

Bamberger A-M, 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), 20 (2): 160-165

Barak Y, Nelson M, Ong ES, et al. "PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development", *Mol Cell* (1999), 4: 585-595

Baum O, Troll S, Hixson DC "The long and short isoform of cell-CAM 105 show variant-specific modifications in adult rat organs", *Biochem Biophys Res Commun* (1996), 227: 775-781

Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert S, Hammarström S, Holmes KV, Karsson A, Kuroki M, Lin S-H, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Öbrink B, Shiveley JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watts S, Zimmermann W “Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family”, *Exp Cell Res* (1999), 252: 243-249

Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al “Selectins: a family of adhesion receptors”, *Cell* (1991), 67: 233

Brümmer J, Neumaier M, Göpfert C, Wagener C “Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family down regulated in colorectal carcinomas”, *Oncogene* (1995), 11: 1649-1655

Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Löning T, Bamberger A-M, Wagener C “cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with Integrin β_3 ”, *Am J Path* (2001), 159 (2): 537-546

Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K, Millirons P, Lin SH “Structure and function of C-CAM1: the first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion”, *J Biol Chem* (1993), 268 (32): 24303-24310

Clark DA “Cytokines, deciduas and early pregnancy”, *Oxf Rev Reprod Biol* (1993), 15: 83-111

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), 4 (4): 357-367

Critchley HOD, Buckley CH, Anderson DC “Experience with a physiological steroid replacement regimen for the establishment of a receptive endometrium in women with premature ovarian failure”, *Br J Obstet Gynaecol* (1990), 97: 804-810

- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ “Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle”, *Science* (1994), 266: 1508-1518
- Daniels E, Letourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Yazova AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N “Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: Correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption, and myogenesis”, *Dev Dyn* (1996), 206: 272-290
- De Lisser HM, Chilkotowsky J, Yan HC, et al “The cytoplasmatic domain of PECAM-1 regulates the functional characteristics of binding”, *J Cell Biol* (1994), 124: 195-203
- Desvergne B, Wahli W “Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism”, *Endocr Rev* (1999), 20: 649-688
- Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C, Haubeck HD “Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family”, *Cancer Lett* (1991), 56: 173-179
- Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N, Holmes KV “Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59”, *J Virol* (1993), 67: 1-8
- Ebrahimnejad A, Flayeh R, Unteregger G, Wagener C, Brümmer J “Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with Paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells”, *Exp Cell Res* (2000), 260: 365-373
- Ergün S, Kilic N, Ziegler 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), 5: 311

- Estrera VT, Chen D-T, Luo W, Hixson DC, Lin SH "Signal transduction by the CEACAM1 tumor suppressor", *J Biol Chem* (2001), 276(18): 15547-15553
- Feinberg RF, Kao L-C, Haimowitz JE, Queenan Jr. JT, Wun T-C, Strauss III JF, Kliman HJ "Plasminogen activator inhibitor type 1 and 2 in human trophoblasts", *Lab Invest* (1989), 61: 20-26
- Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ "Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation?", *Am J Path* (1991), 138 (3), 537-54
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M et al "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells", *J Cell Biol* (1991), 113: 173-185
- 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), 20 : 219-230
- Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Füzesi L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG "Parent cells for throphoblast hybridisation II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT-negative mutants of the choriocarcinoma cell line Jeg-3", *Troph Res* (1997), 10: 191-201
- Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG "Parent cells for trophoblast hybridization I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion leave", *Troph Res* (1997), 10: 181-190
- Graham CH, Lala PK "Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control", *Biochem Cell Biol* (1992), 70: 867-874
- Hashimoto F, Horigome T, Kanbayashi M, Yoshida K, Sugano H "An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel", *Anal Biochem* (1983), 129(1):192-199

Hauck CR, Meyer TF, Lang F, Gulbins E "CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway", *EMBO J* (1998), 17: 443-454

Hixson DC, McEntire KD, Öbrink B "Alterations in the expression of a hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable rat hepatocellular carcinomas", *Cancer Res* (1985), 45: 3742-3749

Huang J, Hardy JD, Sun Y, Shively JE "Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F", *J Cell Sci* (1999), 112: 4193

Huber M, Izzi L, Grondin P, Houde C, Kunath T, Veillette A, Beauchemin N "The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells", *J Biol Chem* (1999), 274: 335-344

Hunkapiller TH, Hood L "Diversity of the immunoglobulin gene superfamily", *Adv Immunol* (1989), 44: 1-63

Huppertz B, Kertschanska S, Frank HG, Gaus G, Funayama H, Kaufmann P "Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution", *Histochem Cell Biol* (1996), 106: 291-301

Hustin J, Franchimont P "The endometrium and implantation" in: Barnea ER, Hustin J, Jauniaux E (eds.) *The first twelve weeks of gestation* (1992), Springer-Verlag Heidelberg, 1. Auflage, 26-42

Hynes RO "Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion", *Cell* (1992), 69: 11-25

Jansen RPS, Turner M, Johanisson E, Landgren BM, Diczfalusy E "Cyclic changes in human endometrial surface glycoproteins: a quantitative histochemical study", *Fertil Steril* (1985), 44: 85-91

Jauniaux E, Burton GJ, Jones CJP "Early human placental morphology" in: Barnea ER, Hustin J, Jauniaux E (eds.) *The first twelve weeks of gestation* (1992), Springer-Verlag Heidelberg, 1. Auflage, 45-64

Kao LC, Caltabiano S, Wu S, Strauss JF III, Kliman HJ "The human villous cytotrophoblast: interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation", *Dev Biol* (1988), 130: 693-702

Kaufmann P "Entwicklung der Plazenta", *Verh Dtsch Ges Path* (1997), 81:266-272

Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae", *Endocrinology* (1986), 118: 1567-1582

Kliman HJ, Feinmann MA, Strauss JF III "Differentiation of human cytotrophoblasts into syncytiotrophoblasts in culture", *Troph Res* (1987), 2: 407-422

Kliman HJ, Feinberg RF "Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions *in vitro*: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity", *Proc Natl Acad Sci USA* (1990a), 87: 3057-3061

Kliman HJ, Feinberg RF, Haimowitz JE "Human trophoblast-endometrial interactions in an in vitro suspension culture system", *Placenta* (1990b), 11: 349-367

Kliman HJ, Feinberg RF "Differentiation of the trophoblast" in: Barnea ER, Hustin J, Jauniaux E (eds.) *The first twelve weeks of gestation* (1992), Springer-Verlag Heidelberg, 1. Auflage, 3-25

Kliman HJ "Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation and trophoblast invasion", *Am J Path* (2000), 157 (6): 1759-1768

Kühnel W "*Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*" (1999), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 10. überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 420

Kunath T, Ordoñez-Garcia C, Turbide C, Beauchemin N "Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein", *Oncogene* (1997), 11: 2375-2382

Kurman RJ, Main CS, Chen HC "Intermediate trophoblast: a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features", *Placenta* (1984), 5: 349-370

Kurman RJ "The morphology, biology, and pathology of intermediate trophoblast: a look back to the present", *Human Path* (1991), 22: 847-855

Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM "Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor", *Am J Physiol Cell Physiol* (2000), 278: C982-C988

Loskutoff DJ, Ny T, Sawdey M, Lawrence D "Fibrinolytic system of cultured endothelial cells: regulation by plasminogen activator inhibitor", *J Cell Biochem* (1986), 32:273

Luca M, Hunt B, Bucana CD, Johnson JP, Fidler IJ, Bar-Eli M "Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells", *Melanoma Res* (1993), 3: 35-41

Markel G, Lieberman N, Katz G, Arnon TI, Lotem M, Drize O, Blumberg RS, Bar-Haim E, Mader R, Eisenbach L, Mandelboim O "CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity", *J Immunol* (2002), 168 (6): 2803-2810

- 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- κ B”, *J Biol Chem* (2001), 276 (26): 24331-24340
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, et al “PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes”, *J Exp Med* (1993), 178: 449-460
- Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C “Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas”, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993), 90: 10744-10748
- Ocklind C, Öbrink B “Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process”, *J Biol Chem* (1982), 257: 6788-6795
- Öbrink B “CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties”, *Curr Opin Cell Biol* (1997), 9: 616-626
- Pignatelli M, Vessey CJ “Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology”, *Hum Pathol* (1994), 25(9): 849-856
- Pijnenborg R “Trophoblast invasion and placentation in the human – morphological aspects”, *Troph Res* (1990), 4: 33-47
- 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), 44: 35-41
- Pu YS, Luo W, Lu HH, Greenberg NM, Lin SH, Gingrich JR “Differential expression of C-CAM cell adhesion molecule in prostate carcinogenesis in a transgenic mouse model”, *J Urol* (1999), 162: 892-896

Reister F, Frank H-G, Kingdom JCP, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B
“Macrophage-induces apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women”, *Lab Invest* (2001), 81: 1143-1152

Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C, Löning T “Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland”, *J Histochem Cytochem* (1997), 45: 957-963

Sawa H, Kamada K, Sato H, Sendo S, Kondo A, Saito I, Edlund M, Öbrink B “C-CAM expression in the developing rat central nervous system”, *Dev Brain Res* (1994), 78: 35-43

Schiebler TH & Kaufmann P, “Reife Plazenta”, *Verh Dtsch Ges Path* (1997), 81:266-272

Shih IM, Elder DE, Speicher D, Johnson JP, Herlyn M “Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen”, *Cancer Res* (1994a), 54: 2514-2520

Shih IM, Kurman RJ “Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast“, *Lab Invest* (1996), 75 (3): 377-388

Shih IM, Wang TL, Westra WH “Diagnostic and biologic implications of Mel-CAM expression in mesenchymal tumors”, *Clin Cancer Res* (1996), 2: 569-575

Singer BB, Scheffrahn I, Öbrink B “The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation”, *Cancer Res* (2000), 60: 1236-1244

Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Öbrink 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), 168: 5139-5146

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, et al “The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells” *EMBO J* (1991), 10: 343-348

Stauber M, Weyerstahl T “Regelrechte Anlage und Entwicklung der Schwangerschaft” in: „*Gynäkologie und Geburtshilfe*“ (2001), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage

Sundberg U, Öbrink B “CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells“, *J Cell Sci* (2002), 115: 1273-1284

Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B “Trophectoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts”, *Development* (1987), 100(4): 653-660

Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B “Expression of cellCAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones”, *J Reprod Fertil* (1990), 88(1): 213-221

Tarrade A, Kuen RL, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M & Evian-Brion D “Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta”, *Lab Invest* (2001a), 81: 1199-1211

Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T “PPAR γ /RXR α heterodimers control human trophoblast invasion”, *J Clin Endocrinol Metab* (2001b), 86: 5017-5024

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U “CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease”, *J Clin Oncol* (2002), 20: 2530-2536

Towbin H, Staehelin T, Gordon J "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications", *Proc Nat Acad Sci USA* (1979), 76: 4350-4354

Turner CE "Paxillin", *Int J Biochem Cell Biol* (1998), 30: 955-959

Vicovac L, Jones CJ, Aplin JD "Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro", *Placenta* (1995), 16: 41-56

Vleminckx K, Vakaet I, Mareel M, et al "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role", *Cell* (1991), 66: 107-119

Wagener C, Ergün S "Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1", *Exp Cell Res* (2000), 261(1): 19-24

Wendling O, Chambon P, Mark M "Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis", *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96: 547-551

Williams AF, Barclay AN "The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition", *Ann Rev Immunol* (1988), 6: 381-405

Wun TC, Reich E "An inhibitor of plasminogen activation from human placenta. Purification and characterization.", *J Biol Chem* (1987), 262: 3646-3653

Yagel S, Parhar RS, Jeffrey JJ, Lala PK "Normal nonmetastatic human trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells", *J Cell Physiol* (1988), 136(3): 455-462

7 Publikationen

1. Bamberger AM, Makrigiannakis A, Röser K, Radde J, Carstens T, Flohr AM, Bamberger CM, Bullerdiek J, Löning T “Expression of the high-mobility group protein HMGI(Y) in human trophoblast: potential role in trophoblast invasion of maternal tissue.”, *Virchows Arch* (2003), 443(5): 649-654

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Differenzierung des Zytotrophoblasten in die drei Hauptpopulationen	4
Abb. 1.2: Zelltypen des utero-plazentaren Systems des Menschen	9
Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des Adhäsionsmoleküls CEACAM1	13
Abb. 2.1: Entstehung der Hybridomzellen, Klon „88“	19
Abb. 2.2: Vektor pcDNA 3.1 (-).....	20
Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Invasionsassays.....	30
Abb. 2.4: Invasionsassay Beispiel	31
Abb. 3.1: Western Blot zur Darstellung der nicht vorhandenen endogenen CEACAM1-Expression im verwendeten Klon „88“	33
Abb. 3.2: Beispiel 1: Western Blot nach Transfektion.....	34
Abb. 3.3: Beispiel 2: Western Blot nach Transfektion.....	34
Abb. 3.4: Darstellung der Positivkontrollzellen HT-1080	35
Abb. 3.5: Darstellung der untransfizierten Zellen des Klons „88“	36
Abb. 3.6: Darstellung der mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen des Klons „88“	37
Abb. 3.7: Darstellung der mit dem Leervektor transfizierten Zellen des Klons „88“	38
Abb. 3.8: Darstellung der Hemmung der Invasivität der mit dem CEACAM1-L-Expressionsvektor transfizierten Zellen durch Zugabe des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers.....	39
Abb. 3.9: Beispiel 1: Auswertung Invasionsassay	40
Abb. 3.10: Beispiel 2: Auswertung Invasionsassay	40
Abb. 3.11: Beispiel 3: Auswertung Invasionsassay mit Antikörper-Zugabe	41

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BD	Becton Dickinson
BGP	biliäres Glykoprotein
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ca	Carcinoma
CAM	cell adhesion molecule
C-CAM	cell-cell adhesion molecule
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CEA	carcinoembryonic antigen
CEACAM	CEA-related cell adhesion molecule
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	colony-stimulating factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	desoxyribonucleid acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPH	edema (Ödem), Proteinurie, Hypertonie
et al.	et alter
FCS	foetal calf serum
g/L	gramm pro liter
GMP	Guanosinmonophosphat
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCL	hydrochlorid acid
HDME	human dermal microvascular endothelial cells
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hPL	humanes Plazentalaktogen
hPLAP	human placental alkaline phosphatase

ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IMP	Inosinmonophosphat
kD	kilo Dalton
mA	Milliampère
mAB	monoclonal antibody
Mel-CAM	melanoma cell adhesion molecule
MHC	major histocompatibility
min	Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	neural cell adhesion molecule
PA	Plasminogen Aktivator
PAI	Plasminogen Aktivator-Inhibitor
PBS	phosphat buffered saline
p.c.	post conceptionem
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PET	Polyethylen-terephthalat
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleid acid
rpm	rounds per minute (Umdrehungen)
RXR	retinoid X receptor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

sec	Sekunde
SERPIN	Serin-Protease-Inhibitor
Std.	Stunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline-Tween
TE8	Tris-EDTA, pH 8
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	transforming growth factor
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Doktormutter Frau Dr. med. Ana-Maria Bamberger. Ihr möchte ich nicht nur für die interessante Aufgabenstellung und die exzellente Betreuung danken, sondern auch für Ihre Ratschläge und emotionale Unterstützung in schwierigen Zeiten. Durch Ihre Förderung war es mir möglich, mich mit großem Einsatz den verschiedenen Forschungsbereichen zu widmen.

Ebenfalls ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Gynäko- und Oralpathologie, allen voran Bianca Kelp, Tanja Karstens, Frau Dr. rer. nat. Kerstin Röser, Gabriele Rieck und Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch. Ihre Unterstützung war mir während der Zeit meiner Doktorarbeit besonders wichtig. Dies gilt auch für Herrn Dr. rer. nat. Alireza Ebrahimnejad aus der Abteilung für Klinische Chemie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin. Ihm danke ich für die fachliche Unterstützung und seine Geduld. Herrn Prof. Dr. med. Jens Brümmer, ebenfalls aus der Abteilung für Klinische Chemie, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Bereitstellung der Materialien.

Einigen weiteren Personen möchte ich auf diesem Wege danken. Meinen Eltern, meiner Freundin und Kommilitonin Nina Weinhold, die mir während des gesamten Medizinstudiums eine sehr wichtige Gefährtin war und zuletzt Reinhold Müller-Westermann, meinem Freund und Partner, ohne den ich mein Studium und diese Arbeit nie auf diese Art und Weise hätte verwirklichen können.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Jessica Radde
Grabenstücken 20
22607 Hamburg
geb.: 25.10.1973 in Stade

Schulbildung:

1986 – 1993
05/1993
Gymnasium Athenaeum, Stade
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1993 – 1996
Ausbildung zur Europa-Direktionsassistentin,
Euro Business College, Hamburg
Abschluß: Diplom

Berufserfahrung:

10/1996 – 08/1997
09/1997 – 04/1998
Direktionsassistentin, „Dekotec
Software Entwicklungs GmbH“
Assistentin der Geschäftsführung,
„Omnikron GmbH“,
Investmentbeteiligungsgesellschaft

Akademische Ausbildung:

04/1998
03/2000
03/2001
09/2003
10/2003
Beginn des Studiums der Humanmedizin,
Universität Hamburg
Ärztliche Vorprüfung
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Beginn des Praktischen Jahrs

Promotion:

04/2001
Beginn der Promotion in der Abt. für Gynäko-
pathologie, Institut für Pathologie, UKE

Eidesstattliche Versicherung:

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