

Aus dem Labor für Tumormunologie,  
LIFE-Zentrum  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

# Charakterisierung von CEACAM20, einer potenziellen Zielstruktur für die Tumormuntherapie

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Andreas Eisenried  
aus Ingolstadt

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Marion Subklewe  
Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2009

*Meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung neoplastischer Erkrankungen und deren Therapie . . . . .	1
1.2	Oberflächenproteine als Zielstruktur einer Immuntherapie . . . . .	1
1.3	Das karzinoembryonale Antigen als Zielantigen in der Immuntherapie .	3
1.4	Die CEA-Familie . . . . .	4
1.4.1	Mitglieder der CEA-Familie . . . . .	4
1.4.2	Entdeckung neuer CEA-Familienmitglieder durch Genomanalyse	4
1.4.3	Die <i>CEACAM</i> -Subgruppe und deren biologische Funktion . . .	5
1.4.4	<i>CEACAM20</i> , ein mögliches Ziel für die Tumorimmuntherapie? .	8
1.5	Zielsetzung der Dissertation . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Material . . . . .	11
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	11
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	13
2.1.3	Software und Internetadressen . . . . .	15
2.1.4	Antikörper . . . . .	15
2.1.5	Oligonukleotide . . . . .	15
2.1.5.1	Oligonukleotide für Expressionsnachweise . . . . .	16
2.1.5.2	Oligonukleotide für die DNA-Amplifikation und Mu- tagenese von <i>CEACAM20</i> -cDNA . . . . .	16
2.1.6	Vektorplasmide . . . . .	17
2.1.7	Bakterien . . . . .	18
2.1.8	Zelllinien . . . . .	18
2.1.9	Humane Gesamt-RNA . . . . .	18
2.1.10	Humane Gewebeproben . . . . .	19

2.2	Methoden . . . . .	20
2.2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	20
2.2.1.1	RNA-Isolierung aus Geweben . . . . .	20
2.2.1.2	RNA-Isolierung aus Zellen . . . . .	20
2.2.1.3	Reverse Transkription . . . . .	20
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	21
2.2.1.5	Mutagenese durch modifizierte Oligonukleotide mittels PCR . . . . .	23
2.2.1.6	DNA-Agarosegelelektrophorese . . . . .	24
2.2.1.7	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese . . . . .	25
2.2.1.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten . . . . .	26
2.2.1.9	DNA-Aufreinigung . . . . .	26
2.2.1.10	DNA-Restriktionsendonukleasenverdau . . . . .	26
2.2.1.11	DNA-Dephosphorylierung . . . . .	26
2.2.1.12	Ligation . . . . .	27
2.2.1.13	Transformation . . . . .	27
2.2.1.14	Herstellung von <i>E.-coli</i> -Dauerkulturen . . . . .	28
2.2.1.15	Präparation kleiner Plasmidmengen (Mini-Prep) . . . . .	28
2.2.1.16	Präparation großer Plasmidmengen (Maxi-Prep) . . . . .	28
2.2.1.17	Kolonie-PCR . . . . .	28
2.2.1.18	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA und RNA . . . . .	29
2.2.1.19	DNA-Sequenzierung . . . . .	30
2.2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	30
2.2.3	Zellkultivierung . . . . .	30
2.2.3.1	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	30
2.2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen . . . . .	31
2.2.3.3	Transiente Transfektion von Zellen . . . . .	31
2.2.4	Genetische Immunisierung . . . . .	33
2.2.4.1	Immunisierung mittels <i>Gene gun</i> zur Herstellung von Antikörpern . . . . .	33
2.2.4.2	Herstellung der <i>Gene-gun</i> -Munition . . . . .	33
2.2.4.3	Immunisierung von Mäusen mittels <i>Gene gun</i> . . . . .	34
2.2.4.4	Analyse der Immunseren mittels zellbasiertem ELISA . . . . .	35

2.2.5	Immunzytologische Färbung von <i>Zytospins</i> . . . . .	36
2.2.6	Immunhistologische Färbung von kryokonservierten Gewebeschnitten . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Bestimmung der humanen <i>CEACAM20</i> -Gensequenz . . . . .	39
3.2	Bestimmung der <i>CEACAM20</i> - <i>leader</i> -Sequenz und der Transmembranregion . . . . .	41
3.3	Expressionsmusteranalyse von <i>CEACAM20</i> -mRNA . . . . .	42
3.3.1	Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA . . . . .	42
3.3.1.1	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese . . . . .	42
3.3.1.2	Qualitätskontrolle mittels RT-PCR Expressionsanalyse von <i>GAPDH</i> . . . . .	42
3.3.2	Expressionsnachweis des <i>CEACAM20</i> -Transkripts mittels RT-PCR in humanen Normalgeweben . . . . .	43
3.3.3	Expressionsnachweis des <i>CEACAM20</i> -Transkripts mittels RT-PCR in humanen Tumorgeweben und Tumorzelllinien . . . . .	44
3.3.4	Nachweis von differentiellem Spleißen für <i>CEACAM20</i> . . . . .	45
3.4	Nachweis des <i>CEACAM20</i> -Proteins . . . . .	49
3.4.1	Klonierung der extrazellulären <i>CEACAM20</i> -Domänen . . . . .	49
3.4.2	Expressionstestung der <i>CEACAM20</i> -Immunisierungs- und <i>Screening</i> -Konstrukte . . . . .	52
3.4.3	Genetische Immunisierung und Bestimmung der Immunisierungseffizienz . . . . .	52
3.4.4	Immunologischer Proteinnachweis mittels <i>Zytospins</i> . . . . .	54
3.4.5	Immunologischer <i>CEACAM20</i> -Proteinnachweis in humanen Prostatagewebe . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Selektive Expression von <i>CEACAM20</i> . . . . .	57
4.2	Funktionelle Vielfalt durch differentielles Spleißen? . . . . .	58
4.3	Konserviertes ITAM-Motiv als funktionelles Element in <i>CEACAM20</i> . . . . .	60
4.4	Mausmodell eignet sich zur Generierung von Anti- <i>CEACAM20</i> -Antikörper . . . . .	63

4.5	<i>CEACAM20</i> als potentielle Zielstruktur für die Tumorummuntherapie .	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
	Literaturverzeichnis	69
	Abkürzungsverzeichnis	79
	Danksagung	83
	Lebenslauf	85



# 1 Einleitung

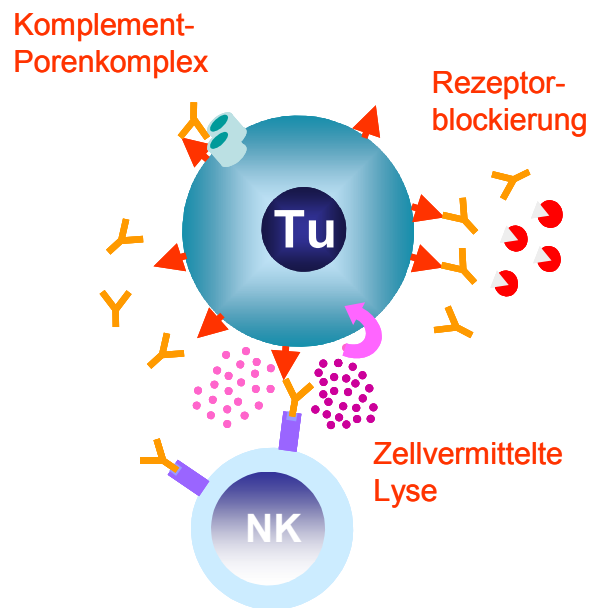
## 1.1 Bedeutung neoplastischer Erkrankungen und deren Therapie

Als Neoplasien bezeichnet man alle malignen Gewebeneubildungen inklusive systemischer Lymphome und Leukämien. Die Zahl der Neuerkrankungen wird in Deutschland mit ungefähr 500.000 pro Jahr angegeben (Epidemiologischer Krebsregister, 2008). Während die pathogenetischen und biologischen Grundlagen dieser Erkrankungen zunehmend bekannt werden, konnten durchschlagende Erfolge in der Therapie nur in sehr frühen Phasen der Erkrankung verzeichnet werden. Neben den klassischen Therapieverfahren wie die Tumorchirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie versprechen jedoch neue Konzepte eine gezieltere, nebenwirkungsärmere und erfolgreichere Therapie. Hierzu gehören insbesondere die kausalen Therapieansätze, welche spezifisch die für die übersteigerte Proliferation notwendigen Signal- und Stoffwechselschritte in den Tumorzellen hemmen. Aber auch die Tumorimmuntherapie, die sich das körpereigene Immunsystem zu Nutze machen möchte. Voraussetzung ist immer ein Verständnis der molekularen Abläufe und Struktur der entarteten Zellen.

## 1.2 Oberflächenproteine als Zielstruktur einer Immuntherapie

Die unterschiedliche Expression der zellulären Oberflächenproteine stellt eine der entscheidenden Möglichkeiten dar, maligne Zellen von benignen Zellen auf molekularer Ebene zu unterscheiden. Diese Tatsache kann man sich im Rahmen der Therapie mit Antigen-spezifischen Antikörpern zu Nutze machen. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde diese Idee durch Paul Ehrlich und seinen Mitarbeitern bekannt. Aber erst mit der Entdeckung der Hybridomtechnologie durch Milstein und Köhler im Jahr 1975 konnte die Grundlage für die Generierung spezifischer Antikörper geschaffen werden (Köhler & Milstein, 1975).

Durch die Bindung der erzeugten Antikörper an die Zielstruktur können zytotoxische Reaktionen ausgelöst werden. Zum einen durch die direkte Kopplung an radioaktive Isotopen oder Toxinen, zum anderen durch die Aktivierung der Komplementkaskade und die dadurch verursachte Zytolyse (Idusogie et al., 2001), als auch durch die Aktivierung zytotoxischer Effektorzellen (Clynes et al., 2000). Eine antiproliferative Wirkung kann durch Bindung und Hemmung von Wachstumshormonrezeptoren und deren Signalkaskade erzeugt werden (Li et al., 2005).



**Abbildung 1.1: Ansätze der Antikörper-basierten Immuntherapie.** Einerseits können monoklonale Antikörper durch Bindung die Komplementkaskade aktivieren, welche wiederum zur Porenbildung und Zelllyse führt. Es können aber auch die Ligandenbindungen an Rezeptoren blockiert und deren proliferative Signalkaskade inhibiert werden. Ein weiterer Weg ist die Aktivierung natürlicher Killerzellen, welche zur Ausschüttung löslicher Perforine führt und ebenso im Zelltod endet.

Neun verschiedene monoklonale Antikörper sind bereits in der klinischen Therapie maligner Erkrankungen etabliert. Fünf davon finden ihren Einsatz bei hämatologischen Neoplasien. Als Antigene dienen hierbei CD52 bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL; Alemtuzumab), CD33 bei der akuten myeloischen Leukämie (AML; Gentuzumab) und CD20 bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und der CLL (Rituximab). Der am häufigsten verwendete Antikörper ist Rituximab, welcher als Standardtherapie bei vielen Non-Hodgkin-Lymphomen zusammen mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin® (Vincristin) und

Prednison (CHOP) verabreicht wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass CHOP und Rituximab zusammen verabreicht in 76 % der Fälle, CHOP allein gegeben, nur in 63 % der Fälle eine Vollremission erzeugen konnte (Coiffier et al., 2002). Rituximab ist ein humanisierter Antikörper, der nur zu einem Teil aus murinen Proteinsequenzen besteht und deswegen nur sehr gering durch neutralisierende Antikörper, so genannte HAMA (*human anti-mouse antibodies*) gehemmt wird. Vier weitere Antikörper dienen der Behandlung solider Tumoren. Am etabliertesten dürfte der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) sein, welcher alleine oder zusammen mit Paclitaxel bei der Behandlung des Brustkrebses eingesetzt wird. Das zugehörige Antigen ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu, der in 20-30 % der Karzinome überexprimiert gefunden werden kann und kausal mit der Tumorentstehung verknüpft ist (Hudis, 2007).

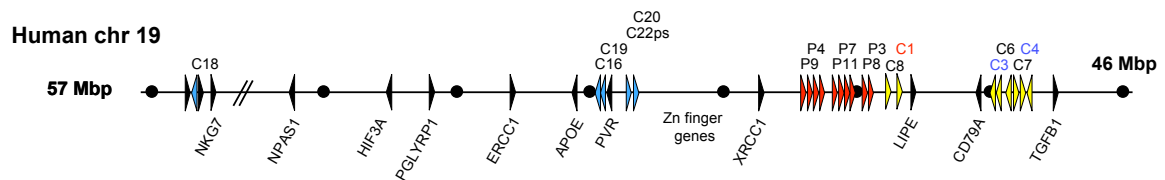
### 1.3 Das karzinoembryonale Antigen als Zielantigen in der Immuntherapie

Das karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein sehr gut charakterisiertes, tumorassoziiertes Glykoprotein, welches bevorzugt in gastro-intestinalen Adenokarzinomen exprimiert wird. Nach seiner Entdeckung Mitte der 60er Jahre durch Gold und Freedman (Gold & Freedman, 1965) konnte gezeigt werden, dass die CEA-Serumkonzentration in Patienten mit Kolonkarzinom deutlich erhöht war. Diese Tatsache macht man sich auch heute noch zu Nutze, indem man CEA als kostengünstigen Tumormarker bei der Verlaufsbeurteilung des Kolonkarzinoms und anderer Adenokarzinome verwendet. Aufgrund seiner Membranverankerung, welche auf eine Glykophosphatidylinositol (GPI)-Verbindung zurückzuführen ist (Takami et al., 1988; Naghibalhossaini et al., 2007), bietet sich CEA auch als Zielstruktur für eine Tumormimmuntherapie mittels monoklonaler Antikörper an (Chatal et al., 2006). Obwohl CEA auch in gesunden Geweben exprimiert ist, ist das Protein aufgrund der streng luminalen Anordnung in den Darmepithelzellen für im Blut zirkulierende Antikörper nicht erreichbar.

## 1.4 Die CEA-Familie

### 1.4.1 Mitglieder der CEA-Familie

Die CEA-Familie ist eine bisher nur in Säugetieren beschriebene Subgruppe der Immunglobulinsuperfamilie. Charakteristisch sind eine ausgeprägte Glykosylierung sowie häufig eine Membranverankerung. Die humanen Mitglieder werden von insgesamt 29 Genen kodiert, die allesamt auf dem langen Arm des Chromosoms 19 innerhalb eines 1,8 Mbp großen Bereichs lokalisiert sind. Funktionell typisch und bisher bekannt sind Zell-Zell- Erkennungsmechanismen (Zelladhäsion) sowie die Modulation innerzellulärer Abläufe zur Regulation der Proliferation. Bemerkenswert ist die große Divergenz zwischen Primaten, Nagern und andere Säugerordnungen welche auf eine evolutionäre Entstehung erst nach der Trennung der unterschiedlichen Ordnungen schließen lässt. Durch Ähnlichkeitsanalysen konnten Mechanismen wie Genkonversion und Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden. Dies erklärt auch das Vorhandensein zahlreicher Pseudogene (Frangsmyr et al., 2000). Die CEA-Familie wird in zwei Untergruppen unterteilt. Die CEA-ähnlichen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (*CEACAM*) und die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (PSG), welche ausschließlich in Trophoblasten während der Ontogenese exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Mitglieder der *CEACAM*-Untergruppe untersucht.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Genloci der CEA-Familie auf Chromosom 19 des Menschen.** Gelb und blau markierte Pfeile zeigen Mitglieder der *CEACAM*-Subgruppe an, rot markierte Pfeile representieren Mitglieder der PSG-Subgruppe. Die Pfeilrichtung entspricht der Transkriptionsrichtung. Schwarze Pfeile entsprechen Markergenen zur Orientierung; C, *CEACAM*; chr, Chromosom; Mbp, Millionen Basenpaare (Kammerer und Zimmermann, eingereicht zur Veröffentlichung).

### 1.4.2 Entdeckung neuer CEA-Familienmitglieder durch Genomanalyse

Dank des *Human Genome Projects* sowie den daraus entstandenen Gendatenbanken konnten in den letzten Jahren viele neue Mitglieder der CEA-Familie im Menschen gefunden werden. Mittels Ähnlichkeitsvergleichen und genetischen Vorhersageprogram-

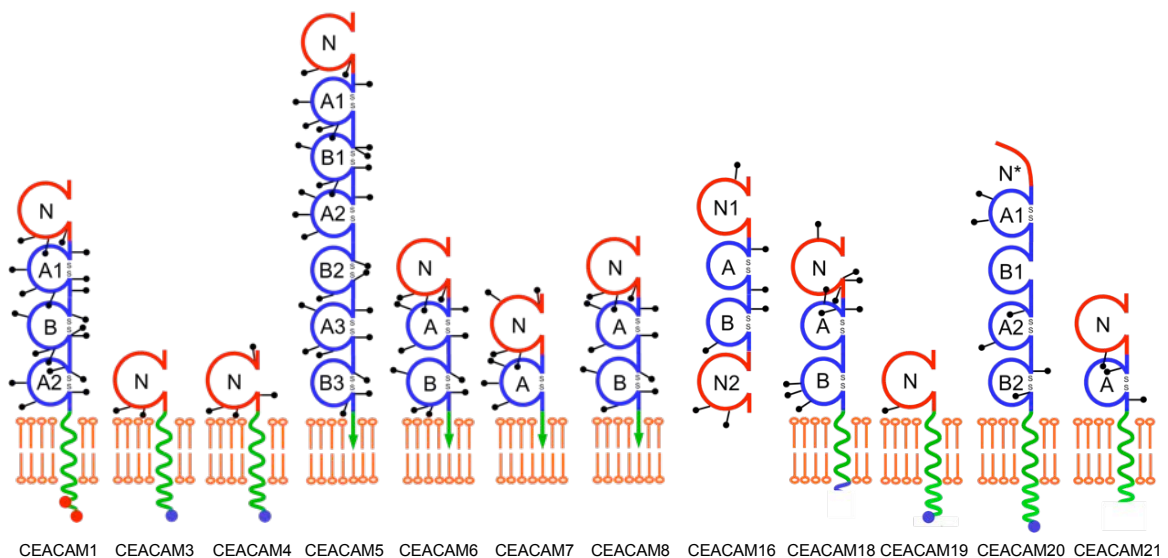
men konnten neue Gene markiert und zunächst vorläufig benannt werden. Darauf aufbauende Experimente dienten schließlich der Sequenzbestätigung und führten zur endgültigen Benennung jener Gene. Die für die vorliegende Arbeit hauptsächlich verwendete genomische Datenbank (Ensembl, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) nutzt dafür folgenden Vorhersageautomatismus (Curwen et al., 2004). Zunächst werden mittels *Genescan*-Algorithmus (Burge & Karlin, 1997) potentielle Gene und deren offene Leserraster im Genom markiert, bevor im nächsten Schritt mit Hilfe des schnellen *Exonerate*-Algorithmus (Slater, unveröffentlicht) die markierten Abschnitte mit cDNA- und EST-Datenbanken verglichen werden. Das Ergebnis wird anschließend einer Analyse des komplexen *GeneWise*-Algorithmus (Birney et al., 2004) unterzogen. Hierbei werden nun die endgültigen Exon-Intron-Grenzen sowie der 5'-UTR (nichttranslatierte Region am 5'-Ende) und 3'UTR (nichttranslatierte Region am 3'-Ende) Bereich des vorhergesagten Gens bestimmt. Abhängig von Qualität und Umfang der cDNA- und EST-Datenbanken ist hierfür auch die Qualität der Vorhersage. Ein bekanntes Defizit der verwendeten Algorithmen ist das Übersehen sehr kleiner Exone sowie das vorzeitige Ende einer Gensequenz bei Vorliegen eines großen letzten Introns (Burset & Guigo, 1996). Beispiele für neu entdeckte Mitglieder der CEA-Familie sind *CEACAM16*, *CEACAM18* und *CEACAM20*.

### 1.4.3 Die *CEACAM*-Subgruppe und deren biologische Funktion

Wie die verwandten Immunglobuline sind die *CEACAM*-Moleküle aus IgV- und IgC-ähnlichen Domänen aufgebaut, welche den variablen und konstanten Anteil von Antikörpern bilden. Eine weitere Unterscheidung erfolgt bei den IgC-ähnlichen Domänen, die als A-Typ mit einer Größe von ungefähr 93 Aminosäuren und als B-Typ mit ungefähr 85 Aminosäuren vorkommen. Die IgV-ähnlichen Abschnitte werden als N-terminale Domänen oder N-Domänen bezeichnet (Hammarstrom, 1999). Die unterschiedliche Anordnung und Anzahl dieser streng extrazellulären Domänen dient mitunter als Charakteristikum der verschiedenen Familienmitglieder. Die Funktion der N-Domänen ist für einzelne Mitglieder sehr genau untersucht. Sie ist wichtig für die homo- und heterophile Interaktion zwischen Mitgliedern der CEA-Familie (Watt et al., 2001) und für die Bindung von Liganden viraler und bakterieller *CEACAM*-bindender Pathogene (Tan et al., 2002). Über die Funktion der IgC-ähnlichen Domänen ist dagegen außer für CEA, bei denen sie an der homophilen Adhäsion beteiligt sind, kaum

## 1 Einleitung

etwas bekannt (Zhou et al., 1993). Der zytoplasmatische Molekülanteil ist, sofern vorhanden, durch funktionelle ITIM- oder ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition/activation motif*) gekennzeichnet. Beispiele für ITAM-tragende Mitglieder sind *CEACAM3*, *CEACAM4*, *CEACAM19* und *CEACAM20*. Die Transmembranregion besteht hierbei aus einer hydrophoben  $\alpha$ -Helixstruktur. Eine andere Form der Membranbindung ohne intrazellulären Anteil zeigt sich bei *CEACAM5*, *CEACAM6*, *CEACAM7* und *CEACAM8*. Hierbei wird posttranslational eine GPI-Verbindung angefügt, welche als hydrophobe Membranverankerung dient (Hefta et al., 1992). Diese Art der Membranassoziation wurde bei murinen CEA-Molekülen bisher nicht beobachtet (Zebhauser et al., 2005).



**Abbildung 1.3: Domänenstruktur der Mitglieder der humanen CEACAM-Untergruppe.** Rot gefärbte Strukturen entsprechen IgV-ähnlichen Domänen (N, N\*), welche in Primaten immer von blau gefärbten IgC-ähnlichen Domänen (A, B) flankiert werden. Kurvige Linien innerhalb der Doppelpoliphospholipidschicht entsprechen Transmembrandomänen, welche typischerweise als hydrophobe  $\alpha$ -Helixstruktur vorliegen. Grüne Pfeile stellen eine Membranassoziation über GPI-Anker dar. Gestielte Punkte entsprechen möglichen N-Glykosilierungsstellen. Rote oder blaue Punkte stellen vermutete Konsensussequenzen für funktionell aktive intrazelluläre Signaleinheiten dar (ITIM, ITAM). (Zimmermann, <http://cea.klinikum.uni-muenchen.de/>)

Die Expression der verschiedenen CEA-Mitglieder kann als sehr heterogen bezeichnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Moleküle vorwiegend auf epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen zu finden sind. Insbesondere auf der apikalen Seite polarisierter Zellen im Darm, Drüsen und Gefäßsystem (Donda et al., 2003;

Scholzel et al., 2000). Es mehren sich die Hinweise, dass ein *CEACAM1*-ähnliches Gen den Urvater der CEA-Genfamilie darstellt (Kammerer und Zimmermann, eingereicht zur Publikation). Vermutlich durch homophile Adhäsion vermittelte Zell-Zellinteraktionen dient *CEACAM1* als Regulator auf Epithel- Endothel- und Immunzellen. Neben der Beteiligung bei der Angiogenese (Tilki et al., 2007), der Regulation von T- und B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Moller et al., 1996) konnte auch eine Wirkung auf die Differenzierung von dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Kammerer et al., 2001). Als markante Besonderheit ist das differentielle Spleißen von *CEACAM1* anzusehen, welches durch unterschiedliche Kombination der für die intra- und extrazellulären Abschnitte kodierenden Exonen entsteht (Barnett et al., 1993). Die lange Isoform des *CEACAM1*-Moleküls zeigt intrazellulär ein ITIM-Motiv, welches inhibierende Wirkung auf biologische Prozesse erzeugt. Die kurze Isoform ohne ITIM-Motiv zeigt diese Wirkung nicht (Huber et al., 1999). Eine weitere Funktion von *CEACAM1* ist die Regulation und Beteiligung bei der Endozytose von Insulin über den Insulinrezeptor (Najjar, 2002). Im Rahmen der Tumorentstehung wird *CEACAM1* eine Rolle als Tumorsuppressorgen nachgesagt (Neumaier et al., 1993). Eine tumorprotetive Wirkung konnte unter anderem auch beim malignen Melanom nachgewiesen werden (Markel et al., 2009). Ursächlich hierfür kann eine Regulationsfunktion bei der Apoptose sein (Nittka et al., 2008).

Wie schon erwähnt, können *CEACAM*-Moleküle als Bindungsstellen für die Adhäsion und gegebenenfalls auch für die Internalisierung von Pathogenen dienen. Als Beispiele können hier *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella typhimurium* genannt werden, welche über Fimbrien an die Kohlenhydratstrukturen der Familienmitglieder *CEACAM1* (Leusch et al., 1991), *CEACAM5* und *CEACAM6* auf Epithelzellen und *CEACAM3* auf neutrophilen Granulozyten binden können (Berger et al., 2004). Durch Expression bestimmter Oberflächenproteine können *Neisseria species* (Opa-Protein), *Haemophilus influenzae* (P5-Protein) und *Moraxella catarrhalis* (UspA1-Protein) und diffus adhärierende *E. coli* (Dr-Adhäsine) mit den N-Domänen der *CEACAM*-Molekülen interagieren (Rougeaux et al., 2008; Hill & Virji, 2003). Hierdurch kann sowohl die Manifestation der entsprechenden Infektion gefördert oder auch die angeborene und adaptive Immunabwehr des Wirts ITIM-vermittelt geschwächt werden (Gray-Owen & Blumberg, 2006; Slevogt et al., 2008). Andererseits konnte gezeigt werden, dass das granulozytenspezifisch exprimierte *CEACAM3* die Elimination

pathogener Keime, die an *CEACAM*-Moleküle binden, fördern kann. Dabei spielt sein ITAM-Motiv eine entscheidende Rolle (Schmitter et al., 2004; Kuespert et al., 2007).

Bei der Suche nach tumorassoziierten, im Tumor deregulierten Proteinen innerhalb der CEA-Familie stieß man auf die Mitglieder *CEACAM6* und *CEACAM7*. Während die Expression von *CEACAM6* bei kolorektalen Karzinomen gesteigert ist, konnte gezeigt werden, dass die Expression von *CEACAM7* herunterreguliert wird (Scholzel et al., 2000).

### 1.4.4 *CEACAM20*, ein mögliches Ziel für die Tumorummuntherapie?

Auf der Suche nach neuen gewebespezifischen Antigenen ergaben Vorarbeiten Hinweise für ein neues Mitglied der CEA-Familie, welches unter anderem selektiv in Prostatagewebe exprimiert wird. Das im Folgenden als *CEACAM20* bezeichnete Protein erfüllt zudem weitere Anforderungen an eine Zielstruktur für eine antikörperbasierte Immuntherapie. Bereits das murine Pendant des neu entdeckten Gens weist eine selektive Expression im Intestinum, im Hoden sowie in weiteren Drüsengeweben auf (Zebhauser et al., 2005). Darüber hinaus konnten in malignen Geweben der Maus *CEACAM20*-Transkripte detektiert werden, was für eine Beteiligung an der Tumorentstehung sprechen kann. Ebenso wie das murine *CEACAM20* scheint auch die menschliche Variante ein Oberflächenprotein zu sein und neben einer extrazellulären Region und einer Transmembranregion auch einen intrazellulären Proteinanteil zu besitzen. Die Domänenanordnung ist typisch für ein Mitglied der CEA-Familie und bietet Möglichkeiten des differentiellen Spleißens.

Eine weitere markante Besonderheit von *CEACAM20* ist die intrazellulär gelegene Konsensussequenz für ein ITAM-Motiv. Das ITAM-Motiv wurde zum ersten Mal von Reth beschrieben (Reth, 1989) und besteht aus einer konservierten tyrosinhaltigen Aminosäurereihenfolge (im Einbuchstabencode: E/DxxYxxI/Lx (6–8) YxxI/L). Während bis vor einigen Jahren angenommen wurde, dass ITAM-Motive ausschließlich in immunologischen Zellen vorkommen, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch andere Zellen funktionell aktive Proteine mit ITAM-Motiv beinhalten. Neben den bekannten B- und T-Zell-Rezeptoren sowie den Fc-Rezeptoren besitzen auch weitere Blutzellen und deren Rezeptoren ITAM-Motive. Als Beispiele zu nennen sind Thrombozyten (Gibbins et al., 1997), Osteoklasten (Koga et al., 2004), neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Aufgabe der ITAM-tragenden Rezeptoren



sind die Aktivierung und Differenzierung der jeweiligen Zellen bei Stimulierung mit dem entsprechenden Antigen. Grundlage der Signaltransduktion ist die durch Rezeptoraktivierung ausgelöste Phosphorylierung beider Tyrosine des ITAM-Motivs durch so genannte Src-Kinasen. SYK (*spleen tyrosine kinase*) oder Zap70 in T-Zellen stellen weitere Proteintyrosinkinasen (PTK) dar, die nun mit Hilfe ihrer SH2-Domäne an die doppelphosphorylierten ITAM-Motive binden und wiederum durch Phosphorylierung weitere Signaltransduktionsproteine aktivieren können. Als Resultat folgt eine Genaktivierung im Zellkern, die zu Proliferation und Differenzierung führt. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass virale Proteine, welche ITAM-Motive enthalten, ihre onkogene Potenz erst durch diesen Mechanismus entfalten können (Lanier, 2006). Erkenntnisse von Grande (Grande et al., 2006) ergeben Hinweise, dass ITAM-tragende Proteine im Allgemeinen als potentielle Onkogene agieren können. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse mit Tumormausmodellen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass auch *CEACAM20* als ITAM-tragendes Oberflächenprotein onkogene Eigenschaften besitzt.

## 1.5 Zielsetzung der Dissertation

*CEACAM20* ist ein neu entdecktes Mitglied der CEA-Familie. Hinweisen zufolge verfügt es über eine selektive Expression in diversen normalen und malignen Geweben, insbesondere auch in der Prostata. Als membranständiges Protein wäre es grundsätzlich für antikörperbasierte Immuntherapie geeignet. Ebenso zeigt *CEACAM20*, dank seines intrazellulären ITAM-Motivs, die Möglichkeit zur transmembranen Signaltransduktion, welche Ursache der Entstehung epithelialer Tumoren sein kann. Durch geeignete Antikörper könnte diese Signaltransduktion unterbunden werden, was von therapeutischem Nutzen wäre. Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die vorhergesagte Gensequenz des humanen *CEACAM20*-Gens experimentell zu bestätigen und die Expression in menschlichen Normal- und Tumorgeweben auf RNA-Ebene zu untersuchen. Anschließend soll die Grundlage für den Nachweis auf Proteinebene geschaffen werden. Ziel ist die Erstellung zunächst polyklonaler Antikörper sowie die Voraussetzungen für die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels genetischer Immunisierung zu schaffen. Diese können für weitere Expressionsanalysen wie Immunhistologie als auch für Funktionsanalysen dienlich sein, um die Eignung als Zielstruktur einer Immuntherapie

## 1 Einleitung

---

weiter zu verifizieren und die Rolle von *CEACAM20* bei der Entstehung epithelialer Tumore zu klären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

CLONdisc™Platten	BD Biosciences, Heidelberg
CryoTube™Vials	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Einmalhandschuhe	Semperit Technische Produkte, Wien
Sempercare nitril	
Sempercare edition	
Elektrophoreseapparatur PS 304	Gibco BRL, Karlsruhe
Fluoreszenzmessgeräte	
Fusion™	PerkinElmer Life Sciences
1420 VICTOR™	LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
Gase	Messer Griesheim GmbH, Karlsruhe
Helium 4.6	
Stickstoff 5.0	
Geldokumentationssystem Fluor-S MultiImager	Bio-Rad, München
<i>Gene gun</i> , Helios	Bio-Rad, München
<i>Gene-gun</i> -Zubehör	Bio-Rad, München
Helium-Reduzierventil	
Tefzel-Schläuche	
Tubing prep station	
Gold microcarrier, 1 $\mu\text{m}$	Bio-Rad, München
Inkubator, B 5060 E	Heraeus Instrumente GmbH, Fellbach
Küvetten	Bio-Rad, München
Quartz spectrophotometer cell micro	
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Mannheim

## 2 Material und Methoden

---

### Mikrotiterplatten

Maxisorp

OptiPlate-96 F, schwarz

Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-  
Jügesheim

### Präparierbesteck

Pinzetten, Scheren

Klingenfuss GmbH, Freiburg i. Br.

### PCR Reaktionsgefäße

PCR Softstrips; 0,2 ml

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

### Photometer

Smartspec™ 3000

GeneQuant II

Bio-Rad, München

Amersham Pharmacia Biotech  
Europe GmbH, Frankfurt

### pH Meter pH 535 MultiCal

### Pipetten Eppendorf Research

### Pipette, 12-Kanal

### Pipettenspitzen

WTW, Weilheim

Eppendorf AG, Hamburg

Dunn, Asbach

Eppendorf AG, Hamburg

Starlab GmbH, Ahrensburg

### Reagenzröhrchen (15 ml; 50 ml)

### Reaktionsgefäße

1,5 und 2 ml

LidBac mit Membrandeckel

### Schüttler CERTOMAT® H

Falcon, Heidelberg

Eppendorf AG, Hamburg

B. Braun Biotech International, Melsun-  
gen

### Sterilbank HERA safe HS12

### Sterile Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml

### Stickstofftank Chronos Biosafe

### Thermocycler

Peltier Thermal Cycler PTC 200

### Thermomixer comfort

### Tuberkulinspritzen

### Ultraschallgerät

### Ultra-Turrax

Heraeus Instrumente GmbH, Fellbach

Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Messer, Griesheim

MJ Research Inc., Watertown, USA

Eppendorf AG, Hamburg

BD Biosciences, Heidelberg

Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Ika GmbH, Staufen

Waagen	Satorius, AG, Göttingen
BP2100	
MC1, Research RC210P	
Wasserbad Julabo 19	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer, Neubauer	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturschalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
6-well, 24-well	
96-well, Rund/Flachboden	
96-well, schwarz	
$\phi$ [cm]: 10, 15	
Zellsieb, 40 $\mu$ m	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugen	
MIKRO 20	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Megafuge 2.0	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	
low EEO	Stratagene, Amsterdam
Electrophoresis Grade	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Amplex <sup>TM</sup>	MoBiTec, Göttingen
BSA Albumine bovine fraction V	Sigma, Taufkirchen
DMEM, Medium	Biochrom AG, Berlin
	Gibco BRL, Karlsruhe
DMSO p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
DNA-Größenmarker	
1-kb-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon - Rot
100-bp-Leiter	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon - Rot
Enthaarungscreme Veet sensitiv	Reckitt Benckiser AG, Mannheim

## 2 Material und Methoden

---

Ethanol	
absolut p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
getrocknet (max. 0,02% H <sub>2</sub> O)	VWR International GmbH, Darmstadt
vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
	Bio-Rad, München
FCS	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FuGENE 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycerin	VWR International GmbH, Darmstadt
HAT Media Supplement 50x	Sigma, Taufkirchen
HT Media Supplement 50x	Sigma, Taufkirchen
HCF Media Supplement	Biochrom AG, Berlin
Humanes Serum TypAB	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanamycin	Biochrom AG, Berlin
Ketavet	Pharmacia GmbH, Erlangen
LB Broth EZMix	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphate buffered Saline (PBS)	
Dulbecco´s	Gibco BRL, Karlsruhe
Pulver	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Polyethylenglycol, PEG	Sigma, Taufkirchen
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Bio-Rad, München
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
RPMI 1640, Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Spermidin	Sigma, Taufkirchen
TAE-Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase (BioTherm™)	GeneCraft, Lüdingshausen
Trypanblaulösung	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	VWR International GmbH, Darmstadt

---

Wasserstoffperoxid (30 %)	VWR International GmbH, Darmstadt Apotheke, Klinikum Grosshadern, München
---------------------------	--

### 2.1.3 Software und Internetadressen

Vector NTI™	Invitrogen, Karlsruhe (vorher: InforMax, Inc., Bethesda, USA)
SignalP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
Codon Usage table	<a href="http://www.kazusa.or.jp">http://www.kazusa.or.jp</a>
ScanProsite	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>
SOSUI Proteome	<a href="http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp">http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp</a>

### 2.1.4 Antikörper

#### Nicht-konjugierte monoklonale Antikörper

Anti-flag M2 (Maus; IgG1)	Sigma, Taufkirchen
Anti-c-MYC (Maus; IgG1)	Sigma, Taufkirchen

#### HRP-konjugierte monoklonale Antikörper

Anti-Maus-Ig-HRP ( <i>horse radish peroxidase</i> ) (Kaninchen)	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
---	---------------------------------------

### 2.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden am Genzentrum der Universität München synthetisiert. Die durch **Fettdruck** markierten Sequenzabschnitte weisen auf relevante Restriktionsendonukleaseschnittstellen hin.

2.1.5.1 Oligonukleotide für Expressionsnachweise

Gen	Primer	$T_a^*$ °C	Sequenz
<i>GAPDH</i>	GAPDH-5'	61	5' -AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'
	GAPDH-3'	64	5' -AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'
<i>CEACAM16</i>	CEACAM16N1-f	61	5' -TCAGCGTGTGCATACCTGGTG-3'
	CEACAM16A-r	60	5' -ATAAGGCGCAGGGTGTCTC-3'
<i>CEACAM19</i>	CEACAM19N-f	62	5' -TACGGAGGCACGAGGCTATT-3'
	CEACAM19TM-r	61	5' -CCTCCAGTTCCTTGTACCA-3'
<i>CEACAM20</i>	CEACAM20N-f	60	5' -CCACCCAAAGTGAGGATGTT-3'
	CEACAM20A1-r	60	5' -ATCTTGCCATCCTTGACAG-3'
	CEACAM20TM-r	61	5' -GGATCCCGATGACAATAACA-3'
	CEACAM20TM-f	60	5' -CATCGCTGGTATTGTTCATCG-3'
	CEACAM20Cyt5-r	60	5' -GGCTCTGGATTCAAGCTC-3'
	CEACAM20Cyt4-r	60	5' -GGCACAGTGGAGACCAATCT-3'
	CEACAM20Cyt3-r	60	5' -CTCCTCTGGAAGGTCTGGTG-3'
	CEACAM20Cyt2-r	60	5' -GACTCTGATCCGTCCCTGAA-3'
<i>CEACAM21</i>	CEACAM21N-f	58	5' -TCTGCCCGAGAATCTTTACA-3'
	CEACAM21A-r	59	5' -TTCATCCTCTTCGTGACCTG-3'

\*  $T_a$ : Annealing-Temperatur

2.1.5.2 Oligonukleotide für die DNA-Amplifikation und Mutagenese von *CEACAM20*-cDNA

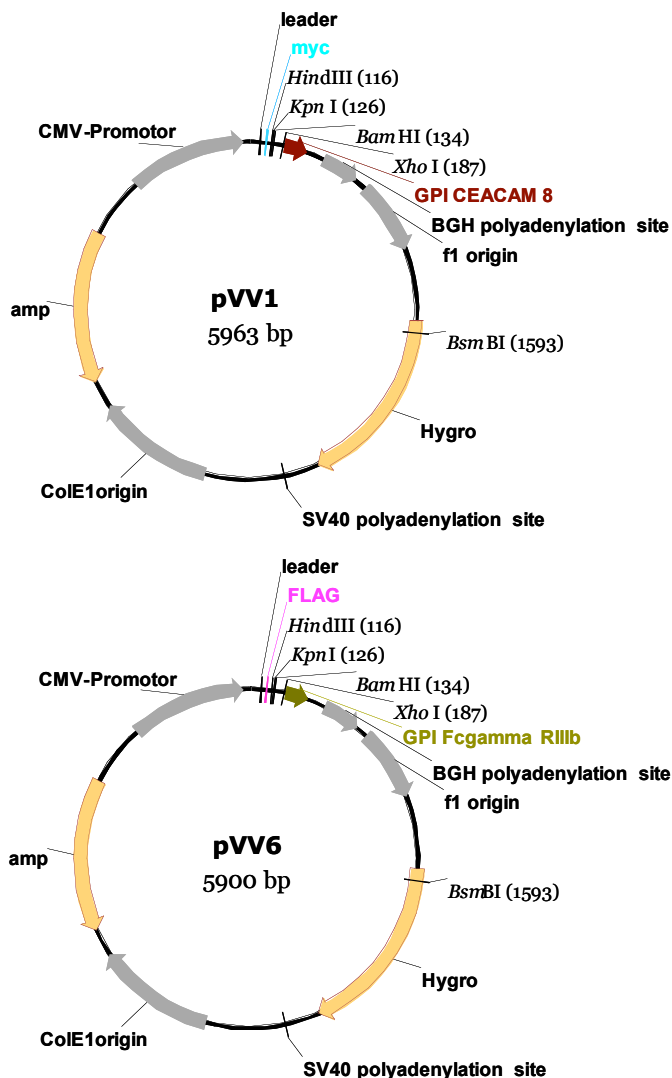
Primer	$T_{a(1)}^*$ °C	$T_{a(2)}^*$ °C	Sequenz
<i>CEA20A1Imu-f</i>	60	73	5' -AAT <b>AAGCTT</b> GCAGCTCACCTCAATGCCA-3'
<i>CEA20TMImu-r</i>	61	73	5' -ATA <b>CTCGAG</b> CTGAGGACAGGGAGGAGGACTG-3'
<i>CEA20B2Imu-r</i>	52	72	5' -ATA <b>CTCGAG</b> CTACCACCTTGACCAGGACTGAAG-3'
<i>CEA20MutXho-f</i>	71		5' -CAATGTGAAGCCCCGAGATGCCCTTC-3'
<i>CEA20MutXho-r</i>	71		5' -GAAGGGCATCTCGGGCTTCACATTG-3'

\*  $T_{a(1)}, T_{a(2)}$ : Annealing-Temperatur für teilweise (1) oder ganze (2) Anlagerung



### 2.1.6 Vektorplasmide

Im Rahmen der genetischen Immunisierung wurden zwei spezielle Plasmide verwendet. Sowohl der Vektor pVV1 (Immunisierungsvektor) als auch pVV6 (*Screening*-Vektor) kodieren für eine GPI-Ankersignalsequenz sowie ein geeignetes Markerpeptid (myc, flag). Als eukaryontischer Promoter wurde der Zytomegalovirus (CMV)-Promoter verwendet. Für die Selektion in Prokaryonten verfügen beide Plasmide über ein Ampicillinresistenzgen sowie ein Hygromycinresistenzgen für die Selektion in eukaryontischen Zellen. Abbildung 2.1 zeigt die zugehörigen Vektorkarten.



**Abbildung 2.1: Vektorkarten des Immunisierungsvektors pVV1 und des *Screening*-Vektors pVV6.** Beide Vektoren besitzen die gleiche Signalsequenz (*leader*), welche sich von der humanen leichten  $\kappa$ -Immunglobulinkette ableitet. Ebenso besitzen beide Vektoren eine GPI-Ankersequenz, die bei pVV1 von *CEACAM8* stammt und bei pVV6 von *Fc $\gamma$ RIIIb*. pVV1 besitzt als Markerpeptid "myc" und pVV6 "flag". Die für die vorliegende Arbeit relevanten Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind im Bereich der Klonierungsstelle (*multiple cloning site, MCS*) angegeben. Offene Leseraster sind durch Pfeile gekennzeichnet. Beide Vektoren besitzen eine prokaryontische Ampicillinresistenz (*amp*) sowie eine eukaryontische Hygromycinresistenz (*hygro*).



Hoden (1)	BioChain Institute, Hingham, USA
Hoden (2)	Chemicon , USA
Thymus	BioChain Institute, Hingham, USA
Uterus	Chemicon , USA

#### 2.1.10 Humane Gewebeproben

Prostatanormalgewebe	Rechtsmedizin, LMU, München über Dr. K. Ebelt, Institut für Pathologie, TU München
Prostatakarzinom	LTI, LMU, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Für die Isolierung von Ribonukleinsäure aus humanen Geweben wurde das RNeasy-Mini-Kit von Qiagen verwendet. Die in gasförmigen Stickstoff bei ca.  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Präparate wurden unter Tiefkühlung abgewogen, mittels eines mit flüssigen  $\text{N}_2$  tiefgekühlten Mörsers grob zerkleinert und unter Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert. Der weitere Verlauf erfolgte gemäß Herstellerangaben.

#### 2.2.1.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Aus kultivierten humanen Tumorzelllinien wurde ebenfalls mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits RNA isoliert. Hierfür wurden bis zu  $6 * 10^6$  Zellen pro Ansatz verwendet, welche mittels QIAshredder der Firma Qiagen und unter Zugabe eines RNase-inaktivierenden Puffers homogenisiert wurden. Die weiteren Schritte erfolgten analog den Herstellerangaben.

#### 2.2.1.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription diente der Umschreibung von isolierter RNA in cDNA (*complementary DNA*). Hierfür wurde eine zufällige Kombination aus Desoxynukleotid-Hexameren (*random hexamer primer*) als Primer verwendet. Als Enzym wurde eine reverse Transkriptase der Firma Promega (Madison, USA) eingesetzt.

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>
RNA-Matrize ( $1\ \mu\text{g}$ ) + RNase freies Wasser	$7\ \mu\text{l}$
RT-Puffer (10x)	$2\ \mu\text{l}$
<i>Random Hexamer Primer</i> ( $10\ \mu\text{M}$ )	$1\ \mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ ( $25\ \text{mM}$ )	$4\ \mu\text{l}$
dNTP ( $10\ \text{mM}$ )	$2\ \mu\text{l}$
RNase-Inhibitor (RNAsin) ( $40\ \text{U}/\mu\text{l}$ )	$0,5\ \mu\text{l}$
AMV-Reverse-Transkriptase ( $25\ \text{U}/\mu\text{l}$ )	$0,6\ \mu\text{l}$
Volumen pro Ansatz ( $\text{H}_2\text{O}$ -Zugabe ad)	$20\ \mu\text{l}$

Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Denaturierung*	70	10
Primeranlagerung	25	10
Verlängerung	42	60
Denaturierung	95	5

\* Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde die RNA vor Zugabe aller anderen Substanzen zunächst auf 70 °C erwärmt.

#### 2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für folgende Zwecke eingesetzt:

- für die Expressionsanalyse nach reverser Transkription
- für Amplifikation und den Einbau von Restriktionsenzymkennungssequenzen am 5'- und 3'-Ende der zu klonierenden cDNA

Für die Expressionsanalysen wurde dabei die herkömmliche Taq-Polymerase mit zugehörigen Puffersubstanzen verwendet. Die Dauer für den Polymerisationsschritt und die Temperatur für die Primeranlagerung wurde an die jeweilige Produktlänge und an die Primereigenschaften angepasst.

Komponenten	Volumen
cDNA-Matrize (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	5 $\mu$ l
<i>Forward Primer</i> (0,4 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
<i>Reverse Primer</i> (0,4 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu$ l
dNTP (0,2 mM)	0,2 $\mu$ l
PCR-Puffer (10x)	2,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,13 $\mu$ l
Volumen pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)	25 $\mu$ l

<b>Versuchsschritt</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Dauer (min:s)</b>
Denaturierung	94	0:30
Zyklische Amplifikation (35x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	54 - 69	0:30
Polymerisation	72	1:10 - 1:50
Finale Polymerisation	72	10:00

Zum Erhalt der exakten cDNA-Sequenzen und für die Weiterverwendung der PCR-Produkte wurde eine *Proof-reading*-Polymerase (Triple Master) der Firma Eppendorf (Hamburg) eingesetzt. Diese besitzt Korrekturleseaktivität und weist eine geringere Fehlerrate auf. Folgender abgewandelte Reaktionsansatz wurde verwendet:

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>
cDNA-Matrize (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	5 $\mu$ l
<i>Forward Primer</i> (0,4 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
<i>Reverse Primer</i> (0,4 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
dNTP (25 mM)	0,4 $\mu$ l
<i>High Fidelity</i> Puffer (10x)	5 $\mu$ l
<i>Triple Master</i> Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Volumen pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)	50 $\mu$ l

<b>Versuchsschritt</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Dauer (min:s)</b>
Denaturierung	94	0:30
1. Zyklische Amplifikation (10x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	54 - 69	0:30
Polymerisation	72	1:10 - 2:00
2. Zyklische Amplifikation (25x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	56 - 72	0:30
Polymerisation	72	1:10 - 2:00
Finale Polymerisation	72	10:00

Die zwei genannten Amplifikationsschritte ergeben sich aus der Tatsache, dass die eigentliche Matrize innerhalb der ersten Zyklen generiert wird und somit neue Bedingungen für die Anlagerung der Oligonukleotide herrschen.

#### 2.2.1.5 Mutagenese durch modifizierte Oligonukleotide mittels PCR

Im Rahmen der *CEACAM20*-Klonierung mussten einzelne Basen innerhalb der DNA-Matrize ausgetauscht werden, um überflüssige und störende Restriktionsendonukleaseschnittstellen zu entfernen. Dies geschah mittels zweier zueinander komplementären Oligonukleotiden, die beide die erwünschte Basenmutation enthielten. Es wurde darauf geachtet, dass die Mutation möglichst fern des 3'-Endes lag, um eine mangelnde Primer-Anlagerung und eine mögliche Reparatur durch Endonukleaseaktivität der *Proof-reading*-Polymerase zu vermeiden. Des Weiteren wurden die Einzelbasen-Mutationen so gewählt, dass es keine Änderung in der Aminosäuren-Kodierung ergab und es auch zu keiner Verschlechterung der eukaryontischen Verfügbarkeit der passenden Transfer-RNA (tRNA) kam. In zwei voneinander unabhängigen Reaktionen wurden zunächst zwei separate PCR-Produkte gewonnen, von denen eines die Mutation in Nähe des 3'-Endes und eines die Mutation in Nähe des 5'-Endes trug. Da sowohl das 3'-Ende als auch das 5'-Ende beider Amplifikate komplementär zueinander waren, konnte im nächsten Schritt eine „Fusions-PCR“ durchgeführt werden. Unter Verwendung beider gereinigter (gemäß Abschnitt 2.2.1.9) PCR-Produkte sowie der Zugabe von geeigneten Strang- und Gegenstrang-Primer konnten in einer gemeinsamen PCR beide Fragmente im komplementären Bereich hybridisieren und somit Grundlage für die ersten Polymerisierungsschritte bilden. Der weitere Verlauf ist analog zur herkömmlichen PCR (Abbildung 2.2).

Die Reaktionsansätze und die Reaktionsbedingungen waren für die ersten beiden PCRs identisch mit den in Abschnitt 2.2.1.4 beschriebenen. Anschließend wurden die Ansätze einer Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.6) unterzogen, die DNA-Produktgrößen kontrolliert und aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 2.2.1.8). Für die Fusions-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

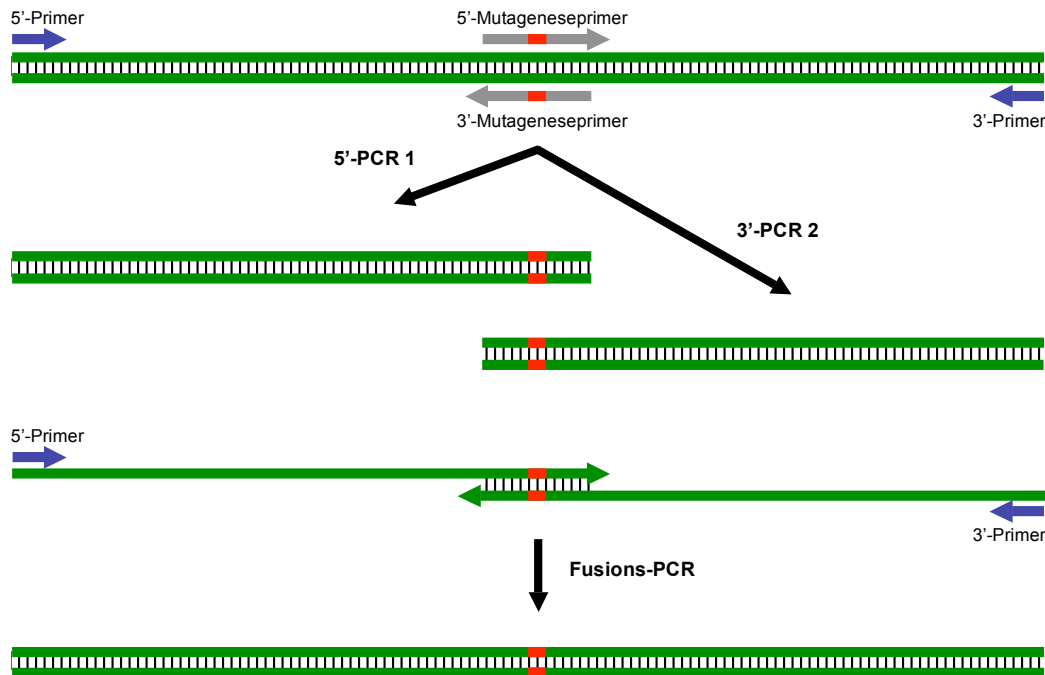
Komponenten	Volumen
5'-Fragment (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
3'-Fragment (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<i>Forward Primer</i> (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
<i>Reverse Primer</i> (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
dNTP (25 mM)	1 $\mu$ l
<i>High Fidelity</i> Puffer (10x)	5 $\mu$ l
<i>Triple Master</i> Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Volumen pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)	50 $\mu$ l

Versuchsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	0:30
Zyklische Amplifikation (10x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	70	0:30
Polymerisation	72	1:50
Finale Polymerisation	72	10:00

### 2.2.1.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die erzeugten PCR-Produkte wurden zur Größendifferenzierung und semiquantitativen Mengenbestimmung einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Hierbei wurde je nach zu erwartender DNA-Fragmentgröße eine geeignete Agarosekonzentration gewählt (<200 bp: 2 %, >200 bp und <500 bp: 1,5 %, >500 bp: 1 %). Zusammen mit einem Elektrophoresepuffer (TAE 10x) wurde die Agarose erhitzt und anschließend nach Abkühlung auf ca. 60  $^{\circ}$ C mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Gelpolymerisation fand in geeigneten horizontalen Gelkammern statt. Die zu analysierende DNA wurde mit einem Bromphenolblau-haltigen Auftragspuffer vermischt und in den Geltaschen aufgetragen. Parallel wurde ein entsprechender Größenmarker zum späteren Vergleich aufgetragen. Bei einer angelegten Gleichspannung von 100 V fand die Elektrophorese mit 1x TAE als Laufpuffer statt. Mittels UV-Transillumination wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und digital fotografiert. Bei präparati-





**Abbildung 2.2: Mutagenese durch modifizierte Oligonukleotide mittels PCR.** Es wurden zunächst zwei separate PCR (5'-PCR 1, 3'-PCR 2) mit jeweils einem endständigen Primer und einem im Bereich der gewollten Mutation gelegenen Mutageneseprimer angesetzt. Die Produkte wurden nach Kontrolle mittels Gelelektrophorese extrahiert, aufgereinigt und anschließend in einer weiteren PCR (Fusions-PCR) mit den beiden zuvor verwendeten endständigen Primer fusioniert.

ven Gelen wurde die relevante Bande mittels sterilem Skalpell und unter minimaler UV-Beleuchtung zum Schutz der DNA ausgeschnitten und asserviert.

### 2.2.1.7 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Intaktheit der isolierten RNA (Abschnitt 2.2.1.1, 2.2.1.2) konnte mittels denaturierender RNA-Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Hierfür wurde die RNA unter Zugabe von Formamid bei 65 °C inkubiert und denaturiert. Die Herstellung und Durchführung erfolgten analog Abschnitt 2.2.1.6 jedoch mit 10x TBE-Puffer (Endkonzentration 1 %) statt TAE-Puffer als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein geeigneter RNA-Marker der Größe 0,24 – 9,4 kb mitgeführt. Unter UV-Transillumination konnten bei intakter RNA die typischen 18S- und 28S-Spezies der eukaryontischen ribosomalen RNA (rRNA) sichtbar gemacht werden.

### 2.2.1.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten

Mit Hilfe des *PerfectPrep Gel Cleanup Kits* (Eppendorf, Hamburg) erfolgte die Extraktion der DNA aus dem präparierten Agarosegel nach Herstellerangaben.

### 2.2.1.9 DNA-Aufreinigung

Falls notwendig erfolgte die Reinigung der DNA nach Restriktionsenzymverdau oder PCR mittels des *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben.

### 2.2.1.10 DNA-Restriktionsendonukleasenverdau

Die für den Restriktionsverdau verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten allesamt von der Firma New England Biolabs (USA). Sowohl für den Verdau der Vektorplasmide als auch der PCR-Produkte wurden die empfohlenen Puffersysteme eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden ebenfalls gemäß Anleitung erstellt.

Vektorverdau:		Verdau PCR-Produkte:	
Komponenten	Volumen	Komponenten	Volumen
Vektor (1 µg/µl)	3 µl	PCR Produkt	30 µl
10x Puffer	2 µl	10x Puffer	4 µl
BSA	0,2 µl	BSA	0,4 µl
Restriktionsenzym I	20 U	Restriktionsenzym I	20 U
Restriktionsenzym II	20 U	Restriktionsenzym II	20 U
H <sub>2</sub> O-Zugabe ad	20 µl	H <sub>2</sub> O-Zugabe ad	40 µl

Falls möglich wurde ein Doppelverdau mit zwei Restriktionsendonukleasen versucht. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für zwei Stunden in einem Thermoblock. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA mittels *PCR Purification Kit* (Abschnitt 2.2.1.9).

### 2.2.1.11 DNA-Dephosphorylierung

Zur Vermeidung einer spontanen Religation der geschnittenen Plasmide wurde die Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA entfernt. Dies geschah mit Hilfe von Kälberdarm-Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, New England Biolabs) im folgenden Reaktionsansatz:

Komponenten	Volumen
Plasmid	30 $\mu\text{l}$
10x Puffer 3	4 $\mu\text{l}$
Phosphatase (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	5 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend gemäß Abschnitt 2.2.1.9 gereinigt.

### 2.2.1.12 Ligation

Die durch Restriktionsenzymverdau (Abschnitt 2.2.1.10) erzeugten komplementären Schnittenden („*sticky ends*“) der Plasmide und PCR-Amplifikate wurden mittels Ligase-Reaktion wieder zusammengefügt. Hierfür wurde das *Rapid Ligation Kit* von Promega GmbH (Mannheim) verwendet. Der Vektor und das zu integrierende DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Menge wurde zuvor mittels Photometer oder semiquantitativ durch Agarosegelelektrophorese und DNA-Markervergleich bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Komponenten	Volumen
DNA-Fragment	3-fach molares Äquivalent
Plasmid	1-fach molares Äquivalent
2x Ligationspuffer	5 $\mu\text{l}$
Ligase	1 $\mu\text{l}$
Volumen pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)	10 $\mu\text{l}$

### 2.2.1.13 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente *E.-coli*-Bakterien aus dem XL1-Blue-Stamm der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend 20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes verdünnt mit 3 ml LB-Selektionsmedium (Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf CLONdisc<sup>TM</sup>-Platten transferiert und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert.

#### 2.2.1.14 Herstellung von *E.-coli*-Dauerkulturen

Für die dauerhafte Aufbewahrung von transformierten Bakterienkulturen wurden 470  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur mit 100  $\mu\text{l}$  Glycerinlösung (87 %) gut vermischt und in einem verschraubbaren Kryogefäß bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.15 Präparation kleiner Plasmidmengen (Mini-Prep)

Für die Extraktion kleiner Plasmidmengen zur Analyse wurden einzelne Bakterienkolonien von einer CLONdisc<sup>TM</sup>-Platte mittels steriler Pipettenspitze in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit luftdurchlässigem Membrandeckel und 2 ml LB-Ampicillin-Selektionsmedium überführt. Die Bakterien wurden ca. 18 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und bei einer Umdrehungszahl von 1400 rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA geschah mittels *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

#### 2.2.1.16 Präparation großer Plasmidmengen (Maxi-Prep)

Aus einer 250 ml Bakterien-Übernachtskultur wurden unter Verwendung des *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben größere Mengen Plasmid-DNA gewonnen. Diese dienten für die Transfektion eukaryontischer Zellen sowie für die Immunisierung von Versuchstieren (Abschnitt 2.2.4.3).

#### 2.2.1.17 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente dem raschen Nachweis der korrekten Insertion in den jeweiligen Vektor nach Ligation und Transformation. Hierfür wurde als DNA-Matrize ein Teil (ungefähr ein Drittel) einer einzelnen markierten Bakterienkultur in einen PCR-Ansatz gegeben. Durch den ersten Erhitzungsschritt auf  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird die Bakterienzellwand zerstört, so dass die Plasmid-DNA zugänglich für die PCR-Reagenzien wird. Als Oligonukleotide wurden geeignete, die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors flankierende Primer eingesetzt. Zum visuellen Nachweis diente eine DNA-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.6).

Komponenten	Volumen
<i>Forward Primer</i> (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
<i>Reverse Primer</i> (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu\text{l}$
dNTP (0,2 mM)	0,2 $\mu\text{l}$
PCR-Puffer (10x)	2,5 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,13 $\mu\text{l}$
Volumen pro Ansatz (H <sub>2</sub> O-Zugabe ad)	25 $\mu\text{l}$

Versuchsschritt	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Dauer (min:s)
Denaturierung	94	0:30
Zyklische Amplifikation (35x)		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	64	0:30
Polymerisation	72	1:30
Finale Polymerisation	72	10:00

### 2.2.1.18 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA und RNA

Für die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA sowie deren Reinheit eignet sich die Messung ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm und die Berechnung mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Für die Messung wurde ein Spektralphotometer mit geeigneten Quarzküvetten verwendet. Die Formel lautet:

$$\text{Konzentration Nukleinsäuren } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Multiplikationsfaktor}$$

Der Multiplikationsfaktor ist für doppelsträngige DNA (dsDNA) 50 und für einzelsträngige RNA 40. Die Reinheit der Nukleinsäuren ergibt sich aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und bei 280 nm. Eine ausreichend hohe Reinheit wird bei einem Quotienten von 1,8 bis 2 erreicht. Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen.

### 2.2.1.19 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) nach der „Cycle-Sequenzierungsmethode“ (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Hierfür wurde 1  $\mu\text{g}$  der DNA in einem Eppendorfgefäß bei 37 °C für 5 Minuten im Vakuum getrocknet und versandt. Die Überprüfung der korrekten Sequenz erfolgte mittels „Alignment“-Funktion der Vector-NTI (Invitrogen) Software.

### 2.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3 Zellkultivierung

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien HeLa, THP-1, BOSC23, LNCaP, DU145, PC3 und 22RV1 erfolgte in geeigneten Kulturmedium. Je nach Zellart wurden weitere Zusätze ergänzt und abhängig vom Wachstumsverhalten wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage erneuert. Die semiadhärenten Zellen BOSC23 wurden durch wiederholtes Aspirieren mittels Elektropipette abgelöst und anschließend wurde 1/6 der Zellmenge mit frischem Medium auf eine neue Kulturplatte aufgetragen. Die adhärenen HeLa-Zellen wurden nach Waschen mit vorgewärmten PBS mittels Zugabe von 3 ml 1x Trypsin/EDTA und drei minütiger Inkubation bei 37 °C abgelöst. Die Proteolyse-Reaktion wurde durch Zugabe von Standardmedium gestoppt, wobei die darin enthaltenen Protease-Inhibitoren das Trypsin inaktivierten. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 340x g für 5 Minuten zentrifugiert, gezählt und anschließend jeweils 1-1,5 Millionen Zellen in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine Kulturplatte mit 15 cm Durchmesser aufgetragen.

#### **Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums:**

---

Standardmedium:	RPMI 1640 , 10 % (Vol.) Fötale Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
-----------------	--

---

#### 2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und unter Anfärbung mit Trypanblau (Sigma, Taufkirchen) konnten die Anzahl der Zellen sowie deren Vitalität bestimmt werden. Hierbei wurden zu 10  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Zellsuspension 10  $\mu\text{l}$  Farbstofflösung gegeben. Tote Zellen färben sich im Mikroskop dunkelblau, da sie anders als vitale Zellen den

Farbstoff aufnehmen. Aus der mittleren Zellzahl (vitale Zellen) pro Quadrat multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor konnte die Zellkonzentration nun bestimmt werden.

### 2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Die Langzeit-Aufbewahrung (< 12 Monaten) von Kulturzellen fand bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  statt. Hierfür wurden die in Kultur gehaltenen eukaryontischen Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase und bei einem Dichtewachstum von 70-80 % gezählt (siehe Abschnitt 2.2.3.1) und bei Raumtemperatur zentrifugiert (340x g für 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in Einfriermedium resuspendiert ( $1\text{ ml}/10^6$  Zellen). Das Einfriermedium bestand aus 10 % sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel und fötalem Kälberserum (*fetal calf serum* [FCS]). Aus der Zellsuspension wurden Aliquots zu je 1 ml in 2 ml Kryogefäße überführt und in einem Styroporbehälter bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Wiederauftauen geschah bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad und zügiger Verdünnung mit Normalmedium, um die Konzentration des DMSO zu verringern. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 340x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgetauten Zellen wurden in Normalmedium aufgenommen und auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert.

### 2.2.3.3 Transiente Transfektion von Zellen

Unter transienter Transfektion versteht man die temporäre Einbringung zirkulärer DNA in eukaryontische Zellen. Dank eines starken eukaryontischen Promotors kommt es im Zellkern zur Transkription der kodierenden DNA sowie zur anschließenden Prozessierung und Translation in Protein. HeLa- und BOSC23-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für die genetische Immunisierung verwendet werden sollten, transfiziert. Dies diente der Funktionsüberprüfung der Expressionsplasmide sowie dem späteren Nachweis von spezifischen Antikörpern im Immuserum und im Hybridomüberstand. Als Transfektionsreagenz für BOSC23-Zellen wurde Lipofektamin 2000<sup>TM</sup> (Invitrogene, Karlsruhe) verwendet. Für HeLa-Zellen kam FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zum Einsatz.

### **Lipofektion von HeLa-Zellen mit FuGENE 6**

Für die Transfektion wurden 7500 HeLa-Zellen pro Vertiefung auf eine 96-*well*-Zellkulturplatte in 20  $\mu\text{l}$  RPMI 1680 / 10 % FCS aufgebracht. Nach einem Inkubationstag waren die Zellen ungefähr 80 % konfluent. Die eigentliche Transfektion verlief nach folgendem Protokoll:

1. Zu 970  $\mu\text{l}$  RPMI 1680 wurden 30  $\mu\text{l}$  FuGENE und 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  oben genannter Mischung pro Vertiefung der 96-*well*-Zellkulturplatte
3. Inkubation für 48 h bei 37 °C

### **Lipofektion von BOSC23-Zellen mit Lipofectamin 2000™**

Zunächst wurden  $0,5 * 10^6$  BOSC23-Zellen pro Vertiefung in einer 6-*well*-Zellkulturplatte aufgebracht und einen Tag bei 37 °C inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 50-60 % erreicht hatten, wurde nach folgendem Protokoll transfiziert:

1. Unter Verwendung eines 5 ml Polystyrol-Reaktionsgefäßes wurden 4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 250  $\mu\text{l}$  DMEM vermischt.
2. Gleichzeitig wurden 4  $\mu\text{l}$  Lipofectamin 2000™ mit 250  $\mu\text{l}$  DMEM in einem weiteren Polystyrol-Reaktionsgefäß vermengt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert.
4. Jetzt wurden jeweils 80  $\mu\text{l}$  der Lipofectamin 2000™/DNA-Mischung langsam in die Vertiefungen der 6-*well*-Zellkulturplatte gegeben.
5. Abschließend wurden die Zellen 48 h bei 37 °C inkubiert.

Die durch Transfektion entstandenen Proteine wurden durch das integrierte Signalpeptid sowie einer carboxyterminalen Membranverankerung an der Zelloberfläche exprimiert. Dies konnte mittels geeigneten Antikörpern in einem zellbasierten ELISA nachgewiesen werden.



### 2.2.4 Genetische Immunisierung

Die genetische Immunisierung ist eine alternative zur herkömmlichen proteinbasierten Immunisierung. Die Applikation der Expressionsplasmide stimuliert das Immunsystem des Versuchstiers unter anderem aufgrund der Anwesenheit von unmethylierten CpG-Sequenzmotiven in der bakteriell erzeugten DNA zur Induktion einer humoralen Antwort gegen das plasmidkodierte Protein. Je nach Art und Ort der Applikation überwiegt die humorale oder die zelluläre Immunantwort.

#### 2.2.4.1 Immunisierung mittels *Gene gun* zur Herstellung von Antikörpern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung von Antikörpern ausschließlich das Verfahren der genetischen Immunisierung mittels *Gene gun* eingesetzt. Im Gegensatz zur intramuskulären Injektion konnte gezeigt werden, dass bei der intrakutanen, lymphknotennahen *Gene-gun*-Immunisierung die humorale und die damit gewollte Immunantwort bevorzugt aktiviert wird (Zhou et al., 2003; Morel et al., 2004).

#### 2.2.4.2 Herstellung der *Gene-gun*-Munition

Die für die genetische Immunisierung verwendete Plasmid-DNA wurde an Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  adsorbiert. Hierfür wurden 25 mg Goldpartikel sowie 200  $\mu\text{l}$  einer 50 mM Spermidinlösung in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurden 200  $\mu\text{g}$  DNA von höchstens 200  $\mu\text{l}$  Volumen zugefügt. Nach vorsichtigem Vermischen wurde 200  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben und die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension dreimal für 5 s bei 15.000 rpm in einer Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Goldpartikel in 1 ml wasserfreiem Ethanol gereinigt und in 3 ml einer PVP-Ethanol-Lösung (18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) resuspendiert. Hierdurch wurde die DNA vor Degradierung geschützt. Die mit DNA beschichteten Goldpartikel wurden in einem weiteren Schritt mit Hilfe einer entsprechenden Vorrichtung der Firma Bio-Rad gemäß Anleitung an die Innenseite eines Teflonschlauchs gebunden, mit hochreinem wasserfreiem  $\text{N}_2$  getrocknet, in 1,5 cm lange Stücke geschnitten und in einem Exsikator unter Silikagel in wasserfreier Atmosphäre aufbewahrt.

### 2.2.4.3 Immunisierung von Mäusen mittels *Gene gun*

Pro Immunisierungsdurchgang wurden fünf BALB/c-Mäuse im Alter von 10 Wochen verwendet. Die Tierhaltung fand im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München statt. Die Tierversuche wurden bei der Regierung von Oberbayern angezeigt (Aktenzeichen: 209.1/211-2531.6-12/03 vom 03.02.2004). Die Immunisierung der Mäuse mittels *Gene gun* fand unter Allgemeinanästhesie statt. Hierfür wurden den Mäuse 2  $\mu\text{l/g}$  Körpergewicht Narkotikum (0,6 ml Rompun, 0,6 ml Ketavet, 0,6 ml NaCl) intraperitoneal injiziert. Zur Enthaarung wurden an den Hinterläufen als auch in der Inguinalregion Depilationscreme aufgetragen. Die anschließende DNA-Applikation mittels *Gene gun* fand gemäß Herstellerangaben statt und wurde jeweils an den proximalen Hinterläufen als auch in den Leistenregionen also an vier Stellen verabreicht. Folgendes Immunisierungsschema wurde verwendet:

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Maßnahme</b>
Tag 0	Abnahme Präimmunserum
Tag 1	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation GM-CSF-Expressionsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
Tag 4	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation Immunisierungsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
Tag 18	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation Immunisierungsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
Tag 31	Abnahme des ersten Immunserums
Tag 32	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation Immunisierungsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
Tag 45	Abnahme des zweiten Immunserums
Tag 46	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation Immunisierungsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
...	
Tag 120	<i>Gene-gun</i> -DNA-Applikation Immunisierungsvektor (4 x 4 $\mu\text{g}$ DNA)
Tag 123	Tötung der Tiere und Abnahme Endserum Lymphknotenentnahme und Fusion der Lymphozyten mit Myelomzellen

---

Für die Gewinnung der Immunsereen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Tabelle) Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Hierfür wurde die Maus in eine Plexiglasröhre platziert, ihr Schwanz zur Vasodilatation mittels Rotlicht erwärmt und die laterale Schwanzvene mit einem Skalpell angeritzt. Das Blut wurde mit einer Eppendorfpipette (gelbe Spitze) aufgefangen, in ein *Microtainer*-Gefäß (BD Bioscience) überführt und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur für 12 min bei 340x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.2.4.4 Analyse der Immunsereen mittels zellbasiertem ELISA

Für die Kontrolle der durch genetische Immunisierung erzeugten Immunantwort wurden die Maussereen auf eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mittels zellbasiertem *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) untersucht. Dabei dienten transient mit dem so genannten *Screening*-Vektor (VV6 mit der entsprechenden zu exprimierenden cDNA) transfizierte BOSC23-Zellen, welche das entsprechende Antigen an der Oberfläche exprimierten, als Bindungsstelle für die im Serum enthaltenen Antikörper. Die Testung der Präimmunsereen sowie der Immunsereen auf irrelevant transfizierte BOSC23-Zellen dienten der Spezifitätskontrolle. Der *Screening*-Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass er, im Vergleich zum Immunisierungsvektor, andere Erkennungssequenzen (*flag tag*) sowie Signalsequenzen für die GPI-Verankerung kodiert, so dass Antikörper, die gegen entsprechende Sequenzen des Immunisierungsvektor in VV1 gerichtet sind, nicht im CELISA detektiert werden.

Im Rahmen des *cell-based* ELISA (CELISA) wurden BOSC23-Zellen 1-2 Tage vor dem geplanten Einsatz mit entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Die semiadhärenten Zellen konnten durch mehrfaches Aspirieren von den Zellkulturplatten abgelöst werden. Sie wurden anschließend mit ELISA-Puffer (PBS, 1 % BSA) gewaschen und zentrifugiert (340x g für 5 min). Es folgte die Bestimmung der Zellzahl sowie die Konzentrationseinstellung auf  $6 \times 10^6$  Zellen/ml. Der CELISA wurde wie folgt durchgeführt:

1. Inkubation einer 96-*well*-Rundbodenplatte mit ELISA-Puffer für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern
2. Entfernen des Puffers und Zugabe von  $25\text{ }\mu\text{l}$  pro *well* Detektionsantikörper und einem irrelevantem Antikörper in je drei Vertiefungen der Platte als Positiv-

bzw. Negativkontrolle. Zusätzlich wurde jeder Antikörper auf transfizierte und nicht-transfizierte Zellen getestet.

3. Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  pro *well* einer 1:100 Serenverdünnung
4. Zugabe von je 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension /*well*
5. Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln
6. Zweimaliges Waschen der Zellen durch Zugabe von je 200  $\mu\text{l}$  PBS/*well*, Zentrifugation bei 400x g für 5 min, Ausgießen und Ausschlagen des Überstandes auf mehrere Lagen Papierhandtüchern.
7. Zugabe von 50  $\mu\text{l}/\text{well}$  Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP)-gekoppelten Anti-Maus-Ig-Antikörper (1:5000 verdünnt)
8. Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln
9. Fünfmaliges Waschen der Zellen

Als Substrat für den HRP-gekoppelten Anti-Maus-Ig-Antikörper diente *Amplex-Red* Reagens (MoBiTec, Göttingen). Grundlage ist eine peroxidasevermittelte Farbreaktion in der *Amplex Red* mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin reagiert. Es folgte eine Messung der Fluoreszenz wobei zur Vermeidung von Streulicht schwarze Mikrotiterplatten verwendet wurden. Kurz vor der Messung wurde die Färbelösung bestehend aus 25  $\mu\text{l}$  einer 10 mM *Amplex-Red*-Lösung und 50  $\mu\text{l}$  einer 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in 10 ml *Amplex-Red*-Reaktionspuffer (0,25 M Na-Phosphat, pH 7,4) hergestellt. Hiervon wurden je 50  $\mu\text{l}/\text{well}$  in die CELISA-Platten übertragen und für 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Die anschließende Messung der Fluoreszenz mit einer Emission von 595 nm erfolgte im VICTOR (PackardBioSciences, Boston, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emission von 595 nm.

### 2.2.5 Immunzytologische Färbung von *Zytospins*

Für die Testung der generierten polyklonalen Antikörper wurden unter anderem *Zytospins* zur immunzytologischen Färbung angefertigt. Nach 10 minütiger Fixierung mit Aceton (Merck) folgten drei Waschgänge mit PBS. Daraufhin wurden die Zellen

mit 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 100 % Methanol/PBS für ungefähr 5 min geblockt und anschließend erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die *Zytopins* 20 min mit 10% AB-Serum in PBS (ca. 100 µl) blockiert und daraufhin 45 min mit dem Primärantikörper bzw. mit dem Immuserum unter feuchter Atmosphäre inkubiert (ca. 100 µl). Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde mit einem HRP-gekoppelten Kaninchen-Anti-Maus-Sekundärantikörper (1:100 verdünnt) 30 min inkubiert und wieder mit PBS dreimal gewaschen. Die Peroxidasefärbung (90 % Ethylaminocarbazol, 99 % Dimethylformamid, Acetat-Puffer (pH 5,2) und 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde dann für 15 min durchgeführt und die *Zytopins* mit Hilfe von Aquatex® (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Anschließend konnten die gefärbten Zellen im Durchlichtmikroskop begutachtet werden.

### 2.2.6 Immunhistologische Färbung von kryokonservierten Gewebeschnitten

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Immunhistologien wurden an kryokonservierten Prostatanormalgewebeschnitten durchgeführt. Das Vorgehen entsprach analog Abschnitt 2.2.5. Zusätzlich wurde neben der Peroxidasefärbung eine Gegenfärbung mit Hämalan (Merck, Darmstadt) für 30 s durchgeführt.



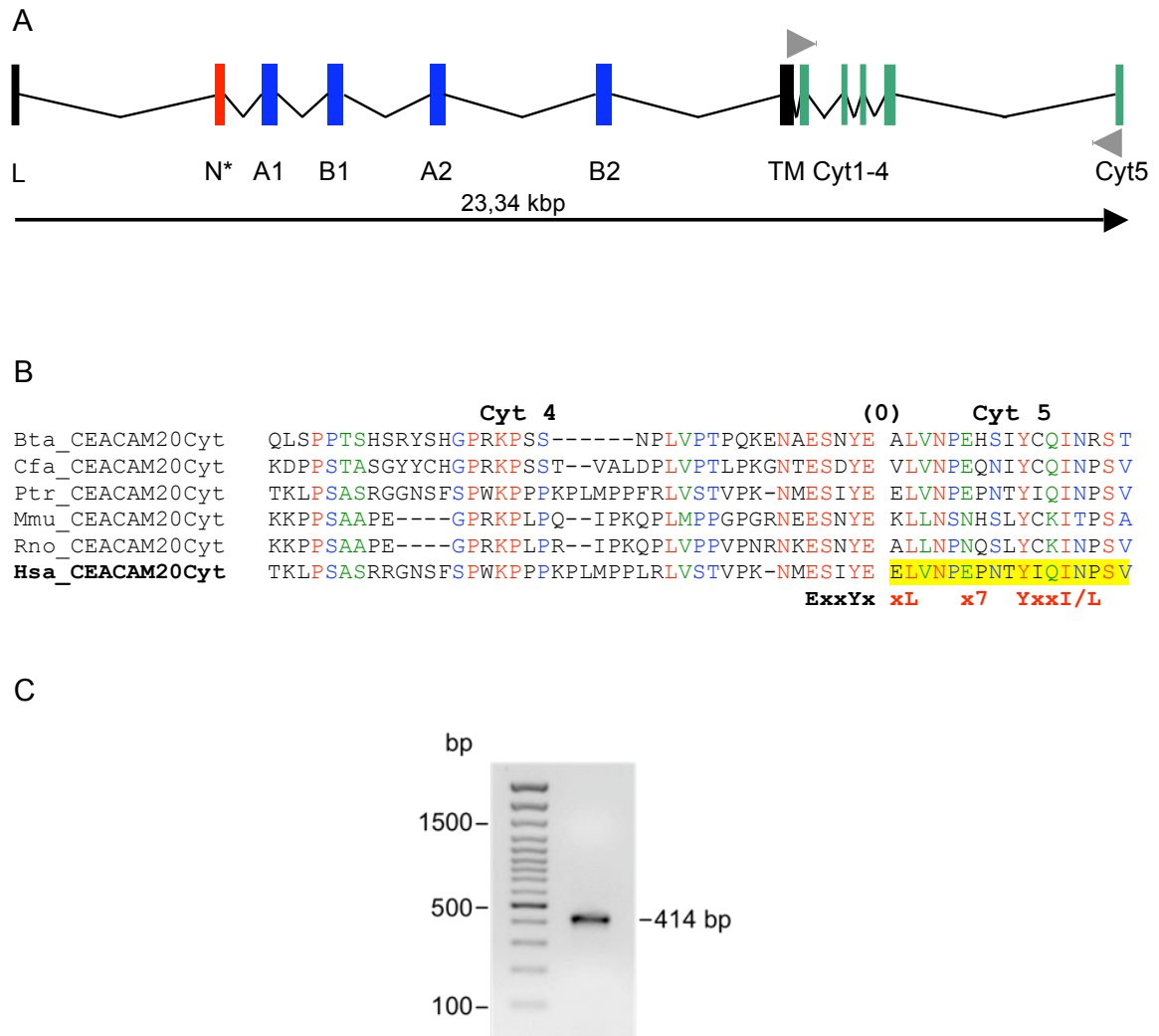
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung der humanen *CEACAM20*-Gensequenz

Als notwendige Voraussetzung für die geplanten *CEACAM20*-Analysen stand zunächst die Suche nach der korrekten Gensequenz, den zugehörigen Exon-Intron-Grenzen sowie der Genlänge im Vordergrund. Im Falle der Genvorhersage für *CEACAM20* in der Datenbank *Ensembl* musste festgestellt werden, dass der für den extrazellulären Proteinanteil kodierende Bereich des Gens sehr gut mit dem anderer Spezies (z.B. Maus, Schimpanse) korrelierte, jedoch der restliche Bereich teils große Divergenzen aufwies. Insbesondere das im letzten Exon kodierte und hoch konservierte ITAM-Motiv schien in der menschlichen Sequenz gänzlich zu fehlen. Diese unwahrscheinliche Annahme führte zur Verwerfung der für diesen Abschnitt vorhergesagten Sequenz.

Im Folgenden wurden alle drei Leseraster eines 10 kb großen Sequenzbereichs ab dem letzten als richtig akzeptierten Exon (in 3'-Richtung) in Aminosäuresequenzen übersetzt. Mittels Mustererkennungssoftware (*ScanProsite*) folgte eine Suche nach dem vermuteten ITAM-Motiv (Aminosäuresequenz: [IL]-x(6,7)-Y-x-x-[IL]). Die im zweiten Leseraster schließlich entdeckte Peptidsequenz sowie die entsprechende Nukleotidsequenz wurden auf Plausibilität geprüft und konnten mittels RT-PCR und geeigneten Oligonukleotiden als letztes kodierendes Exon bestätigt werden (siehe Abbildung 3.1). Eine Sequenzierung des RT-PCR-Produktes konnte den Beweis abschließen.

### 3 Ergebnisse

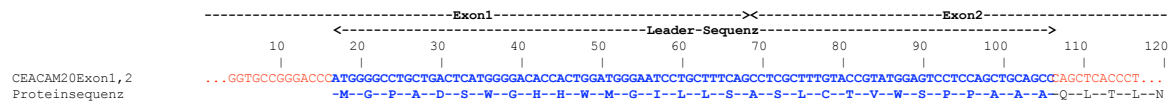


**Abbildung 3.1: Vorhergesagte CEACAM20-Exonanordnung und der von den letzten beiden Exonen kodierten Peptidsequenz in verschiedenen Spezies.** (A) Das mittels bioinformatischer Mustersuche vorhergesagte Cyt5-Exon im *CEACAM20*-Gen liegt ca. 5 kbp stromab vom zytoplasmatischen Domänenexon 4. (L, Leader; N\*, A1, B1, A2, B2, extrazelluläre Domänen; TM, Transmembranregion; Cyt1-4, intrazelluläre Exone) (B) Identifizierung von funktionell wichtigen Sequenzmotiven durch phylogenetischen Sequenzvergleich. Die Konsensussequenz eines hochkonservierten ITAM-Motivs ist unterhalb angegeben. Rot markierte Aminosäuren zeigen eine vollständige Konservierung, grün bzw. blau markierte Aminosäuren eine gute bzw. geringere Konservierung. Die gelb unterlegte Sequenz der zytoplasmatischen Domäne 5 (von Cyt 5-Exon kodiert) wurde in dieser Arbeit vorhergesagt. (Bta, *Bos taurus*; Cfa, *Canis familiaris*; Ptr, *Pan troglodytes*; Mmu, *Mus musculus*; Rno, *Rattus norvegicus*; Hsa, *Homo sapiens*) (C) Bestätigung der Vorhersage des Cyt 5-Exons in *CEACAM20* des Menschen durch RT-PCR. Oligonukleotide im Transmembran-Bereich-Exon und im bioinformatisch vorhergesagten letzten Exon (Cyt 5) von *CEACAM20* wurden zur PCR-Amplifikation von *CEACAM20*-cDNA nach RT von Gesamt-RNA aus Prostata verwendet. Die Größe des beobachteten cDNA-Fragments entspricht der Größe des erwarteten Fragments (414 bp).

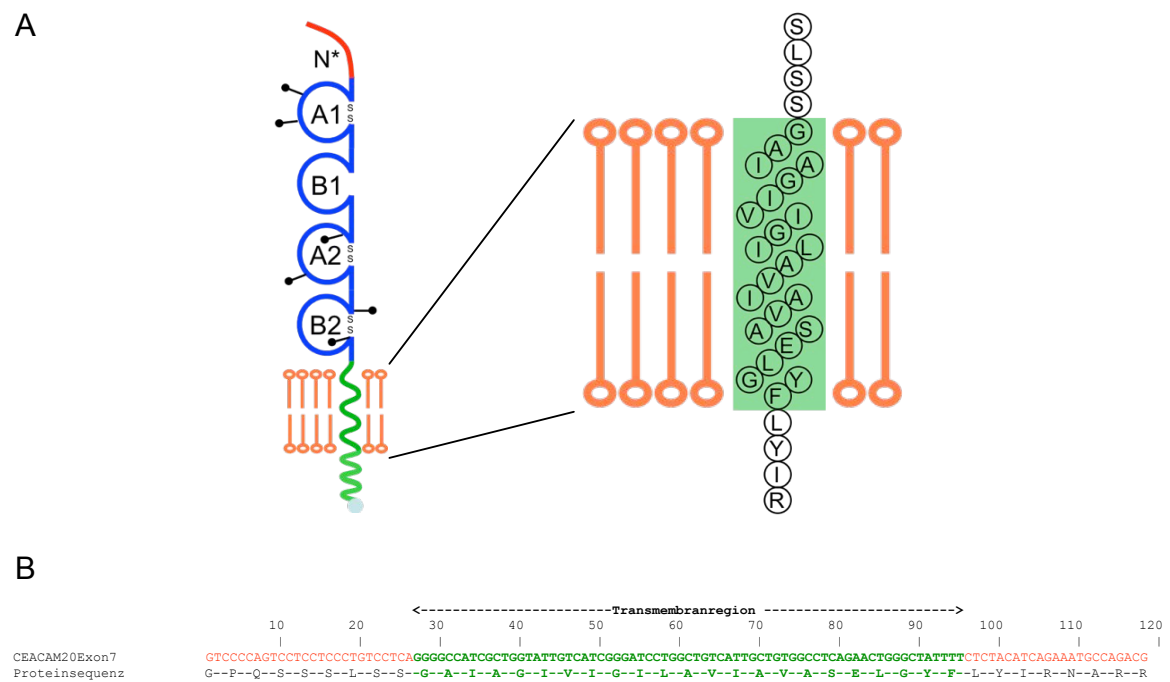


### 3.2 Bestimmung der CEACAM20-leader-Sequenz und der Transmembranregion

Für weitere Untersuchungen wurde mit geeigneter Software die *leader*-Sequenz (Abbildung 3.2) und die Transmembranregion (Abbildung 3.3) von *CEACAM20* bestimmt.



**Abbildung 3.2: Vorhersage der *leader*-Sequenz von *CEACAM20*.** Die Software SignalP konnte anhand der Primärsequenz des ersten und zweiten Exons von *CEACAM20* die Signalsequenz für die Proteintranslokation an die Zellmembran mit hoher Wahrscheinlichkeit bestimmen (*Accession number*: ENST00000316962).



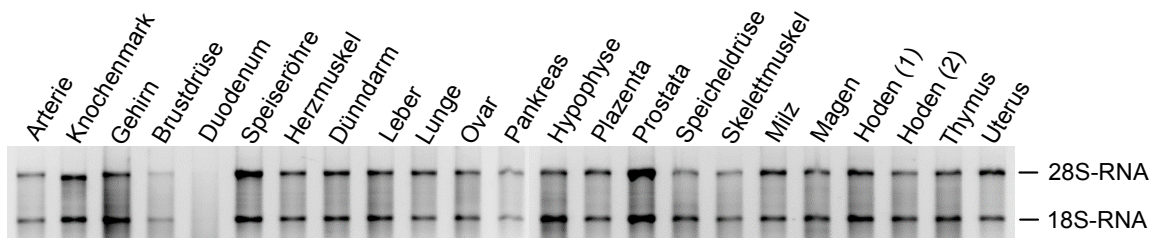
**Abbildung 3.3: Vorhersage der *CEACAM20*-Transmembranregion.** Mit Hilfe der SOSUI-Proteome-Software konnte anhand der Primärsequenz die Transmembranregion von *CEACAM20* im 7. Exon bestimmt werden (B) (*Accession number*: ENST00000316962). Die schematische Darstellung zeigt die in  $\alpha$ -Helixstruktur angeordneten größtenteils hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Phospholipiddoppelschicht (A).

### 3.3 Expressionsmusteranalyse von *CEACAM20*-mRNA in humanen Geweben und Zelllinien

#### 3.3.1 Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA

##### 3.3.1.1 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Für die Kontrolle der käuflich erworbenen humanen Gesamt-RNAs aus verschiedenen humanen Geweben wurde eine denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese gemäß Abschnitt 2.2.1.7 durchgeführt. Bei deutlicher Darstellung der zwei ribosomalen RNA (rRNA)-Spezies (18S und 28S-rRNA) wurde von einer Intaktheit der RNA ausgegangen und diese für weitere Versuche verwendet. Abbildung 3.4 zeigt einen exemplarischen Auszug der RNA-Kontrollen.

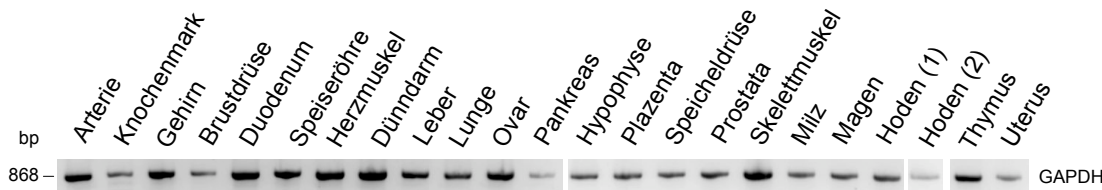


**Abbildung 3.4: RNA-Qualitätskontrolle mittels denaturierender Agarosegel-elektrophorese.** Ein Mikrogramm der Gesamt-RNA wurde nach Denaturierung elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der sichtbaren 28S- und 18S-rRNA-Spezies, die aufgrund ihrer Größe und ihres äquimolaren Vorkommens in der Zelle ein Färbestärkeverhältnis von 2:1 zeigen müssten, kann die Intaktheit der RNA abgeschätzt werden. Im dargestellten Fall konnten bei allen Proben zumindest beide Banden nachgewiesen werden. Ausnahme stellt die Duodenal-RNA-Probe dar. Diese wurde für weitere Analysen gegen eine intakte ausgetauscht.

##### 3.3.1.2 Qualitätskontrolle mittels RT-PCR Expressionsanalyse von *GAPDH*

Nach durchgeführter reversen Transkription wurde die erzeugte cDNA ebenfalls auf Intaktheit kontrolliert. Dies geschah mittels RT-PCR (gemäß Abschnitt 2.2.1.3, 2.2.1.4) und Expressionskontrolle des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) *housekeeping*-Gens. Als Enzym der Glykolyse wird *GAPDH* in allen eukaryontischen Zellen annähernd gleich stark exprimiert und seine mRNA eignet sich deswegen besonders als semiquantitatives Kontroll- und Vergleichstranskript (Barber et al., 2005). Abbildung 3.5 zeigt ein exemplarisches Versuchsergebnis. Die Effizienz der Amplifikation der *GAPDH*-cDNA variierte stark zwischen den Proben, besonders schwach viel

die Amplifikation für die Pankreasprobe aus. Dies korreliert gut mit der RNA-Analyse und könnte mit dem hohen Gehalt an RNasen des Pankreas erklärt werden, die die Isolierung intakter RNA erschweren.

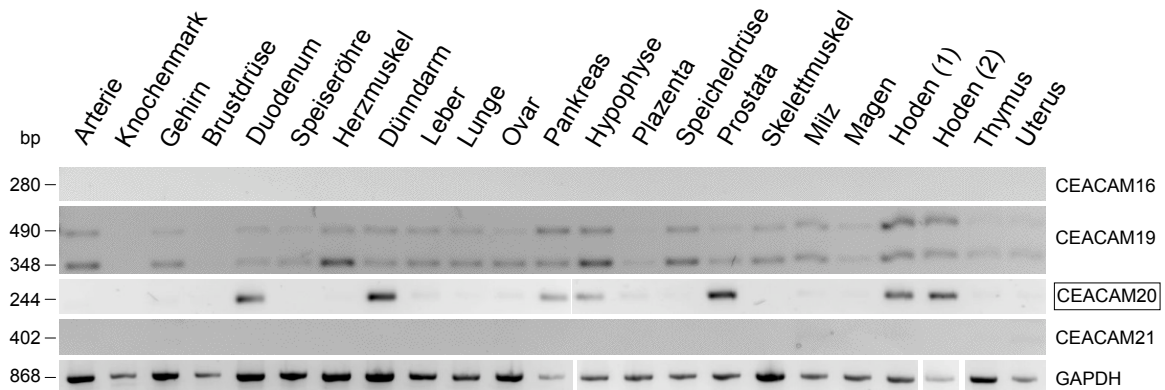


**Abbildung 3.5: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA mittels GAPDH-RT-PCR.** Mit einem Mikrogramm der jeweiligen Gesamt-RNA wurde eine reverse Transkription, und mit 1/20 des Reaktionsansatzes eine Polymerase-Kettenreaktion mit *GAPDH*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. In der Gelelektrophorese zeigten sich in allen Proben deutliche Banden in der zu erwartenden Größe (868 bp).

#### 3.3.2 Expressionsnachweis des *CEACAM20*-Transkripts mittels RT-PCR in humanen Normalgeweben

Als Korrelat für die translatierte Proteinmenge eines bestimmten Gens in einer Zelle oder in einem Gewebe kann im Allgemeinen die Menge an zugehöriger mRNA und der daraus abgeleiteten cDNA herangezogen werden. Hierfür eignet sich die Methode der RT-PCR (Abschnitt 2.2.1.3, 2.2.1.4), welche für den Expressionsnachweis von *CEACAM20* verwendet wurde. Gesamt-RNA aus unterschiedlichen humanen Normalgeweben wurden mit Hilfe von geeigneten Oligonukleotiden und angepassten Reaktionsbedingungen untersucht, um die *CEACAM20*-Expression nachzuweisen. Zum Vergleich wurden auch die Expressionsmuster weiterer neuentdeckter CEA-Genfamilienmitglieder wie *CEACAM16*, *CEACAM19* und *CEACAM21* analysiert. Allerdings erlaubt die RT-PCR nur eine semiquantitative Abschätzung der Transkriptmenge. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der CEA-Genfamilie (z.B. *CEACAM1*, *CEACAM19*), welche nahezu ubiquitär exprimiert werden, zeigte *CEACAM20* eine selektive Expression in den untersuchten Geweben. Insbesondere in Teilen des Dünndarms, Pankreas, Hypophyse, Speicheldrüse, Hoden und relativ schwach in der Prostata und Plazenta konnte eine Expression nachgewiesen werden. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ein Bereich zwischen dem zweiten Exon (kodiert für die im Vergleich zu anderen Mitgliedern der CEA-Familie stark verkürzte N\*-Domäne) und dem dritten Exon (kodiert für die A1-Domäne) amplifiziert wurde (Abbildung

3.6). In weiteren Versuchen wurden andere Regionen der cDNA-Matrize untersucht, um unterschiedliche Expressionsmuster differentieller Spleißvarianten auszuschließen bzw. zu untersuchen. Hierbei ergab sich trotz verschiedener Spleißvarianten kein signifikanter Unterschied in der Expressionsverteilung (siehe unten). *CEACAM16*- und *CEACAM21*-Transkripte konnten in keinem der Gewebe gefunden werden.

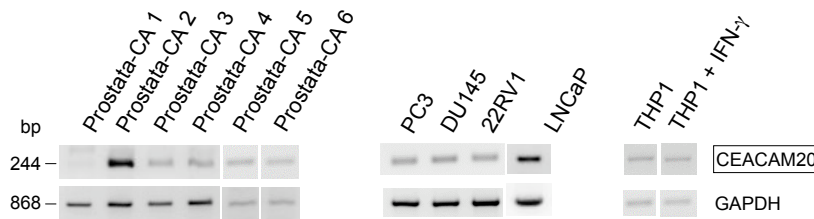


**Abbildung 3.6: Gewebe-spezifische Expression des *CEACAM20*-Gens in Normalgeweben des Menschen im Vergleich mit weiteren neuentdeckten CEA-Genfamilienmitgliedern.** Nach RT von 1  $\mu$ g der jeweiligen Gesamt-RNA wurde ein zwanzigstel des Reaktionsansatzes für die PCR-Amplifikation der cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden die Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die jeweils zu erwartende Produktgröße ist angegeben. Als Intaktheitskontrolle wurde in einem gleichgroßen Aliquot *GAPDH*-cDNA amplifiziert. Die stärkste *CEACAM20*-Expression auf mRNA-Ebene ist in Dünndarm und Prostata zu beobachten. Zum Vergleich mit anderen neu entdeckten Mitgliedern der humanen CEA-Genfamilie wurde die Expression von *CEACAM16*, *CEACAM19* und *CEACAM21* mituntersucht. Während *CEACAM16* und *CEACAM21* keine nennenswerte Expression in Normalgeweben zeigten, konnte eine nahezu ubiquitäre Expression von *CEACAM19* nachgewiesen werden. Die bei *CEACAM19* gezeigte Doppelbande ergibt sich durch eine alternative Spleißstelle (Scorilas et al., 2003).

### 3.3.3 Expressionsnachweis des *CEACAM20*-Transkripts mittels RT-PCR in humanen Tumorgeweben und Tumorzelllinien

Für die Verwendung potentieller Antigene als Zielstruktur einer gerichteten Tumorthherapie, ist eine ausreichende Expression in neoplastischem Gewebe notwendige Voraussetzung. Aus diesem Grund wurden mittels RT-PCR diverse neoplastisch veränderte Gewebe sowie Tumorzelllinien exemplarisch auf *CEACAM20*-Expression hin untersucht. Prostatagewebeproben mit pathologisch bestätigtem Karzinomanteil, wurden durch radikale Prostatektomie erhalten. Als Tumorzelllinien dienten vier kommerziell erhältliche Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, DU145, PC3 und 22RV1). Es konnten

in 5 von 6 Tumorproben und in allen Tumorzelllinien *CEACAM20*-mRNA nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden THP1-Leukämiezellen mit und ohne Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Stimulierung auf *CEACAM20*-Expression hin untersucht. In beiden Fällen konnten gleiche Mengen an *CEACAM20*-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Expression von *CEACAM20* in Prostatakarzinom-Gewebe, Prostatakarzinomzelllinien und THP1-Leukämiezellen.** Nach RT von 1  $\mu$ g der jeweiligen Gesamt-RNA wurde ein zwanzigstel des Reaktionsansatzes für die PCR-Amplifikation der cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden die Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die jeweils zu erwartende Produktgröße ist angegeben. Als Intaktheitskontrolle wurde in einem gleichgroßen Aliquot *GAPDH*-cDNA amplifiziert. Es zeigt sich eine *CEACAM20*-Expression in 5 von 6 Karzinomproben, sowie in allen Karzinomzelllinien. Ebenfalls kann *CEACAM20*-mRNA in THP1-Zellen, unabhängig der Stimulation mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

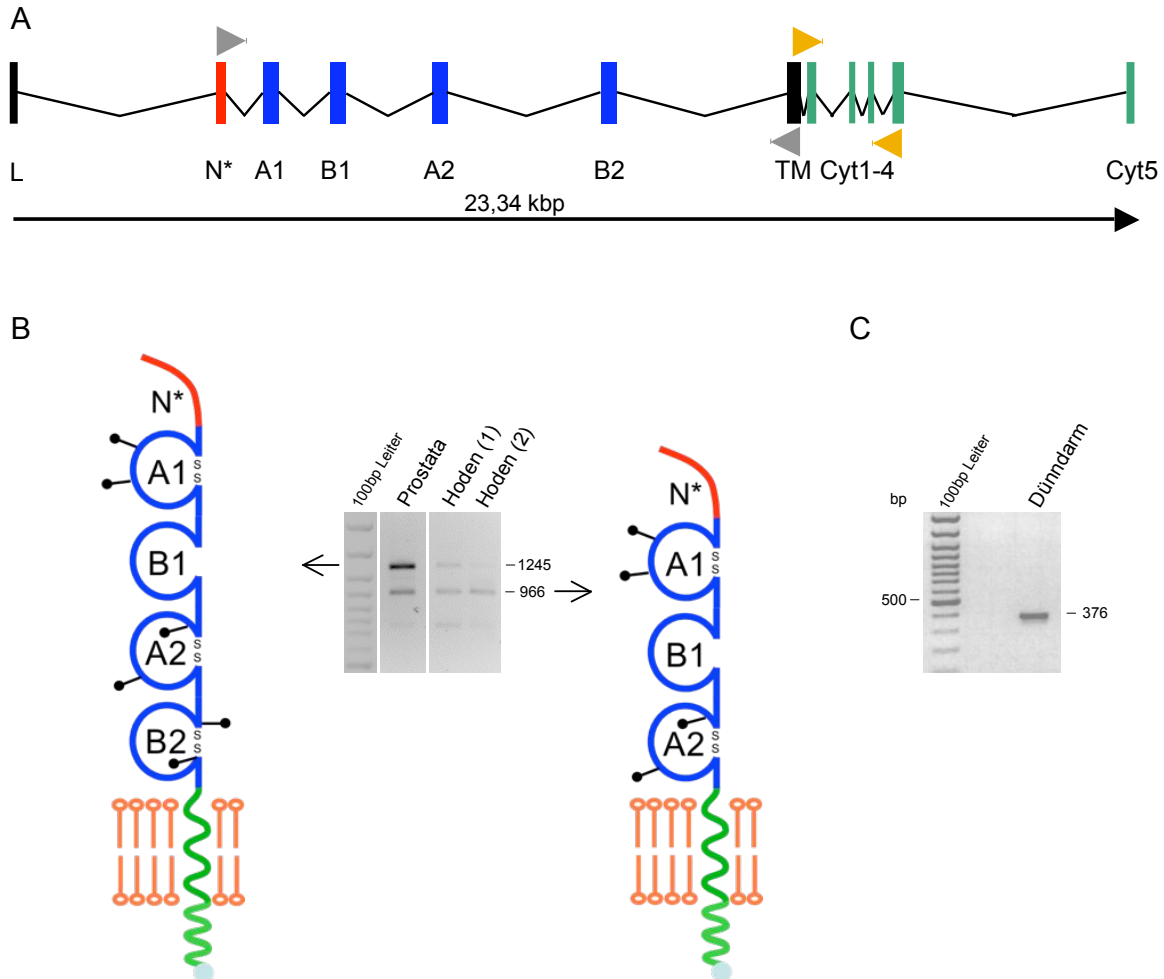
#### 3.3.4 Nachweis von differentiellem Spleißen für *CEACAM20*

Zur Erhöhung der funktionellen Vielfalt genetischer Produkte, ist in eukaryontischen Zellen das differentielle Spleißen ein häufig verwendeter Mechanismus. Je mehr Exonen ein Gen besitzt, umso mehr Variationsmöglichkeiten ergeben sich daraus. Neben der üblichen Kombinatorik können aber auch alternative Spleißstellen neue genetische Produkte erzeugen (Black, 2000). In der RT-PCR für *CEACAM20* zeigten sich bei entfernt gewählten Oligonukleotiden (N\*-Domäne und TM-Domäne) unterschiedliche Bandenmuster in diversen Geweben. Während in den meisten Geweben *CEACAM20*-Transkripte mit voller Länge dominierten (wie z.B. in Prostata), waren in Hoden um ca. 250 bp kleinere PCR-Produkte vorherrschend (Abbildung 3.8). Mittels DNA-Sequenzierung des aus dem Gel isolierten PCR-Produkts konnte gezeigt werden, dass in diesem *CEACAM20*-cDNA-Fragment das für die B2-Domäne-kodierende Exon nicht enthalten war.

Zum Nachweis möglicher intrazellulärer Spleißvarianten wurde eine RT-PCR mit Dünndarm-cDNA und Oligonukleotiden, die im vierten zytoplasmatischen Exon und

in der Transembranregion lokalisiert waren, durchgeführt. Die stärkste Expression zeigte das Produkt mit voller Länge. Daneben fiel eine deutlich geringere Expression eines um wenige Nukleotide kleineren Produktes auf. Spätere Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um eine Spleißvariante ohne des dritten zytoplasmatischen Exons handeln könnte (*CEACAM20 $\Delta$ Cyt3*)(Paptistella, 2009).

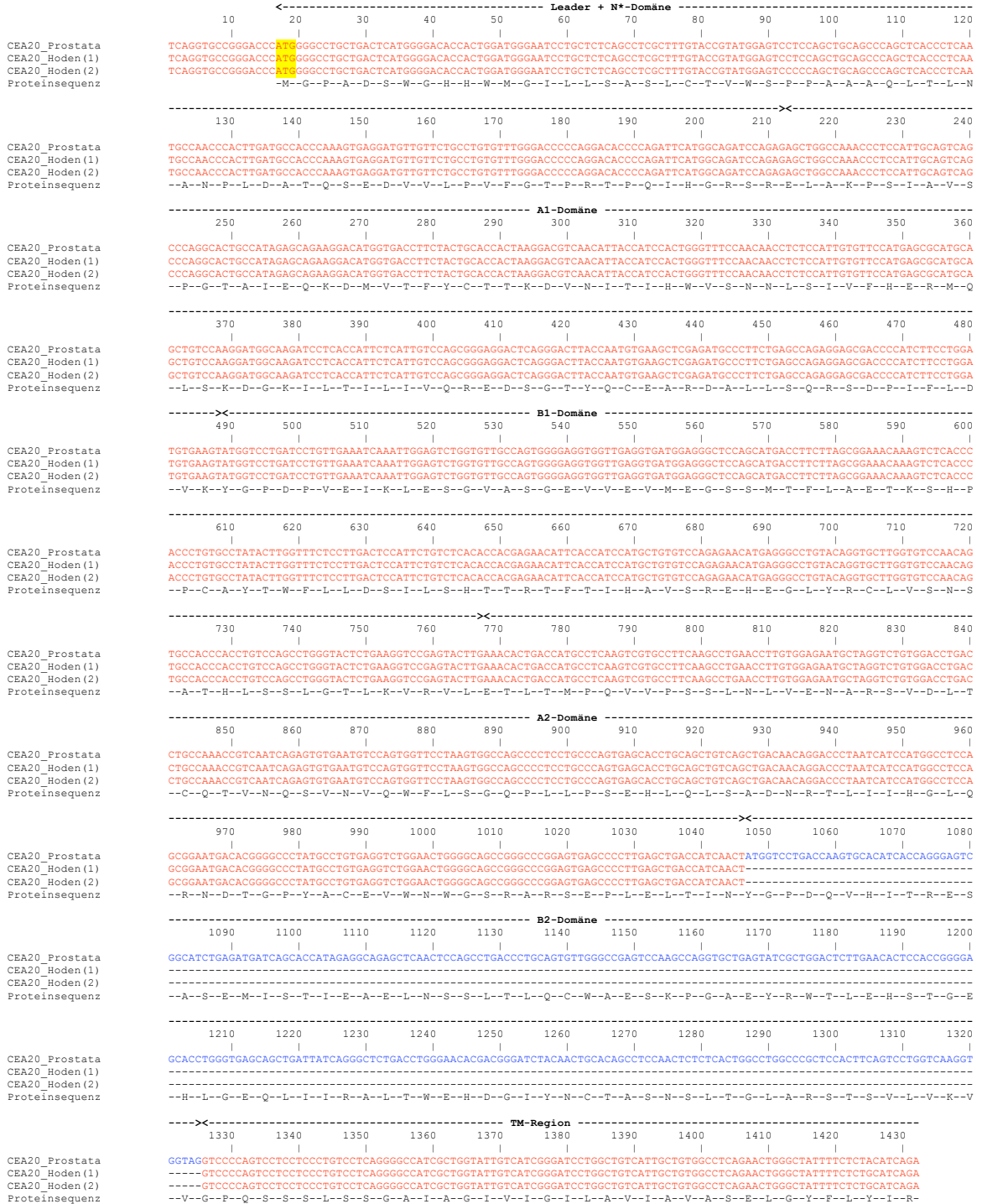
### 3.3 Expressionsmusteranalyse von *CEACAM20*-mRNA



**Abbildung 3.8: Differenzielles Spleißen des *CEACAM20*-Primärtranskripts.** (A,B) Die durch graue Pfeile schematisch dargestellten Oligonukleotide und deren Lokalisation (Erläuterung siehe Abbildung 3.1) ergaben in der RT-PCR mit Prostata- und Hoden-cDNA unterschiedliche Bandenmuster. Die Gelelektrophorese zeigt, dass in Hodengewebe ein kleineres *CEACAM20*-cDNA-Amplifikationsprodukt als in Prostata-Gewebe dominierend ist. (D, nächste Seite) Eine durchgeführte Sequenzierung der PCR-Produkte mit einer Größe von 1245 und 966 bp zeigte, dass in dieser *CEACAM20*-cDNA das B2-Exon nicht eingespleißt wurde (vergleiche die schematisch dargestellten Domänenanordnungen). In beiden Hoden-Geweben stellt die B2-deletierte Spleißvariante die dominierende *CEACAM20*-mRNA dar. (A,C) Für den Nachweis zytoplasmatischer Spleißvarianten wurde eine RT-PCR mit Dünndarm-cDNA durchgeführt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind durch orange Pfeile schematisch dargestellt. Die erwartete Produktgröße liegt bei 376 bp und entspricht wahrscheinlich der stärksten Bande. Bei genauer Betrachtung zeigt sich eine deutlich schwächere Bande geringerer Größe.

### 3 Ergebnisse

D





## 3.4 Nachweis des *CEACAM20*-Proteins

### 3.4.1 Klonierung der extrazellulären *CEACAM20*-Domänen

Basierend auf der Vorhersage einer membrangebundenen Expression des *CEACAM20*-Moleküls mit extra- und intrazellulären Proteinanteil bot es sich an, den extrazellulären Proteinanteil als Antigen für die genetische Immunisierung zu verwenden. Mittels RT-PCR und den geeigneten Oligonukleotiden wurde die kodierende DNA-Sequenz amplifiziert und anschließend in den Immunisierungsvektor VV1 und in den *Screening*-Vektor VV6 kloniert. Die gewählten Plasmide enthielten bereits NH<sub>2</sub> (N)-terminal eine Signalsequenz für extrazelluläre Proteine, ein myc-Epitop sowie COOH (C)-terminal eine Signalsequenz für eine GPI-Verankerung (Abbildung 3.9). Die Oligonukleotide wurden mit Überhängen versehen und das Raster so gewählt, dass zum einen die zur Klonierung notwendigen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen endständig vorhanden waren zum anderen eine Leserasterverschiebung im Bezug auf die Signalsequenzen vermieden wurde. Der so konstruierte Immunisierungsvektor VV1-*CEACAM20* diente im Weiteren dazu, das Fusionsprotein während der genetischen Immunisierung zu bilden.

Parallel wurde für die spätere Anti-*CEACAM20*-Antikörperidentifizierung ein Expressionsplasmid für ein zweites Fusionsprotein mit flag-Epitop konstruiert, welches vermeiden sollte, Antikörper gegen so genannte Übergangsepitope zu detektieren, die möglicherweise über die eingeführten Restriktionsendonukleaseschnittstellen entstanden sind. Um die Einführung von Mutationen in den kodierenden Bereich der *CEACAM20*-cDNA zu minimieren, wurde zur PCR-Amplifikation eine hitzestabile *High-fidelity*-Polymerase mit Falscheinbaukorrekturfunktion verwendet.

Zur Selektion der korrekten Klone wurde eine Kolonie-PCR (gemäß Abschnitt 2.2.1.17) durchgeführt und anschließend mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Alle Klone mit einem PCR-Produkt der richtigen Größe wurden in Nährmedium angezchtet und deren Plasmide nach Vektorpräparation sequenziert. Daraufhin wurde der Klon (CEA20\_K3, Abbildung 3.10) ausgewählt, der die geringste Fehlerrate in Bezug auf die Nukleotidsequenz aufwies und somit die korrekte Proteinprimärstruktur am ehesten sicherstellte. Trotz der zweifachen Aminosäuremutation konnte aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Serin und Threonin von einer unwesentlichen Änderung der Proteinstruktur ausgegangen werden.

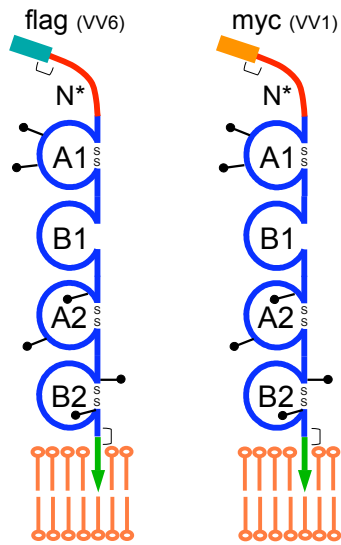
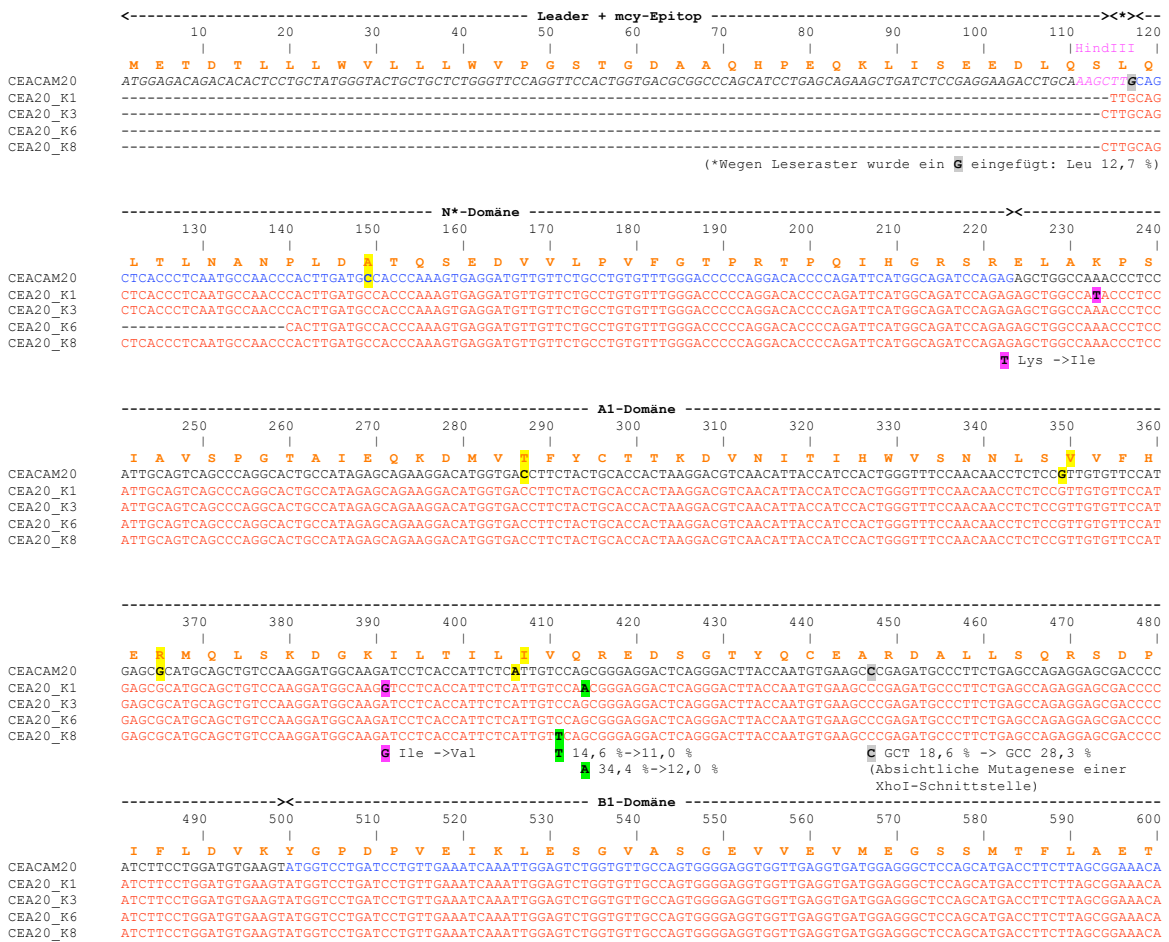


Abbildung 3.9: Konstruierte Fusionsproteine zur genetischen Immunisierung bzw. zur Detektion *CEACAM20*-spezifischer Antikörper. Alle originären extrazellulären Domänen des humanen *CEACAM20* mit flankierenden GPI-Anker und myc(VV1-Vektor)- bzw. flag(VV6-Vektor)-Epitop. Eckige Klammern markieren die durch Fusion entstandenen Übergangsepitope.



### 3.4 Nachweis des CEACAM20-Proteins

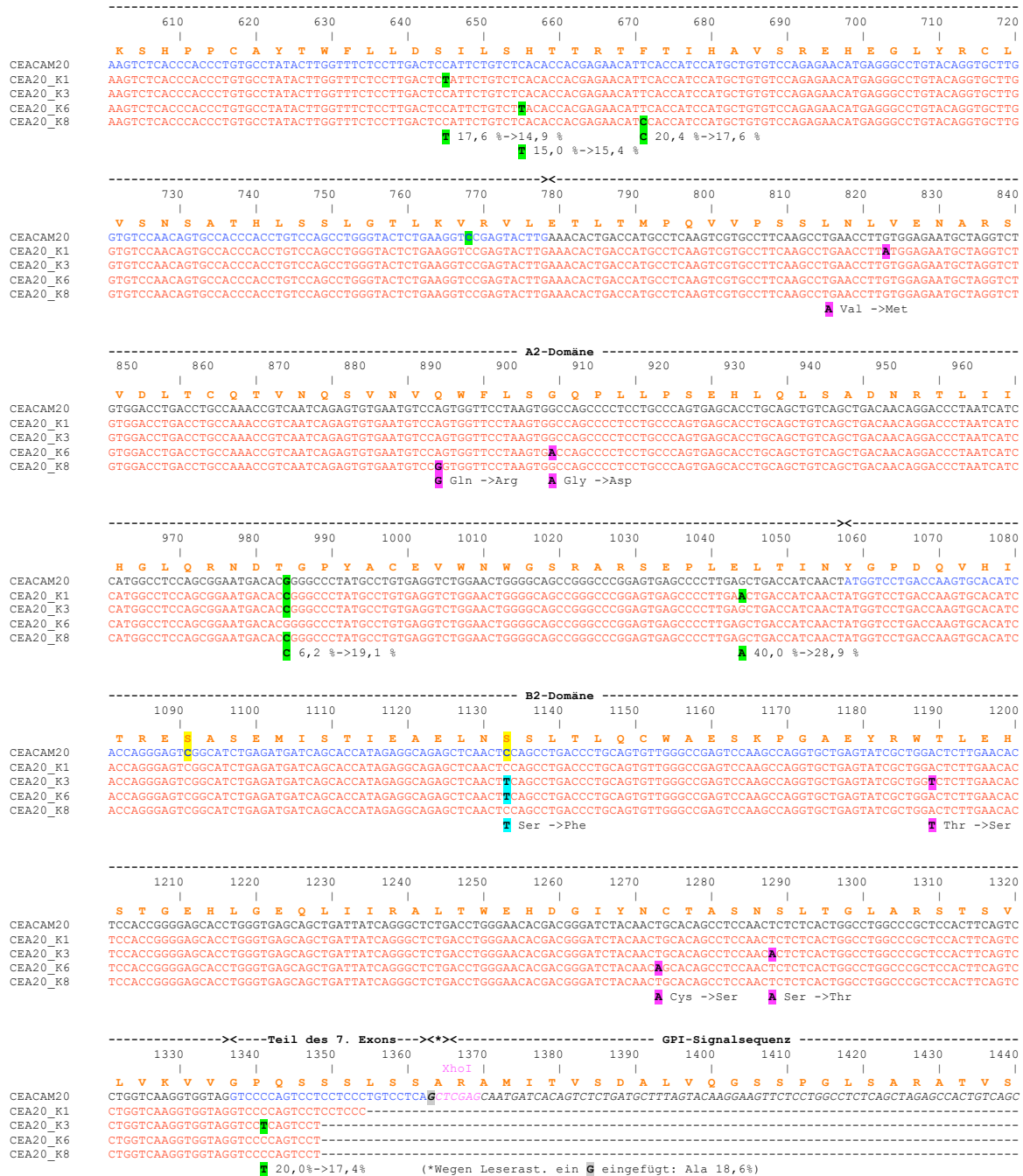
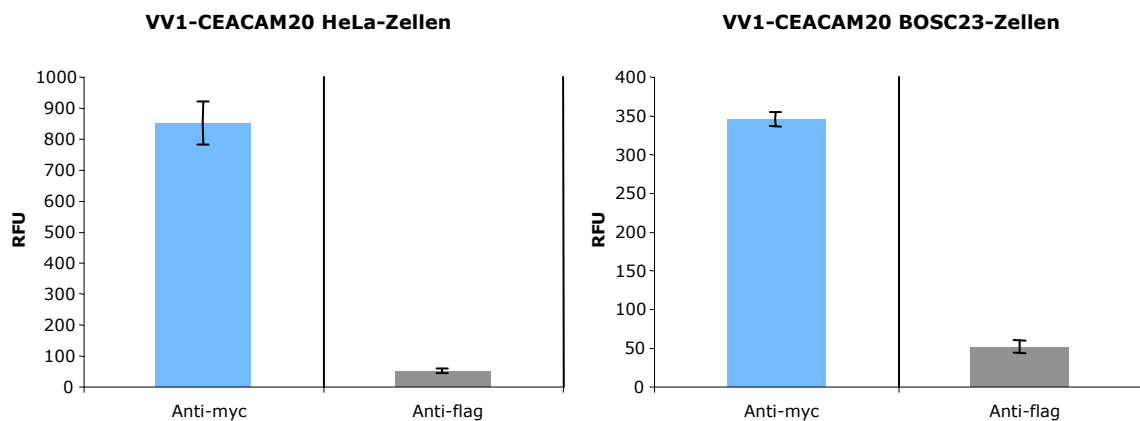


Abbildung 3.10: Sequenzvergleich verschiedener VV1-CEACAM20-Klone mit der CEACAM20-Datenbanksequenz (Accession number: ENST00000316962). Die Sequenzierung wurde mit 1 µg des jeweiligen Klon-Plasmids und Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (GVfor, GVrev) durchgeführt. Gelb/Blau: Bekanntes SNP (single-nucleotide polymorphism, gelb) mit (blau) oder ohne Aminosäurenaustausch in den Klonen; Lila: Mutation mit Aminosäurenaustausch; Grün: Mutation ohne Aminosäurenaustausch; Grau: Leserasterbedingte Baseneinfügung; Prozentangaben zeigen jeweils die Veränderung in der Codon-Häufigkeit im Menschen.

### 3.4.2 Expressionstestung der *CEACAM20*-Immunisierungs- und *Screening*-Konstrukte

Nach erfolgter Klonierung der *CEACAM20*-Immunisierungs- und *Screening*-Konstrukte wurden HeLa-Zellen transient mit den ausgewählten Plasmiden transfiziert und auf Expression des Fusionsproteins hin untersucht. Hierfür wurde ein CELISA mit geeigneten Antikörpern (Anti-myc, Anti-flag) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das erstellte Konstrukt in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist und mittels Antikörper detektiert werden kann (Abbildung 3.11). Dies war wichtige Voraussetzung für die weitere genetische Immunisierung. Analog hierzu wurde auch die Exprimierbarkeit mit BOSC23-Zellen untersucht.

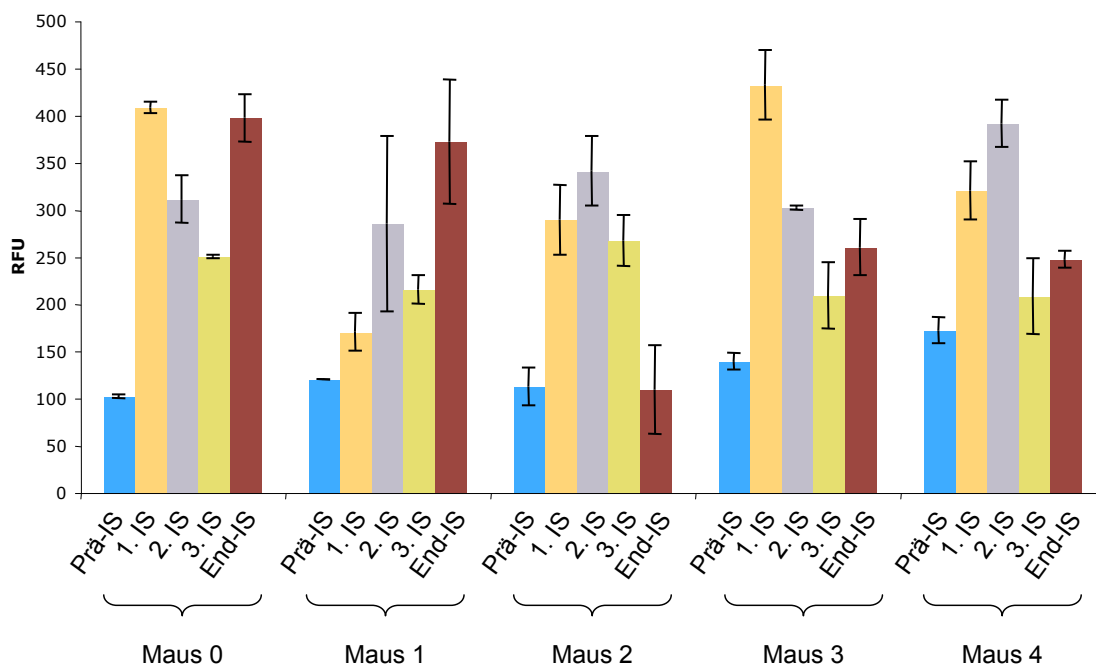


**Abbildung 3.11: Expressionstestung des VV1-*CEACAM20*-Konstrukts an transient transfizierten HeLa- und BOSC23-Zellen mittels CELISA.** HeLa- und BOSC23-Zellen wurden mit dem VV1-*CEACAM20*-Vektor, welcher das myc-Peptid kodiert, transient transfiziert. Die Expression wurde mit dem Anti-myc-Antikörper (Anti-myc) überprüft, der unter Zugabe eines HRP-Sekundäntikörpers und eines Peroxidase-reaktiven Fluorochroms im CELISA nachgewiesen werden kann. Als Negativkontrolle diente der Anti-flag-Antikörper (Anti-flag). Die Mittelwerte/Standardabweichungen wurden jeweils aus vier Messwerten bestimmt.

### 3.4.3 Genetische Immunisierung und Bestimmung der Immunisierungseffizienz

Die nach 31, 49 und 77 Tagen gewonnenen Immunsereen sowie das Endserum wurden zur Verlaufskontrolle einer spezifischen Immunreaktion in den Mäusen untersucht. Hierfür wurden sowohl das Präimmenserum (Serum vor der ersten Immunisierung)

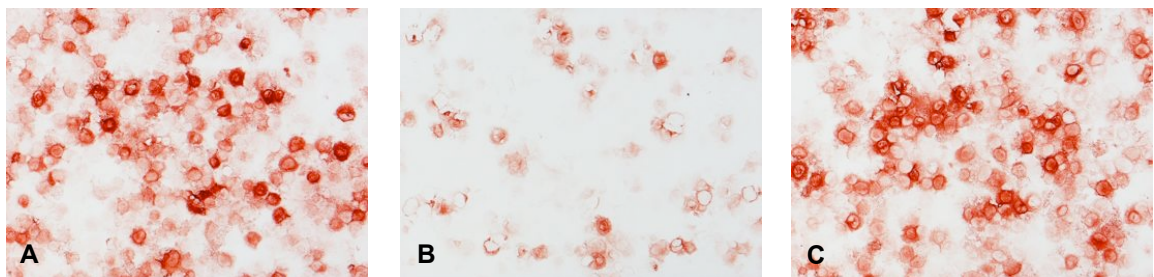
als auch die jeweiligen Immunsereen in einem CELISA getestet. BOSC23-Zellen wurden dafür mit dem flag-*CEACAM20*-Konstrukt transient transfiziert und mit den Immunsereen inkubiert. Durch die Wahl eines unterschiedlichen *Screening*-Epitops (flag statt myc) konnte sowohl eine Expressionskontrolle in den BOSC23-Zellen durchgeführt, als auch falsch positive Immunisierungsergebnisse durch myc-Antikörper oder Übergangsepitopantikörper vermieden werden. Es zeigte sich bereits nach der ersten genetischen Immunisierung eine deutliche Immunreaktion in allen Mäusen. Weitere Immunisierungsschritte, die im Abstand von 14 Tagen durchgeführt wurden, konnten die Antikörperproduktion noch gering steigern (Abbildung 3.12). Dies ist zum einen durch einen höheren Antikörpertiter als auch durch selektivere Bindungseigenschaften der gereiften Antikörper zu erklären. Nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und polyklonale Endseren gewonnen.



**Abbildung 3.12: Bestimmung der Immunisierungseffizienz durch Vergleich der Immunsereen mit dem Präimmunserum im CELISA.** Es wurden im CELISA transient mit *Screening*-Vektor (VV6) transfizierte BOSC23-Zellen mit allen Immunsereen inklusive Prä- und Endimmunserum getestet. In allen fünf Mäusen konnte eine deutliche Antikörperbildung bereits nach der ersten durchgeführten genetischen Immunisierung festgestellt werden. Alle weiteren Immunisierungen konnten die Antikörperbildung nur noch gering steigern. Die Mittelwerte/Standardabweichungen wurden aus jeweils zwei bis vier Messwerten gebildet

#### 3.4.4 Immunologischer Proteinnachweis mittels *Zytospins*

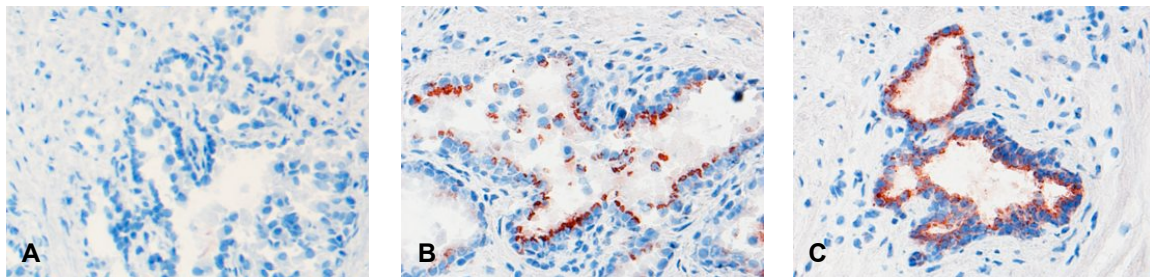
Zur weiteren Spezifizierung des durch genetische Immunisierung gewonnenen Immunserums wurden transient transfizierte HeLa-Zellen immunzytologisch gefärbt. Als Expressionsvektor wurde das mit flag-Epitop versehene VV6-*CEACAM20*-Plasmid verwendet, um eine Erkennung durch generierte Anti-myc-Antikörper oder Übergangsepitopantikörper zu vermeiden. Es zeigte sich eine der Positivkontrolle (Anti-flag-Antikörper) gleichwertigen Färbereaktion an den Zelloberflächen, so dass von einer spezifischen Erkennung durch *CEACAM20*-Antikörper ausgegangen werden konnte (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: Immunzytologische Färbung von transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem VV6-*CEACAM20*-Expressionsvektor.** Immungefärbte *Zytospins* von transient transfizierten HeLa-Zellen dienen als Spezifitätskontrolle des polyklonalen Immunendserums. Als Positivkontrolle wurde ein Anti-flag-Antikörper (A)(1:80) verwendet, als Negativkontrolle diente das Präimmunserum (B)(Verdünnung 1:100; Maus #3). Der spezifische Proteinnachweis von *CEACAM20* gelang durch Inkubation der *Zytospins* mit dem polyklonalen Anti-*CEACAM20*-Immunendserum (C) (Verdünnung 1:100; Maus #3).

### 3.4.5 Immunologischer *CEACAM20*-Proteinnachweis in humanen Prostatagewebe

Die durch RNA-Analyse vorhergesagte Expression von *CEACAM20* in Prostatanormalgewebe konnte nun mit Hilfe der erzeugten polyklonalen Immunsereen mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt werden. Hierfür wurden kryokonservierte histologische Schnitte von Prostatagewebe angefertigt und mit dem Immunendserum inkubiert. Ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper diente über eine Farbstoffreaktion der Anfärbung. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop zeigte sich eine spezifische Färbung der apikalen Drüsenregion des Prostatagewebes, die einer luminalen Anordnung des *CEACAM20*-Proteins entspricht (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14: Immunhistologischer *CEACAM20*-Proteinnachweis in humanen Prostatagewebe**

Mit Hilfe des Anti-*CEACAM20*-Immunendserums (Verdünnung 1:100; Maus #1) konnten Regionen des apikalen Prostatadrüsenepithels spezifisch gefärbt werden. Es handelte sich hierbei um kryokonserviertes Normalgewebe der Prostata (B, C). Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum (A)(Verdünnung 1:100; Maus #1)





## 4 Diskussion

### 4.1 Selektive Expression von *CEACAM20*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass die *CEACAM20*-Expression, ähnlich wie in der Maus, auf wenige Gewebe im Menschen beschränkt ist. Im Gegensatz zu ubiquitär exprimierten Mitgliedern der CEA-Genfamilie wie *CEACAM1* oder *CEACAM19* wird *CEACAM20* bevorzugt in Dünndarm, Prostata, Hoden und geringer in wenigen anderen Drüsen exprimiert. Diese Art der selektiven Expression kann sowohl funktionelle als auch ontogenetische Ursachen haben und spezifische Eigenschaften der Gewebezellpopulation widerspiegeln. Die Ergebnisse zeigen, dass andere, ebenfalls neuentdeckte Mitglieder keine oder nur eine sehr geringe Expression in humanen Normalgeweben aufweisen. Auf mRNA-Ebene konnten sowohl *CEACAM16* als auch *CEACAM21* in den getesteten Geweben nicht nachgewiesen werden, wobei *CEACAM16* auch in der Maus nicht nachweisbar war (Zebhauser et al., 2005). Weiterführende Untersuchungen in unserem Labor konnten jedoch zeigen, dass das humane *CEACAM16* im Bereich der *Stria vascularis* des Innenohrs exprimiert ist (Zimmermann, Krupar, Sunami, Kamp, Eisenried, unveröffentlicht). Ein derartig eingeschränktes Expressionsmuster könnte für eine organspezifische Funktion des vermutlich löslichen *CEACAM16*-Proteins sprechen.

Neben gesunden Geweben konnte *CEACAM20*-mRNA auch in Prostatamalignomen und Prostatakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. In den untersuchten Geweben konnte jedoch nicht differenziert werden, in welchen Zelltypen die Gentranskripte auftraten. Im Falle des Prostatakarzinoms kommen neben den Karzinomzellen sowohl Epithel-, Endothel- als auch Mesenchymzellen in Frage. Zur Klärung dieses Sachverhaltes ist die Immunhistologie und die RNA-*in-situ*-Hybridisierung der RT-PCR überlegen. Ebenso könnte mittels *Real-time*-PCR eine genauere Aussage in Bezug auf die Quantität der Transkripte getroffen werden. Eine Veränderung der Transkriptmenge in Malignomen kann beispielsweise ein deutlicher Hinweis auf eine pathogenetische Funktion von *CEACAM20* sein. Eine semiquantitative Analyse der *CEACAM20*-

mRNA nach RT-PCR durch DNA-Gelelektrophoresen konnte bisher jedoch keine Steigerung der Transkriptmenge gegenüber Normalgeweben feststellen. Im Allgemeinen kann von geringen Transkriptmengen und den daraus resultierenden geringen Proteinmengen von *CEACAM20* ausgegangen werden, da ein Expressionsnachweis nur bei Steigerung der Amplifikationsfrequenz in der RT-PCR erreicht wurde.

Als nächster Schritt wurde die zelluläre und histologische Proteinexpression von *CEACAM20* mittels durch genetische Immunisierung erzeugten Antikörper untersucht. In den getesteten kryokonservierten Prostatageweben konnte gezeigt werden, dass *CEACAM20* vorwiegend auf der apikalen Seite des Drüsenepithels exprimiert wird. Neuere Untersuchungen mit Paraffinschnitten der Prostata und des Dünndarms konnten diese Ergebnisse bestätigen (Papistella, 2009). In zukünftigen Untersuchungen wäre es interessant zu klären, ob in Prostatakarzinomen *CEACAM20* aufgrund des Verlusts der zellulären Polarisation an allen Zellseiten exprimiert ist. Ausserdem wäre zur Beurteilung der immunhistologisch angefärbten Strukturen wichtig, die Spezifität der verwendeten Antikörper mittels *Western-blot*-Analysen an Prostatagewebeextrakten zu überprüfen.

### 4.2 Funktionelle Vielfalt durch differentielles Spleißen?

Als weit verbreitetes Phänomen größerer Intron- und Exon-reicher Gene kann auch bei Mitgliedern der CEA-Familie differentielles Spleißen beobachtet werden. Sowohl intra- als auch extrazelluläre Bereiche der jeweiligen Proteine sind hiervon betroffen (Barnett et al., 1989; Nagel et al., 1993). Im Falle von *CEACAM1* konnten 7 verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher extrazellulärer Domänenstruktur nachgewiesen werden (Hammarstrom, 1999). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die IgV-ähnliche Domäne in keiner Spleißvariante verloren ging. Ursache dafür kann die Wichtigkeit der N-Domänen für die homophile und heterophile Adhäsionsfähigkeit sein (Sippel et al., 1996; Öbrink, 1997). Da *CEACAM20* je nach Spezies eine unterschiedlich gekürzte N-Domäne besitzt, ist die Frage noch ungeklärt, ob *CEACAM20* überhaupt zur Adhäsion fähig ist (sie ist in Säugern mit Plazenta nur 18-36 Aminosäure lang, im Opossum dagegen, wie in anderen CEA-Familienmitgliedern 108 Aminosäuren lang; Kammerer und Zimmermann, unveröffentlicht).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt gezeigt, dass in Hodengewebe, neben der vollständigen Proteinvariante von *CEACAM20*, insbesondere eine um eine extrazellu-

läre Domäne verkürzte Variante exprimiert wird. In allen anderen getesteten Geweben konnte dies nicht gezeigt werden. Sequenzanalysen ergaben, dass in beiden untersuchten Proben die kodierende Sequenzregion der B2-Domäne im *CEACAM20*-Transkript fehlte (*CEACAM20 $\Delta$ B2*). Im Allgemeinen dient Spleißen der Steigerung der funktionellen und der strukturellen Proteinvialfalt (Black, 2000). Im konkreten Fall könnte die strukturelle Veränderung beispielsweise zu einem Wegfall oder Modifikation einer möglichen Rezeptorfunktion von *CEACAM20* im Hoden führen. Zur weiteren Untersuchung der möglichen Bedeutung des in Hoden beobachteten differentiellen Spleißens, müssten zunächst die *CEACAM20* exprimierenden Zellen mittels Immunhistologie identifiziert werden.

Interessanterweise ergaben Recherchen in Transkriptdatenbanken wie *NCBI Geo Profiles*, dass die murine *CEACAM20* in Oozyten und besonders stark in der befruchteten Eizelle (Zygote) exprimiert wird. Im Laufe weiterer Zellteilungen nehmen die *CEACAM20*-Transkripte wieder ab und sind im 8-Zellstadium kaum mehr nachzuweisen. Dies spricht dafür, dass *CEACAM20* eine so genannte maternale RNA darstellt, das heißt, sie wird nicht vom Genom des sich entwickelnden Embryos abgelesen, sondern wird von der mütterlichen Eizelle dem sich entwickelnden Embryo zur Verfügung gestellt. Zum jetzigen Wissensstand ist die funktionelle Bedeutung noch völlig unklar. Es findet sich in der Maus ein Nager-spezifisches Mitglied der CEA-Familie, das ausschließlich in Hoden und Nebenhoden exprimiert ist. Da heterophile Interaktion zwischen Mitgliedern der CEA-Familie weit verbreitet ist, ist es denkbar, dass *CEACAM17* auf Spermien und *CEACAM20* auf der Eizelle interagieren und somit an der Befruchtung beteiligt sind. Interessanterweise spielt ein weiteres Mitglied der murinen CEA-Familie (*PSG17*) bei der Befruchtung eine Rolle, das als Ligand für das Oozyten-Membranprotein CD9 fungiert. CD9 ist essentiell für die Fusion des Eies mit dem Spermium (Waterhouse et al., 2002; Ellerman et al., 2003).

Neben den extrazellulären Spleißvarianten konnten auch intrazelluläre Varianten gefunden werden. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass es sich hierbei um eine Spleißvariante ohne des dritten intrazellulären Exons handeln könnte (Papistella, 2009). Interessant ist die Tatsache, dass das ITAM-Motiv von *CEACAM20* auf zwei Exone (Cyt4 und Cyt5) verteilt ist. Durch Wegfall des vierten zytoplasmatischen Exons (Cyt 4) würde das "nachgerückte" dritte Exon (Cyt 3) die fehlenden Aminosäuren des ITAM-Motivs ergänzen und somit die Funktion sicherstellen. Falls sowohl das dritte als auch das vierte Exon verloren gingen, wäre die ITAM-Konsensussequenz nicht mehr voll-

ständig und ein Funktionsverlust wäre die Folge. Ähnliches konnte bereits anhand der kurzen Spleißvariante von *CEACAM1* beobachtet werden, bei der durch Verlust des intrazellulären ITIM-Motivs eine Steigerung der Proliferation beobachtet wurde (Singer et al., 2000). Durch Transfektion *CEACAM20*-negativer Zellen mit unterschiedlichen künstlich generierten Spleißvarianten von *CEACAM20* (*CEACAM20* $\Delta$ *Cyt3*, *CEACAM20* $\Delta$ *Cyt4*, *CEACAM20* $\Delta$ *Cyt3* $\Delta$ *Cyt4*) und darauf aufbauenden Wachstumsuntersuchungen könnte die Einflussnahme der verschiedenen Spleißvarianten und Tyrosinkonstellationen des ITAM-Motivs auf die Proliferation bestimmt werden.

### 4.3 Konserviertes ITAM-Motiv als funktionelles Element in *CEACAM20*

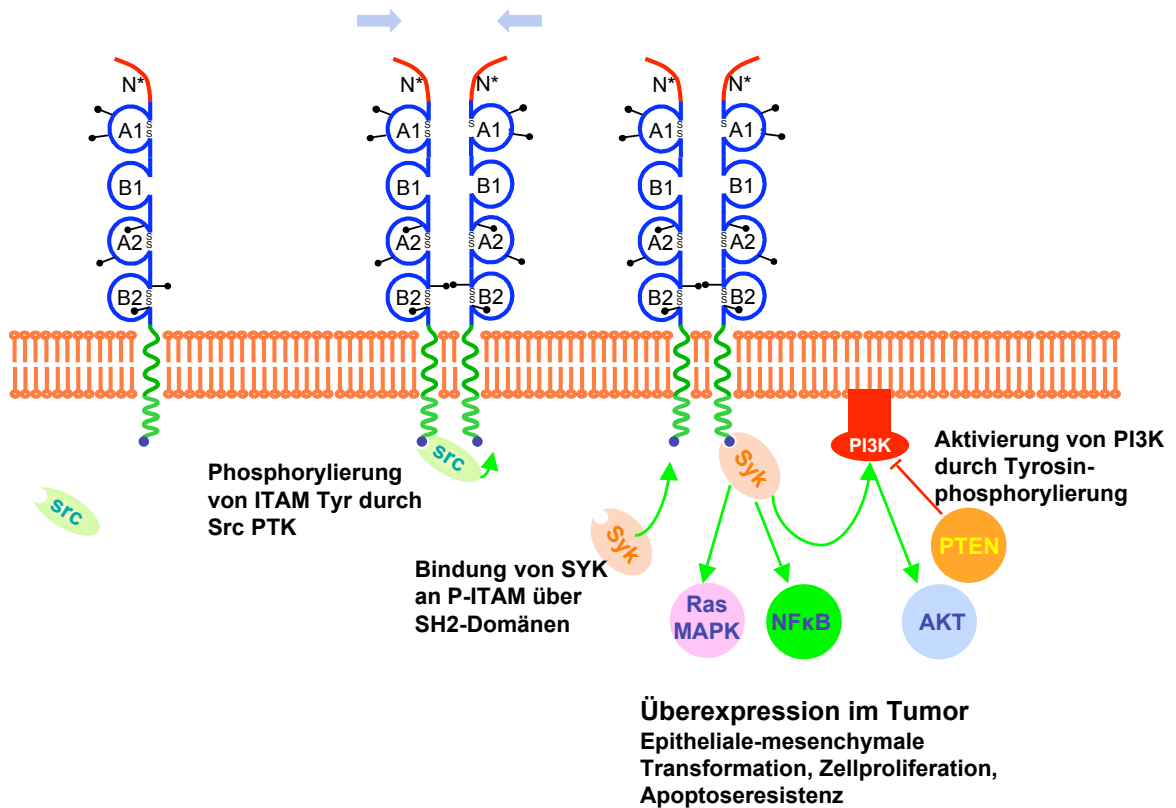
Das in allen untersuchten Säugetierspezies vorkommende *CEACAM20*-ITAM-Motiv konnte trotz abweichender Vorhersage der Genomdatenbanken auch im Menschen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Übereinstimmung zu 100 % im Bereich der Konsensussequenz. Außerdem erfüllt die Sequenz die strengste Definition für ein ITAM-Motiv. Diese beiden Indizien lassen eine funktionelle Bedeutung erwarten. Bemerkenswert ist insbesondere die Tatsache, dass ITAM-Motive bis vor wenigen Jahren ausschließlich in Immunzellen beschrieben wurden, *CEACAM20* aber nachweislich auch in Epithelzellen exprimiert wird (siehe Abbildung 3.14, Seite 55). Neben viralen Proteinen konnten in letzter Zeit auch natürliche Proteine mit einem ITAM-Motiv in Epithelzellen gefunden werden (Fodor et al., 2006).

Im Allgemeinen verläuft die Aktivierung funktioneller ITAM-Motive über die Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste durch Src-Phosphotyrosinkinasen. Hierdurch können weitere Proteintyrosinkinasen wie SYK (Mocsai et al., 2002) oder ZAP-70 (Goda et al., 2004) binden und aktiviert werden, welche im nächsten Schritt erneut Moleküle der Signalkette phosphorylieren und somit zur Regulation von Proliferation und Differenzierung führen. Hierzu zählen die Phospholipase C (PLC), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K/Akt), die MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) sowie NF $\kappa$ B (Niuro & Clark, 2002). Anders wie ursprünglich angenommen, wird SYK auch in epithelialen Zellen exprimiert und kann somit die Hypothese einer funktionierenden Signalkette von *CEACAM20* stützen (Yanagi et al., 2001). Ebenso konnte mittlerweile durch *Wes-*

tern Blot-Analysen und Immunpräzipitation die Phosphorylierbarkeit der Tyrosinreste des CEACAM20-ITAM-Motivs bestätigt werden (Paptistella, 2009).

Durch die Assoziation viraler Proteine mit ITAM-Motiv und der Entstehung epithelialer Tumoren konnte die onkogene Potenz jener Proteine gezeigt werden (Lanier, 2006). Bestes Beispiel ist das Env-Protein des *murine mammary tumor virus* (MMTV) (Katz et al., 2005; Ross et al., 2006). Untersuchungen zeigten, dass durch ITAM-abhängige Aktivierung die epithelialen Zellen eine *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) sowie ausgeprägte Zeichen einer Transformation aufwiesen. Ersteres kann als Ursache einer aggressiven Metastasierung der mutierten Zellen angesehen werden (Thiery, 2002). Ebenfalls kam es zu einem Verlust der epithelialen Marker E-Cadherin and Keratin 18. Ein weiteres Zeichen der Zelltransformation ist die gesteigerte Sensitivität zur Apoptose, ausgelöst durch TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sowie TNF- $\alpha$ . Da diese Effekte auch durch nicht-virale Proteine ausgelöst werden (Grande et al., 2006), könnte CEACAM20 somit auch eine Rolle in der Kanzerogenese epithelialer Tumoren spielen. Eine durch Mutation ausgelöste kontinuierliche ITAM-Aktivierung könnte zum Beispiel ähnlich wie in Virus-infizierten Zellen zu einer Entartung der betroffenen Zellen führen (Grande et al., 2007; Monroe, 2006). Im Gegensatz dazu könnte CEACAM20 auch zu den wenigen Proteinen gehören, die ein inhibierendes ITAM-Motiv tragen und ähnlich wie ITIM-Proteine als Tumorsuppressor wirken kann (Underhill & Goodridge, 2007).

Zukünftige Funktionsanalysen müssen zeigen, welche Auswirkung die von Michaela Paptistella gefundene Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK auf die Aktivierung weiterer *Downstream*-Partner hat (Paptistella, 2009). Mittels siRNA (*small interfering RNAs*) könnten einzelne Phosphotyrosinkinasen als auch das ITAM-tragende Protein selber deaktiviert werden und den Einfluss auf Proliferation und Differenzierung untersucht werden (Shi et al., 2006).



**Abbildung 4.1: Hypothetisches Modell der ITAM-vermittelten Signaltransduktion durch CEACAM20.** Durch Aggregation zweier CEACAM20-Moleküle, vermittelt durch einen noch unbekanntem Liganden, kommt es zur Aktivierung von Src-Phosphotyrosinkinase und zur Tyrosinphosphorylierung des CEACAM20-ITAM-Motivs, was wiederum zur Anlagerung und Aktivierung von SYK führt. Als Proteintyrosinkinase ist SYK ebenfalls in der Lage, weitere Partner verschiedener Signalketten durch Phosphorylierung zu aktivieren. Als Beispiele zu nennen sind Mitglieder des Ras/MAPK-, NFκB- und PI3K/Akt-Signalwegs. PTEN hat die Fähigkeit PI3K zu antagonisieren. Alle genannten Faktoren sind in der Lage Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptoseresistenz zu nehmen.

## 4.4 Mausmodell eignet sich zur Generierung von Anti-CEACAM20-Antikörper

Bereits vor über 25 Jahren ist es gelungen, spezifische monoklonale Antikörper gegen das karzinoembryonale Antigen (CEA) in der Maus zu generieren (Rogers et al., 1984). Das Problem der kreuzreaktiven Erkennung verwandter Mitglieder der CEA-Familie blieb jedoch bis heute persistent (Daniel et al., 1993; Skubitz et al., 1993). Große Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Proteinen und zum Teil auch zwischen den für die Antikörperherstellung verwendeten Tierspezies fordern eine intensive Testung der generierten Antikörper. Insbesondere die Auswahl der für die Immunisierung verwendeten Epitope kann entscheidend für den Erfolg sein. Im Falle von *CEACAM20* konnte festgestellt werden, dass die humane A1-Domäne 55 %, und die A2-Domäne 65 % Ähnlichkeit mit der murinen Proteinvariante aufweist. Dies sollte ausreichen um eine entsprechende Immunreaktion in der Maus zu erzeugen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte genetische Immunisierung konnte zeigen, dass bereits nach erstem Kontakt mit der eingebrachten Fremd-DNA, welche die extrazellulären Bereiche des menschlichen *CEACAM20* kodierte, Antikörper in der Maus gebildet wurden.

Immunzytologische Analysen haben gezeigt, dass die murinen Anti-*CEACAM20*-Antikörper das menschliche *CEACAM20* sicher detektieren können. Sowohl an transient transfizierten HeLa-Zellen als auch an kryokonservierten Prostatagewebeproben konnte ein Proteinnachweis demonstriert werden. Neuere Immunanalysen mittels *Zytopins*, Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) und Immunhistologie konnten die Spezifität der generierten Antikörper weiter bestätigen. Trotzdem sollte in Zukunft eine Kreuzreaktivität mit anderen verwandten Mitgliedern der CEA-Genfamilie weiter ausgeschlossen werden. Im Vergleich mit einem kommerziellen monoklonalen Antikörper der Firma GENOVAC (Freiburg) hat sich gezeigt, dass die polyklonalen Antiseren eine durchweg bessere Detektierbarkeit des *CEACAM20*-Proteins aufweisen und somit momentan die beste Möglichkeit des Proteinnachweises darstellen (Paptistella, 2009).

Zusammenfassend konnte eine Eignung der genetischen Immunisierung von Mäusen für die Herstellung polyklonaler Antikörper gezeigt werden und die Voraussetzung für die Generierung monoklonaler Anti-*CEACAM20*-Antikörper geschaffen werden. Diese können dann für weitergehende Untersuchungen mittels *Western Blot*, Immunpräzipitation und Immunhistologie verwendet werden. Eine Steigerung der Bindungsfähigkeit

monoklonaler Antikörper könnte dann mittels Affinitätsreifung durch in-vitro Mutation erreicht werden (Pavoni et al., 2006). Zukünftige Erkenntnisse könnten auch zeigen, dass sich *CEACAM20*, ähnlich wie das karzinoembryonale Antigen (CEA), für routinemäßige immunhistopathologische Untersuchungen eignen kann (Wittekind, 1995).

Für die therapeutische Verwendung monoklonaler Anti-*CEACAM20*-Antikörper (Abschnitt 4.5) würde sich neben der Herstellung chimärer Maus-Mensch-Antikörper auch die genetische Immunisierung von Mäusen, die ein humanes Chromosom 14-Fragment tragen (*Human Artificial Chromosome*) und somit zur Bildung menschlicher Antikörper fähig sind, eignen (Ishida et al., 2002; Imakiire et al., 2004). Eine Bildung von neutralisierenden HAMAs wäre bei Verwendung von humanen Antikörpern ausgeschlossen.

### 4.5 *CEACAM20* als potentielle Zielstruktur für die Tumorummuntherapie

Mit Kenntnis der humanen *CEACAM20*-Nukleotidsequenz und der damit verbundenen cDNA- und Aminosäuresequenz konnte belegt werden, dass *CEACAM20* durch eine geeignete Signalsequenz sowie hydrophober Aminosäuren im mittleren Proteinabschnitt als ein Oberflächenprotein mit Transmembranregion exprimiert wird. Im Vergleich zu einigen anderen membranassoziierten CEA-Familienmitgliedern kann die Fixierung mittels  $\alpha$ -Helix-Struktur als deutlich robuster angenommen werden, als mittels einer GPI-Verankerung (Cross, 1990; Edidin, 1992). Immunhistologische Analysen konnten schlussendlich die natürliche Expression an der Zelloberfläche beweisen. Dies ist eine unabdingbare Voraussetzung für eine Zielstruktur für Antikörper-vermittelte Immuntherapie. Insbesondere die selektive Expression in wenigen gesunden Geweben sowie die Expression in fast allen untersuchten Prostatakarzinomen und Prostatakarzinomzelllinien schafft eine optimistische Ausgangslage. Vor allem die streng luminale Proteinlokalisierung in gesunden polarisierten Zellen wie die des Prostata-drüsenepithels oder des Dünndarmepithels (Papistella, 2009) stellen keine Kontraindikation für eine antikörperbasierte Tumorummuntherapie da. Im Blut und im Interstitium vorhandene Antikörper können die *tight junctions* der Zell-Zell-Verbindungen nicht durchqueren und sind somit, analog zu Therapieversuchen mit Anti-CEA-Antikörpern, räumlich vom Antigen getrennt (Dougan & Dranoff, 2008). Ein tumortoxischer Effekt könnte



nach Antikörper-Antigen-Bindung durch Aktivierung von NK-Zellen zustande kommen (Conaghan et al., 2008; Stein & Goldenberg, 2004) sowie durch Konjugation der Antikörper mit einem Chemotherapeutikum (Chen et al., 2007) oder einem radioaktivem Isotop (Wong et al., 2000).

Eine erste Evaluierung einer Immuntherapie mit *CEACAM20*-Antikörpern könnte ähnlich der kürzlich durchgeführten präklinischen Testung von medikamentgekoppelten Anti-*CEACAM6*-Antikörper (*antibody-drug conjugate*, ADC) zur Therapie des Pankreaskarzinoms durchgeführt werden (Strickland et al., 2009). Sowohl im Maus- als auch im Primatenmodell wurde die Therapie auf Effizienz und Sicherheit hin untersucht. Mit Hilfe radioaktivmarkierter ADC konnte in der Positronenemissionstomographie (PET) die Lokalisation der applizierten Antikörper festgestellt werden und so eine direkte Schädigung anderer Organe abgeschätzt werden.

Eine weitere Therapieoption wäre die funktionelle Beeinflussung von *CEACAM20*. Das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene ITAM-Motiv könnte Bestandteil der überschießenden Proliferationsrate in malignen Geweben sein. Die Blockierung einer homo- oder heterophilen Adhäsion als auch die Verdrängung eines möglichen aktivierenden Liganden von *CEACAM20* mittels Antikörper könnte die Signaltransduktion des ITAM-Motivs deaktivieren und so einen Wachstumsstillstand der entarteten Zellen auslösen. Im Gegensatz zu zytotoxischen oder Komplement-aktivierenden Wirkmechanismen Antikörper-basierter Immuntherapien (siehe Abschnitt 1.2), könnte in diesem Fall auf den Fc-Teil der therapeutischen Antikörper verzichtet werden. Durch Abspalten des Fab-Kompartiments mittels Pepsin kann das Molekulargewicht der vierkettigen Antikörper deutlich verringert werden und die Diffusion und Distribution in soliden Tumoren verbessert werden (Yokota et al., 1992).

Eine interessante Alternative wäre auch die direkte Hemmung des ITAM-Motivs und seiner *Downstream*-Partner mittels niedermolekularen Substanzen, sogenannten *small molecule drugs*, oder auf RNA-Interferenz basierenden *anti mRNA drugs* (Popescu, 2005). Aktuell werden Tyrosinkinaseinhibitoren für SYK getestet. Analog zu Imatinib (Glivec®), das als Hemmstoff des Fusionsproteins BCR-ABL bei chronisch myeloischer Leukämie zum Einsatz kommt, können auf Oxindole-basierende Substanzen die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase SYK kompetitiv hemmen (Lai et al., 2003; Rossi et al., 2006).



## 5 Zusammenfassung

Während herkömmliche Therapieansätze zur Behandlung bösartiger Tumoren meist mit einer Zerstörung umliegender Gewebe und Strukturen einhergehen und häufig den gesamten Körper betreffen, so verspricht die Antikörper-vermittelte Immuntherapie eine gezielte Bekämpfung der entarteten Zellen. Sowohl die Theorie als auch die Methodik sind bekannt und einsatzbereit, nur mangelt es an geeigneten Zielstrukturen für diesen Therapieansatz. Entweder sind die in Frage kommenden Strukturen zu häufig auch auf gesunden Zellen exprimiert oder nur ein geringer Anteil der Tumorzellen zeigen das benötigte Oberflächenantigen. Mitglieder der CEA-Familie haben bereits öfter bewiesen, dass sie über die notwendigen Eigenschaften verfügen, um als Zielstruktur für eine antikörperbasierte Tumorummuntherapie eingesetzt werden zu können. Im Rahmen dieser Arbeit ist mit Hilfe der RT-PCR ein sicherer Nachweis der *CEACAM20*-mRNA gelungen und polyklonale Antikörper konnten das zugehörige Protein zuverlässig nachweisen. Die selektive Expression von *CEACAM20* in gesunden Geweben als auch die Expression in den untersuchten Tumorgeweben und Tumorzelllinien sind günstige Eigenschaften für einen möglichen therapeutischen Einsatz. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten ebenfalls zeigen, dass *CEACAM20* neben seinem interessanten Expressionsmuster auch aufgrund seiner luminalen Anordnung in gesunden polarisierten Zellen potentiell für die Therapie geeignet ist. Aber auch als immunhistologisches Diagnostikum könnte *CEACAM20*, ähnlich wie *CEACAM5* (CEA), eine Rolle spielen und bei der Suche nach einem Primärtumor helfen.

Spezifische polyklonale und monoklonale Antikörper waren und sind dringend notwendig, um die Aussagekraft des neuentdeckten CEA-Familienmitgliedes weiter zu charakterisieren. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten polyklonalen Antikörper konnten in aktuellen Analysen die bisherigen Erkenntnisse bestätigen und eine enge Korrelation zwischen der Expression von *CEACAM20*-mRNA und des *CEACAM20*-Proteins aufzeigen. Somit wurde die Voraussetzung für weiterführende Arbeiten und Expressionsanalysen geschaffen. Es hat sich gezeigt, dass die polyklonalen Antiseren,

gegenüber eines monoklonalen Antikörpers der Firma GENOVAC (Freiburg), momentan die beste Möglichkeit darstellen, das *CEACAM20*-Protein sicher nachzuweisen.

Darüber hinaus konnte die *CEACAM20*-cDNA sowie die Primärstruktur bestimmt und die starke Konservierung eines ITAM-Motivs nachgewiesen werden. Mittlerweile konnte auch die funktionelle Aktivität dieser Konsensussequenz bewiesen werden. Diese Tatsache macht *CEACAM20* als Regulator der Zellproliferation, der Apoptose und der Zelldifferenzierung wahrscheinlich. Falls zukünftige Untersuchungen eine Steigerung der *CEACAM20*-Expression in malignen Geweben nachweisen können, ist somit auch eine Funktion als Onkogen oder Protoonkogen möglich. Analysen durch Hemmung oder Stimulierung des ITAM-Motivs sowie dessen *Downstream*-Partner könnten eine Reihe weiterer Informationen liefern.

In Summe erscheint es sinnvoll und lohnenswert, *CEACAM20* in seiner Funktion und seiner Struktur weiter zu untersuchen. Auch zusätzliche Expressionsanalysen benigner und maligner Zellverbände können wichtige Informationen für die mögliche Anwendung bei weiteren Tumorentitäten liefern.

## Literaturverzeichnis

- Barber R, Harmer D, Coleman R, Clark B. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21(3):389–395, 2005.
- Barnett T, Drake L, Pickle Wn. Human biliary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol*, 13(2):1273–1282, 1993.
- Barnett T, Kretschmer A, Austen D, Goebel S, Hart J, Elting J, Kamarck M. Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol*, 108(2):267–276, 1989.
- Berger C, Billker O, Meyer T, Servin A, Kansau I. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol*, 52(4):963–983, 2004.
- Birney E, Clamp M, Durbin R. GeneWise and Genomewise. *Genome Res*, 14(5):988–995, 2004.
- Black D. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*, 103(3):367–370, 2000.
- Burge C, Karlin S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol*, 268(1):78–94, 1997.
- Burset M, Guigo R. Evaluation of gene structure prediction programs. *Genomics*, 34(3):353–367, 1996.
- Chatal J, Champion L, Kraeber-Bodere F, Bardet S, Vuillez J, Charbonnel B, Rohmer V, Chang C, Sharkey R, Goldenberg D, Barbet J. Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-

- antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J Clin Oncol*, 24(11):1705–1711, 2006.
- Chen D, Tan Z, Chen F, Du T. Construction of humanized carcinoembryonic antigen specific single chain variable fragment and mitomycin conjugate. *World J Gastroenterol*, 13(43):5765–5770, 2007.
- Clynes R, Towers T, Presta L, Ravetch J. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6(4):443–446, 2000.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(4):235–242, 2002.
- Conaghan P, Ashraf S, Tytherleigh M, Wilding J, Tchilian E, Bicknell D, Mortensen N, Bodmer W. Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer*, 98(7):1217–1225, 2008.
- Cross G. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu Rev Cell Biol*, 6:1–39, 1990.
- Curwen V, Eyraas E, Andrews T, Clarke L, Mongin E, Searle S, Clamp M. The Ensembl automatic gene annotation system. *Genome Res*, 14(5):942–950, 2004.
- Daniel S, Nagel G, Johnson J, Lobo F, Hirn M, Jantscheff P, Kuroki M, von Kleist S, Grunert F. Determination of the specificities of monoclonal antibodies recognizing members of the CEA family using a panel of transfectants. *Int J Cancer*, 55(2):303–310, 1993.
- Donda A, Cesson V, Mach J, Corradin G, Primus F, Robert B. In vivo targeting of an anti-tumor antibody coupled to antigenic MHC class I complexes induces specific growth inhibition and regression of established syngeneic tumor grafts. *Cancer Immun*, 3:11, 2003.
- Dougan M, Dranoff G. Immune Therapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*, 2008.

- Edidin M. Patches, posts and fences: proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol*, 2(12):376–380, 1992.
- Ellerman D, Ha C, Primakoff P, Myles D, Dveksler G. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell*, 14(12):5098–5103, 2003.
- Fodor S, Jakus Z, Mocsai A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett*, 104(1-2):29–37, 2006.
- Frangsmyr L, Israelsson A, Teglund S, Matsunaga T, Hammarstrom S. Evolution of the carcinoembryonic antigen family. structures of CGM9, CGM11 and pregnancy-specific glycoprotein promoters. *Tumour Biol*, 21(2):63–81, 2000.
- Gibbins J, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson S. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett*, 413(2):255–259, 1997.
- Goda S, Quale A, Woods M, Felthausen A, Shimizu Y. Control of TCR-mediated activation of beta 1 integrins by the ZAP-70 tyrosine kinase interdomain B region and the linker for activation of T cells adapter protein. *J Immunol*, 172(9):5379–5387, 2004.
- Gold P, Freedman S. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, 122(3):467–481, 1965.
- Grande S, Bannish G, Fuentes-Panana E, Katz E, Monroe J. Tonic B-cell and viral ITAM signaling: context is everything. *Immunol Rev*, 218:214–234, 2007.
- Grande S, Katz E, Crowley J, Bernardini M, Ross S, Monroe J. Cellular ITAM-containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells. *Oncogene*, 25(19):2748–2757, 2006.
- Gray-Owen S, Blumberg R. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(6):433–446, 2006.
- Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 9(2):67–81, 1999.

- Hefta L, Chen F, Ronk M, Sauter S, Sarin V, Oikawa S, Nakazato H, Hefta S, Shively J. Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis. *Cancer Res*, 52(20):5647–5655, 1992.
- Hill D, Virji M. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol*, 48(1):117–129, 2003.
- 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*, 274(1):335–344, 1999.
- Hudis C. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357(1):39–51, 2007.
- Idusogie E, Wong P, Presta L, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, Mulkerrin M. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*, 166(4):2571–2575, 2001.
- Imakiire T, Kuroki M, Shibaguchi H, Abe H, Yamauchi Y, Ueno A, Hirose Y, Yamada H, Yamashita Y, Shirakusa T, Ishida I, Kuroki M. Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. *Int J Cancer*, 108(4):564–570, 2004.
- Ishida I, Tomizuka K, Yoshida H, Tahara T, Takahashi N, Ohguma A, Tanaka S, Umehashi M, Maeda H, Nozaki C, Halk E, Lonberg N. Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning Stem Cells*, 4(1):91–102, 2002.
- Kammerer R, Stober D, Singer B, Obrink B, Reimann J. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J Immunol*, 166(11):6537–6544, 2001.
- Katz E, Lareef M, Rassa J, Grande S, King L, Russo J, Ross S, Monroe J. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J Exp Med*, 201(3):431–439, 2005.



- Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, 428(6984):758–763, 2004.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497, 1975.
- Krebs in Deutschland 2003-2004*. Epidemiologischer Krebsregister, 2008.
- Kuespert K, Weibel S, Hauck C. Profiling of bacterial adhesin–host receptor recognition by soluble immunoglobulin superfamily domains. *J Microbiol Methods*, 68(3):478–485, 2007.
- Lai J, Cox P, Patel R, Sadiq S, Aldous D, Thurairatnam S, Smith K, Wheeler D, Jagpal S, Parveen S, Fenton G, Harrison T, McCarthy C, Bamborough P. Potent small molecule inhibitors of spleen tyrosine kinase (Syk). *Bioorg Med Chem Lett*, 13(18):3111–3114, 2003.
- Lanier L. Viral immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signaling in cell transformation and cancer. *Trends Cell Biol*, 16(8):388–390, 2006.
- Leusch H, Drzeniek Z, Hefta S, Markos-Pusztai Z, Wagener C. The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA an BGP) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. *Zentralbl Bakteriol*, 275(1):118–122, 1991.
- Li S, Schmitz K, Jeffrey P, Wiltzius J, Kussie P, Ferguson K. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7(4):301–311, 2005.
- Markel G, Seidman R, Cohen Y, Besser M, Sinai T, Treves A, Orenstein A, Berger R, Schachter J. Dynamic expression of protective CEACAM1 on melanoma cells during specific immune attack. *Immunology*, 126(2):186–200, 2009.
- Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz V, Lowell C. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 16(4):547–558, 2002.

- Moller M, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer*, 65(6):740–745, 1996.
- Monroe J. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*, 6(4):283–294, 2006.
- Morel P, Falkner D, Plowey J, Larregina A, Falo L. DNA immunisation: altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, 22(3-4):447–456, 2004.
- Nagel G, Grunert F, Kuijpers T, Watt S, Thompson J, Zimmermann W. Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur J Biochem*, 214(1):27–35, 1993.
- Naghbalhossaini F, Yoder A, Tobi M, Stanners C. Evolution of a tumorigenic property conferred by glycoposphatidyl-inositol membrane anchors of carcinoembryonic antigen gene family members during the primate radiation. *Mol Biol Cell*, 18(4):1366–1374, 2007.
- Najjar S. Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab*, 13(6):240–245, 2002.
- 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 U S A*, 90(22):10744–10748, 1993.
- Niir H, Clark E. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, 2(12):945–956, 2002.
- Nittka S, Bohm C, Zentgraf H, Neumaier M. The CEACAM1-mediated apoptosis pathway is activated by CEA and triggers dual cleavage of CEACAM1. *Oncogene*, 27(26):3721–3728, 2008.
- Öbrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, 9(5):616–626, 1997.
- Paptistella M. CEACAM20, ein potentielles Zielmolekül für die Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten. *Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-*

*Maximilians-Universität, München, 2009.*

- Pavoni E, Flego M, Dupuis M, Barca S, Petronzelli F, Anastasi A, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriu G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M, Minenkova O. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer*, 6:41, 2006.
- Popescu F. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med*, 9(4):840–853, 2005.
- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338(6214)(6214):383–384, 1989.
- Rogers G, Rawlins G, Kardana A, Gibbons A, Bagshawe K. A monoclonal antibody against a CEA-related antigen expressed on HT29 colon tumour cells. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20(10):1279–1286, 1984.
- Ross S, Schmidt J, Katz E, Cappelli L, Hultine S, Gimotty P, Monroe J. An immunoreceptor tyrosine activation motif in the mouse mammary tumor virus envelope protein plays a role in virus-induced mammary tumors. *J Virol*, 80(18):9000–9008, 2006.
- Rossi A, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, Issakani S, Argade A, Singh R, Payan D, Masuda E. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *J Allergy Clin Immunol*, 118(3):749–755, 2006.
- Rougeaux C, Berger C, Servin A. hCEACAM1-4L downregulates hDAF-associated signalling after being recognized by the Dr adhesin of diffusely adhering *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 10(3):632–654, 2008.
- Schmitter T, Agerer F, Peterson L, Munzner P, Hauck C. Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*, 199(1):35–46, 2004.
- Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, 156(2):595–605, 2000.

- Scorilas A, Chiang P, Katsaros D, Yousef G, Diamandis E. Molecular characterization of a new gene, CEAL1, encoding for a carcinoembryonic antigen-like protein with a highly conserved domain of eukaryotic translation initiation factors. *Gene*, 310:79–89, 2003.
- Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Miah S, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K, Yamamura H. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood*, 107(11):4554–4562, 2006.
- Singer B, Scheffrahn I, Obrink 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*, 60(5):1236–1244, 2000.
- Sippel C, Shen T, Perlmutter D. Site-directed mutagenesis within an ectoplasmic ATPase consensus sequence abrogates the cell aggregating properties of the rat liver canalicular bile acid transporter/ecto-ATPase/cell CAM 105 and carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem*, 271(51):33095–33104, 1996.
- Skubitz K, Ducker T, Skubitz A, Goueli S. Antiserum to carcinoembryonic antigen recognizes a phosphotyrosine-containing protein in human colon cancer cell lines. *FEBS Lett*, 318(2):200–204, 1993.
- Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, N’guessan P, Lucka L, Riesbeck K, Zimmermann W, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Singer B. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*, 9(11):1270–1278, 2008.
- Stein R, Goldenberg D. A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther*, 3(12):1559–1564, 2004.
- Strickland L, Ross J, Williams S, Ross S, Romero M, Spencer S, Erickson R, Sutcliffe J, Verbeke C, Polakis P, van Bruggen N, Koeppen H. Preclinical evaluation of carcinoembryonic cell adhesion molecule (CEACAM) 6 as potential therapy target for pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol*, 218(3):380–390, 2009.

- Takami N, Misumi Y, Kuroki M, Matsuoka Y, Ikehara Y. Evidence for carboxyl-terminal processing and glycolipid-anchoring of human carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem*, 263(25):12716–12720, 1988.
- Tan K, Zelus B, Meijers R, Liu J, Bergelson J, Duke N, Zhang R, Joachimiak A, Holmes K, Wang J. Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J*, 21(9):2076–2086, 2002.
- Thiery J. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6):442–454, 2002.
- Tilki D, Oliveira-Ferrer L, Kilic N, Friedrich M, Stief C, Ergun S. One molecule, two faces. Epithelial loss of cell adhesion molecule CEACAM1 activates angiogenesis in bladder and prostate cancer. *Urologe A*, 46(9):1128–1134, 2007.
- Underhill D, Goodridge H. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol*, 28(2):66–73, 2007.
- Waterhouse R, Ha C, Dveksler G. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med*, 195(2):277–282, 2002.
- Watt S, Teixeira A, Zhou G, Doyonnas R, Zhang Y, Grunert F, Blumberg R, Kuroki M, Skubitz K, Bates P. Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood*, 98(5):1469–1479, 2001.
- Wittekind C. Carcinoembryonic antigen family members as diagnostic tools in immunohistopathology. *Tumour Biol*, 16(1):42–47, 1995.
- Wong J, Chu D, Yamauchi D, Williams L, Liu A, Wilczynski S, Wu A, Shively J, Doroshow J, Raubitschek A. A phase I radioimmunotherapy trial evaluating 90yttrium-labeled anti-carcinoembryonic antigen (CEA) chimeric T84.66 in patients with metastatic CEA-producing malignancies. *Clin Cancer Res*, 6(10):3855–3863, 2000.
- Yanagi S, Inatome R, Ding J, Kitaguchi H, Tybulewicz V, Yamamura H. Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood*, 98(9):2869–2871, 2001.

- Yokota T, Milenic D, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*, 52(12):3402–3408, 1992.
- Zebhauser R, Kammerer R, Eisenried A, McLellan A, Moore T, Zimmermann W. Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics*, 86(5):566–580, 2005.
- Zhou H, Stanners C, Fuks A. Specificity of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their effects on CEA-mediated adhesion. *Cancer Res*, 53(16):3817–3822, 1993.
- Zhou X, Zheng L, Liu L, Xiang L, Yuan Z. T helper 2 immunity to hepatitis B surface antigen primed by gene-gun-mediated DNA vaccination can be shifted towards T helper 1 immunity by codelivery of CpG motif-containing oligodeoxynucleotides. *Scand J Immunol*, 58(3):350–357, 2003.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	aufgefüllt
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität ( <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
BGP	Biliäres Glykoprotein ( <i>biliary glycoprotein</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C20	CEACAM20
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität ( <i>complement dependent cytotoxicity</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CEA	Karzinomembryonales Antigen ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )
CEACAM	CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül ( <i>CEA-related cell-adhesion molecule</i> )
CELISA	<i>cell based enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cyt	zytoplasmatisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell scan</i> )
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

---

G	Guanin
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HAMA	humane Anti-Maus-Antikörper
Hsa	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante ( <i>constant</i> ) Immunglobulindomäne
IgV-Domäne	variable ( <i>variable</i> ) Immunglobulindomäne
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
L	Signalpeptid ( <i>leader</i> )
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mmu	Maus ( <i>Mus musculus</i> )
MMTV	Brusttumorvirus der Maus ( <i>mouse mammary tumor virus</i> )
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
NF- $\kappa\text{B}$	<i>nuclear factor-<math>\kappa\text{B}</math></i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )



PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen ( <i>prostate specific antigen</i> )
PSG	Schwangerschaftsspezifisches Glykoprotein ( <i>pregnancy specific glycoprotein</i> )
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SV40	Simian Virus 40
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UspA1	<i>ubiquitous surface protein A1</i>
UTR	Nicht-translatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
V	Volt



## Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann, bedanken. Durch sein großes Engagement bei der Betreuung meiner Doktorarbeit konnte ich mich stets auf die relevanten Aspekte und Fragestellungen meiner Arbeit konzentrieren und meinen naturwissenschaftlichen Horizont kontinuierlich erweitern. In zahlreichen Diskussionen habe ich gelernt, über den Tellerrand zu blicken und vielfältige Gesichtspunkte in meiner täglichen Arbeit zu berücksichtigen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Rainer Riesenberg, der mir in manch misslicher Lage stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Sei es durch sein umfangreiches Wissen, als auch durch seine ermutigenden und aufbauenden Worte zur rechten Zeit. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht in der Form möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Sandra Neckermann bedanken. Neben ihrer Hilfestellung bei der Generierung von Antikörpern verdanke ich ihr viele kurzweilige Tage und Wochen im Labor. Es hat sehr viel Spaß gemacht, in ihrer Gegenwart zu arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Alexander Buchner, der zu manch später Stunde bereit war, diverse Computerprobleme zu lösen und meinen Laboralltag durch interessante Diskussionen aufgewertet hat.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Robert Kammerer, Dr. Kathleen Ebelt, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer und Dr. Heike Pohla für die familiäre und nette Atmosphäre im Labor, die auch zahlreiche private Unternehmungen angeregt hat.

Im besonderen Maße möchte ich meiner Schwester Gerdi und ihrem Mann Dr. Eugen Grupp danken. Durch ihre Unterstützung während des Studiums und der ständigen Gewissheit, auf ihren Rat vertrauen zu können, sind viele Dinge deutlich leichter geworden.

Meine große Dankbarkeit richtet sich an meine Eltern, die mich in selbstloser Weise mein Leben lang unterstützt haben und das Fortschreiten dieser Arbeit wesentlich mitgetragen haben.



## curriculum vitæ

### Andreas Eisenried

geboren am 9. September 1980 in Ingolstadt

#### Schulische Ausbildung

09/1992 - 06/2000

06/2000

Apian-Gymnasium Ingolstadt

“Allgemeine Hochschulreife”

Leistungskurse Physik, Chemie

#### Berufsausbildung

08/2000 - 10/2001

Ausbildung und Staatsexamen zum Rettungsassistenten an der Med-Ecole / Kiel

#### Hochschulausbildung

09/2001 - 05/2008

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

12/2005

US-Amerikanisches Staatsexamen in Medizin

“USMLE Step 1”

5/2008

“Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung”

#### Famulaturen

03/2004

Innere Medizin, Klinikum Ingolstadt

03-04/2005

Chirurgie, Orthopädie, Kantonspital Nidwalden, Schweiz

03/2006

Anästhesie, Klinikum Ingolstadt

07-08/2006

Interventionelle Radiologie, St. Vincent Catholic Hospital, New York

#### Praktisches Jahr

02-06/2007

Chirurgie, Klinikum Ingolstadt und Inselspital Bern, Schweiz

06-10/2007

10/2007-01/2008

Innere Medizin, Universitätsklinikum Großhadern

Anästhesie, Universitätsklinikum Großhadern

**Promotion**

10/2003 - 01/2005

Promotionsstudium "Molekulare Medizin" an der Ludwig-Maximilians-Universität München

ab 11/2003

Doktorarbeit am Labor für Tumorimmunologie, Universitätsklinikum Großhadern, München

03/2006

Präsentation der Forschungsergebnisse im Rahmen eines Vortrags und eines Posters auf der EXPU (Kongress für experimentelle Urologie)

**Berufliche Tätigkeit**

ab 07/2008

Tätigkeit als Assistenzarzt an der Anästhesiologischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen

**Auszeichnungen**

03/2000

"Bayerischer Umweltpreis Jugend forscht"

06/2000

"Preis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft für hervorragende Leistungen im Fach Physik"

**Publikation**

2005

Zebhauser R., Kammerer R., Eisenried A., McLellan A., Moore T., Zimmermann W.

"Identification of a novel group of evolutionary conserved members within the rapidly diverging murine Cea family"

Genomics, 86, 566-80, 2005