

Aus dem Labor für Tumormimmunologie,  
LIFE-Zentrum  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

## **CEACAM20, ein potentiell es Zielmolekül für die Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten**

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

vorgelegt von  
Michaela Paptistella

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat  
Priv. Doz. Dr. Claus Schäfer

Mitbetreuung durch den  
habilitierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2009

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.2 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern als neue Option in der Tumorthera- rapie	2
1.3 CEA als Zielstruktur in der Therapie solider Tumoren	5
1.4 Die CEA-Familie	6
1.4.1 CEACAM- und PSG-Subgruppe	6
1.4.2 Biologische Funktionen von Mitgliedern der CEA-Familie	8
1.4.3 Bisherige Erkenntnisse über CEACAM20	12
1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit	16
<b>2. Materialien</b>	<b>17</b>
2.1 Geräte	17
2.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Chemikalien und Reagenzien	18
2.4 Antikörper	19
2.5 Oligonukleotide	20
2.6 Vektoren	20
2.7 Enzyme und Kits	21
2.8 Bakterien	21
2.9 Zelllinien	21
2.10 RNA	21
2.11 Gewebeschnitte (Kryogewebe und Paraffin-eingebettetes Gewebe)	22
2.12. Software und Internetadressen	22
<b>3. Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1 RNA-Isolation und Qualitätsmessung	23
3.1.2 Reverse Transkription der isolierten RNA	24
3.1.3 Quantitative <i>real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	25
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese	27
3.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.1.8 DNA-Dephosphorylierung	28
3.1.9 DNA-Aufreinigung	28
3.1.10 Ligation	28
3.1.11 Transformation kompetenter Bakterien	29
3.1.12 Kolonie-PCR	29
3.1.13 Herstellen von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	29
3.1.14 Plasmidpräparation	30
3.1.15 Konzentrationsbestimmung und Reinheit der DNA	30
3.1.16 DNA-Sequenzierung	30
3.2 Zellbiologische Methoden	30

3.2.1 Kultivierung von Zellen .....	30
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl .....	31
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	31
3.2.4 Transiente Transfektion von Kulturzellen.....	32
3.2.5 Stabile Transfektion von Kulturzellen .....	32
3.2.6 Erstellen einer Wachstumskurve von stabil transfizierten Kulturzellen .....	33
3.2.7 Herstellung von Zytospins .....	33
3.2.8 Pervanadat-Behandlung von Kulturzellen.....	33
3.2.9 Lyse der Zellen .....	34
3.2.10 Proteinbestimmung.....	34
3.3 Immunologische Methoden.....	35
3.3.1 <i>Magnetic cell sorting</i> (MACS) .....	35
3.3.2 Zellbasierter ELISA (CELISA).....	35
3.3.3 Durchflusszytometrie (FACS) .....	36
3.3.4 Western Blot .....	37
3.3.5 Immunpräzipitation .....	38
3.3.6 Immunzytologie und -histologie .....	38
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1 Expression von CEACAM20.....	41
4.1.1 Klonierung der CEACAM20-cDNA und Nachweis verschiedener Spleißvarianten von CEACAM20 auf RNA-Ebene .....	41
4.1.2 Charakterisierung poly- und monoklonaler Anti-CEACAM20-Antikörper und Nachweis von CEACAM20-Protein .....	46
4.1.2.1 CELISA.....	46
4.1.2.2 Durchflusszytometrie (FACS) .....	47
4.1.2.3 Western Blot .....	48
4.1.2.4 Immunzytologie .....	49
4.1.3 Nachweis von CEACAM20- und SYK-mRNA in Prostatakarzinomzelllinien und -gewebe sowie Kolonkarzinomzelllinien .....	50
4.1.3.1 RT-PCR und Kontrolle mittels GAPDH-cDNA-Bestimmung .....	50
4.1.3.2 Screening von Dünndarm-, Prostatanormal-, Prostatakarzinomgewebe sowie Prostatakarzinomzelllinien auf CEACAM20-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR .....	50
4.1.3.3 Screening von Kolonnorgewebe und Kolonkarzinomzelllinien auf CEACAM20-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR .....	51
4.1.3.4 Quantitativer Nachweis von CEACAM20-mRNA in Normalgeweben und Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien mittels RT-PCR .....	53
4.1.3.5 Screening von Dünndarm- und Prostatagewebe sowie Prostatakarzinomzelllinien auf SYK-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR .....	54
4.1.3.6 Quantitativer Nachweis von SYK-mRNA in Normalgeweben und Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien mittels RT-PCR .....	55
4.1.4 Untersuchung des Expressionsmusters von CEACAM20 auf Proteinebene ...	56
4.1.4.1 Prostatakarzinomzelllinien .....	56
4.1.4.2 Dünndarm.....	57
4.1.4.3 Prostata .....	58
4.1.4.4 Western Blot-Analyse der CEACAM20-Expression in Dünndarm, Prostata und Prostatakarzinom.....	59
4.2 Funktionsanalysen von CEACAM20.....	61

4.2.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von stabil CEACAM20- exprimierenden COS7-Zellen .....	61
4.2.2 Mögliche Funktionalität des hypothetischen ITAM-Motivs in CEACAM20 .....	63
4.2.2.1 Nachweis der Phosphorylierbarkeit von Tyrosinresten in CEACAM20 .....	63
4.2.2.2 Untersuchung der Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK .....	65
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
5.1 Expressionsort von CEACAM20 .....	66
5.2 Funktion von CEACAM20 .....	68
5.2.1 Möglicher Einfluss der Spleißvarianten von CEACAM20 auf Zelladhäsion und Proliferation .....	68
5.2.2 Funktionalität des ITAM-Motivs von CEACAM20 .....	69
5.2.3 SYK als <i>down-stream</i> -Partner von CEACAM20 .....	69
5.2.4 Möglicher Einfluss von CEACAM20 auf Differenzierung, Apoptose und Migrati- on .....	70
5.2.5 Mögliche Funktion von CEACAM20 im Kolonkarzinom .....	71
5.2.6 Funktionen von ITAM-Motiven in der CEA-Familie, mögliche Übertragung auf CEACAM20 .....	73
5.3 Mögliche Verwendung von CEACAM20 für Diagnose, Prognose und Therapie von Tumoren .....	74
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>93</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>94</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes mit einer Inzidenz von 48.650 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und stellt die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache nach Lungen- und Darmkrebs dar (Bertz *et al.*, 2006). Als Risikofaktoren werden Alter, Verwandtschaft mit Patienten mit Prostatakarzinom und ethnische Zugehörigkeit (höhere Inzidenz bei Männern schwarzafrikanischer Herkunft) diskutiert. Mittlerweile wurden wichtige Hinweise gefunden, dass eine Entzündung der Prostata am Prozess der Karzinogenese beteiligt ist (Nelson *et al.*, 2004; Sugar 2006; De Marzo *et al.*, 2007).

Symptome treten meist in fortgeschrittenem Stadium auf, da der Tumor in den äußeren Drüsenanteilen wächst und somit erst spät Schmerzen oder Störungen beim Wasserlassen verursacht. Als weitere Symptome können eine gestörte Blasenentleerung und Blutbeimengungen im Urin vorkommen. Wenn bereits Knochenmetastasen vorhanden sind, kann es zu rheumatischen Beschwerden und Knochenschmerzen kommen. Da die klinische Symptomatik keinen zuverlässigen diagnostischen Parameter darstellt, sollten alle Männer ab 50 Jahren (bei familiärer Belastung ab 45 Jahren) regelmäßig zur Vorsorgeuntersuchung gehen. Diese umfasst eine digital-rektale Untersuchung, bei der bereits kleine Unregelmäßigkeiten der Oberfläche getastet werden können. Eine weitere Möglichkeit bietet die Bestimmung der Serumkonzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA), die in einem Normbereich von 0-4 ng/ml liegt. Da aber die Konzentration nicht nur bei einem Prostatakarzinom, sondern auch bei einem Prostataadenom, einer Prostataentzündung sowie nach körperlicher Anstrengung, Fahrradfahren oder Geschlechtsverkehr erhöht sein kann, wird sie nicht von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen. Als weitere Möglichkeit steht ein rektaler Ultraschall zur Verfügung. Die sicherste diagnostische Methode stellt die Biopsie dar. Mit dem gewonnenen Material kann das *grading* sowie die Bestimmung des *Gleason scores* erfolgen. Die Beurteilung des Tumorstadiums sollte anhand des TNM-Systems beurteilt werden. Als Therapieoptionen stehen operative Verfahren, Strahlentherapie transkutan, als *afterloading* oder mittels *seeds* sowie bei Rezidiven oder Metastasierung eine Hormontherapie zur Verfügung.

Nach wie vor stellen das hormonunabhängig wachsende Karzinom sowie die oft schon in frühen Krankheitsstadien ausgestreuten Tumorzellen, die zu nicht mehr

kontrollierbarer Metastasierung und zum Tod führen können, die Hauptprobleme bei der Therapie des Prostatakarzinoms dar. Daher beschäftigt sich die aktuelle Forschung intensiv mit der Suche nach neuen Zielstrukturen, die eine gezielte Hemmung oder Zerstörung von Tumorzellen durch therapeutische Antikörper erlauben (Timme *et al.*, 2003).

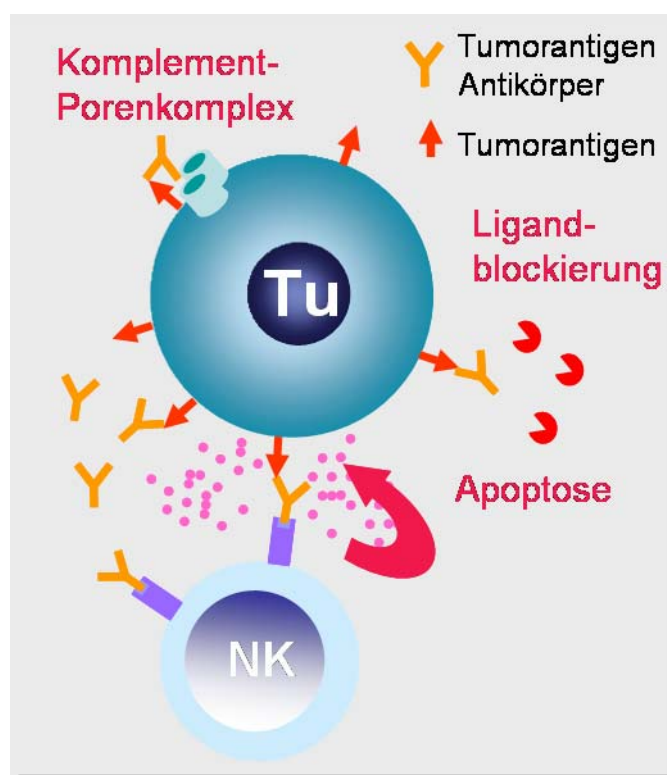
Das Prostatakarzinom stellt ein besonders geeignetes Ziel für eine Immuntherapie dar, da die Prostata kein lebenswichtiges Organ ist und somit eine Zerstörung der Drüsenzellen nicht lebensbedrohlich ist. Außerdem ist die Prostata relativ prädisponiert für Entzündungen (Prostatitis, sexuell übertragbare Erkrankungen). Daher ist sicher, dass eine ausreichende Immunantwort gegen Prostatagewebe möglich ist (Webster *et al.*, 2005). Zudem findet sich eine inverse Beziehung zwischen der Rezidivrate und der Anzahl von T-Lymphozyten, die sich im Tumorgewebe angesiedelt haben (Vesalainen *et al.*, 1994). Das bedeutet, dass die zelluläre Immunität die Tumormetastasen unterdrücken kann. Somit stellt die Stimulierung der T-Zell-Antwort einen wichtigen Mechanismus in der Proliferationshemmung und Zerstörung von Krebszellen dar (Hurwitz *et al.*, 2003; Karnes *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse werden als therapeutischer Ansatz ebenso erforscht wie der Einsatz monoklonaler Antikörper in der Therapie des Prostatakarzinoms (siehe oben). Die aktuelle Forschung befasst sich vor allem mit der Zielstruktur ERBB2/HER-2, die bereits beim Mammakarzinom zu Therapieerfolgen geführt hat (Liu *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2002) und deren Blockierung durch einen monoklonalen Antikörper auch bei Tumormodellen der Prostata zu einer Wachstumshemmung geführt hat (Agus *et al.*, 2002).

## **1.2 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern als neue Option in der Tumorthherapie**

Die Idee, Antikörper in der Therapie von Tumoren einzusetzen, formulierte bereits Paul Ehrlich vor über hundert Jahren (Ehrlich, 1900). Doch die Rahmenbedingungen zur Herstellung von spezifischen, monoklonalen Antikörpern mittels Hybridomtechnologie standen erst 1975 zur Verfügung (Köhler und Milstein, 1975). Es dauerte weitere zwei Jahrzehnte, bis es zu ersten Erfolgen beim Einsatz therapeutischer Antikörper im Rahmen von klinischen Studien kam. Das Prinzip der Antikörpertherapie beruht auf der Bindung des monoklonalen Antikörpers an das von der Tumorzelle exprimierte Zielantigen und die dadurch ausgelösten Reaktionen. Zum einen kann es zu direk-



ter Destruktion des Tumors mittels konjugierter radioaktiver Isotope oder Toxine kommen, zum anderen zu einer indirekten Zerstörung mittels einer durch das Komplementsystem ausgelösten Zytolyse (*complement dependent cytotoxicity*, CDC), einer durch den Antikörper induzierten Zytotoxizität durch Effektorzellen (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) oder zur Blockierung von zum Beispiel Wachstumshormonrezeptoren (Mellstedt, 2003, Hinoda *et al.*, 2004, Reichert und Valge-Archer, 2007).



**Abb. 1.1: Wirkungsweise monoklonaler Antikörper in der Tumorthherapie.** Der Einfluss von monoklonalen Antikörpern auf Tumorzellen beruht auf Komplementaktivierung und Lyse der Zellen durch Porenkomplexbildung (CDC), auf Ligand- bzw. Rezeptorblockierung oder auf induzierter zellulärer Zytotoxizität (ADCC). Die dabei freigesetzten zytolytischen Proteine (Perforin, Granzym B) sind durch lila Punkte in der Graphik dargestellt. (Zimmermann, unveröffentlicht).

Der erste monoklonale therapeutische Antikörper, Muromonab-CD3 (Orthoclone®, OKT3), wurde 1986 zugelassen. Er bindet an das CD3-Protein auf der Oberfläche von T-Lymphozyten und wurde als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin eingesetzt (D'Alessandro *et al.*, 1989) und findet auch heute noch in diesem Bereich Anwendung (Benekli *et al.*, 2006). 1994 wurde der erste Antikörper zur adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Edrecolomab (Panorex®) ist gegen das Zelladhäsionsmolekül EpCAM (17-1A) von Epithelzellen gerichtet. In einer randomisierten Studie konnten Riethmüller *et al.* den therapeutischen Effekt

von Panorex® über sieben Jahre Beobachtungszeitraum zeigen (Riethmueller *et al.*, 1998), der vor allem durch die Verhinderung der Bildung von Fernmetastasen erklärt werden kann. Ein Problem dieser beiden therapeutischen monoklonalen Antikörper liegt allerdings darin, dass es sich um rein murine Antikörper handelt. Es kann zur Bildung von neutralisierenden humanen Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern (HAMAs) kommen, die allerdings die Wirkung nur gering beeinträchtigen und sehr selten zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen (Frödin *et al.*, 1992; Gruber *et al.*, 2000). Um die Immunogenität der Antikörper zu reduzieren, werden heutzutage chimäre und humanisierte Antikörper verwendet. Der erste chimäre Antikörper, Abciximab (ReoPro®), erhielt 1995 seine Zulassung. Er ist gegen den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten gerichtet und wird unter anderem im Rahmen der Herzinfarkttherapie eingesetzt (Lefkovits und Topol, 1995; DeCarlo *et al.*, 2008). Ein Beispiel für einen humanisierten therapeutischen Antikörper stellt Trastuzumab (Herceptin®) dar, der an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu bindet, der in Tumoren von etwa 25-30% der Mammakarzinompatientinnen überexprimiert wird (Cobleigh *et al.*, 1999; Piccart-Gebhart *et al.*, 2005). Die Wirksamkeit von therapeutischen monoklonalen Antikörpern kann gesteigert werden, indem sie in Kombination mit Chemotherapeutika oder Zytokinen gegeben werden (Arnould *et al.*, 2006). Hierbei spielen oben erwähnte konjugierte Antikörper eine wichtige Rolle. Durch die Kopplung eines Wirkstoffes an den Antikörper wird eine gezielte Reaktion am Wirkort erreicht. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg™), ein monoklonaler Antikörper gegen das Membranprotein CD33 gekoppelt mit dem bakteriellen Toxin Calicheamicin. Seine Zulassung erhielt es in den USA und Europa als Monotherapie bei Rezidiv einer akuten myeloischen Leukämie (Fenton und Perry, 2006; Pagano *et al.*, 2007). Im Rahmen einer Radioimmuntherapie von Non-Hodgkin-Lymphomen stehen seit neuestem zwei Medikamente zur Verfügung, wobei bei beiden an den murinen Immunglobulin G1 (IgG1)-Anti-CD20-Antikörper ein Radioisotop gekoppelt ist. Bei Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®) ist es <sup>90</sup>Yttrium und bei Tositumomab (Bexxar®) <sup>131</sup>Jod (Marcus, 2005; Davies, 2007).

Da die bisherigen Ergebnisse bei der Anwendung therapeutischer monoklonaler Antikörper sehr viel versprechend sind, beschäftigt sich die aktuelle Forschung intensiv mit der Suche nach neuen Zielstrukturen.

### 1.3 CEA als Zielstruktur in der Therapie solider Tumoren

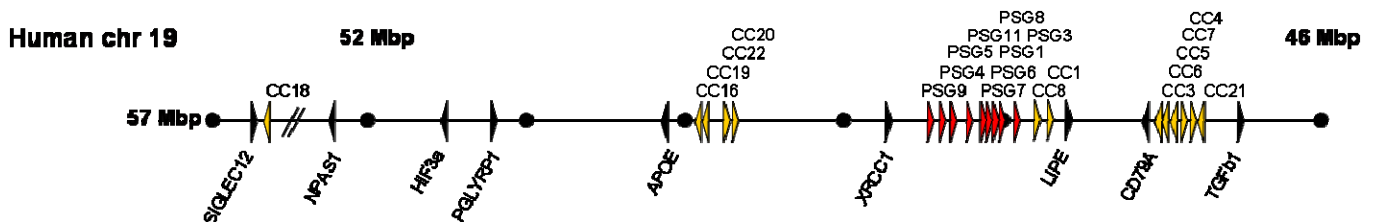
Als mögliche Zielstrukturen für die Immuntherapie von Tumoren sind Oberflächenmoleküle wie beispielsweise das CEA (karzinoembryonales Antigen, CEACAM5) von Interesse. CEA wurde 1965 von Gold und Freedman das erste Mal in Extrakten von Kolonkarzinomen gefunden (Gold und Freedman, 1965). Erst Jahre später konnte das CEA-Molekül genauer charakterisiert werden. Es handelt sich um ein stark glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa (Coligan *et al.*, 1972, Westwood *et al.*, 1974) und besteht aus 7 Domänen, die homolog zu den variablen beziehungsweise konstanten Regionen der Immunglobulinketten sind (Paxton *et al.*, 1987; Williams and Barclay, 1988). Über eine Glykosylphosphatidylinositol-Verbindung ist CEA in der Zellmembran verankert (Takami *et al.*, 1988).

Kurz nach seiner Entdeckung konnte CEA im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom und anderen Tumoren mittels Radioimmunoassay nachgewiesen werden (Thomson *et al.*, 1966), wobei bei gesunden Personen und Patienten mit anderen Erkrankungen nur geringe CEA-Konzentrationen gefunden wurden. Somit wurde CEA ein Tumormarker, der auch heute noch im klinischen Alltag seine Anwendung findet. Er eignet sich jedoch nicht für ein Screening-Verfahren zur Erkennung des kolorektalen Karzinoms, da der CEA-Wert sowohl bei entzündlichen Erkrankungen der Leber und Gallenblase als auch bei anderen Neoplasien erhöht sein kann (Chevinsky, 1991; Ballesta *et al.*, 1995). CEA wird heutzutage als postoperativer Verlaufs- und damit als Prognoseparameter verwendet (Goldstein und Mitchell, 2005). Ein postoperativer Anstieg von CEA weist auf ein Rezidiv hin (Thompson *et al.*, 1991), sogar wenn präoperativ ein normaler CEA-Wert gemessen wurde (Grossmann *et al.*, 2007). Dadurch kann ein rezidivierendes Krankheitsgeschehen erkannt werden, wenn in klinischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren noch keine Hinweise gefunden werden.

Nach neueren Erkenntnissen ist CEA bei Tumoren häufig überexprimiert (Kim *et al.*, 1992) und an deren Entstehung und Metastasierung beteiligt (Hofstetter *et al.*, 1990; Screaton *et al.*, 2000). Dies geschieht über eine Zerstörung der Zellpolarisation und Gewebearchitektur (Ilantzis *et al.*, 2002; Ordonez *et al.*, 2007). Daraus ergibt sich, dass als weiteres Einsatzgebiet CEA als Zielstruktur für die Therapie von epithelialen Tumoren mit monoklonalen Antikörpern intensiv erforscht wird (Blumenthal *et al.*, 2005; Stein und Goldenberg, 2004).

## 1.4 Die CEA-Familie

Das CEA gehört zu einer Familie von äußerst unterschiedlichen Glykoproteinen, die auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 19 innerhalb eines 1,8 Mbp großen Bereiches durch 29 Gene kodiert werden (Zimmermann *et al.*, 1988; Brandriff *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1994) (Abbildung 1.2). Die Vielfalt an Mitgliedern entstand bei dieser Familie erst nach der evolutionären Trennung von Nagern und Primaten vor mehr als 75 Millionen Jahren, so dass es sich um eine relativ junge Genfamilie handelt (Thompson und Zimmermann, 1988; Rudert *et al.*, 1989). Durch diese unabhängige Entwicklung in den einzelnen Spezies zeigen die paralogen Gene eine größere Ähnlichkeit als die orthologen Gene. Dieses Phänomen kann noch durch Genkonversion über Rekombinationsereignisse zwischen den verwandten Genen verstärkt werden. Bei der Maus finden sich auf Chromosom 7 insgesamt 31 für Mitglieder der CEA-Familie kodierende Gene, von denen nur fünf ortholog zum menschlichen Genom sind (CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20) (Zebhauser *et al.*, 2005).

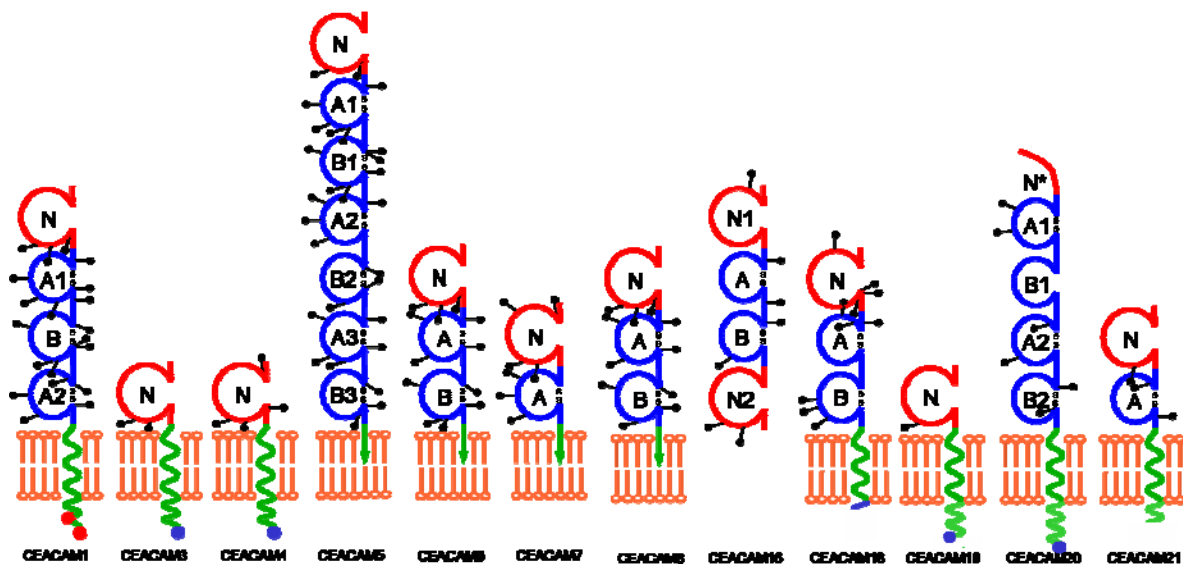


**Abb. 1.2: Genlokus und Anordnung der Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Chromosom 19 des Menschen.** Die Lage der einzelnen Gene ist durch unterschiedlich gefärbte Dreiecke symbolisiert, wobei die gelbe Farbe die Mitglieder der CEACAM-Subgruppe, die rote Farbe die der PSG-Subgruppe darstellt und die Dreieckspitze in Richtung der Transkription zeigt. Schwarz markiert sind Markergene, die der Orientierung dienen sollen. CC, CEACAM (Kammerer, Habilitationsschrift „Die carcinoembryonische antigen-related cell adhesionmoleküle (CEACAM) als Regulatoren der immunvermittelten Tumoralabwehr“).

### 1.4.1 CEACAM- und PSG-Subgruppe

Die CEA-Familie, eine Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie, wird unterteilt in CEA-ähnliche Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (*CEA-related cell-cell adhesion molecules*, CEACAMs) und Schwangerschafts-spezifische Glykoproteine (*pregnancy-specific glycoproteins*, PSGs), die ausschließlich in Trophoplasten exprimiert werden (Beauchemin *et al.*, 1999). Die humanen Mitglieder der CEA-Familie weisen eine IgV-ähnliche Domäne auf, die der variablen Domäne der Immunglobuline entspricht,

und null bis sechs IgC-ähnliche Domänen, die den konstanten Domänen der Immunglobuline entsprechen. Bei letzteren werden Domänen vom Typ A bestehend aus meist 93 Aminosäuren von Domänen vom Typ B bestehend aus meist 85 Aminosäuren unterschieden (Williams und Barclay, 1988; Hammarström, 1999). Mitglieder der humanen CEACAM-Untergruppe sind mit Ausnahme von CEACAM16 in der Zellmembran befestigt, während die Mitglieder der PSG-Untergruppe sezerniert werden. Die Bindung an die Zelloberfläche beziehungsweise eine Verankerung in der Zellmembran kann auf zwei Arten stattfinden, zum einen über eine hydrophobe Transmembrandomäne (im Falle von CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4), zum anderen über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8) (Hefta *et al.*, 1988; Hammarström, 1999). Intrazellulär zeigen CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM19 und CEACAM20 ein funktionelles ITIM oder ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition; activation motif*) (siehe dazu Kapitel 1.4.3). Abbildung 1.3 zeigt die Domänenstruktur der humanen Mitglieder der CEACAM-Familie.



**Abb. 1.3: Domänenstruktur der Mitglieder der humanen CEACAM-Familie.** Rot dargestellt sind die IgV-ähnlichen Domänen, blau die IgC-ähnlichen Domänen, innerhalb deren sich Disulfidbrücken befinden. Diese werden zwischen jeweils zwei hochkonservierten Cysteinen ausgebildet. Die gestielten Punkte symbolisieren Konsensussequenzen für mögliche N-Glykosylierung. Bis auf das lösliche CEACAM16 werden die Mitglieder der CEACAM-Subgruppe mittels Transmembrandomäne (grün kurvige Linie) oder GPI-Anker (grüner Pfeil) in der Membran verankert. Funktionelle bzw. vermutete ITAMs sind als blauer Punkt im intrazellulären Bereich dargestellt, rote Punkte symbolisieren ein ITIM. (<http://cea.klinikum.uni-muenchen.de/>)

Da sich diese Doktorarbeit ausschließlich mit einem Mitglied der humanen CEACAM-Familie beschäftigt, soll in erster Linie auf diese eingegangen werden. Dennoch sei-

en ein paar Besonderheiten der CEACAMs der Nager zu erwähnen, nämlich das vollständige Fehlen von GPI-Verankerung und das verstärkte Auftreten von löslichen CEA-verwandten Molekülen (murine CEACAM9-CEACAM16) (Finkenzeller *et al.*, 1997; Zebhauser *et al.*, 2005). Eine weitere Besonderheit stellt CEACAM2 dar, das bisher nur in der Maus gefunden wurde (Nédellec *et al.*, 1994; Zebhauser *et al.*, 2005).

Die zweite Untergruppe der CEA-Familie bildet die PSG-Subgruppe. Ihre humanen Vertreter setzen sich ähnlich wie die der CEACAM-Subgruppe aus einer IgV-ähnlichen Domäne, und ebenfalls aus einer variablen Anzahl an IgC-ähnlichen A- und B-Domänen zusammen, die allerdings auf unterschiedliche Weise kombiniert sind. Besonderheiten der PSGs sind zum einen die ausgeprägte Sequenzkonservierung sowie eine Ähnlichkeit in der Domänenanordnung. Zum anderen fehlen den PSG-Mitgliedern Verankerungen in der Zellmembran, so dass sie zu den sezernierten Proteinen gehören. Außerdem zeigen sie eine geringere Glykosylierung im Vergleich zu den CEACAM-Mitgliedern. Bei den murinen PSGs bleibt zu erwähnen, dass sich ihre Domänenstruktur aus einer IgC- und unterschiedlich vielen IgV-ähnlichen Domänen zusammensetzt (Thompson *et al.*, 1991; Teglund *et al.*, 1995; McLellan *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Biologische Funktionen von Mitgliedern der CEA-Familie

Die Vertreter der PSG-Subgruppe werden beim Menschen hauptsächlich durch den Synzytiotrophoblasten der Plazenta nach Befruchtung der Eizelle gebildet und zeigen einen starken Konzentrationsanstieg bis zum Ende der Schwangerschaft hin (Teglund *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997). Bei den Nagetieren werden sie durch trophoblastische Riesenzellen und den Spongiotrophoblasten synthetisiert (Kromer *et al.*, 1996). Jedoch wurden einzelne Mitglieder in geringerem Maße auch in Speicheldrüse, Hoden und embryonaler Leber gefunden (Zimmermann *et al.*, 1989; Zoubir *et al.*, 1990; Borjigin *et al.*, 1990) sowie in Chorionkarzinomen, und Brusttumoren (Thompson, 1995). Kürzlich wurde eine konsistente *De-novo*-Expression von PSG9 auf mRNA-Ebene in kolorektalen Karzinomen beschrieben (Salahshor *et al.*, 2005). Nach neueren Erkenntnissen sind sie funktionell am komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft beteiligt. So konnten niedrige PSG-Serumwerte in Zusammenhang mit fetaler Hypoxie, intrauteriner Wachstumsverzögerung und drohendem Abort ge-

bracht werden (Würz *et al.*, 1981; Leslie *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1993). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Stimulierung von Monozyten durch humane oder murine PSGs, die zur Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-6, IL-10 und TGF- $\beta$ 1 führen. Dadurch würden sie Einfluss auf die maternale Immunantwort gegenüber dem Embryo bzw. auf die Angreifbarkeit von Tumoren durch das Immunsystem nehmen (Wessells *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2005). Das murine CD9 wurde als Rezeptor für PSG17 identifiziert (Waterhouse *et al.*, 2002). CEACAM9, ein Mitglied der murinen CEA-Familie, welches ausschließlich in primären und sekundären trophoblastischen Riesenzellen der Plazenta synthetisiert wird, spielt möglicherweise eine funktionell bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Plazenta bei Nagern (Finkenzeller *et al.*, 1997).

Die Mitglieder der CEACAM-Subgruppe zeichnen sich durch ein äußerst heterogenes Expressionsmuster aus. Jedoch gibt es zahlreiche Hinweise, dass sie sich bevorzugt im apikalen Bereich von Epithelien, auf Endothelien und auf hämatopoetischen Zellen befinden (Prall *et al.*, 1996; Möller *et al.*, 1996; Kammerer *et al.*, 1998; Frängsmayr *et al.*, 1999; Hammarström, 1999; Schölzel *et al.*, 2000). Manche Vertreter der CEACAM-Subgruppe können jedoch einem einzelnen Organ zugeordnet werden, beispielsweise die murinen Vertreter CEACAM9, CEACAM11, CEACAM12, CEACAM13, CEACAM14 und CEACAM15, die ausschließlich in der Plazenta gefunden wurden (Kataoka *et al.*, 2000; Zebhauser *et al.*, 2005).

Wie der Name schon vermuten lässt, können die meisten CEACAMs als Adhäsionsmoleküle Zell-Zellverbindungen vermitteln. Als Ausnahme sei das humane CEACAM7 erwähnt (Thompson *et al.*, 1994; Kinugasa *et al.*, 1998). Die membranständigen Mitglieder CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 können zum Teil homophil sich selbst oder heterophil an andere CEA-Familienmitglieder binden (Williams und Barclay, 1988; McCuaig *et al.*, 1992; Lucka *et al.*, 1995; Maxwell, 1999; Kuroki *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2005). Verantwortlich für die Bindungseigenschaft sind Bereiche der N-Domäne (Zhou *et al.*, 1993; Öbrink, 1997; Hammarström, 1999; Taheri *et al.*, 2000; Watt *et al.*, 2001). CEACAM1 ist nicht nur an Zelladhäsionsprozessen beteiligt, sondern besitzt auch regulatorische Funktionen auf Epithel-, Endothel- und Immunzellen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten seine Beteiligung bei der Angiogenese, in der Funktionsregulation von T-, B- und natürlichen Killerzellen sowie bei der Differenzierung von dendritischen Zellen nachweisen (Kammerer *et al.*, 1998; Ergün *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 2001; Markel *et al.*, 2002; Greicius *et al.*,

2003; Chen *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2006; Dango *et al.*, 2008). Die Besonderheit von CEACAM1 liegt darin, dass es in vielen verschiedenen Isoformen vorliegt, die durch alternatives Spleißen entstehen und sich in der Anzahl der extrazellulären Domänen oder der Länge des zytoplasmatischen Bereichs unterscheiden (Barnett *et al.*, 1989; Sundberg und Öbrink, 2002). Die Isoform von CEACAM1 mit dem langen zytoplasmatischen Anteil besitzt ein funktionelles ITIM und kann dadurch biologische Prozesse inhibieren (Huber *et al.*, 1999), während der Isoform mit dem kurzen zytoplasmatischen Bereich das ITIM fehlt und sie daher eher stimulierend wirkt. Beide Spleißvarianten treten nun in zahlreichen Zellpopulationen parallel in einem bestimmten Verhältnis zueinander auf, welches abhängig von Herkunft und Funktionszustand der Zelle ist (Kammerer *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2000). Je nach Überwiegen einer Isoform kommt es nun zu aktivierenden oder inhibierenden Signalen. Chen *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass CEACAM1 die Wirkungsweise von T-Zellen fördern oder hemmen kann (Chen *et al.*, 2004). Die Rolle von CEACAM1 in der Tumorgenese ist ebenso komplex. Während es bei Melanomzellen die Tumorzellinvasion verstärkt (Ebrahimnejad *et al.*, 2004), gilt es als Tumorsuppressor bei epithelialen Zellen aufgrund seiner Herunterregulierung in zahlreichen Adenokarzinomen und seiner Tumorstimmungs-inhibition (Neumaier *et al.*, 1993; Hauck *et al.*, 1994; Hsieh *et al.*, 1995; Turbide *et al.*, 1997; Estrera *et al.*, 2001). Als mögliche Erklärung hierfür konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 an der Regulation von Apoptose im Epithel des Kolons beteiligt ist (Nittka *et al.*, 2004). Nach neuesten Erkenntnissen aktiviert CEA die CEACAM1 vermittelte Apoptose (Nittka *et al.*, 2008). Im Prostatakarzinom konnte nachgewiesen werden, dass eine Herunterregulierung von CEACAM1 mit einem Verlust der Zellpolarität, einer erhöhten Proliferationsrate sowie einer Verschlechterung des *Gleason scores* korreliert (Busch *et al.*, 2002). Des Weiteren nimmt CEACAM1 Einfluss auf den Insulin-Metabolismus, indem es die Wirkung von Insulin durch Förderung der Endozytose des Insulinrezeptors limitiert (Soni *et al.*, 1999; Najjar, 2002; Küspert *et al.*, 2006). Bei Mäusen fungiert CEACAM1 zudem als Rezeptor für das murine Hepatitis-Virus (MHV) und dessen Infiltration ins Gewebe (Dveksler *et al.*, 1993; Nédellec *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2004). CEACAM1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine Resistenz gegenüber diesen Coronaviren (Blau *et al.*, 2001; Hemmila *et al.*, 2004). Beim Menschen dienen CEACAM1 sowie CEACAM5 und CEACAM6 auf Epithelzellen und CEACAM3 auf neutrophilen Granulozyten als Rezeptor zur Anheftung oder auch Internalisierung für



verschiedene humanpathogene Bakterien. *E. coli* und *Salmonella typhimurium* können über Typ-1-Fimbrien an Kohlenhydratstrukturen von CEACAMs binden (Leusch *et al.*, 1991; Berger *et al.*, 2004; Baranov und Hammarström, 2004). Andere Humanpathogene exprimieren bestimmte Oberflächenproteine für eine Anheftung an Vertreter der CEA-Familie. So können Opa-Oberflächenproteine von *Neisseria spec.*, P5-Protein von *Haemophilus influenzae* und UspA1 (*ubiquitous surface protein A1*) von *Moraxella catarrhalis* mit den N-Domänen der CEACAMs interagieren (Chen *et al.*, 1997; Virji *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2001; Hill und Virji, 2003; Hauck *et al.*, 2006; N'Guessan *et al.*, 2007; Villullas *et al.*, 2007). Bestimmte Opa-Oberflächenproteine binden ausschließlich an CEACAM1 oder CEACAM5, andere hingegen an verschiedene CEACAM-Moleküle (Virji *et al.*, 1999; Billker *et al.*, 2000). Abhängig von der exprimierten Opa-Variante kann eine solche Rezeptor-Interaktion Neisserien die Invasion in das betroffene Gewebe ermöglichen und somit zur Manifestation des entsprechenden Krankheitsbildes führen (Wang *et al.*, 1998; Gray-Owen, 2003). Außerdem kommt es durch Pathogen-Rezeptorinteraktion zu Aktivierung und Proliferation von CD4+ T-Lymphozyten, was möglicherweise die Immunreaktion des Wirts gegen die Pathogene beeinträchtigt (Boulton und Gray-Owen, 2002). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass CEACAM3 an der Elimination von humanen CEACAM-bindenden Pathogenen beteiligt ist (Chen *et al.*, 2001; Schmitter *et al.*, 2004; Küspert *et al.*, 2006).

Im Rahmen der Tumorforschung sind die CEA-Familienmitglieder CEACAM6 und CEACAM7 ins Rampenlicht gerückt. Beide Moleküle wurden in normalem Kolongewebe im Bereich der Glykokalyx gefunden und stellen Komponenten des sogenannten *fuzzy coats* dar (Frängsmayr *et al.*, 1999). CEACAM6 befindet sich in Epithelien zahlreicher Organe sowie in Granulozyten, während CEACAM7 nur in hochdifferenzierten Epithelzellen der kolorektalen Mukosa und in isolierten dukталen Epithelzellen des Pankreas nachgewiesen werden konnte. Beide Vertreter der CEA-Familie korrelieren mit Apoptose im normalen Kolon und konnten nicht in hochproliferierenden Zellen in der Basis der Kolonkrypten gefunden werden (Schölzel *et al.*, 2000). Im kolorektalen Karzinom ist CEACAM6 stark überexprimiert, während CEACAM1 und CEACAM7 herunterreguliert sind und als mögliche Tumorsuppressoren diskutiert werden (Thompson *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997; Koops *et al.*, 1998; Blumenthal *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass im Adenokarzinom des Magens CEACAM1 und CEACAM7 ebenso wie CEACAM6

überexprimiert sind (Kinugasa *et al.*, 1998). CEACAM6 zerstört die Gewebearchitektur, blockiert die Zelldifferenzierung sowie eine durch die Anoikis vermittelte Apoptose und trägt bei unregulierter Überexpression durch diese Funktionen in gleicher Weise wie das CEA zur Karzinogenese bei (Ilantzis *et al.*, 2002; Ordonez *et al.*, 2007). Deshalb beschäftigt sich die aktuelle Forschung mit CEACAM6 als mögliches Zielmolekül für die Immuntherapie von Karzinomen. Blumenthal *et al.* konnten bereits durch *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche zeigen, dass sich durch Antikörper gegen CEACAM6 die Adhäsion, Invasion sowie die Metastasierung reduzieren lassen (Blumenthal *et al.*, 2005). Auch im Pankreasadenokarzinom-Nacktmausmodell konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von Anti-CEACAM6-Antikörper in Kombination mit einem Saporin-konjugierten Immunglobulin das Tumorwachstum reduziert sowie die Apoptoserate im Tumor gesteigert wird (Duxbury *et al.*, 2004). Außerdem wurde CEACAM6 als möglicher prognostischer Marker für das Pankreaskarzinom und das kolorektale Karzinom untersucht (Jantscheff *et al.*, 2003; Duxbury *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Bisherige Erkenntnisse über CEACAM20

Da im Prostatakarzinom keine Überexpression von CEACAM6 nachgewiesen werden konnte (Blumenthal *et al.*, 2007), wird intensiv nach weiteren möglichen Zielstrukturen für eine Antikörper-basierte Immuntherapie gesucht. Aufgrund von Vorarbeiten konnte ein weiteres Mitglied der CEA-Familie, CEACAM20, als mögliches *target* für eine derartige Therapie des Prostatakarzinoms ausfindig gemacht werden. Bei der Maus konnte Zebhauser *et al.* zeigen, dass CEACAM20 im Normalgewebe hauptsächlich in Dünn-, Dickdarm und Hodengewebe detektierbar ist, sowie in geringeren Mengen in Thymus, Speichel- und Brustdrüse, Ovar und Prostata. CEACAM20-Transkripte finden sich außerdem in Magen- und Brusttumoren (Zebhauser *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass CEACAM20 im zugehörigen Normalgewebe entweder gar nicht (Magen) oder schwach (Brustdrüse) exprimiert ist, lässt den Schluss zu, dass es zu einer Hochregulation von CEACAM20 bei maligner Entartung kommt. Das Expressionsmuster von CEACAM20 beim Menschen auf RNA-Ebene ähnelt dem der Maus. CEACAM20 wurde relativ selektiv in Dünndarm und Prostata gefunden, in geringerer Ausprägung auch in Hoden, Pankreas und Hypophyse (Eisenried, persönliche Mitteilung). Außerdem wurden Prostatakarzinomzelllinien und vier Prostatakarzinomproben auf die Anwesenheit von CEACAM20-mRNA hin untersucht. Es

zeigte sich, dass CEACAM20 auf RNA-Ebene sowohl in den Zelllinien als auch in drei von vier Karzinomen exprimiert wird (Eisenried, persönliche Mitteilung). In normaler Prostata wird CEACAM20 wahrscheinlich an der lumenwärts gerichteten Seite des Drüsenepithels exprimiert. Die immunhistologische Färbung erfolgte mit polyklonalen Anti-CEACAM20-Seren, die durch genetische Immunisierung generiert wurden (Eisenried, persönliche Mitteilung).

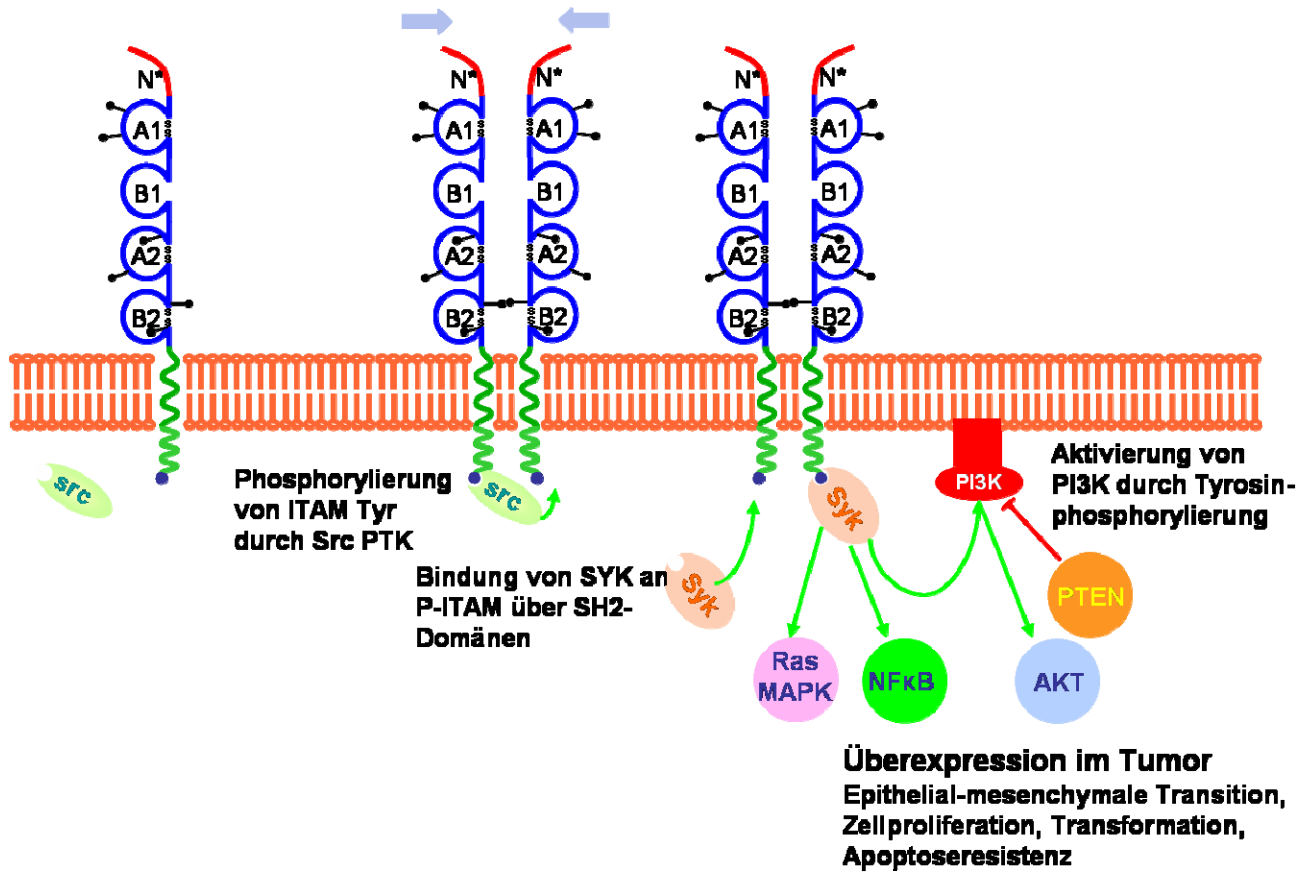
Als wichtige Besonderheit zeigt CEACAM20 im zytoplasmatischen Bereich eine ITAM-Konsensussequenz (im Einbuchstabenkode für Aminosäuren: E/DXXYXXI/LX<sub>(6-12)</sub>YxxI/L) (Zebhauser *et al.*, 2005), die stark konserviert ist, wie ein Vergleich in mehreren Spezies zeigt (Abbildung 1.4).



**Abb. 1.4: Vergleich der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 in sechs verschiedenen Spezies im Hinblick auf die ITAM-Konsensussequenz.** Rot gedruckt sind Aminosäuren, die in allen Spezies identisch sind, beispielsweise das ITAM. Grün und blau symbolisieren relativ gut konservierte Aminosäuren, während schwarze Aminosäuren unterschiedlich sind in den einzelnen Spezies. Neben dem ITAM befindet sich ein hypothetisches *GRB2-like SH2 domains binding motif* im zytoplasmatischen Bereich von CEACAM20, das ebenso stark konserviert ist (Kammerer und Zimmermann, unveröffentlicht).

ITAM-tragende Proteine werden vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Cambier, 1995; Haks *et al.*, 2001; Humphrey *et al.*, 2005; Mocsai *et al.*, 2006) und werden dort zur Immunrezeptor-vermittelten Aktivierung, Überleben und Differenzierung als Antwort auf ein Pathogen benötigt (Grande *et al.*, 2006). Zum ersten Mal identifiziert wurden ITAMs als homologe Sequenz verschiedener Signalproteine, die mit Lymphozyten- und Mastzell-Antigen-Rezeptorkomplexen assoziiert sind (Reth, 1989). Die Signaltransduktion nach Rezeptoraktivierung wird durch Proteintyrosinkinase (PTK) aus der SRC-Familie initiiert, zu denen FYN, LCK, LYN, HCK und BKL gehören. Die SRC-Kinasen phosphorylieren beide Tyrosine des ITAMs. An dieses doppelt-phosphorylierte ITAM können nun *Src homology 2 (SH2) domain-containing proteins* binden, beispielsweise SYK und ZAP-70, die durch diese Bindung aktiviert werden. Dadurch können sie sich selbst durch Phosphorylierung (in trans) sowie weitere Signalmoleküle aktivieren, wie zum Beispiel Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C (PLC), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *extra-cellular signal-related kinases* (ERKs), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und *nuclear*

*factor* (NF)- $\kappa$ B (Grande *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Daraus resultieren Zellaktivierung und Proliferation. Nach neuesten Ergebnissen konnten ITAM-tragende Proteine viralen Ursprungs identifiziert werden, deren ITAMs für die von ihnen vermittelte Transformation epithelialer Zellen funktionell verantwortlich sind. Dazu gehören das LMP2A (*latent membrane protein 2A*) des Epstein-Barr-Virus, das Env-Protein des MMTV (*mouse mammary tumor virus*) und das HHV8 K1 des Humanen Herpesvirus 8 (Scholle *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2001; Morrison und Raab-Traub, 2005; Katz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Grande *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006; Matskova *et al.*, 2007). Doch scheint diese Funktion des ITAMs nicht auf virale Proteine beschränkt zu sein. Grande *et al.* untersuchten dazu murine Brustepithelzellen und Fibroblasten, die ein rekombinantes Protein exprimieren, welches aus den zytoplasmatischen, ITAM-tragenden Regionen der B-Zell-Rezeptorkomplexkomponenten Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  besteht. Sie beobachteten ebenfalls eine Transformation der Zellen. Somit sind die Überexpression eines nicht-viralen, ITAM-tragenden Proteins ausreichend für eine Zelltransformation und diese Proteine als Onkoproteine in nicht-hämatopoetischen Zellen anzusehen (Grande *et al.*, 2006). Als Interaktionspartner der ITAM-tragenden Proteine wird die PTK SYK beschrieben. SYK besitzt zwei aminoterminalen SH2-Domänen. Die Aktivierung dieser PTK erfolgt über Assoziation der SH2-Domänen an ein durch SRC-PTK doppelt phosphoryliertes ITAM (Kurosaki *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 2004). Es kommt zur Autophosphorylierung von SYK, wobei die Phosphorylierung von zwei Tyrosinen von SYK wichtig für seine Kinaseaktivität ist (Kimura *et al.*, 1996; El-Hillal *et al.*, 1997). Als Interaktionspartner von SYK sind unter anderem Phospholipase Cy1, VAV-Proteine, CB1 und LYN beschrieben (Sidorenko *et al.*, 1995; Law *et al.*, 1996; Deckert *et al.*, 1996; Ota *et al.*, 1997). Übertragen auf CEACAM20 und unter Berücksichtigung der Expression von CEACAM20 in Magen- und Brusttumoren der Maus liegt die Vermutung nahe, dass CEACAM20 eine Rolle in der Onkogenese spielt. In Abbildung 1.5 ist diese Hypothese durch ein Schema der Signaltransduktion veranschaulicht.



**Abb. 1.5: Hypothetische Signaltransduktionswege von CEACAM20.** Nach Aktivierung von CEACAM20 kommt es zur Phosphorylierung der ITAM-Tyrosine durch SRC-Kinasen. An das phosphorylierte ITAM kann nun SYK über seine SH2-Domänen binden und wird dadurch aktiviert. Daraufhin werden durch das aktivierte SYK zahlreiche Signalkaskaden initiiert, die zur Tumorentstehung beitragen können. (Zimmermann, unveröffentlicht.)

## 1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

CEACAM20, ein kürzlich entdecktes Mitglied der CEA-Familie, wurde auf RNA-Ebene hauptsächlich in Dünndarm, normaler Prostata, Prostatakarzinomzelllinien sowie Prostatakarzinomgewebe exprimiert gefunden. Aufgrund seines zytoplasmatischen ITAM-Motivs liegt die Vermutung nahe, dass CEACAM20 eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren epithelialen Ursprungs, insbesondere des Prostatakarzinoms, spielt. Durch sein relativ spezifisches Expressionsmuster und seine eventuelle Lokalisation im apikalen Bereich von normalen Epithelzellen könnte es auf nicht polarisierten Tumorzellen zugänglich sein und so als mögliches Zielmolekül für eine Antikörper-basierte Immuntherapie dienen. Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung der Expression von CEACAM20 auf mRNA- und Proteinebene in Prostatakarzinomzellen und exemplarisch für andere Karzinome in Kolonkarzinomzellen sowie der Funktionalität seines intrazellulären ITAM. Des Weiteren sollen Wege der intrazellulären Signaltransduktion im Hinblick auf das ITAM identifiziert werden. Da für CEACAM20 keine kommerziellen Antikörper auf dem Markt zu erwerben sind, wurden in unserem Labor und durch die Firma Genovac (Freiburg) poly- und monoklonale Antikörper mittels genetischer Immunisierung hergestellt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen nun diese Antikörper charakterisiert werden, um sie für weitere Analysen wie Immunhistologie und Western Blot anwenden zu können. Durch Konstruktion eines CEACAM20-Expressionsvektors soll nach Transfektion von kultivierten Zelllinien die Phosphorylierbarkeit des ITAM-Motivs sowie eine mögliche Interaktion mit der Tyrosinkinase SYK untersucht werden. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen, die Funktion von CEACAM20 im Hinblick auf seine etwaige Rolle in der Karzinogenese und seine potentielle Eignung als Zielmolekül in der Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten zu klären.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

Agilent Bioanalyzer 2100, RNA 6000 Pico Chip	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Durchflusszytometer Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Elektrophoresekammer horizontal	Gibco BRL, Karlsruhe
ELISA Reader Multiskan RC	Thermo Labsystems, Langenselbold
Fluoreszenzmessgeräte Fusion™ 1420 VICTOR™	PerkinElmer Life and Analytical Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim
Geldokumentationssystem Fluor-S Multimager™	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Hypercassette™	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Inkubationsschrank	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Light Cycler®	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler Centrifuge Adapters™ und Kühlblock	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
MACSmix Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35	Zeiss, München
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Photokamera Nikon Eclipse E800 Digital Sight DS-5M-L1	Nikon, Düsseldorf
Pipettierassistent Pipetpoy acu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Schüttler CERTOMAT®H	B. Braun Biotech International, Melsungen
Sterilbank HERA safe HS12	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Sulzbach
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC200	MJ Research Inc., Watertown, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen: Präzisionswaage BP2100 Analysewaage MC1	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Julabo 19	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Westernblot XCell SureLock™ Electrophoresis Cell XCell II™ Blot Module Röntgenentwicklungsgerät Scopix LR5200	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe  Agfa, Köln
Zentrifugen DNA Speed Vac DNA110 MIKRO 20	Savant Instruments, New York Hettich AG, Bäch, Schweiz

Megafuge 2.0 Shandon Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau Thermo, Langenselbold Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
---	---

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Cell-Scraper	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Einfrierröhrchen CryoTube™ Vials	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Einmalhandschuhe Sempercare	Semperit Technische Produkte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich
FACS-Röhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kulturflaschen Nunclon™ Surface	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Kulturplatten Nunclon™ Surface	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Light Cycler® Capillaries (20 µl)	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml; Lid <sub>Bac</sub> )	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark Falcon, Heidelberg
Western Blot Detection Reagents Hyperfilm™ ECL NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Zellkulturplatten (6-well, 96-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Electrophoresis Grade	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Ampflex™	MoBiTec, Göttingen
Aquatex®	Merck, Darmstadt
BSA (Albumine bovine fraction V)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
DMEM, Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA-Größenmarker 1-kb-Leiter, 100-bp-Leiter (express) Hyper Ladder	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot Bioline, Luckenwalde
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Ethylaminocarbazol	Sigma, Taufkirchen
FACS flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FuGene 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Genticin (G418-Sulfat)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerin	VWR International GmbH, Darmstadt
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt



Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Nonidet® P40	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Orthovanadat	Sigma, Taufkirchen
PBS-Pulver	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein G Sepharose®, Fast Flow	Sigma, Taufkirchen
RNA 6000 Pico Marker	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Rotihistol® (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640, Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Tris-HCl	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	VWR International GmbH, Darmstadt

## 2.4 Antikörper

### *Polyklonales Serum*

Maus-Anti-CEACAM20-Serum	Andreas Eisenried, Labor für Tumorimmunologie (LTI), Klinikum Großhadern, Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU), München
--------------------------	--

### *Überstände*

Maus-Anti-CEACAM20 6G4A5	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 12D8	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 8B3G11	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 5B5	Andreas Eisenried, LTI, LMU, München
Maus-Anti-CEACAM20 17D7	Andreas Eisenried, LTI, LMU, München
Maus-Anti-CEACAM20 21G2	Andreas Eisenried, LTI, LMU, München

### *Nicht-konjugierte Antikörper*

Maus-Anti-beta-Aktin AC-74	Sigma, Taufkirchen
Maus-Anti-CD3 OKT-3	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Maus-Anti-CEACAM1/5 4/3/17	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM1/3/4/5/6 D14HD11	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 6G4A5	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 12D8A5	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-CEACAM20 8B3G11	Genovac, Freiburg
Maus-Anti-c-myc	Serotec, Düsseldorf
Maus-Anti-Phosphotyrosin-IgG <sub>2b</sub> 4G10	Upstate, Lake Placid, USA
Kaninchen-Anti-SYK (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

*Horse raddishperoxidase (HRP)-konjugierte Antikörper*

Pferd-Anti-Maus-Immunglobulin (Ig) HRP	Vector, Burlingame, USA
Kaninchen-Anti-Maus-Ig-HRP	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Schaf-Anti-Maus-Ig-HRP	Amersham, Bioscience, Buckinghamshire, UK
Esel-Anti-Kaninchen-Ig-HRP	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK

*Fluoreszenzmarkierte Antikörper*

Ziege-Anti-Maus-Ig-RPE	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Ziege-Anti-Maus-Ig-FITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

*Magnetic Cell Sorting (MACS) Antikörper*

Ziege-Anti-Maus-IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
--------------------------------	------------------------------------

**2.5 Oligonukleotide**

Alle Oligonukleotidsequenzen (humane Gene) sind in 5`-3`-Richtung angegeben.

Beta-actin 5` beta-actin 3`	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC
GAPDH 5` GAPDH 3`	AAGGTGAAGGTCCGAGTCAAC AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC
CEA20-5UT-HindIII-f	GATCAAGCTTACGGCCTGGCACACTGAAG
CEACAM20HindIII-f	ATGGGGCCTGCTGACTCAT
CEACAM20N-f	CCACCCAAAGTGAGGATGTT
CEACAM20A1-r	ATCTTGCCATCCTTGGACAG
CEACAM20A1c-f	ATTGTGTTCCATGAGCGCA
CEACAM20B1c-r	AGTACCCAGGCTGGACAGGT
CEACAM20A2-f	CCTGACCTGCCAAACCGTCAATCAG
CEACAM20A2-r	CTGATTGACGGTTTGGCAGGTCAGG
CEACAM20TM-r	GGATCCCGATGACAATACCA
CEACAM20TM-f	CATCGCTGGTATTGTCATCG
CEACAM20Cyt6-r	ACTGCTGCATCCCCAACA
CEACAM20Cyt5-r	GGCACAGTGGAGACCAATCT
CEACAM20Cyt4-r	CTCCTCTGGAAGGTCTGGTG
CEACAM20Cyt3-r	GACTCTGATCCGTCCCTGAA
CEACAM20Cyt2-r	GGGATGGGTTGTGAGGTCT
CEACAM20Ex12-r	GGCTCTGGATTCAACAAGCTC
CEA20UTR3-EcoRI-r	TATGAATTCATGGGAGCCAGGGCCTGAC
SYK-f SYK-r	ATGGAGATGGCAGAACTTGG CTTGACAGGCCACTTTCCAT

**2.6 Vektoren**

pcDNA3.0	Invitrogen, Karlsruhe
SYK-pcDNA3.1 Zeo	Prof. Barbara Walzog, LMU, München
pEGFP-C1	Clontech, Mountain View, USA

## 2.7 Enzyme und Kits

Antartic Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
DNA-Gelextraktion	Eppendorf, Hamburg
DNA Purification	Qiagen, Hilden
High-Fidelity-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
ImmPRESS™	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ligation	Promega, Mannheim
Light Cycler® FastStart DNA Master <sup>Plus</sup> SYBR Green I	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmid-Maxi-Prep	Qiagen, Hilden
Plasmid-Mini-Prep	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transkription	Promega, Mannheim
RNA 6000 Pico Kit	Technologies, Santa Clara, USA
RNA-Isolation	Qiagen, Hilden
BioTherm™ DNA-Polymerase	GeneCraft, Lüdingshausen

## 2.8 Bakterien

XL1-Blue Competent Cells	Stratagene, Amsterdam
--------------------------	-----------------------

## 2.9 Zelllinien

BOSC23	LTI, LMU, München
COS7	LTI, LMU, München
DU145	LTI, LMU, München
HeLa	LTI, LMU, München
LNCaP	LTI, LMU, München
PC3	LTI, LMU, München
22Rv1	LTI, LMU, München
THP-1	LTI, LMU, München

## 2.10 RNA

Arterie	BioChain Institute, Hingham, USA
CaCo2, +IL-1, +TNF $\alpha$ , +IFN $\gamma$ , + TNF $\alpha$ / IFN $\gamma$	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Dünndarm	BioChain Institute, Hingham, USA
Duodenum	BioChain Institute, Hingham, USA
Gehirn	BioChain Institute, Hingham, USA
Hoden	BioChain Institute, Hingham, USA
Hypophyse	BioChain Institute, Hingham, USA
Kolon	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Leber	BioChain Institute, Hingham, USA
Lunge	BioChain Institute, Hingham, USA
LS1742	Robert Kammerer, LTI, LMU München
Magen	BioChain Institute, Hingham, USA
Milz	BioChain Institute, Hingham, USA

Monozyten	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Ösophagus	BioChain Institute, Hingham, USA
Ovar	BioChain Institute, Hingham, USA
Pankreas	BioChain Institute, Hingham, USA
Plazenta	BioChain Institute, Hingham, USA
Prostata	BioChain Institute, Hingham, USA
RKO	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Speicheldrüse	BioChain Institute, Hingham, USA
SW403	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
T102, +IL-1, +IL-6, +TNF $\alpha$ , +IFN $\gamma$	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
TE6	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
Thymus	BioChain Institute, Hingham, USA
Uterus	BioChain Institute, Hingham, USA
W19	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
W25+	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
W25-	Robert Kammerer, LTI, LMU, München
W46/2	Robert Kammerer, LTI, LMU, München

### 2.11 Gewebeschnitte (Kryogewebe und Paraffin-eingebettetes Gewebe)

Dünndarm	Pathologie Großhadern, LMU, München
Kolon	Chirurgie Großhadern, LMU, München
Prostatakarzinom	Pathologie Großhadern, LMU, München über Dr. K. Ebelt, GSF, München
Prostatanormalgewebe	Rechtsmedizin, LMU, München über Dr. K. Ebelt, GSF, München

### 2.12 Software und Internetadressen

Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Network Protein Sequence @analysis	Pôle Bioinformatique Lyonnais
Primer3	Steve Lincoln, Mark Daly, and Eric S. Lander
Vektor NTI™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
WinMDI	Josef Trotter (Scripps, San Diego, CA, USA)

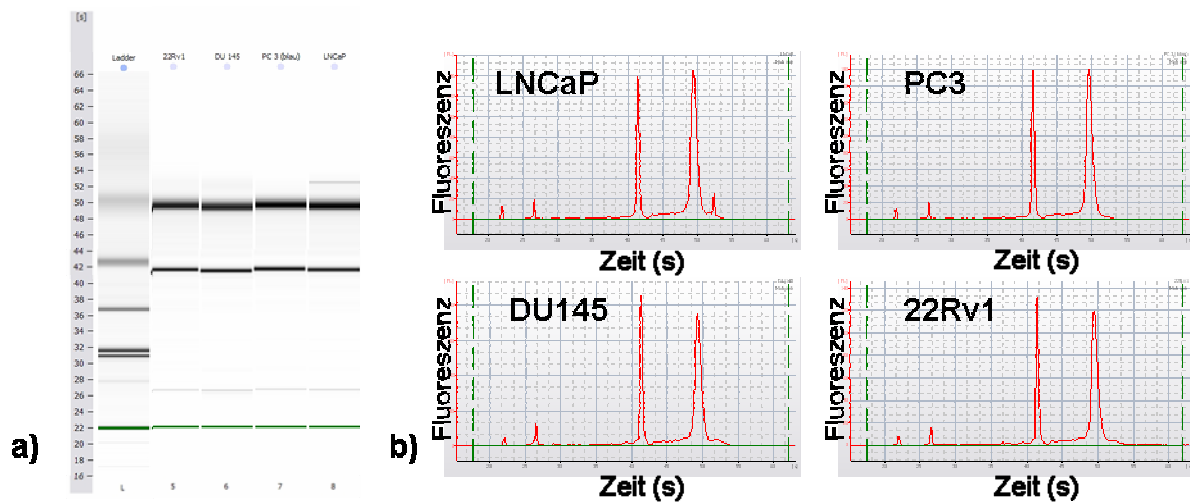
## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 RNA-Isolation und Qualitätsmessung

Zur Gewinnung von RNA diente Prostatakarzinomgewebe (zur Verfügung gestellt von Dr. Kathleen Ebelt) von sieben verschiedenen Patienten sowie Dünndarmnormalgewebe (zur Verfügung gestellt von Dr. Rainer Riesenberg). Das Gewebe, das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wird, wurde auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gebracht und anschließend im Gefriermikrotom (Leica CM3050 S) in 20-50  $\mu\text{m}$  dicke Stücke geschnitten, die zur weiteren Verarbeitung mit RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurden. Außerdem wurde RNA aus HeLa-Zellen sowie den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC3, DU145 und 22Rv1 isoliert. Dazu wurden jeweils  $10^5$  Zellen verwendet.

Die Isolation der RNA wurde mithilfe des RNeasy® Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angabe des Herstellers und unter Verwendung aller enthaltenen Reagenzien und Puffern durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde mittels Absorptionsmessung des Eluats bei 260 nm ermittelt. Die Qualitätsmessung der isolierten RNA wurde am Agilent Bioanalyzer 2100 mit dem RNA 6000 Pico Kit nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Kapillarelektrophorese und gleichzeitig eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, die auf einer laserinduzierten Fluoreszenz eines RNA-bindenden Cy-3-Farbstoffes beruht (Mueller *et al.*, 2000). Die Auswertung erfolgte mit der Software 2100 Expert im Eukaryote Total RNA Pico Assay Modus. Man erhält sowohl eine Konzentrationsangabe relativ zum eingesetzten RNA 6000 Picomarker (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und eine *RNA integrity number* (RIN) als Maß für die Qualität der RNA, die über das Verhältnis der 28 S rRNA zur 18 S rRNA der eingesetzten Probe berechnet wird (Schroeder *et al.*, 2006). Stellvertretend für alle untersuchten RNA-Proben ist in Abbildung 3.1 das Ergebnis der Prostatakarzinomzelllinien-RNAs dargestellt.



**Abb. 3.1: RNA-Qualitätskontrolle.** Die Kapillarelektrophorese gekoppelt mit fluoreszenz-basierter Quantifizierung wurde verwendet, um die Qualität von Gesamt-RNA der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC3, DU145 und 22Rv1 zu bestimmen. a) Geldarstellung, b) Diagramm-Darstellung der Fluoreszenzmessung.

RNA von Kolonkarzinomzelllinien, die nach Stimulierung der Zellen mit IL-1, IL-6,  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  isoliert wurde, wurde mir freundlicherweise von Dr. Robert Kammerer zur Verfügung gestellt.

### 3.1.2 Reverse Transkription der isolierten RNA

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Umschreibung der isolierten RNA in *complementary* DNA (cDNA). Als Primer dienten zufällige Kombinationen aus Desoxynukleotid-Hexameren (*random primers*). Die für diese Reaktion benötigten Komponenten wurden von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen.

Als erster Schritt wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA mit RNase-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 9  $\mu\text{l}$  verdünnt und bei 70°C 10 min denaturiert. Der Reaktionsansatz sowie die einzelnen Schritte der RT-PCR sind im Folgenden dargestellt.

#### RT-PCR-Ansatz:

Komponenten	Volumen
RNA-Matrize (1 $\mu\text{g}$ ) + RNase-freies $\text{H}_2\text{O}$	9 $\mu\text{l}$
RT-Puffer (10x)	2 $\mu\text{l}$
Random primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	4 $\mu\text{l}$
dNTP (je 10 mM)	2 $\mu\text{l}$
RNase-Inhibitor (RNasin) (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

AMV-Reverse-Transkriptase (25 U/ $\mu$ l)	0,6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

### Reaktionsbedingungen nach Denaturierung:

Versuchsschritte	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer (min)
Primeranlagerung	25	10
Verlängerung	42	60
Denaturierung	95	5

Im Anschluss an die RT-PCR wurde die erhaltene cDNA im Verhältnis 1:5 verdünnt.

### 3.1.3 Quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Quantifizierung der erhaltenen cDNA wurde eine RT-PCR mithilfe des Light-Cycler®-Systems (Roche, Mannheim) unter Verwendung des Light-Cycler® Fast-Start DNA Master<sup>Plus</sup> Sybr Green I-Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers (pro Kapillare 16  $\mu$ l Mastermix und 4  $\mu$ l DNA) durchgeführt. Der Farbstoff Sybr Green I fluoresziert nur, wenn er an doppelsträngige DNA (dsDNA) gebunden hat. Durch die Messung der Fluoreszenzzunahme kann der sogenannte *crossing point* (Cp) ermittelt werden, der dem messbaren Beginn der exponentiellen Produktzunahme entspricht und mit der Anfangskonzentration der eingesetzten cDNA invers exponentiell (proportional zu  $1/2^n$ ) korreliert. Dadurch kann eine Quantifizierung der Transkripte erfolgen. Zur Identifizierung des DNA-Produktes erfolgte im Anschluss an den letzten Elongationsschritt der PCR eine Schmelzkurvenanalyse, da jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur besitzt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte durch das Computerprogramm *Light-Cycler 3* (Version 5.32). Die Berechnung der relativen auf den  $\beta$ -Aktin-mRNA-Gehalt bezogene Menge erfolgte nach der Formel  $1/2^{C_{py}} : 1/2^{C_{px}} = 2^{C_{px}-C_{py}}$ , wobei x für den  $\beta$ -Aktin-Cp-Wert und y für den CEACAM20-Cp-Wert steht (Cp: *crossing point*).

### 3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Expressionsanalyse nach RT-PCR, zur Amplifikation und Einbau von Restriktionssequenzen am 5'- und 3'-Ende des Bereiches der cDNA, der für das Antigen kodiert, und in Form einer *nested* PCR zur Amplifikation eines PCR-Produkts

mit einer anderen Primerkombination verwendet. Als DNA-Polymerase diente zum einen die BioTherm™ DNA-Polymerase von GeneCraft (Lüdingshausen), zum anderen die zu *proof reading* befähigte *High-Fidelity*-Polymerase von Fermentas (St. Leon-Rot). Einige Primer, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, wurden mithilfe des Computerprogramms „Primer3“ (neue Version des Programms Primer 0.5 von Steve Lincoln, Mark Daly, and Eric S. Lander) entworfen. Die unterschiedlichen Primerkombinationen erforderten eine spezifische Temperatur und Zeitspanne zur Primeranlagerung aufgrund der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotide.

#### Standard PCR-Ansatz unter Verwendung der BioTherm™ DNA-Polymerase:

Komponenten	Volumen
cDNA 1:5 verdünnt mit H <sub>2</sub> O	5 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
Forward primer (10 pg/µl)	1 µl
Reverse primer (10 pg/µl)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
dNTP (je 25 mM)	0,5 µl
BioTherm™ DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,13 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

#### Standard PCR-Ansatz unter Verwendung der *High-Fidelity*-Polymerase:

Komponenten	Volumen
cDNA-Template 1:5 verdünnt mit H <sub>2</sub> O	5 µl
PCR-Puffer (10x) mit MgCl <sub>2</sub>	5 µl
forward primer (10 pg/µl)	2 µl
reverse primer (10 pg/µl)	2 µl
dNTP (25 mM)	0,4 µl
<i>High-Fidelity</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### Reaktionsbedingungen:

Versuchsschritte	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	95	2 min
Amplifikation (30 Zyklen)		
Denaturierung	94	30 s
Primeranlagerung	56-70	30-70 s*
Verlängerung	42	1-3 min*
Verlängerung	72	10 min

\* je nach Größe des Primers beziehungsweise des zu amplifizierenden Bereichs wurde die Zeit verändert



### 3.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Um die bei der PCR entstandenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen der DNA wandern die DNA-Fragmente zur Anode bei einer angelegten Spannung von 70-90 Volt. Zur optimalen Auftrennung wurde ein TAE-Agarosegel je nach erwarteter Größe in einer Konzentration zwischen 0,9-2% verwendet. Um die DNA-Fragmente in der UV-Transillumination sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2 µg/ml versetzt. Vor dem Auftrag der DNA-Fragmente wurde zu diesen eine entsprechenden Menge an einem 6x DNA-Auftragspuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) zugegeben. Der darin enthaltene Farbstoff diente als Einfüllhilfe und zur Sichtbarmachung der Elektrophoresefront. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Marker mitgeführt.

Bei präparativen Gelen wurde im Anschluss an die Gelelektrophorese die gewünschte DNA-Bande mithilfe eines Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### 3.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die aus dem Agarosegel herausgeschnittene DNA-Bande wurde gewogen (maximales Gewicht beträgt 400 mg) und unter Verwendung des *Perfect Prep Gel Cleanup Kits* (Eppendorf, Hamburg) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

### 3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau des Vektors und des PCR-Produkts erfolgte mithilfe der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* der Firma New England Biolabs (Schwalbach) unter Verwendung des empfohlenen Puffers (Tango).

#### Restriktionsansatz:

Komponenten	Volumen
DNA (1 µg)	1 µl
10x Puffer	1 µl
<i>HindIII</i> (10 U/µl)	0,5 µl
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend 20 min bei 65°C inaktiviert.

### 3.1.8 DNA-Dephosphorylierung

Um die Phosphatgruppen am 5'-Ende des geschnittenen Vektors zu entfernen und somit eine Religation zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung mithilfe der *antartic phosphatase* (New England Biolabs, Schwalbach) durchgeführt.

#### Dephosphorylierungsansatz:

Komponenten	Volumen
Vektor	19 µl
10x Puffer	2,2 µl
<i>antartic phosphatase</i> (5 U/µl)	1 µl

### 3.1.9 DNA-Aufreinigung

Im Anschluss an den Restriktionsendonukleaseverdau der PCR-Fragmente und der Dephosphorylierungsreaktion des Vektors erfolgte eine Reinigung der cDNA mittels des *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers.

### 3.1.10 Ligation

Für die Ligation wurde das *Rapid Ligation Kit* von Promega (Mannheim) verwendet. Nach Abschätzen der DNA-Menge nach Agarosegelelektrophorese anhand der *Hyper Ladder* (Bioline, Luckenwalde) wurden Vektor und das zu integrierende DNA-Fragment (*insert*) im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde anstatt des *inserts* Wasser zugegeben. Der Ligationsansatz wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Ligationsansatz:

Komponenten	Volumen
Vektor (140 ng)	2 µl
<i>Insert</i> (155,6 ng)	9,3 µl
2x Rapid Ligation Buffer	15 µl
T4-DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl

H <sub>2</sub> O	ad 30 µl
------------------	----------

### 3.1.11 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation wurde mithilfe des kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Stamms der Firma Stratagene (La Jolla, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zu jeweils 25 µl des Bakterienstamms wurden in drei Ansätzen folgende Komponenten zugegeben:

- a) Ligationsansatz
- b) pUC18 (Positivkontrolle)
- c) Ligationsansatz mit Wasser anstatt eines *inserts* (Negativkontrolle).

Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert, für 45 s in einem 42°C warmen Wasserbad hitzegeschockt und anschließend erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Daraufhin wurde jeder Ansatz auf Agar-Platten (hergestellt aus LB-Medium, 1,5% Select Agar und Ampicillin in einer Konzentration von 1 µl/ml Agar) transferiert und für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 3.1.12 Kolonie-PCR

Um die Anwesenheit des *inserts* nach Ligation und Transformation zu überprüfen, erfolgte eine Kolonie-PCR. Statt einer gereinigten DNA als Matrize wurden einzelne Bakterienkolonien direkt verwendet, die hierfür mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und anschließend in den PCR-Ansatz abgestreift wurden. Das Pipettierschema gleicht dem Ansatz einer PCR mit Taq-Polymerase von GeneCraft (Lüdingshausen) (siehe Kapitel 3.1.3). Die Analyse erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

### 3.1.13 Herstellen von *E. coli*-Dauerkulturen

Für die Aufbewahrung der Klone wurden diese über Nacht bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer angezüchtet und anschließend 470 µl der Bakteriensuspension mit 100 µl 87%-igem autoklaviertem Glycerin versetzt und in einem Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

### 3.1.14 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein mit LB-Medium und Ampicillin gefülltes 2 ml Eppendorf-Lidbac-Gefäß überführt, welches einen luftdurchlässigen Membrandeckel besitzt und somit für die Anzucht von Bakterien geeignet ist. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 500 rpm in einem Thermomixer. Anschließend konnte eine Plasmidpräparation mithilfe des *Qiaprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt werden.

Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt, beispielsweise zur Transfektion eukaryontischer Zellen, erfolgte eine Inkubation der Bakterienkolonien in 250 ml LB-Medium und Ampicillin über Nacht und anschließend eine Plasmidpräparation mittels *QIAfilter Plasmid Maxi Kits* von Qiagen (Hilden) gemäß Herstellerangaben.

### 3.1.15 Konzentrationsbestimmung und Reinheit der DNA

Die Konzentration der DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei 260 nm in einem Photometer ermittelt. Das Verhältnis der Messung bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA und sollte >1,8 betragen. Niedrigere Werte zeigen eine Verunreinigung mit Proteinen an.

### 3.1.16 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die MWG Biotech (Martinsried) nach der Sequenzierungsmethode nach Sanger (*Sanger et al., 1977*) mithilfe von Didesoxyribonukleotiden. Dazu wurde die Plasmid-DNA (1 µg) vor dem Versand in einer Speed-Vac-Zentrifuge (10 min bei mittlerer Erwärmung) eingedampft. Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit in NCBI veröffentlichten Sequenzen mithilfe des Programms NCBI Blast verglichen.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller verwendeter Zelllinien (COS7, HeLa, BOSC23, LNCaP, PC3, DU145 und 22Rv1) erfolgte in einem humidifizierten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Kulturflaschen oder -platten mit einem Standard-Medium (RPMI oder DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin). Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die adhärennten Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA gelöst (3 min Inkubation bei 37°C). Durch Zugabe von frischem Medium wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Zentrifugation bei 340x g für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen wurde 1x10<sup>6</sup> Zellen pro 25-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche neu angesetzt. Die semiadhärennten Zellen (BOSC23) wurden durch wiederholtes Aspirieren des Mediums von der Zellkulturplatte gelöst, zentrifugiert, gezählt und anschließend mit 1x10<sup>6</sup> Zellen neu angesetzt.

### **3.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Anzahl lebendiger Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Zur Identifizierung toter Zellen wurden diese mit 0,4% Trypanblau angefärbt, das in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben wurde. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergibt sich aus dem Produkt der mittleren Zellzahl pro Großquadrat, dem Verdünnungsfaktor und der Zahl 10<sup>4</sup>.

### **3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

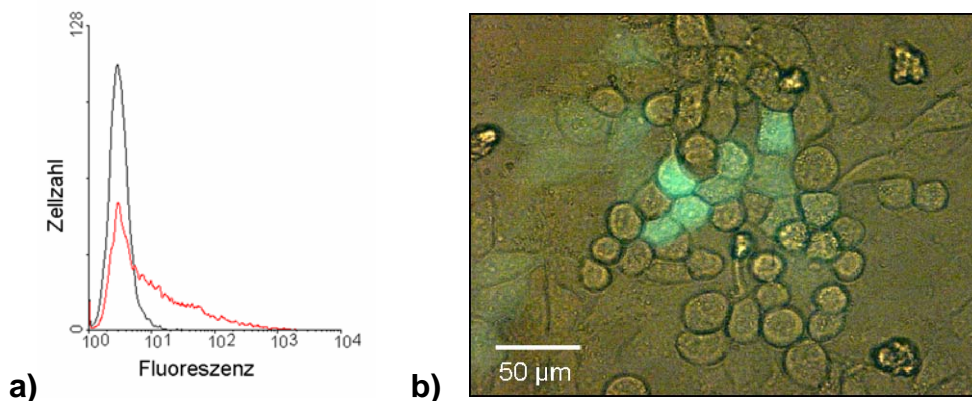
Die verwendeten Zellen wurden in einer Konzentration von 5x10<sup>6</sup> pro ml eines speziellen Einfriermediums (FCS, 10% DMSO steril) eingefroren. Dazu wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 340x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die in ein Kryoröhrchen überführten Zellen bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden Zellen dem Stickstofftank entnommen und rasch in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und solange inkubiert, bis sich das Medium verflüssigt hatte. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10 ml 37°C warmen Mediums in einem 50 ml Röhrchen verdünnt und bei Raumtemperatur und 340x g zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die Suspension in eine 10-cm<sup>2</sup>-, 25-cm<sup>2</sup> oder 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche transferiert.

### 3.2.4 Transiente Transfektion von Kulturzellen

Zur Expression des gewünschten Proteins wurden COS7-, BOSC23- oder HeLa-Zellen mit einem entsprechenden Expressionsvektor transient transfiziert. Dies erfolgte mithilfe des FuGene6-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) im Falle der COS7- und HeLa-Zellen. Für die BOSC23-Zellen wurde Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. In beiden Fällen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro *well* einer *six-well*-Platte über Nacht inkubiert. Bei der Lipofektion unter Verwendung von FuGene6 wurde anschließend pro *well* ein Transfektionsansatz aus 97  $\mu$ l serumfreiem Medium, 3  $\mu$ l FuGene6-Reagenz und 1  $\mu$ g DNA zugegeben und 24 h oder 48 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz für die Lipofektion mit Lipofectamine 2000™ pro *well* bestand aus 500  $\mu$ l DMEM, 4  $\mu$ g DNA und 4  $\mu$ l Lipofectamine 2000™ und wurde ebenfalls nach Zugabe zu den Zellen 24 h oder 48 h inkubiert. Der Erfolg der transienten Transfektion wurde mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit einem GFP-Expressionsvektor (pEGFP-C1) bestimmt (siehe Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Überprüfung der Effizienz von transienten Transfektionen.** HeLa-Zellen wurden mittels FuGene6-Reagenz mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFP-C1 transient transfiziert und durch (a) FACSscan (rote Kurve: transfizierte Zellen mit GFP-Expressionsvektor; schwarze Kurve: Negativkontrolle mit nicht-transfizierten HeLa-Zellen) und (b) Fluoreszenzmikroskopie auf Anwesenheit von GFP-exprimierenden Zellen hin untersucht.

### 3.2.5 Stabile Transfektion von Kulturzellen

Um einen möglichen Einfluss von CEACAM20 auf das Wachstumsverhalten von Kulturzellen untersuchen zu können, wurden COS7-Zellen mit einem CEACAM20-

Expressionsvektor stabil transfiziert. Dazu wurden die Zellen wie bei einer transienten Transfektion vorbereitet (Kapitel 3.2.4) und mit FuGene6-Reagenz nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Selektion der CEACAM20-exprimierenden COS7-Zellen erfolgte mittels MACS-Technik (Kapitel 3.3.2) und G418-Behandlung (G418-Sulfat, GibcoBRL, Karlsruhe). Die MACS-Selektion wurde zweimal im Abstand von 5 Tagen, die Selektion mittels G418-Zugabe ins Medium über 5 Wochen durchgeführt. Der Erfolg der Transfektion wurde in der Durchflusszytometrie analysiert und dokumentiert.

### 3.2.6 Erstellen einer Wachstumskurve von stabil transfizierten Kulturzellen

In einer *six-well*-Platte wurden pro well  $5 \times 10^4$  CEACAM20 exprimierende Zellen nach stabiler Transfektion (Kapitel 3.2.5) in 2 ml Medium angesetzt und im Brutschrank kultiviert. Als Kontrollen wurden nicht-transfizierte und Vektor-transfizierte Zellen mitgeführt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen gezählt und erneut in 2 ml frischem Medium ausplattiert, ebenso nach 3, 4 und 5 Tagen. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen und ausgewertet. Die Berechnung der Verdopplungszeit erfolgte mithilfe der Regressionsgeraden und der Formel  $N_t = N_0 e^{\lambda t}$  für exponentielles Wachstum ( $N_0$  = Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $N_t$  = Wert zum Zeitpunkt  $t$ ,  $e$  = Eulersche Zahl und  $\lambda$  = Zerfallskonstante).

### 3.2.7 Herstellung von Zytospins

Zur Herstellung von Zytospins wurden COS7-Zellen transient transfiziert (Kapitel 3.2.4), gewaschen, trypsiniert und gezählt. Pro Objektträger werden  $4 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l benötigt. Für einen Schleudergang in der Shandon-Zentrifuge (Thermo, Langenselbold) wurden 12 Objektträger mit insgesamt  $0,5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die Zytospins an der Luft getrocknet und bis zur immunhistologischen Färbung (siehe Kapitel 3.3.6) bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.2.8 Pervanadat-Behandlung von Kulturzellen

Nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit CEACAM20-Expressionsvektor (Kapitel 3.2.4) wurden die Zellen mit Pervanadat behandelt, einem Phosphatase-

Inhibitor. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen zugunsten der Kinasen verschoben, so dass die Phosphorform von phosphorylierbaren Proteinen akkumuliert.

Pervanadat wurde bei jeder Behandlung neu angesetzt. Dazu wurden zu 2 ml H<sub>2</sub>O 18 mg Natriumorthovanadat zugegeben. Um Pervanadat zu erhalten, wurden 7,6 ml H<sub>2</sub>O, 1,9 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,5 ml der zuvor angesetzten Vanadat-Lösung vermischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Pro *well* einer *six-well*-Platte wurden nun 2 ml serum-freies Medium und 40 µl Pervanadat zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, mit einem *cell-scraper* (Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark) von der Platte abgekratzt, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und bei 340x g für 3 min zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit vanadat-versetztem Medium gewaschen, in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und anschließend lysiert (siehe Kapitel 3.2.9).

### 3.2.9 Lyse der Zellen

Das Zellpellet wurde in einem Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% Nonidet P40 (NP-40), 1 Protease-Inhibitoren Cocktail Tablette *complete mini* pro 10 ml Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim), 50 mM NaF, 1 mM Natriumorthovanadat) resuspendiert, für 10 min auf Eis lysiert und bei 500x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein beschriftetes Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Bei Prostatagewebeproben wurde das Gewebe durch mehrfaches Auf- und Ab-Pipettieren im Lysepuffer suspendiert und anschließend auf Eis lysiert.

### 3.2.10 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde in einer 96-*well*-Rundbodenplatte eine BSA-Verdünnungsreihe in Wasser von 2 µg/µl bis 0,125 µg/µl (BioRad, München) zur Erstellung einer Eichkurve pipettiert. Außerdem wurden Aliquots von den zu bestimmenden Proteinproben aufgetragen. Die Proben wurden je nach erwarteter Konzentration 1:1, 1:2, 1:5 oder 1:10 mit Wasser verdünnt. Sowohl die Verdünnungsreihe als auch alle Proben wurden für eine Mittelwertbestimmung doppelt aufgetragen, um



Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. In jedes *well* wurden nun 80 µl *BCA™* Reagenz (*BCA™ Protein Assay Kit*, Pierce, Rockford, USA), das 1:50 verdünnt wurde, pipettiert und anschließend die Platte 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben im *ELISA-Reader* mit dem Programm *Ascent Software 2.42* (Wellington, Neuseeland) ausgewertet.

### 3.3 Immunologische Methoden

#### 3.3.1 *Magnetic cell sorting* (MACS)

Mithilfe des *magnetic cell sortings* können transfizierte Zellen anhand des Antigens, das sie exprimieren, selektioniert werden. Dies erfolgt über sogenannte *MicroBeads*, bestehend aus etwa 50 nm großen Magnetpartikeln und Antikörpern, die entweder Zelloberflächenmoleküle oder an das exprimierte Antigen gebundene Antikörper erkennen. Die Selektion erfolgt durch ein Magnetfeld, das die mit *MicroBeads* markierten Zellen zurückhält. Dazu wurden transient transfizierte Zellen (Kapitel 3.2.4) mit einem spezifischen Erstantikörper (1:5 verdünnt in MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA)) 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Beladung des Zellpellets mit *MicroBeads* (Anti-Maus-IgG, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), eine erneute Inkubation von 15 min bei 4°C und ein Waschschritt. Die Zellsuspension wurde nun in eine MACS-Säule pipettiert, die in einem Magnetfeld stand. Durch Spülen der Säule mit Puffer wurden die nicht markierten Zellen entfernt. Nach Herausnahme der Säule aus dem Magnetfeld konnten die markierten Zellen gewonnen werden.

#### 3.3.2 Zellbasierter ELISA (CELISA)

Die Überstände und Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, wurden durch die Firma Genovac oder durch Andreas Eisenried, Doktorand im Labor für Tumorimmunologie der LMU München, mittels genetischer Immunisierung generiert (Beschreibung der Methode siehe Dissertation von Andreas Eisenried, LMU München).

Zur Testung der Hybridomüberstände auf die Anwesenheit von CEACAM20-spezifischen Antikörpern wurde ein sogenannter *cell based enzyme-linked immuno-*

*sorbent assay* (CELISA) durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen transient mit einem CEACAM20-Expressionsvektor transfiziert (Kapitel 3.2.4) und auf eine 96-*well*-Zellkulturplatte aus schwarzem Polypropylen (zur Vermeidung von Streulicht) ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen mit 300  $\mu$ l PBS/1% BSA pro *well* für 1 h bei 37°C zur Blockierung inkubiert. Nach Entfernen des PBS/1% BSA wurden 50  $\mu$ l der einzelnen Hybridomüberstände pro *well* zu den Zellen pipettiert. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 (26  $\mu$ g/ml) und als irrelevanter Antikörper ein Anti-c-myc-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) mitgeführt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden 50  $\mu$ l HRP-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (1:5000 verdünnt) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 50  $\mu$ l *Amplex*® *Red* Reagenz (MoBio-Tec, Göttingen) markiert. Die jeweils frisch angesetzte Färbelösung bestand aus 25  $\mu$ l einer 10 mM *Amplex*® *Red*-Lösung und 50  $\mu$ l einer 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in 10 ml *Amplex*® *Red*-Reaktionspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 1 h im Dunkeln erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Fluoreszenzmessgerät VICTOR™.

### 3.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Als weitere Methode zur Analyse von Hybridomüberständen und monoklonalen Antikörpern wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Nach transienter Transfektion von Kulturzellen (Kapitel 3.2.4) wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* einer 96-*well*-Rundbodenplatte in einem Volumen von 150  $\mu$ l ausgebracht und zweimal mit FACS-Puffer (PBS, 1% BSA, 1% NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Anschließend wurden Hybridomüberstände (unverdünnt) beziehungsweise Erstantikörper (26  $\mu$ g/ml) in einem Volumen von 25  $\mu$ l zu den Zellen pipettiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Azidpuffer (Zugabe von 200  $\mu$ l Azidpuffer und Zentrifugation bei 340x g für 5 min) wurde ein Phycoerytrin (PE)- oder ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml und 25  $\mu$ l/*well* zugegeben und ebenfalls für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde das Zellpellet in 150  $\mu$ l Azidpuffer aufgenommen, in ein Messröhrchen überführt und mit 50  $\mu$ l Propidiumjodidlösung (4  $\mu$ g/ml) zur Markierung toter Zellen versetzt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer bei einer Flussrate von

1000 Zellen/s, die Auswertung mithilfe der *WinMDI 2.8* Software von Joseph Trotter (Scripps, San Diego, CA, USA).

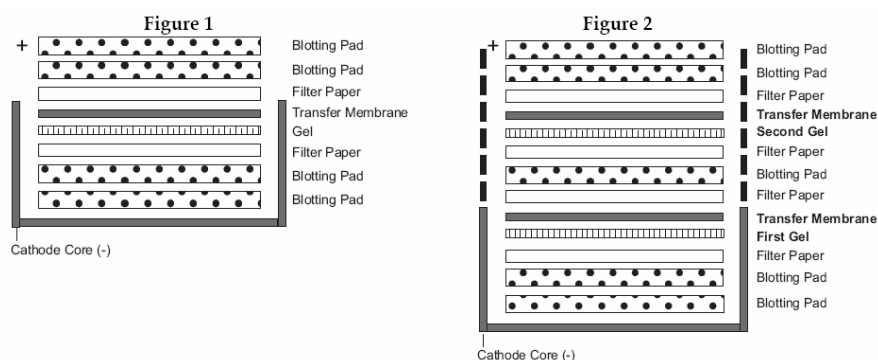
### 3.3.4 Western Blot

Als Methode zur Proteinanalyse wurde der Western Blot verwendet. Dazu wurden Zellen transient transfiziert (Kapitel 3.2.4), je nach Versuch mit Pervanadat behandelt (Kapitel 3.2.8) und lysiert (Kapitel 3.2.9).

Pipettierschema der Proteinproben:

Komponente	Menge/Volumen
Proteinprobe	20 µg
Auftragspuffer (NuPAGE® LDS <i>sample buffer</i> )	5 µl
0,5 M Dithiothreitol (DTT)	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Proteinproben wurden durch Vortexen vermischt, kurz anzentrifugiert und daraufhin bei 95°C für 5 min erhitzt. Nach erneutem Anzentrifugieren konnten die Proben in einem Gradientengel (4-12% Bis-Tris-Gel, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen werden. Zum Größenvergleich wurde stets ein Marker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad, München) mitgeführt. Die Proteine wurden 15 min bei 90 V und 2 h bei 130 V aufgetrennt und anschließend bei 200 mA 1 h auf eine Transfermembran geblottet. Der Aufbau des Blottes ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abb. 3.2:** Schema für den Aufbau zum Proteintransfer mit einem (links) und zwei Gelen (rechts).

Nach dem Vorgang des Blottens wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blotmilch (50 ml 10x PBS, 25 mg Milchpulver, 500 µl Tween 20, H<sub>2</sub>O ad 500 ml) geblockt. Am

nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (je nach verwendetem Antikörper in einer Konzentration zwischen 1-40 µg/ml) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten (Zugabe von Blotmilch für 10 min und Mischen auf dem Schüttler CERTOMAT®H, anschließendem Entfernen und Zugabe frischer Blotmilch) wurde als Zweitantikörper ein Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000 zur Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit PBS/0,1% Tween gespült und mit 500 µl/Membran *Amersham-Detection*-Reagenz 1 min inkubiert. Die Belichtung erfolgte in einer *Hypercassette*<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) in der Dunkelkammer für 0,5-30 min, die Entwicklung im Röntgenentwicklungsgerät Scopix LR5200 (Agfa, München).

### 3.3.5 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation kann ein Antigen, je nach Versuch zusammen mit einem Interaktionspartner, mittels eines spezifischen Antikörpers aus dem Lysat (Kapitel 3.2.9) von Kulturzellen nach Transfektion (Kapitel 3.2.4) oder von Gewebe gefangen und anschließend im Western Blot (Kapitel 3.3.5) durch einen weiteren spezifischen Antikörper detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Immunpräzipitation mithilfe von Protein-G-Sepharose® (Sigma, Taufkirchen) durchgeführt. Die Beads wurden mit eiskaltem Lysepuffer 1 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF) mehrmals gewaschen und anschließend mit einem Antikörper für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer 2 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% NP-40, 1 Protease-Inhibitoren Cocktail Tablette *complete mini* pro 10 ml Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim), 50 mM NaF, 1 mM Na-Orthovanadat) erfolgte die Immunpräzipitation mittels 40 µl Bead-Suspension unter Verwendung von 100-250 µg Protein im Lysat, das mit PBS zu einer Konzentration von 0,5-1,0 µg Protein/µl verdünnt wurde. Die Inkubation über Nacht erfolgte bei 4°C unter Rotation. Nach erneutem Waschen mit Lysepuffer 2 wurden die Proteinproben analog der Beschreibung in Kapitel 3.2.6 (Western Blot) aufbereitet und anschließend bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

### 3.3.6 Immunzytologie und -histologie

Die Immunzytologie wurde in dieser Arbeit verwendet, um Zytospins von transfizierten Kulturzellen (Kapitel 3.2.7) und Prostatakarzinomzelllinien auf die Anwesenheit von CEACAM20 zu untersuchen. Zur Analyse von Anwesenheit und Lokalisation von CEACAM20 in Prostata- und Dünndarmgewebeschnitten wurde die Immunhistologie als Methode gewählt. Das verwendete Gewebe lag in Form von Kryo- und Paraffinschnitten vor (zur Verfügung gestellt durch die Pathologie Großhadern sowie durch die Rechtsmedizin der LMU).

- Bei **Kryoschnitten** wurde zuerst eine Acetonfixierung (Aceton, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Nach drei Waschschritten mit PBS folgte eine Peroxidaseblockierung mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100% Methanol/PBS für maximal 5 min. Nach erneutem dreimaligem Waschen und einer Blockierung mit AB-Serum für 20 min wurde der Erstantikörper (Konzentration 20 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (Negativkontrolle mit MOPC-Antikörper 10 µg/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (1:100 verdünnt) für 30 min. Anschließend wurde dreimal gewaschen, die Peroxidasefärbung (90% Ethylaminocarbazol, 99% Dimethylformamid, Acetat-Puffer (pH 5,2) und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 15 min und die Gegenfärbung mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt) für 30 s durchgeführt. Nach dem Eindeckeln mit Aquatex® (Merck, Darmstadt) konnten die gefärbten Schnitte im Mikroskop analysiert werden.
- Bei **Paraffinschnitten** wurde zuerst eine Entparaffinierung mit Xylol (Rotihistol®, Roth, Karlsruhe) und eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96% und 75% Ethanol) und dann in Aqua dest. durchgeführt. Anschließend folgte ein *Retrieval* mit Tris/EDTA pH 9,0 (*Target Retrieval Solution*, DakoCytomation, Glostrup Denmark), um die Epitope des Antigens für die Antikörperbindung zugänglich zu machen. Nach drei Waschschritten und Peroxidaseblockierung (PBS, 90% Methanol und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) folgte der Proteinblock mit 2,5% Pferdeserum (ImmPRESS®, Vector, Burlingame, USA). Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Konzentrationen 6 µg/ml, 20 µg/ml und 50 µg/ml) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer (Negativkontrolle mit MOPC-Antikörper 10 µg/ml). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit HRP-gekoppeltem Pferd-Anti-Maus-Antikörper (ImmPRESS®, Vector, Burlingame, USA) für 30 min inkubiert. Nach drei Waschschritten folg-

te die Peroxidasefärbung (90% Ethylaminocarbazol, 99% Dimethylformamid, Acetat Puffer (pH 5,2) und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und die Hämalaun-Gegenfärbung. Nach dem Eindeckeln wurden die gefärbten Schnitte im Mikroskop analysiert und dokumentiert durch die Bildkamera (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35, Zeiss, München).

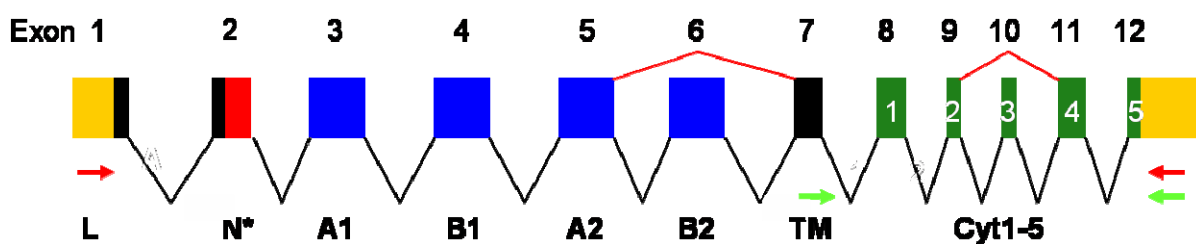
- **Zytospins** wurden ebenfalls mit ImmPRESS® (Vector, Burlingame, USA) gefärbt (Technik siehe oben).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Expression von CEACAM20

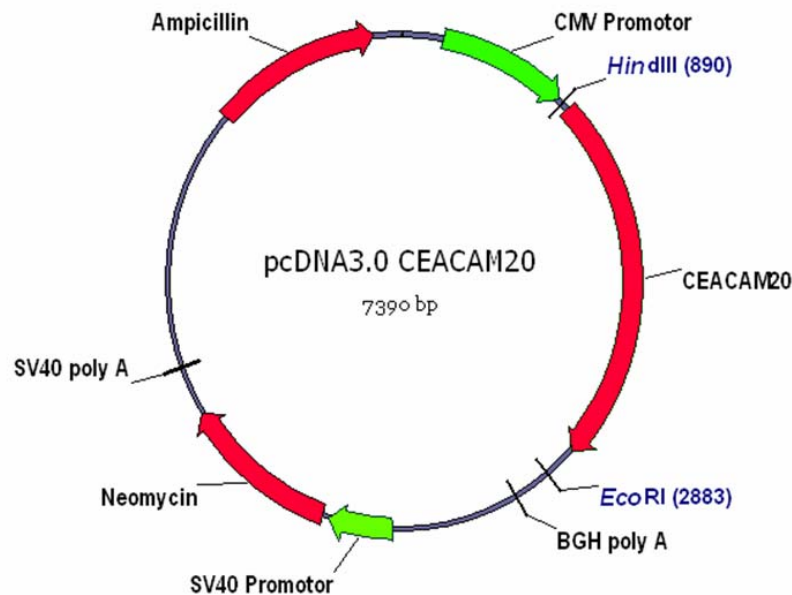
#### 4.1.1 Klonierung der CEACAM20-cDNA und Nachweis verschiedener Spleißvarianten von CEACAM20 auf RNA-Ebene

Für Expressions- und Funktionsanalysen von CEACAM20 wurde ein Expressionsvektor benötigt. Außerdem sollten mögliche Spleißvarianten von CEACAM20 untersucht werden, da dieses Phänomen bei Mitgliedern der CEA-Familie, beispielsweise für CEACAM1 (Singer *et al.*, 2002), bekannt ist. Zur Klonierung der CEACAM20-cDNA wurde aus humanem Dünndarmgewebe isolierte Gesamt-RNA in cDNA mittels RT umgeschrieben und anschließend eine PCR mit einer *High-Fidelity*-Polymerase zur Gewinnung der CEACAM20-Full-Length-cDNA durchgeführt. Zur Substanzvermehrung erfolgte eine *nested* PCR. Dazu wurden nach Amplifikation und Gelelektrophorese die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten, die DNA extrahiert, gereinigt und erneut mit veränderter Primerkombination unter sonst gleichen Bedingungen amplifiziert. Die Primer wurden hierfür im 5'- und 3'-nicht-translatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) gewählt, um die gesamte cDNA mit einer errechneten Größe von 1886 Basenpaaren (bp) zu erhalten (Abbildung 4.1, schematische Darstellung des CEACAM20-Gens, rote Pfeile stellen die Primer dar).



**Abb. 4.1: Amplifikations- und Nachweisstrategie von CEACAM20-cDNA-Spleißvarianten.** Die Primerpositionen für die Amplifikation der CEACAM20-cDNAs sind durch Pfeile in der schematischen Exondarstellung des CEACAM-Gens markiert. Jedes Kästchen symbolisiert ein Exon, dessen Benennung darunter und deren zugehörige Exonnummer darüber aufgeführt sind. Die roten Pfeile stellen die Primerpositionen für die PCR zur Generierung des Full-Length-Klons dar, die grünen Pfeile die Primerpositionen für die PCR-Analyse der für den zytoplasmatischen Bereich kodierenden cDNA. Die roten Linien von A2 zu TM und von Cyt2 zu Cyt4 stellen die beobachteten Spleißereignisse dar. Die Exonen kodieren für L, leader; N\*, „verstümmelte“ N-Domäne; A1,2, B1,2, IgC-Domänen vom Subtyp A, B; TM, Transmembrandomäne; Cyt1-5, zytoplasmatische Bereiche 1-5.

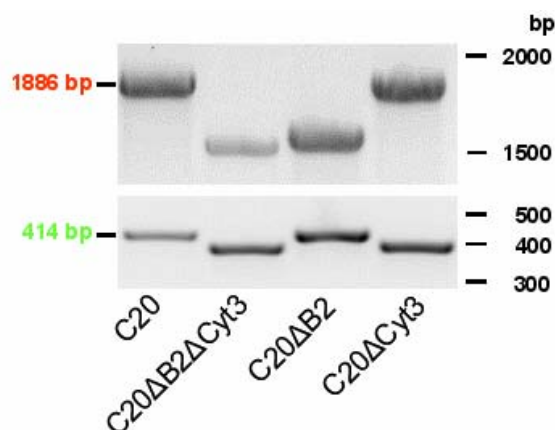
Den verwendeten Primern wurden Restriktionsschnittstellen (*Hind*III und *Eco*RI) für den Einbau in das Plasmid pcDNA3.0 angehängt. Nach erfolgter Ligation des *inserts* in das Plasmid (Abbildung 4.2) wurden XL1-Blue-kompetente Bakterien transformiert und einzelne Klone gepickt.



**Abb. 4.2: CEACAM20-Expressionsvektoren.** CEACAM20-cDNAs wurden durch *nested* RT-PCR mit Hilfe von RNA aus Dünndarmgewebe amplifiziert und in pcDNA3.0 kloniert. Es sind nur die für die Klonierung relevanten Restriktionseendonukleaseschnittstellen eingezeichnet. Es ist stellvertretend der *full-length*-CEACAM20-Expressionsvektor gezeigt. CMV, Cytomegalievirus; BGH poly A, *bovine growth hormone* Polyadenylierungssignal; SV40, Simian Virus 40.

Als Nachweis für die korrekte Integration von CEACAM20-cDNA in das Plasmid wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Es zeigten sich PCR-Produkte in vier verschiedenen Größen (Abbildung 4.3 oben, rot dargestellt die für *full-length*-CEACAM20-cDNA erwartete Größe von 1886 bp). Zur genaueren Analyse erfolgte eine PCR des zytoplasmatischen Bereiches (Primer in der Transmembrandomäne und in der 3'-UTR, in Abbildung 4.1 grün dargestellte Pfeile). Die erwartete Größe von 414 bp (in Abbildung 4.3 grün dargestellt) wurde von zwei PCR-Produkten erreicht, zwei weitere zeigten eine um etwa 40 Nukleotide geringere Größe.





**Abb. 4.3: Nachweis der Spleißvarianten von CEACAM20 mittels PCR.** Selektierte cDNA-Klone wurden durch eine *full-length*-PCR und eine den zytoplasmatischen Bereich umfassende PCR näher charakterisiert (Primer siehe Abbildung 4.1). Es zeigen sich vier verschiedene CEACAM20-Varianten mit Deletionen sowohl in den für den extra- als auch für den intrazellulären Bereich kodierende Regionen. Oben aufgeführt das Ergebnis der *full-length*-Klon-PCR mit einer erwarteten Größe des ungespleißten Produkts von 1886 bp, unten das Ergebnis der PCR über den intrazellulären Bereich mit einer berechneten Größe von 414 bp bei Abwesenheit von Spleißen. C20, CEACAM20;  $\Delta$ , Exonsequenz ausgespleißt.

Durch Sequenzierung wurden die erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Es handelt sich um verschiedene Spleißvarianten von CEACAM20-mRNAs, wobei extrazellulär der kodierende Bereich für die B2-Domäne fehlen kann, intrazellulär der kodierende Bereich für den zytoplasmatischen Bereich 3 (Cyt3). In Tabelle 4.1 sind die systematische Bezeichnung (Beauchemin *et al.*, 1999) und die *accession numbers* zusammengestellt.

Spleißvariante	systematische Bezeichnung	accession number
CEACAM20 <i>full length</i>	CEACAM20-5L	EU008600
CEACAM20 $\Delta$ B2 $\Delta$ Cyt3	CEACAM20-4S	EU008601
CEACAM20 $\Delta$ B2	CEACAM20-4L	EU008602
CEACAM20 $\Delta$ Cyt3	CEACAM20-5S	EU008603

**Tab. 4.1: Nomenklatur der CEACAM20-Spleißvarianten.** Nach der Genbezeichnung wird die Zahl der extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen angezeigt. Die Buchstaben L und S zeigen an, ob es sich um eine *full-length* oder um eine verkürzte zytoplasmatische Domäne handelt.

Abbildung 4.4 zeigt die Sequenzierungsergebnisse für alle Varianten von CEACAM20 im Vergleich zu der in *ensembl* vorhergesagten Sequenz von CEACAM20 zusammen mit der Proteinsequenz für den CEACAM20-*full-length*-Klon. Außerdem sind *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) grün (ohne Aminosäureaustausch) bzw. gelb (mit Aminosäureaustausch) unterlegt sowie eine Änderung der entsprechenden Aminosäure aufgeführt.



```

CEACAM20_Klon44      CCAGCTTCAGGACGGATCAGAGTCGAAGCTG-----CGAAGCTGCCTCAGCAAGCCGTAGAGGCAATCTTCAGCCCCTGGAAGCC
Aminosäuresequenz  --Q--L--Q--G--R--I--R--V--E--L--M--Q--P--P--D--L--P--E--E--T--Y--E--T--K--L--P--S--A--S--R--R--G--N--S--F--S--P--W--K--P
SAP
                1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
CEACAM20_XM_001134461 ACACCCCAAACCTCTGATGCCCCCACTCAGATTGGTCTCCACTGTGCCAAAAACATGGAGTCAATCTATGAGGCTG-----
CEACAM20_Klon16      ACACCCCAAACCTCTGATGCCCCCACTCAGATTGGTCTCCACTGTGCCAAAAACATGGAGTCAATCTATGAGGAGCTTTGGAATCCAGAGCCCAACACTTACATCCAAATCAACCCCTC
CEACAM20_Klon24      ACCACCCAAACCTCTGATGCCCCCACTCAGATTGGTCTCCACTGTGCCAAAAACATGGAGTCAATCTATGAGGAGCTTTGGAATCCAGAGCCCAACACTTACATCCAAATCAACCCCTC
CEACAM20_Klon27      ACCACCCAAACCTCTGATGCCCCCACTCAGATTGGTCTCCACTGTGCCAAAAACATGGAGTCAATCTATGAGGAGCTTTGGAATCCAGAGCCCAACACTTACATCCAAATCAACCCCTC
CEACAM20_Klon44      ACCACCCAAACCTCTGATGCCCCCACTCAGATTGGTCTCCACTGTGCCAAAAACATGGAGTCAATCTATGAGGAGCTTTGGAATCCAGAGCCCAACACTTACATCCAAATCAACCCCTC
Aminosäuresequenz  --P--P--K--P--L--M--P--P--L--R--L--V--S--T--V--P--K--N--M--E--S--I--Y--E--V--L--V--N--P--E--P--N--T--Y--I--Q--I--N--P--S
SAP
                1810      1820
CEACAM20_XM_001134461 -----
CEACAM20_Klon16      CGTCTAATGGAATTCGCAGATATCCA
CEACAM20_Klon24      CGTCTAATGGAATTCGCAGATATCCA
CEACAM20_Klon27      CGTCTAATGGAATTCGCAGATATCCA
CEACAM20_Klon44      CGTCTAATGGAATTCGCAGATATCCA
Aminosäuresequenz  --V-Stop
SAP

```

**Abb. 4.4: Aminosäure- und Nukleotidsequenzvergleich von CEACAM20-Spleißvarianten.** Die CEACAM20-cDNAs wurden mit Hilfe von genspezifischen Primern durch *nested* PCR amplifiziert, subkloniert und sequenziert. Rot gedruckt sind übereinstimmende Nukleotide. Bei Klon 24 und 27 fehlt die für die extrazelluläre Domäne B2 kodierende Sequenz, bei Klon 24 und 44 die für den zytoplasmatischen Bereich 3. Man erkennt einzelne SNPs (*single nucleotide polymorphism*), die bei synonymen Austauschen grün oder bei nichtsynonymen Austauschen gelb unterlegt sind. Blau unterlegt sind die Start- und Stoppkodonen. Wie man erkennen kann, fehlt bei der vorausgesagten Sequenz der zytoplasmatische Bereich 5 sowie das Stoppkodon. Die Aminosäuresequenz wurde von der Referenzsequenz (bis auf das C-terminale Ende) abgeleitet. Die Sequenzen wurden bei Genbank eingereicht und zusammen mit den entsprechenden Proteinsequenzen publiziert. SAP, *single amino acid polymorphism*.

Um eine quantitative Aussage zur Häufigkeit der gefundenen Spleißvarianten von CEACAM20 treffen zu können, wurden insgesamt 21 Klone analysiert. Tabelle 4.2 fasst die Häufigkeit der Spleißereignisse zusammen.

Spleißvariante	Anzahl	Prozentsatz
CEACAM20 <i>full length</i>	15	71,4%
CEACAM20 $\Delta$ B2 $\Delta$ Cyt3	1	4,8%
CEACAM20 $\Delta$ B2	2	9,5%
CEACAM20 $\Delta$ Cyt3	3	14,3%

**Tab. 4.2: Häufigkeitsverteilung der CEACAM20-Spleißvarianten.** Insgesamt wurden 21 CEACAM20-cDNA-Klone analysiert. 15 von ihnen entsprechen der *full-length*-Variante von CEACAM20-mRNA, bei 6 Klonen fand ein Spleißereignis statt.

Die gefundenen SNPs wurden mit in *ensembl* veröffentlichten SNPs verglichen. Einige von ihnen werden von *ensembl* vorhergesagt, andere hingegen wurden im Rahmen der Klonierung der CEACAM20-cDNA neu entdeckt. Interessant sind die SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch und damit eventuell zu einer veränderten Proteinstruktur führen. Als Resultat daraus kann sich eine neue Funktion oder ein Funktionsverlust ergeben. In Tabelle 4.3 sind die Positionen sowie der Nukleotidaustausch der SNPs der gefundenen CEACAM20-Sequenzen im Vergleich zu der in *ensembl* angegebenen Sequenz zusammengefasst. Allerdings kann insbesondere bei singulär auftretenden Sequenzvarianten ein Misinkorporation durch die hitze-stabile Polymerase nicht ausgeschlossen werden.

Position	64 bp	94 bp	338 bp	1080 bp	1183 bp	1346 bp	1425 bp	1550 bp	1755 bp
SNPs, diese Arbeit	T→C	T→C	A→G	C→T	T→A	T→C	A→G	T→C	T→A
betroffenes Codon	CTT/C	CCT/C	A/GTT	TC/TG	CTT/A	T/CCC	TA/GC	T/CGC	GT/AG
kodierte Aminosäure	L→L	P→P	I→V	S→L	L→L	S→P	Y→C	C→R	V→E
SNP, ensembl	-	-	A→G	C→T	-	-	A→G	T→C	-

**Tab. 4.3: Analyse der in den CEACAM20-cDNA-Klonen gefundenen Nukleotidsequenzvariationen im Vergleich zu bekannten CEACAM20-SNPs.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die in Abbildung 4.4 aufgeführten *full-length*-CEACAM20-Nukleotidsequenz. Hat ein Pyrimidinaustausch (Thymin zu Cytosin) stattgefunden, ist dies durch „T→C“ symbolisiert, analog dazu ein Purin- oder ein gemischter Austausch. Entsprechend sind die Frequenz des betroffenen Codons sowie die resultierenden Aminosäureaustausche im Einbuchstabencode angegeben. Man erkennt mögliche neue SNPs, die noch nicht in *ensembl* veröffentlicht wurden.

#### 4.1.2 Charakterisierung poly- und monoklonaler Anti-CEACAM20-Antikörper und Nachweis von CEACAM20-Protein

Um den Expressionsort von CEACAM20 untersuchen können, wurden Antikörper benötigt. Da es für dieses Protein keine Antikörper zu kaufen gab, wurden in Vorarbeiten des Labors und in Kooperation mit der Firma Genovac (Freiburg) mithilfe der genetischen Immunisierung poly- und monoklonale Antikörper gegen den extrazellulären Bereich von CEACAM20 generiert. Die Charakterisierung dieser Antikörper erfolgte mittels CELISA, FACS, Western Blot und Immunzytologie.

##### 4.1.2.1 CELISA

Zur Charakterisierung der Hybridomüberstände und monoklonalen Antikörper wurde zunächst ein zell-basierter ELISA (CELISA) durchgeführt, da bei dieser Methode viele Proben parallel getestet werden können. Mithilfe dieses CELISAs konnte die Erkennung aller vier Spleißvarianten durch die Antikörper gezeigt werden, da bei Zellen, die eine Spleißvariante von CEACAM20 exprimieren, der der kodierende Bereich für die extrazelluläre Domäne B2 fehlt, keine niedrigeren Werte gefunden wurden. Das bedeutet, dass alle getesteten Hybridomüberstände und der monoklonale Antikörper nicht an die B2-Domäne binden und somit alle hier untersuchten Spleißvarianten von CEACAM20 detektieren. Als Negativkontrolle wurde ein nicht-relevanter Erstantikörper (Anti-c-myc-Antikörper) verwendet. Tabelle 4.4 zeigt das erhaltene Ergebnis.

Hybridomüberstand	6G4A5	12D8	8B3G11	5B5	17D7	21G2	-	-
-------------------	-------	------	--------	-----	------	------	---	---

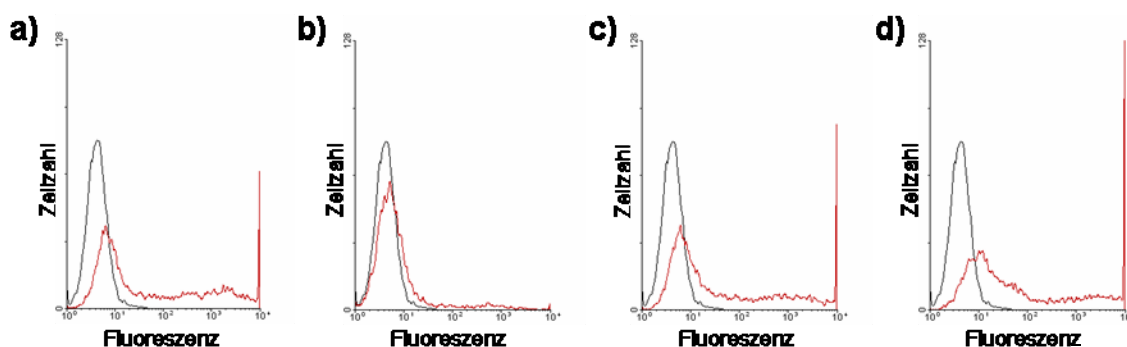
gereinigter Antikörper	-	-	-	-	-	-	6G4A5	Anti-c-myc-AK
CEACAM20 full length	287	2095	649	111	3344	4651	891	47
CEACAM20 $\Delta$ B2 $\Delta$ Cyt3	443	1609	605	106	3301	4790	876	45
CEACAM20 $\Delta$ B2	395	1602	416	49	5550	4698	1438	37
CEACAM20 $\Delta$ Cyt3	877	1951	637	54	5490	6232	935	41

**Tab. 4.4: Detektion von CEACAM20-Spleißvarianten im CELISA mit Anti-CEACAM20-Hybridomüberständen und Anti-CEACAM20-Antikörper.** 7500 Zellen pro *well* einer 96-*well*-Platte wurden transient mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert, mit 50  $\mu$ l Hybridomüberständen (wie dargestellt) oder 20  $\mu$ g/ml monoklonalem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 oder einem Anti-c-myc-AK (10  $\mu$ g/ml) als Negativkontrolle für 1h inkubiert. Nach Inkubation mit HRP-markierten Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Antikörper und einem fluorigenen Substrat wurde das umgesetzte Substrat im Fluorimeter quantifiziert. Man erkennt, dass der jeweilige Überstand alle CEACAM20-Spleißvarianten gleichermaßen detektiert.

Aufgrund der Ergebnisse wurden nur die Überstände 12D8, 17D7 und 21G2 sowie der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 in weiteren Versuchen verwendet.

#### 4.1.2.2 Durchflusszytometrie (FACS)

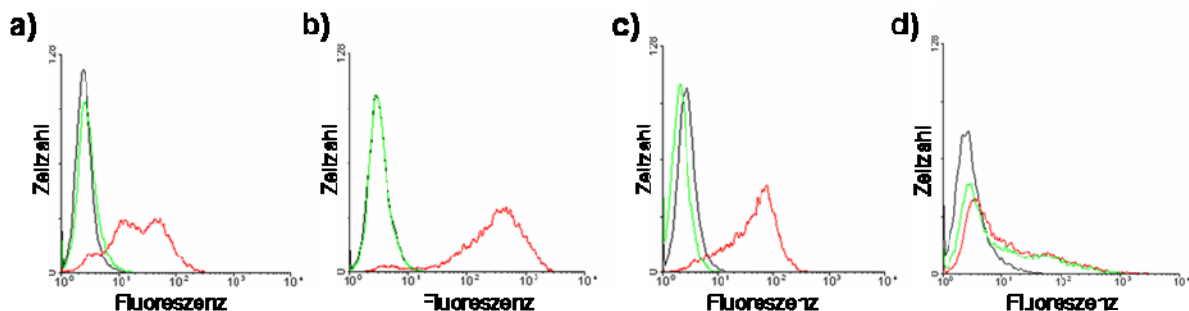
Zur genaueren Charakterisierung der Bindungsstärke wurden die Antikörper in der Durchflusszytometrie getestet. Dazu wurden COS7-Zellen verwendet, die transient mit CEACAM20-Expressionsvektoren transfiziert wurden. Auch im FACS wurden alle vier Spleißvarianten sowohl durch polyklonale als auch durch monoklonale Antikörper detektiert. Exemplarisch für alle weiteren getesteten Antikörper zeigt Abbildung 4.5 das Ergebnis des Hybridomüberstandes 17D7 an allen vier Varianten von CEACAM20.



**Abb. 4.5: Detektion aller Spleißvarianten von CEACAM20 in der Durchflusszytometrie mit Anti-CEACAM20-Hybridomüberstand 17D7.** Die vier verschiedenen Spleißvarianten von CEACAM20 (a: CEACAM20 full-length; b: CEACAM20 $\Delta$ B2 $\Delta$ Cyt3; c: CEACAM20 $\Delta$ B2; d: CEACAM20 $\Delta$ Cyt3) wurden transient in COS7-Zellen exprimiert und 48 h nach Expressionsvektor-Transfektion mit Anti-CEACAM20-Hybridomüberstand 17D7 und PE-markiertem Kaninchen-Anti-Maus-Ig reagiert und mit-

tels Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet, die in der Darstellung als schwarze Linie zu erkennen ist. Die Ergebnisse für die Proben der CEACAM20-exprimierenden Zellen stellen die roten Linien dar. In dem dargestellten Experiment war die Transfektionseffizienz für die  $\Delta B2\Delta Cyt3$ -Spleißvariante (b) nur sehr gering. Die kleine transfizierte Zellpopulation jedoch wurde durch den Antikörper 17D7 erkannt (siehe Fluoreszenzbereich zwischen  $10^2$  und  $10^3$ ).

Zur weiteren Charakterisierung wurde das polyklonale Anti-CEACAM20-Serum zusätzlich auf eine mögliche Interaktion mit weiteren, verbreitet exprimierten Mitgliedern der CEA-Familie hin getestet. Dazu wurden stabile Transfektanten für CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 verwendet. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. Die Kontrolle für CEACAM20 erfolgte mit stabil transfizierten COS7-Zellen. Es zeigt sich, dass ausschließlich CEACAM20 durch das polyklonale Serum detektiert wird (Abbildung 4.6).



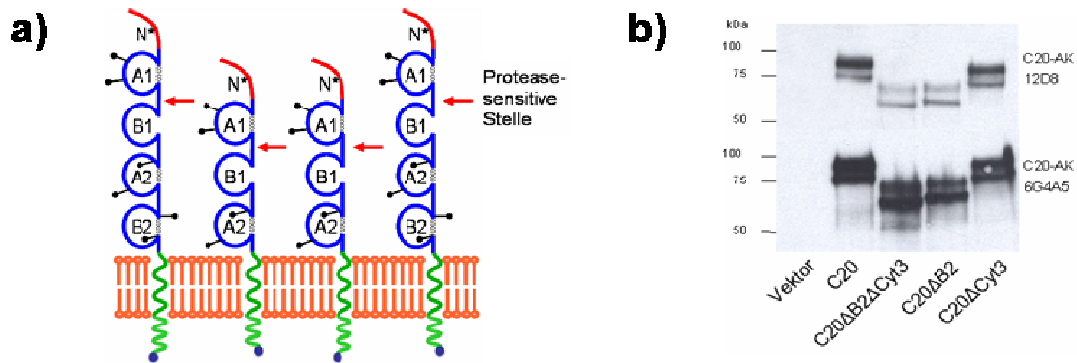
**Abb. 4.6: Analyse des polyklonalen Anti-CEACAM20-Serums auf Kreuzreaktion mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie.** Der Versuch wurde analog zu den Reaktionsbedingungen des Experiments in Abb. 4.5 durchgeführt. Schwarz dargestellt ist die Negativkontrolle (nicht-transfizierte Zellen), rot ist die Positivkontrolle (transfizierte Zellen mit jeweiligem monoklonalem Antikörper: a) CEACAM1: 4/3/17, b) CEACAM5: 4/3/17, c) CEACAM6: D14HD11 und d) CEACAM20: 6G4A5) und grün das polyklonale Serum. Man erkennt, dass das polyklonale Anti-CEACAM20-Serum nicht mit den nahe-verwandten CEA-Familienmitgliedern CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 kreuzreagiert.

#### 4.1.2.3 Western Blot

Auch im Western Blot konnten die monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper alle vier Spleißvarianten detektieren. Hierzu wurde von transient transfizierten HeLa-Zellen ein Zelllysate angefertigt und jeweils 20  $\mu$ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt. Interessanterweise zeigen sich Doppelbanden für CEACAM20, die sich um 16 kDa voneinander unterscheiden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine protease-sensitive Stelle zwischen der A1- und B1-Domäne, da die N- und A1-Domänen zusammen eine relative Molekülmasse von ungefähr 15,6 kDa (inklusive der Kohlenhydratgruppen zweier potentieller Glykosylierungsstellen) aufweisen (vergleiche Abb. 4.7). Als weitere Möglichkeit kommen Glykosylierungsunterschiede in Betracht. Die



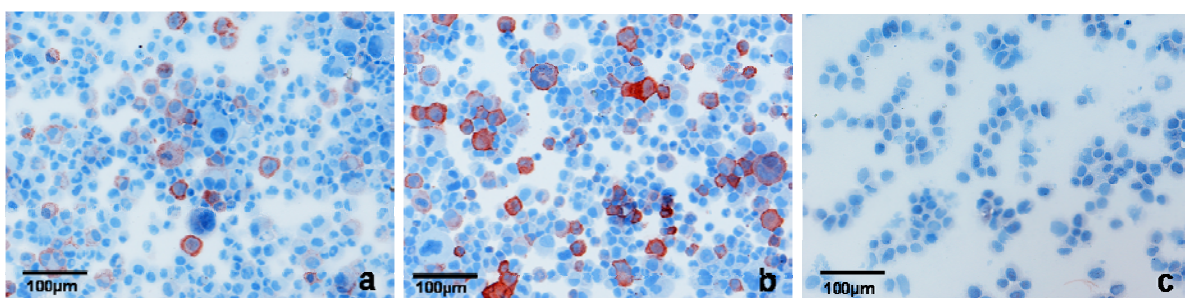
Größe der oberen Banden für CEACAM20 liegt bei 86 kDa, für CEACAM20 $\Delta$ B2 $\Delta$ Cyt3 bei 67 kDa, für CEACAM20 $\Delta$ B2 bei 68 kDa sowie für CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 bei 85 kDa.



**Abb. 4.7: Detektion aller CEACAM20-Spleißvarianten im Western Blot mit Anti-CEACAM20-Antikörpern 12D8 und 6G4A5.** Domänenanordnung der kodierten CEACAM20-Isoformen (a). HeLa-Zellen wurden transient mit dem pcDNA3.0-Vektor oder mit pcDNA3-CEACAM20-Expressionskonstrukten der angegebenen Spleißvarianten transfiziert und ihre Lysate im Western Blot analysiert (b). Die jeweils obere Bande entspricht der erwarteten Größe der Spleißvariante, bei den unteren Banden könnte es sich um Abbauprodukte oder Glykosylierungsvarianten handeln.

#### 4.1.2.4 Immunzytologie

Um zu überprüfen, ob der Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 grundsätzlich für die Immunhistologie (zumindest für den immunhistologischen Nachweis von CEACAM20 in unfixiertem Gewebe) geeignet ist, wurden Transfektanten immunzytologisch analysiert. Für die Immunzytologie wurden COS7-Zellen verwendet, die transient *full-length*-CEACAM20 beziehungsweise CEACAM20 ohne die extrazelluläre Domäne B2 exprimieren. Von diesen Zellen wurden Zytospins angefertigt und diese mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 gefärbt. Als Negativkontrollen wurden CEACAM21-exprimierende Zellen und nicht-transfizierte Zellen (ohne Abbildung) mitgeführt. In Abbildung 4.8 sieht man deutlich, dass der Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 selektiv CEACAM20-exprimierende Zellen erkennt.



**Abb. 4.8: Selektive Erkennung von CEACAM20 durch den monoklonalen Antikörper 6G4A5 in der Immunzytologie.** Es wurden 48 h nach transienter Transfektion Zytospins von CEACAM20- und CEACAM21 exprimierenden Zellen angefertigt und immunzytologisch mittels Peroxidase-Reaktion gefärbt. Der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 erkennt sowohl CEACAM20 *full-length* (a) als auch CEACAM20 $\Delta$ B2 (b), jedoch nicht CEACAM21-exprimierenden HeLa-Zellen (c).

### **4.1.3 Nachweis von CEACAM20- und SYK-mRNA in Prostatakarzinomzelllinien und -gewebe sowie Kolonkarzinomzelllinien**

In den folgenden Experimenten soll die Frage geklärt werden, ob CEACAM20 in Tumoren epithelialen Ursprungs auf RNA-Ebene exprimiert wird. Als erster Hinweis für eine funktionelle Interaktion soll eine Koexpression von CEACAM20 und SYK in diesen Karzinomen untersucht werden. Als Qualitätsanforderungen der isolierten RNA wurden ein Mengenverhältnis der 28 S- und 18 S-rRNA von 2:1, was einem molaren Verhältnis von 1:1 entspricht, sowie eine *RNA Integrity Number* über 7,0 definiert. In den weiteren Versuchen wurden nur RNAs verwendet, die diesen Anforderungen entsprachen (vergleiche Methodenteil).

#### **4.1.3.1 RT-PCR und Kontrolle mittels GAPDH-cDNA-Bestimmung**

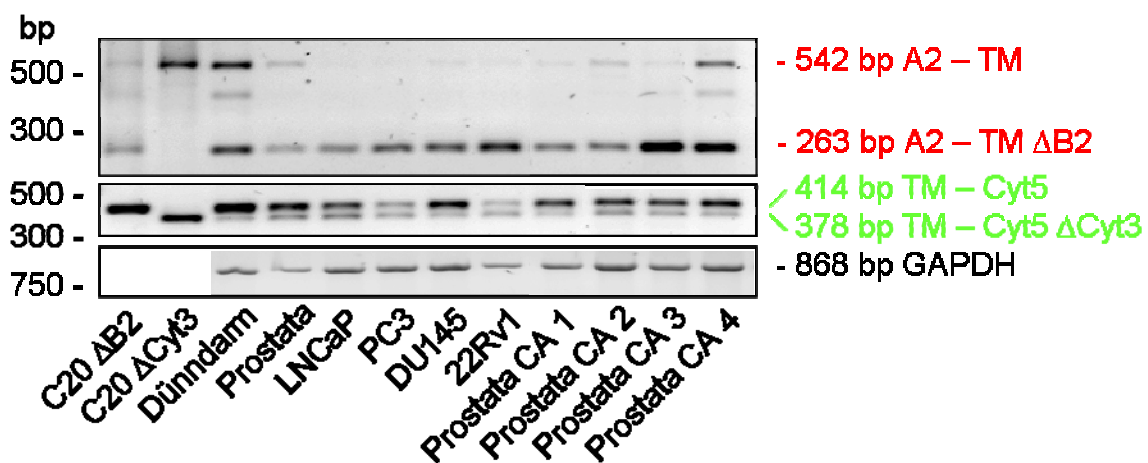
Ein Mikrogramm isolierte und auf ihre Qualität hin getestete RNA wurde nun mithilfe von sogenannten *random hexamer primern* umgeschrieben. Als Kontrolle für die erfolgreiche Umschreibung der mRNA in cDNA wurde eine PCR zum Nachweis der *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-cDNA durchgeführt. Man geht davon aus, dass GAPDH-mRNA in jeder eukaryontischen Zelle in ungefähr gleicher Menge vorliegt, da GAPDH funktionell an der für jede Zelle wichtigen Glykolyse beteiligt ist (Barber *et al.*, 2005).

#### **4.1.3.2 Screening von Dünndarm-, Prostatanormal-, Prostatakarzinomgewebe sowie Prostatakarzinomzelllinien auf CEACAM20-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR**

Mittels PCR wurde ein Screening von cDNA-Proben aus Dünndarm, normaler Prostata, vier Prostatakarzinomzelllinien und sieben verschiedenen Prostatakarzinomproben auf CEACAM20-cDNA durchgeführt (Abbildung 4.13). Dabei wurden die Primer so gewählt, dass zum einen der für die extrazellulären Domänen A2 und B2 kodierende Bereich amplifiziert wurde (Primer in den Domänen A2 und TM, rot dargestellt) und zum anderen der intrazelluläre Bereich (Primer in den Domänen TM und Cyt5,



grün dargestellt). Dadurch sollten die CEACAM20-Spleißvarianten (Kapitel 4.1.2) in den einzelnen Geweben analysiert werden. Als Kontrolle sind die mit Hilfe der Expressionsplasmiden pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ B2 und pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 erhaltenen PCR-Produkte sowie die GAPDH-RT-PCR-Produkte mit aufgetragen (Kapitel 4.1.3.2). Man erkennt, dass im Dünndarm, in der Prostata und in einer Prostatakarzinomprobe beide extrazellulären Spleißvarianten, in allen anderen Proben nur die verkürzte extrazelluläre Variante und in allen Proben die Varianten mit und ohne den zytoplasmatischen Bereich Cyt3 vorkommen.

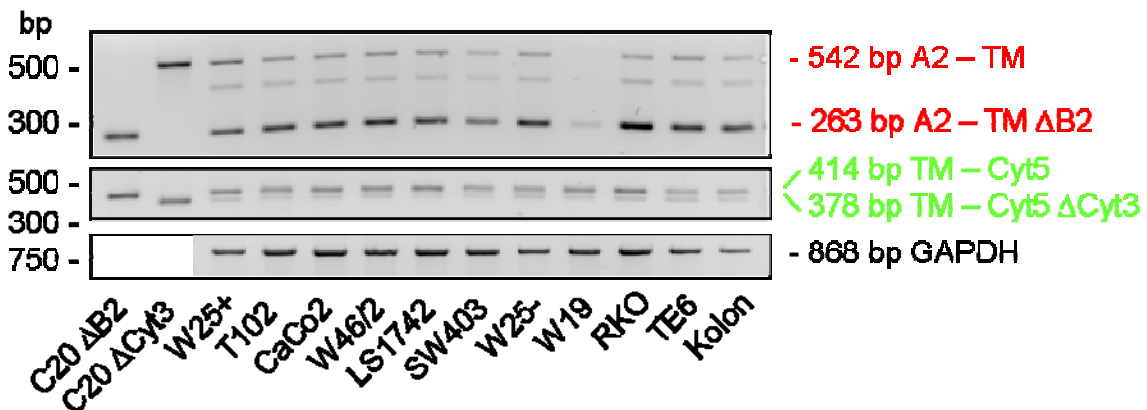


**Abb. 4.13: CEACAM20-mRNA-Spleißvarianten in Dünndarm, Prostata, Prostatakarzinomzelllinien und –gewebe.** Es wurde eine Standard-PCR (vgl. Methodenteil) mit 30 Zyklen zum Nachweis von GAPDH-cDNA und 35 Zyklen zum Nachweis von CEACAM20-cDNA und anschließend eine Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ B2 (C20 $\Delta$ B2) und pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 (C20 $\Delta$ Cyt3) verwendet. Rechts ist die erwartete Größe der DNA-Fragmente angegeben. In den Prostatakarzinomzelllinien und -gewebe dominiert die verkürzte extrazelluläre Spleißvariante ( $\Delta$ B2), während bei allen Geweben und Zelllinien die CEACAM20-mRNAs, die für Varianten mit full-length Zytoplasmabereich kodieren, häufiger vorzuliegen scheinen.

#### 4.1.3.3 Screening von Kolonnormalgewebe und Kolonkarzinomzelllinien auf CEACAM20-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR

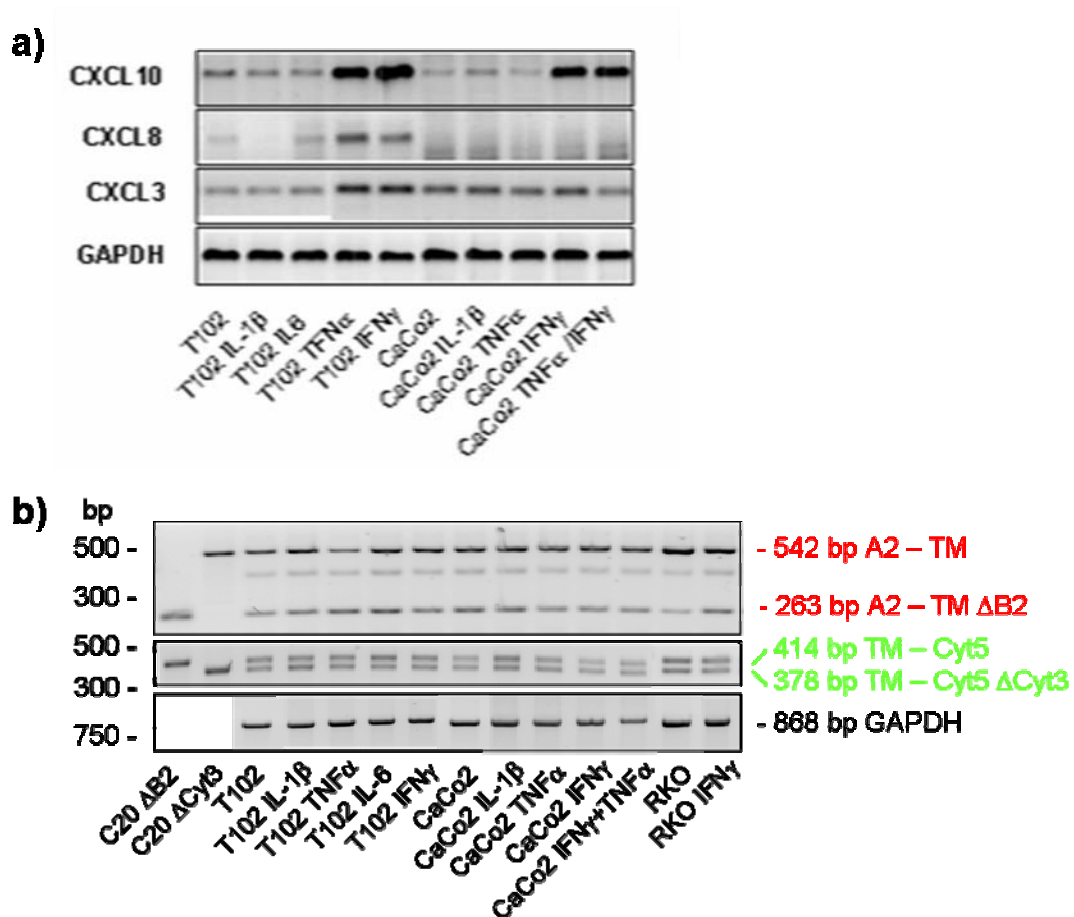
Analog zur Versuchsdurchführung in Kapitel 4.1.3.3 wurde mittels PCR ein Screening der cDNA-Proben von Kolonnormalgewebe sowie Kolonkarzinomzelllinien auf CEACAM20-cDNA durchgeführt. Es wurden wieder die kodierenden Bereiche amplifiziert, für die in anderen Geweben differentielles Spleißen beobachtet wurde (Abbildung 4.14). Als Kontrolle sind die mit den Klonierungsvektoren pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ B2 und pcDNA3.0-CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 als *template* erhaltenen PCR-Produkte aufgetragen. Zur Normierung wurde wieder eine GAPDH-cDNA-PCR

durchgeführt (Kapitel 4.1.3.2). Alle Zelllinien bis auf W19 sowie das normale Kolongewebe zeigen die verschiedenen Spleißvarianten von CEACAM20.



**Abb. 4.14: CEACAM20-mRNA-Spleißvarianten in Kolonkarzinomzelllinien und Kolonnormalgewebe.** Durchführung, Kontrollen und Beschriftung wie in Legende 4.13 beschrieben. Außer bei der Zelllinie W19 finden sich alle Varianten von CEACAM20, wobei extrazellulär die verkürzte Spleißvariante ( $\Delta B2$ ) und intrazellulär die *full-length*-Variante von CEACAM20 vermehrt vorhanden zu sein scheint.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die CEACAM20-mRNA-Expression bei Stimulierung durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, TNF oder IFN $\gamma$ , wie für andere Mitglieder der CEA-Familie beobachtet, hochreguliert wird und somit möglicherweise ebenfalls wichtig für Immunreaktionen ist. Untersucht wurden die zwei menschlichen Kolonkarzinomzelllinien T102 und CaCo2. Als Kontrolle wurde der Einfluss der Zytokine auf die Expression von Genen bestimmt, die bekanntermaßen durch die oben genannten Zytokine stimulierbar sind (Abbildung 4.15a). In Abbildung 4.15b erkennt man, dass es zu keiner Veränderung der Expression von CEACAM20 auf mRNA-Ebene nach Zytokinbehandlung kommt, während insbesondere die Expression der mRNA für das Chemokin CXCL10 erhöht ist.

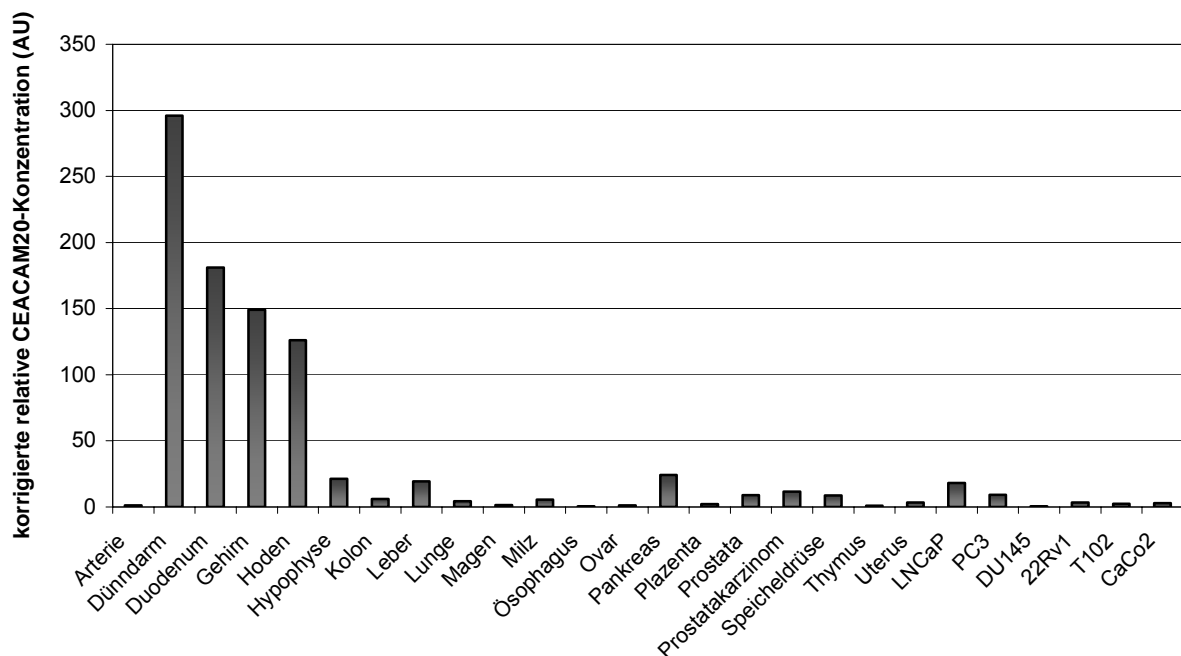


**Abb. 4.15: CEACAM20-Expression wird nicht durch proinflammatorische Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$  stimuliert.** Die Zelllinien wurden in *six-well*-Platten kultiviert, bis sie ein semi-konfluentes Stadium erreicht hatten. Nach Entfernung des alten Mediums erfolgte eine 12-stündige Inkubation mit frischem RPMI-Medium mit oder ohne Zytokinzugabe (IL-1 $\beta$ , 100 U/ml; IL-6, 50 ng/ml; TNF $\alpha$ , 50 ng/ml; IFN $\gamma$ , 50 U/ml). Die RNA wurde aus je 106 konfluenten Tumorzellen isoliert, quantifiziert und davon je 1  $\mu$ g in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle (a) wurde eine Standard-PCR auf das *housekeeping* Gen GAPDH sowie auf die stimulierbaren Gene CXCL 3, 8 und 10 durchgeführt (Kammerer, unveröffentlicht.) Daraufhin wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Legende 4.13 beschrieben eine Standard-PCR zum Nachweis von CEACAM20 sowie zur erneuten Kontrolle von GAPDH durchgeführt (b). Es zeigt sich keine Hochregulierung von CEACAM20 in Anwesenheit von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$ . Außerdem lassen sich keine Angaben zu den Häufigkeiten der Spleißvarianten machen, da sie je nach PCR-Lauf variieren.

#### 4.1.3.4 Quantitativer Nachweis von CEACAM20-mRNA in Normalgeweben und Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien mittels RT-PCR

In Vorarbeiten wurden verschiedene Gewebe auf die Anwesenheit von CEACAM20 auf RNA-Ebene untersucht (Kapitel 1.4.3). Nun wurden diese Normalgewebe, Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien sowie eine Prostatakarzinomgewebeprobe mittels quantitativer PCR im Light-Cycler® (Roche, Mannheim) analysiert, um eine mögliche Hochregulierung von CEACAM20 in Tumorzelllinien und -geweben beurteilen zu können. Für die Normierung (Korrektur für RT-PCR-Effizienz der verschiedenen Proben; Intaktheit der RNA, u.s.w.) der relativen CEACAM20-cDNA-Konzentrationen

wurden die erhaltenen CEACAM20-Werte in Relation zum  $\beta$ -Aktin-cDNA-Gehalt gesetzt. Dabei wurden Proben, deren *crossing point* ( $C_P$ ) für  $\beta$ -Aktin über 23 lag, nicht weiter ausgewertet, da die verwendete RNA wahrscheinlich nicht mehr intakt ist. Die übrigen Proben wiesen  $C_P$ -Werte zwischen 15,8 - 22,8 auf. Zur Kontrolle der Produktreinheit und Größe wurde eine Schmelzkurvenanalyse sowie eine Agarosegelelektrophorese für die  $\beta$ -Aktin- und CEACAM20-cDNA-Amplifikationsprodukte durchgeführt, die beide eine korrekte Amplifikation zeigten (Ergebnis nicht gezeigt). In Abbildung 4.16 zeigen sich hohe Werte für CEACAM20 in Gehirn, Dünndarm und Hoden sowie in geringeren Mengen in Leber, Pankreas, Hypophyse, Speicheldrüse, Kolon, Prostata, Prostatakarzinomgewebe und -zelllinien sowie Kolonkarzinomzelllinien.

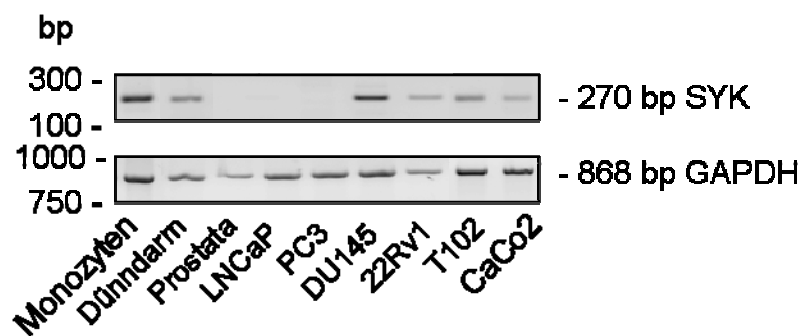


**Abb. 4.16: Quantifizierung von CEACAM20-mRNA in Normalgeweben und Adenokarzinomzelllinien.** Für alle Gewebe und Zelllinien wurden im Light-Cycler®  $\beta$ -Aktin- sowie CEACAM20-cDNA quantifiziert. Die Primer für die Amplifikation von CEACAM20-cDNA wurden in den N und A1 kodierenden Sequenzbereichen gewählt (vgl. Materialien). Es wurden 35 Zyklen für  $\beta$ -Aktin und 40 Zyklen für CEACAM20 verwendet. Mit Hilfe der  $C_P$ -Werte wurde, wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben, jeder CEACAM20-cDNA-Wert auf den  $\beta$ -Aktin-Gehalt der Probe bezogen. In Dünndarm, Gehirn und Hoden finden sich die höchsten CEACAM20-cDNA-Konzentrationen, in geringeren Mengen auch in Hypophyse, Kolon, Leber, Milz, Pankreas, Prostata, Prostatakarzinom, Speicheldrüse sowie den Zelllinien LNCaP und PC3.

#### 4.1.3.5 Screening von Dünndarm- und Prostatagewebe sowie Prostatakarzinomzelllinien auf SYK-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR

Um zu untersuchen, ob das potentielle ITAM-Motiv in CEACAM20, wie in anderen ITAM-haltigen Signalrezeptoren, SYK-abhängig Signalreaktionen auslösen kann,

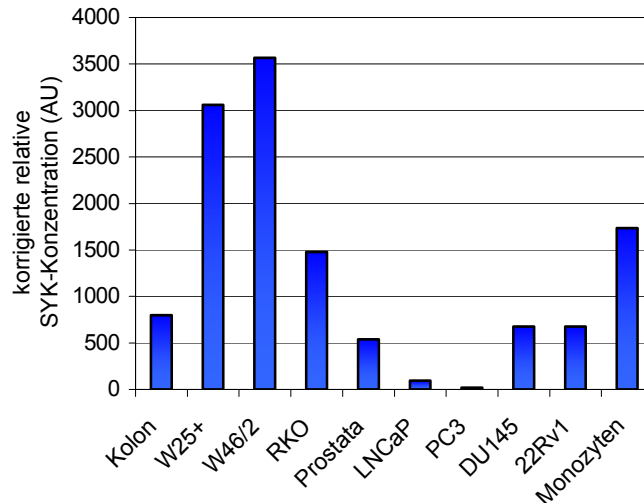
wurde nach SYK-mRNA in den Geweben gesucht, in denen CEACAM20-Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (Dünndarm, Prostata und Prostatakarzinomzelllinien). Als Positivkontrolle wurde RNA aus der monozytären Zelllinie THP-1 mitgeführt, da THP-1-Zellen als Zellen des hämatopoetischen Systems SYK exprimieren (McDonald *et al.*, 1997). Wie Abbildung 4.17 zeigt, konnte im Dünndarm, in zwei von vier Prostatakarzinomzelllinien sowie in beiden Kolonkarzinomzelllinien SYK-mRNA durch RT-PCR nachgewiesen werden. Isolierte RNA aus Prostatakarzinomgewebeproben wurde nicht verwendet, da hier eine Unterscheidung zwischen der Herkunft von SYK aus Prostatakarzinom oder beispielsweise B-Lymphozyten, bei denen SYK an der Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors beteiligt ist (Kurosaki *et al.*, 1994), nicht möglich ist. Mit derselben Einschränkung muss der Nachweis von SYK-mRNA in Dünndarm- und Prostatagewebe betrachtet werden.



**Abb. 4.17: Nachweis von SYK-mRNA in Dünndarm, Prostata, Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien.** Eine Standard-PCR mit 35 Zyklen sowie eine Produktanalyse in einem 2%igem Agarosegel wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde RNA aus Monozyten (monozytäre Zelllinie THP-1) getestet. In Dünndarm sowie in 2 von 4 Prostatakarzinomzelllinien und beiden Kolonkarzinomzelllinien konnte SYK-mRNA nachgewiesen werden.

#### 4.1.3.6 Quantitativer Nachweis von SYK-mRNA in Normalgeweben und Prostata- und Kolonkarzinomzelllinien mittels RT-PCR

Analog zum Nachweis von CEACAM20-mRNA wurde auch zum Nachweis von SYK-mRNA eine quantitative RT-PCR an den gleichen Prostatakarzinomzelllinien und weiteren Kolontumorzelllinien durchgeführt. Als Kontrolle diente cDNA aus THP-1-Zellen (Monozyten). Kolongewebe sowie die Kolonkarzinomzelllinien weisen eine relativ hohe Konzentration von SYK-mRNA auf, Prostatagewebe sowie die Zelllinien DU145 und 22Rv1 eine geringere Konzentration. Abbildung 4.18 zeigt das relative Verhältnis von SYK zu  $\beta$ -Aktin.

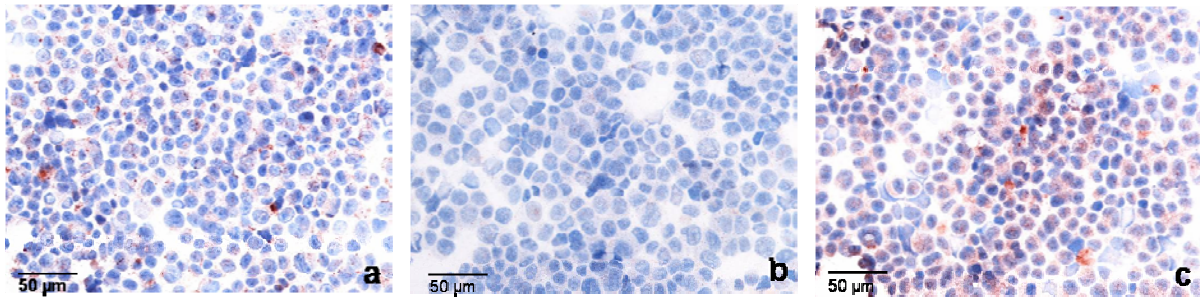


**Abb. 4.18: Quantifizierung von SYK-mRNA in Kolon- und Prostata-Normalgewebe und Adenokarzinomzelllinien.** Der  $\beta$ -Aktin- sowie SYK-cDNA-Gehalt wurden durch quantitative RT-PCR im Light-Cycler® bestimmt ( $\beta$ -Aktin: 35 Zyklen; SYK-cDNA: 40 Zyklen). Als Positivkontrolle diente cDNA von Monozyten (monozytäre Zelllinie THP-1). Es zeigen sich hohe Werte für SYK im Kolongewebe sowie in den Kolonkarzinomzelllinien und etwas geringere Werte im Prostatagewebe sowie in den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und 22Rv1.

#### 4.1.4 Untersuchung des Expressionsmusters von CEACAM20 auf Proteinebene

##### 4.1.4.1 Prostatakarzinomzelllinien

Da CEACAM20 auf RNA-Ebene in Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, PC3, DU145 und 22Rv1) gezeigt werden konnte, wurde als nächster Schritt die Expression von CEACAM20 auf Proteinebene mittels Immunzytologie untersucht. Dazu wurden von allen vier Prostatakarzinomzelllinien Zytospins angefertigt und diese mit einer Peroxidase-Färbung (ImmPRESS™, Vector Laboratories, Burlingame, USA) angefärbt. Als Erstantikörper wurden das polyklonale Serum von mittels eines CEACAM20-Immunisierungsvektors genetisch immunisierten Mäusen oder der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 verwendet. Das vor der Immunisierung entnommene Serum (Präimmunserum) diente jeweils als Negativkontrolle. Die Abbildung 4.19 zeigt beispielhaft für alle vier Zelllinien das Ergebnis für die Zelllinie 22Rv1. Man erkennt keine spezifische Färbung der Zellen. Die rötliche Farbe, die vor allem bei Abbildung 4.19c zu sehen ist, ist unspezifische Hintergrundfärbung. Somit konnte CEACAM20 in den Prostatakarzinomzelllinien nicht in der Immunzytologie gezeigt werden.

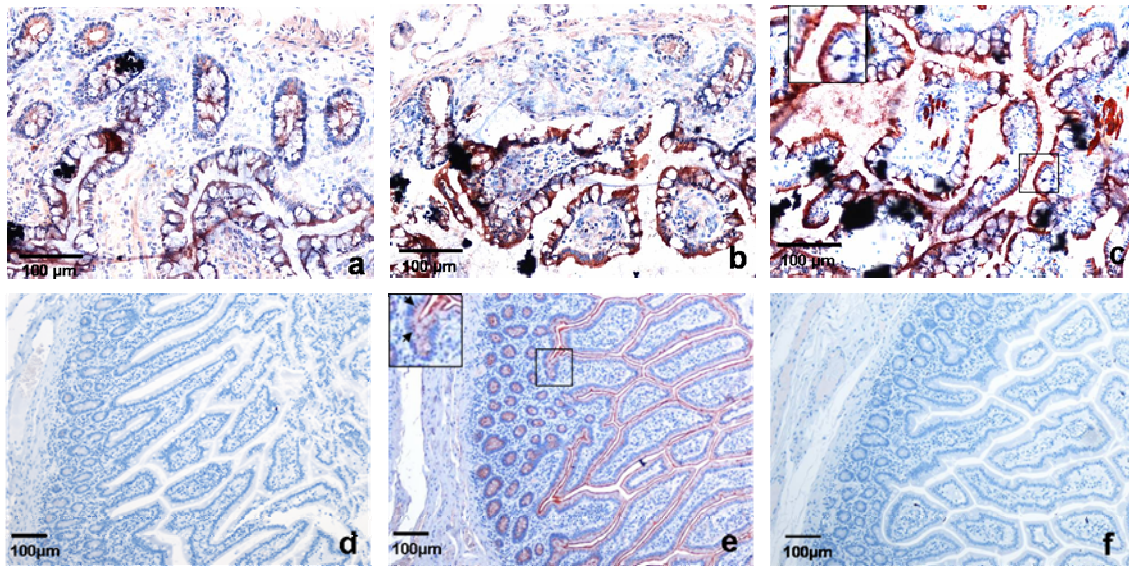


**Abb. 4.19: Immunzytologische Färbung von Zytospins der Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1 zum Expressionsnachweis von CEACAM20.** Weder mit dem Präimmenserum (Verdünnung 1:100), das vor der genetischen Immunisierung der Mäuse abgenommen wurde (a), noch mit dem polyklonalen Anti-CEACAM20-Immenserum (Verdünnung 1:100) erzielt man eine spezifische Färbung der Zellen (b). Mit dem monoklonalen Antikörper 6G4A5 (Konzentration 8 µg/ml) zeigt sich möglicherweise eine spezifische Färbung, die allerdings meist zytoplasmatisch zu finden war (c).

#### 4.1.4.2 Dünndarm

Im Dünndarm wurde der höchste CEACAM20-mRNA-Gehalt gefunden. Daher wurde zunächst das Expressionsmuster von CEACAM20 in Dünndarm-Kryo- und Paraffinschnitten mittels Peroxidase-Färbung untersucht. Es wurden das polyklonale Anti-CEACAM20-Antiserum und der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 eingesetzt. In den Kryoschnitten zeigt sich eine fraglich spezifische Färbung im apikalen Bereich der Epithelzellen einschließlich Bürstensaum (Abbildung 4.20a-c). Bei der Färbung durch den monoklonalen Antikörper zeigt sich zudem eine starke Hintergrundfärbung vor allem von glatten Muskelzellen und Blutgefäßen. In den Paraffinschnitten erkennt man ein äquivalentes Verteilungsmuster (Abbildung 4.20d-e). Doch sieht man bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6G4A5 keine Färbung (Abbildung 4.20f). Auch bei Wiederholung der Immunhistologie mit weiteren Dünndarm-Paraffinschnitten konnte keine Färbung erzielt werden.





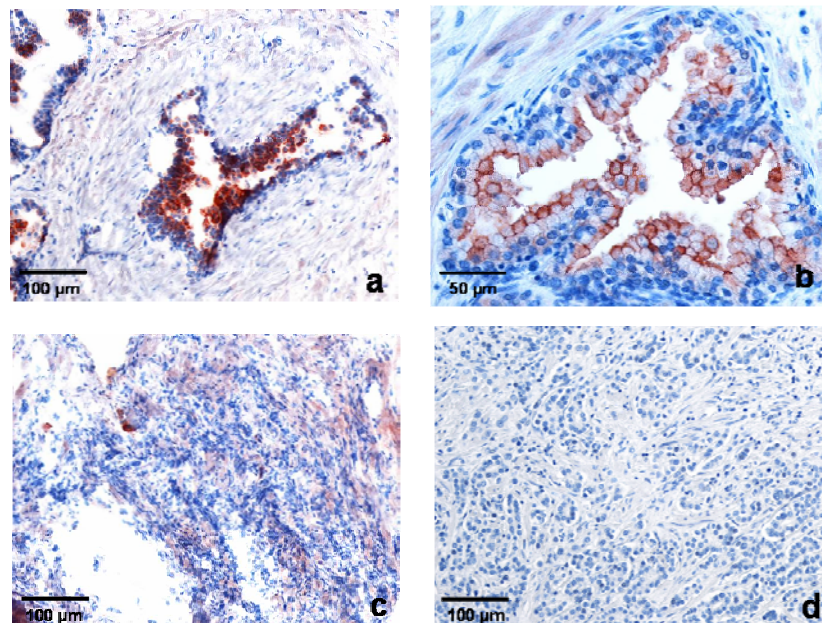
**Abb. 4.20: Immunhistologische Färbung von Dünndarm Kryo- (a-c) und Paraffinschnitten (d-f) zum Expressionsnachweis von CEACAM20.** In den Kryoschnitten zeigt sich eine starke Färbung des Epithels unter Verwendung des Anti-CEACAM20-Immunsersums (Verdünnung 1:100) (b) und des monoklonalen Antikörpers (Konzentration 40 µg/ml) (c). Deutlich geringer gefärbt werden die Epithelzellen nach Inkubation mit dem Präimmunsersum (Verdünnung 1:100) (a). In den Paraffinschnitten erkennt man eine apikale Färbung des Epithels nur bei Verwendung des polyklonalen Anti-CEACAM20-Immunsersums (e), jedoch nicht nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper (Konzentration 40 µg/ml) (f). Als Negativkontrolle diente wie bei den Kryoschnitten das Präimmunsersum (Verdünnung 1:100) (d). Bei doppelter Vergrößerung (e) erkennt man neben der apikalen Färbung eine Färbung von Golgi-Apparat-ähnlichen Strukturen (mit Pfeilen gekennzeichnet).

#### 4.1.4.3 Prostata

Da sowohl in Vorarbeiten als auch im Rahmen dieser Arbeit CEACAM20 auf RNA-Ebene in Prostatanormalgewebe sowie in Prostatakarzinomproben gefunden wurde, war es von großem Interesse, die Expression von CEACAM20 in diesen Geweben auf Proteinebene nachzuweisen. Es wurden sowohl Proben von Normalgewebe als auch Karzinom der Prostata jeweils als Kryo- und Paraffinschnitte mittels Peroxidase-Färbung untersucht. Bei normalem Prostatagewebe zeigt sich vor allem in den Kryoschnitten unter Anwendung des polyklonalen Serums in einer Verdünnung von 1:100, aber auch in den Paraffinschnitten bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6G4A5 in einer Konzentration von 20 µg/ml bei etwa 10% der Drüsen eine apikale Färbung des Epithels (Abbildung 4.21a, b). Da sich allerdings nicht alle Drüsenepithelien anfärben ließen und der monoklonale Antikörper in Kryoschnitten der normalen Prostata nur eine diffuse Stromafärbung zeigte, besteht die Möglichkeit, dass es sich um keine spezifische Reaktion handelt. Bei den Prostatakarzinomschnitten ist das Bild eindeutig. Weder in Kryo- noch in Paraffinschnitten zeigt sich



unter Verwendung des polyklonalen Serums sowie des monoklonalen Antikörpers eine Färbung der Karzinomzellen (Abbildung 4.21c, d).

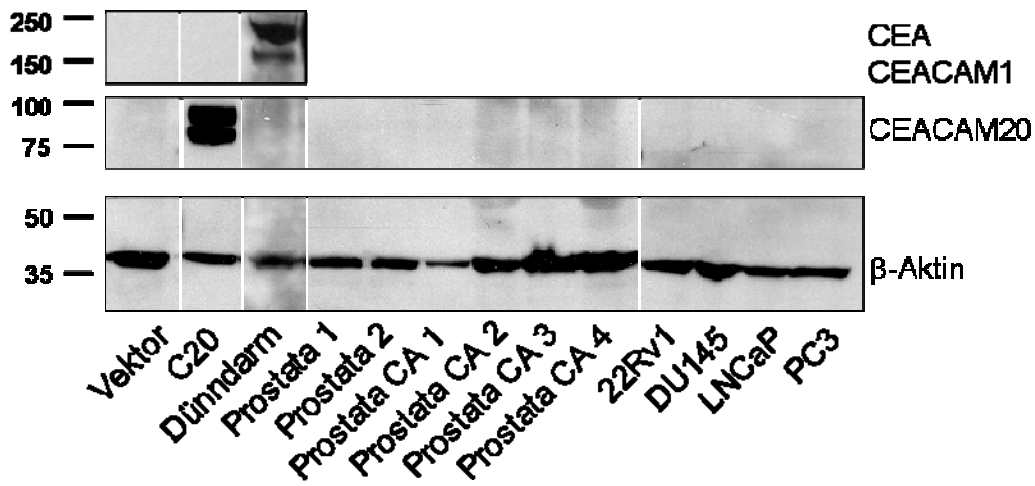


**Abb. 4.21: Immunhistologische Färbung von hyperplastischem Prostatagewebe (a,b) und Prostatakarzinom (c,d) als Kryo- (a,c) und Paraffinschnitte (b,d) zum Expressionsnachweis von CEACAM20.** Bei der Prostatahyperplasie (a und b) zeigt sich eine Färbung des apikalen Epithels lumenwärts sowohl durch das Anti-CEACAM20-Immunsereum (Verdünnung 1:100) (a) als auch durch den monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 (Konzentration 20 µg/ml) (b). Im Prostatakarzinom (c und d) erkennt man unter den gleichen Bedingungen wie bei der Prostatahyperplasie keine spezifische Färbung.

#### 4.1.4.4 Western Blot-Analyse der CEACAM20-Expression in Dünndarm, Prostata und Prostatakarzinom

Um die Ergebnisse in der Immunhistologie durch eine unabhängige Methode zu überprüfen, wurden von den verwendeten Prostatakarzinomzelllinien und den Gewebeproben von Dünndarm, normaler Prostata und Prostatakarzinom Zelllysate angefertigt. Für den Western Blot wurden pro Probe 40 µg Protein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Anti-CEACAM20-Immunsereum in einer Verdünnung von 1:100. Bei den Prostatakarzinomzelllinien und Prostatageweben bestätigte sich das negative Ergebnis aus der Immunhistologie. Im Dünndarm- sowie im Prostanormalgewebe konnte, entgegen der Erwartung, kein CEACAM20 nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden Lysate von vektor-transfizierten Zellen beziehungsweise mit einem CEACAM20-Expressionsvektor transient transfizierte Zellen mitgeführt (pro Probe 10 µg Protein eingesetzt). Außerdem erfolgte eine Detektion mit An-

ti- $\beta$ -Aktin-Antikörper als Ladekontrolle (Abbildung 4.22). Um das Dünndarmgewebe noch weiter zu untersuchen, wurde zum einen ein Western Blot mit 80  $\mu$ g Gesamtprotein analysiert, zum anderen als Kontrolle die Anwesenheit von CEA und CEACAM1 untersucht. CEA (ca. 180 kDa) und CEACAM1 (ca. 150 kDa) konnten mit dem Antikörper 4/3/17 (Genovac, Freiburg) nachgewiesen werden. CEACAM20 konnte auch bei 80  $\mu$ g Protein weder mit dem polyklonalen Serum noch mit dem monoklonalen Antikörper detektiert werden (ohne Abbildung).



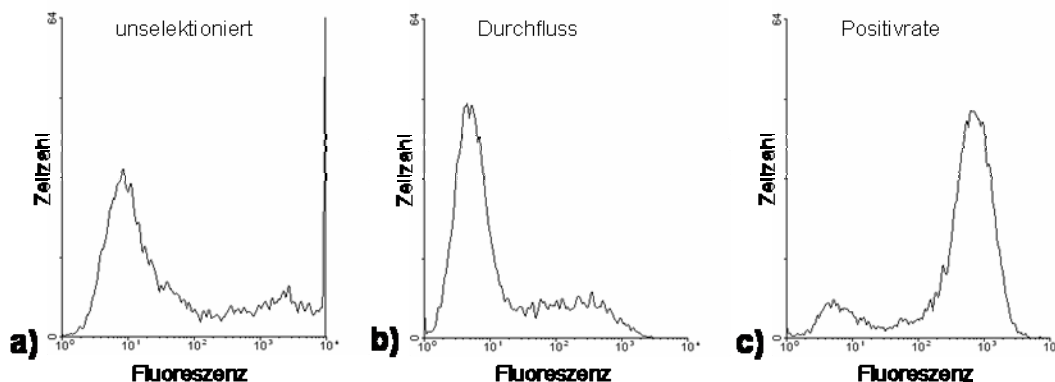
**Abb. 4.22: Analyse der CEACAM20-Expression in Dünndarm-, Prostata- und Prostatakarzinomgewebe sowie Prostatakarzinomzelllinien durch Western Blot.** Es wurden 40  $\mu$ g Protein pro Spur aufgetragen. Als Kontrollen wurden Zelllysate von Vektor- und CEACAM20-Expressionsplasmidtransfizierten HeLa-Zellen (C20) getestet (jeweils 10  $\mu$ g). Alle Lysate wurden im Western Blot auf die Anwesenheit von CEACAM20 mithilfe des polyklonalen Anti-CEACAM20-Serum in einer Verdünnung von 1:100 und  $\beta$ -Aktin mithilfe des Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpers (Verdünnung: 1:3000) analysiert. Zusätzlich wurde in beiden Kontrolleextrakten und im Dünndarmgewebe die Anwesenheit von CEA und CEACAM1 mit dem für CEA und CEACAM1 spezifischen Antikörper 4/3/17 in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml untersucht. Es zeigt sich, dass in allen Geweben kein CEACAM20 nachgewiesen werden kann, während CEA und CEACAM1 im Dünndarm detektiert werden konnte.

## 4.2 Funktionsanalysen von CEACAM20

Neben der Expression von CEACAM20 soll im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von CEACAM20 untersucht werden. Zum einen stellt sich hierbei die Frage, ob CEACAM20 mit seinem ITAM-Motiv die Proliferation von Zellen beeinflusst, zum anderen, ob das in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 vorhandene ITAM-Motiv funktionell ist. Die Aufgabenstellung umfasste die mögliche Phosphorylierbarkeit von CEACAM20 sowie die Untersuchung der Bindung von SYK an das phosphorylierte CEACAM20-ITAM über seine SH2-Domänen.

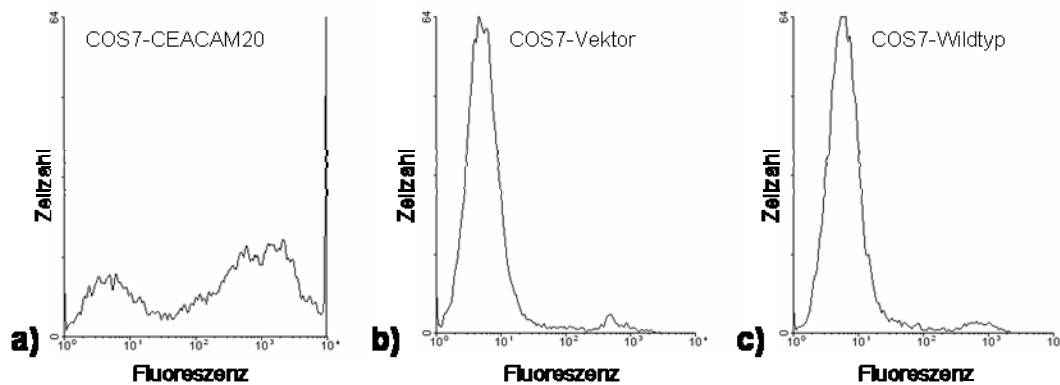
### 4.2.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von stabil CEACAM20-exprimierenden COS7-Zellen

Es wurden stabile Transfektanten für alle CEACAM20-Spleißvarianten mittels der CEACAM20-Expressionsvektoren (Kapitel 4.1.1) angefertigt, wobei die Selektion mithilfe G418 über fünf Wochen und eine zweimalige Anreicherung CEACAM20-exprimierender Zellen mittels MACS erfolgte. Abbildung 4.23 zeigt das Ergebnis der MACS-Selektion durch den monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper 12D8 am Beispiel CEACAM20 $\Delta$ Cyt3-exprimierender Zellen.



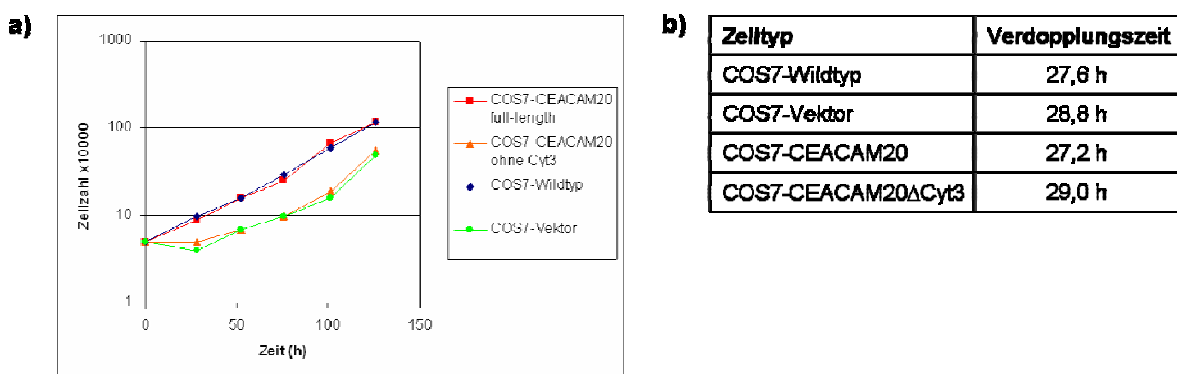
**Abb. 4.23: Selektion von CEACAM20 $\Delta$ Cyt3-exprimierenden Zellen mittels MACS.** Die Durchflusszytometrie wurde unmittelbar nach der MACS-Selektion durch den monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper 12D8 durchgeführt. Für die Detektion im FACS wurde ebenfalls der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 12D8 verwendet. Die drei Bilder zeigen die Situation vor der MACS-Durchführung (a, unselektioniert), den Durchfluss (b, Durchfluss) und die Positivrate (c, CEACAM20 selektioniert).

Trotz wiederholter MACS-Selektion und mehrwöchiger G418-Behandlung konnten nicht alle negativen Zellen entfernt werden (Abbildung 4.24).



**Abb. 4.24:** FACS-Analyse stabil CEACAM20 exprimierender COS7-Zellen (a) im Vergleich zu vektor-transfizierten COS7-Zellen (b) und Wildtyp-COS7-Zellen (c) zur Ermittlung der Positivrate. Man erkennt eine deutliche Positivfraktion in (a) mit einem Fluoreszenzpeak bei etwa  $10^3$ , die 72% aller Zellen ausmacht.

Nun wurde das Wachstum von CEACAM20-exprimierenden und vektor- beziehungsweise nicht-transfizierten Zellen über fünf Tage untersucht (Abb. 4.25). Bei halblogarithmischer Auftragung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit zeigt sich für alle vier untersuchten Zelllinien ein linearer Verlauf mit gleichem Anstieg der Regressionsgeraden, was einer identischen Zellverdopplungsdauer entspricht. Es ergibt sich nur eine geringfügig längere Verdopplungszeit für COS7-Zellen, die CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 exprimieren. Eine fast identische Verdopplungszeit, gepaart mit einer ähnlichen anfänglichen Wachstumsverzögerung, wurde jedoch auch für vektor-transfizierte COS7-Zellen gefunden (Abb. 4.25b).



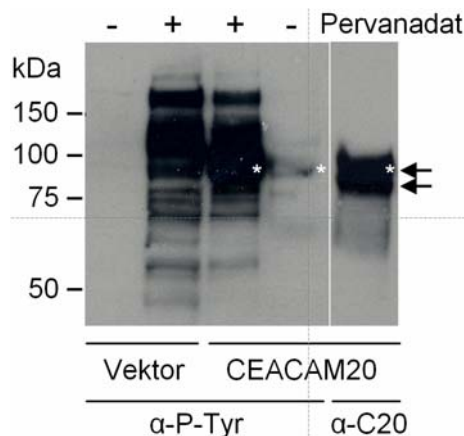
**Abb. 4.25:** Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit von CEACAM20-exprimierenden, vektor-transfizierten und Wildtyp-COS7-Zellen. Es wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von stabil CEACAM20-exprimierenden COS7-Zellen im Vergleich zu vektor-transfizierten COS7-Zellen sowie Wildtyp-COS7-Zellen über fünf Tage hinweg untersucht. Dazu wurden die Zellen in einer *six-well*-Platte inkubiert und jeweils nach 24 h mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt. Für alle Zelltypen zeigt

sich ein exponentielles Wachstum (a), wobei nur geringfügige Unterschiede bei der Verdopplungszeit der verschiedenen Zelllinien ergeben (b).

## 4.2.2 Mögliche Funktionalität des hypothetischen ITAM-Motivs in CEACAM20

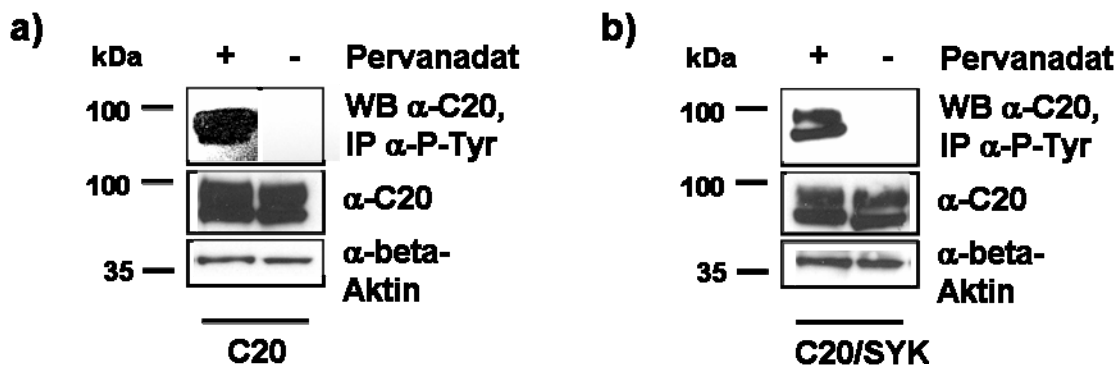
### 4.2.2.1 Nachweis der Phosphorylierbarkeit von Tyrosinresten in CEACAM20

Den ersten Schritt in der möglicherweise durch CEACAM20 vermittelten Signalkaskade stellt die Phosphorylierung von CEACAM20 nach Aktivierung durch Bindung eines (noch) nicht identifizierten Liganden dar. In den folgenden Experimenten wurde eine Phosphorylierung von Tyrosinresten in CEACAM20 vermutlich über SRC-Familie-Proteintyrosinkinasen durch Pervanadat-Behandlung induziert. Pervanadat inhibiert selektiv Proteintyrosinphosphatasen, so dass das Phosphorylierungsgleichgewicht unphysiologisch auf die Seite phosphorylierter Proteine verschoben wird. Als erster Schritt zum Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierbarkeit von CEACAM20 wurden Zellysate von Pervanadat-behandelten CEACAM20-exprimierenden HeLa-Zellen und vektor-transfizierten HeLa-Zellen verglichen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Abbildung 4.26). Da bei CEACAM20-exprimierenden Zellen nach Pervanadat-Behandlung im Vergleich zu den vektor-transfizierten Zellen Banden in der Größe von CEACAM20 verstärkt zu sehen sind, kann von einer Phosphorylierung ausgegangen werden.



**Abb. 4.26: Phosphorylierbarkeit von CEACAM20 an Tyrosinresten innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne.** HeLa-Zellen wurden transient mit pcDNA3.0 (Vektor) oder pcDNA3.0-CEACAM20 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen 10 min mit oder ohne Proteintyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat bei 37°C inkubiert. Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ -P-Tyr) oder Anti-CEACAM20-Antikörper (6G4A5;  $\alpha$ -C20) wurden zum Nachweis von Phosphotyrosin-haltigen Proteinen bzw. CEACAM20 verwendet. (Stern: Haupt-Phosphotyrosin-Protein; Pfeile: CEACAM20-Isoformen).

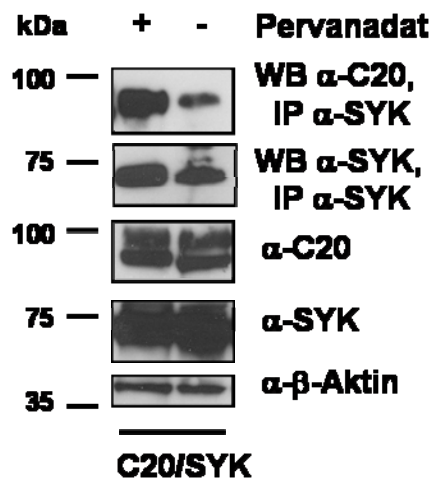
Als Beweis für die Tyrosinphosphorylierbarkeit von CEACAM20 wurde eine Immunpräzipitation mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper und anschließend eine Detektion im Western Blot mit Anti-CEACAM20-Antikörper durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin im Lysat detektiert. Die Anwesenheit gleicher Mengen CEACAM20 in den Zellen nach Transfektion mit und ohne Pervanadatbehandlung wurde durch Nachweis von CEACAM20 gezeigt (Abbildung 4.27). Dieses Experiment belegt eindeutig, dass in CEACAM20 Tyrosinphosphorylierung stattfinden kann (Abbildung 4.27a). Interessanterweise wird in den CEACAM20-Transfektanten, die CEACAM20 in zwei Varianten unterschiedlicher Mobilität exprimieren, die rascher wandernde Variante deutlich schwächer als die langsamer wandernde Variante phosphoryliert (Abb. 4.27a). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es eine Variante des CEACAM20-Proteins gibt, der unter anderem intrazellulär am C-terminalen Ende Aminosäuren des ITAM-Motivs fehlen, die an der Phosphorylierung beteiligt sind (Kapitel 4.1.2.3). Doch bei Kotransfektion von CEACAM20- und SYK-Expressionsvektoren zeigt sich unter gleichen Versuchsbedingungen eine stärkere untere Bande beim Nachweis von phosphoryliertem CEACAM20 (Abb. 27b). Möglicherweise wird durch Bindung von SYK und durch die dadurch erfolgte SYK-Aktivierung die Phosphorylierung weiterer in beiden Varianten vorhandener Tyrosine gefördert.



**Abb. 4.27: Phosphorylierbarkeit von CEACAM20 mit und ohne Koexpression von SYK.** BOSC23-Zellen wurden transient mit dem pcDNA3.0-CEACAM20-Expressionsvektor alleine (a) bzw. zusammen mit einem SYK-Expressionsvektor transfiziert (b). Nach 24 h Inkubation erfolgte bei der Hälfte der Zellen eine Pervanadat-Behandlung (Inkubationszeit: 10 min, 37°C). Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper durchgeführt (IP  $\alpha$ -P-Tyr). Die darauffolgende Analyse im Western Blot (WB) erfolgte mit Anti-CEACAM20-Antikörper (6G4A5). Zur Kontrolle wurden  $\beta$ -Aktin sowie CEACAM20 detektiert. Man erkennt eine Pervanadat-abhängige Phosphorylierung von CEACAM20 (a), wobei es in Anwesenheit von SYK zu einer stärkeren Phosphorylierung der CEACAM20-Isoform mit höherer Mobilität kommt (b). C20, CEACAM20.

#### 4.2.2.2 Untersuchung der Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK

Über seine SH2-Domänen kann SYK an phosphorylierte ITAM-Motive binden. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass CEACAM20 an Tyrosinen phosphorylierbar ist, sollte als nächster Schritt eine mögliche Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen transient mit dem SYK-Expressionvektor zusammen mit dem CEACAM20-Expressionsvektor oder mit dem Leervektor kotransfiziert. Daraufhin wurde die Hälfte der Zellen mit Pervanadat behandelt und anschließend lysiert. Es folgte eine Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Anti-SYK-Antikörper und die anschließende Analyse mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper im Western Blot. Zur Kontrolle wurden  $\beta$ -Aktin, SYK und CEACAM20 nach Transfektion sowie SYK nach Immunpräzipitation im Western Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert (Abbildung 4.28). Man erkennt, dass eine Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK stattfindet, die unter Pervanadat-Behandlung verstärkt wird.



**Abb. 4.28: Nachweis der Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK.** Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem gleichen Schema wie in der Legende zu Abb. 4.27 beschrieben. Die Immunpräzipitation wurde mit dem polyklonalen Anti-SYK-AK durchgeführt, die Detektion im Western Blot mit Anti-SYK-Antikörper als Kontrolle sowie mit Anti-CEACAM20-Antikörper (6G4A5). Es zeigt sich eine Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK aufgrund der Kopräzipitation von SYK und CEACAM20, die nach Pervanadat-Behandlung verstärkt wird.

## 5. Diskussion

### 5.1 Expressionsort von CEACAM20

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Expressionsort von CEACAM20 des Menschen auf RNA- und Proteinebene untersucht. Bereits in Vorarbeiten konnten mithilfe von RT-PCR verschiedene Gewebe auffindig gemacht werden, in denen CEACAM20-Transkripte vorkommen. Dazu gehören Dünndarm, Prostata und Hoden sowie einige wenige weitere Organe. Außerdem wurden Prostatakarzinomzelllinien und vier Prostatakarzinomgewebeproben auf die Anwesenheit von CEACAM20-mRNA hin getestet. In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von CEACAM20-mRNA um zusätzliche Gewebeproben sowie Zelllinien erweitert und quantitativ untersucht. Es zeigt sich, dass CEACAM20 nicht nur in den Organen, die in Vorarbeiten beschrieben sind, exprimiert wird, sondern auch in weiteren Geweben wie beispielsweise Kolon und Kolonkarzinomzelllinien. Außerdem kann nun durch die quantitative Auswertung eine Mengenrelation zwischen den einzelnen Geweben erfolgen, wobei im Dünndarm eindeutig am meisten CEACAM20-mRNA vorliegt. Vergleicht man die relative Menge für das normale Prostatagewebe mit den Mengen für das Prostatakarzinomgewebe, erkennt man eine geringfügige Hochregulierung von CEACAM20-mRNA im Tumorgewebe sowie eine vermehrte Expression von CEACAM20 in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP. Verschiedene Spleißvarianten von CEACAM20 konnten durch Klonierung nachgewiesen werden. Die Häufigkeit der Varianten konnte nun durch gezielte Primerwahl in den einzelnen Geweben untersucht werden. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Gewebe und Zelllinien sowohl die beiden extrazellulären ( $\pm$  B2-Domäne) als auch die intrazellulären Spleißvarianten ( $\pm$  zytoplasmatisches Exon 3) von CEACAM20 exprimieren. Das Expressionsmuster weiterer nachgewiesener (Eisenried, persönliche Mitteilung) bzw. möglicher Spleißvarianten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Zur Analyse des Expressionsorts von CEACAM20 auf Proteinebene wurden poly- und monoklonale Antikörper gegen CEACAM20 im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erkennen spezifisch CEACAM20 und zeigen keine Kreuzreaktionen mit anderen untersuchten Mitgliedern aus der CEA-Familie (Genovac, Freiburg). Formal kann die Erkennung von nicht untersuchten und in CEACAM20-positiven Geweben exprimierten Mitgliedern nicht ausgeschlossen werden (zum Beispiel CEACAM19). Sie ist jedoch aufgrund der geringen Verwandtschaft zwischen den in Frage kommenden Proteinen sehr unwahrschein-



lich. Diese Antikörper wurden nun in der Immunhistologie sowie im Western Blot eingesetzt. Das polyklonale murine Anti-CEACAM20-Serum zeigt eine reproduzierbare immunhistologische Färbung sowohl in Kryo- als auch in Paraffinschnitten des Dünndarms und des Prostatanormalgewebes. Bereits in Vorarbeiten konnte CEACAM20 im apikalen Bereich des Drüsenepithels der Prostata dargestellt werden. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Außerdem zeigt sich eine vergleichbare Färbung im Epithel des Dünndarms. Jedoch konnte CEACAM20 mit diesem Serum in den entsprechenden Gewebelysaten mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. Dazu muss man bedenken, dass in dem Western-Blot-Verfahren, das in dieser Arbeit verwendet wurde, laut Hersteller nur bis zu  $10^{-12}$  g Protein nachweisbar sind und außerdem das Zielprotein in dem Gesamtgewebelysat verdünnt wird.

Vergleicht man das Expressionsmuster von CEACAM20 des Menschen mit dem der Maus, ergeben sich nur wenige Unterschiede bei den untersuchten Normalgeweben. Erwähnenswert ist hierbei, dass bei der Maus CEACAM20-mRNA in Adenokarzinomen wie Brust- und Magentumoren sowie im Ovar nachgewiesen werden konnte (Zebhauser *et al.*, 2005). In Internet-Datenbanken wie *NCBI Geo Profiles* findet man für das murinen CEACAM20-Genexpressionsprofil auffallend hohe Werte für das befruchtete Ei sowie die Oozyte. Die Konzentration von CEACAM20-mRNA nimmt von der Oozyte ausgehend bis zum 1-Zell-Stadium zu, im 2-Zellstadium leicht ab und ist im 8-Zellstadium kaum mehr zu finden. Auch bei der Reifung der Oozyte im Follikel kann eine starke Mengenzunahme von CEACAM20-Transkripten beobachtet werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass CEACAM20 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Reifung der Oozyte sowie bei der Befruchtung spielt. CEACAM20 könnte hierbei mit CEACAM17 kooperieren, das spezifisch im Gewebe des Hodens und Nebenhodens nachgewiesen werden konnte (Zebhauser *et al.*, 2005). CEACAM17 ist mit PSG17 verwandt, was seinerseits als Ligand für das integrale Membranprotein CD9 fungiert (Waterhouse *et al.*, 2002; Ellerman *et al.*, 2003). CD9, das auf der Oberfläche von Oozyten lokalisiert ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Verschmelzung von Spermien und Eizellen (Miyado *et al.*, 2000). Analog dazu könnte CEACAM17 einen Liganden für CEACAM20 darstellen. Nach Interaktion mit Spermienliganden wie CEACAM17 könnten von CEACAM20 frühe Wachstumssignale für das befruchtete Ei ausgehen (siehe unten). Die mögliche funktionelle Beteiligung an der Zygotenstimulierung lässt eine Analogie zu einer Rolle bei der

Tumorentstehung zu. So könnte CEACAM20 durch deregulierte Expression (Überexpression) zur Tumorentwicklung beitragen.

## 5.2 Funktion von CEACAM20

### 5.2.1 Möglicher Einfluss der Spleißvarianten von CEACAM20 auf Zelladhäsion und Proliferation

Das Auftreten von Spleißvarianten, wie es im Rahmen dieser Arbeit für CEACAM20 nachgewiesen werden konnte, ist in der CEA-Familie keine Seltenheit. So existieren wie für CEACAM20 auch für CEACAM1 sowohl Varianten des extrazellulären sowie des zytoplasmatischen Abschnittes (Hammarström, 1999). Die Funktion der verkürzten extrazellulären Variante konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Da eine Beteiligung mehrerer extrazellulärer Domänen an der Zelladhäsion gezeigt werden konnte (Zhou *et al.*, 1993), wird eine Variabilität bei der Ausbildung dieser Adhäsion durch das Fehlen von einzelnen Domänen diskutiert. Allerdings scheint für die Zelladhäsion, wenn nachgewiesen, die N-Domäne essentiell zu sein. Diese liegt bei CEACAM20 in verschiedenen Spezies in unterschiedlichem Ausmaß gekürzt vor, so dass nicht klar ist, ob CEACAM20 überhaupt homophil oder heterophil mit anderen CEA-Familienmitgliedern interagieren kann. Das Auftreten verkürzter intrazellulärer Varianten von CEACAM1, der das ITIM fehlt, konnte in den Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferationsrate gebracht werden, wobei das Verhältnis von kurzer und langer Variante von Bedeutung ist (Singer *et al.*, 2000). Bei CEACAM20 führt das Fehlen des zytoplasmatischen Bereichs 3 zum Verlust eines in allen Spezies konservierten Tyrosins. Dies könnte ähnlich wie bei CEACAM1 Einfluss auf die Proliferationsrate nehmen. Hinweise darauf konnten in dieser Arbeit durch die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit gewonnen werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen, die CEACAM20 $\Delta$ Cyt3 exprimieren, ist geringfügig langsamer als die der nicht-transfizierten Zellen. Doch unterscheidet sich die Zellzyklusdauer von CEACAM20-exprimierenden COS7-Zellen kaum von der von vektor-transfizierten COS7-Zellen. Dies könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass die verwendeten COS7-Zellen kein SYK exprimieren (Pradip *et al.*, 2003), das für die Signalkaskade eines ITAM-tragenden Proteins notwendig ist (vergleiche Einleitung). Andererseits konnte keine Zellpopulation generiert werden, in der alle Zellen CEACAM20 expri-

mieren, so dass mögliche Effekte auf das Wachstum verborgen blieben. Die Proliferationsrate sollte auf jeden Fall erneut untersucht werden, wobei ein Zellsystem verwendet werden könnte, das endogen SYK exprimiert, wie beispielsweise die Prostatakarzinomzelllinie DU145.

### 5.2.2 Funktionalität des ITAM-Motivs von CEACAM20

Die Besonderheit von CEACAM20 liegt in seinem hypothetischen zytoplasmatischen ITAM. Dieses Motiv gehorcht perfekt dem ITAM-Konsensusmotiv. Funktionelle ITAMs werden an ihren Tyrosinresten phosphoryliert, so dass daran Proteintyrosinkinasen wie beispielsweise SYK über sogenannte *src-homology-2*-(SH2)-Domänen binden können. Dadurch werden weitere Signalketten ausgelöst, die zu Aktivierung von Proliferation oder Differenzierung führen. In dieser Arbeit konnte die Tyrosinphosphorylierung von CEACAM20 mittels Immunpräzipitation und Western Blot nach transienter Transfektion in der epithelialen Zelllinie BOSC unter Hemmung von Proteintyrosinphosphatasen nachgewiesen werden. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass das ITAM-Motiv von CEACAM20 funktionell ist. Als nächster Schritt könnten durch Mutationsanalyse die zytoplasmatischen Tyrosine bestimmt werden, die bei CEACAM20 phosphoryliert werden. Insgesamt gibt es neben den beiden im ITAM liegenden Tyrosinen (Tyr-578, Tyr-589) noch weitere zwei Tyrosine (Tyr-511; Tyr-536) wobei eines (Tyr-536) durch alternatives Spleißen in einem ITAM zu liegen kommen würde (siehe Einleitung), während das andere Tyrosin in einem potentiellen Motiv liegt, das nach Phosphorylierung von der Grb2-SH2-Domäne gebunden werden kann (Nioche *et al.*, 2002). Außerdem könnte durch Hemmung mittels des SRC-Familie-Kinasehemmstoffs PP2 die Phosphorylierung durch SRC-Kinasen nachgewiesen werden. Eine weitere Bestimmung der verantwortlichen SRC-Kinasen würde folgen.

### 5.2.3 SYK als *down-stream*-Partner von CEACAM20

Des Weiteren sind *down-stream*-Partner von CEACAM20 von Interesse. Es konnte durch Koexpression von CEACAM20 und SYK-Kinase in BOSC-Zellen und Koimmunpräzipitation gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen beiden stattfindet, die in Gegenwart eines Tyrosinphosphataseinhibitors stärker ist. Dies lässt den

Schluss zu, dass SYK an das phosphorylierte ITAM von CEACAM20 bindet und weitere Signalwege aktiviert, da die Aktivierung dieser Proteintyrosinkinase über Assoziation von SH2-Domänen an ein durch SRC-Proteintyrosinkinasen (SRC-PTKs) doppelt phosphoryliertes ITAM erfolgt (Kurosaki *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 2004). SYK wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Neuere Ergebnisse zeigen eine Expression von SYK auch in nicht-hämatopoetischen Geweben wie beispielsweise Epithelzellen, Hepatozyten, Fibroblasten und neuronalen Zellen (Yanagi *et al.*, 2001). SYK wird, ebenso wie vermutlich CEACAM20, in apikalen Regionen von Epithelzellen im Darm exprimiert (Duta *et al.*, 2006). Der Zusammenhang zwischen ITAM-tragenden Virusproteinen, SYK und Tumorentstehung ist bereits in Kapitel 1.4.3 angedeutet. In diesem Zusammenhang soll die Rolle von SYK näher diskutiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Zellmigration von Epithelzellen, die durch das ITAM-haltige LMP2A (*latent membrane protein 2A*) des Epstein-Barr-Virus induziert wird, durch SYK vermittelt wird. Hemmung von SYK durch Piceatannol oder *small-interfering-RNA*-Moleküle (siRNA) resultiert in einer verminderten Zellmigration (Lu *et al.*, 2006). Der Einfluss von SYK auf die Zelltransformation in Assoziation mit einem ITAM konnte bei dem Env-Glykoprotein des MMTV (*murine mammary tumor virus*) ebenfalls in nicht-hämatopoetischen Zellen gezeigt werden (Katz *et al.*, 2005). ITAM-tragende Proteine wurden als potentielle Onkogene beschrieben, in deren Wirkungsweise SYK eine entscheidende Rolle spielt (Grande *et al.*, 2006; Lanier, 2006). Während SYK in Interaktion mit nur teilweise bekannten, nicht-ITAM-haltigen Proteinen als Tumorsuppressor agieren kann (Coopman *et al.*, 2000; Mahabeleshwar und Kundu, 2003; Li und Sidell, 2005; Chakraborty *et al.*, 2005), ist es in Assoziation mit ITAM-tragenden Proteinen an der Tumorgenese beteiligt (Ross *et al.*, 2006), wobei die Überexpression bzw. Hochregulation der ITAM-tragenden Proteine wie CEACAM20 von entscheidender Bedeutung sein könnte.

#### **5.2.4 Möglicher Einfluss von CEACAM20 auf Differenzierung, Apoptose und Migration**

Um den pathogenetischen Mechanismus der Tumorentstehung verstehen zu können, ist es von großem Interesse zu wissen, was genau die Folge von Überexpression oder Hochregulierung von ITAM-tragenden Proteinen wie CEACAM20 ist. Epithelzellen, die ein Protein mit einem viralen ITAM-Motiv exprimieren, zeigen eine *epi-*

*thelial to mesenchymal transition* (EMT), sowie verschiedene Zeichen der Transformation. Dazu gehören der Verlust der Polarisierung in der dreidimensionalen Morphologie, die erhöhte Sensitivität zur Apoptose, ausgelöst durch TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) oder  $\text{TNF}\alpha$ , und die Herunterregulierung von E-Cadherin und Zytokeratin-18 (Scholle *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2003; Katz *et al.*, 2005). Diese Eigenschaften sind abhängig von einem intakten ITAM-Motiv und konnten auch für die Expression eines nicht-viralen ITAM-Motivs in Epithelzellen nachgewiesen werden (Grande *et al.*, 2006). Veränderungen der Morphologie, die mit Transformation assoziiert sind, können durch pharmakologische Hemmung von SRC oder SYK verhindert werden (Grande *et al.*, 2006). Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die Beteiligung dieser Kinasen an der von den ITAM-tragenden Proteinen ausgelösten Signalkaskade, wie sie in dieser Arbeit bereits zum Teil für CEACAM20 gezeigt werden konnte. In Anbetracht dessen könnte CEACAM20 eine entscheidende Rolle am Transformationsprozess von Epithelzellen spielen. Außerdem könnte CEACAM20 aufgrund seines ITAM-Motivs und der nachgewiesenen Interaktion mit SYK an der Migration von Epithelzellen beteiligt sein, wie es für das LMP2A-Protein des Epstein-Barr-Virus beschrieben ist (Lu *et al.*, 2006), und so in Tumoren epithelialen Ursprungs zur Metastasierung beitragen.

### 5.2.5 Mögliche Funktion von CEACAM20 im Kolonkarzinom

Da CEACAM20 in Seren einzelner Patienten mit Kolonkarzinom mittels eines CEACAM20-spezifischen Sandwich-ELISAs nachgewiesen werden konnte (Schleer, Genovac, Freiburg, persönliche Mitteilung), wurde CEACAM20-mRNA mittels RT-PCR von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien analysiert. In allen Zelllinien konnte CEACAM20-mRNA nachgewiesen werden (Kapitel 4.7). Da CEACAM20 möglicherweise an der Tumorentstehung aufgrund seines ITAM-Motivs beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass es bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen kann. Wie Morrison und Raab-Traub zeigen konnten, ist das ITAM von LMP2A des Epstein-Barr-Virus an der Hemmung der Differenzierung von Epithelzellen sowie der Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges beteiligt (Morrison und Raab-Traub, 2005). Es kommt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern nach Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweges. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der WNT-Signalweg, insbesondere  $\beta$ -Catenin, für die Karzinoge-

nese des Mammakarzinoms durch MMTV wichtig ist (Theodorou *et al.*, 2007).  $\beta$ -Catenin ist als Onkoprotein bekannt und aktiviert eine vermehrte Expression von Genen wie beispielsweise *c-myc* und *CCND1* (Cyclin D1), die zu einer Verstärkung von Zellzyklusprogression und Zellproliferation führen können (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999; Wong und Pignatelli, 2002; Giles *et al.*, 2003; Polakis, 2007). Bereits vor über 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms eine entscheidende Rolle spielt (Kinzler und Vogelstein, 1996). Die Überexpression von  $\beta$ -Catenin führt zur Bildung von adenomatösen Polypen, die primär als nicht maligne angesehen werden, da sie nicht infiltrativ wachsen und keine Metastasierung verursachen. Doch kann es zur Entartung solcher Adenome kommen. Annähernd 95% aller kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen. Somit stellt  $\beta$ -Catenin ein Schlüsselmolekül bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms dar (Bienz und Clevers, 2000; Kolligs *et al.*, 2002). Analog zu LMP2A des Epstein-Barr-Virus könnte CEACAM20 mit seinem zytoplasmatischen ITAM zu einer Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges beitragen und somit an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms maßgeblich beteiligt sein. Wie in Kapitel 1.4.2 erwähnt ist, sind die CEA-Familienmitglieder CEACAM1 und CEACAM7 im kolorektalen Karzinom herunterreguliert, während CEACAM6, das das Überleben sich aus dem epithelialen Gewebeverband lösender Zellen fördert, stark überexprimiert ist (Thompson *et al.*, 1997; Koops *et al.*, 1998; Schölzel *et al.*, 2000; Ilantzis *et al.*, 2002; Blumenthal *et al.*, 2007). Vielleicht gibt es ein Zusammenspiel von CEACAM20 und CEACAM6 bei der Entstehung des Karzinoms des Dickdarms. CEACAM1, das bereits bei sporadischen kolorektalen Adenomen vermindert exprimiert ist, könnte mit seinem zytoplasmatischen ITIM als Gegenspieler fungieren (Nollau *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass zelluläre Aktivierung durch ITAM-tragende Rezeptoren oft unter der Kontrolle von ITIM-tragenden Rezeptoren stehen (Underhill und Goodridge, 2007). Signaltransduktion durch einen multimolekularen Komplex aus Mitgliedern der CEA-Familie könnte durch die relative Stöchiometrie der einzelnen Komponenten reguliert werden. Somit könnte es bei einem Überwiegen der aktivierenden Komponente des ITAMs von CEACAM20 zu einer Förderung der Tumorentstehung durch Rekrutierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges kommen.

### 5.2.6 Funktionen von ITAM-Motiven in der CEA-Familie, mögliche Übertragung auf CEACAM20

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 erwähnt, zeigen weitere Mitglieder der CEA-Familie im zytoplasmatischen Bereich so genannte ITAM- oder ITIM-Motive. Im Folgenden sollen die Funktionen der ITIM- und ITAM-tragenden Proteine näher betrachtet werden, um daraus mögliche Funktionen von CEACAM20 abzuleiten.

Bei CEACAM1 liegt die Besonderheit vor, dass die Isoformen mit beziehungsweise ohne ITIM parallel in einer Zellpopulation vorliegen und je nach Verhältnis zueinander, das von Herkunft und Funktionszustand der Zelle abhängt, die aktivierende oder inhibierende Wirkung überwiegt (Kammerer *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2000). Außerdem ist bekannt, dass CEACAM1 in zahlreichen Tumoren herunterreguliert ist (Kunath *et al.*, 1995; Hsieh *et al.*, 1995; Kammerer *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Isoform von CEACAM1, die das funktionelle ITIM enthält und etwa 15-20% aller Isoformen von CEACAM1 in einer Zelle ausmacht, das Zellwachstum von Kolonkarzinomzelllinien reduzieren, die Fähigkeit zur Koloniebildung vermindern und die Tumorformation verhindern kann (Kunath *et al.*, 1995; Turbide *et al.*, 1997). Das ITIM-Motiv beinhaltet zwei Tyrosine, die durch LYN und HCK, zwei Mitglieder aus der SRC-Familie, phosphoryliert werden, jedoch nicht durch YES, FYN, SRC oder SYK (Skubitz *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu konnte eine Assoziation zwischen CEACAM1 und pp60c-SRC (c-SRC), dem zellulären Homolog des viralen Onkogens v-SRC, das in zahlreichen Tumoren aktiviert ist, nachgewiesen werden (Brümmer *et al.*, 1995; Masaki *et al.*, 2003; Dehm und Bonham, 2004). Dass CEACAM1 über sein ITIM eine wichtige Rolle in der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden spielt, zeigt außerdem die Assoziation mit den Proteintyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2, die durch Dephosphorylierung zu inhibitorischen Signalen führen (Beauchemin *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001).

Ein Beispiel aus der CEA-Familie mit einem zytoplasmatischen ITAM-verwandten Motiv ist CEACAM3. CEACAM3 wird ausschließlich auf humanen Granulozyten exprimiert (Nagel *et al.*, 1993) und konnte als wichtiger Rezeptor für die Oponin-unabhängige Phagozytose und Bakterienelimination identifiziert werden (Schmitter *et al.*, 2004). Durch Bindung des Opa-Proteins eines Bakteriums, vor allem *Neisseria species*, an CEACAM3 kommt es zur Tyrosinphosphorylierung des ITAMs durch aktive Proteintyrosinkinase aus der SRC-Familie, vor allem durch HCK und FGR (Mc-

Caw *et al.*, 2003; Schmitter *et al.*, 2004; Schmitter *et al.*, 2007). An die phosphorylierten Tyrosine des ITAMs kann nun der *guanine-nucleotide exchange factor* (GEF) VAV über seine SH2-Domänen binden und die GTPase RAC aktivieren (Schmitter *et al.*, 2007). In einem transfizierten Hühner-B-Zell-Modell (DT40) sind die Phagozytose des Bakteriums sowie ein intrazellulärer Kalziumfluss abhängig von der Aktivität der Kinase SYK und der Phospholipase C (Chen *et al.*, 2001). In anderen Zelltypen erfordert die CEACAM3-abhängige Elimination von Bakterien kein SYK (Billker *et al.*, 2002; McCaw *et al.*, 2003; Schmitter *et al.*, 2004). Eine genaue Analyse der Beteiligung von SYK zeigt, dass SYK zusammen mit der PI3K (Booth *et al.*, 2003) bei der Internalisierung von Partikeln in einer Größe von 5,6 µm erforderlich ist, jedoch nicht bei Partikeln in der Größenordnung von beispielsweise Neisserien. Die SYK-vermittelte Internalisierung, die von einem phosphorylierten ITAM abhängig ist, kann die Effizienz der Internalisierung von Partikeln erhöhen, wenn die Dichte an CEACAM3-bindendem Liganden (Opa-Protein) an der Oberfläche unterhalb eines Schwellenwertes liegt, und nimmt eine Schlüsselrolle in der CEACAM3-abhängigen Elimination von Bakterien durch humane Granulozyten ein (Sarantis und Gray-Owen, 2007). Überträgt man diese Erkenntnisse auf das verwandte Molekül CEACAM20, sollte VAV als möglicher Partner von CEACAM20 in Erwägung gezogen werden. Zu berücksichtigen ist dabei allerdings, dass das ITAM-Motiv in CEACAM3 von der Konsensus-ITAM-Motivsequenz abweicht, da es ein Methionin anstatt eines Leucins bzw. Isoleucins aufweist (YxxLx<sub>7</sub>YxxM).

### **5.3 Mögliche Verwendung von CEACAM20 für Diagnose, Prognose und Therapie von Tumoren**

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über CEACAM20 stärken die Hypothese, dass CEACAM20 eine Rolle bei der Karzinogenese spielen könnte. Jedoch konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass es im Zusammenhang mit der Entstehung des Prostatakarzinoms steht. Dafür weisen erste Ergebnisse auf eine funktionelle Beteiligung bei der Ausbildung des kolorektalen Karzinoms hin. Es wäre daher von großem Interesse, CEACAM20 auf Proteinebene in Biopsien oder Gewebeschnitten von Patienten mit Kolonkarzinom nachzuweisen. Dazu könnten die in dieser Arbeit verwendeten Methoden Immunhistologie und Western Blot dienen. Des Weiteren könnte bei Schwierigkeiten des Nachweises im Western Blot eine Im-



munpräzipitation von CEACAM20 hilfreich sein. Auch weitere Adenokarzinome des Menschen (Brust und Magen) sollten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene auf die Expression von CEACAM20 untersucht werden, da bei der Maus bereits eine Überexpression von CEACAM20 in diesen Geweben gezeigt werden konnte. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Expression auf RNA-Ebene wäre die *in-situ*-Hybridisierung. Dadurch könnte ebenfalls die genaue Lokalisation von CEACAM20 im Gewebe untersucht werden. Als weiterer Schwerpunkt sollte die intrazelluläre Signaltransduktion von CEACAM20 weiter analysiert werden, vor allem der Ablauf der intrazellulären Kaskade mit Aktivierung verschiedener Signalwege. Die Aufklärung dieser Mechanismen ist für das Verständnis der Funktion von ITAM-tragenden Proteinen bei der Entstehung von epithelialen Tumoren sowie für einen möglichen therapeutischen Ansatz von zentraler Bedeutung. Weitere Funktionsanalysen wie Aktivierung von CEACAM20 durch Antikörper-Quervernetzung sowie der Einfluss von CEACAM20 bei Überexpression auf das Überleben, Wachstumsverhalten sowie eine mögliche Transformation von Epithelzellen sollten im Blickpunkt stehen. Durch Gewinnung dieser Erkenntnisse könnten die antikörper-basierte Immuntherapie oder eine pharmakologische Intervention der Signalmechanismen von CEACAM20 wichtige neue Möglichkeiten bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms oder anderen Adenokarzinomen wie beispielsweise Magen- oder Brusttumoren darstellen. Sollte sich CEACAM20 als Serumparameter des kolorektalen Karzinoms bewahrheiten, könnte CEACAM20 zur Diagnosefindung beitragen oder, wie das verwandte CEA, einen Verlaufs- und Prognoseparameter darstellen.

## 6. Zusammenfassung

Bis heute steht uns keine effektive Therapie für die Behandlung von Patienten mit hormon-unabhängig wachsendem Prostatakarzinom zur Verfügung. Daher sind selektiv exprimierte transmembranäre Proteine, die funktionell am Wachstum des Tumors beteiligt sind, von großem Interesse für eine antikörper-basierte Immuntherapie. CEACAM20 wurde als mögliches Zielantigen für eine solche Immuntherapie identifiziert. Es wurde auf RNA-Ebene in Prostatakarzinomzelllinien und Prostatagewebe-proben nachgewiesen. Außerdem wurde es in Dünndarm und Dickdarm sowie in geringerem Maße in weiteren Geweben gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier unterschiedlichen CEACAM20-Spleißvarianten identifiziert und ihre differentielle Expression in verschiedenen Geweben gezeigt werden. Als Besonderheit weist CEACAM20 eine *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Konsensussequenz in seiner zytoplasmatischen Domäne auf. ITAM-tragende virale Proteine besitzen wachstumsstimulierende Eigenschaften, wie nicht nur für hämatopoetische Zellen, sondern auch für nicht-hämatopoetische Zellen wie Endothel- und Epithelzellen gezeigt werden konnte. Interessanterweise reicht die Überexpression von nicht-viralen ITAM-tragenden Proteinen aus, Zellen zu transformieren. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierbarkeit von CEACAM20 in Gegenwart eines Phosphatasehemmers durch Immunpräzipitation und Western Blot nachgewiesen. Außerdem konnte auf diese Weise eine Interaktion zwischen CEACAM20 und SYK, einem charakteristischen Element der ITAM-vermittelten Signaltransduktion, gezeigt werden. Des Weiteren wurden poly- und monoklonale Antikörper gegen CEACAM20, die durch genetische Immunisierung generiert wurden, zur Funktions- und Lokalisationsanalyse von CEACAM20 charakterisiert. Es wurde das Expressionsmuster in normalem Dünndarmgewebe sowie normalem Prostata- und Prostatakarzinomgewebe untersucht. CEACAM20 scheint in der apikalen Region von Epithelzellen des Dünndarms und der Prostata, jedoch nicht in Prostatakarzinomzellen exprimiert zu werden. Das Ergebnis, dass CEACAM20 in allen untersuchten Kolonkarzinomzelllinien auf RNA-Ebene zu finden ist, lässt die Vermutung zu, dass es an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt ist. Hierzu sollten weitere Analysen folgen, um CEACAM20 als mögliche Zielstruktur für Immuntherapie oder niedermolekulare Medikamente zu charakterisieren.

## 7. Literaturverzeichnis

Agus, D.B., Akita, R.W., Fox, W.D., Lewis, G.D., Higgins, B., Pisacane, P.I., Lofgren, J.A., Tindell, C., Evans, D.P., Maiese, K., Scher, H.I. and Sliwkowski, M.X. (2002) Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, **2**, 127-37.

Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J.F. and Coudert, B. (2006) Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast-cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*, **94**, 259-67.

Ballesta, A.M., Molina, R., Filella, X., Jo, J. and Giménez, N. (1995) Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biol*, **16**, 32-41.

Baranov, V. and Hammarström, S. (2004) Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1), apically expressed on human colonic M cells, are potential receptors for microbial adhesion. *Histochem Cell Biol*, **121**, 83-9.

Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A. and Clark, B.J. (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, **21**, 389-95.

Barnett, T.R., Kretschmer, A., Austen, D.A., Goebel, S.J., Hart, J.T., Elting, J.J. and Kamarck, M.E. (1989) Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol*, **108**, 267-76.

Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E. and Veillette, A. (1997) Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene*, **14**, 783-90.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarström, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Öbrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S. and Zimmermann, W. (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res*, **252**, 243-9.

Benekli, M., Hahn, T., Williams, B.T., Cooper, M., Roy, H.N., Wallace, P., Stewart, C., Bambach, B. and McCarthy, P.L. (2006) Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), methylprednisolone and cyclosporine for acute graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **38**, 365-70.

Berger, C.N., Billker, O., Meyer, T.F., Servin, A.L. and Kansau, I. (2004) Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol*, **52**, 963-83.

Bertz, J., Giersiepen, K., Haberland, J., Hentschel, S., Kaatsch, P., Katalinic, A., Stabenow, R., Stegmaier, C. und Ziegler, H. (2006) Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. Herausgegeben durch die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI)

Bienz, M. and Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, **103**, 311-20.

Billker, O., Popp, A., Gray-Owen, S.D. and Meyer, T.F. (2000) The structural basis of CEACAM-receptor targeting by neisserial Opa proteins. *Trends Microbiol*, **8**, 258-60.

Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E. and Meyer T.F. (2002) Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *EMBO J*, **21**, 560-71.

- Blau, D.M., Turbide, C., Tremblay, M., Olson, M., Létourneau, S., Michaliszyn, E., Jothy, S., Holmes, K.V. and Beauchemin, N. (2001) Targeted disruption of the CEACAM1 (MHVR) gene leads to reduced susceptibility of mice to mouse hepatitis virus infection. *J Virol*, **75**, 8173-86.
- Blumenthal, R.D., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M. (2005) Inhibition of adhesion, invasion and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res*, **65**, 8809-17.
- Blumenthal, R.D., Osorio, L., Hayes, M.K., Horak, I.D., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M. (2005) Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. *Cancer Immunol Immunother*, **54**, 315-27.
- Blumenthal, R.D., Leon, E., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M. (2007) Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer*, **7**, 2.
- Booth, J.W., Telio, D., Liao, E.H., McCaw, S.E., Matsuo, T., Grinstein, S. and Gray-Owen, S.D. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem*, **278**, 14037-45.
- Borjigin, J., Tease, L.A., Barnes, W. and Chan, W.Y. (1990) Expression of the pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes in human testis. *Biochem Biophys Res Commun*, **166**, 622-9.
- Boulton, I.C. and Gray-Owen, S.D. (2002) Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol*, **3**, 229-36.
- Brandriff, B.F., Gordon, L.A., Tynon, K.T., Olsen, A.S., Mhrenweiser, H.W., Fertitta, A., Carrano, A.V. and Trask, B.J. (1992) Order and genomic distances among members of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family determined by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **12**, 773-9.
- Brümmer, J., Neumaier, M., Göpfert, C. and Wagener, C. (1995) Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene*, **11**, 1649-55.
- Busch, C., Hanssen, T.A., Wagener, C. and Öbrink, B. (2002) Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol*, **33**, 290-8.
- Cambier, J.C. (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol*, **155**, 3281-85.
- Chakraborty, G., Rangaswami, H., Jain, S. and Kundu, G.C. (2006) Hypoxia Regulates Cross-talk between Syk and Lck Leading to Breast Cancer Progression and Angiogenesis. *J Biol Chem*, **16**, 11322-31.
- Chen, D., Iijima, H., Nagaishi, T., Nakajima, A., Russell, S., Raychowdhury, R., Morales, V., Rudd, C.E., Utku, N. and Blumberg, R.S. (2004) Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function. *J Immuno*, **172**, 3535-43.
- Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A. and Gotschlich, E.C. (1997) Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *J Exp Med*, **185**, 1557-64.
- Chen, T., Bolland, S., Chen, I., Parker, J., Pantelic, M., Grunert, F. and Zimmermann, W. (2001) The CGM1a (CEACAM3/CD66d)-mediated phagocytic pathway of *Neisseria gonorrhoeae* expressing opacity proteins is also the pathway to cell death. *J Biol Chem*, **276**, 17413-9.
- Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A. and Bolland, S. (2001) Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J Leukoc Biol*, **70**, 335-40.
- Chevinsky, A.H. (1991) CEA in tumors of other than colorectal origin. *Semin Surg Oncol*, **7**, 162-6.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. and Slamon, D.J. (1999) Multinational study for the efficacy and safety

of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, **17**, 2639-48.

Coligan, J.E., Lautenschleger, J.T., Egan, M.L. and Todd, C.W. (1972) Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. *Immunohistochemistry*, **9**, 377-86.

Coopman, P.J.P., Do, M.T.H., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H. and Mueller, S.C. (2000) The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature*, **406**, 742-7.

D'Alessandro, A.M., Pirsch, J.D., Stratta, R.J., Sollinger, H.W., Kalayoglu, M., Maki, D.G. and Belzer, F.O. (1989) OKT3 salvage therapy in a quadruple immunosuppressive protocol in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*, **47**, 297-300.

Dango, S., Sienel, W., Schreiber, M., Stremmel, C., Kirschbaum, A., Pantel, K. and Passlick, B. (2008) Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM-1) is associated with increased angiogenic potential in non-small-cell lung cancer. *Lung cancer*, **60**, 426-33.

Davies, A.J. (2007) Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene*, **26**, 3614-28.

Dawson, C.W., George, J.H., Blake, S.M.S., Longnecker, R. and Young, L.S. (2001) The Epstein-Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 2A Augments Signaling from Latent Membrane Protein 1. *Virology*, **289**, 192-207.

De Carlo, M., Maselli, D., Cortese, B., Ciabatti, N., Gistri, R., Levantino, M., Balbarini, A., De Caterina, R. and Petronio, A.S. (2008) Emergency coronary artery bypass grafting in patients with acute myocardial infarction treated with glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors. *Int J Cardiol*, **123**, 229-33.

Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T. and Altman, A. (1996) Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity*, **5**, 591-604.

Dehm, S.M. and Bonham, K. (2004) SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol*, **82**, 263-74.

De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B. and Nelson, W.G. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, **7**, 256-69.

Duta, F., Ulanova, M., Seidel, D., Puttagunta, L., Musat-Marcu, S., Harrod, K.S., Schreiber, A.D., Steinhoff, U. and Befus, A.D. (2006) Differential expression of spleen tyrosine kinase Syk isoforms in tissues: effects of the microbial flora. *Histochem Cell Biol*, **126**, 495-505.

Duxbury, M.S., Ito, H., Ashley, S.W. and Whang, E.E. (2004) CEACAM6 as a novel target for indirect type 1 immunotoxin-based therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 837-43.

Duxbury, M.S., Matros, E., Clancy, T., Bailey, G., Doff, M., Zinner, M.J., Ashley, S.W., Maitra, A., Redston, M. and Whang, E.E. (2005) CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg*, **241**, 491-6.

Dveksler, G.S., Dieffenbach, C.W., Cardellichio, C.B., McCuaig, K., Pensiero, M.N., Jiang, G.S., Beauchemin, N. and Holmes, K.V. (1993) Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol*, **67**, 1-8.

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

- Ellerman, D.A., Ha, C., Primakoff, P., Myles, D.G. and Dveksler, G.S. (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell*, **14**, 5098-103.
- El Hillal, O., Kurosaki, T., Yamamura, H., Kinet, J. P. and Scharenberg, A. M. (1997) Syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1919-24.
- Ergün, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurmbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M. and Wagener, C. (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*, **5**, 311-20.
- Estrera, V.T., Chen, D.T., Luo, W., Hixson, D.C. and Lin, S.H. (2001) Signal transduction by the CEA-CAM1 tumor suppressor. Phosphorylation of serine 503 is required for growth-inhibitory activity. *J Biol Chem*, **276**, 15547-53.
- Fenton, C. and Perry, C.M. (2006) Spotlight on gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukaemia. *BioDrugs*, **20**, 137-9.
- Finkenzeller, D., Kromer, B., Thompson, J.A. and Zimmermann, W. (1997) Cea5, a structurally divergent member of the murine carcinoembryonic antigen gene family, is exclusively expressed during early placental development in trophoblast giant cells. *J Biol Chem*, **272**, 31369-76.
- Frängsmayr, L., Baranov, V. and Hammarström, S. (1999) Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol*, **20**, 277-92.
- Frödin, J.E., Lefvert, A.K. and Mellstedt, H. (1992) The clinical significance of HAMA in patients treated with mouse monoclonal antibodies. *Cell Biophys*, **21**, 153-65.
- Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1653**, 1-24.
- Gold, P. and Freedman, S.O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, **122**, 467-81.
- Goldstein, M.J. and Mitchell, E.P. (2005) Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest*, **23**, 338-51.
- Grande, S.M., Katz, E., Crowley, J.E., Bernardini, M.S., Ross, S.R. and Monroe, J.G. (2006) Cellular ITAM containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells. *Oncogene*, **25**, 2748-57.
- Grande, S.M., Ross, S.R. and Monroe, J.G. (2006) Viral immunoreceptor-associated tyrosine-based activation motifs: potential players in oncogenesis. *Future Oncol*, **2**, 301-10.
- Gray-Owen, S.D. (2003) Neisserial Opa proteins: impact on colonization, dissemination and immunity. *Scand J Infect Dis*, **35**, 614-8.
- Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Öbrink, B. and Singer, B.B. (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol*, **74**, 126-34.
- Grossmann, I., de Bock, G.H., Meershoek-Klein Kranenburg, W.M., van de Velde, C.J. and Wiggers, T. (2007) Carcinoembryonic antigen (CEA) measurement during follow-up for rectal carcinoma is useful even if normal levels exist before surgery. A retrospective study of CEA values in the TME trial. *Eur J Surg Oncol*, **33**, 183-7.
- Gruber, R., van Haarlem, L.J., Warnaar, S.O., Holz, E. and Riethmüller, G. (2000) The human anti-mouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A. *Cancer Res*, **60**, 1921-6.

- Ha, C.T., Waterhouse, R., Wessells, J., Wu, J.A. and Dveksler, G.S. (2005) Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2 and TGF-beta1. *J Leukoc Biol*, **77**, 948-57.
- Haks, M.C., Cordaro, T.A., van den Brakel, J.H., Haanen, J.B., de Vries, E.F., Borst, J., Krimpenfort, P. and Kruisbeek, A.M. (2001) A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J Immunol*, **166**, 2576-88.
- Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Cancer Biol*, **9**, 67-81.
- Hauck, C.R., Agerer, F., Münzner, P. and Schmitter, T. (2006) Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol*, **85**, 235-42.
- Hauck, W., Nédellec, P., Turbide, C., Stanners, C.P., Barnett, T.R. and Beauchemin, N. (1994) Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinoms. *Eur J Biochem*, **223**, 529-41.
- Hefta, S.A., Hefta, L.J., Lee, T.D., Paxton, R.J. and Shively, J.E. (1988) Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4648-52.
- Hemmila, E., Turbide, C., Olson, M., Jothy, S., Holmes, K.V. and Beauchemin, N. (2004) CEACAM1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol*, **78**, 10156-65.
- Hill, D.J., Toleman, M.A., Evans, D.J., Villullas, S., Van Alphen, L. and Virji, M. (2001) The variable P5 proteins of typeable and non-typeable Haemophilus influenzae target human CEACAM1. *Mol Microbiol*, **39**, 850-62.
- Hill, D.J. and Virji, M. (2003) 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**, 117-29.
- Hinoda, Y., Sasaki, S., Ishida, T. and Imai, K. (2004) Monoclonal antibodies as effective therapeutic agents for solid tumors. *Cancer Sci*, **95**, 621-5.
- Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., Yanagi, S., Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H. and Nakanishi, S. (2004) Phosphorylation and recruitment of Syk by immunoreceptor tyrosine-based activation motif-based phosphorylation of tamalin. *J Biol Chem*, **279**, 32308-15.
- Hofstetter, R.B., Campbell, D.E., Chi, K.F., Kerckhoff, S., Cleary, K.R., Ullrich, S., Thomas, P. and Jessup, J.M. (1990) Carcinoembryonic antigen enhances metastatic potential of human colorectal carcinoma. *Arch Surg*, **125**, 300-4.
- Hsieh, J.T., Luo, W., Song, W., Wang, Y., Kleinerman, D.I. Van, N.T. and Lin, S.H. (1995) Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res*, **55**, 190-7.
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A. and Beauchemin, N. (1999) 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**, 335-44.
- Humphrey, M.B., Lanier, L.L. and Nakamura, M.C. (2005) Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*, **208**, 50-65.
- Hurwitz, A.A., Yanover, P., Markowitz, M., Allison, J.P. and Kwon, E.D. (2003) Prostate cancer: advances in immunotherapy. *BioDrugs*, **17**, 131-8.
- Ilantzis, C., De Marte, L., Screaton, R.A. and Stanners, C.P. (2002) Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, **4**, 151-63.

- Jantscheff, P., Terracciano, L., Lowy, A., Glatz-Krieger, K., Grunert, F., Micheel, B., Brümmer, J., Laffer, U., Metzger, U., Herrmann, R. and Rochlitz, C (2003) Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol*, **21**, 3638-46.
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S. and von Kleist, S. (1998) Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation, *Eur J Immunol*, **28**, 3664-74.
- Kammerer, R., Stober, D., Singer, B.B., Öbrink, B. and Reimann, J. (2001) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J Immunol*, **166**, 6537-44.
- Kammerer, R., Riesenberger, R., Weiler, C., Lohrmann, J., Schleypen, J. and Zimmermann, W. (2004) The tumour suppressor gene CEACAM1 is completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma. *J Pathol*, **204**, 258-67.
- Kammerer, R. (2007) Die carcinoembryonic antigen-related cell adhesionmoleculen (CEACAM) als Regulatoren der immunvermittelten Tumorabwehr (Habilitationsschrift)
- Karnes, R.J., Whelan, C.M. and Kwon, E.D. (2006) Immunotherapy for prostate cancer. *Curr Pharm Des*, **12**, 807-17.
- Kataoka, K., Takata, Y., Nakajima, A., Saito, S. and Huh, N. (2000) A carcinoembryonic antigen family cDNA from mouse placenta encoding a protein with a rare domain composition. *Placenta*, **21**, 610-4.
- Katz, E., Lareef, M.H., Rassa, J.C., Grande, S.M., King, L.B., Russo, J., Ross, S.R. and Monroe, J.G. (2005) MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J Exp Med*, **201**, 431-39.
- Kim, J., Kaye, F.J., Henslee, J.G., Shively, J.E., Park, J.G., Lai, S.L., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L. and Gazdar, A.F. (1992) Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*, **52**, 718-25.
- Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E. and Siraganian, R. P. (1996) Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1471-1478.
- Kinugasa, T., Kuroki, M., Takeo, H., Matsuo, Y., Ohshima, K., Yamashita, Y., Shirakusa, T. and Matsuo, Y. (1998) Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. *Int J Cancer*, **76**, 148-53.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-70.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-7.
- Kolligs, F.T., Bommer, G. and Göke, B. (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, **66**, 131-44.
- Koops, M.D., Thompson, J., Zimmermann, W. and Stanners, C.P. (1998) Transcriptional regulation of the non-specific cross-reacting antigen gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family up-regulated in colorectal carcinomas. *Eur J Biochem*, **253**, 778-86.
- Kromer, B., Finkenzeller, D., Wessels, J., Dveksler, G., Thompson, J. and Zimmermann, W. (1996) Coordinate expression of splice variants of the murine pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene family during placental development. *Eur J Biochem*, **242**, 280-7.
- Küspert, K., Pils, S. and Hauck, C.R. (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology*, **18**, 565-71.



- Kunath, T., Ordoñez-García, C., Turbide, C. and Beauchemin, N. (1995) Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*, **11**, 2375-82.
- Kuroki, M., Abe, H., Imakiirei, T., Liao, S., Uchida, H., Yamauchi, Y., Oikawa, S. and Kuroki, M. (2001) Identification and comparison of residues critical for cell-adhesion activities of two neutrophil CD66 antigens, CEACAM6 and CEACAM8. *J Leukoc Biol*, **70**, 543-50.
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T. and Yamamura, H. (1994) Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med*, **179**, 1725-9.
- Lanier, L.L. (2006) Viral immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signaling in cell transformation and cancer. *Trends Cell Biol*, **16**, 388-90.
- Law, C.L., Chandran, K.A., Sidorenko, S.P. and Clark, E.A. (1996) Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol*, **16**, 1305-15.
- Lefkowitz, J. and Topol, E.J. (1995) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors in ischemic heart disease. *Curr Opin Cardiol*, **10**, 420-6.
- Leslie, K.K., Watanabe, S., Lei, K.J., Chou, D.Y., Plouzek, C.A., Deng, H.C., Torres, J. and Chou, J.Y. (1990) Linkage of two human pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes: one is associated with hydatidiform mole. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5822-6.
- Leusch, H.G., Drzeniek, Z., Markos-Pusztai, Z. and Wagener, C. (1991) Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect Immun*, **59**, 2051-7.
- Li, J. and Sidell, N. (2005) Growth-related oncogene produced in human breast cancer cells and regulated by Syk protein-tyrosine kinase. *Int J Cancer*, **117**, 14-20.
- Liu, Y., Majumder, S., McCall, W., Sartor, C.I., Mohler, J.L., Gregory, C.W., Earp, H.S. and Whang, Y.E. (2005) Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer. *Cancer Res*, **15**, 3404-9.
- Lu, J., Lin, W.-H., Chen, S.-Y., Longnecker, R., Tsai, S.-C., Chen, C.-L. and Tsai, C.-H. (2006) Syk Tyrosine Kinase Mediates Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A-induced Cell Migration in Epithelial Cells. *J Biol Chem*, **281**, 8806-14.
- Lucka, L., Cichocka, I., Bäumlner, K., Bechler, K. and Reutter, W. (1995) A short isoform of carcinoembryonic-antigen-related rat liver cell-cell adhesion molecule (C-CAM/gp110) mediates intercellular adhesion. Sequencing and recombinant functional analysis. *Eur J Biochem*, **234**, 527-35.
- Mahabeleshwar, G.H. and Kundu, G.C. (2003) Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **278**, 6209-21.
- Marcus, R. (2005) Use of 90Y-ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol*, **32**, 36-43.
- Markel, G., Lieberman, N., Katz, G., Arnon, T.I., Lotem, M., Drize, O., Blumberg, R.S., Bar-Haim, E., Mader, R., Eisenbach, L. and Mandelboim, O. (2002) CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol*, **168**, 2803-10.
- Masaki, T., Igarashi, K., Tokuda, M., Yukimasa, S., Han, F., Jin, Y.J., Li, J.Q., Yoneyama, H., Uchida, N., Fujita, J., Yoshiji, H., Watanabe, S., Kurokohchi, K. and Kuriyama, S. (2003) pp60c-src activation in lung adenocarcinoma. *Eur J Cancer*, **39**, 1447-55.
- Matskova, L.V., Helmstetter, C., Ingham, R.J., Gish, G., Lindholm, C.K., Ernberg, I., Pawson, T. and Winberg, G. (2007) The Shb signalling scaffold binds to and regulates constitutive signals from the Epstein-Barr virus LMP2A membrane protein. *Oncogene*, **26**, 4908-17.

- Maxwell, P. (1999) Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br J Biomed Sci*, **56**, 209-14.
- McCaw, S.E., Schneider, J., Liao, E.H., Zimmermann, W. and Gray-Owen, S.D. (2003) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor. *Mol Microbiol*, **49**, 623-37.
- McCuaig, K., Turbide, C. and Beauchemin, N. (1992) mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Differ*, **3**, 165-74.
- McDonald, D.R., Brunden, K.R. and Landreth, G.E. (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci*, **17**, 2284-94.
- McLellan, A.S., Fischer, B., Dveksler, G., Hori, T., Wynne, F., Ball, M., Okumura, K., Moore, T. and Zimmermann, W. (2005) Structure and evolution of the mouse pregnancy-specific glycoprotein (*Psg*) gene locus. *BMC Genomics*, **6**, 4-21.
- Mellstedt, H. (2003) Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today*, **39**, 1-16.
- Mendoza, N., Phillips, G.L., Silva, J., Schwall, R. and Wickramasinghe, D. (2002) Inhibition of ligand-mediated HER2 activation in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, **62**, 5485-8.
- Miura, H.S., Nakagaki, K. and Taguchi, F. (2004) N-terminal domain of the murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein. *J Virol*, **78**, 216-23.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. and Mekada, E. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321-4.
- Mocsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L. and Lowell, C.A. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol*, **7**, 1326-33.
- Möller, M.J., Kammerer, R., Grunert, F. and von Kleist, S. (1996) Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer*, **65**, 740-5.
- Morrison, J.A., Klingelutz, A.J. and Raab-Traub, N. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells. *J Virol*, **77**, 12276-84.
- Morrison, J.A. and Raab-Traub, N. (2005) Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of  $\beta$ -catenin signaling. *J Virol*, **79**, 2375-82.
- Müller, M.M., Singer, B.B., Klaile, E., Obrink, B. and Lucka, L. (2005) Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signalling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood*, **105**, 3925-34.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R. and Ilsley, D. (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, **21**, 128-34.
- Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T.W., Watt, S.M., Thompson, J. and Zimmermann, W. (1993) Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur J Biochem*, **214**, 27-35.
- Najjar, S.M. (2002) Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 240-5.

- Nédellec, P., Dveksler, G.S., Daniels, E., Turbide, C., Chow, B., Basile, A.A., Holmes, K.V. and Beauchemin, N. (1994) Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol*, **68**, 4525-37.
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., DeWeese, T.L. and Isaacs, W.B. (2004) The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol*, **172**, S6-11, S11-2.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P. and Wagener, C. (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10744-8.
- N'Guessan, P.D., Vigelahn, M., Bachmann, S., Zabel, S., Opitz, B., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Zweigner, J., Riesbeck, K., Singer, B.B., Suttorp, N. and Slevogt, H. (2007) The UspA1 protein of *Moxarella catarrhalis* induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. *J Infect Dis*, **195**, 1651-60.
- Nioche, P., Liu, W.Q., Broutin, I., Charbonnier, F., Latreille, M.T., Vidal, M., Roques, B., Garbay, C. and Ducruix, A. (2002) Crystal structures of the SH2 domain of Grb2 : highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor. *J Mol Biol*, **315**, 1167-77.
- Nittka, S., Günther, J., Ebisch, C., Erbersdobler, A. and Neumaier, M. (2004) The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, **23**, 9306-13.
- Nittka, S., Böhm, C., Zentgraf, H. and Neumaier, M. (2008) The CEACAM1-mediated apoptosis pathway is activated by CEA and triggers dual cleavage of CEACAM1. *Oncogene*, **27**, 3721-8.
- Nollau, P., Prall, F., Helmchen, U., Wagener, C. and Neumaier, M. (1997) Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization. *Am J Pathol*, **151**, 521-30.
- Öbrink, B. (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 616-26.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A. and Hammarström, S. (1994) Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics*, **23**, 659-68.
- Ordonez, C., Zhai, A.B., Camacho-Leal, P., Demarte, L., Fan, M.M. and Stanners, C.P. (2007) GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin alpha5beta1-fibronectin interaction. *J Cell Physiol*, **210**, 757-65.
- Ota, Y. and Samelson, L.E. (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science*, **276**, 418-20.
- Pagano, L., Fianchi, L., Caira, M., Rutella, S. and Leone, G. (2007) The role of Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients. *Oncogene*, **26**, 3679-90.
- Paxton, R.J., Mooser, G., Pande, H., Lee, T.D. and Shively, J.E. (1987) Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 920-4.
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrison, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Rüschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden E., Dolci, M.S., Gelber, R.D.; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, **353**, 1659-72.
- Polakis, P. (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **17**, 45-51.

- Pradip, D., Peng, X. and Durden, D.L. (2003) Rac2 specificity in macrophage integrin signaling: potential role for Syk kinase. *J Biol Chem*, **278**, 41661-9.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Löning, T. and Wagener, C. (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, **44**, 35-41.
- Reichert, J.M. and Valge-Archer, V.E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 349-56.
- Reth, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature*, **338**, 383-84.
- Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J. and Pichlmayr, R. (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*, **16**, 1788-94.
- Ross, S.R., Schmidt, J.W., Katz, E., Cappelli, L., Hultine, S., Gimotty, P. and Monroe, J.G. (2006) An immunoreceptor tyrosine activation motif in the mouse mammary tumor virus envelope protein plays a role in virus-induced mammary tumors. *J Virol*, **80**, 9000-8.
- Rudert, F., Zimmermann, W. and Thompson, J.A. (1989) Intra- and interspecies analyses of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family reveal independent evolution in primates and rodents. *J Mol Evol*, **29**, 126-34.
- Salahshor, S., Goncalves, J., Chetty, R., Gallinger, S. and Woodgett, J.R. (2005) Differential gene expression profile reveals deregulation of pregnancy specific beta1 glycoprotein 9 early during colorectal carcinogenesis. *BMC Cancer*, **5**, 66.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-67.
- Sarantis, H. and Gray-Owen, S.D. (2007) The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway. *Cell Microbiol*, **9**, 2167-80.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P. and Hauck, C.R. (2004) Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*, **199**, 35-46.
- Schmitter, T., Pils, S., Sakk, V., Frank, R., Fischer, K.D. and Hauck, C.R. (2007) The granulocyte receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3) directly associates with Vav to promote phagocytosis of human pathogens. *J Immunol*, **178**, 3797-805.
- Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B. and Thompson, J. (2000) Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, **156**, 595-605.
- Scholle, F., Bendt, K.M. and Raab-Traub, N. (2000) Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol*, **74**, 10681-9.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. and Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, **7**, 3.
- Screaton, R.A., DeMarte, L., Draber, P. and Stanners, C.P. (2000) The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidyl-inositol anchor. *J Cell Biol*, **150**, 613-26.

- Shao, L., Allez, M., Park, M.S. and Mayer, L. (2006) immunomodulatory roles of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Ann N Y Acad Sci*, **1072**, 194-209.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5522-7.
- Sidorenko, S.P., Law, C.L., Chandran, K.A. and Clark, E.A. (1995) Human spleen tyrosine kinase p72Syk associates with the Src-family kinase p53/56Lyn and a 120-kDa phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 359-63.
- Silver, R.M., Heyborne, K.D. and Leslie, K.K. (1993) Pregnancy specific beta 1 glycoprotein (SP-1) in maternal serum and amniotic fluid; pre-eclampsia, small for gestational age fetus and fetal distress. *Placenta*, **14**, 583-9.
- Singer, B.B., Scheffrahn, I. and Öbrink, B. (2000) 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**, 1236-44.
- Singer, B.B., Scheffrahn, I., Heymann, R., Sigmundsson, K., Kammerer, R. and Öbrink, B. (2002) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol*, **168**, 5139-46.
- Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Ahmed, K. and Skubitz, A.P. (1995) CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol*, **155**, 5382-90.
- Snyder, S.K., Wessner, D.H., Wessells, J.L., Waterhouse, R.M., Wahl, L.M., Zimmermann, W. and Dveksler, G.S. (2001) Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta 1 by human monocytes. *Am J Reprod Immunol*, **45**, 205-16.
- Soni, P., Al-Hosaini, K.A., Fernström, M.A. and Najjar, S.M. (1999) Cell adhesion properties and effects on receptor-mediated insulin endocytosis are independent properties of pp120, a substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol Res Commun*, **1**, 102-8.
- Stein, R. and Goldenberg, D.M. (2004) 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**, 1559-64.
- Stern, N., Markel, G., Arnon, T.I., Gruda, R., Wong, H., Gray-Owen, S.D. and Mandelboim, O. (2005) Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J Immunol*, **174**, 6692-701.
- Sugar, L.M. (2006) Inflammation and prostate cancer. *Can J Urol*, **13**, 46-7.
- Sundberg, U. and Öbrink, B. (2002) CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J Cell Sci*, **115**, 1273-84.
- Taheri, M., Saragovi, U., Fuks, A., Makkerh, J., Mort, J. and Stanners, C.P. (2000) Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem*, **275**, 26935-43.
- Takami, N., Misumi, Y., Kuroki, M., Matsuoka, Y. and Ikehara, Y. (1988) Evidence for carboxyl-terminal processing and glycolipid-anchoring of human carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem*, **263**, 12716-20.
- Tan, K., Zelus, B.D., Meijers, R., Liu, J.H., Bergelson, J.M., Duke, N., Zhang, R., Joachimiak, A., Holmes, K.V. and Wang, J.H. (2002) Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J*, **21**, 2076-86.

- Teglund, S., Zhou, G.Q. and Hammarström, S. (1995) Characterization of cDNA encoding novel pregnancy-specific glycoprotein variants. *Biochem Biophys Res Commun*, **211**, 656-64.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422-6.
- Theodorou, V., Kimm, M.A., Boer, M., Wessels, L., Theelen, W., Jonkers, J. and Hilkens, J. (2007) MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. *Nat Genet*, **39**, 759-69.
- Thompson, J. and Zimmermann, W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. *Tumour Biol*, **9**, 63-83.
- Thompson, J.A., Grunert, F. and Zimmermann, W. (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal*, **5**, 344-66.
- Thompson, J., Zimmermann, W., Nollau, P., Neumaier, M., Weber-Arden, J., Schrewe, H., Craig, I. and Willcocks, T. (1994) CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J Biol Chem*, **269**, 32924-31.
- Thompson, J.A. (1995) Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol*, **16**, 10-6.
- Thompson, J.A., Eades-Permer, A.M., Ditter, M., Muller, W.J. and Zimmermann, W. (1997) Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: an animal model for CEA-directed tumor immunotherapy. *Int J Cancer*, **72**, 197-202.
- Thompson, J., Seitz, M., Chastre, E., Ditter, M., Aldrian, C., Gespach, C. and Zimmermann, W. (1997) Down-regulation of carcinoembryonic antigen family member 2 expression is an early event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, **57**, 1776-84.
- Thomson, D.M., Krupey, J., Freedman, S.O. and Gold, P. (1966) The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 161-7.
- Timme, T.L., Satoh, T., Tahir, S.A., Wang, H., Teh, B.S., Butler, E.B., Miles, B.J., Amato, R.J., Kadmon, D. and Thompson, T.C. (2003) Therapeutic targets for metastatic prostate cancer. *Curr Drug Targets*, **4**, 251-61.
- Turbide, C., Kunath, T., Daniels, E. and Beauchemin, N. (1997) Optimal Ratios of Biliary Glycoprotein Isoforms Required for Inhibition of Colonic Tumor Cell Growth. *Cancer Res*, **57**, 2781-8.
- Underhill, D.M. and Goodridge, H.S. (2007) The many faces of ITAMs. *Trends Immunol*, **28**, 66-73.
- Vesalainen, S., Lipponen, P., Talja, M. and Syrjänen, K. (1994) Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*, **30A**, 1797-803.
- Villullas, S., Hill, D.J., Sessions, R.B., Rea, J. and Virji, M. (2007) Mutational analysis of human CEA-CAM1: the potential of receptor polymorphism in increasing host susceptibility to bacterial infection. *Cell Microbiol*, **9**, 329-46.
- Virji, M., Evans, D., Hadfield, A., Grunert, F., Teixeira, A.M. and Watt, S.M. (1999) Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification of Opa adhesinotopes on the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol*, **34**, 538-51.
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A. and Watt, S.M. (2000) Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, **36**, 784-95.

- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F. and Dehio, C. (1998) Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol Microbiol*, **30**, 657-71.
- Wang, L., Dittmer, D.P., Tomlinson, C.C., Fakhari, F.D. and Damania, B. (2006) Immortalization of primary endothelial cells by K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res*, **66**, 3658-66.
- Wang, X., Lau, C., Wiehler, S., Pow, A., Mazzulli, T., Gutierrez, C., Proud, D. and Chow, C.W. (2006) Syk is downstream of intercellular adhesion molecule-1 and mediates human rhinovirus activation of p38MAPK in airway epithelial cells. *J Immunol*, **177**, 6859-70.
- Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med*, **195**, 277-82.
- Watt, S.M., Teixeira, A.M., Zhou, G.Q., Doyonnas, R., Zhang, Y., Grunert, F., Blumberg, R.S., Kuroki, M., Skubitz, K.M. and Bates, P.A. (2001) Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood*, **98**, 1469-79.
- Webster, W.S., Small, E.J., Rini, B.I. and Kwon, E.D. (2005) Prostate Cancer Immunology: Biology, Therapeutics and Challenges. *J Clin Oncol*, **23**, 8262-9.
- Wessells, J., Wessner, D., Parsells, R., White, K., Finkenzeller, D., Zimmermann, W. and Dveksler, G. (2000) Pregnancy specific glycoprotein 18 induces IL-10 expression in murine macrophages. *Eur J Immunol*, **30**, 1830-40.
- Westwood, J.H., Bessell, E.M., Bukhari, M.A., Thomas, P. and Walker, J.M. (1974) Studies on the structure of the carcinoembryonic antigen. I. some deductions on the basis of chemical degradations. *Immunohistochemistry*, **11**, 811-8.
- Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405.
- Wong, N.A. and Pignatelli, M. (2002) Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol*, **160**, 389-401.
- Würz, H., Geiger, W., Künzig, H.J., Jabs-Lehmann, A., Bohn, H. and Lüben, G. (1981) Radioimmunoassay of SP1 (pregnancy-specific beta1-glycoprotein) in maternal blood and in amniotic fluid normal and pathologic pregnancies. *J Perinat Med*, **9**, 67-78.
- Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T. and Yamamura, H. (2001) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 495-8.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T. and Zimmermann, W. (2005) Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine *Cea* family. *Genomics*, **86**, 566-80.
- Zhou, G.Q., Baranov, V., Zimmermann, W., Grunert, F., Erhard, B., Mincheva-Nilsson, L., Hammarström, S. and Thompson, J. (1997) Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta. *Placenta*, **18**, 491-501.
- Zhou, H., Fuks, A., Alcaraz, G., Bolling, T.J. and Stanners, C.P. (1993) Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol*, **122**, 951-60.
- Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, H.-H., Shively, J.E., von Kleist, S. and Thompson, J.A. (1988) Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res*, **48**, 2550-4.

Zimmermann, W., Weiss, M. and Thompson, J.A. (1989) cDNA cloning demonstrates the expression of pregnancy-specific glycoprotein genes, a subgroup of the carcinoembryonic antigen gene family, in fetal liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 1197-209.

Zoubir, F., Khan, W.N. and Hammarström, S. (1990) Carcinoembryonic antigen gene family members in submandibular salivary gland: demonstration of pregnancy-specific glycoproteins by cDNA cloning. *Biochem Biophys Res Commun*, **169**, 203-16.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität ( <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
Ak	Antikörper
BGP	Biliäres Glykoprotein ( <i>biliary glycoprotein</i> )
Bp	Basepaare
°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
Cp	<i>Crossing point</i>
Cyt	zytoplasmatisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
(d)NTP	2'-(Desoxy)Ribonukleosid 5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
et al.	und andere
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell scan</i> )
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HAMA	humane Anti-Maus-Antikörper
Hsa	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )
HHV	Humanes Herpesvirus ( <i>humane herpes virus</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante ( <i>constant</i> ) Immunglobulindomäne
IgV-Domäne	variable ( <i>variable</i> ) Immunglobulindomäne
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ITAM	auf der Aminosäure Tyrosin basierendes aktivierendes Motiv des Immunrezeptors ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
ITIM	Auf der Aminosäure Tyrosin basierendes inhibitorisches Motiv des Im-

	munrezeptors ( <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> )
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Signalpeptid ( <i>leader</i> )
LMP2A	Latentes Membranprotein 2A ( <i>latent membrane protein 2A</i> )
M	Molar
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
mg	Milligramm
MHV	Maushepatitisvirus ( <i>mouse hepatitis virus</i> )
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
Mmu	Maus ( <i>Mus musculus</i> )
MMTV	Brusttumorvirus der Maus ( <i>mouse mammary tumor virus</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
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	Reverse Transkription ( <i>reverse transcription</i> )
s	Sekunde
SAP	<i>single amino acid polymorphism</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SV 40	Simian Virus 40
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Stadieneinteilungssystem von malignen Tumoren (Tumor, Nodes, Metastasen)
UspA1	Weit verbreitetes Oberflächenmolekül A1 ( <i>ubiquitous surface protein A1</i> )
UTR	Nicht-translatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
V	Volt

## 9. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann dafür, dass ich im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin promovieren konnte und damit eine besondere Förderung erhalten habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann, der mit viel Geduld und Engagement meine Doktorarbeit betreut hat. Seine stete Diskussionsbereitschaft sowie sein großes Interesse an meiner Arbeit waren für mich von zentraler Bedeutung.

Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Robert Kammerer bedanken, der mir stets mit Rat und Tat in theoretischen und in praktischen Fragen zur Seite stand.

In ganz besonderem Maße hat Dr. Rainer Riesenberg Anteil an dieser Arbeit: Vielen Dank für die fortwährende Unterstützung, sei es bei der Immunhistologie oder bei zahlreichen anderen Versuchen! Mit unendlicher Hilfsbereitschaft und wertvollen Hinweisen hat Dr. Riesenberg die gesamte Arbeit begleitet. Mit ihm zusammenzuarbeiten, hat immer sehr viel Freude gemacht.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Alexander Buchner, der sich um die nicht seltenen Probleme mit dem Computer gekümmert hat.

Auch bei Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer und Dr. Heike Pohla möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Barbara Walzog möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir den SYK-Expressionsvektor zur Verfügung gestellt hat.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Marco Düring für seine äußerst hilfreichen Tipps zu Immunpräzipitation und Western Blot bedanken.

Dr. Kathleen Ebelt möchte ich meinen Dank für die Prostatagewebeproben aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Andreas Eisenried für die Einarbeitung im Labor und die Einführung in das Gebiet der Molekularbiologie sowie in die Thematik der Doktorarbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt meine ganze Dankbarkeit meiner Familie: Meinen Eltern für die tatkräftige Unterstützung in allen Bereichen und meiner Schwester, die es unter anderem durch gemeinsame wunderschöne Wanderungen geschafft hat, mich immer wieder neu für die Arbeit zu motivieren.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Michaela Paptistella  
 Geburtsdatum/-ort: 08. August 1981 in München  
 Familienstand: ledig

### Schulbildung:

Sep. 1988 - Juli 1992: Grundschule an der Regina-Ullmann-Straße in München  
 Sep. 1992 - Juli 1999: Humanistisches Wilhelmshaus in München  
 Sep. 1999 - Juli 2001: Carl-Spitzweg-Gymnasium in Germering mit Abschluss Abitur

### Hochschulausbildung:

Okt. 2002 - Okt. 2008: Studium der Humanmedizin an der LMU München  
 August 2004: Physikum  
 Oktober 2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Famulaturen:

März 2005: Famulatur in der Pathologie im Allgemeinen Krankenhaus Wien (Österreich)  
 September 2005: Famulatur in der Inneren Medizin im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in München  
 September 2006: Famulatur in der Anästhesiologie im St. Luke's Hospital in Malta  
 März/April 2007: Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe im Toronto East General Hospital (Lehrkrankenhaus der University of Toronto), Kanada

### Praktisches Jahr:

Aug. - Dez. 2007: Tertian in der Inneren Medizin der Medizinischen Klinik Innenstadt, LMU  
 Dez. 2007 - März 2008: Tertian in der Anästhesiologie des Klinikums Großhadern, LMU  
 März - Juli 2008: Tertian in der Chirurgie des Kantonsspitals Winterthur (Schweiz)

### Berufstätigkeit als Ärztin:

seit Januar 2009: Assistenzärztin in der Anästhesiologie des Klinikums Großhadern, LMU

### Promotion:

Nov. 2005 - Aug. 2007: Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“  
 Dissertationsthema: „CEACAM 20, ein potentielles Zielmolekül für die Immuntherapie von Prostatakarzinompatienten“  
 Oktober 2007: Teilnahme am 17<sup>th</sup> Annual International CEA Symposium in Los Angeles, USA: Postervorstellung mit Kurzvortrag

### Stipendium:

seit Oktober 2002: Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz  
 seit Oktober 2005: Wechsel in das Max-Weber-Programm der Studienstiftung des Deutschen Volkes

### Auszeichnung:

Juni 2001: Karl-von-Frisch-Abiturientenpreis Biologie

### Sonstige Tätigkeiten:

Sept. 2001 - Aug. 2002: Freiwilliges Soziales Jahr beim Bayerischen Roten Kreuz;  
 Einsatzstelle: Stiftung Pfennigparade  
 April - Juli 2005: Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Physiologie, LMU  
 Jan./Febr. 2008: Tätigkeit als studentische Hilfskraft an der Medizinischen Fakultät, Schwerpunkt Medizindidaktik, LMU