

Aus dem Labor für Tumorimmunologie,  
LIFE-Zentrum  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. multi A. Hofstetter

**Charakterisierung eines Mausmodells für die Evaluierung neuer  
Mitglieder der CEA-Familie als mögliche Zielstrukturen für die  
Tumorthherapie**

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

vorgelegt von  
Roland Andreas Zebhauser

aus München

2006



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Zimmermann

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. M. Jochum

Priv. Doz. Dr. M. Guba

Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

26.10 2006



*Für meine liebe Mutter, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre*

*Für meinen lieben Vater, der viel zu früh verstorben ist*



# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Hintergründe und Ursachen onkologischer Erkrankungen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Neue erfolgversprechende Konzepte für die neoadjuvante und adjuvante Tumortherapie</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 <i>Rational design</i> -Medikamente für die kausale molekulare Tumorthherapie .....	1
1.2.2 Monoklonale Antikörper für die Therapie maligner Erkrankungen.....	2
<b>1.3 Mögliche Zielstrukturen für die Therapie solider Tumore</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Das CEA - ein Beispiel für ein vermehrt in der Immuntherapie eingesetztes Zielantigen.....	6
<b>1.4 Die CEA-Familie</b> .....	<b>7</b>
1.4.1 Strukturelle Besonderheiten der CEA-Familie.....	8
1.4.1.1 Die CEACAM-Subgruppe .....	9
1.4.1.2 Die PSG-Subgruppe .....	11
1.4.2 Biologische Funktionen von Mitgliedern der CEA-Familie .....	12
<b>1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit</b> .....	<b>16</b>
<b><u>2. Materialien</u></b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Häufig verwendete Materialien</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3 Chemikalien und biologische Reagenzien</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Zellkultur .....	18
2.3.2 Molekularbiologie .....	18
<b>2.4 Kits</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 Mäuse</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6 Zelllinien</b> .....	<b>19</b>
<b>2.7 Oligonukleotide</b> .....	<b>20</b>
<b>2.8 Personen- und Herstellerverzeichnis</b> .....	<b>21</b>
<b><u>3. Methoden</u></b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Gewebegewinnung</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.2.1 RNA-Isolierung aus Geweben.....	23

3.2.2 RNA-Isolierung aus Tumorzellen.....	24
3.2.3 Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA.....	24
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
<b>3.3 Elektrophorese im Agarosegel.....</b>	<b>27</b>
3.3.1 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	27
3.3.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....	28
3.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	29
3.3.4 Sequenzanalyse von DNA mit Didesoxynukleotiden.....	29
<b>3.4 Allgemeine Methoden der Zellkultur.....</b>	<b>30</b>
3.4.1 Bestimmung der Zellzahl.....	30
3.4.2 Einfrieren von Zellen.....	31
3.4.3 Auftauen von eingefrorenen Zellen.....	31
3.4.4 Kultur von adhären Ten Tumorzelllinien.....	31
<b><u>4. Ergebnisse.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>4.1 Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA.....</b>	<b>33</b>
4.1.1 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
4.1.2 Intaktheitsnachweis der Gesamt-RNA mittels $\beta$ -Aktin-RT-PCR.....	34
<b>4.2 Spezifitätskontrolle der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide.....</b>	<b>35</b>
4.2.1 Spezifitätsnachweis für das sehr nahe verwandte Genpaar <i>Psg30</i> und <i>Psg31</i> .....	35
<b>4.3 Analyse der Expression von Mitgliedern der murinen CEA-Familie in Normalgeweben und verschiedenen Tumoren mittels RT-PCR.....</b>	<b>37</b>
4.3.1 Expression von Transkripten der CEA-Genfamilie in Normalgeweben adulter Mäuse.....	37
4.3.2 Vergleich des Expressionsmusters von Transkripten der CEA-Genfamilie im Verlauf der Embryogenese.....	40
4.3.3 Untersuchung der Expression von CEA-Familienmitgliedern in ausgewählten epithelialen Tumoren.....	42
<b>4.4 Nachweis von alternativem Spleißen bei <i>Ceacam17</i>.....</b>	<b>43</b>
<b><u>5. Diskussion.....</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b>5.4 Aussagekraft und Grenzen der RT-PCR beim Nachweis von Transkripten der CEA-Familie.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Mögliche Funktion des löslichen CEACAM10 als <i>decoy</i>-Rezeptor für verschiedene Pathogene.....</b>	<b>48</b>



---

<b>5.3</b>	<b>Möglicher Einfluss von CEACAM17 auf die Fertilität.....</b>	<b>49</b>
<b>5.4</b>	<b>Mögliche Funktionen der plazentaspezifisch exprimierten Mitglieder der CEA-Familie bei der Embryogenese .....</b>	<b>50</b>
<b>5.5</b>	<b>Möglicher Einfluss von CEACAM18 und CEACAM20 auf die Entstehung und das Wachstum epithelialer Tumore.....</b>	<b>51</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick: Weiterführende Untersuchungen an der CEA-Familie von Mensch und Maus und klinische Anwendungsmöglichkeiten.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b><u>Zusammenfassung.....</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b>7.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis.....</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b>8.</b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b>9.</b>	<b><u>Danksagung.....</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b>10.</b>	<b><u>Lebenslauf .....</u></b>	<b><u>73</u></b>







# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergründe und Ursachen onkologischer Erkrankungen

Bösartige Neubildungen sind nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache bei beiden Geschlechtern. Nach der neuesten Veröffentlichung der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2006 beläuft sich die Zahl aller in Deutschland an Krebs Verstorbener bei Männern auf ca. 109.000 und bei Frauen auf ca. 100.000. Die Zahl der jährlich auftretenden Neuerkrankungen wird bei Männern auf ca. 218.000 und bei Frauen auf ca. 206.000 geschätzt. Zu den häufigsten Tumoren zählen bei Männern das Prostatakarzinom, das Adenokarzinom des Dickdarms und das Bronchialkarzinom, bei Frauen das Mammakarzinom, gefolgt von kolorektalen Tumoren und dem Bronchialkarzinom. Für die Entstehung einer Krebserkrankung wird neben Veränderungen auf chromosomaler Ebene eine Reihe von Risikofaktoren verantwortlich gemacht. Zu diesen zählen zum Beispiel langjähriges Rauchen, ein zu hoher Anteil an tierischem Fett und eine intensive Sonneneinstrahlung. Wichtige genetische Veränderungen in diesem Zusammenhang sind unter anderem die Aktivierung von so genannten Protoonkogenen zu Onkogenen durch Punktmutationen oder Translokationen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie dem p53-Gen (Weinstein, 1988; Sturm *et al.*, 2003). Es ist jedoch bis heute ungeklärt, warum es im Detail zu diesen Veränderungen kommt und was die genauen Auslöser dafür sind. Trotz großer Fortschritte bei der Behandlung von Tumorerkrankungen durch chirurgische Intervention, Strahlen- und Chemotherapie stellen die Metastasierung und das häufige Auftreten von Rezidiven immer noch ein großes Problem dar.

## 1.2 Neue erfolgversprechende Konzepte für die neoadjuvante und adjuvante Tumorthherapie

### 1.2.1 *Rational design*-Medikamente für die kausale molekulare Tumorthherapie

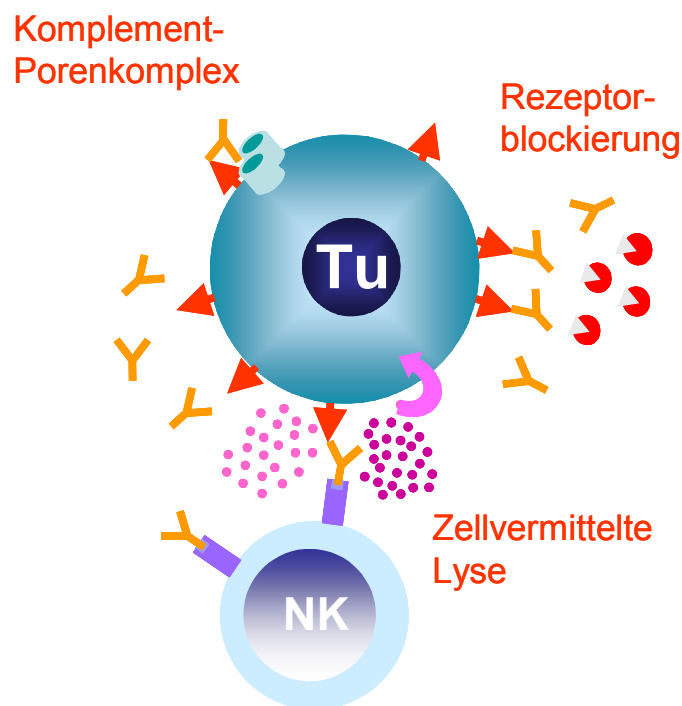
Erst detailliertere Kenntnisse der Pathogenese maligner Erkrankungen und die Weiterentwicklung moderner Methoden der Molekularbiologie, wie der Hybridom-Technologie, ermöglichten die Entwicklung neuer selektiverer und dadurch nebenwirkungsärmerer

antineoplastischer Therapien. So findet der Einsatz von niedermolekularen Wirksubstanzen, so genannter *small molecular drugs*, die gezielt gegen tumorrelevante Moleküle gerichtet sind, in klinischen Studien immer breitere Anwendung. Im Vordergrund steht hierbei die Hemmung von Komponenten zellulärer Signalkaskaden, wie zum Beispiel bestimmter Rezeptortyrosinkinasen, die auf Grund von Mutationen, Translokationen oder Amplifikationen auf Genomebene dauerhaft aktiviert werden und dadurch eine transformierende Wirkung zeigen (Levitzki und Gazit, 1995; Blume-Jensen und Hunter, 2001; Arora und Scholar, 2005). Durch den Einsatz von zielgerichteten niedermolekularen Wirksubstanzen, wie zum Beispiel den Tyrphostinen, ist es möglich, diese pathologisch aktivierten Signaltransduktionswege zu unterbrechen. Ein Beispiel hierfür ist der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Gleevec®), der eine hochwirksame Therapieoption für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) darstellt (le Coutre, *et al.*, 1999; Giles *et al.*, 2005; Druker, 2004). Dieser ist spezifisch gegen die Tyrosinkinaseaktivität des Fusionsproteins Bcr-Abl gerichtet. Letzteres wird von einem Hybridgen kodiert, das durch eine chromosomale Umlagerung neu entstanden ist und als Onkogen wirkt (Spiekermann und Hiddemann, 2005). Häufig werden diese Tyrphostine an monoklonale Antikörper, Zytokine oder lösliche Rezeptormoleküle gekoppelt, um an die Zielzelle binden und somit ihre Wirkung entfalten zu können (Alves und Hiddemann, 1997).

### **1.2.2 Monoklonale Antikörper für die Therapie maligner Erkrankungen**

Bereits vor über hundert Jahren wurde von Ehrlich und seinen Mitarbeitern der Gedanke formuliert, tumoreigene Strukturen mit Hilfe von Antikörpern unschädlich zu machen (Ehrlich, 1900). Aber erst mit der Entwicklung der Hybridom-Technologie durch Köhler und Milstein im Jahre 1975 konnte die Grundlage für die Generierung von monoklonalen Antikörpern mit definierter Spezifität und in ausreichender Menge geschaffen werden (Köhler und Milstein, 1975). Die anfängliche Verwendung von häufig radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern diente aber vor allem diagnostischen Zwecken, wie zum Beispiel dem immunhistochemischen Anfärben von Gewebeproben und der *in vivo*-Lokalisierung von Metastasen. Obwohl bereits in den 1980er Jahren die antitumorale Aktivität muriner Antikörper im Tiermodell gezeigt wurde, konnten erst in den 1990er erste vielversprechende Erfolge im Rahmen klinischer Studien erzielt werden. Das grundlegende Prinzip der Antikörpertherapie besteht in der Bindung des monoklonalen Antikörpers an das betreffende

spezifische Zielantigen, das in der Regel membranständig von der Tumorzelle exprimiert wird. Die therapeutische Wirkung des monoklonalen Antikörpers beruht dabei auf einer über das Komplementsystem vermittelten Zytolyse (CDC), einer durch den Antikörper selbst induzierten Zytotoxizität durch Effektorzellen (ADCC) oder der Blockierung von zum Beispiel Wachstumshormonrezeptoren (Mellstedt, 2003; Stern und Herrmann, 2005). Die Wirksamkeit wird dabei maßgeblich von der Affinität der Antikörper-Antigen-Bindung, der Heterogenität der Antigenexpression und der Tumorgroße beeinflusst (Engert *et al.*, 1997).



**Abbildung 1.1 Wirkungsweise monoklonaler Antikörper.** Monoklonale Antikörper können auf unterschiedliche Weise das Wachstum maligner Zellen beeinflussen. Dazu zählen die vom Antikörper selbst induzierte zelluläre Zytotoxizität (ADCC), die über das Komplementsystem vermittelte Zytolyse (CDC) und die Rezeptorblockierung. Die Tumorantigene sind in der Abbildung als rote Pfeile dargestellt. Die gegen das entsprechende Antigen gerichteten monoklonalen Antikörper sind an der charakteristischen Struktur der Immunglobuline und der orangenen Farbe zu erkennen. Die im Zuge der ADCC von den Effektorzellen freigesetzten zytolytischen Proteine (Perforin, Granzym B) werden durch lilafarbene Punkte symbolisiert. (Zimmermann, unveröffentlicht).

Der erste für die adjuvante Tumorthherapie von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zugelassene Antikörper war der murine monoklonale Antikörper 17-1A (Panorex®). Dieser ist gegen das Membranglykoprotein Co 17-1A/EpCAM, einem Zelladhäsionsmolekül auf Epithelzellen, gerichtet. Eine randomisierte Studie von Riethmüller *et al.* konnte zeigen, dass die krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei der adjuvanten Behandlung von R0-resezierten kolorektalen Tumoren im Stadium Dukes C mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe von 49 % auf 64 % gestiegen ist

(Riethmüller *et al.*, 1998). Die Daten legen nahe, dass insbesondere die Vernichtung von so genannten Mikrometastasen hauptsächlich im Knochenmark für das gute Ansprechen der Therapie ausschlaggebend war. Häufig aufgetretene Nebenwirkungen waren unter anderem passagere, gut therapierbare gastrointestinale Symptome und allergische Reaktionen mit einer Flushsymptomatik. Jedoch kam es bei etwa 80 % der Patienten aufgrund der Verwendung von xenogenen Maus-Antikörpern und der damit verbundenen großen Immunogenität nach der zweiten bis dritten Applikation zur Bildung von neutralisierenden humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMAs), was die therapeutische Wirkung deutlich einschränkte. Neue gentechnologische Methoden und die damit verbundene Entwicklung von chimären oder humanisierten Antikörpern, bei denen der murine Anteil nur noch weniger als 5 % ausmacht, konnten dazu beitragen, dieses Problem zu minimieren. Beispiele hierfür sind der chimäre Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Rituxan®), der für die Therapie von Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe eingesetzt wird und der humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) (Maloney, 2005; Jazirehi und Bonavida, 2005). Letzterer ist gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu gerichtet, der bei 20-30 % aller Patientinnen mit einem Mamma- oder Ovarialkarzinom stark überexprimiert ist (Cobleigh *et al.*, 1999; Leonard, 2005; Huober *et al.*, 2006). Interessanterweise zeigen die monoklonalen Antikörper ihre größte Wirksamkeit in Verbindung mit herkömmlichen Chemotherapeutika oder Zytokinen (Lenz *et al.*, 2005; Arnould *et al.*, 2006). Zur Verbesserung der Effektivität der Antitumorthherapie wurden Versuche unternommen, toxische Substanzen, wie zum Beispiel Zytostatika und Bakterientoxine chemisch oder durch rekombinante Techniken an die monoklonalen Antikörper zu koppeln. Diese so genannten Immunkonjugate werden nach Antigen-spezifischer Bindung durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen und können somit nach Freisetzung aus den Lysosomen im Zytosol ihre toxische Wirkung entfalten (Barth *et al.*, 1997). Es konnte im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie an Patienten mit mehrfach rezidiertem Morbus Hodgkin gezeigt werden, dass der Komplex aus monoklonalem Antikörper gegen das CD25 und der Ricin-A-Kette als Toxinkomponente eine deutliche Reduzierung der Tumorlast und somit eine Verbesserung der Lebensqualität bewirkt (Engert *et al.*, 1997). Die Schwere und Vielfältigkeit der dabei aufgetretenen Nebenwirkungen schränken die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten jedoch stark ein. So wurden unter anderem eine starke Hepatotoxizität des Ricin-A und das sogenannte *vascular leak syndrome* (VLS) mit klinischen Symptomen wie Hypalbuminämie, Hypotonie und Tachykardie beobachtet (Gramatzki und Valerius, 1997).



Der klinische Stellenwert der Immuntherapie wird darin gesehen, die selektive Beseitigung residueller Tumorzellen zu unterstützen, die den konventionellen Behandlungsmethoden nicht zugänglich sind und die häufig den Ausgangspunkt für ein Rezidiv der Erkrankung darstellen.

### 1.3 Mögliche Zielstrukturen für die Therapie solider Tumore

Im Zuge intensiver Forschungsarbeit konnten molekulare und zelluläre Zielstrukturen gefunden werden, die sich als Angriffspunkt für den Einsatz von niedermolekularen Wirksubstanzen oder monoklonalen Antikörpern zur therapeutischen Intervention eignen. Ein Beispiel in diesem Zusammenhang ist der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor, dessen korrekte Tyrosinkinaseaktivität durch genetische und epigenetische Regulationsmechanismen aufgehoben ist. Diese Tatsache kann zu einer unangepassten Dauerstimulation der Zellreplikation und damit zu einem unkontrollierten Tumorwachstum führen (Pao und Miller, 2005). Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind dabei eine Reihe von Oberflächenmolekülen, wie das CEA (karzinoembryonale Antigen), das CEACAM6 (CEA-related cell-adhesion molecule 6) und das CEACAM1, die im Falle einer malignen Transformation häufig überexprimiert sind (Kim *et al.*, 1992; Ilantzis *et al.*, 2002; Laack *et al.*, 2002; Jantscheff *et al.*, 2003). Nicht selten sind diese Zelladhäsionsmoleküle selbst funktionell an der Tumorentstehung und dem Auftreten einer Metastasierung beteiligt (Hofstetter *et al.*, 1990a; Screatton *et al.*, 2000; Duxbury *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass durch ein verändertes Expressionsmuster des CEA auf der Oberfläche von Tumorzellen die Polarität der Zellverbände aufgehoben und folglich ein unkoordiniertes Wachstum gefördert wird (Ilantzis *et al.*, 2002). Zudem sind CEA und CEACAM6 maßgeblich an der Hemmung der durch die Anoikis vermittelten Apoptose beteiligt (Ordonez *et al.*, 2000; Soeth *et al.*, 2001; Duxbury *et al.*, 2004). Unter Anoikis versteht man eine Art des programmierten Zelltodes, der eintritt, wenn epitheliale Zellen den Kontakt zur extrazellulären Matrix verlieren und den Zellverband verlassen. Die Anoikis stellt einen Schutzmechanismus dar, der den Erhalt der Gewebearchitektur gewährleistet und das Auftreten von Dysplasien verhindert (Frisch und Francis, 1994).

### 1.3.1 Das CEA - ein Beispiel für ein vermehrt in der Immuntherapie eingesetztes Zielantigen

Das Oberflächenmolekül CEA oder auch CEACAM5 wurde 1965 von einer Arbeitsgruppe um Gold und Freedman in verschiedenen fötalen Geweben, wie zum Beispiel in der Leber und in Adenokarzinomen des Kolon gefunden und erstmalig beschrieben (Gold und Freedman, 1965). Es handelt sich dabei um ein stark glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, das sich aus 7 Domänen zusammensetzt, die entweder der variablen oder der konstanten Region der Immunglobulinkette homolog sind (Oikawa *et al.*, 1987b; Paxton *et al.*, 1987; Williams und Barclay, 1988). Die Verankerung in der Zellmembran erfolgt über eine Glykosylphosphatidylinositol-Verbindung (Takami *et al.*, 1988; Hefta *et al.*, 1988).

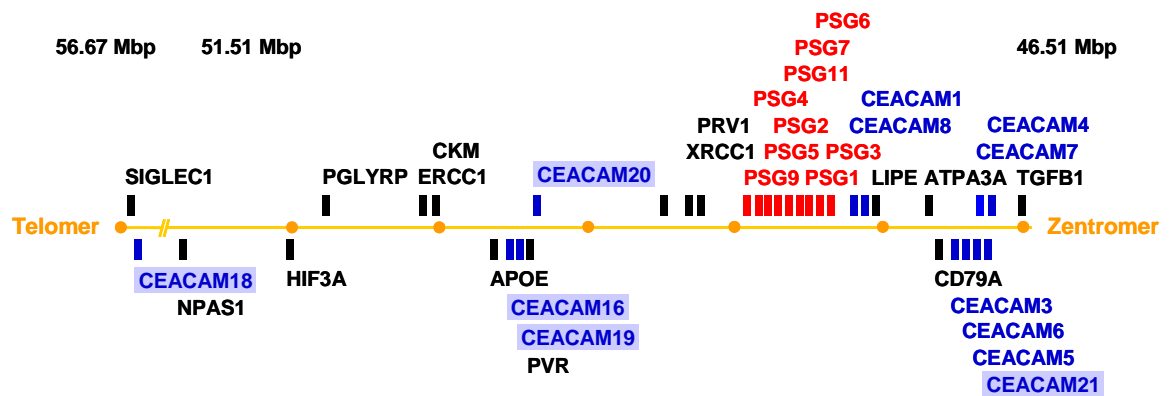
Aufgrund seiner funktionellen Beteiligung an der Entstehung von epithelialen Tumoren und der ausgedehnten Oberflächenexpression wird das CEA intensiv auf die Tauglichkeit als Zielantigen für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern untersucht (Chan und Stanners, 2004; Imakiire *et al.*, 2004; Blumenthal *et al.*, 2005).

Die Hauptanwendung des CEA im klinischen Alltag liegt in der postoperativen Beurteilung des Serumwertes im Langzeitverlauf und der damit verbundenen Prognoseeinschätzung (Sikorska *et al.*, 1988; Goldstein und Mitchell, 2005). So weisen bleibend hohe Werte im CEA-Immunoassay nach der chirurgischen Entfernung eines kolorektalen Tumors und besonders ein Wiederanstieg auf ein rezidivierendes Krankheitsgeschehen hin (Thompson *et al.*, 1991). Dieses wird somit oft bereits zu einem Zeitpunkt erkennbar, an dem klinische Untersuchungen und bildgebende Verfahren noch keinen Hinweis auf ein Rezidiv liefern. Im Gegensatz zu früheren Annahmen ist eine Erhöhung des Serumwertes für das CEA über die Obergrenze von 2,5 ng/ml jedoch nicht nur bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts, sondern auch bei einer Reihe von anderen Neoplasien und bei entzündlichen Erkrankungen der Leber oder der Gallenblase zu erwarten (Chevinsky, 1991; Ballesta *et al.*, 1995). Dieser Umstand erklärt die geringe Spezifität des Biomarkers CEA und macht deutlich, warum er nicht für das Screening von Patienten mit Verdacht auf das Vorhandensein eines kolorektalen Tumors geeignet ist.

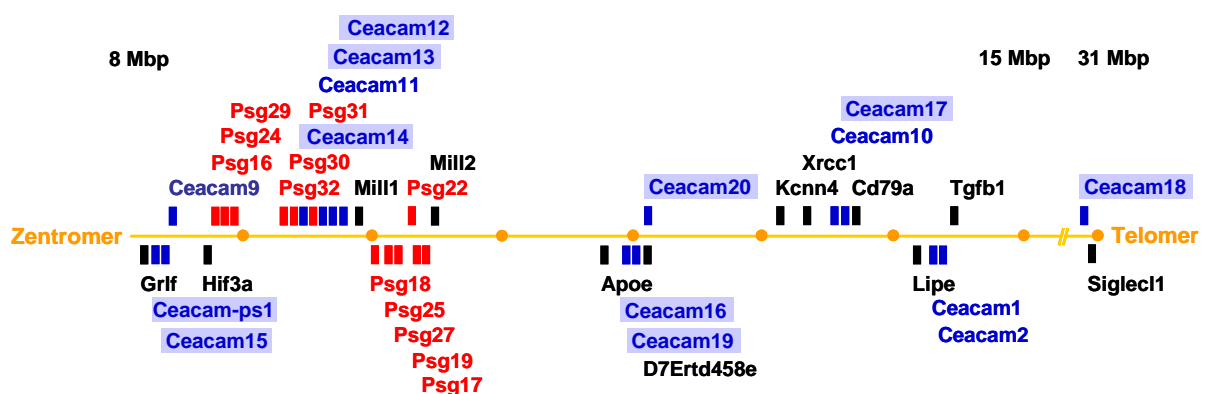
### 1.4 Die CEA-Familie

Das CEA gehört zu einer Gruppe von strukturell nahe verwandten Oberflächenmolekülen und sezernierten Proteinen. Auf Genom-Ebene werden diese hinsichtlich ihrer biologischen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärten Moleküle von 29 Genen kodiert, die auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 19 innerhalb eines Bereiches von 1,8 Mb liegen (Zimmermann *et al.*, 1988; Brandriff *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1994; Zimmermann, 2002). Die murinen Vertreter dieser Genfamilie befinden sich in einem dazu synthenen zentromernahen Bereich auf Chromosom 7 (Rudert *et al.*, 1992; McLellan *et al.*, 2005). Die Anordnung der Gencluster auf dem betreffenden Chromosom ist in den Abbildungen 1.2A und B vergleichend dargestellt.

A



B



**Abbildung 1.2** Anordnung der Mitglieder der CEA-Familie auf dem Chromosom 19 des Menschen (A) und dem Chromosom 7 der Maus (B). Die Lage der einzelnen Gene in Millionen Basenpaaren (Mbp) auf dem betreffenden Chromosom ist durch unterschiedlich gefärbte Balken symbolisiert. Dabei werden die Mitglieder der CEACAM-Subgruppe durch blaue und die Vertreter der PSG-Untergruppe durch rote Balken dargestellt. Die durch schwarze Kästchen symbolisierten Markergene dienen der Orientierung. Die durch vergleichende Analysen der Genom-, cDNA- und EST-Datenbanken neu gefundenen Mitglieder der humanen und murinen CEA-Familie sind durch einen blauen Hintergrund besonders hervorgehoben. (Zimmermann, unveröffentlicht).

Bei der CEA-Familie handelt es sich um eine relativ junge Genfamilie, deren Mitgliedervielfalt erst nach der evolutionären Trennung von Nagern und Primaten vor 75 Millionen Jahren entstanden ist (Thompson und Zimmermann, 1988; Rudert *et al.*, 1989). Erst vor kurzer Zeit konnten durch vergleichende Analysen von Genom-, cDNA- und EST-Datenbanken eine Reihe neuer Mitglieder der humanen und murinen CEA-Familie gefunden werden. Beispiele hierfür sind die murinen *Ceacam12*, *Ceacam13*, *Ceacam14*, *Ceacam15*, *Ceacam16*, *Ceacam17*, *Ceacam18*, *Ceacam19* und *Ceacam20* und die humanen *CEACAM18* und *CEACAM20*. Diese zeigen zum Teil ein sehr enges Verwandtschaftsverhältnis zu den bereits bekannten Mitgliedern (*Ceacam12*, *Ceacam13* und *Ceacam14* zu *Ceacam11*). Die vollständig unabhängige Entwicklung der CEA-Familie in den einzelnen Spezies führte dazu, dass die paraloge Gene innerhalb dieser Familie, die durch Duplikation entstanden sind, oft eine größere Ähnlichkeit zeigen als die orthologe Gene. Von den bis heute bekannten 31 Genen der Maus werden nur fünf auch im Menschen gefunden. Im Einzelnen konnten orthologe Gene für *Ceacam1*, *Ceacam16*, *Ceacam18*, *Ceacam19* und *Ceacam20* nachgewiesen werden. Diese sind daher für eine vergleichende Analyse der biologischen Funktionen in den einzelnen Spezies von besonderem Interesse. Anhand von Sequenzvergleichen auf Nukleotidebene lassen sich die Mitglieder der humanen und murinen CEA-Genfamilie in drei Gruppen zusammenfassen: in die *Ceacam*-Subgruppe, in die *Psg*-Subgruppe und in eine Gruppe von Pseudogenen (Beauchemin *et al.*, 1999). Thompson *et al.* konnten auf Proteinebene zeigen, dass innerhalb einer Subgruppe eine Sequenzähnlichkeit von bis zu 90 % für die N-Domäne besteht, während zwischen den drei Untergruppen noch eine Ähnlichkeit von ungefähr 50 % zu finden ist (Thompson *et al.*, 1991).

#### **1.4.1 Strukturelle Besonderheiten der CEA-Familie**

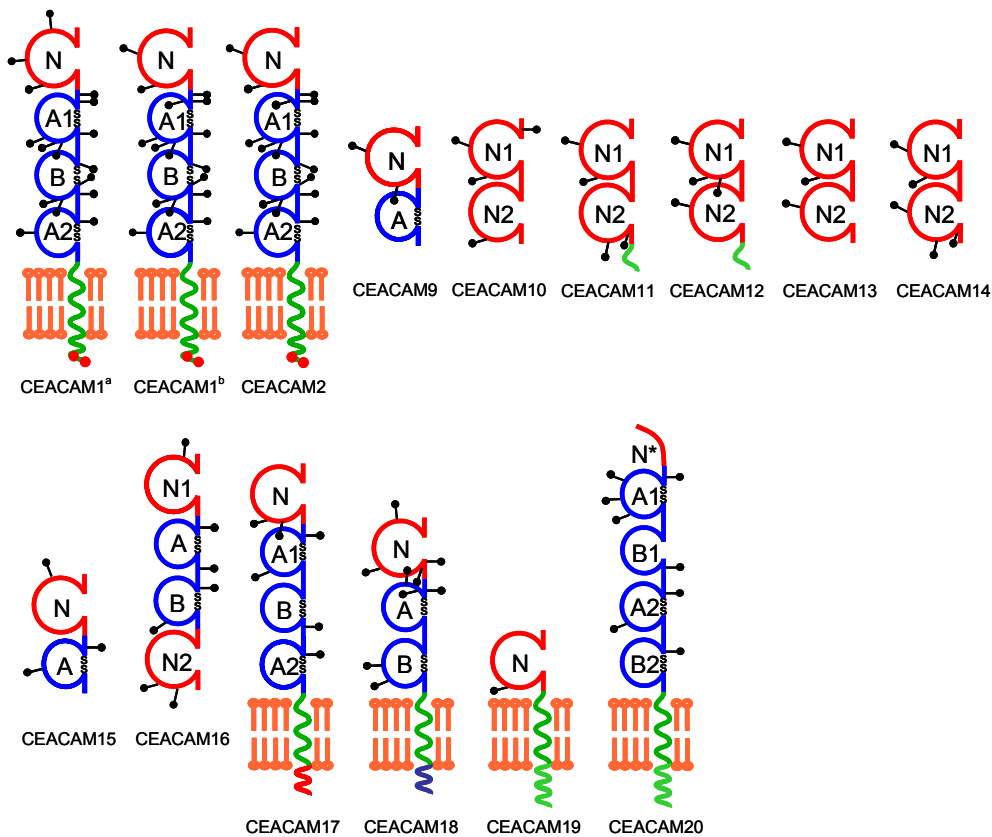
Die CEA-Familie gehört neben den Cadherinen und dem T-Zellrezeptor zur Immunglobulin-Superfamilie. Eine genaue Analyse der Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass es deutliche Unterschiede in der Domänenanordnung zwischen den einzelnen Subtypen der CEA-Familie gibt.

#### 1.4.1.1 Die CEACAM-Subgruppe

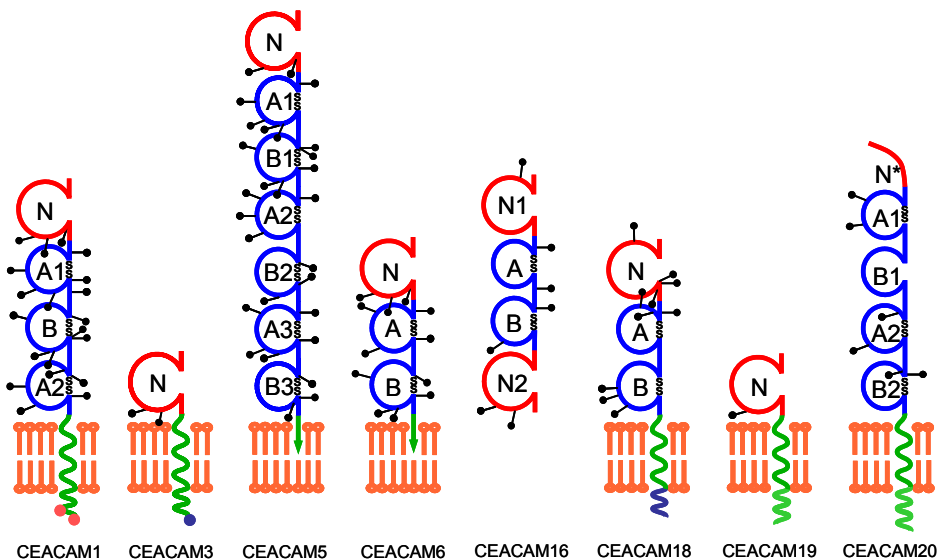
Die Mitglieder der dem CEA strukturell nahe verwandten Untergruppe besitzen am aminoterminalen Ende ein Signalpeptid, das der Überführung des Proteins in das endoplasmatische Retikulum dient und kotranslational abgespalten wird. Angrenzend an den *Leader* befindet sich eine IgV-ähnliche Domäne, die sich aus 108 Aminosäuren zusammensetzt. Der N-Domäne wird *in vitro* eine wichtige Rolle bei der homo- und heterophilen Zelladhäsion zugeschrieben (Rojas *et al.*, 1990; Watt *et al.*, 2001). Angrenzend an die in ihrer Aminosäuresequenz und Anzahl der Glykosylierungsstellen variablen Struktureinheit gibt es je nach Mitglied der humanen CEA-Familie zwischen 0 und 6 Proteindomänen, die in unterschiedlichen Kombinationen angeordnet sein können. Diese lassen sich in einen Typ A, der aus 93 Aminosäuren aufgebaut ist und einen Typ B, der sich aus 85 Aminosäuren zusammensetzt, unterteilen. Beide Untereinheiten zeigen eine signifikante Ähnlichkeit mit der konstanten C2-Immunglobulindomäne (Williams und Barclay, 1988; Boehm *et al.*, 1996; Hammarström, 1999). Die Mitglieder der humanen CEA-Familie können über zwei unterschiedliche Arten an die Zelloberfläche gebunden sein. Im Falle von CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4 erfolgt dies über eine hydrophobe Transmembrandomäne. Diese ermöglicht dem jeweiligen Protein die Integration in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Den intrazellulären Anteil bildet entweder eine aus 73 Aminosäuren bestehende lange oder eine aus nur 10 bis 30 Aminosäuren zusammengesetzte kurze zytoplasmatische Domäne. Die lange Variante von CEACAM3 und CEACAM4 enthält ein funktionelles ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), das durch die nachfolgende Konsensus-Sequenz repräsentiert wird: YxxL/I(x)<sub>7-12</sub>YxxL/I. Dabei steht das Y für Tyrosin, das L für Leucin und das x für eine nicht definierte Aminosäure (Reth, 1989; Cambier, 1995). Im Gegensatz dazu sind CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 über eine Glykosylphosphatidylinositol-Verbindung in der Zellmembran verankert (Hefta *et al.*, 1988).

Die CEA-Familie der Nager ist durch das vollständige Fehlen GPI-verankerter Formen und das Auftreten löslicher CEA-verwandter Moleküle, wie zum Beispiel CEACAM9 und CEACAM10 der Maus, charakterisiert (Kromer *et al.*, 1996; Finkenzeller *et al.*, 1997). Abbildung 1.3 zeigt eine vergleichende Darstellung der Domänenstruktur von Mitgliedern der murinen und humanen CEACAM-Subgruppe.

## Murine Mitglieder der CEACAM-Subgruppe



## Humane Vertreter der CEACAM-Subgruppe



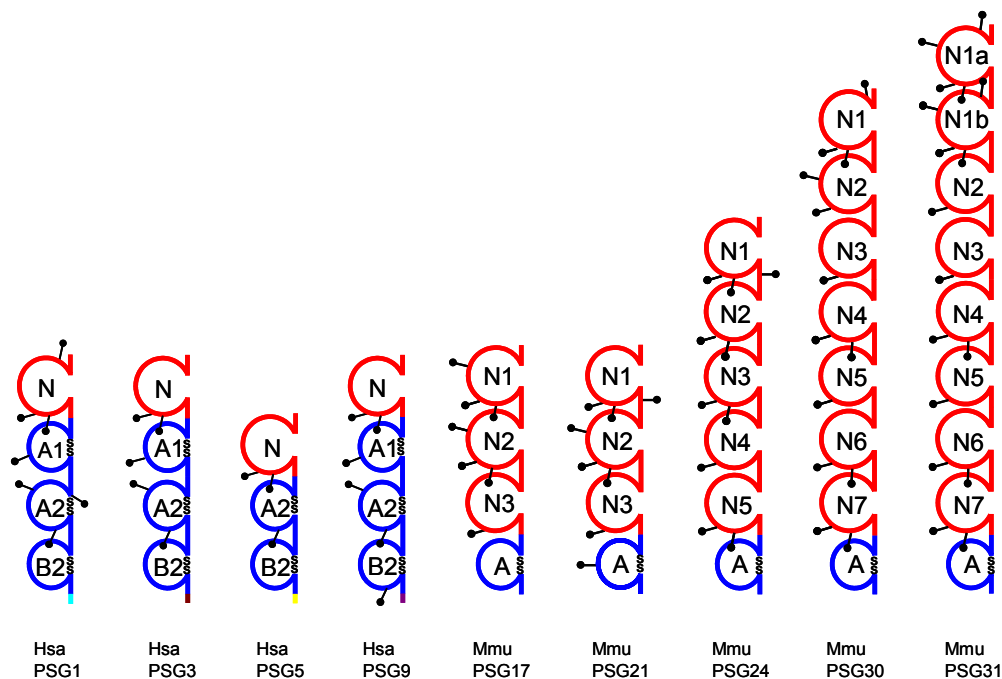
**Abbildung 1.3 Domänenanordnung verschiedener Mitglieder der CEACAM-Subgruppe von Maus und Mensch.** Die IgV-ähnlichen Domänen werden dabei durch rote und die IgC-ähnlichen Domänen (A und B) durch blaue Kreise symbolisiert. Innerhalb der IgC-ähnlichen Domänen sind charakteristische Disulfidbrücken zu erkennen, deren Sequenz hoch konserviert ist. Die Konsensus-Sequenzen für mögliche N-Glykosylierungen sind durch gestielte Punkte markiert. Die einzelnen Mitglieder der CEACAM-Subgruppe können entweder über eine Transmembrandomäne (grüne geschwängelte Linie) oder einen GPI-Anker (grüner Pfeil) in der Membran verankert sein. Rote oder blaue Punkte innerhalb der zytosomatischen Domäne (geschwängelte Linie) symbolisieren die Anwesenheit von funktionellen ITIM- oder ITAM-Motiven. (Zimmermann, unveröffentlicht).

### 1.4.1.2 Die PSG-Subgruppe

Die Mitglieder der humanen PSG-Untergruppe setzen sich ähnlich wie die Vertreter der CEACAM-Subgruppe aus einer IgV- und einer variablen Anzahl von IgC-ähnlichen Domänen zusammen, die in unterschiedlicher Art und Weise kombiniert sein können. Die einzelnen PSGs zeigen eine große Sequenzkonservierung und eine starke Ähnlichkeit in der Anordnung ihrer Proteindomänen. Im Vergleich zu den Mitgliedern der CEACAM-Subgruppe fehlt den PSGs eine Membranverankerung, was ihre Zugehörigkeit zu den sezernierten Proteinen untermauert.

Im Vergleich dazu setzen sich die bis heute bekannten Vertreter der murinen PSG-Untergruppe aus nur einer einzelnen IgC-ähnlichen Domäne (A) und einer stark variierenden Anzahl IgV-ähnlicher Domänen (N1-N7) zusammen (Thompson *et al.*, 1991; McLellan *et al.*, 2005). Eine Besonderheit der PSGs stellt die im Vergleich zur CEA-Untergruppe deutlich geringere Glykosylierung dar.

#### Humane und murine Mitglieder der PSG-Subgruppe



**Abbildung 1.4 Domänenstruktur verschiedener Mitglieder der PSG-Subgruppe von Maus und Mensch.** Die Mitglieder der PSG-Subgruppe setzen sich aus IgV-ähnlichen Domänen (durch rote Kreise symbolisiert) und IgC-ähnlichen Domänen (durch blaue Kreise symbolisiert) zusammen. Die charakteristischen Disulfidbrücken innerhalb der IgC-ähnlichen Domäne sind an den beiden übereinander stehenden S zu erkennen. Gestielte Punkte in der Abbildung markieren die in großer Anzahl vorhandenen Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen. Die folgenden Abkürzungen werden in der Abbildung verwendet: Hsa steht für *Homo sapiens* (Mensch) und Mmu für *Mus musculus* (Maus). (Zimmermann, unveröffentlicht).

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

Die verschiedenen Mitglieder der CEA-Familie zeigen ein sehr heterogenes Expressionsmuster, das erst durch die Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper (mAbs) genauer analysiert werden konnte. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CEA-verwandte Moleküle vorwiegend auf den apikalen Membranen vieler epithelialer Gewebe, auf den Endothelien kleiner Blutgefäße und auf Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden sind (Prall *et al.*, 1996; Kammerer *et al.*, 1998; Frängsmyr *et al.*, 1999; Schölzel *et al.*, 2000; Donda *et al.*, 2000).

Die PSGs werden ab Tag 7 nach der Befruchtung der Eizelle vom menschlichen Synzytiotrophoblasten der Plazenta gebildet und erreichen gegen Ende der Schwangerschaft im Serum erstaunlich hohe Konzentrationen (bis zu 400 mg/ml) (Zhou *et al.*, 1997). Sie sind die vom Embryo synthetisierte Proteingruppe, die neben dem humanen Choriongonadotropin und dem  $\alpha$ -Fötoprotein am stärksten im Blut einer Schwangeren vertreten ist (Bohn *et al.*, 1971; Lin *et al.*, 1974). In der Plazenta der Nagetiere werden die PSGs von den trophoblastischen Riesenzellen und den Spongiotrophoblasten gebildet (Carney *et al.*, 1993; Kromer *et al.*, 1996). In deutlich geringerem Umfang können einige Mitglieder der PSG-Subgruppe noch in der Speicheldrüse, im Hoden und in der embryonalen Leber nachgewiesen werden (Zimmermann *et al.*, 1989; Zoubir *et al.*, 1990; Borjigin *et al.*, 1990).

In den vergangenen Jahren zeigten mehrere Studien, dass die Mitglieder der CEA-Familie an einer Reihe von normalen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. So können CEACAM1 und CEACAM5 über eine homo- oder heterophile Interaktion die Zelladhäsion vermitteln und somit einen wichtigen Einfluß auf die interzelluläre Signalübertragung nehmen (McCuaig *et al.*, 1992; Stanners, 1998; Maxwell, 1999; Stern *et al.*, 2005). Diese Wechselwirkung zwischen den einzelnen CEACAM-Molekülen wird über deren N-Domäne gesteuert. (Öbrink, 1997; Watt *et al.*, 2001). Einige wichtige biologische Funktionen, die über eine homophile Zelladhäsion beim Menschen und bei der Maus vermittelt werden, sind die Sicherstellung eines geregelten Gewebeaufbaus in der Embryonalperiode, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zuge eines entzündlichen Prozesses und die Steuerung einer zielgerichteten Zellproliferation (Daniels *et al.*, 1996; Hammarström *et al.*, 1999; Singer *et al.*, 2000). Neben der Beteiligung an Vorgängen der Zellphysiologie können einige Mitglieder der CEA-Familie, wie zum Beispiel CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 über ausgeprägte N-Glykosylierungen an



Asparaginresten Lektine auf den Fimbrien einiger Bakterienspezies binden, was möglicherweise eine positive Auswirkung auf den Aufbau der kommensalen Darmflora hat (Baranov und Hammarström, 2004). Zudem dienen sie auf Epithelzellen (CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6) und auf neutrophilen Granulozyten (CEACAM3) als Rezeptor für virulente Stämme verschiedener Humanpathogene. So können über eine heterophile Interaktion die unterschiedlichen Opa-Oberflächenproteine von *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*, das UspA1 (*ubiquitous surface protein A1*) von *Moraxella catarrhalis* sowie die Fimbrien Typ1 von *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* und von *Escherichia coli* gebunden werden (Leusch *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1997; Virji *et al.*, 1999; Hill und Virji, 2003; Hauck *et al.*, 2006). Auch ein pathogenes Virus, das murine Hepatitisvirus (MHV-A59) erkennt Proteindeterminanten des CEACAM1 über das MHV-Spikeprotein und interagiert mit diesen (Dveksler *et al.*, 1993a; Tan *et al.*, 2002; Thackray *et al.*, 2005). Es kommt im Fall der bakteriellen Pathogene zur Invasion der betroffenen Mukosazellen des Respirations- oder Urogenitaltrakts und über eine mögliche Transzytose zu einer Manifestation des entsprechenden Krankheitsbildes (Wang *et al.*, 1998; Karalus und Campagnari, 2000; Gray-Owen, 2003). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass CEACAM-Moleküle, wie zum Beispiel CEACAM3, auch an der Elimination von Pathogenen beteiligt sind (Chen *et al.*, 2001; Schmitter *et al.*, 2004). Diese Funktion wird über ein regulatorisches ITAM-Motiv innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 vermittelt (McCaw *et al.*, 2003). Dabei werden die beiden Tyrosinreste innerhalb dieser funktionellen Einheit von zytosolischen Kinasen aus der src-Familie phosphoryliert (Hauck *et al.*, 1997; Streichert *et al.*, 2001). An die phosphorylierten Tyrosinreste können weitere Tyrosinkinase- und Adaptermoleküle über deren SH2 (src-homologe Region)-Domänen gebunden werden. Dies bewirkt letztlich die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren im Zellkern der neutrophilen Granulozyten, die CEACAM3 auf ihrer Oberfläche tragen. Über diese Signalkaskade kommt es zu einer zielgerichteten und Opsonin-unabhängigen Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen durch die neutrophilen Granulozyten (Schmitter *et al.*, 2004). Die Gegensteuerung nach erfolgter Aktivierung der Signalkette und damit die Fähigkeit, auf äußere Reize flexibel reagieren zu können wird über die Bindung der löslichen Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 vermittelt (Hauck *et al.*, 1999). Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, werden einige Mitglieder der CEA-Familie, allen voran CEACAM1, auf humanen und murinen Zellen des Immunsystems exprimiert (Kammerer *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2002). Auf diese Weise können sie möglicherweise Einfluss auf deren Funktion nehmen. Greicius *et al.* konnten

anhand von *In-vitro*-Versuchen zeigen, dass das murine CEACAM1 maßgeblich an der Proliferation der B-Zellen und der Sezernierung von Immunglobulinen beteiligt ist (Greicius *et al.*, 2003). Da jedoch die Differenzierung in die nachgeschalteten Plasmazellen ausbleibt, wird vermutet, dass sich die funktionelle Bedeutung von CEACAM1 überwiegend auf die frühen Phasen der Immunreaktion beschränkt. Interessanterweise wurde zudem von einer Arbeitsgruppe um Daohong Chen beobachtet, dass das humane CEACAM1 einerseits die Wirkungsweise von T-Zellen fördern, andererseits jedoch auch hemmen kann (Chen *et al.*, 2004). Dieser Umstand lässt sich dadurch erklären, dass es für CEACAM1 aufgrund eines alternativen Spleißvorgangs auf RNA-Ebene mehrere Isoformen gibt, die sich entweder in der Anzahl der extrazellulären Domänen oder in der Länge des zytoplasmatischen Anteils unterscheiden (Barnett *et al.*, 1989; Sundberg und Öbrink, 2002). Wie eine umfassende Analyse der Aminosäuresequenz ergeben hat, besitzt die lange zytoplasmatische Spleißvariante von CEACAM1 zwei Tyrosinreste, die vermutlich Teile eines regulatorischen ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) sind (Huber *et al.*, 1999). Über dieses können wichtige biologische Prozesse, wie zum Beispiel die Proliferation von T-Zellen inhibiert werden. Der Isoform mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne fehlt ein derartiges funktionelles Peptidmotiv und sie fungiert daher vorwiegend als kostimulatorischer Rezeptor. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die beiden Spleißvarianten in den meisten Zellpopulationen parallel exprimiert werden, jedoch in einem unterschiedlichen Verhältnis zueinander. Dieses ist abhängig von der Herkunft und vom Funktionszustand der betreffenden Zelle (Kammerer *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2000). Überwiegt zum Beispiel die lange Spleißvariante von CEACAM1 im Verhältnis zur kurzen, so führt dies zu einer Inhibierung der T-Zell-Funktion. CEACAM1 nimmt zudem eine wichtige Rolle bei der Steuerung der dezidualen Immunantwort ein. So wird über ein vermehrtes Vorhandensein des CEACAM1 auf der Oberfläche der einzelnen Lymphozytenpopulationen in der Dezidua die zytotoxische Wirkung der NK-Zellen und die Proliferation der CD4-positiven T-Zellen gehemmt (Markel *et al.*, 2002; Boulton und Gray-Owen, 2002). Auf diese Weise wird gewährleistet, dass es im Falle einer bakteriellen oder viralen Infektion der Mutter nicht zu einer überschießenden lokalen Immunreaktion der Dezidua kommt, die eine Gefahr für den semiallogenen Fötus darstellen würde (Markel *et al.*, 2002).

Obwohl die physiologische Funktion der PSGs noch nicht vollständig geklärt ist, deutet vieles darauf hin, dass sie mitverantwortlich sind für den erfolgreichen Verlauf einer

Schwangerschaft. So konnte von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass geringe Serumwerte dieser Proteingruppe eng verbunden sind mit drohendem Abort, intrauteriner Wachstumsverzögerung und fetalem Sauerstoffmangel (Würz *et al.*, 1981; Tamsen *et al.*, 1983; Silver *et al.*, 1993). Einen zusätzlichen Hinweis in diese Richtung liefert die Beobachtung, dass Antikörper, die gegen Mitglieder der PSG-Subgruppe gerichtet sind, bei Mäusen und Affen zum Abbruch einer Schwangerschaft führen (Hau *et al.*, 1985). Es wird vermutet, dass einige Vertreter aus der humanen und murinen PSG-Subgruppe (humanes PSG1, humanes PSG6, murines PSG17 und murines PSG18) über eine Stimulierung der Monozyten zur Bildung anti-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-10 und TGF- $\beta$ 1, eine wichtige Rolle bei der Regulierung der maternalen Immunantwort gegenüber dem semiallogenen Embryo spielen (Snyder *et al.*, 2001). Im Falle des murinen PSG17 konnte das Integrin-assoziierte Tetraspanin CD9 als Rezeptor auf Zellen des Monozyten/ Makrophagen-Systems gefunden werden (Waterhouse *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2005).

## 1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die CEA-Genfamilie kodiert für eine große Anzahl von Oberflächenmolekülen, deren Funktionen *in vivo* noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Den bekanntesten Vertreter stellt dabei das CEA dar, das im Klinikalltag eine breite Anwendung als prognostischer und therapeutischer Marker für Tumoren des Gastrointestinaltrakts findet. Die Sensitivität und die Spezifität für das Kolonkarzinom sind jedoch nur gering. So ist auch bei einer Reihe von anderen gut- und bösartigen Erkrankungen eine Erhöhung des Serumwertes für das CEA zu erwarten. Untersuchungen der letzten Jahre zielten daher darauf ab, weitere dem CEA verwandte Oberflächenmoleküle zu identifizieren, die tumorselektiv exprimiert werden und sich aus diesem Grund für den Einsatz als Zielantigen im Rahmen einer Immuntherapie eignen. Durch vergleichende Analysen von Genom-, cDNA- und EST-Datenbanken konnten neue Mitglieder der humanen und murinen CEA-Familie gefunden werden, deren Struktur und biologische Funktionen nun genauer charakterisiert werden sollen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Maus als Modell verwendet. Der große Vorteil dabei liegt in dem leichteren Zugang zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben, sowie im Vorhandensein von transgenen Tumormodellen und Tumorzelllinien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine umfassende Analyse des zeitlichen und örtlichen Expressionsverhaltens der neuen Mitglieder der murinen CEA-Familie im Vergleich zu den bereits bekannten Mitgliedern, in der Hoffnung erste Hinweise auf mögliche biologische Funktionen zu bekommen. Im Falle einer Überexpression bei den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren, könnten die von den entsprechenden Genen kodierten Proteine als Zielstrukturen für Antikörper-vermittelte Therapien breitere Anwendung finden. Zudem könnte bei einer funktionellen Beteiligung der Mitglieder der CEA-Familie an der Tumorentstehung versucht werden, diese Wirkung durch die Anwendung von *small molecular drugs* oder Antikörpern zu blockieren.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

Elektrophoresekammern, horizontal	Invitrogen
Geldokumentationssystem Fluor-S MultiImager™	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Inkubationsschrank	Heraeus
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Mikrowelle Micromat	AEG
Pipettierassistent Pipetboy acu	Hirschmann
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Temperaturzyklusautomat PTC-200	MJ Research
Ultra-Turrax	IKA Kabortechnik
Vortex VF2	IKA Labortechnik
Waagen	
Präzisionswaage BP2100	Sartorius
Analysenwaage MCI	Sartorius
Wasserbad SUB	Julabo
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 541R	Heraeus

### 2.2 Häufig verwendete Materialien

Handschuhe Sempermed Nitril	Semperit
Einfrierröhrchen (2 ml)	Nunc
Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Falcon
Pipettenspitzen (200 und 1000 µl)	Greiner
Pipettenspitzen, gestopft (2,5, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,2 ml) Softstrips	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml) Safelock	Eppendorf

Skalpelle (Nr. 20)	Feather
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Falcon
Zellkulturplatten (96 well, Rundboden)	TPP
Zentrifugenröhrchen (Polyethylen, 15 und 50 ml)	Falcon

## 2.3 Chemikalien und biologische Reagenzien

### 2.3.1 Zellkultur

Ampicillin	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Cell Concepts
Penicillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen
RPMI 1640-Medium	Invitrogen
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen
Tryptophanblau	Sigma

### 2.3.2 Molekularbiologie

100 kb DNA-Marker	Invitrogen
0,24-9,5 kb RNA-Marker	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	Sigma
<i>Blue Juice</i> -Gelladepuffer	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
dNTP-Mix (jeweils 25mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Fermentas
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Formamid	Invitrogen
Isopropanol	Sigma
PCR-Puffer BioTherm™ (enthält 15mM MgCl <sub>2</sub> )	GeneCraft
RNAlater	Ambion

TAE (Tris-Acetat/EDTA)-Puffer	Invitrogen
Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> ) DNA Polymerase	Promega
TBE (Tris-Borat/EDTA)-Puffer	Ambion

## 2.4 Kits

QIAshredder™	Qiagen
Perfectprep®Gel Cleanup	Eppendorf
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy®Midi-Kit	Qiagen
RNeasy®Mini-Kit	Qiagen

## 2.5 Mäuse

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Gewebe wurden aus CEA424/SV40 T-Antigen transgenen und nichttransgenen C57BL/6-Geschwistermäusen isoliert. Die Konservierung der resezierten Gewebeproben erfolgte in *RNAlater* bei  $-20\text{ °C}$  oder nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei  $-80\text{ °C}$ .

## 2.6 Zelllinien

Name	Beschreibung	Wachstum <sup>1</sup>	Quelle
GC424	Murine Magentumorzelllinie	adhärent (F)	Robert Kammerer
GC5+/-	Murine Magentumorzelllinie	adhärent (F)	Robert Kammerer
GC8+/-	Murine Magentumorzelllinie	adhärent (F)	Robert Kammerer
GC11+/-	Murine Magentumorzelllinie	adhärent (F)	Natasja van den Engel
CT 36	Murine Kolontumorzelllinie	adhärent (F)	Nicole Beauchemin
CMT 93	Murine Kolontumorzelllinie	adhärent (F)	Nicole Beauchemin
Lewis Lung	Murine Lungentumorzelllinie	adhärent (F)	Nicole Beauchemin

<sup>1</sup>Wachstum und Kultivierung der Zelllinie. F=Zellkulturflasche

## 2.7 Oligonukleotide

Gen	Primer	Sequenz	Produktgröße	Primer-lokalisierung	T <sub>ann</sub> (°C)
<i>β-Aktin</i>	Strang	5' ATGGATGACGATATCGCT 3'	569 bp	Exon 2 Exon 4	58
	Gegenstrang	5' ATGAGGTAGTCTGTCTCAGGT 3'			
<i>Ceacam1a</i>	Strang	5' TCAGCACATCTCCACAAAGG 3'	285 bp	L-Exon N-Exon	62
	Gegenstrang	5' CTCTCTGCCGCTGTATGCTT 3'			
<i>Ceacam1a</i>	Strang	5' AGCGTCAGGAGCAACTCAA 3'	268 bp	A2-Exon Cyt3-Exon	62
	Gegenstrang	5' AGAAGAAGGGGCTGAAGTTGGC 3'			
<i>Ceacam2</i>	Strang	5' GCTATGAAAAGCAGGGCAGA 3'	495 bp	L-Exon N-Exon	62
	Gegenstrang	5' TGAAATTGTCCAGTCAGGACC 3'			
<i>Ceacam9</i>	Strang	5' CTTAACCTGCTGGAATGCACCCGCCG 3'	407 bp	N-Exon A-Exon	68
	Gegenstrang	5' GCACAGAAATCGGAGTAATT 3'			
<i>Ceacam10</i>	Strang	5' CAGCCTCACTTTTAACTTACT 3'	396 bp	N1-Exon N2-Exon	60
	Gegenstrang	5' GCACAGAAATCGGAGTAATT 3'			
<i>Ceacam11</i>	Strang	5' CACAGGAGTTAAACCACTCAAGAA 3'	323 bp	N1-Exon N2-Exon	62
	Gegenstrang	5' AAACCTGCAGGAGAATATTGTCA 3'			
<i>Ceacam12</i>	Strang	5' AAGGAGGTAAACTGCTCAAGAT 3'	259 bp	N1-Exon N2-Exon	62
	Gegenstrang	5' AGTTGAGAAGTAGGATGCTTTC 3'			
<i>Ceacam13</i>	Strang	5' GGAGCTGCACCGTTCAAGT 3'	504 bp	N1-Exon N2-Exon	62
	Gegenstrang	5' TCGTCTTTCTTCTTGACATTG 3'			
<i>Ceacam14</i>	Strang	5' CCTGGTTCACAGGAGCTAGAGT 3'	340 bp	N1-Exon N2-Exon	62
	Gegenstrang	5' GGCATCTGAAAGACCCACAA 3'			
<i>Ceacam15</i>	Strang	5' CCTCTAAAGAAATGCGTCTCTC 3'	394 bp	N-Exon A-Exon	62
	Gegenstrang	5' GACACGCAGGTGAGAATTGA 3'			
<i>Ceacam16</i>	Strang	5' TCCTGGTGGCCAGTTACATT 3'	278 bp	N1-Exon A-Exon	62
	Gegenstrang	5' GCTGCTACAGACGAGACGAA 3'			
<i>Ceacam17</i>	Strang	5' AAACGGCCGATAGACAACGA 3'	474 bp	N-Exon A1-Exon	60
	Gegenstrang	5' GAACGGGTCCTACTATGGAAGG 3'			
<i>Ceacam18</i>	Strang	5' TGAAGTGGACACTAGCAACG 3'	482 bp	N-Exon B-Exon	60
	Gegenstrang	5' TGCTTAGGAAGGAGCCGTTA 3'			
<i>Ceacam19</i>	Strang	5' CACATCGAGATGATCCCAGA 3'	388 bp	N-Exon TM-Exon	60
	Gegenstrang	5' TCCAATGATGATGGCTACC 3'			
<i>Ceacam20</i>	Strang	5' CAAGCTCACCTCACAGTCA 3'	357 bp	A1-Exon B1-Exon	60
	Gegenstrang	5' AAGTTCACGGTGTTCCTTC 3'			
<i>Ceacam20</i>	Strang	5' GATCTGCCTCTGCTCTGGTC 3'	497 bp	B2-Exon Cyt-Exon	60
	Gegenstrang	5' TGGGGTGATCTTGCAATAA 3'			
<i>Psg17</i>	Strang	5' GGTACAAAGGGGTGGCAA 3'	393 bp	N1-Exon N2-Exon	62
	Gegenstrang	5' CAAGCTTGTTAAACACAACCTGCT 3'			
<i>Psg30</i>	Strang	5' CTGCACAAATAACCATTGAATTAGA 3'	725 bp	N1-Exon N3-Exon	62
	Gegenstrang	5' CTTGACTTGCAAAGGGTGATAA 3'			
<i>Psg31</i>	Strang	5' CATCCCTTTCTACTTGCTACCAA 3'	522 bp	N3-Exon N4-Exon	62
	Gegenstrang	5' CTCAGATTTCTCTCTGCAATT 3'			



## 2.8 Personen- und Herstellerverzeichnis

AEG	Nürnberg, Deutschland
Ambion	Austin, Texas, USA
BDK Luft- und Klimatechnik	Sonnenbühl, Deutschland
Beauchemin, Nicole	McGill Universität, Montreal, Kanada
Bio-Rad	Richmond, Kalifornien, USA
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Cell Concepts	Umkirch, Deutschland
Dunn Labortechnik	Asbach, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon	Oxnard, Kalifornien, USA
Fermentas	Leon-Rot, Deutschland
GeneCraft	Lüdinghausen, Deutschland
Greiner	Nürtingen, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hirschmann	Unterhaching, Deutschland
IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Julabo	Seelbach, Deutschland
Kammerer, Robert	Labor für Tumorummunologie, Klinikum Großhadern, LMU München
Merck	Darmstadt, Deutschland
MJ Research	Watertown, Massachusetts, USA
Muller, William	McMaster Universität, Hamilton, USA
Nunc	Naperville, USA
Promega	Madison, Wisconsin, USA
Qiagen	Chatsworth, Kalifornien, USA
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Semperit	Wien, Österreich
Sigma	St. Louis, Missouri, USA
TPP	Trasadingen, Schweiz
Van den Engel, Natasja	Chirurgische Klinik Klinikum Großhadern, LMU München



## 3. Methoden

### 3.1 Gewebegewinnung

Im ersten Schritt der Gewebeisolierung wurden die C57BL/6-Mäuse mit Isofluran narkotisiert. Nach etwa 1 Minute (min) erfolgte die Tötung der Mäuse durch Genickbruch. Unter Verwendung einer chirurgischen Pinzette und eines Skalpells mit der Stärke 15 wurden die untersuchten Organe sorgfältig freipräpariert und aus dem Gewebeverband entfernt. Die Fixierung der entnommenen Gewebe erfolgte entweder in flüssigem Stickstoff oder in *RNAlater*. Es wurde streng darauf geachtet, dass ein Zeitfenster von 5 min bei der Gewebeisolierung nicht überschritten wurde, um einer möglichen Degradierung der RNA vorzubeugen.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Die Isolierung von RNA aus murinen Geweben wurde mit Hilfe des *RNeasy®-Mini*-Reagenziensystems nach der Methode von Chomczynski und Sacchi durchgeführt (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dabei wurden pro Versuchsansatz maximal 30 mg der in *RNAlater* oder in flüssigem Stickstoff konservierten Organe eingesetzt. Durch die Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers wurden die Zellen aufgeschlossen und die Ribonukleasen inaktiviert. Die Verwendung eines Ultra-Turrax für 30 Sekunden (s) erbrachte die Entstehung eines homogenisierten Lysats. Bei der weiteren Aufarbeitung entsprechend des Herstellerprotokolls wurde das Lysat mit einem Ethanol-haltigen Puffer versetzt und auf eine *RNeasy®*-Säule aufgetragen. Das Ethanol sollte Versuchsbedingungen gewährleisten, die eine selektive Bindung der RNA an eine Gelmembran während der nachfolgenden Zentrifugation fördert. Durch die Verwendung von Waschpuffern wurden Verunreinigungen entfernt und die stark angereicherte RNA verbleibt an der Silikagelmembran innerhalb der Plastiksäule. Im abschließenden Schritt wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der *RNeasy®*-Säule abgelöst. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes wurde die proteinkodierende Boten (*messenger*)-RNA (mRNA) mit einer Länge von über 200 Nukleotiden gewonnen. Die Ausbeute an isolierter RNA lag zwischen 100 µg/ml und

2000 µg/ml, abhängig von dem verwendeten Organsystem. Die isolierte und gereinigte RNA wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Intaktheit und die Größenverteilung der in den nachfolgenden Versuchen verwendeten RNA wurden anhand einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung überprüft.

### 3.2.2 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Die Isolierung von RNA aus murinen Tumorzelllinien erfolgte ebenfalls unter Verwendung des *RNeasy®-Mini*-Reagenziensystems. Pro Versuchsansatz wurde eine Zellzahl von weniger als  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers zu dem zuvor in etwas PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gelösten Zellpellet. Dieses gewährleistet den kompletten Aufschluss von Zell- und Organellmembranen. Die Homogenisierung wurde in diesem Falle durch das Auftragen des Lysats auf eine *QIAshredder®*-Spinsäule und nachfolgende Zentrifugation erreicht. Dabei werden die Viskosität des Zelllysats reduziert und die hochmolekulare genomische DNA und andere hochmolekulare Zellbestandteile geschert. Entsprechend dem Herstellerprotokoll erfolgten die weiteren Versuchsschritte wie bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus murinen Geweben. Nach der Ablösung der RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der *RNeasy®*-Spinsäule wurde die Konzentration der RNA über die photometrische Messung der Absorption im Eluat bei 260 nm bestimmt. Der Quotient aus den Absorptionswerten bei 260 nm und bei 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der RNA; er lag zwischen 1,6 und 2,0.

### 3.2.3 Reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA

Die Umschreibung der proteinkodierenden mRNA in cDNA wurde mit Hilfe des Reverse Transkription-Reagenziensystems durchgeführt. Die Methode beruht auf der Fähigkeit der aus einem *Avian-Myeloblastosis*-Virus isolierten reversen Transkriptase (AMV-RTase), die gesamte zelluläre mRNA in einer so genannten Erststrangreaktion in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Dieser Vorgang wird durch die komplementäre Bindung von Hexamer-nukleotiden als *random* Primer an die mRNA gestartet. Die Verlängerung erfolgt dann über

eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung. Die Wahl dieser so genannten *random* Primer erfolgt häufig für den Fall, dass die RNA sehr lang oder reich an Sekundärstrukturen ist. Die reverse Transkription wurde nach den vom Hersteller vorgeschlagenen Versuchsbedingungen durchgeführt. Im ersten Schritt, der sogenannten Denaturierung wird 1 µg der RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 9,9 µl aufgefüllt und anschließend bei 70 °C für 10 min inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.1

<b>Reaktionsansatz für die Reverse Transkription</b>	
RNA-Probe (1 µg) + RNase freies Wasser	9,90 µl
<i>Random</i> Hexamer Primer (0,5 µg/µl)	1,00 µl
RT-Puffer (10x)	2,00 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,00 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,00 µl
RNase-Hemmer (40 U/µl)	0,50 µl
AMV-Reverse-Transkriptase (25 U/µl)	0,60 µl
<hr/>	
Volumen pro Versuchsansatz	20,00 µl

Tabelle 3.2

<b>Inkubationen bei der Reversen Transkription</b>		
Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Primeranlagerung	25	10
Verlängerung	42	60
Denaturierung	95	5

### 3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der enzymatischen Amplifikation einer bestimmten Sequenz der cDNA, die durch Primer begrenzt ist, die für diesen Bereich spezifisch sind. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des von Lucas *et al.* entwickelten Computerprogramms „Primer“ entworfen und setzen sich aus 18 bis 28 Nukleotiden zusammen (Lucas *et al.*, 1991). Sie wurden so ausgewählt, dass sie in ihrer

Nukleotidsequenz mindestens vier Unterschiede im Vergleich zu der Sequenz der übrigen bekannten Mitglieder der CEACAM-Subgruppe und einigen ausgewählten Vertretern der PSG-Untergruppe aufwiesen. Diese Unterschiede sind für die Spezifität der Oligonukleotide von großer Bedeutung. Die Validität der gefundenen Primer wurde durch einen Vergleich mit den aus der Genom-Datenbank *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) stammenden und in Form eines *Multialignments* dargestellten Sequenzen der Mitglieder der CEA-Familie überprüft. Es wurde zudem darauf geachtet, dass Strang- und Gegenstrangprimer nicht zueinander komplementär sind. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide einschließlich der errechneten Fragmentlängen gibt die Tabelle in Kapitel 2.7.

Im ersten Reaktionszyklus wurde die DNA durch kurzzeitige Hitzebehandlung bei 94 °C in die komplementären Einzelstränge zerlegt. Anschließend wurden die beiden Primer an den jeweils komplementären Bereich der cDNA anhybridisiert. Die Reaktionstemperatur für dieses so genannte *Annealing* war für jedes der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primerpaar unterschiedlich und wurde durch die Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotide bestimmt. Es ergaben sich hierbei Werte zwischen 58 °C und 68 °C. In einer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysierten Reaktion wurden unter Verwendung der dNTPs (2'-(Desoxy)Ribonukleosid 5'-triphosphate) die Einzelstränge in 5'→3'-Richtung zu den Doppelsträngen vervollständigt. Diese wurden erneut hitzedenaturiert und dienten für den zweiten Reaktionszyklus als Matrizen. Die zu untersuchende Zielsequenz wird auf diesem Wege exponentiell vermehrt. Bei einer Zyklenzahl von 30, wie sie meist bei den Versuchen verwendet wurde, beträgt der Vermehrungsfaktor theoretisch  $10^7$ . Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit spezifischen Primern für die  $\beta$ -Aktin-cDNA mitgeführt. Diese kodiert für ein Protein, das in jeder Zelle exprimiert wird und deshalb zu den Haushaltsgenen, den so genannten *Housekeeping*-Genen, gezählt wird (Weeds *et al.*, 1982). Zu diesen gehören zudem die *Gapdh* (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und das *Cyclophilin*. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 beschrieben.

Tabelle 3.3

<b>Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion</b>	
cDNA-Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	5,00 µl
Strang-Primer (25 pmol/µl)	0,40 µl
Gegenstrang-Primer (25 pmol/µl)	0,40 µl
PCR-Puffer (10x)	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,50 µl
dNTP Mix (25 mM)	0,20 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,13 µl
deionisiertes Wasser	14,87 µl
<hr/>	
Volumen pro Versuchsansatz	25,00 µl

Tabelle 3.4

<b>Inkubationen bei der Polymerase-Kettenreaktion</b>		
Versuchsschritte	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)
Anfängliche Denaturierung	94	0:30
Amplifikation (30 Zyklen):		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	58-68	1:10
Polymerisation	72	1:30

### 3.3 Elektrophorese im Agarosegel

#### 3.3.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die bei der Polymerase-Kettenreaktion entstandenen DNA-Fragmente wandern aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im elektrischen Feld in Richtung Anode und können in Abhängigkeit von ihrer Größe in einer hochmolekularen Gelmatrix getrennt werden. Dabei hängt das Wanderungsverhalten der zu analysierenden Nukleinsäuren von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Konformation der Makromoleküle und der Porengröße der Gelmatrix ab. Mit der verwendeten Konzentration der Agarose von 2 % wird eine optimale Trennung von DNA-Fragmenten in einer Größe zwischen 100 und 3000 Basenpaaren ermöglicht. Im ersten Versuchsschritt wurde die Gelmatrix in Form der Agarose in dem Elektrophorese-Puffer 10x TAE (Endkonzentration 1x) aufgekocht und nach der

Herstellung einer homogenen Lösung und Abkühlung auf 60 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt. Dabei lagert sich das Ethidiumbromid sequenzunspezifisch zwischen benachbarten Basenpaaren ein und erlaubt eine Sichtbarmachung der DNA-Fragmente in der UV-Transillumination ( $\lambda=308$  nm). Die Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer mit Auftrennstrecken von 10 bzw. 16 cm gegossen und die Polymerisation abgewartet. Vor dem Einpipettieren von 12,5 µl der aufzutrennenden DNA-Proben in die Geltaschen wurden diese mit einem Bromphenolblau-haltigen Auftragspuffer versetzt und bei 65 °C für 5 min im Thermocycler inkubiert. Der Probenpuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung und markiert die Elektrophoresefront. Bei einer angelegten Spannung von 80 mV wurde die Gelelektrophorese in 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde bei jedem Lauf ein Größenstandard in Form einer 100-bp-DNA-Leiter mitgeführt. Das Agarosegel wurde zur Dokumentation mit einer Digitalkamera fotografiert und ausgewertet.

### 3.3.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Intaktheit der unter Verwendung des *RNeasy®-Mini*-Reagenziensystems gewonnenen RNA wurde anhand einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei wird die RNA durch die Zugabe von Formamid und eine Inkubationstemperatur von 65 °C denaturiert und gemäß der unterschiedlichen Größe der einzelnen RNA-Fraktionen aufgetrennt. Die Gesamt-RNA der meisten eukaryotischen Zellen setzt sich aus drei unterschiedlichen Arten von RNA-Molekülen zusammen, der *messenger* RNA (mRNA), der *transfer* RNA (tRNA) und der ribosomalen RNA (rRNA). Die ribosomale RNA macht dabei den vorherrschenden Anteil aus und lässt sich in Säugetierzellen aufgrund ihrer ungefähren Sedimentationsgeschwindigkeit in eine 18S- und eine 28S-rRNA unterteilen. Um eine Inaktivierung von RNAsen zu gewährleisten, wurde für die Herstellung der Gelmatrix und des Laufpuffers mit DEPC (Diethylpyrokarbonat) in einer Endkonzentration von 0,1 % versetztes und autoklaviertes Wasser verwendet. Im ersten Schritt wurde für jede zu untersuchende Probe ein Versuchsansatz aus RNA (Konzentration 1 µg/µl), Formamid (Endkonzentration 50 %) und 10x TBE-Puffer (Endkonzentration 1x) hergestellt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach der anschließenden Zugabe des Bromphenolblau-haltigen Auftragspuffers wurden 16 µl in die Taschen eines 1,5 %igen Agarosegels einpipettiert. Letzterem wurde vor dem Eingießen in eine horizontale Gelkammer Ethidiumbromid in



einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugefügt. Bei einer angelegten Spannung von 70 mV wurde die Elektrophorese in 1x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Dieser besitzt im Vergleich zu 1x TAE eine deutlich stärkere Pufferkapazität. Als Größenstandard wurde bei jedem Lauf ein RNA-Marker mit RNA-Fragmenten der Größe 0,24-9,5 kb mitgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe von UV-Transillumination und einer Digitalkamera.

### 3.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Auslösung und Reinigung der zu analysierenden DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des *Perfectprep-Gel-Cleanup*-Reagenziensystems. Dabei wurde im ersten Schritt das mit Ethidiumbromid gefärbte Fragment unter UV-Transillumination mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Das Gewicht betrug im Mittel 50 mg und sollte eine Gesamtmasse von 400 mg nicht übersteigen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde das Agarosegelfragment unter Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers und anschließende Inkubation bei 50 °C für 5 min aufgelöst und homogenisiert. Im Weiteren wurde das mit Isopropanol versetzte Homogenat auf eine Spinsäule aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an eine Membran aus Silikagel. Die Verwendung von Waschpuffern ermöglicht die Entfernung von Verunreinigungen, wie zum Beispiel von Salzen, Agarose und anderen organischen Molekülen. Nach einigen Zentrifugationsschritten wurde die gereinigte DNA mit 30 µl eines Elutionspuffers von der Silikagelmembran abgelöst und bei -20 °C eingefroren.

### 3.3.4 Sequenzanalyse von DNA mit Didesoxynukleotiden

Die Nukleotidsequenz des PCR-Amplifikats von *Ceacam17* wurde mit Hilfe eines *BigDye®- Terminator-Cycle-Sequencing*-Reagenziensystems bestimmt. Der eigentlichen Sequenzierungsreaktion gehen zwei Fällungsschritte mit 100 %igem Ethanol voraus. Das Prinzip beruht auf der 1977 von Sanger *et al.* entwickelten Methode der enzymatischen Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden für die Komplementärstrangsynthese durch die DNA-Polymerase zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden (2'-Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten) die 2',3'-Didesoxynukleotiden (2',3'-Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate) verwendet. Als Startpunkt für das Enzym dient ein kurzer Doppelstrangbereich, der durch

die Anlagerung eines genspezifischen Primers an das 3'-Ende des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes gebildet wird. Der Versuchsansatz von 10 µl setzt sich zusammen aus 7 µl PCR-Produkt, 2 µl *BigDye*-Reagenz und 1 µl Primer. Durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese, denn das fehlende 3'-OH-Ende verhindert die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die jeweils mit einer der vier bekannten Basen enden. Die entstehenden Produkte werden durch Gelelektrophorese in sehr dünnen, hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mittels Laserstrahl und Lichtdetektor quantifiziert. Das Ergebnis wird von einem Computer erfasst, analysiert und gespeichert. Bei Modifikationen dieser Methode ist das den Kettenabbruch auslösende 2',3'-Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie zum Beispiel Fluorescein-5'-Isothiocyanat oder Texasrot, markiert. Die Absorptionsspektren dieser Farbstoffe unterscheiden sich so weit voneinander, dass sie bei Anregung durch Bestrahlung mit einem 488-nm-Argon-Laser vier photometrisch eindeutig erfassbare Einzelsignale ergeben. Da für jedes Didesoxynukleotid ein anderer Farbstoff verwendet wird, ist die Durchführung in nur einem Reaktionsansatz möglich und das Verfahren kann dadurch deutlich vereinfacht werden.

### 3.4 Allgemeine Methoden der Zellkultur

#### 3.4.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der verwendeten Tumorzelllinien wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung des Farbstoffes Trypanblau geschätzt und die Vitalität beurteilt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, wohingegen tote Zellen durch ein Leck in ihrer äußeren Membran dunkelblau angefärbt werden. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblaulösung in einer Endkonzentration von 0,4 % verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Kammer nicht überladen wird. Die Zellen wurden in allen vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend die Werte gemittelt. Mit Hilfe der nachfolgenden Formel kann die Zellzahl pro ml Suspension bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl pro ml Suspension} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.4.2 Einfrieren von Zellen

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden in Konzentrationen zwischen  $2 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml in einem Volumen von 1 ml eingefroren. Für eine dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff ist es erforderlich, dass dem Nährmedium RPMI 1640 ein Gefrierschutzmittel in Form von DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Endkonzentration von 20 % zugesetzt wird. Dieses verhindert die Bildung von Eiskristallen und dadurch ein Platzen der Zellen. Im Einzelnen wurden die einzufrierenden Tumorzellen durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 540x g sedimentiert und anschließend in einer geeigneten Menge an Einfriermedium resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde auf mehrere Kryoröhrchen verteilt (Endvolumen 1 ml). Im nachfolgenden Schritt wurden die Röhrchen in eine Einfrierbox überführt und für 24 Stunden bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Dabei sorgte die durch Isopropanol gekühlte Einfrierbox bei  $-80\text{ °C}$  für eine schonende Erniedrigung der Temperatur um ca.  $1\text{ °C}$  pro Minute. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei  $-130\text{ °C}$ .

### 3.4.3 Auftauen von eingefrorenen Zellen

Die Kryoröhrchen wurden dem Stickstofftank entnommen und rasch in ein Wasserbad mit einer Temperatur von  $37\text{ °C}$  gestellt. Der Auftauvorgang wird solange abgewartet, bis sich innerhalb des Röhrchens nur noch ein kleiner Eiskristall befindet. Anschließend wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und mit 1 ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) vermischt. Im Folgenden wurden weitere 3 ml PBS unter permanentem Schütteln tropfenweise zugegeben. Das Gefäß wurde umgehend bei 540x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weitere Verwendung wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge eines bei  $37\text{ °C}$  vorgewärmten RPMI 1640 Nährmediums resuspendiert.

### 3.4.4 Kultur von adhärennten Tumorzelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Magen- und Kolontumorzelllinien erfolgte in einem RPMI 1640 Nährmedium. Das benötigte Volumen in einer kleinen Kulturflasche mit einer Adhärenzfläche von  $25\text{ cm}^2$  betrug 10 ml, in einer mittleren Kulturflasche mit einer

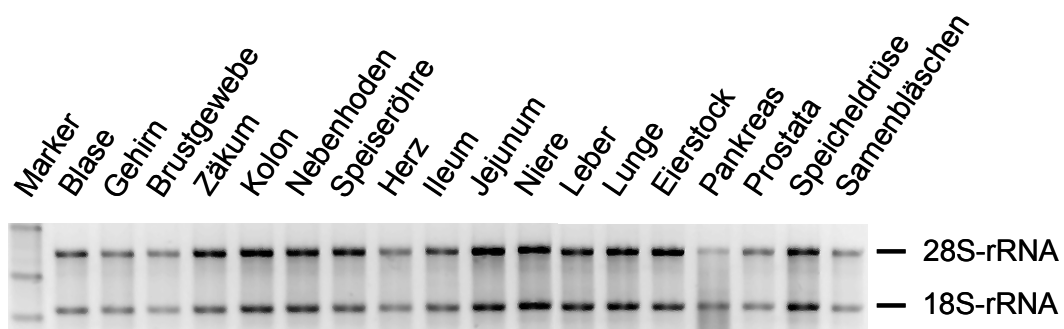
Adhärenzfläche von 75 cm<sup>2</sup> 15 ml. Je nach Wachstumsverhalten der Tumorzellen wurde das Nährmedium alle 3-4 Tage erneuert. Dabei wurde das komplette Medium mit einer 10 ml Pipette abgesaugt, verworfen und die Kulturflasche mit 5 ml vorgewärmtem PBS gespült. Nach der anschließenden Zugabe von 1,5 ml 1x Trypsin/EDTA wurden die Zellen für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei werden die adhärenen Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Die Zeitvorgabe sollte genau eingehalten werden, da das Trypsin/EDTA bei zu langer Einwirkung toxisch auf die Tumorzellen wirkt. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Nährmedium aufgenommen und nach einem weiteren Waschschrift mit PBS in einem Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10 geteilt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA

#### 4.1.1 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Intaktheit der isolierten Gesamt-RNA wurde vor der weiteren Verwendung mit Hilfe einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde 1 µg der gewonnenen Gesamt-RNA durch Zugabe von Formamid bei einer Reaktionstemperatur von 65 °C denaturiert und entsprechend der Größe der einzelnen Fraktionen auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die untersuchten RNAs der einzelnen Mausorgane wurden als intakt angesehen, wenn nach Anfärbung mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachung unter UV-Transillumination zwei deutlich voneinander getrennte Banden der erwarteten Größe von 1,9 kb für die 18S- und von 4,7 kb für die 28S-rRNA im Agarosegel zu erkennen waren. Eine mögliche Degradierung der RNA zeigte sich durch eine Unschärfe oder ein Fehlen der betreffenden Banden nach der Gelelektrophorese. Diese RNA-Proben wurden im Rahmen der weiteren Versuche nicht verwendet. Als Größenstandard wurde bei jedem Lauf ein RNA-Marker mit RNA-Fragmenten der Größe 0,24-9,5 kb mitgeführt. Abbildung 4.1 zeigt einen exemplarischen Auszug der untersuchten Gesamt-RNAs.

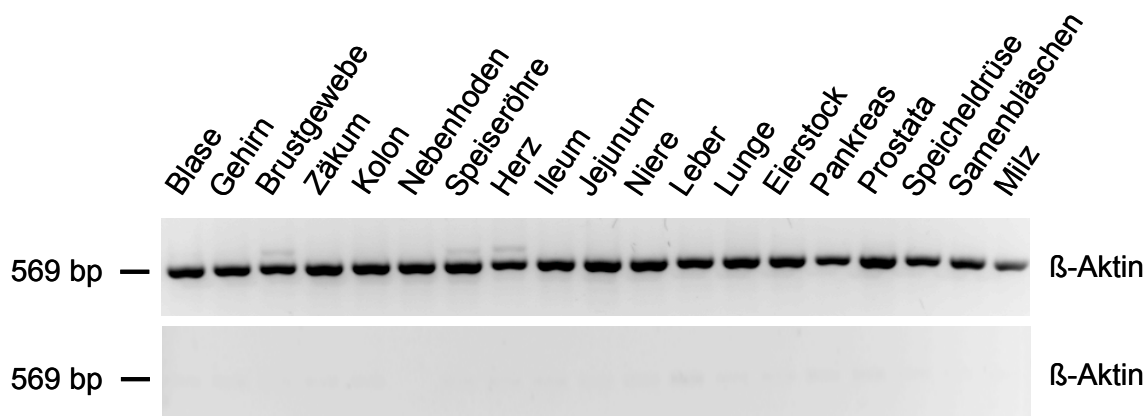


**Abbildung 4.1** Intaktheitskontrolle der verwendeten RNA aus Geweben adulter C57BL/6-Mäuse durch denaturierende Gelelektrophorese. Ein µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 16 µl auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Transillumination sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt einen exemplarischen Auszug der untersuchten Gewebe mit Darstellung der 18S-rRNA- und 28S-rRNA-Spezies. Bei Vorhandensein von zwei deutlich getrennten Banden in einem Mengenverhältnis von circa 1:2 wurde die Gesamt-RNA als intakt angesehen und konnte im Rahmen der weiteren Versuche verwendet werden. Einzig die RNA des Pankreas erschien deutlich degradiert und wurde daher für die weitere Analyse nicht verwendet, sondern durch eine neu isolierte RNA-Probe ersetzt.

#### 4.1.2 Intaktheitsnachweis der Gesamt-RNA mittels $\beta$ -Aktin-RT-PCR

Eine weitere Möglichkeit, die Intaktheit der Gesamt-RNA zu untersuchen, ist die Durchführung einer RT-PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die spezifisch sind für das endogene *Housekeeping*-Gen  $\beta$ -Aktin. Dieses wird in jeder eukaryotischen Zelle exprimiert und ist funktionell an der intrazellulären Beweglichkeit von Zellorganellen beteiligt (Weeds *et al.*, 1982). Beim Vorhandensein von intakter mRNA für  $\beta$ -Aktin in den isolierten Mausgeweben kann daher davon ausgegangen werden, dass die Gesamt-RNA nicht degradiert ist.

Wie von Ng *et al.* beschrieben, gibt es jedoch neben dem Strukturgen, das für  $\beta$ -Aktin kodiert, mehrere Pseudogene und prozessierte Pseudogene, die auch im Falle einer fehlgeschlagenen Transkription und Kontamination mit genomischer DNA ein Amplifikat in einer Größe von 569 bp ergeben (Ng *et al.*, 1985). Um diesen Umstand ausschließen zu können, wurde eine PCR nach standardisiertem Protokoll mit für  $\beta$ -Aktin-cDNA spezifischen Primern durchgeführt, jedoch ohne vorhergehende Reverse Transkription. In diesem Falle konnte kein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 569 bp nachgewiesen werden. Dieses Versuchsergebnis beweist, dass die nachgewiesenen Transkripte von der mRNA stammen und nicht von kontaminierender genomischer DNA. Abbildung 4.2 zeigt einen exemplarischen Auszug der Versuchsergebnisse.



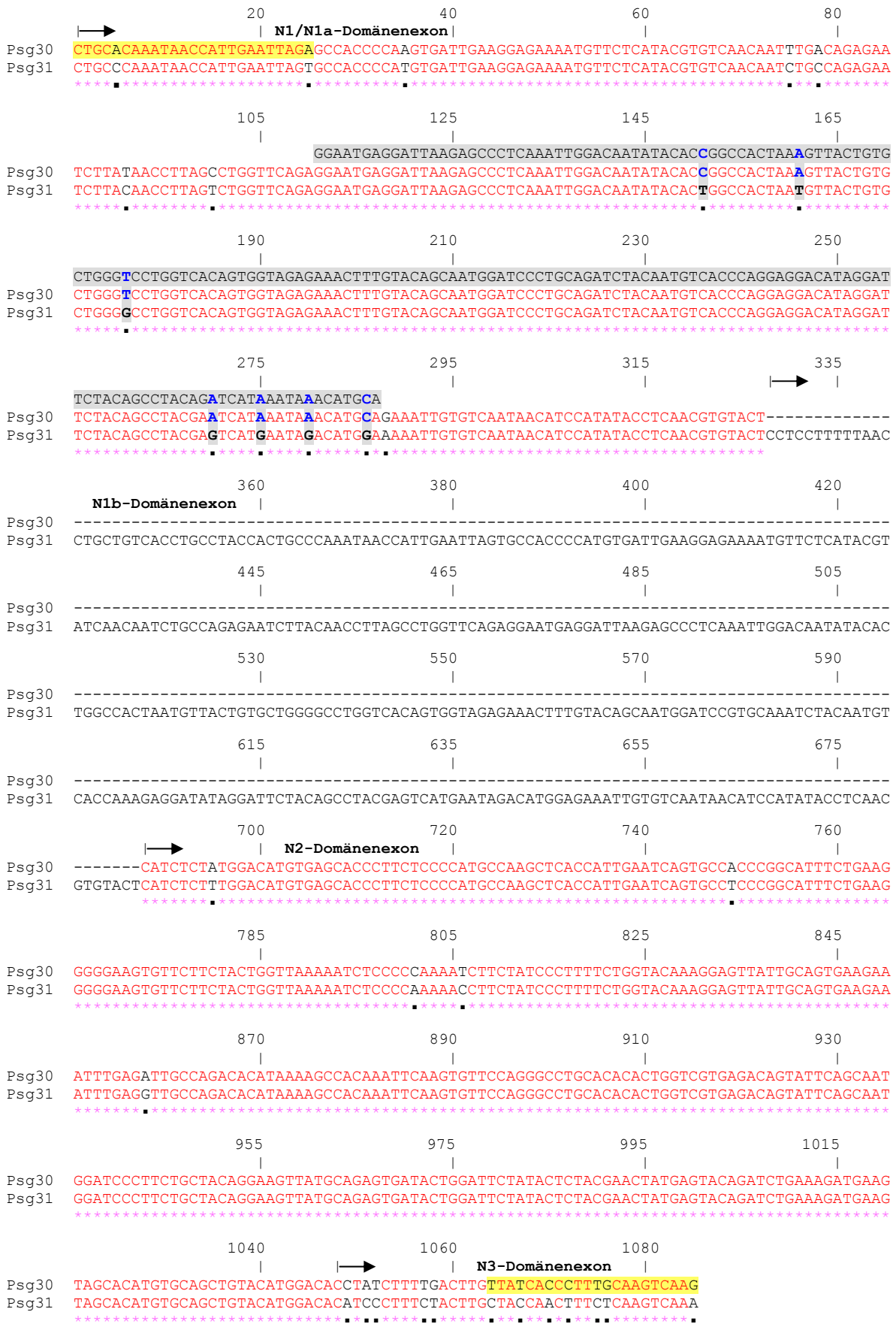
**Abbildung 4.2 Intaktheitskontrolle der Gesamt-RNA mittels  $\beta$ -Aktin-RT-PCR.** Ein  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde in einem Versuchsansatz von 20  $\mu$ l revers transkribiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Im Anschluss daran wurden 5  $\mu$ l in einer PCR mit spezifischen Strang- und Gegenstrangprimern für das *Housekeeping*-Gen  $\beta$ -Aktin eingesetzt. Die Hälfte des in der PCR verwendeten Reaktionsansatzes (12,5  $\mu$ l) wurde mittels Elektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel entsprechend der Größe aufgetrennt. Das in der Abbildung dargestellte Amplifikat besitzt eine Größe von 569 bp. In einem zweiten Versuchsansatz erfolgte die RT-PCR für  $\beta$ -Aktin ohne vorhergehende Reverse Transkription. Das Fehlen von spezifischen Amplifikationsprodukten zeigt die Abwesenheit von kontaminierender genomischer DNA an.

## 4.2 Spezifitätskontrolle der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide

### 4.2.1 Spezifitätsnachweis für das sehr nahe verwandte Genpaar *Psg30* und *Psg31*

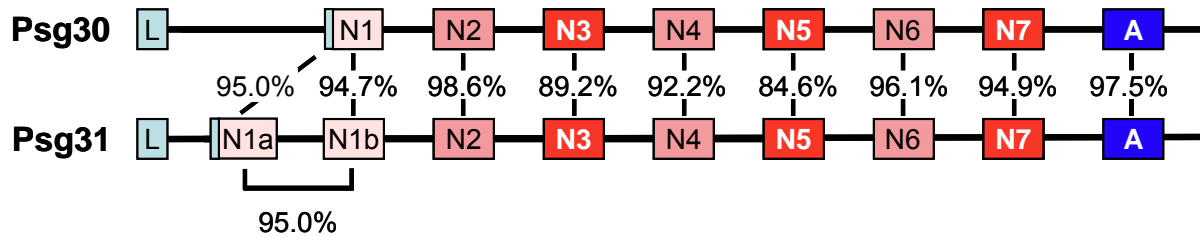
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von Mitgliedern der murinen CEA-Familie auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität der gewonnenen Versuchsergebnisse wurden exemplarisch die Amplifikationsprodukte der *Psg30*- und *Psg31*-cDNA im Strang und Gegenstrang sequenziert. Das Ergebnis wurde mit dem aus der Genom-Datenbank *Ensembl* stammenden Teil der Nukleotidsequenz von *Psg30* und *Psg31*, der für die N1-, N2- und den Anfang der N3-Domäne kodiert, verglichen. Von besonderer Bedeutung war dabei die Tatsache, dass PSG30 und PSG31 sehr nahe verwandt sind. Dieses zeigt sich auch an einer fast identischen Anzahl und Anordnung der IgC- und IgV-ähnlichen Domänen, was auf einen gemeinsamen Vorläufer schließen lässt. Die Vervielfältigung der einzelnen Exons, die für die N-Domänen kodieren, erfolgte durch mehrmalige Verdopplung. Eine Arbeitsgruppe um Dr. Tom Moore konnte in neueren Untersuchungen zeigen, dass bei dem Vorläufermolekül von PSG31 eine zusätzliche Duplikation des Exons, das für die N1-Domäne kodiert, stattgefunden hat. So gibt es in diesem Falle eine Domäne N1a und eine Domäne N1b, die eine Ähnlichkeit von 95 % aufweisen (McLellan *et al.*, 2005). Die Auswertung der Versuchsergebnisse zeigt, dass die Sequenz des Amplifikationsprodukts der *Psg30*-cDNA in einem gut lesbaren Bereich von 176 Nukleotiden mit der aus der Genom-Datenbank *Ensembl* stammenden Sequenz für *Psg30* übereinstimmt. Im Gegensatz dazu konnten mehrere Nukleotidabweichungen im Vergleich zur Sequenz für *Psg31* gefunden werden (Abb. 4.3A). Diese Tatsache belegt die hohe Spezifität der für die Expressionsanalyse mit Hilfe der RT-PCR verwendeten Primer für *Psg30*. Die nachfolgenden Abbildungen (4.3A und B) veranschaulichen die Versuchsergebnisse für *Psg30*.

**A**





## B



**Abbildung 4.3 Spezifitätskontrolle der PCR-Amplifikation von Psg30-cDNA. (A)** Das Psg30-Amplifikationsprodukt wurde unter UV-Beleuchtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und im Strang und Gegenstrang sequenziert. Die Abbildung zeigt in roten Buchstaben die Nukleotidsequenz des gesamten erwarteten Psg30-PCR-Produkts in einer Größe von 725 bp, wobei der Strang- und der Gegenstrangprimer gelb unterlegt sind. Dieser Bereich kodiert für die N1-, N2- und einen Teil der N3-Domäne. Die Exon-Intron-Grenzen werden durch Pfeile symbolisiert. Vergleichend dazu ist die Nukleotidsequenz von *Psg31* für den entsprechenden Bereich dargestellt. Übereinstimmungen in den beiden Sequenzen sind durch Sterne, Unterschiede durch Quadrate hervorgehoben. Der sequenzierte Bereich zwischen den Positionen 111 und 287 ist grau unterlegt dargestellt. **(B)** Zur Dokumentation der engen Verwandtschaft von *Psg30* und *Psg31* sind die Anordnung der für die Ig-ähnlichen Domänen kodierenden Exons und die Ähnlichkeit der korrespondierenden Sequenzen auf Proteinebene abgebildet. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei dem Vorläufermolekül von PSG31 eine zusätzliche Duplikation des N1-Domänen-exons stattgefunden hat. (nach McLellan *et al.*, 2005).

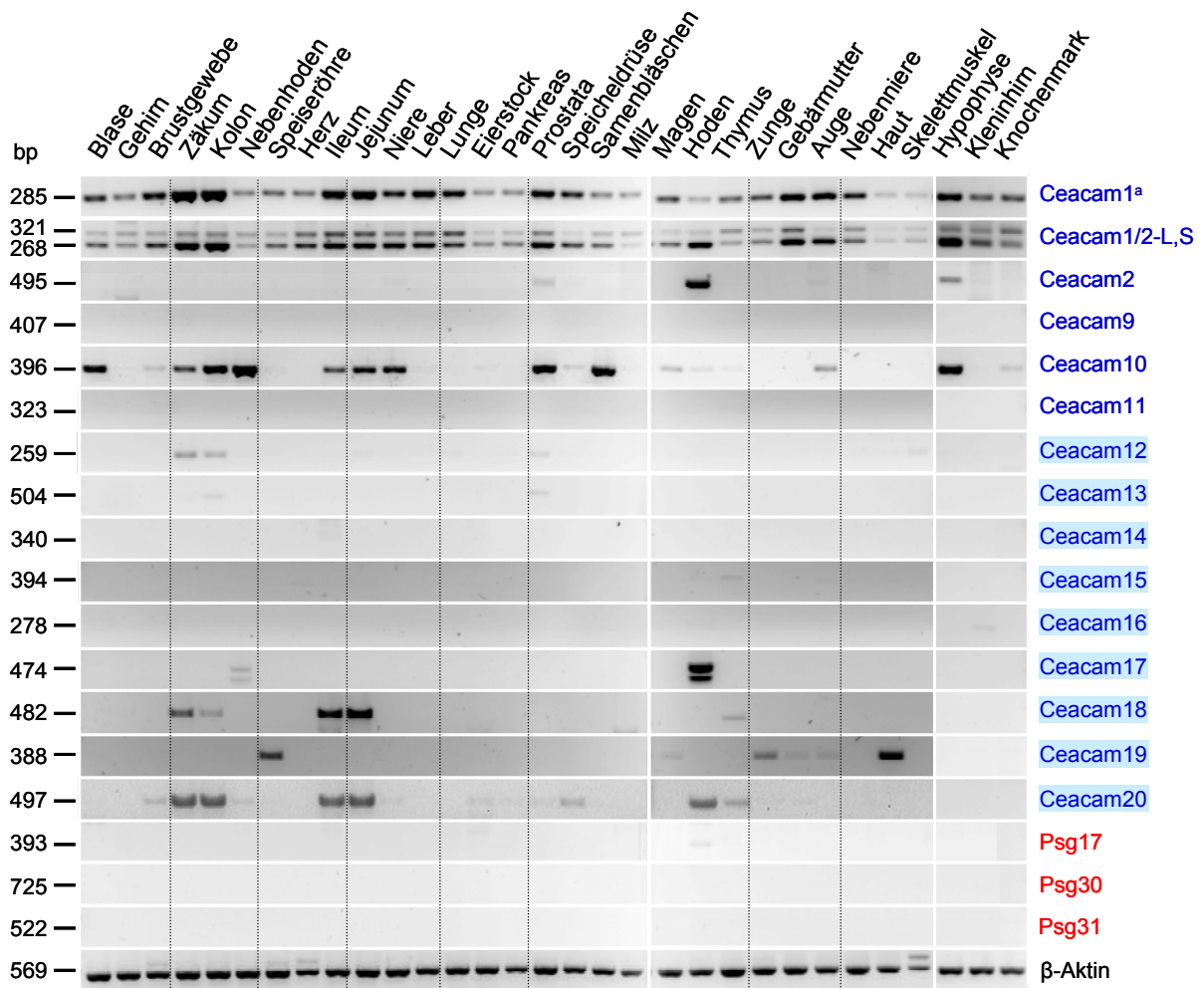
### 4.3 Analyse der Expression von Mitgliedern der murinen CEA-Familie in Normalgeweben und verschiedenen Tumoren mittels RT-PCR

#### 4.3.1 Expression von Transkripten der CEA-Genfamilie in Normalgeweben adulter Mäuse

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die neu entdeckten Gene exprimiert werden, wurde eine umfassende Analyse ihrer mRNAs in einer Reihe von adulten Geweben und plazentaren Entwicklungsstadien von C57BL/6-Mäusen mittels RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Expressionsmuster bereits bekannter muriner Gene verglichen, mit dem Ziel, über das spezifische Verteilungsmuster Hinweise auf eine Eignung als Zielstruktur für die Immuntherapie und mögliche funktionelle Besonderheiten zu erhalten. Die für die Amplifikation verwendeten und meist 20 Nukleotide umfassenden Primer wurden so ausgewählt, dass sie mit mindestens vier Basenpaarfehlbildungen gegenüber den am nächsten verwandten Mitgliedern hybridisieren (siehe Tabelle in Kapitel 2.7). Zudem sollten sie aus unterschiedlichen Exons sein, um eventuell kontaminierende DNA aufgrund des längeren Amplifikationsprodukts erkennen zu können. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, zeigen die Vertreter der CEA-Genfamilie eine sehr heterogene Gewebeverteilung. Bei

genauerer Betrachtung ist jedoch zu erkennen, dass sich die Art der Expression in drei Gruppen zusammenfassen lässt: die erste Gruppe zeigt ein sehr breites, die zweite Gruppe ein deutlich eingegrenztes und die dritte Gruppe ein nahezu gewebespezifisches Expressionsmuster. Im Gegensatz zum menschlichen Gen für CEACAM1 gibt es in der Maus (und in der Ratte) zwei Allelvarianten, nämlich *Ceacam1<sup>a</sup>* und *Ceacam1<sup>b</sup>* (McCuaig *et al.*, 1993; Edlund *et al.*, 1993). Bei den hier untersuchten C57BL/6-Inzuchtmäusen kommt nur das *Ceacam1<sup>a</sup>*-Allel vor. Die *Ceacam1<sup>a</sup>*-mRNA konnte in allen untersuchten adulten Mausorganen nachgewiesen werden. Vor allem im oberen und unteren Verdauungstrakt ist sie in großer Menge vorhanden. Von besonderem Interesse ist dabei, dass vorwiegend die mRNA für die kurze zytoplasmatische Spleißvariante exprimiert wird. Dies wird durch das Auftreten des 268-bp-DNA-Fragments angezeigt. In RNA aus Milz und Thymus dagegen ist die mRNA für die lange zytoplasmatische Spleißvariante, sichtbar an dem Amplifikationsprodukt mit einer erwarteten Größe von 321 bp, vorherrschend. Diese Organe gehören zum lymphatischen System und sind daher an ähnlichen physiologischen Vorgängen beteiligt. *Ceacam10*-mRNAs konnten in zwei Kompartimenten des Dünndarmes (Ileum, Jejunum), im Kolon, in der Blase, in der Prostata, im Samenbläschen, in den Nebenhoden und in der Hypophyse nachgewiesen werden. Ein nicht so breit gestreutes Expressionsmuster zeigen *Ceacam12*, *Ceacam18*, *Ceacam19* und *Ceacam20*. *Ceacam12* zum Beispiel wird nur in Teilen des unteren Gastrointestinaltrakts, in der Prostata und im Skelettmuskel exprimiert. Es kodiert für ein Protein mit zwei IgV-ähnlichen Domänen (N1 und N2), das zu den sezernierten Mitgliedern der CEA-Familie zählt. *Ceacam19*-Transkripte waren vorwiegend in Organen zu finden, die ein mehrschichtiges verhornendes oder verhorntes Plattenepithel besitzen. Beispiele hierfür sind die Speiseröhre, die Haut, die Zunge, der Magen und das Auge. *Ceacam18*- und *Ceacam20*-mRNAs konnten vorwiegend in den einzelnen Abschnitten des unteren Verdauungstrakts (Jejunum, Ileum, Zäkum, Kolon) und in sehr geringem Umfang im Thymus nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden *Ceacam20*-Transkripte im Hoden und in der Prostata gefunden. Ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster zeigen *Ceacam2*, *Ceacam16* und *Ceacam17*. So waren Transkripte des zwischen Mensch und Maus hoch konservierten *Ceacam16* nur in sehr geringer Menge im Kleinhirn detektierbar. *Ceacam2*- und *Ceacam17*-mRNAs konnten dagegen überwiegend in RNA von Organen nachgewiesen werden, die zum männlichen Urogenitaltrakt gehören, wie zum Beispiel im Hoden, Nebenhoden und in der Prostata. Im Falle von *Ceacam17* trat neben dem erwarteten Amplifikat mit einer Größe von 474 bp noch ein zusätzliches PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 406 bp auf. Dieses Produkt wurde isoliert und anschließend

sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden in Kapitel 4.4 dargestellt und erläutert. *Ceacam13*- und *Psg17*-Transkripte konnten nur in geringfügigen Mengen im Kolon, in der Prostata und im Hoden nachgewiesen werden. Die übrigen Mitglieder der CEA-Familie waren in den untersuchten adulten Geweben der Maus nicht detektierbar. Abbildung 4.4 zeigt die durch Ethidiumbromid angefärbten Amplifikationsprodukte nach gelelektrophoretischer Auftrennung.



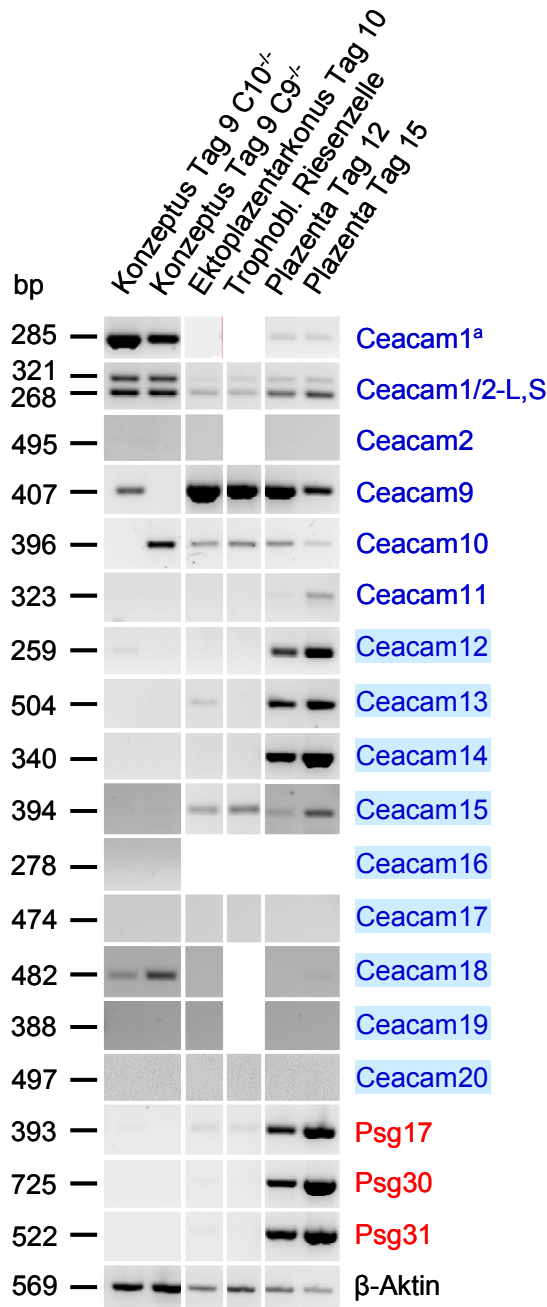
**Abbildung 4.4 Expressionsanalyse von murinen *Ceacam*- und *Psg*-Genen in adulten Normalgeweben mit Hilfe der RT-PCR.** Ein  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus den angegebenen adulten Normalgeweben von C57BL/6-Inzuchtmäusen wurde in einem Versuchsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  revers transkribiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Im Anschluss daran wurden 5  $\mu\text{l}$  in einer PCR mit genspezifischen Strang- und Gegenstrangprimern und einer Zyklenzahl von 30 Wiederholungen eingesetzt. Eine Ausnahme bildete *Ceacam20*. In diesem Fall wurden 35 Amplifikationszyklen verwendet. Die Hälfte des in der PCR verwendeten Reaktionsansatzes (12,5  $\mu\text{l}$ ) wurde mittels Elektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel entsprechend der Größe aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das Expressionsmuster von bereits bekannten (in blauer Schrift) und neu entdeckten (in blauer Schrift mit hellblauem Hintergrund) Mitgliedern der CEACAM-Subgruppe. Zudem wurden exemplarisch drei Vertreter aus der PSG-Untergruppe (in roter Schrift) untersucht. Als Intaktheits- und RNA-Mengenkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit spezifischen Primern für  $\beta$ -Aktin-cDNA mitgeführt. Die erwartete Größe der DNA-Fragmente ist auf der linken Seite der Abbildung zu erkennen.

### 4.3.2 Vergleich des Expressionsmusters von Transkripten der CEA-Genfamilie im Verlauf der Embryogenese

Das Muster der Expression im Verlauf der Embryogenese von Mitgliedern der murinen CEA-Familie wurde semiquantitativ mittels RT-PCR mit Gesamt-RNA von Gewebeproben plazentarer Kompartimente unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht. Die korrespondierenden cDNAs wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Tom Moore zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden Plazenten der Stadien Tag 9 post coitum (p.c.) bis Tag 15 p.c. analysiert. Dies entspricht einem Zeitrahmen aus der Mitte der Tragzeit, die bei der Maus ca. 21 Tage dauert. Als interne Kontrolle der Spezifität der verwendeten Primerpaare für *Ceacam9* und *Ceacam10* wurden Plazenta-RNA-Proben von Mäusen, denen entweder beide Allele für *Ceacam9* oder für *Ceacam10* fehlten, mitgeführt. In der Tat konnten bei den *Knock-out*-Mäusen für *Ceacam9* und *Ceacam10* keine DNA-Fragmente der erwarteten Größen von 407 bp (*Ceacam9*-mRNA) und 396 bp (*Ceacam10*-mRNA) mit für das betreffende Gen spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Dieses Ergebnis spricht für die Spezifität der beiden Primerpaare.

*Ceacam11*-, *Ceacam12*-, *Ceacam13*- und *Ceacam14*-Transkripte waren vorwiegend in späten Stadien der Embryonalentwicklung ab Tag 12 in der vollständig ausgereiften Plazenta zu finden (Abb. 4.5). Die zugehörigen Proteine zählen zu den sezernierten Mitgliedern der CEA-Familie, da sie keine feste Membranverankerung besitzen. Die exemplarisch untersuchten *Psg*-Gene konnten überwiegend in den Gewebeproben der Plazenta von Tag 12 p.c. und Tag 15 p.c. nachgewiesen werden. Das Expressionsverhalten von *Ceacam18* scheint dazu zeitlich verschoben zu sein, da die zugehörige mRNA fast ausschließlich in den frühen Entwicklungsstadien ab Tag 9 zu finden war. Eine Mittelstellung nehmen dabei *Ceacam1* und das nahe verwandte *Ceacam10* ein. Deren Transkripte werden entsprechend der Auswertung der Versuchsergebnisse erstmalig ab Tag 9 der Tragzeit beobachtet. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung nehmen sie jedoch wieder deutlich ab. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die *Ceacam1*-Spleißvariante mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, sichtbar anhand des PCR-Produkts mit einer Größe von 268 bp, deutlich stärker in den späten Plazentastadien exprimiert wird. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die *Ceacam9*-mRNA im Verhältnis zur relativen Menge an mRNA für  $\beta$ -Aktin besonders ausgeprägt im Ektoplazentarkonus von Tag 10 und den Trophoblastriesenzellen (*trophoblast giant cells*) von Tag 10 vorhanden ist. Im Vergleich dazu wurden Transkripte des mit *Ceacam9* strukturell nahe verwandten *Ceacam15*

vorwiegend in den Gewebeproben ab Tag 10 der Embryonalentwicklung gefunden. Ceacam2-, Ceacam16-, Ceacam17-, Ceacam19- und Ceacam20-mRNAs konnten dagegen in keiner der untersuchten Gewebeproben der verschiedenen plazentaren Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Abbildung 4.5 zeigt eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

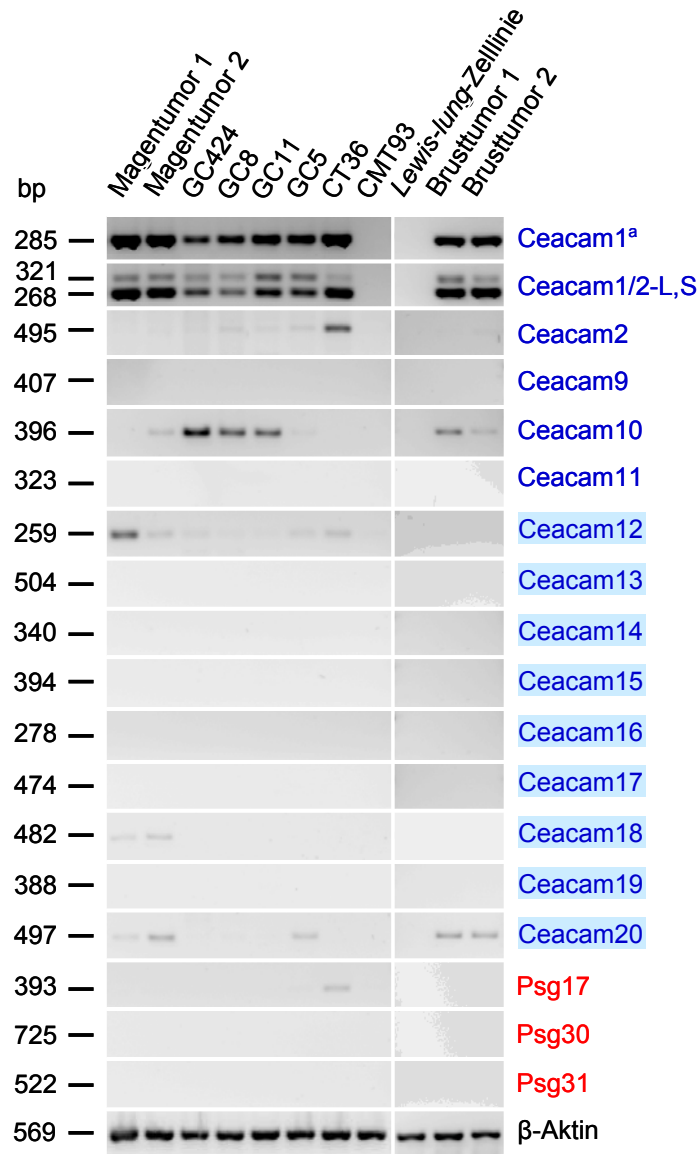


**Abbildung 4.5 Expressionsanalyse von Mitgliedern der murinen CEA-Familie im Laufe der Embryogenese.**

In die Untersuchung miteinbezogen wurde die Gesamt-RNA plazentarer Gewebe und Zellen von Tag 9 bis Tag 15 der Embryonalentwicklung. Die hierbei verwendete RT-PCR und die nachfolgende Elektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel wurden, wie in der Legende zu Abbildung 4.4 beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Expression von bereits bekannten (in blauer Schrift) und neu entdeckten (hellblau unterlegt) Mitgliedern der CEACAM-Subgruppe. Zudem wurden exemplarisch drei Vertreter aus der PSG-Untergruppe untersucht (in roter Schrift). Als Intaktheitskontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit spezifischen Primern für  $\beta$ -Aktin-cDNA mitgeführt. Die Größe der Amplifikationsprodukte wird auf der linken Seite der Grafik angezeigt. Die folgenden Abkürzungen werden in der Abbildung verwendet: C9<sup>-/-</sup> steht für Ceacam9<sup>-/-</sup> und C10<sup>-/-</sup> für Ceacam10<sup>-/-</sup>.

### 4.3.3 Untersuchung der Expression von CEA-Familienmitgliedern in ausgewählten epithelialen Tumoren

Um ein mögliches Potential als Zielantigen für die Tumorthherapie herauszufinden, wurde die Expression von Mitgliedern der CEA-Familie auf mRNA-Ebene exemplarisch in einer Auswahl primärer Magentumore von CEA424-SV40-T-Antigen transgenen Mäusen und davon abgeleiteter Zelllinien (GC424, GC8, GC11 und GC5) mit Hilfe der RT-PCR unter Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden untersucht. Bei diesen Mäusen werden durch das Vorhandensein des vom dem DNA-Virus SV40 stammenden T-Antigens multifokale Tumoren im Bereich des Magenpylorus induziert, die erstmalig im Alter von 37 Tagen in Form von Zelldysplasien innerhalb der Schleimhaut auftreten. Ein ausgeprägtes invasives Wachstum in das Duodenum mit Durchsetzen aller Wandschichten des Magens wird in einem Alter von 90-120 Tagen erreicht (Thompson *et al.*, 2000). Zudem wurde das Expressionsverhalten von Mitgliedern der murinen CEA-Familie in primären Brustadenokarzinomen von Mäusen, die für das *c-neu* der Ratte transgen sind, sowie in einer Gruppe von Zelllinien, die von Kolon- und Lungentumoren stammen, untersucht. Wie aus Abbildung 4.6 ersichtlich wird, ist die mRNA von *Ceacam1*<sup>a</sup> in fast allen Tumorproben und Zelllinien zu finden, wobei die Spleißvariante für die kurze zytoplasmatische Isoform deutlich stärker exprimiert wird (PCR-Produkt mit einer Größe von 268 bp). Das dem *Ceacam1* nahe verwandte *Ceacam10* zeigt ebenfalls eine breite Gewebeverteilung. Die *Ceacam10*-mRNA konnte in drei von vier untersuchten Magentumorzelllinien und in den primären Brusttumoren nachgewiesen werden. Vergleichend dazu waren *Ceacam12*-Transkripte in starker Ausprägung nur in RNA eines Magenadenokarzinoms detektierbar. Interessanterweise zeigen *Ceacam18* und *Ceacam20* ein ähnliches Expressionsverhalten (Abb. 4.6). So werden *Ceacam18*- und *Ceacam20*-mRNAs überwiegend in den primären Magentumoren gefunden. Zudem konnten Transkripte von *Ceacam20* noch in geringer Menge in den untersuchten Adenokarzinomen der Brust nachgewiesen werden. In der Kolontumorzelllinie CT36 werden lediglich *Ceacam2* und im Vergleich zum  $\beta$ -Aktin-Gehalt der Zelle in sehr geringem Maße *Psg17* exprimiert. Dagegen konnte keines der untersuchten Mitglieder der murinen CEA-Familie in RNA der Lungentumorzelllinie *lewis lung* gefunden werden. Abbildung 4.6 zeigt das Expressionsverhalten der untersuchten Mitglieder der CEA-Familie in ausgewählten epithelialen Tumoren und Tumorzelllinien.

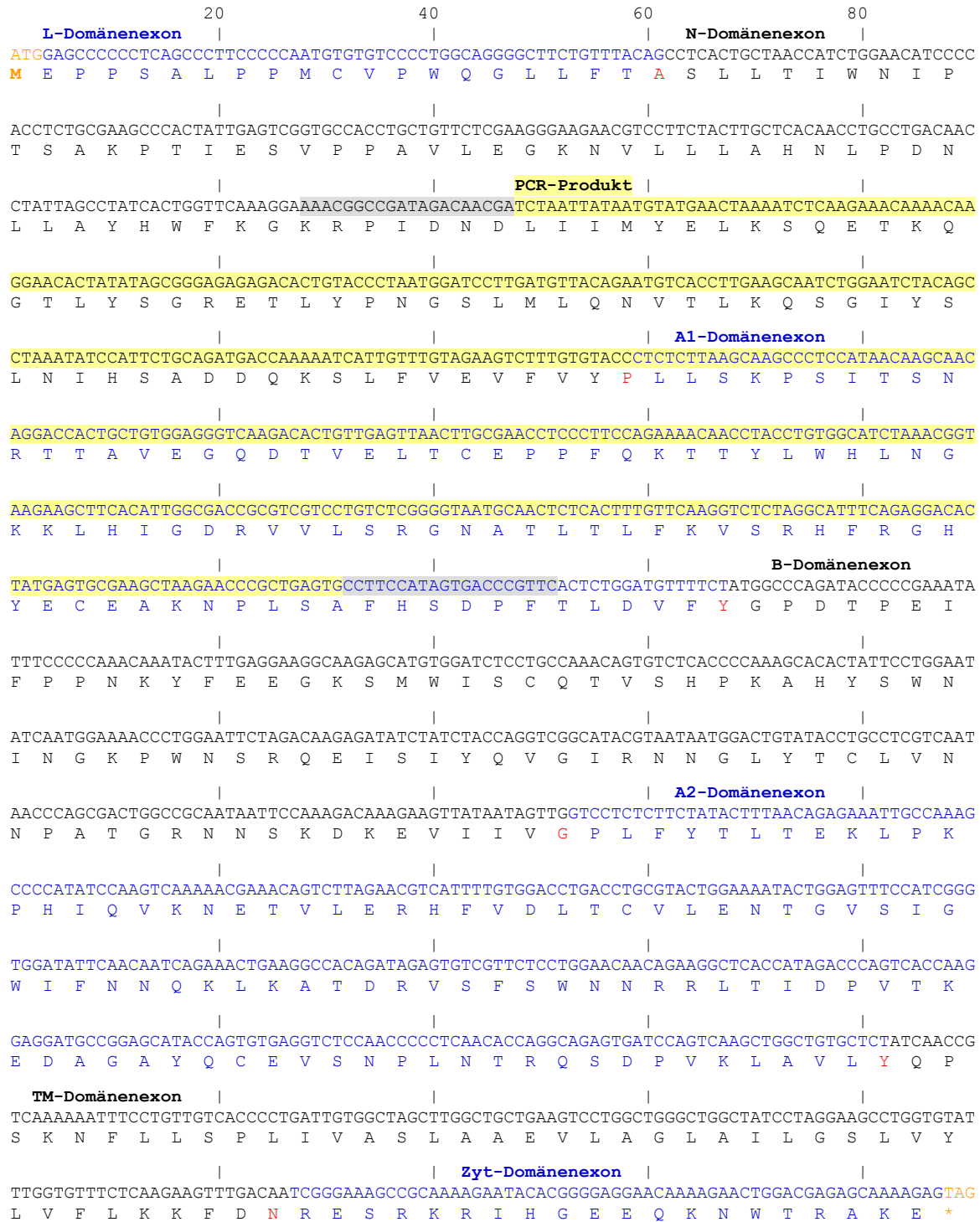


**Abbildung 4.6 Vergleichende Expressionsanalyse von murinen *Ceacam*- und *Psg*- Genen mit Hilfe der RT-PCR.** Als Untersuchungsmaterial dienten Gewebe verschiedener Primärtumoren epithelialen Ursprungs und Zelllinien, die von Adenokarzinomen des Magens (GC5, GC8, GC11, GC424), des Kolon (CT36, CMT93) und der Lunge (*Lewis-lung*) stammen. Die RT-PCR und die nachfolgende Elektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel wurden, wie in der Legende zu Abbildung 4.4 beschrieben, durchgeführt. In der Abbildung wird das Expressionsmuster von bereits bekannten (in blauer Schrift) und neu entdeckten (in blauer Schrift und blauem Hintergrund) Mitgliedern der CEACAM-Subgruppe vergleichend dargestellt. Zudem wurden exemplarisch drei Mitglieder der PSG-Untergruppe (in roter Schrift) untersucht. Die Größe des erwarteten Amplifikationsprodukts ist auf der linken Seite der Abbildung aufgeführt.

#### 4.4 Nachweis von alternativem Spleißen bei *Ceacam17*

*Ceacam17*-Transkripte konnten hochspezifisch in den Gewebeproben von Hoden und Nebenhoden der adulten Maus nachgewiesen werden (Abb. 4.4). In beiden Fällen waren

zwei Banden mit einer Größe von jeweils 406 bp und 474 bp zu erkennen. Abbildung 4.7 zeigt die Nukleotid- und kodierte Aminosäuresequenz der Ceacam17-cDNA.



**Abbildung 4.7 Nukleotid- und kodierte Aminosäuresequenz der Ceacam17-cDNA.** Mit Hilfe der Genom-Datenbank *Ensembl* konnte die gesamte Nukleotidsequenz für Ceacam17 ermittelt werden. Die Ceacam17-cDNA kodiert für ein Signalpeptid, eine N-, eine A1-, eine B-, eine A2-, sowie eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne. Die Exon-Intron-Grenzen werden durch den Wechsel von blauer und schwarzer Schriftfarbe symbolisiert. Die gelb unterlegte Sequenz zeigt das PCR-Produkt in einer Größe von 457 Nukleotidbasenpaaren, wobei der Strang- und der Gegenstrangprimer grau unterlegt sind. Die orange eingefärbten Triplets ATG und TAG stellen das Start- und das Stopcodon dar. Die in der Abbildung rot eingezeichneten Aminosäuren werden von Codonen kodiert, die durch Intronsequenzen "gespalten" sind.



Zur Untersuchung der Identität der PCR-Produkte wurden diese aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und entsprechend der modifizierten Methode nach Sanger im Strang- und Gegenstrang sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Abbildung 4.8 veranschaulicht die durch Auswertung der Sequenzierung gewonnenen Ergebnisse.

```

                L L S K P S I T S N R T T A V E G Q D T V E L
Ceacam17A1s CTCTCTTAAGCAAGCCCTCCATAACAAGCAACAGGACCCTGCTGTGGAGGGTCAAGACACTGTTGAGTT
Ceacam17A1  CTCTCTTAAGCAAGCCCTCCATAACAAGCAACAGGACCCTGCTGTGGAGGGTCAAGACACTGTTGAGTT
                L L S K P S I T S N R T T A V E G Q D T V E L

                T C E P P F Q K T T Y L W H L N G
Ceacam17A1s AACTTGCGAACCTCCCTTCCAGAAAACAAACTACCTGTGGCATCTAAACG-----
Ceacam17A1  AACTTGCGAACCTCCCTTCCAGAAAACAAACTACCTGTGGCATCTAAACGTAAGAAGCTTCACATTGGC
                T C E P P F Q K T T Y L W H L N G K K L H I G

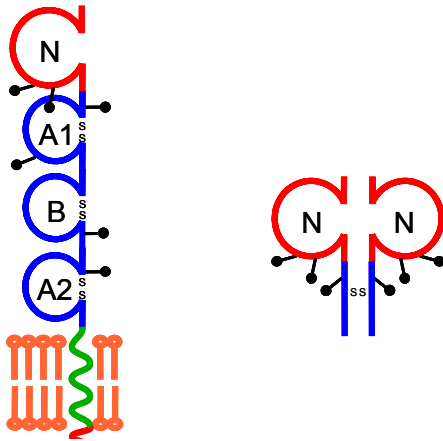
                L *
Ceacam17A1s -----GTCTCTAGGCATTTTCAGAGGAC
Ceacam17A1  GACCGCGTCGTCCTGTCTCGGGTAATGCAACTCTCACTTTGTTCAAGGTCCTTAGGCATTTTCAGAGGAC
                D R V V L S R G N A T L T L F K V S R H F R G

Ceacam17A1s ACTATGAGTGCGAAGCTAAGAACCCGCTGAGTGCCTTCCATAGTGACCCGTTCACTCTGGATGTTTTCT
Ceacam17A1  ACTATGAGTGCGAAGCTAAGAACCCGCTGAGTGCCTTCCATAGTGACCCGTTCACTCTGGATGTTTCT
                H Y E C E A K N P L S A F H S D P F T L D V F

```

**Abbildung 4.8 Alternatives Spleißen führt zu möglicher löslicher Ceacam17-Variante.** Die entstehenden Amplifikationsprodukte von *Ceacam17* wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend im Strang und Gegenstrang sequenziert. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Nukleotidsequenz von Exon 3, das für die A1-Domäne kodiert, für die lange Form von *Ceacam17* und die kürzere Spleißvariante. Zudem ist die Übersetzung der Triplets in die entsprechenden Aminosäuren dargestellt, wobei jedes zweite Triplet zur besseren Übersicht gelb unterlegt ist. Die charakteristischen Erkennungsstellen für das Spleißereignis in Form der Dupletts GT als *Donor* und AG als *Akzeptor* sind durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die durch die Deletion von 68 Nukleotiden entstehende Verschiebung des Leserasters führt zu einem Abbruch der Translation durch das Stopcodon TAG, das durch einen Stern markiert ist.

Das Ergebnis zeigt, dass die obere Bande mit einer Größe von 474 bp das erwartete Transkript des Gens darstellt, während die untere Bande mit einer Größe von 406 bp eine Spleißvariante ist. Die genaue Analyse der Nukleotidsequenz beweist, dass alternatives Spleißen im Exon 3 stattgefunden hat. Dieses kodiert für eine IgC-ähnliche A1-Proteindomäne. Die aus dem alternativen Spleißen resultierende Deletion von 68 Nukleotiden führt bei dem kleineren PCR-Produkt zu einer Verschiebung des offenen Leserasters (*frame shift*) und zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation durch das Stopcodon TAG (Abb. 4.8).



**Abbildung 4.9 Mögliche Dimerbildung der löslichen Ceacam17-Variante.** Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die Domänenstruktur der langen Form von CEACAM17 und auf der rechten Seite die mögliche Dimerbildung der verkürzten NA1'-Spleißvariante über Ausbildung einer Disulfidbrücke (zwei nebeneinander stehende S). Die IgV-ähnlichen Domänen werden dabei durch rote und die Subtypen der IgC-ähnlichen Domänen durch blaue Kreise symbolisiert. Die verkürzte A1-Domäne ist durch eine blaue Linie dargestellt.

Das dabei entstehende Protein setzt sich aus nur einer N-Domäne und einer auf 40 Aminosäuren verkürzten A1-Domäne zusammen. Durch die Veränderung der Molekülstruktur kommt es zu einem Verlust der Verankerung in der Zellmembran und zur Entstehung eines löslichen Proteins. Ein ungepaarter Cysteinrest der verkürzten A1-Domäne stellt möglicherweise den Ausgangspunkt für eine homophile Dimerisation unter Ausbildung einer Disulfidbrücke dar (Abb. 4.9).

## 5. Diskussion

### 5.1 Aussagekraft und Grenzen der RT-PCR beim Nachweis von Transkripten der CEA-Familie

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Expressionsmuster neu gefundener und bereits bekannter Mitglieder der murinen CEA-Familie mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Anhand der gewonnenen Ergebnisse lässt sich eine Aussage darüber machen, ob die betreffenden mRNAs unter den gewählten Versuchsbedingungen in den untersuchten Gewebeproben nachweisbar sind oder nicht. Durch die Verwendung genspezifischer Primer konnten die mRNAs der einzelnen Mitglieder der CEA-Familie mit einer hohen Genauigkeit differenziert und somit deren Verteilungsmuster gut miteinander verglichen werden. Als Beispiel sei die sichere Unterscheidung der sehr nahe verwandten *Psg30*- und *Psg31*-Transkripte aufgeführt. Durch Modifikationen der RT-PCR ist es zudem möglich, die Nachweisgrenze für eine in wenigen Kopien vorliegende mRNA-Spezies zu senken. So konnte im Falle der *Ceacam20*-mRNA erst durch eine Erhöhung der Anzahl der Amplifikationszyklen von 30 auf 35 ein PCR-Produkt sicher nachgewiesen werden. Nicht selten kommt es aber dabei zum Auftreten von mehreren Zusatzbanden, was die Spezifität stark einschränkt. Die Grenzen der Aussagekraft ergeben sich primär dadurch, dass durch die Verwendung der semiquantitativen RT-PCR nicht die genaue Menge an mRNA des betreffenden Mitglieds der CEA-Familie in den untersuchten Gewebeproben bestimmt werden kann. Eine Möglichkeit hierzu bietet die *real-time*-PCR, zum Beispiel unter Verwendung des Lightcycler-Gerätes. Bei dieser Methode wird der zu untersuchenden Probe ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der in die doppelsträngige DNA interkalieren kann. Dieser Farbstoff emittiert im gebundenen Zustand und nach spezifischer Anregung Licht einer definierten Wellenlänge. Dieses wird von einer Photozelle innerhalb des Gerätes registriert und gemessen. Die Intensität hängt dabei von der Menge des gebundenen Farbstoffs und damit vom Gehalt der doppelsträngigen DNA ab. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, dass man durch die Verwendung von Organgewebeproben ein Gemisch von RNAs unterschiedlicher Zellpopulationen untersucht. So können in der Regel RNAs von Epithel-, Endothel- und Mesenchymzellen gefunden werden. Es lässt sich daher keine Aussage darüber machen, in welcher Zellart die einzelnen Mitglieder der murinen CEA-Familie exprimiert werden. Die genaue Lokalisation wäre jedoch für die Untersuchung möglicher

biologischer Funktionen von großer Wichtigkeit. In diesem Punkt ist die *in situ*-Hybridisierung der RT-PCR überlegen.

## 5.2 Mögliche Funktion des löslichen CEACAM10 als *decoy*-Rezeptor für verschiedene Pathogene

Übereinstimmend mit den Versuchsergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen (Turbide *et al.*, 1991; McCuaig *et al.*, 1993; Godfraind *et al.*, 1995) konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass *Ceacam1* ein sehr breites Expressionsmuster aufweist. Dessen Transkripte waren in nahezu allen untersuchten Gewebeproben zu finden (Abb. 4.4). Zudem macht das Vorhandensein von orthologen Genen in Mensch und Maus *Ceacam1* zu einem besonders interessanten Mitglied der CEA-Familie. Das nahezu übereinstimmende Expressionsmuster des humanen und murinen *Ceacam1* deutet auf eine gut konservierte und im Laufe der Evolution nur wenig veränderte Funktion hin (McCuaig *et al.*, 1993; Prall *et al.*, 1996; Zebhauser *et al.*, 2005). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CEACAM1 über zwei phosphorylierbare Tyrosinreste, die Teile eines regulatorischen ITIM-Motivs innerhalb der langen zytoplasmatischen Domäne sind, die Aktivierung und Proliferation von CD4 positiven T-Lymphozyten negativ beeinflusst und damit maßgeblich an der Steuerung der Immunantwort beteiligt ist (Boulton und Gray-Owen, 2002; Nakajima *et al.*, 2002; Chen und Shively, 2004). Aufgrund dieser Tatsache und dem Vorhandensein auf der Oberfläche vieler Epithelien, wie zum Beispiel des Gastrointestinaltrakts, stellt CEACAM1 einen idealen Rezeptor für Pathogene dar. Zu diesen zählen das MHV (murines Hepatitisvirus), verschiedene *Neisseria*-Spezies, das *Haemophilus influenzae* und die *Moraxella catarrhalis* (Virji *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002; Hill und Virji, 2003). Die Andockung der unterschiedlichen Pathogene an das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wird über dessen N-Domäne vermittelt (Virji *et al.*, 1999; Thackray *et al.*, 2005). Diese Tatsache erklärt die im Vergleich zur A1-Domäne (Sequenzidentität von 61 %) geringe Sequenzähnlichkeit von nur 45 % auf Proteinebene für die N-Domäne zwischen Mensch und Maus (Zebhauser *et al.*, 2005). Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der schnellen Koevolution von Wirtsorganismus und dem zugehörigen Pathogen. Als besonders interessant ist zu erwähnen, dass *Ceacam10* ein ähnlich breites Expressionsmuster wie *Ceacam1* aufweist. In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen konnten *Ceacam10*-Transkripte vorwiegend im unteren Gastrointestinal-

und im Urogenitaltrakt nachgewiesen werden (Abb. 4.4; Keck *et al.*, 1995; Kataoka *et al.*, 2000; Finkenzeller *et al.*, 2003). Die nahezu identische Gewebeverteilung von *Ceacam10* und *Ceacam1* lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Konservierung der Sequenz der Promotorregion und des ersten Exons zwischen den beiden fast 95 % beträgt (Nedellec *et al.*, 1995; Keck *et al.*, 1995). Zudem wird vermutet, dass *Ceacam10* durch eine Genduplikation eines, dem *Ceacam1* verwandten Vorfahren, vor der Trennung von Maus und Ratte entstanden ist. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der N1-Domäne könnte CEACAM10 über eine heterophile Interaktion als Ligand für CEACAM1 oder als kompetitiver löslicher Rezeptor für einige pathogene Bakterien und Viren fungieren und so die Bindung an das membrangebundene CEACAM1 und die mögliche Gewebeinvasion verhindern.

### 5.3 Möglicher Einfluss von CEACAM17 auf die Fertilität

Interessanterweise konnten *Ceacam17*-Transkripte nur im Gewebe des Hodens und des Nebenhodens nachgewiesen werden (Abb. 4.4). Diese hohe Spezifität des Expressionsmusters lässt vermuten, dass CEACAM17 eine bedeutende Funktion für die Fertilität der Nagetiere hat. Einen ersten wichtigen Hinweis liefern die Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen, die belegen, dass PSG17, ein lösliches Mitglied der CEA-Familie, als Ligand für das integrale Membranprotein CD9 fungiert (Waterhouse *et al.*, 2002; Ellerman *et al.*, 2003). Das Tetraspanin CD9 wird auf der Oberfläche von Oozyten exprimiert und ist maßgeblich an der Verschmelzung von murinen Spermien und Eizellen beteiligt (Miyado *et al.*, 2000). Dieser Umstand wird durch die Beobachtung bestätigt, dass weibliche Mäuse, denen beide Allele für *Cd9* fehlen, unfruchtbar sind und deren Oozyten nicht mit Spermien interagieren können (Kaji *et al.*, 2000; Le Naour *et al.*, 2000). Die hohe Gewebespezifität von CEACAM17 und die deutliche Sequenzähnlichkeit mit PSG17 lassen den Schluss zu, dass CEACAM17 möglicherweise als Spermienrezeptor für das Membranprotein CD9 auf Oozyten fungiert. Diese Vermutung könnte durch Fertilitätstests mit Mäusen, denen beide Allele für *Ceacam17* fehlen, überprüft werden.

#### 5.4 Mögliche Funktionen der plazentaspezifisch exprimierten Mitglieder der CEA-Familie bei der Embryogenese

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass die meisten der nagerspezifischen Gene (*Ceacam9*, *Ceacam11*, *Ceacam12*, *Ceacam13*, *Ceacam14*, *Ceacam15*, *Psg17*, *Psg30* und *Psg31*) mit Ausnahme von *Ceacam17* vorwiegend im Laufe der Embryogenese in der Plazenta exprimiert werden (Abb. 4.5). Dieser Umstand wird durch die Beobachtung von Kromer *et al.* bestätigt, dass die Transkripte der murinen *Psg*-Gene in den Trophoblastriesenzellen und den Spongiotrophoblasten zu finden sind (Kromer *et al.*, 1996). Die Suche nach möglichen biologischen Funktionen der korrespondierenden Proteine führt zu der Frage, inwieweit die Art der Plazentation eine Rolle dabei spielt. So können zwischen den verschiedenen Spezies und selbst zwischen sehr nahe verwandten Arten große Unterschiede in der Entstehungsart und Gestaltung der Plazenta auftreten (Leiser und Kaufmann, 1994). Die unterschiedlichen Plazentaformen können nach dem Grad des Abbaus des mütterlichen Gewebes an der Implantationsstelle des fötalen Trophoblasten in drei Gruppen eingeteilt werden: in die epitheliochoriale, die endotheliochoriale und die hämochoriale Plazenta. Primaten (z.B. Mensch) und Nager (z.B. Maus und Ratte) besitzen eine hämochoriale Plazenta, was bedeutet, dass der fötale Trophoblast als äußerste Schicht direkt mit dem mütterlichen Blutkreislauf in Kontakt ist. Es stellt sich hierbei jedoch die Frage, warum ein Fötus, der für das mütterliche Immunsystem fremde paternale Antigene präsentiert, nicht abgestoßen wird. Einen ersten wichtigen Anhaltspunkt lieferten die Ergebnisse von *in vitro*-Experimenten, die belegen konnten, dass die PSGs eine inhibitorische Wirkung auf die Stimulation von Lymphozyten und immunsuppressive Eigenschaften in einer *mixed lymphocyte reaction* aufweisen (Cerni *et al.*, 1977; Majumdar *et al.*, 1982; Bebo und Dveksler, 2005). Das nahezu übereinstimmende und auf die Plazenta beschränkte Expressionsmuster der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Mitglieder der *Psg*-Subgruppe spricht dafür, dass die Genprodukte eine ähnliche biologische Funktion ausüben (Abb. 4.5). Zudem besitzen sie eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit, die sich durch die Multiplikation ganzer Gene erklären lässt. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass einige PSGs mit dem Oberflächenrezeptor CD9 auf Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems an der Schnittstelle zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf interagieren und auf diese Weise die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-4 und IL-10, begünstigen (Wessells *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2005). Diese sind charakteristisch für eine humorale T<sub>H</sub>2-Immunantwort, die sich positiv auf den

Verlauf einer Schwangerschaft auswirkt (Wegmann *et al.*, 1993; Motran *et al.*, 2003). Dieser Umstand lässt den Schluss zu, dass die Mitglieder der PSG-Subgruppe einen wichtigen Einfluss auf die Modulation des mütterlichen Immunsystems haben. So konnten Arnold *et al.* zeigen, dass bei Frauen mit wiederholten spontanen Aborten ein Mangel an von aktivierten Monozyten gebildetem IL-10 zu beobachten war (Arnold *et al.*, 1999). Der Wechsel einer überwiegend zellvermittelten T<sub>H</sub>1-Immunreaktion zu einer humoralen T<sub>H</sub>2-Antwort lässt sich zudem daran erkennen, dass sich manche Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel die rheumatoide Arthritis, in der Schwangerschaft bessern (Fialova *et al.*, 1991). Die Abwehr von Pathogenen, die über den angeborenen, unspezifischen Teil des Immunsystems vermittelt wird, ist davon nicht beeinträchtigt (Sacks *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die untersuchten mRNAs von Ceacam11, Ceacam12, Ceacam13 und Ceacam14 ein ähnliches Gewebeverteilungsmuster aufweisen wie die mRNAs von Psg17, Psg30 und Psg31. Transkripte dieser Mitglieder der *Ceacam*-Subgruppe können vorwiegend in den späten Stadien der Embryonalentwicklung ab Tag 12 in der Plazenta beobachtet werden (Abb. 4.5; Kataoka *et al.*, 2000). Dieser Umstand und die ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit den PSGs (Abb. 1.3 und Abb. 1.4) lassen den Schluss zu, dass die von *Ceacam11-Ceacam14* kodierten Proteine möglicherweise auch an der Steuerung des mütterlichen Immunsystems während der Schwangerschaft beteiligt sind. Analysen auf Proteinebene haben jedoch ergeben, dass den CEACAM11-CEACAM14-Molekülen im Gegensatz zu den PSGs eine IgC-ähnliche Domäne am C-terminalen Ende fehlt. Diese ist bei allen PSGs der Nagetiere vorhanden und stellt aufgrund der hohen Konservierung wahrscheinlich einen funktionstragenden Strukturteil dar.

## **5.5 Möglicher Einfluss von CEACAM18 und CEACAM20 auf die Entstehung und das Wachstum epithelialer Tumore**

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass die Transkripte von *Ceacam18* und *Ceacam20* vorwiegend im unteren Gastrointestinaltrakt und in geringerem Maße auch im Hoden und im Thymus zu finden sind (Abb. 4.4). Dieses Expressionsmuster und die Anwesenheit einer ITAM-Konsensussequenz in CEACAM20 und einer Transmembransequenz in CEACAM18, die eine Assoziation mit ITAM-tragenden Adaptermolekülen erlaubt, liefern einen ersten Hinweis, dass diese beiden Mitglieder der CEA-Familie möglicherweise funktionell an der Proliferation und Differenzierung der

intestinalen Epithelzellen beteiligt sind. Interessanterweise konnten Ceacam18- und Ceacam20-mRNAs zudem in primären Adenokarzinomen des Magens und im Falle von Ceacam20 auch in den exemplarisch untersuchten Brusttumoren nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch einige andere Mitglieder der humanen und murinen CEA-Familie, wie zum Beispiel CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6, eine Überexpression in verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs zeigen. Zu diesen zählen das Adenokarzinom der Lunge, des Magens, des Kolon und des Pankreas (Baranov *et al.*, 1994; Kinugasa *et al.*, 1998; Laack *et al.*, 2002; Jantscheff *et al.*, 2003; Duxbury *et al.*, 2004). Im Falle des malignen Melanoms ist CEACAM1 vorwiegend im invasiven Ausbreitungsgebiet des Primärtumors und in den metastatischen Läsionen zu finden, was für eine direkte funktionelle Beteiligung an der malignen Transformation sprechen würde (Thies *et al.*, 2002; Ebrahimnejad *et al.*, 2004). In der Tat konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen durch *in vitro*-Versuche belegt werden, dass neben CEACAM1 auch CEACAM5 und CEACAM6 maßgeblich an der Entstehung von epithelialen Neoplasien und der tumorassoziierten Gefäßneubildung beteiligt sind (Ordonez *et al.*, 2000; Soeth *et al.*, 2001; Ilantzis *et al.*, 2002; Duxbury *et al.*, 2004; Blumenthal *et al.*, 2005). Die genauen Mechanismen dafür sind jedoch noch nicht bekannt.

Interessanterweise konnte anhand von ausführlichen Analysen auf Nukleotid- und Proteinebene mit Hilfe der Genom-Datenbank *Ensembl* gezeigt werden, dass es innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 eine zwischen Mensch und Maus stark konservierte Sequenz eines möglicherweise funktionellen ITAM-Motivs gibt (Zebhauser *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu besitzt das murine CEACAM18 in seiner Transmembrandomäne eine im Vergleich zum humanen CEACAM18 veränderte Aminosäure, ein Arginin, das eine Interaktion mit einem ITAM-tragenden Adaptermolekül, wie zum Beispiel dem DAP12, ermöglicht (Vivier *et al.*, 2004; Horejsi *et al.*, 2004; Zebhauser *et al.*, 2005). ITAM-tragende Proteine werden, bis auf wenige Ausnahmen, fast ausschließlich in Zellen des hämatopoetischen Systems gefunden (Cambier, 1995; Haks *et al.*, 2001). Sie sind dort maßgeblich an der Weiterleitung aktivierender Signale beteiligt. Ursächlich hierfür ist die ATP-abhängige Phosphorylierung zweier Tyrosinreste innerhalb dieses regulatorischen ITAM-Motivs (Johnson *et al.*, 1995). Auf diesem Wege kommt es zum Beispiel zur Stimulation der B-Zellen, die über die ITAM-tragenden Iga- und Igβ-Untereinheiten des BCR (*B-cell receptor*) vermittelt wird (Fuentes-Panana *et al.*, 2004). In Epithelzellen konnten bisher nur wenige Proteine mit ITAM-Motiven charakterisiert und funktionell untersucht werden. Interessanterweise konnte erst kürzlich anhand von *in vitro*-Versuchen



gezeigt werden, dass eine Reihe von Proteinen viralen Ursprungs, wie zum Beispiel das Env-Glykoprotein des MMTV (*mouse mammary tumor virus*) oder das LMP2A (*latent membrane protein 2A*) des Epstein-Barr-Virus, über ein funktionelles ITAM-Motiv am Transformationsprozess von Epithelzellen beteiligt sind (Katz *et al.*, 2005; Morrison und Raab-Traub, 2005; Grande *et al.*, 2006). Diese Eigenschaft scheint jedoch nicht nur auf ITAM-Motive innerhalb viraler Proteine beschränkt zu sein. So konnten Grande *et al.* Ende letzten Jahres in weiterführenden Experimenten zeigen, dass die Überexpression ITAM-tragender Proteine des BCR ebenfalls zu einer Transformation von Epithelzellen, in diesem Falle von Brustepithelzellen, führt (Grande *et al.*, 2005). Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass CEACAM18 und CEACAM20 möglicherweise ebenfalls wachstumsstimulierende Eigenschaften besitzen und durch Hochregulation in epithelialen Tumoren aktiv am malignen Geschehen beteiligt sind. Dafür spricht die Überexpression der Ceacam18- und Ceacam20-mRNA in den, in dieser Arbeit untersuchten, Magen- und Brusttumoren der Maus.

## **5.6 Ausblick: Weiterführende Untersuchungen an der CEA-Familie von Mensch und Maus und klinische Anwendungsmöglichkeiten**

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Versuchsergebnisse geben erstmalig einen Überblick über das Expressionsverhalten der neuen Mitglieder der murinen CEA-Genfamilie im Vergleich zu den schon bekannten. Von besonderem Interesse sind dabei vor allem *Ceacam16*, *Ceacam18*, *Ceacam19* und *Ceacam20*, für die es ein orthologes Gegenstück im menschlichen Genom gibt. Weiterführende Untersuchungen werden darauf ausgerichtet sein, die genaue Lokalisation der Proteine im Zellverbund zu bestimmen, um auf diesem Wege eventuell detailliertere Kenntnisse über deren biologische Funktion zu erhalten. So wird gegenwärtig versucht, mit Hilfe der Hybridomtechnologie geeignete monoklonale Antikörper zu generieren, die gegen die verschiedenen Mitglieder der CEA-Familie gerichtet sind. Diese Antikörper könnten dann für die Immunhistochemie an Gewebeschnitten verwendet werden. Es wird hierbei jedoch vorausgesetzt, dass die mit Hilfe der RT-PCR gefundenen Transkripte auch in ein funktionsfähiges Protein umgeschrieben werden. Erste Erfolge der Antikörpergewinnung im Rahmen einer genetischen Immunisierung konnten bereits für das humane CEACAM20 erzielt werden (Andreas Eisenried, unveröffentlichte

Daten). Eine Methode für die genaue Analyse der Zellexpression auf RNA-Ebene ist die *in situ*-Hybridisierung unter Verwendung von spezifischen RNA-Sonden.

Wie bereits erwähnt, gibt es eine Reihe von Mitgliedern aus der CEA-Familie, deren Expressionsmuster auf der Zelloberfläche sich im Verlaufe einer malignen Transformation verändert. Nicht selten sind diese, wie zum Beispiel CEACAM5 und CEACAM6, maßgeblich an der Entstehung eines epithelialen Tumors und der Metastasierung beteiligt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Versuchsergebnisse lassen vermuten, dass auch einige der neu gefundenen Mitglieder der CEA-Familie, wie zum Beispiel die murinen, in Tumoren epithelialen Ursprungs hochregulierten Ceacam18 und Ceacam20 einen Einfluss auf die Tumorgenese haben. Es wäre daher von großem Interesse zu klären, ob dies auch für die orthologen Gegenstücke im Menschen zutrifft. Erste Ergebnisse zeigen, dass *CEACAM20*-Transkripte in drei von vier untersuchten Prostatakarzinomproben nachweisbar sind, was für eine mögliche Beteiligung an der Tumorentstehung sprechen kann (Andreas Eisenried, unveröffentlichte Daten). Im Falle einer Bestätigung dieser Vermutung durch Funktionstests auf Proteinebene, könnte versucht werden, monoklonale Antikörper zu entwickeln, die spezifisch gegen CEACAM20 auf der Oberfläche von Tumorzellen gerichtet sind. Auf diesem Wege wäre es denkbar, die transformierenden Mechanismen, die über das ITAM-Motiv des CEACAM20 vermittelt werden, zu blockieren. Die Wirkungsweise eines ähnlichen Ansatzes konnte bereits für ein anderes Mitglied der CEA-Familie, nämlich CEACAM1, gezeigt werden. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen CEACAM1 auf der Oberfläche von Endothelzellen wurde der Versuch unternommen, die tumorassoziierte Neoangiogenese, zum Beispiel beim Harnblasenkarzinom, zu unterbinden (Oliveira-Ferrer *et al.*, 2004). Außerdem wird gegenwärtig untersucht, ob die Fähigkeit von CEACAM1, positiv auf die Ausbildung von Kollateralgefäßen einzuwirken, bei der Therapie der Koronarstenose Anwendung finden kann (Wagener und Ergün, 2000).

## 6. Zusammenfassung

Tumoren gehören neben Herz- und Kreislauferkrankungen zu den häufigsten Todesursachen bei beiden Geschlechtern. Neben den bereits gut etablierten Behandlungsmethoden, wie der Tumorchirurgie, der Radio- oder Chemotherapie, erzielt der Einsatz von so genannten *small molecular drugs* erste klinische Erfolge. Zudem findet die Immuntherapie unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern immer breitere Anwendung. Als mögliche Zielstrukturen konnten Moleküle identifiziert werden, die funktionell an der Tumorentstehung beteiligt und oftmals auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden sind. Zu diesen zählen neben den Proteintyrosinkinaserzeptoren auch das als Tumormarker bekannte karzinoembryonale Antigen (CEA oder CEACAM5). Das CEA gehört zu einer Gruppe von strukturell nahe verwandten Oberflächenmolekülen und sezernierten Proteinen, die an einer Reihe von normalen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. So dienen sie als Rezeptor für einige pathogene Bakterien und Viren, wie zum Beispiel die Opa-Oberflächenproteine von *Neisseria gonorrhoeae*. Die löslichen PSGs dagegen sind maßgeblich an der Steuerung der Immunantwort während der Schwangerschaft beteiligt.

Durch vergleichende Analysen von Genom-, cDNA- und EST-Datenbanken konnten neue Mitglieder der murinen CEA-Familie gefunden werden, die nun genauer charakterisiert werden sollten. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Expressionsverhalten dieser neuen Mitglieder der CEA-Familie auf mRNA-Ebene in einer Vielzahl von embryonalen und adulten Normalgeweben, sowie in einigen ausgewählten Tumoren und Tumorzelllinien mit Hilfe der RT-PCR unter Verwendung von genspezifischen Primern untersucht.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse hat gezeigt, dass es erhebliche Unterschiede in der Gewebeverteilung der einzelnen Mitglieder der murinen CEA-Familie gibt. *Ceacam1*- und *Ceacam10*-mRNAs waren mit einigen wenigen Ausnahmen in nahezu allen untersuchten Geweben zu finden, während Transkripte von *Ceacam2*, *Ceacam12*, *Ceacam13* und *Ceacam17* sehr gewebespezifisch nachweisbar waren. Eine Mittelstellung nehmen dabei *Ceacam18*, *Ceacam19* und *Ceacam20* ein. Interessanterweise gibt es eine Reihe von Mitgliedern aus der CEA-Familie (*Ceacam9*, *Ceacam11*, *Ceacam12*, *Ceacam13*, *Ceacam14*, *Ceacam15*, *Psg17*, *Psg30* und *Psg31*), die fast ausschließlich in den unterschiedlichen plazentaren Entwicklungsstadien exprimiert werden. Es wird vermutet, dass einige von ihnen eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation während der Schwangerschaft spielen. Die einzelnen Vertreter der murinen CEA-Familie zeigen ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten in den untersuchten epithelialen Tumoren und den davon abgeleiteten Zelllinien.

Während *Ceacam1*- und *Ceacam10*-Transkripte weit verbreitet sind, konnten die mRNAs von *Ceacam2* und *Psg17* nur in der Kolontumorzelllinie CT36 gefunden werden. Von besonderem Interesse waren *Ceacam18* und *Ceacam20*, für die es ein orthologes Gegenstück im menschlichen Genom gibt. Beide konnten vorwiegend in Adenokarzinomen des Magens und im Falle des *Ceacam20* auch in den exemplarisch untersuchten primären Brusttumoren nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass CEACAM20 und CEACAM18 möglicherweise über ein funktionelles ITAM-Motiv oder die Interaktion mit ITAM-tragenden Adaptermolekülen direkt an der Entstehung epithelialer Neoplasien beteiligt sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können als Grundlage für nachfolgende strukturelle und funktionelle Untersuchungen der neuen Mitglieder der murinen und humanen CEA-Familie gesehen werden. Von zentralem Interesse in diesem Zusammenhang ist hierbei die Frage, ob sich CEACAM18 oder CEACAM20 als Zielstrukturen für eine Antikörper-vermittelte Immuntherapie verwenden lassen.

## 7. Literaturverzeichnis

Alves, F. und Hiddemann, W. (1997) Tyrosinkinaseinhibitoren: Ein Ansatz zur pathogeneseorientierten Tumorthherapie. *Internist*, **38**, 1074-82.

Arnold, L.L., Doherty, T.M., Flor, A.W., Simon, J.A., Chou, J.Y., Chan, W.Y. and Mansfield, B.C. (1999) Pregnancy-specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potential correlation to interleukin-10 expression. *Am J Reprod Immunol*, **41**, 174-82.

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.

Arora, A. and Scholar, E.M. (2005) Role of tyrosine inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, **315**, 971-79.

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

Baranov, V., Yeung, M.M.W. and Hammarström, S. (1994) Expression of CEA and nonspecific cross-reacting 50 kD antigen in human normal and cancerous colon mucosa: comparative ultrastructural study with monoclonal antibodies. *Cancer Res*, **54**, 3305-14.

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**, 83-89.

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.

Barth, S., Winkler, U., Diehl, V. und Engert, A. (1997) Immuntoxine: Wirkungsweise und Einsatz bei malignen Erkrankungen. *Internist*, **38**, 1063-69.

Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A. and Stanners, C.P. (1989) Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol*, **7**, 3221-30.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G.S., 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.M. and Zimmermann, W. (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res*, **252**, 243-49.

Bebo, B.F. Jr. and Dveksler, G.S. (2005) Evidence that pregnancy specific glycoproteins regulate T-cell function and inflammatory autoimmune disease during pregnancy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **4**, 231-37.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K. and Stanners, C.P. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, **57**, 327-34.

Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-65.

- 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.
- Böhm, M.K., Mayans, M.O., Thornton, J.D., Begent, R.H., Keep, P.A. and Perkins, S.J. (1996) Extended glycoprotein structure of the seven domains in human carcinoembryonic antigen by X-ray and neutron solution scattering and an automated curve fitting procedure: implications for cellular adhesion. *J Mol Biol*, **259**, 718-36.
- Bohn, H. (1971) Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placenta and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. *Arch Gynakol*, **210**, 440-57.
- 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**, 622-29.
- 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., Tynan, K.T., Olsen, A.S., Mohrenweiser, 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 hybridisation. *Genomics*, **12**, 773-79.
- Cambier, J.C. (1995) New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today*, **16**, 110.
- 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.
- Carney, E.W., Prideaux, V., Lye, S.J. and Rossant, J. (1993) Progressive expression of trophoblast-specific genes during formation of mouse trophoblast giant cells in vitro. *Mol Reprod Dev*, **34**, 357-68.
- Cerni, C., Tatra, G. and Bohn, H. (1977) Immunosuppression by human placenta lactogen (HPL) and the pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP-1). Inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation. *Arch Gynakol*, **223**, 1-7.
- Chan, C.H.F and Stanners, C.P. (2004) Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol Ther*, **9**, 775-85.
- Chen, C.J. and Shively, J.E. (2004) The cell-cell adhesion molecule carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 inhibits IL-2 production and proliferation in human T cells by association with Src homology protein-1 and downregulates IL-2 receptor. *J Immunol*, **172**, 3544-52.
- 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 T cell function. *J Immunol*, **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**, 17413-19.

- Chevinsky, A.H. (1991) CEA in tumors of other than colorectal origin. *Semin Surg Oncol*, **7**, 162-66.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA-isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-59.
- 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 of 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.
- Daniels, E., Letourneau, S., Turbide, C., Kuprina, N., Rudinskaya, T., Yazova, A.C., Holmes, K.V., Dveksler, G.S. and Beauchemin, N. (1996) Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption, and myogenesis. *Dev Dyn*, **206**, 272-90.
- Donda, A., Mori, L., Shamshiev, A., Carena, I., Mottet, C., Heim, M.H., Beglinger, C., Grunert, F., Rochlitz, C., Terracciano, L., Jantschkeff, P. and De Libero, G. (2000) Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur J Immunol*, **30**, 2593-603.
- Druker, B.J. (2004) Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*, **91**, 1-30.
- Duxbury, M.S., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W. and Wang, E.E. (2004) CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and *in vivo* metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, **23**, 465-73.
- Dveksler, G.S., Dieffenbach, C.W., Cardellichio, C.B., McCuaig, K., Pensiero, M.N., Jiang, G.S., Beauchemin, N. and Holmes, K.V. (1993a) Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus A-59. *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**, 1781-87.
- Edlund, M., Gaardsvoll, H., Bock, E. and Öbrink, B. (1993) Different isoforms of stock-specific variants of the cell adhesion molecule C-CAM (cell CAM 105) in rat liver. *Eur J Biochem*, **213**, 1109-16.
- Ehrlich, P. (1900) On immunity with special reference to cell life. *Proc Royal Soc London*, **66**, 424-48.
- 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.
- Engert, A., Diehl, V., Schnell, R., Radszuhn, A., Hatwig, M.T., Drillich, S., Schön, G., Bohlen, H., Tesch, H., Hansmann, M.L., Barth, S., Schindler, J., Ghetie, V., Uhr, J. and Vitetta, E. (1997) A phase-1 study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **89**, 403-10.
- Engert, A., Schnell, R., Barth, S. und Diehl, V. (1997) Immuntherapeutische Strategien bei Lymphomen. *Internist*, **38**, 150-56.

- Fialova, L., Kohoutova, B., Peliskova, Z., Malbohan, I. and Mikulikova, L. (1991) Serum levels of trophoblast-specific beta-1-globulin (SP1) and alpha-1-fetoprotein (AFP) in pregnant women with rheumatoid arthritis. *Cesk Gynekol*, **56**, 166-70.
- 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.
- Finkenzeller, D., Fischer, B., Lutz, S., Schrewe, H., Shimizu, T. and Zimmermann, W. (2003) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10 expressed specifically early in pregnancy in the decidua is dispensable for normal murine development. *Mol Cell Biol*, **23**, 272-79.
- Frängsmyr, 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.
- Frisch, S.M. and Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, **124**, 619-26.
- Fuentes-Panana, E.M., Bannish, G., Shah, N. and Monroe, J.G. (2004) Basal Igalpha/Igbeta signals trigger the coordinated initiation of pre-B cell antigen receptor-dependent processes. *J Immunol*, **173**, 1000-11.
- Giles, F.J., Cortes, J.E. and Kantarjian, H.M. (2005) Targeting the kinase activity of the BCR-ABL fusion protein in patients with chronic myeloid leukemia. *Curr Mol Med*, **5**, 615-23.
- Godfraind, C., Langreth, S.G., Cardellichio, C.B., Knobler, R., Coutelier, J.P., Dubois-Dalq, M. and Holmes, K.V. (1995) Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest*, **73**, 615-27.
- 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 staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest*, **23**, 338-51.
- Gramatzki, M. und Valerius, T. (1997) Antikörper als spezifische Tumorthapeutika. *Internist*, **38**, 1055-62.
- Grande, S.M., Katz, E., Crowley, J.E., Bernardini, M.S., Ross, S.R. and Monroe, J.G. (2005) Cellular ITAM-containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells. *Oncogene*, **24**, Epub ahead of print.
- 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**, 614-18.
- 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.



- 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, PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. *J Leukoc Biol*, **77**, 948-57.
- Haks, M.C., Cordaro, T.A., van den Brakel, J.H.N., Haanen, J.B.A.G., de Vries, E.F.R., 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.
- Hau, J., Gidley-Baird, A.A., Westergaard, J.G. and Teisner, B. (1985) The effect on pregnancy of intrauterine administration of antibodies against two pregnancy-associated murine proteins: murine pregnancy-specific beta 1-glycoprotein and murine pregnancy-associated alpha 2-glycoprotein. *Biomed Biochem Acta*, **44**, 1255-59.
- Hauck, C.R., Meyer, T.F., Lang, F. and Gulbins, E. (1998) CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J*, **17**, 443-54.
- Hauck, C.R., Gulbins, E., Lang, F. and Meyer, T.F. (1999) Tyrosine phosphatase SHP-1 is involved in CD66-mediated phagocytosis of Opa52-expressing *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, **67**, 5490-94.
- 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.
- Hefta, S.A., Hefta, L.J.F., 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.
- 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.
- Hofstetter, R.B., Augustus, L.B., Mankarios, R., Chi, D., Fan, D., Toth, C., Thomas, P. and Jessup, J.M. (1990a) Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastases. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 380-85.
- Horejsi, V., Zhang, W. and Schraven, B. (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 603-16.
- 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.
- Huober, J., Jackisch, C., Untch, M., Mobus, V., Wallwiener, D., Kaufmann, M. and Minkwitz, G. (2006) Adjuvant therapy with trastuzumab (Herceptin) in primary breast cancer. *Zentralbl Gynakol*, **128**, 30-37.

- Iliantzis, C., DeMarte, 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.
- Imakiire, T., Kuroki, M., Shibaguchi, H., Yamauchi, Y., Ueno, A., Hirose, Y., Yamada, H., Yamashita, Y., Shirakusa, T., Ishida, I. and Kuroki, M. (2004) Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. *Int J Cancer*, **108**, 564-70.
- 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.
- Jazirehi, A.R. and Bonavida, B. (2005) Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in Non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*, **24**, 2121-43.
- Johnson, S.A., Pleiman, C.M., Schneringer, J., Hippen, K. and Cambier, J.C. (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol*, **155**, 4596-603.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S and Kudo, A. (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat Genet*, **24**, 279-82.
- 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.
- Karalus, R. and Campagnari, A. (2000) *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect*, **2**, 547-59.
- 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**, 610-14.
- 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.
- Keck, U., Nedellec, P., Beauchemin, N., Thompson, J.A. and Zimmermann, W. (1995) The cea10 gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow. *Eur J Biochem*, **229**, 455-64.
- 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 related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*, **52**, 718-25.
- Kinugasa, T., Kuroki, M., Takeo, H., Matsuo, Y., Ohshima, K., Yamashita, Y., Shirakusa, T. and Matsuoka, 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.

- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, **256**, 495-97.
- Kromer, B., Finkenzeller, D., Wessells, 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**, 280-87.
- Laack, E., Nikbakht, H., Peters, A., Kugler, C., Jasiewicz, Y., Edler, L., Brümmer, J., Schumacher, U. and Hossfeld, D.K. (2002) Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol*, **20**, 4279-84.
- leCoutre, P., Mologni, L., Cleris, L., Marchesi, E., Buchdunger, E., Giardini, R., Formelli, F. and Gambacorti-Passerini, C. (1999) In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 163-68.
- Leiser, R. and Kaufmann, P. (1994) Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, **102**, 122-34.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, **287**, 319-21.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Dührsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M. and Hiddemann, W. (2005) Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol*, **23**, 1984-92.
- Leonard, J.P. (2005) Targeting CD20 in follicular NHL: novel anti-CD20 therapies, antibody engineering, and the use of radioimmunoconjugates. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 335-39.
- 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**, 2051-57.
- Levitzi, A. and Gazit, A. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, **267**, 1782-88.
- Lin, T.M., Halbert, S.P. and Spellacy, W.N. (1974) Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation. *J Clin Invest*, **54**, 576-82.
- Lucas, K., Busch, M., Mossinger, S. and Thompson, J.A. (1991) An improved microcomputer program for finding gene- or gene family-specific oligonucleotides suitable as primers for polymerase chain reactions or as probes. *Comput Appl Biosci*, **7**, 525-29.
- Majumdar, S., Bapna, B.C., Mapa, M.K., Gupta, A.N., Devi, P.K. and Subrahmanyam, D. (1982) Pregnancy specific proteins: suppression of in vitro blastogenic response to mitogen by these proteins. *Int J Fertil*, **27**, 66-69.
- Maloney, D.G. (2005) Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets. *Semin Oncol*, **32**, 19-26.

- Markel, G., Wolf, D., Hanna, J., Gazit, R., Goldman-Wohl, D., Lavy, Y., Yagel, S. and Mandelboim, O. (2002) Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J Clin Invest*, **110**, 943-53.
- Maxwell, P. (1999) Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br J Biomed Sci*, **56**, 209-14.
- McCaw, S.E., Schneider, E., Liao, E.H., Zimmermann, W. and Gray-Owen, S.D. (2003) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the 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.
- McCuaig, K., Rosenberg, M., Nedellec, P., Turbide, C. and Beauchemin, N. (1993) Expression of the Bgp gene and characterization of mouse colon biliary glycoprotein isoforms. *Gene*, **127**, 173-83.
- 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.
- 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**, 321-24.
- 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.
- Motran, C.C., Lopez Diaz, F., Montes, C.L., Bocco, J.L. and Gruppi, A. (2003) *In vivo* expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a induces alternative activation of monocytes and enhances TH2-type immune response. *Eur J Immunol*, **33**, 3007-16.
- Nakajima, A., Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Nieuwenhuis, E.E., Raychowdhury, R., Glickman, J., Blau, D.M., Russell, S., Holmes, K.V. and Blumberg, R.S. (2002) Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J Immunol*, **168**, 1028-35.
- Nedellec, P., Turbide, C. and Beauchemin, N. (1995) Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein 1 gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur J Biochem*, **231**, 104-14.
- Ng, S.Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. and Kedes, L. (1985) Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: Conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol Cell Biol*, **5**, 2720-32.
- Öbrink, B. (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 616-26.
- Oikawa, S., Nakazato, H. and Kosaki, G. (1987b) Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **142**, 511-18.

- Oliveira-Ferrer, L., Tilki, D., Ziegeler, G., Hauschild, J., Loges, S., Irmak, S., Kilic, E., Huland, H., Friedrich, M. and Ergün, S. (2004) Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res*, **64**, 8932-38.
- 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., Screaton, R.A., Ilantzis, C. and Stanners, C.P. (2000) Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res*, **60**, 3419-24.
- Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*, **23**, 2556-68.
- 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**, 920-24.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, 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.
- Reth, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature*, **338**, 383-84.
- Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, 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.
- Rojas, M., Fuks, A. and Stanners, C.P. (1990) Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family functions in vitro as a Ca<sup>2+</sup>-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ*, **1**, 527-33.
- 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.
- Rudert, F., Saunders, A.M., Rebstock, S., Thompson, J.A. and Zimmermann, W. (1992) Characterization of murine carcinoembryonic antigen gene family members. *Mamm Genome*, **3**, 262-73.
- Sacks, G., Sargent, I. and Redman, C. (1999) An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*, **20**, 114-18.
- 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.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Münzner, 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.

Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B. and Thompson, J.A. (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*, **157**, 1051-52.

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 glycosphosphatidyl-inositol anchor. *J Cell Biol*, **150**, 613-26.

Sikorska, H., Shuster, J. and Gold, P. (1988) Clinical applications of carcinoembryonic antigen. *Cancer Detect Prev*, **12**, 321-55.

Silver, R.M., Heyborne, K.D. and Leslie, K.K. (1993) Pregnancy-specific beta1-glycoprotein (SP-1) in maternal serum and amniotic fluid; pre-eclampsia, small for gestational age fetus and fetal distress. *Placenta*, **14**, 583-89.

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 signalling in human, mouse and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoforms by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol*, **168**, 5139-46.

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.

Soeth, E., Wirth, T., List, H.J., Kumbhani, S., Petersen, A., Neumaier, M., Czubayko, F. and Juhl, H. (2001) Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, **7**, 2022-30.

Spiekermann, K. und Hiddemann, W. (2005) Molekulare Zielstrukturen in der Onkologie. *Internist*, **46**, 847-60.

Stanners, C.P. (1998) Cell adhesion and communication mediated by the CEA family: basic and clinical principles. *Harwood Academic, Amsterdam*.

Stern, M. and Herrmann, R. (2005) Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*, **54**, 11-29.

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.

Streichert, T., Ebrahimnejad, A., Ganzer, S., Flayeh, R., Wagener, C. and Brümmer, J. (2001) The microbial receptor CEACAM3 is linked to the calprotectin complex in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 191-97.

Sturm, I., Bosanquet, A.G., Hermann, S., Guner, D., Dorken, B. and Daniel, P.T. (2003) Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ*, **10**, 477-84.

- 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.
- 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.
- Tamsen, L., Johansson, S.G. and Axelsson, O. (1983) Pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP1) in serum from women with pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *J Perinat Med*, **11**, 19-25.
- 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.
- Thackray, L.B., Turner, B.C. and Holmes, K.V. (2005) Substitutions of conserved amino acids in the receptor-binding domain of the spike glycoprotein affect utilization of murine CEACAM1a by the murine coronavirus MHV-A59. *Virology*, **334**, 98-110.
- Thies, A., Moll, I., Berger, J., Wagener, C., Brümmer, J., Schulze, H.J., Brunner, G. and Schumacher, U. (2002) CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol*, **20**, 2530-36.
- 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., Epting, T., Schwarzkopf, G., Singhofen, A., Eades-Perner, A.M., Van der Putten, H. and Zimmermann, W. (2000) A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *Int J Cancer*, **86**, 863-69.
- Turbide, C., Rojas, M., Stanners, C.P. and Beauchemin, N. (1991) A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, **266**, 309-15.
- Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K. and Doyonass, R. (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, **22**, 929-39.
- 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 adhesin sites on the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol*, **34**, 538-51.
- Vivier, E., Nunes, J.A. and Vely, F. (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science*, **306**, 1517-19.
- Wagener, C. and Ergün, S. (2000) Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res*, **261**, 19-24.

- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F. and Dehio, C. (1998) Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular transversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol Microbiol*, **30**, 657-71.
- Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 is the receptor for the 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.
- Weeds, A. (1982) Actin-binding proteins--regulators of cell architecture and motility. *Nature*, **296**, 811-16.
- Weinstein, I.B. (1988) The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res*, **48**, 4135-43.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, **14**, 353-56.
- 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.
- Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405.
- Würz, H., Geiger, W., Kunzig, H.J., Jabs-Lehmann, A., Bohn, H. and Luben, G. (1981) Radioimmunoassay of SP1 (pregnancy-specific beta1-glycoprotein) in maternal blood and in amniotic fluid of normal and pathologic pregnancies. *J Perinat Med*, **9**, 67-78.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T. and Zimmermann, W. (2005) Identification of a novel group of evolutionary 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.
- 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**, 2550-54.
- 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**, 1197-1209.
- Zimmermann, W. (2002) Carcinoembryonic antigen. In *Encyclopedia of Molecular Medicine* (T.Creighton, ed.), John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 459-62.
- 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> )
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMV	Vogel-Myeloblastosis-Virus ( <i>avian-myeloblastosis-virus</i> )
BGP	Biliäres Glykoprotein ( <i>biliary glycoprotein</i> )
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Differenzierungsantigene auf der Zelloberfläche ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität ( <i>complement dependent cytotoxicity</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CEA	karzinoembryonales Antigen ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )
CEACAM	CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül (CEA-related cell-adhesion molecule)
CML	chronische myeloische Leukämie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
(d)NTP	2'-(Desoxy)Ribonukleosid 5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
G	Guanin
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HAMA	humane anti-Maus-Antikörper
Hsa	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante ( <i>constant</i> ) Immunglobulindomäne

IgV-Domäne	variable ( <i>variable</i> ) Immunglobulindomäne
ITAM	auf der Aminosäure Tyrosin basierendes aktivierendes Motiv des Immunrezeptors
ITIM	auf der Aminosäure Tyrosin basierendes inhibitorisches Motiv des Immunrezeptors
L	Signalpeptid ( <i>leader</i> )
MHV	Maushepatitisvirus ( <i>mouse hepatitis virus</i> )
min	Minute
Mmu	Maus ( <i>Mus musculus</i> )
MMTV	Brusttumorvirus der Maus ( <i>mouse mammary tumor virus</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PSG	Schwangerschaftsspezifisches Glykoprotein ( <i>pregnancy specific glycoprotein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription ( <i>reverse transcription</i> )
s	Sekunde
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle Typ1 und Typ2
UspA1	das weit verbreitete Oberflächenmolekül A1 ( <i>ubiquitous surface protein A1</i> )
VLS	Gefäßlecksyndrom ( <i>vascular leak syndrome</i> )

## 9. Danksagung

Meine ersten Tage im Labor für Tumormunologie waren geprägt von einer großen Erwartungshaltung und vor allem Unsicherheit. Was würde auf mich zukommen? Würde ich der Aufgabenstellung gewachsen sein? Diese Zweifel konnten jedoch schnell durch den großen Teamgeist und das sehr schöne Arbeitsklima ausgeräumt werden.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann, der große Geduld mit mir hatte und der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich habe von ihm nicht nur viel Theoretisches über die einzelnen Mitglieder der CEA-Familie gelernt, sondern auch einen guten Einblick in einige wichtige Methoden der Molekularbiologie bekommen. Wann immer ich nicht weiter wusste - und das war wirklich sehr häufig - hatte er ein offenes Ohr für mich und nahm sich viel Zeit. Zudem möchte ich mich bei Robert Kammerer bedanken, ohne dessen gute Anregungen und das breite Fachwissen über die CEA-Familie die Fertigstellung dieser Arbeit sehr viel schwieriger gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt auch Alex Buchner, Kathleen Ebelt, Anja Hennig, Heidi Herbig, Rainer Riesenberg, Birte Sievers und Birgit Stadlbauer, die mich tatkräftig unterstützten und die ich jederzeit um Rat fragen konnte. Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Mirna Castro, Birgit Konkol, Heike Pohla und Roswitha Schreiner, die viel Geduld mit mir hatten (Heike, vielen Dank für die Zurverfügungstellung Deines Laptops) und trotz kleinerer Schwierigkeiten immer guter Laune waren. Vielen Dank für alles.

Selbstverständlich haben auch Menschen außerhalb des Labors einen entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit. Nicht selten habe ich ihnen mein Leid geklagt, vor allem wenn es um den theoretischen Teil ging. Sie haben mich unterstützt und mir immer neuen Mut gemacht. Ganz besonders möchte ich mich bei Elke, Miran, Sandra, Petra, Henning, Serkan, und Manu für deren große Hilfe und Beistand bedanken. Schön, dass es Euch gibt.

Das Ende der Danksagung ist meiner lieben Mutter und meinem lieben Bruder gewidmet, ohne die die Durchführung und Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie haben nie den Glauben an mich verloren. Was würde ich nur ohne Euch machen?

Mama, vielen, vielen Dank für alles, was Du in meinem bisherigen Leben für mich getan hast.



## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name	Roland Andreas Zebhauser
Geburtsdatum	14. Februar 1975
Geburtsort	München

### Schulbildung

Sept. 1981 - Juli 1985	Grundschule an der Eversbuschstrasse, München
Sept. 1985 - Juli 1994	Städtisches Louise-Schröder Gymnasium, München
Juli 1994	Abitur mit den Leistungskursen Chemie und Geschichte

### Zivildienst

Sept. 1994 - Nov. 1995	Pfarrei Frieden-Christi, München
------------------------	----------------------------------

### Studium

Nov. 1995 - Nov. 2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
-----------------------	--

### Famulatur

April 1999	Innere Medizin, Kreiskliniken Dachau-Indersdorf
Okt. 1999	Orthopädie, Krankenhaus München-Bogenhausen
März / April 2000	Pädiatrie, Praxis Dr. med. U. Lindlbauer, München

## Praktisches Jahr

April 2002 - Aug. 2002	Innere Medizin: Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Krankenhaus München-Schwabing
Aug. 2002 - Nov. 2002	Chirurgie: Abteilung für Viszeralchirurgie, Krankenhaus München-Schwabing
Nov. 2002 - Feb. 2003	Urologie, Universitätsklinikum Grosshadern, München

## Promotion

April 2004 - April 2006	Doktorarbeit im Labor für Tumorummunologie, Universitätsklinikum Grosshadern, München
	Thema: Charakterisierung eines Mausmodells für die Evaluierung neuer Mitglieder der CEA-Familie als mögliche Zielstrukturen für die Tumorthherapie

## Publikation

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

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

*Genomics*, **86**, 566-80 (2005)

## Bisherige Tätigkeiten

Okt. 1997 - Nov. 1997	Ausbildung zum Sanitätshelfer Arbeiter-Samariter-Bund, München
Juni 1998 - Juni 2002	Pflegehelfer Kreiskliniken Dachau-Indersdorf