

Wolfgang Merkt

Dr. med.

Biochemische Charakterisierung und funktionelle Unterschiede von humanem und bovinem CEACAM1 auf NK-Zellen

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. C. Watzl

Das auch CD66a, C-CAM oder *biliary glycoprotein* (BGP) genannte Transmembranprotein CEACAM1 ist das einzige Mitglied der CEACAM-Familie, welches auf Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) exprimiert wird. In CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen, zu denen auch die uterinen NK-Zellen zählen, führt CEACAM1 zu einer MHC I-unabhängigen Inhibition der NK-Zell-Zytotoxizität. Die Signaltransduktion des humanen CEACAM1 erfolgt über zwei ITIMs; bei einer Stimulierung des Rezeptors werden die ITIMs phosphoryliert und die Phosphatasen SHP1 und SHP2 gebunden. SHP1 und SHP2 führen, wahrscheinlich über die Dephosphorylierung von Vav1, einem zentralen Element der NK-Zell-Aktivierung, zur Inhibition der NK-Zell-Zytotoxizität. NK-Zellen und CEACAM1 werden bedeutende Rollen bei der humanen Plazentation zugeschrieben. Mensch und Rind besitzen grundsätzlich unterschiedliche Plazentationsarten. Gleichzeitig unterscheiden sich bovines und humanes CEACAM1 in der Ausstattung an intrazellulären Motiven. Im Gegensatz zum humanen CEACAM1 besitzt bovines CEACAM1 neben einem membranproximalen ITIM ein distales ITSM. ITSM-haltige Rezeptoren können zu einer NK-Zell-Aktivierung führen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob die unterschiedliche Ausstattung des humanen und bovines CEACAM1 mit ITIMs bzw. ITSMs eine funktionelle Konsequenz besitzt, und ob infolge dessen neben der reinen Assoziation auch eine kausale Zuordnung von Plazentationsart und intrazellulären CEACAM1-Motiven bestehen könnte. Hierzu wurde untersucht, welche Auswirkungen die Expression von Fusionsproteinen mit den intrazellulären Domänen von humanem und bovinem CEACAM1 auf die Zytotoxizität von NK-Zell-Linien besitzt.

Unsere Zytotoxizitätsversuche bestätigten die inhibitorische Funktion von humanem CEACAM1 auf NK-Zellen. Diese fällt verglichen mit Literatur-Daten zu KIR-Rezeptoren relativ gering aus. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der inhibitorischen Funktion von humanem und bovinem CEACAM1 bei gleichzeitiger Stimulation über den aktivierenden Rezeptor NKp30 gefunden. Bovines CEACAM1 war nicht bzw. nur minimal in der Lage, die NKp30-abhängige Zytotoxizität zu inhibieren. Im Gegensatz dazu hemmt auch bovines CEACAM1 die NK-Zell-Zytotoxizität bei Stimulation über einen anderen aktivierenden Rezeptor (2B4). Eine etwaige Steigerung der Zytotoxizität über bovines CEACAM1, welche aufgrund der Ausstattung mit einem ITSM denkbar wäre, konnte nicht

beobachtet werden. Somit zeigten wir zum ersten Mal, dass sich bovines CEACAM1 in NK-Zellen funktionell signifikant von humanem CEACAM1 unterscheidet. Bovines CEACAM1 kann jedoch in Abhängigkeit des verwendeten aktivierenden Rezeptors ebenfalls inhibierend wirken.

Die Umwandlung des humanen membrandistalen ITIMs in ein ITSM, und damit in den bovinen Genotyp, führte zu einer bezüglich des humanen Wildtyps signifikant geringeren Inhibition der NKp30-abhängigen Zytotoxizität. Diese humane Mutante präsentierte somit einen bovinen Phänotyp. Folglich ist das membrandistale funktionelle Motiv für den Unterschied zwischen humanem und bovinem CEACAM1 verantwortlich. Hierdurch wird die Wichtigkeit dieser funktionellen Sequenz deutlich, welche in einer früheren Veröffentlichung bezweifelt wurde und möglicherweise Zell-spezifisch ist.

Mutationen des bovines CEACAM1 führten zu keinen signifikanten Unterschieden. Die Umwandlung des bovines ITSMs in ein ITIM führte jedoch tendenziell zu einem humanen Phänotyp. Die Ausschaltung des bovines ITIMs führte zu keinem funktionellen Unterschied, sodass diesem Motiv eine weniger bedeutende Rolle in der NK-Zell-Inhibition zuzukommen scheint.

Des Weiteren wurden mittels Immunpräzipitation und Western Blot die molekularen Grundlagen für dieses unterschiedliche Verhalten von bovinem und humanem CEACAM1-Wildtyp untersucht. Wir konnten die bisherigen Erkenntnisse bezüglich des humanen CEACAM1 reproduzieren: Sowohl SHP1 als auch SHP2 banden an die phosphorylierte intrazelluläre CEACAM1-Domäne. Darüber hinaus scheint überexprimiertes SHP2 auch an unphosphoryliertes humanes CEACAM1 binden zu können; ein Hinweis darauf, dass es trotz aller Ähnlichkeiten Unterschiede zwischen SHP1 und SHP2 gibt. Die Bindung von SHP1 und SHP2 an die humanen CEACAM1-ITIMs passt zum Modell der ITIM-vermittelten Zellregulation im Allgemeinen und zum Bild der bisher bekannten Rolle von CEACAM1 auf NK-Zellen im Speziellen. Zum ersten Mal in der Literatur beschreiben wir eine Assoziation von SHP1 und SHP2 an bovines CEACAM1.

Die beiden Adaptoren SAP und EAT-2, die bekanntlich bevorzugt an ITSM-Sequenzen binden, konnten nach Immunpräzipitation des humanen CEACAM1-Konstrukts erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Entgegen unserer Erwartung band SAP auch nicht an den bovinen Wildtyp. Zum ersten Mal in der Literatur beschreiben wir im Gegensatz hierzu eine Assoziation von bovinem CEACAM1 an das Adaptorprotein EAT-2. Diese bovine EAT-2-Bindung könnte für die funktionellen Unterschiede verantwortlich sein und könnte auch die differentielle Beeinflussung der aktivierenden Rezeptoren durch bovines CEACAM1 erklären. Während NKp30 seine Signale über ITAM-haltige Adaptorproteine vermittelt, könnte das bovine CEACAM1-ITSM als Konkurrent zu den ITSMs von 2B4 fungieren und so die 2B4-abhängige Zytotoxizität verringern.

Zusammenfassend zeigen wir mit dieser Studie, dass die unterschiedliche Ausstattung an funktionellen Sequenzen der intrazellulären Domäne tatsächlich zu einer unterschiedlichen Funktion von bovinem und humanem CEACAM1 auf NK-Zellen führt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen verschiedenen Varianten des CEACAM1-Proteins und der

unterschiedlichen Plazentation bei Mensch und Rind ist somit möglich. Damit ist ein weiterer grundlegender Baustein für das Verständnis wichtiger immunologischer Komponenten gegeben, die für die unterschiedliche Plazentation verantwortlich sein könnten.