

Identifizierung und Charakterisierung von
Peptidantagonisten zur Hemmung der CEACAM1
vermittelten Tumorprogression

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jan Alexander Hartmann

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 2001 bis Dezember 2004 im Institut für Klinische Chemie (Zentrum für Klinische Pathologie) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Wagener

Tag der Disputation: 09.02.2006

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

2.1.2. Chemikalien

2.1.3. Standards und Kits

2.1.4. Enzyme und Proteine

2.1.5. Plasmide und Bakterienstämme

2.1.6. Oligonukleotide

2.1.7. Verbrauchsmaterial

2.2. Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-Page)

2.2.2. Silberfärbung von SDS-Page Gelen

2.2.3. Coomassiefärbung von SDS-Page Gelen

2.2.4. Western-Blot-Transfer

2.2.5. Chemilumineszenz-Reaktion zur Darstellung der Peroxidase- Reaktion

2.2.6. Proteinbestimmung nach *Bradford*

2.2.7. Kopplung von Peptiden an BSA

2.2.8. Biotinylierung von BSA-Peptid-Konjugaten

2.2.9. ELISA mit BSA-Peptid-Konjugaten

2.3. Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation)

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion

2.3.3. Agarosegel-Elektrophorese

2.3.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

2.3.5. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

2.3.6. Ligation

2.3.7. Restriktionsverdau

2.4. Methoden des *Random Phage Displays*

2.4.1. Phage Display Peptide Library von NEB

2.4.2. Immobilisierung von CEACAM1 an Polystyrol

2.4.3. Immobilisierung von CEACAM1 an Magnetbeads

2.4.4. *Biopanning* zur Isolierung von Phagen

2.4.5. Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters

2.4.6. Amplifikation von Phagenklonen durch PEG/NaCl-Präzipitation

2.4.7. Amplifikation einzelner Phagenklone

2.4.8. Charakterisierung der Bindungs-Affinität der Phagenklone zu
CEACAM1 durch ELISA

2.5. Invasionsassays mit Melanomzellen

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von nativem und rekombinantem CEACAM1

3.2. Identifizierung von CEACAM1 bindenden Peptiden mit Hilfe des
Random Phage Display Systems

3.2.1. Isolierung von CEACAM1 Bindungspeptiden durch *Biopanning*

3.2.2. Durchführung eines Kontroll-ELISA's zur Identifizierung von
CEACAM1 bindenden Peptid-Motiven

3.2.3. Darstellung der gefundenen Peptidsequenzen

3.2.4. Quantitativer ELISA mit einem Phagenklon

3.2.5. Suche nach physiologischen CEACAM1-Interaktionspartnern über
Sequenzhomologien zu Peptiden des *Random Phage Display Biopannings*

3.2.6. Sequenzhomologien mit Bezug zur homophilen Interaktion

3.2.7. Datenabgleich mit Mikroarray Experimenten (Affimetrix)

3.3. Untersuchung einer potentiellen Lectin-Funktion von CEACAM1 durch ELISA-Experimente

3.4. Melanomzellen-Invasionsassays

3.4.1. Auswahl von Peptiden für Melanomzellen-Invasionsassays

3.4.2. Quantitativer ELISA mit biotinylierten Peptid-BSA-Konjugaten

3.4.3. Invasionsassays mit MV3 – Melanomzellen

3.4.4. Invasionsassay mit G361 – Melanomzellen

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Summary

7. Literatur

8. Anhang

8.1. Tabellarischer Anhang

8.2. Gefahrenstoffe

8.3. Lebenslauf

8.4. Danksagung

8.5. Eidesstattliche Erklärung

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	<i>(2', 2'-Azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)</i>
A, C, D, E, F ...	Einbuchstaben-Code für Aminosäuren: Alanin, Cystein, Aspartat, Glutamat, Phenylalanin ...
Ala, Cys, Asp ...	Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren: Alanin, Cystein, Aspartat ...
Amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
bidest.	doppelt destilliert(es)
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>engl. bovine serum albumin,</i> Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CEACAM1	<i>Carcino Embryonal Antigen - Cell Adhesion Molecul</i>
cfu	<i>engl. colony forming units</i>
C-terminal	Carboxyterminal
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. deoxy nucleic acid,</i> Deoxynukleinsäure

dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	<i>engl. fluorescence activated cell sorter / scanner</i>
FRET	<i>engl. fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanosin
HBSS	<i>engl. Hank's balanced salt solution</i>
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasepaar(e)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria Broth
log-Phase	logarithmisches Wachstum
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	milli (10^{-3})
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})

NCA	<i>Non-specific cross-reacting antigen</i>
N-terminal	Aminoterminal
OD 600	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600
nm	
p	piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i> , Phosphat- gepufferte Salze
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i>
PEG 8000	Polyethylenglycol, avg. mol. wt. = 8000
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>engl. rounds per minute</i> , Umdrehungen pro
Minute	
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
sLex	Sialyl-Lewis-x
s.o.	siehe oben
T	Thymosin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TBS	<i>engl. Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Saline
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (= μmol umgesetztes Substrat pro min)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
Verd., verd.	Verdünnung, verdünnt
Vol.	Volumen/Volumina
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl--D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Trotz erheblicher Fortschritte der Krebstherapie ist ein großer Anteil der ca. 12000 Erkrankungen am malignen Melanom in Deutschland pro Jahr (Robert Koch Institut, 2004) mit Mortalität verbunden, da deren Verlauf oft mit aggressiver Metastasenbildung verbunden ist. Metastasierungen beginnen mit der Loslösung einzelner Krebszellen vom Primärtumor und deren sukzessivem Eindringen in die Blutgefäße (siehe Abb. 1). Der weitläufigen Ausbreitung im Körper folgt eine Anhaftung an Endothelien und deren Penetration. Nach Degradation der Basalmembran können sich die Krebszellen an neuen Orten ansiedeln und proliferieren (Engers *et al.*, 1998; Steeg, 2003).

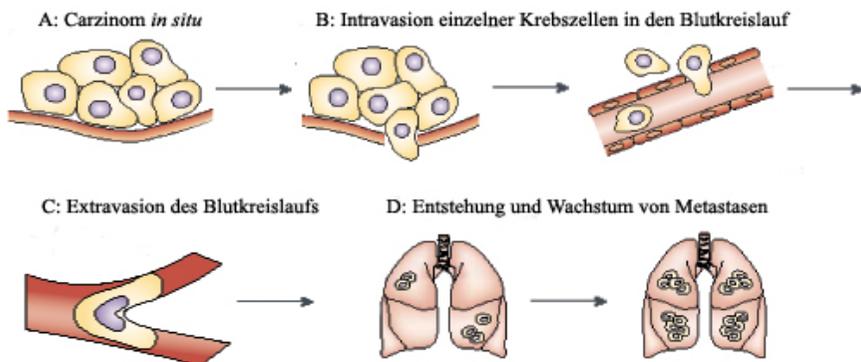


Abb. 1: Mechanismus der Metastasenbildung: A: Ein *in situ* Karzinom ist von einer intakten Basalmembran umgeben. B: Der Zerstörung der extrazellulären Matrix folgt die Invasion einzelner Krebszellen in den Blutkreislauf. C: Nach Anhaftung am Endothelgewebe und dessen Penetration wird der Blutkreislauf wieder verlassen (Extravasion). D: Die einzelnen Krebszellen proliferieren zu neuen Tumoren. (Abb.: modifiziert nach Patricia S. Steeg).

Nach erfolgter Metastasierung der Tumore sind Krebserkrankungen kaum noch erfolgreich zu therapieren. Um so entscheidender sind daher Untersuchungen von Prozessen, die der Metastasierung vorgelagert sind, nämlich der Invasion von Tumorzellen in die umgebenden Gewebe einerseits und der Blutversorgung

dieses proliferierenden Gewebes durch Angiogenese andererseits. Zelladhäsionsmoleküle sind dabei aufgrund ihres Einflusses auf zelluläre Eigenschaften in diesem Kontext von entscheidender Bedeutung.

Zelladhäsionsmoleküle und die Kommunikation im Zellverband

Die Zellen in den verschiedenen Geweben des menschlichen Organismus werden durch Adhäsionsmoleküle organisiert und zusammengehalten. Sie sind nach der Ausdifferenzierung im jeweiligen Gewebsverband stabil eingebunden oder teilen sich in einem kontrollierten Rahmen. Zellen können aber auf chemische oder physikalische Belastung des Gewebes reagieren, indem sie z.B. bei Wundheilungsprozessen von einem statischen in einen flexibleren Zustand wechseln. Diese physiologische Flexibilität erlaubt z.B. dass Einzelzellen an den Ort der Läsion zur Regeneration des Gewebes migrieren, um danach wieder in einen stabilen Zustand überzugehen. Verschiedene Adhäsionsmoleküle können mit ihrem intrazellulären Anteil über Signaltransduktionswege den Zellstatus regulieren. Sowohl direkte zelluläre Kontakte, z.B. Leukozytenadhäsionen, als auch indirekte endokrine Signale (Hormone, Interleukine) werden von außen in das Zellinnere kommuniziert, um eine entsprechende Reaktion der Zelle zu stimulieren.

Interne Störungen des zellulären Lebenszyklus beeinflussen umgekehrt auch das Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen. Mutationen des Genoms können die Funktionstüchtigkeit von exprimierten Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsproteinen oder Rezeptoren beeinträchtigen. Es kann zur Expression von Proteinen kommen, welche notwendige Differenzierungen unterbinden, Apoptose (kontrollierter Zelltod) geschädigter Zellen verhindern und durch unkontrollierte Zell-Proliferation die Entstehung von Karzinomen bewirken.

Invasion von Tumorzellen

Wird eine Zelle durch intrazelluläre Ereignisse von einem stationären in einen invasiven Zustand versetzt, beginnt über spezifische Signaltansduktionskaskaden eine Veränderung der Proteinexpression, welche die plastische Beschaffenheit des Zytoskeletts und der Zelloberfläche modifiziert (Hood *et al.*, 2002). Stabilität gewährende Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. E-Cadherin werden abgebaut oder internalisiert, während migrationsfördernde Zelladhäsionsmoleküle wie Integrin $\alpha\beta 3$ verstärkt exprimiert werden. Die Zelle wird so in die Lage versetzt sich aus dem jeweiligen Zellverband zu lösen. Durch Expression, Sezernierung und Aktivierung von Proteasen verändern migrierende Tumorzellen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) dahingehend, dass sie dieses Gewebe penetrieren können. Nach Erreichen des Blutsystems können die entarteten Zellen dann andere Organe erreichen und dort unkontrolliert proliferieren (siehe Abb. 1).

Neben der Inhibition von invasivem Tumorwachstum ist die Hemmung der Angiogenese ein weiterer wichtiger Angriffspunkt der Krebstherapie. Als Angiogenese wird die Aussprossung neuer Blutgefäße aus dem bereits bestehenden Blutversorgungssystem bezeichnet. Beim gesunden adulten Organismus findet dieser Vorgang lediglich bei Prozessen wie Wundheilung oder Ovulation statt.

Bei einer Krebserkrankung kann der Durchmesser solider Tumore von ca. 1 mm nur dann überschritten werden, wenn das Tumorgewebe an das Blutssystem angeschlossen ist. Die Bildung neuer Blutgefäße wird durch Ausschüttung angiotaktischer Faktoren von Tumorzellen forciert. Die Hemmung der Angiogenese soll schnell wachsendes malignes Gewebe von der Nährstoffzufuhr

durch neu gebildete Blutkapillaren abschneiden und so das Tumorwachstum limitieren.

Bei interzellulären Prozessen der Invasion und Migration von Zellen im Zusammenhang mit Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese sind Zelladhäsionsmoleküle von herausragender Wichtigkeit. Diese entscheiden zum einen über die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung. Zum anderen können Zelladhäsionsmoleküle extrazelluläre Signale in das Zellinnere kommunizieren (Signaltransduktion), um dort durch modifizierte Genexpression die Plastizität der Zelle zu erhöhen. Aufgrund ihrer großen Bedeutung hinsichtlich der Tumorprogression und des Blutgefäßwachstums sind diverse Zelladhäsionsmoleküle als potentielle Zielobjekte für neue Therapieformen beschrieben worden.

Klassifizierung von Zelladhäsionsmolekülen

Die Zelladhäsionsmoleküle wurden aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien in verschiedene Familien eingeteilt. Neben den Cadherinen und Integrinen gehören die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs) zu den wichtigsten Zelladhäsionsmolekülen. Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie verfügen als gemeinsames Merkmal abschnittsweise über räumliche Strukturen nach dem Schema der Immunglobulinfaltung (*Ig-folds*), welche aus zwei β -Faltblattstrukturen mit antiparallelen β -Strängen besteht. Das Spektrum ihrer biologischen Funktionen umfasst Zell-Zell-Adhäsionsprozesse, Immunabwehr, die Entwicklung neuronaler Strukturen sowie Signaltransduktion und Migration. Dabei sind sie zum einen nach dem Muster der homophilen Interaktion in *cis* und *trans* (Taheri *et al.*, 2000), zum anderen aber auch in *cis* mit bestimmten Rezeptoren, Integrinen und Cadherinen assoziiert. Die Ig-CAMs sind an ihrem extrazellulären Anteil oft hoch glykolysiert, wobei spezifische

Glykosylierungsmuster z.T. eine funktionelle Bedeutung bei Wechselwirkungen im interzellulären Kontext haben.

Im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit steht ein als CEACAM1 bezeichnetes Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie.

CEACAM1 (*Carcino Embryonal Antigen related Cell Adhesion Molekül 1*; CD66a, C-CAM, BGP, NCA-160; aktuelle Nomenklatur: CEACAM1, Beauchemin *et al.*, 1999) gehört innerhalb der Superfamilie der Immunglobuline zur CEA-Familie. Die CEA-Genfamilie befindet sich auf dem humanen Chromosom 19 und besteht aus insgesamt 34 Genen, von denen 19 exprimiert werden (<http://cea.klinikum.uni-muenchen.de>). Die CEA-Genfamilie wird ihrerseits in die CEA-Familie und die PSG-Familie (PSG = pregnancy specific glycoprotein) unterteilt, wobei letztere Gene vornehmlich während der Embryonalentwicklung exprimiert werden. Die Mitglieder der CEA-Familie besitzen aufgrund von Sequenzhomologien strukturell große Ähnlichkeit zueinander (siehe Abb. 2). Sie verfügen jeweils über eine N-terminale Domäne, welche zur variablen Domäne der Immunglobuline (IgV) homolog ist, und eine Anzahl an extrazellulären Domänen, die dem konstanten IgC2-Domänentyp entsprechen. Die stark glykosylierten Vertreter der CEA-Familie weisen ein sehr weites Expressionsspektrum auf und sind multifunktionell im Rahmen der zellulären Kommunikation. Sie sind involviert in Tumorsuppressions-, Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen und die Erkennung verschiedener pathogener Mikroorganismen. CEACAM1 besitzt als Glykoprotein von ca. 160 kD einen Zuckeranteil von ca. 35%, wobei als Besonderheit vor allem High-Mannose und Lewis x Glycane präsent sind (Lucka *et al.*, 2004). Im humanen Epithel zeigt CEACAM1 ein breites Expressionsspektrum (Gastrointestinaltrakt, Niere, Cervix, Endometrium, Blase) (Prall *et al.*, 1996).

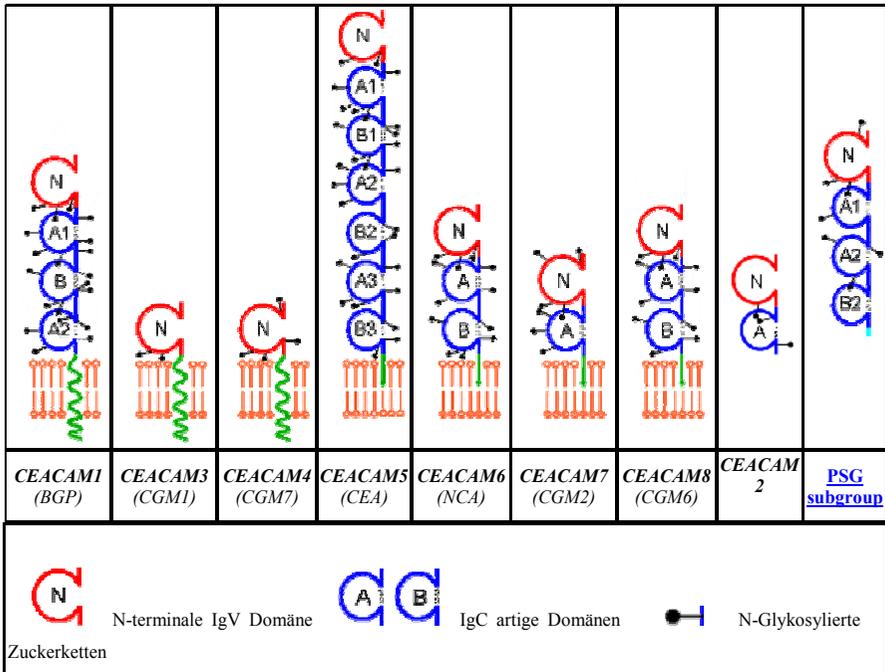


Abb.2: Aufbau und Nomenklatur von Mitgliedern der CEA-Familie (Beauchemin *et al.*, 1999; <http://cea.klinikum.uni-muenchen.de>).

In der myeloischen Reihe wird CEACAM1 hauptsächlich von Granulozyten exprimiert, es wurde aber auch auf aktivierten T-Zellen und B-Zellen nachgewiesen. Die endotheliale Expression lässt sich in neu gebildeten Blutgefäßen in Angiogeneseprozessen nachweisen, nicht aber in ausgereiften Blutgefäßen (Ergün *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den anderen CEA-Familienmitgliedern besitzen CEACAM1 und CEACAM3 eine cytoplasmatische Domäne, welche in signaltransduktorische Aktivitäten im intrazellulären Raum eingebunden ist. Insgesamt existieren von CEACAM1 10 verschiedene Spleißvarianten. Die wichtigsten davon sind CEACAM1-L mit einem langen cytoplasmatischen Anteil (73 Aminosäuren) und CEACAM1-S mit einem kurzen Anteil von 10 Aminosäuren. Die cytoplasmatische Domäne der L-Isoform enthält sowohl Serin- als auch Tyrosin-Reste, welche im Rahmen

von Signaltransduktionsprozessen phosphoryliert werden können. Damit ist CEACAM1-L neben CEACAM3-L in der Lage direkt in Signaltransduktionskaskaden mitzuwirken. Die Beschaffenheit der cytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-L erlaubt interessanterweise sowohl aktivierende als auch deaktivierende Interaktionen mit Signalproteinen. Zu den identifizierten intrazellulären Liganden mit stimulatorischer Funktion gehören Mitglieder der src-Kinase-Familie (c-Src, fck und lyn) (Brümmer *et al.*, 1995), welche nach der Phosphorylierung zweier Tyrosinreste (Y 488 und Y516) an die cytoplasmatische Domäne binden. Dagegen wurden z.B. die Phosphatasen SHP1 und SHP2 als inhibitorische Adapterproteine im Cytoplasma gefunden (Huber *et al.*, 1999). Neben der Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne ist die Fähigkeit zur homophilen Interaktion in *cis*- und *trans*-Ausrichtung von CEACAM1 entscheidend für seine Funktionalität als zelluläres Adhäsionsmolekül. In *cis*-Interaktion bilden die CEACAM1-L- und CEACAM1-S-Isoformen bevorzugt Homodimere. Die CEACAM1-Homodimere stehen auf der Zelloberfläche mit den Monomeren in einem dynamischen Gleichgewicht, welches durch die Gesamtexpression der Isoformen, den Aktivierungszustand der Zelle und die Phosphorylierung der Tyrosin- und Serin-Reste der cytoplasmatischen Domäne bestimmt wird (Öbrink *et al.*, 2004). Neue experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CEACAM1 vermittelte homophile Interaktion sein signaltransduktives Verhalten bestimmt, indem die cytoplasmatischen Domänen des Dimers eine funktionelle Einheit bilden, die von verschiedenen Serin- und Tyrosin-Kinasen oder Phosphatasen erkannt wird (Greicius *et al.*, 2003; Öbrink *et al.*, 2004). Es wurde mit NBT-II-Zellen gezeigt, dass das Verhältnis der verschiedenen Spleißformen untereinander je nach Zellstatus variieren kann, und dass die Dimerisierung sowie die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne dabei eine entscheidende Rolle spielen. Die komplexe Bedeutung von CEACAM1 und seiner potentiellen stimulatorischen oder inhibitorischen

Funktion bei der Interaktion von zellulären Systemen wird anhand seiner Dysregulation bei verschiedenen Krebsarten deutlich. So ist in Karzinomen von Endometrium, Colon, Mamma, Blase und Prostata die CEACAM1-Expression geringer als in den entsprechenden gesunden Geweben. Für CEACAM1 wird in diesen Fällen eine Tumorsuppressor-Funktion postuliert, da es über interzelluläre homophile Bindung die Integrität von Geweben gewährleisten kann und somit Metastasierungsprozesse einschränkt. In anderen Tumorgeweben wird CEACAM1 jedoch verstärkt exprimiert. So ist die CEACAM1 Expression beim malignen Melanom, beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und beim Magenkarzinom hochreguliert. Möglicherweise ist die widersprüchliche simultane Klassifizierung als Tumorsuppressor einerseits und als Tumorpromoter andererseits darin begründet, dass eine überwiegende Expression der CEACAM1-S Spleißvariante eine stabilisierende Wirkung im interzellulären Kontext hat, während die CEACAM1-L Expression Zellen stimuliert und aktiviert, und somit die Mobilität bestimmter Zelltypen forciert. Da alle CEACAM1 spezifischen Antikörper nur die extrazelluläre Domäne von CEACAM1 erkennen, sind z.B. differenzierte histologische Untersuchungen von Tumorgeweben hinsichtlich der verschiedenen Isoformen noch nicht möglich. Jedoch verdichten sich die Hinweise, dass nur die CEACAM1-L Spleißvariante eine aktivierende Wirkung hat (Ebrahimnejad *et al.*, 2004). Die in dieser Dissertation verwendete Bezeichnung CEACAM1 bezieht sich ausschließlich auf CEACAM1-L, da nur mit dieser Spleißvariante gearbeitet wurde. Es wurde gezeigt, dass die CEACAM1-Expression beim malignen Melanom mit aggressiver Metastasierung dieser Tumore korreliert und mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht. CEACAM1 ist daher als unabhängiger prognostischer Parameter beim malignen Melanom einzustufen (Thies *et al.*, 2002). Beim malignen Melanom ist CEACAM1 vor allem an der Invasionsfront von proliferierenden Tumoren in *cis*-Interaktion mit Integrin β_3 nachweisbar (siehe Abb.3 und Abb. 4) (Brümmer *et al.*, 2001;

Ebrahimnejad *et al.*, 2004) . Die Interaktion mit Integrin $\alpha\beta3$ wird über die cytoplasmatische Domäne von CEACAM1 vermittelt und ist von ihrem Phosphorylierungszustand abhängig.

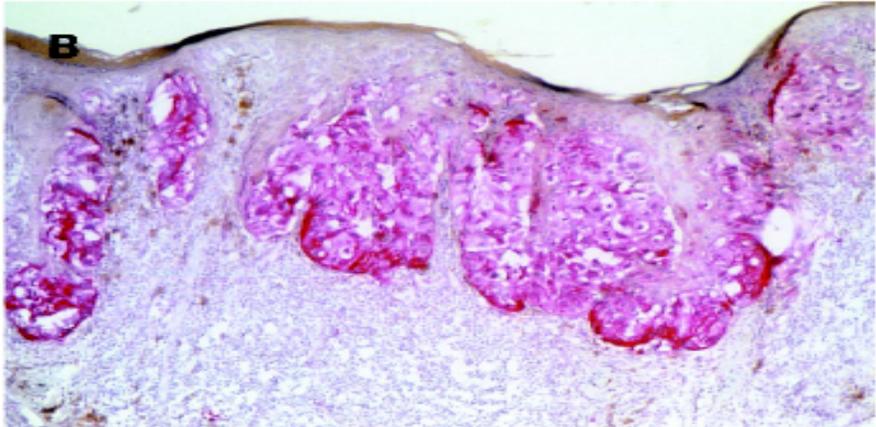


Abb.3: Immunfärbung eines primären Melanoms mit dem CEACAM1 spezifischen Antikörper 4D1C2 (ROT). Die stärkste CEACAM1-Expression wurde an der Invasionsfront detektiert (Vergrößerung: 100x)(Abb.: Anka Thies *et al.*, 2002).

CEACAM1 ist ein angiogenetischer Faktor

Beim Erwachsenen erfolgt die Gefäßneubildung (Angiogenese) nur noch bei der Ovulation und im Rahmen von Wundheilungs- und Entzündungsprozessen. Tumore entwickeln eine lokale Hypoxie, welche die Expression und Ausschüttung angiotaktischer Stimulatoren zur Folge haben. Wichtige Stimulatoren sind VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), Angiopoetine und Ephrine. Die neu gebildeten Endothelzellen weisen ein anderes Genexpressionsmuster auf als Endothelzellen von konstitutiven Gefäßen. So werden z.B. vermehrt Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie VEGF-Rezeptoren, Ephrin-Rezeptoren sowie Endoglin (CD 105) exprimiert (Ruoslati, 2002; Bergers *et al.*, 2003). Auch die Zelladhäsionsmoleküle Integrin $\alpha\beta3$ und CEACAM1 sind in neu gebildeten Blutgefäßen verstärkt exprimiert. Es wurde

gezeigt, dass im Migrationsassay die Zugabe von gelöstem CEACAM1 das Endothelzellen-wachstum konzentrationsabhängig beschleunigt.

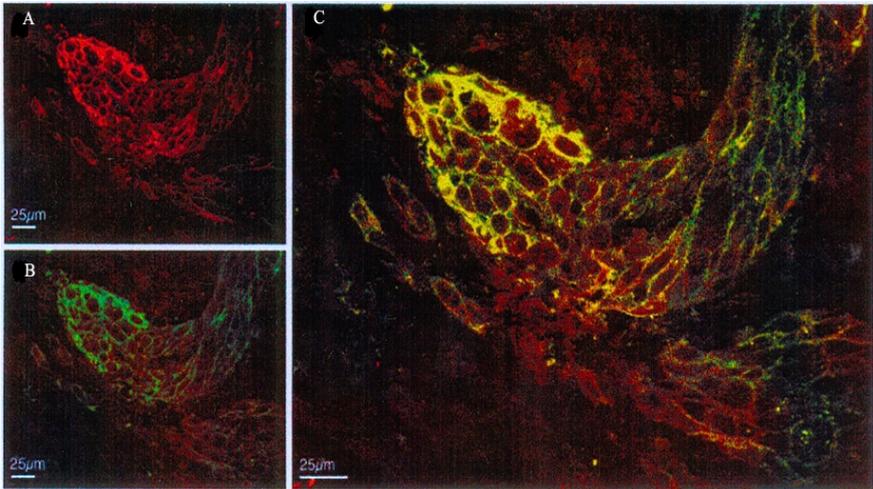


Abb.4: Kolokalisation von CEACAM1 und Integrin $\beta 3$ bei einem primären Melanom. A: CEACAM1-Detektion mit TRITC markiertem 4D1C2 mAK (Rot). B: Integrin $\beta 3$ Detektion mit FITC markiertem m AB anti Integrin $\beta 3$ (Grün). C: Simultane Messung zeigt die Kolokalisation der Signale (Gelb) vor allem an der Invasionsfront des invadierenden Tumors. (Modifiziert aus: *Cis-Interaction of Cell Adhesion Moleküle CEACAM1 with Integrin $\alpha\beta 3$* , *American Journal of Pathologie*, Vol. 159 No. 2, 2.08.2001 (J. Brümmer *et al.*, 2001)).

Bei gleichzeitiger Gabe mit VEGF wurde eine synergistische Steigerung der Migration festgestellt, während der monoklonale Anti-CEACAM1-Antikörper 4D1C2 die Ausbildung tubulärer Strukturen *in vitro* verhinderte (Ergün *et al.*, 2000). Obwohl der genaue funktionelle Hintergrund noch aufzuklären ist, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass CEACAM1 ein angiogenetischer Faktor ist. Neben seiner Bedeutung bei der Tumorprogression ist CEACAM1 in eine Reihe weiterer wichtiger physiologischer Funktionen involviert:

→ CEACAM1 ist an der Leukozytenaktivierung beteiligt (Kammerer *et al.*, 2001)

→ CEACAM1 ist Rezeptor verschiedener Pathogene wie *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Haemophilus influenzae* (Virji *et al.*, 1996; Virji *et al.*, 2000)

→ CEACAM1 reguliert die Insulinwirkung in Hepatozyten über indirekte Interaktion mit dem Insulin Rezeptor (Poy *et al.*, 2002)

Random Phage Display zur Identifizierung von Proteinbindungsmotiven

Der Begriff *Random Phage Display* beschreibt die Präsentation (*Display*) von Peptiden einer nach Zufallsprinzip (*Random*) generierten Peptid-Bibliothek an der Außenhülle von filamentösen Phagen. Mit dieser mikrobiologischen Variante der kombinatorischen Chemie können *in vitro* Peptidliganden gegen Zielmoleküle identifiziert werden (Katz 1997). Entscheidend ist dabei die Verbindung der Strukturinformation der exprimierten Peptide mit ihrer Erbinformation im jeweiligen Phagengenom. Dieses kann nach Selektion der dem Zielmolekül affinsten Peptide durch gentechnische Methoden vervielfältigt und entschlüsselt werden. Das Phagen Display mit seinem Prinzip der Kopplung von Phänotyp mit Genotyp wurde erstmals 1990 zur Gewinnung von single chain antibodies (scFv's) eingesetzt (McCafferty *et al.* 1990). Weiterführende Entwicklungen führten zur systematischen Expression von Fabs (Hoogenboom *et al.* 1991) und anderen Antigen bindenden Peptiden oder Proteinen auf der Außenhülle von M13-Phagen (Benhar, 2001). Mittels gentechnischer Methoden lassen sich mit relativ geringem Aufwand große kombinatorische Peptidbibliotheken erstellen. In das Gen eines Phagen wird dabei ein DNA-Fragment integriert, welches für ein Peptid kodiert.

Nach Infektion von Bakterien mit dem rekombinanten Phagen wird dieser vermehrt und präsentiert an seiner Oberfläche das neu eingeführte Peptid. Durch systematische oder zufällige Variation der DNA-Sequenzen können Bibliotheken mit einer Komplexität von 10^7 - 10^9 Peptiden erzeugt werden. Meistens werden in diesem System nicht lysierende M13 Phagen verwendet, die auch als Ff-Phagen bezeichnet werden, da sie ausschließlich E.coli infizieren, in

denen ein F-Plasmid (F⁺) enthalten ist, so dass diese einen F-Pilus ausbilden können. Das Genom dieses Bakteriophagen besteht aus einzelsträngiger, zirkulärer DNA mit einer Größe von ca. 6500 Nukleotiden. Die Phagenhülle enthält etwa 2700 Kopien des Haupthüllproteins (*major coat protein*) pVIII und je fünf Kopien der Nebenhüllproteine (*minor coat proteins*) pIII, pVI, pVII und pIX, wobei pIII und pVI am schmalen Ende des länglichen Phagenpartikels angeordnet sind. Die Peptide können N-terminal mit pVIII und pIII verknüpft werden, ohne dass es zu einem Funktionsverlust des Bakteriophagen kommt (Scott & Smith 1990). Durch Einbau von degenerierten DNA Sequenzen in das Phagen genom können Peptidbibliotheken erzeugt werden, die beispielsweise alle möglichen Dodekapeptide als Fusion mit pIII oder pVIII exponieren.

Auf dieser Grundlage wurde eine als *Biopanning* bezeichnete Methode entwickelt, die es ermöglicht aus einer komplexen Phagenbibliothek diejenigen Peptid-Phagen systematisch anzureichern, deren Peptide die besten Bindungseigenschaften zur exponierten Zielstruktur haben. Beim *Biopanning* wird das fixierte Zielprotein zunächst mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Nach Entfernung von schwachen, unspezifischen Bindern durch mehrmaliges Waschen erfolgt die Elution der gebundenen Phagen mittels pH-Wert Absenkung und anschließender Neutralisierung des Eluats. Die Art und Konzentration der Detergenzien im Inkubationspuffer und in der Waschlösung ist dabei für die Stringenz des Anreicherungsprozesses von entscheidender Bedeutung. Das Eluat, welches nun CEACAM1 bindende Phagen enthält, wird zu einer im *log*-Wachstum befindlichen *E. coli*-Kultur gegeben und amplifiziert. Die dabei generierten Phagen werden aus dem Überstand der Bakterienkultur abgetrennt, aufgereinigt und beim nächsten *Biopanning*-Schritt zur weiteren Anreicherung gegen das Zielmolekül eingesetzt. Nach mehreren *Biopanning*-Durchgängen werden einzelne Phagenklone in *E.coli* amplifiziert, um anschließend ihre DNA zu isolieren.

Random Phage Display - Biopanning

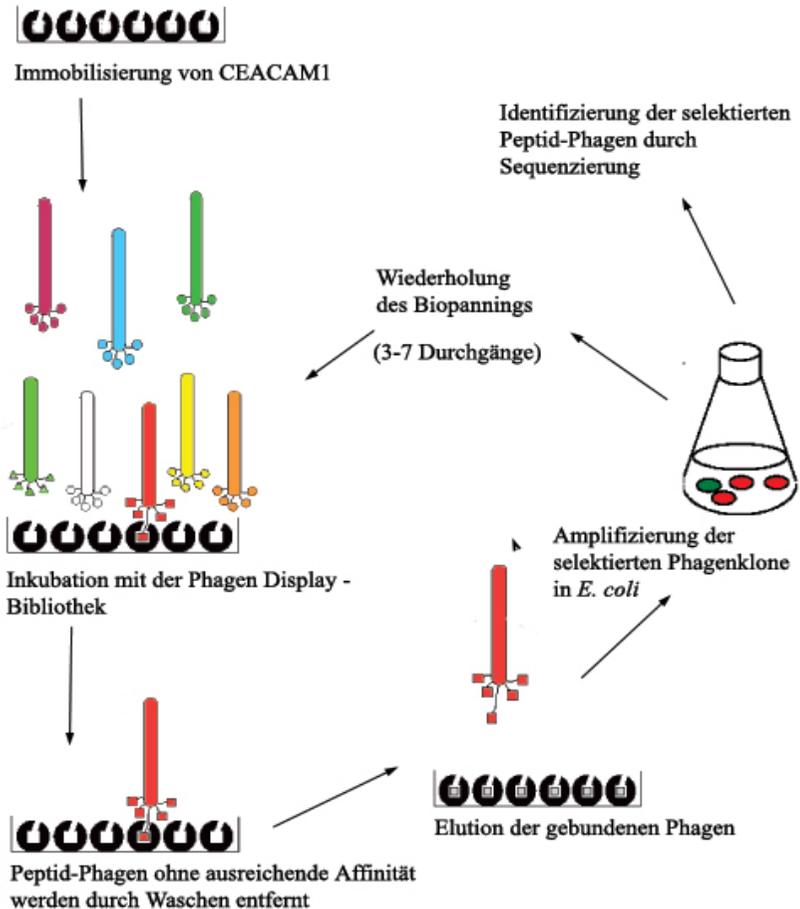


Abb. 5: Experimenteller Ablauf des *Biopannings* beim *Random Phage Display*. Am immobilisierten CEACAM1 binden Phagen, deren Dodeka-Peptidvarianten die höchste Affinität zum Liganden besitzen. Nicht bindende Phagen werden durch Waschen entfernt, während gebundene z. B. durch eine Veränderung des pH-Wertes (*pH-shift*) eluiert werden können. Diese werden durch Inkubation mit *E. coli*-Kulturen vermehrt. Nach Abtrennen und Aufreinigung werden sie in weiteren *Biopanning*-Runden eingesetzt. Nach Selektion bindender Varianten wird die für das Peptid kodierende DNA isoliert und sequenziert.

Durch Sequenzierung wird dann das jeweilige Peptid charakterisiert. In dieser Doktorarbeit wurde die *Phagen Display* Peptidbibliothek *Ph.-D.-12TM* der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet, die $2,7 \times 10^9$ verschiedene Dodeka-Peptidsequenzen als lineare Fusionsproteine mit dem Oberflächenprotein pIII exprimiert.

Aufgabenstellung dieser Dissertation

CEACAM1 ist ein Zelladhäsionsmolekül von essenzieller funktioneller Bedeutung für die Ausbildung neuer Blutkapillaren und die Invasion maligner Melanomzellen. Mit der molekularbiologischen Methode des *Random Phage Displays* sollen Peptide selektiert werden, welche die von CEACAM1 präsentierten Epitope effektiv erkennen. Da diese Zielstrukturen auch *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit an physiologischen Interaktionen beteiligt sind, könnten diese Peptide möglicherweise die Wechselwirkungen von CEACAM1 mit anderen Molekülen als Antagonisten unterbinden. In der vorliegenden Dissertation wurden zwei Strategien verfolgt:

1. Die Identifizierung und Charakterisierung möglicher physiologischer Interaktionspartner von CEACAM1 durch Datenbank-Recherchen mit der Sequenzinformation dieser Peptide.
 2. Eine direkte funktionelle Inhibition von CEACAM1 in migrierenden Melanomzellen. Besonders geeignete Peptide wurden auf biologische Aktivität hinsichtlich CEACAM1 exprimierender Melanomzellen in *in vitro* Invasions-Assays untersucht. Dass bei den Selektionsexperimenten hauptsächlich eingesetzte rCEACAM1 wurde durch rekombinante Expression in CHO-Zellen hergestellt.
-

2. Material und Methoden

2.1. Material

Chemikalien

Chemikalien und Lösungen wurden überwiegend in analytischer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Produkte anderer Hersteller werden im Text jeweils genannt. Für proteinchemische Arbeiten wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet. Bei molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden wurde immer steriles Wasser zu Injektionszwecken oder autoklaviertes Wasser als Reagenz und zum Ansetzen der Lösungen/Puffer benutzt.

Geräte

Analysewaagen	Mettler, Gießen
Autoklaven	Tecnomara, Fernwald
Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus
Chromatographieanlagen DuoFlow,	Fa. Biorad, München
FPLC	Pharmacia LKB, München
Elektronenmikroskop	CM100 Philips, Hamburg
ELISA-Platten-Photometer	SLT, Crailsheim
Filmkassetten und Röntgenfilme	Amersham/Pharmacia
Gelkammern und Zubehör	Biometra, Göttingen
Heizblöcke	Flow Laboratories, Meckenheim
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop	Zeiss (Zeiss Axiovert 135), Jena
PCR-Gerät, Minicycler MS Research	Biozym, Hamburg
pH-Meter	Beckman, München

Pipetten	eppendorf, Hamburg
Polaroid Kamera, Filme	Polaroid, Hertfordshire, UK
Sonicator, Sono plus	Bandelin
Spannungsgerät für die Elektrophorese	Biometra, Göttingen
sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Wasserbad	Flow Laboratories, Meckenheim
Whatman-Papier	Whatman, Kent, UK

Zentrifugen:

Sorvall RC5C, Rotoren SS34 und GSA	Sorvall/DuPont,
eppendorf Tischzentrifugen	eppendorf, Hamburg
Sigma 3-1	Sigma Zentrifugen, Osterode

Verbrauchsmaterialien:

ELISA-Platten: Maxisorb loose	Nunc
Nap-5-Säulen (Sephadex-G25)	Pharmacia LKB, München
Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
sterile Plastikartikel	Falcon und Greiner
Ultrafiltrationseinheiten	Millipore, Eschborn
(Ausschlußvolumen 10, 30 und 100 kD)	

Primäre Antikörper

4D1C2-Mouse mAB	
T84.1- mAB	
Anti M13 Antikörper POD-konjugiert	Pharmacia Biotech, Freiburg

Sekundäre Antikörper

Goat-Anti-Mouse-Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Goat Anti-Mouse-FITC	Dianova, Hamburg

2.2. Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Bei der SDS-Page-Gelelektrophorese werden Proteine in Polyacrylamid-Gelen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Proteine werden in denaturierenden SDS(Sodium-Dodecyl-Sulfat)-haltigen Gelen in einem konstanten Ladungs/Masse-Verhältnis durch das negativ geladene SDS komplexiert. In Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad der Polyacrylamidgele und dem Anteil des Polyacrylamids wird nach der Auftrennung im elektrischen Feld eine lineare Auftrennung der einzelnen Proteine in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich erreicht.

Verwendete Lösungen:

Trenngel-Puffer:	1,5M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Denaturierender Probenpuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 6,8 12 % Glycerin (v/v) 4 % SDS (w/v) 2 % b-Mercaptoethanol (v/v) 0,01 % Serva Blue (w/v)
Acrylamid-Lösung:	40 % Lösung (w/v), 19:1, Roche
TEMED:	10 % (Biorad)
APS (Biorad):	10 % Lösung (w/v)
SDS:	10 % Lösung (w/v)
Elektrophorese-Laufpuffer (10 x):	1,92 M Glycin 0,248 M Tris 10 % SDS (w/v)
Der Laufpuffer wurde vor Gebrauch 1:10 mit ddH ₂ O verdünnt.	

Der Vernetzungsgrad wird dem entsprechendem Molekulargewichtsbereich angepasst, in dem die lineare Auftrennung erfolgen soll (z.B. 12,5 % Trenngele für Proteine von 10-60 kD; 7 % Gele für Proteine von 70-200 kD etc.).

Zunächst wird das Trenngel (5 ml) gegossen, auf dessen Oberkante vor der Polymerisation etwas Butanol gegeben wird, damit die Oberkante glatt wird.

Pipettierschema für SDS-Page-Trenngele (5 ml Ansatz):

Reagenz	7%iges SDS-Page-Gel	12,5%iges SDS-Page-Gel
Acrylamid-Lösung (40 %)	0,875 ml	1,565 ml
Trenngel-Puffer	1,25 ml	1,25 ml
Wasser	2,825 ml	2,135 ml
SDS (10 % Lösung)	50 µl	50 µl
TEMED (10 % Lösung)	15 µl	15 µl
APS (10 % Lösung)	30 µl	30 µl

Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Butanol durch Auslaufenlassen entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm zwischen die Glasplatten geschoben. Das Sammelgel sollte etwa 0,5-0,75 cm lang sein.

Pipettierschema für SDS-Page-Sammelgele (2,5 ml Ansatz):

Reagenz	SDS-Page-Sammelgel
Acrylamid-Lösung (40 %)	0,310 ml
Sammelgel-Puffer	625 µl
Wasser	1,6 ml
SDS (10 % Lösung)	25 µl
TEMED (10 % Lösung)	7,5 µl
APS (10 % Lösung)	15 µl

Für die Elektrophorese werden die Gele vertikal in die Gelkammer eingespannt und Elektrodenlaufpuffer in Pufferkammer und Probenaschen gefüllt. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt, 5-10 min im Wasserbad gekocht und in die Taschen pipettiert. Im Sammelgel erfolgt zunächst bei einer Stromstärke von 10mA die Konzentration der Proben, die weitere Auftrennung im Trenngel bei 20mA. Um Aussagen über die Größe der einzelnen Proteinbanden machen zu können wird ein Marker aufgetragen.

2.2.2. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung stellt eine äußerst sensitive Methode zum Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen dar. Es können Proteinkonzentrationen bis zum Nanogramm-Bereich detektiert werden. Die Färbung wird in Plastikschaalen durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Gele von den Glasplatten vorsichtig abgelöst und zum Fixieren 30 min in Lösung 1 (s.o.) geschwenkt. Anschließend wird 10 min in Lösung 2 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in ddH₂O wird das Gel mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (Lösung 3) für 1 min sensitiviert, anschließend wird wieder dreimal für 1 min mit ddH₂O gewaschen. Zum Anfärben der Gele wird 30 min mit Lösung 4 gefärbt, und nach zweimaligem Waschen mit ddH₂O mit Lösung 5 entwickelt. Die Entwicklung wird durch Lösung 6 gestoppt. Die Gele werden in einer 15 % Ethanol-Lösung in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen:

Lösung 1 (Fixierlösung):	50 % Methanol
	10 % Eisessig
	40 % Wasser
Lösung 2 (Rehydratisierungslösung):	5 % Methanol
	7,5 % Eisessig
	87,5 % Wasser

Lösung 3 (Sensitivierungslösung):	0,02 % Natriumthiosulfat in Wasser
Lösung 4 (Färbelösung):	0,02 % Silbernitrat 1 mM Formaldehyd
Lösung 5 (Entwicklungslösung):	6 % Natriumcarbonat 6 mM Formaldehyd
Lösung 6 (Stopplösung):	2,3 M Natriumcitrat in Wasser

2.2.3. Coomassiefärbung von SDS-Page Gelen

Zum Einfärben werden die Gele etwa 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und daraufhin in Entfärberlösung für 30–60 Minuten wieder soweit entfärbt, dass die Proteinbanden deutlich sichtbar sind.

Zusammensetzung der Lösungen für die Coomassiefärbung:

Färbelösung:	0,01 % Coomassie Blau R-250 in H ₂ O :
Methanol :	Essigsäure (6:3:1 v)
Entfärberlösung:	H ₂ O : Methanol : Essigsäure (6:3:1 v)

2.2.4. Western Blotting

Nach der Gelelektrophorese wurden dabei die Proteine aus den SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen zum immunologischen Nachweis spezifischer Antigene transferiert. Der Transfer der Proteine aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose erfolgte elektrophoretisch, wobei die negativ geladenen Proteine auf die positiv geladene Nitrocellulosemembran gebracht werden. Es wurden Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran passend auf die

Gelgröße zugeschnitten (je 8 x 10 cm) und im Transferpuffer äquilibriert. Die Kathodenplatte der Apparatur wurde zunächst mit zwei in Transferpuffer getränkten Filtern belegt. Darüber wurde die Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, BA85 Protran-Membran, 0,45µm Porengröße) gelegt, dann folgte das Gel. Auf der Membran wurden die Position des Molekulargewichtsstandards und der Umriss des Gels markiert. Das Gel wurde dann mit zwei weiteren Filterpapieren bedeckt. Durch mehrfaches Glattrollen des Western-Blot-Stapels mit einer Pipette wurden Luftblasen entfernt. Der Apparaturdeckel mit der Anodenplatte wurde befestigt und mit Gewichten beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte über 45 min mit 200 mA/ Gel.

2.2.5. Immunologischer Nachweis spezifischer Antigene auf Western-Blot Membranen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf den Membranen wurde nach Western-Blot-Transfer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5 % Milchpulver inkubiert. Die Blockierungslösung wurde verworfen. Anschließend wurden die Membranen für 1 h mit dem jeweiligen Antikörper bei RT auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min. bei RT in PBS-T (0,1 %) entfernt.

2.2.6. Chemilumineszenz-Reaktion mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern

Die Peroxidase-Reaktion im Immunoblot mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers in Verbindung mit Chemilumineszenz-tauglichen Substraten (z.B. dem verwendeten ECL-Kit, Amersham) stellt eine äußerst sensitive Detektionsmethode dar. Die Chemilumineszenz entsteht durch Oxidation von Luminol durch die Peroxidase. Das Luminol strahlt nach

Anregung Licht aus und fällt anschließend in seinen Grundzustand zurück. Das emittierte Licht wird durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht .

Nach Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern wurden die Nitrocellulosemembranen über 15-30 min bei RT in PBS (pH 7,5; 0,25 % Tween 20) gewaschen. Der Wechsel der Puffervorlage erfolgte alle 5 min. Die beiden Substratlösungen wurden den Herstellerangaben entsprechend 1:1 zusammengegeben. Die Membranen wurden gleichmäßig mit der Substratlösung für ca 2 min. unter Abdunklung bedeckt, anschließend wurde diese durch Abtropfen entfernt. Für einen variablen Zeitraum (je nach Signalstärke von 2 min. bis zu Expositionen über Nacht) wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm™) aufgelegt.

Waschpuffer für die Chemilumineszenzreaktion:

PBS, pH 7,5; 0,5 % Tween 20 (v/v)

2.2.7. Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Dieses Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den sauren Farbstoff Coomassie-Brilliantblau (G250), dessen Absorptionsmaximum bei 465 nm liegt, sich in Gegenwart von Proteinen aber zu einer Wellenlänge von 595 nm verschiebt. Ausgelöst wird diese Verschiebung durch die Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff sowie kationischen und nichtpolaren Seitenketten in den Proteinen. Die Veränderung der Extinktion wird im Photometer gemessen. Mit dieser Methode lassen sich Proteinkonzentrationen von 0,05-0,5 µg/ml nachweisen. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit IgG -Lösung (3 mg/ml) hergestellt (1, 3, 6, 9, 15, 30 und 60 µg/ml). Der Nullwert wurde gegen das Milieu geeicht, in dem sich auch die zu bestimmende Proteinlösung befand. Zur

Durchführung der Konzentrationsbestimmung wurden 200 µl einer fertigen Bradford-Reagenz-Lösung (Biorad) mit 800 µl der Verdünnungsreihe des Proteins versetzt, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm im Photometer vermessen.

2.3. Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep)

2.3.1.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wird die Lösung mit 600 µl einer Phenol:Chloroform Lösung versetzt, gut durchmischt (Vortexer) und anschließend 3 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Von den getrennten Phasen wird die obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, abgenommen. Anschließend werden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt.

2.3.1.2. Ethanolpräzipitation

Die Nukleinsäurelösungen werden durch Zugabe von 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) auf eine Endkonzentration von 300 mM Natriumacetat eingestellt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wird mit dem 2.5 – 3 Volumen Ethanol (100 %, gekühlt auf -20°C) versetzt, geschüttelt und anschließend über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach wird der Nukleinsäureniederschlag durch Zentrifugieren bei 14.000 x g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wird durch Zugabe von 300 µl 70 % Ethanol und erneuter Zentrifugation (14.000 x g, RT) für 2 Minuten gewaschen. Der Überstand wird entfernt und nach kurzem Trocknen des Pellets an der Luft wird dieses in einem geeigneten Volumen Wasser resuspendiert.

2.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird dabei durch zwei *Primer* (Oligonukleotide) festgelegt, die sequenzspezifisch an die hitzedenaturierte *Template* (Matrizen)-DNA binden. Zu Beginn einer PCR wird die bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert. Es folgt in der Nähe der entsprechenden Hybridisierungstemperatur der *Primer* die *Annealing* (Annährungs)-Reaktion zu den kodierenden und den dazu komplementären nicht kodierenden Strängen. Bei der anschließenden *Elongation* (Verlängerungs)-Reaktion verlängert die Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C beide Stränge in 3' Richtung. Dieser Zyklus aus Denaturierung der *Template*-DNA, Hybridisierung mit den *Primern* und Elongation des Zielfragmentes wird bis zu 25mal wiederholt. Letztendlich folgt zur Amplifikation unvollständiger PCR-Fragmente ein finaler Elongationsschritt von 10 min.

Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur eines Primers wurde folgende Faustregel verwendet:

$$T_m = 4 (G/C) + 2 (A/T)$$

Für jedes GC-Paar wurde eine Schmelztemperatur von 4°C angenommen, für jedes A/T-Paar eine Schmelztemperatur von 2°C.

Standard PCR

Pfu-Polymerase Synthese von 500 bp/min Stratagene

Deoxynukleotid Mix 100 mM; jedes dNTP 25 mM Stratagene

Standard-Reaktionsansatz:

5 µl	10 x PCR-Puffer (wird mit DNA-Polymerase mitgeliefert)
1 µl	5'-Primer (20 pM)
1 µl	3'-Primer (20 pM)
1 µl	dNTPs (jedes dNTP 25 mM)
0,5 µg	Template-DNA
ad 50 µl	autoklaviertes ddH ₂ O

Anschließend wurde mit einem Tropfen (ca. 50 µl) Mineralöl überschichtet, 2-3 U DNA-Polymerase (1 µl) hinzupipettiert und der PCR-Ansatz sofort in den Thermocycler gestellt.

1 Zyklus: 94 °C 5 min Denaturierung

15-25 Zyklen: 94 °C 30 sec Denaturierung

 50-65 °C 30 sec Annealing (Temperatur je nach Primer)

 72 °C 90 sec Elongation (Dauer richtet sich nach
Produktlänge und verwendeter Polymerase)

1 Zyklus: 72 °C 10 min finale Elongation unvollständiger
Amplifikate

Mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese wird überprüft, ob das PCR-Produkt die zu erwartende Größe aufweist. Die DNA wird mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend eluiert.

2.3.3. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um Reinheit, Größe oder Konzentration einer DNA-Lösung zu überprüfen (analytisch) oder um gezielt DNA-Fragmente zu isolieren und sie dadurch von unerwünschter DNA zu befreien (präparativ). Wie im Polyacrylamidgel zur Auftrennung von Proteinen besteht in Agarosegelen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Größe der Moleküle und der Wanderungsdistanz im Gel.

Horizontalelektrophoresesystem Gibco BRL
mit Power Supply, Gelkammern, Gelträgern und diversen Kämmen
Image Master® VPS (312 nm) Pharmacia Biotech
UV-Transluminator (366 nm) NeoLab

TAE-Puffer, pH 8,0 (50x):

Tris/HCl 2 M Sigma

Essigsäure 1 M Merck

EDTA, Dinatriumsalz 0,5 M Sigma

Agarose-Lösung (100 ml):

Agarose 1-2 % Roth

Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) 3-4 µl Roth

Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer unter Kochen gelöst und das Ethidiumbromid nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt.

Probenpuffer (5x):

Bromphenolblau 0,2 % Boehringer

Xylencyanol FF 0,2 % Roth

Glycerol 60 % Merck

EDTA, Dinatriumsalz 60 mM Sigma

Analytische Agarose-Gelelektrophorese:

Je nach Größe der zu analysierenden DNA, werden 1-2 %-ige Agarosegele mit 5 µl-Probentaschen hergestellt. Die DNA-Proben werden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung (100-120 V) in 1 x TAE-Puffer. Durch Interkalation des zugesetzten Ethidiumbromids kann die DNA mittels UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

Präparative Agarose-Gelelektrophorese:

Die präparative Gelelektrophorese erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die analytische Gelelektrophorese. Es werden allerdings Gele mit Probentaschen bis zu 100 µl verwendet und das Ausschneiden der DNA-Banden (Skalpell) erfolgt möglichst schnell bei weniger energiereichem UV-Licht (366 nm), um die DNA nicht zu zerstören.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der Proben mittels präparativer Gelelektrophorese werden die DNA-Banden möglichst schnell bei UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

2.3.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgt unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ von QIAGEN nach Herstellerangaben.

2.3.5. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.3.6. Ligation

Die komplementären kohäsiven Enden der jeweiligen DNA und des Plasmids, die nach Restriktionsverdau entstanden sind, wurden im molaren Verhältnis von 3:1 für 12 h bei 16 °C ligiert. Die Inkubation von insgesamt ca. 500 ng DNA erfolgte mit 0,1 U T4-DNALigase in Ligasepuffer. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl.

2.3.7. Restriktionsverdau

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller zugehörigen Puffersystem nach empfohlener Temperatur-, Konzentrations- und Zeitangabe. Der Restriktionsverdau wurde im Falle unterschiedlicher Optimalbedingungen der beiden Enzyme separat mit eingefügter Aufreinigung durchgeführt.

2.4. Methoden beim Random Phage Display

2.4.1. *Ph.-D.-12TM* Phage Display Peptide Bibliothek von New England Biolabs (NEB)

Die Phage Display Peptidbibliothek *Ph.-D.-12TM* der Firma New England Biolabs exprimiert eine variable Peptidsequenz von zwölf Aminosäuren als lineares Fusionsprotein mit dem Oberflächenprotein pIII des Bakteriophagen M13. Ein Spacer aus vier Aminosäuren (Gly-Gly-Gly-Ser) zwischen der pIII Sequenz und den zwölf Aminosäuren ermöglicht eine effektive Präsentation des

Peptids. Die Library verfügt über eine Komplexität von $2,7 \times 10^9$ verschiedenen Peptidsequenzen und ist für 10 *Biopanning* Reaktionen bestimmt. Die *Phage Display Peptide* Bibliothek wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.2. Immobilisierung von CEACAM1 in Polystyrol-Röhrchen (Nunc)

Es wurden 500 μl der jeweiligen CEACAM1-Lösung auf den Boden eines Nunc Röhrchens gegeben und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

2.4.3. Immobilisierung von CEACAM1 und CEACAM1-Domänen an Magnetbeads (Dynabeads[®] M-270 Epoxy)

Bei den verwendeten Magnetbeads handelt es sich um mit hochvernetztem Polystyrol ummantelte paramagnetische Partikel, welche als funktionelle Gruppen eine Schicht von Diglycidylethern (Epoxygruppen) tragen. Mittels der funktionellen Epoxy-Gruppen können Proteine, Peptide und andere Zielmoleküle kovalent an die Magnetbeads gebunden werden, um sie so immobilisiert für verschiedene *Biopanning*-Verfahren einzusetzen. Durch diese Methode kann eine größere Oberfläche des Zielproteins exponiert werden als bei einfacher Absorption an Polystyroloberflächen (siehe 2.5.3.). Außerdem kann besser und intensiver gewaschen werden. Es wurde vor Beginn einer *Phage-Display Biopanning* Serie das Zielprotein für den gesamten Prozess (also für 3 *Biopanning*-Schritte) immobilisiert und dann bei jedem einzelnen Panning anteilig eingesetzt. Die gefriergetrocknet vorliegenden Magnetbeads wurden dem Bedarf entsprechend abgewogen, wobei den Herstellerangaben entsprechend ein Verhältnis von 3 mg Zielprotein je 10^7 Magnetbeads eingehalten wurde. Für 120 μg zu immobilisierendem rCEACAM1 wurden daher 5 mg Dynabeads[®] M-270 Epoxy eingewogen und in 0,5 ml PBS (pH 7,4) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß resuspendiert. Das Eppendorfgefäß mit den Magnetbeads wurde zur Entfernung des Überstandes für 4 min in einen Magnetständer (DynaL MPC) gestellt, bis die Ablagerung der Magnetbeads zum

im Ständer eingebauten Magneten abgeschlossen war. Nach zwei weiteren gleichartigen Waschschrritten wurden 120 µg CEACAM1 in 500 µl PBS aufgenommen und zu den Magnetbeads gegeben. Um die Kopplung zu beschleunigen wurden 250 µl einer 3M Ammoniumsulfat-Lösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration des Ammoniumsulfats 1 M betrug. Das Kopplungs-gemisch wurde nun für mindestens 24 h bei 4°C unter konstantem Rütteln inkubiert. Zum *Biopanning* wurde die jeweilig benötigte Menge des gekoppelten rCEACAM1's abgenommen und 3 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die gekoppelten Magnetbeads mindestens 1 h mit Blockierungs-Puffer inkubiert, um letztlich zum *Biopanning* eingesetzt zu werden.

2.4.4. Blockierung von immobilisiertem CEACAM1 und CEACAM1 – Einzeldomänen *Biopanning*-Ansätzen

Der Überstand wurde abgenommen und das Röhrchen für 2h bei 4°C mit 3ml Blockierlösung (bei den Dynabead-Ansätzen mit 2 ml) versetzt, um nicht mit CEACAM1 besetzte Oberflächen abzusättigen.

Zusammensetzung der Lösungen beim Phage Display:

CEACAM1(nativ) - Inkubationslösung :

20 µg/ml natives CEACAM in PBS

CEACAM1(rekombinant) - Inkubationslösung:

40 µg/ml rekombinantes CEACAM1 in PBS

Blockierungslösung:

2,5 mg/ ml

BSA in PBS

HBSS+Ca²⁺ (pH 7,5):

0.8 mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
125 mM	NaCl
1 mM	NaHPO ₄
1 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,1 mM	KH ₂ PO ₄
1 mM	KCl
1.2 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
10 mM	Hepes

Die Lösung wurde steril filtriert.

HBSS+Ca²⁺ -T (0,5%):

HBSS+Ca ²⁺ + 0,5% (v/v)	Tween 20
------------------------------------	----------

Tween 20 wurde in HBSS + Ca²⁺ gelöst.

HBSS+Ca²⁺ -T (0,5%)+BSA (0,1%)

1 mg/ml BSA wurde in HBSS+ Ca²⁺ -T (0,5%)

Glycin-Elutionslösung (pH 2,2):

0,2 M	Glycin
-------	--------

Die Lösung wurde steril filtriert.

Tris-HCl-Lösung (pH 9,1):

1 M	Tris
-----	------

Die Lösung wurde autoklaviert.

PBS (pH 7,5):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	NaH ₂ PO ₄
1,4 mM	KH ₂ PO ₄

PEG/NaCl-Lösung:

20 % (w/v) PEG-8000

2,5 M NaCl

Die Lösung wurde autoklaviert.

2.4.5. Biopanning zur Isolierung von hochaffinen Phagen

Als *Biopanning* wird die Anreicherung von antigenbindenden Random-Peptid-Phagen in einem Selektionsprozess bezeichnet. Es wurden in den einzelnen Experimenten jeweils 3 *Biopannings* durchgeführt. Nach Immobilisierung des Zielproteins und Blockierung des Panning-Ansatzes (s.o.) wurde dreimal mit jeweils 2 ml HBSS+Ca²⁺+T (0,5 %) gewaschen. Es wurden 10 µl der *Ph.-D.-12TM Phage Display Peptide* Bibliothek (ca. 2,7 x 10⁸ Phagen, einem Zehntel der Gesamtbibliothek entsprechend) in jeweils 500 µl HBSS+Ca²⁺-T (0,5 %)+BSA (0,1 %) pipettiert und durch kurzes Mischen verteilt. Die Phagen-Bibliothek wurde zum immobilisierten Zielprotein gegeben und unter konstantem Rütteln 30 min bei Raumtemperatur oder bei 37°C inkubiert. Nach dem Abpipettieren der Inkubationslösung wurden die Polystyrolröhrchen/ Magnetbeads zur Entfernung nicht gebundener Phagen viermal mit je 1000 µl HBSS+Ca²⁺+T (0,5 %) gewaschen. Die Elution spezifisch gebundener Phagen erfolgte durch Absenkung des pH-Werts. Dazu wurden die Ansätze jeweils 2 min mit 320 µl Glycin-Elutionslösung (pH 2,2) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die nach anschließender Neutralisierung mit 64 µl Tris-Puffer (pH 9,1) erhaltene Lösung wird als Panning-Eluat bezeichnet.

2.4.6. Amplifikation der eluierten Phagen des Panning-Eluats

Da die M13-Phagen nur *männliche*, F-Faktor positive *E.coli* Bakterien infizieren, enthält das F-Faktor-Genom der ER2738-*E. coli*-Kultur ein Mini-

Transposon welches Tetracyclin-Resistenz vermittelt, so dass F-Faktor positive Bakterien auf Tetracyclin enthaltendem Medium selektiert werden können. Von der im *Ph.-D.-12TM Phage Display Peptide* Library Kit als Glycerolstock enthaltenen ER2738-*E. coli*-Kultur wurde 1 µl entnommen, in 10 µl LB-Medium gelöst und auf einer LB-Tet-Kulturplatte ausgestrichen. Die LB-Tet-Kulturplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C im Dunkeln bis zu 4 Wochen gelagert.

E. coli ER2738

F⁺lacI_q .(lacZ)M15 proA+B+ zcf::Tn10(Tet_R)/fluA2 supE thi .(lac-proAB) (hsdMS-mcrB)5 (rk-mk-McrBC-)

Zur Amplifikation von Phagen wurde eine auf LB-Tet-Medium selektierte ER2738-*E. coli* Einzelkolonie in 20 ml LB-Medium bis zur frühen log-Wachstumsphase (OD600 ~ 0,3 - 0,5) bei 37°C bei 150 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Vom Panning-Eluat wurden 350 µl (von insgesamt ca. 400 ml) der Kultur zugesetzt und diese für weitere 4,5 h bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 14.000 g bei 4 °C 10 min abzentrifugiert und der Überstand durch erneutes Zentrifugieren vollständig von den Bakterien befreit. Der Überstand enthält die amplifizierten Phagen.

2.4.7. Isolierung von amplifizierten Phagen durch PEG/NaCl-Präzipitation

Die PEG/NaCl-Lösung wurde in einer Menge von 1/6 des Gesamtvolumens des Phagenüberstands hinzupipettiert, kurz gemischt und über Nacht zur Fällung bei 4 °C stengelassen. Das Phagenpräzipitat wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 g und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde nach Entfernen des Überstands in 200 µl 0,02 % NaN₃ in PBS aufgenommen und mit 14.000 g bei 4 °C 5 min zentrifugiert. Der Überstand stellt das amplifizierte Phagen-Eluat dar, welches in weiteren Panning-Runden eingesetzt werden kann.

2.4.8. Bestimmung des Phagentiters

Eine auf LB-Tet-Medium selektierte *E. coli*-ER2738 Bakterienkolonie wurde in 50 ml LB-Medium bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 vermehrt. Anschließend wurden Röhrchen mit 200 µl *E. coli*-ER2538 Kultur vorbereitet. Agarose Top wurde in der Mikrowelle geschmolzen, zu 3 ml aliquotiert und in einem 45 °C warmen Heizofen aufbewahrt, während LB/IPTG/Xgal-Platten bei 37 °C vorgewärmt wurden. Von der zu bestimmenden Phagenlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 10 µl der einzelnen Verdünnungen für 2 min bei Raumtemperatur in den vorbereiteten *E. coli* -ER2538 Kulturröhrchen inkubiert.

Ansätze an Verdünnungsreihen für die Phagentiterbestimmung:

Amplifiziertes Phageneluat: 10⁶-10¹¹

Panning-Eluat: 10¹-10⁴

Die infizierten Bakterien wurden zu den 2,5 ml 45 °C warmer Agarose Top gegeben, gut gemischt und zügig auf die vorbereiteten LB/IPTG/Xgal-Platten gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten maximal 12 h bei 37 °C inkubiert.

Agarose Top:

5 g Bacto-Tryptone

2,5 g Yeast-Extrakt

2,5 g NaCl

0,5 g MgCl₂ x 6 H₂O

3,5 g Agarose

Die Substanzen wurden in 500 ml ddH₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

LB/IPTG/Xgal – Platten:

10 g Bacto-Tryptone

5 g Yeast-Extrakt

5 g NaCl

15 g Agar

Die Substanzen wurden in 1000 ml ddH₂O gemischt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 70°C wurde 1 ml einer IPTG/Xgal-Lösung hinzugegeben.

IPTG/Xgal-Lösung:

1,25 g IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid)

1 g Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Dgalactosid)

Die Substanzen wurden in 25 ml Dimethylformamid gelöst und bei -20°C im Dunkeln gelagert.

In dem auf den IPTG/Xgal-Platten wachsenden Bakterienrasen erscheinen phageninfizierte Bakterienklone als transparente Stellen, die als Plaques bezeichnet werden. Die Random-Peptid-Phagen der Bibliothek wurden mit dem das *lacZα*-Gen enthaltende M13mp19-Vektor kloniert, so dass die mit ihnen infizierten Bakterienklone auf LB/IPTG/Xgal Platten blaue Plaques bilden. Durch eventuelle Verunreinigungen amplifizierte Wildtyp-Phagen würden dagegen weiße Plaques bilden. Bei den jeweiligen Platten der Verdünnungsreihen mit idealerweise ca. 100 Plaques wurden die blauen Plaques ausgezählt und der Phagentiter in pfu (*plaque forming units*)/10μl bestimmt.

2.4.9. Amplifikation einzelner Phagenklone

Eine auf LB-Tet-Medium selektierte *E. coli*-ER2738 Bakterienkolonie wurde in 50ml LB-Medium bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator über Nacht vermehrt. Anschließend wurde die Kultur 1:100 in LB Medium verdünnt und 15

ml Falcontubes zu 2 ml vorbereitet. Die *E. coli* ER2737 Kulturen wurden mit einzelnen Blau-Plaques von LB/IPTG/Xgal-Platten (z.B. von der Titerbestimmung) infiziert und weitere 4,5 h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für 10 min wurde der Phagenüberstand abpipettiert. Die Isolierung der amplifizierten Phagen erfolgte durch PEG/NaCl-Präzipitation mit anschließender Aufnahme der Phagen in 50 µl PBS mit 0,02 % NaN₃. Die amplifizierten Phagenklone wurden sowohl für Bindungsexperimente als auch für nachfolgende Isolierung von einzelsträngiger DNA eingesetzt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Phagen 1:2 mit Glycerol verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.10. Aufreinigung von Einzelstrang-DNA aus Phagen zur Sequenzierung

In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 100 µl NaJ-Lösung mit 10 µl der Phagensuspension der Einzelklonaufreinigung (siehe 2.5.8.) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Ethanol (100 %) dazugegeben und der Ansatz zur DNA-Präzipitation über Nacht bei -20°C gelagert. Im weiteren Verlauf wurde die Einzelstrang-DNA durch 15 min Zentrifugation bei 14.000 g gefällt, der Überstand abgenommen und die präzipitierte DNA mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach 1 min Zentrifugation bei 14.000 g wurde nochmals der Überstand abgenommen und die Proben bei RT getrocknet. Letztlich wurden die DNA-Proben mit den zugehörigen Primern versetzt (1 picomol pro Ansatz) und sequenziert.

2.4.11. Charakterisierung der Bindungs-Affinität der Phagenklone zu CEACAM1 durch ELISA

Auf Polystyrol-ELISA-Platten wurden 0,2 µg rCEACAM1 in 100 µl PBS je Reaktionsgefäß (*Well*) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Als Negativkontrolle

wurde jeweils ein *Well* nur mit 100 μ l PBS gefüllt. Der Überstand wurde abpipettiert (und aufbewahrt für weitere Experimente) und die *Wells* mit jeweils 250 μ l Blockierlösung 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die ELISA-Ansätze 2x mit HBSS + Ca^{2+} -T (0,5 %) gewaschen und jeweils 2 *Wells* mit 2 μ l Einzelklon-Phagensuspension in 100 μ l Inkubationspuffer [HBSS + Ca^{2+} + T(0,5 %) + BSA (0,1 %)] versetzt. Die Phagensuspensionen wurden dann 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach Abgießen der Lösungen wurde 5x mit 300 μ l HBSS+ Ca^{2+} -T (0,5 %) gewaschen. Pro *Well* wurden dann 200 μ l Anti-M13-Antikörperlösung hinzugeben und der ELISA-Ansatz 1 bei RT unter Schütteln inkubiert.

Anti-M13-Antikörper-Lösung:

HRP (*Horseradish Peroxidase*)- konjugierter Anti-M13 monoklonaler Antikörper 1:5000 verdünnt in HBSS+ Ca^{2+} +T (0,5 %)+BSA (0,1 %).

ABTS-Lösung (pH 4,0):

0,25 mg /ml ABTS

0,05 M Natriumcitrat

Es wurden jeweils 3 μ l 30 % H_2O_2 /ml frisch zugesetzt.

Die Extinktionen wurden im ELISA-READER bei 405 nm gemessen.

2.6. Invasionsassay mit Melanomzellen

In dieser Testreihe wurde die Wirkung von Peptiden, welche durch *Random Phage Display* gegen CEACAM1 selektiert worden waren, auf die Invasivität von Melanomzellen in einem *in vitro* Invasionsassay untersucht. Dabei wurden zunächst eine CEACAM1 exprimierende Melanom-Zelllinie und eine Zelllinie ohne CEACAM1 eingesetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden auch Zellen der CEACAM1 exprimierenden Melanomzelllinie G361 in diesem System

untersucht. Dieses Experiment wurde mit dem *BioCoat Matrigel Invasion*-System der Firma BD durchgeführt, mit denen *in vitro* das invasive Verhalten maligner Zellen im Vergleich zu normalen, bzw. anders transfizierten Zellen untersucht werden kann. Insbesondere kann das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen in Relation zur Expression bestimmter Zelladhäsionsproteine sowie der Einfluss von Cytostatika und Antikörpern auf maligne Zellen erforscht werden. Die Matrigel Invasionskammern bestehen aus Zellkultureinsätzen (*Falcon Cell Culture Inserts*), deren Boden aus einer perforierten Membran (Porenweite: 8 μm) besteht. Diese Membran ist mit einer dünnen Matrigelschicht bedeckt, welche ein *in vitro* Äquivalent einer Extrazellulären Matrix (ECM) darstellen soll. Unterhalb der Invasionskammern befindet sich nährstoffreiches Medium, so dass die Zellen bestrebt sind dorthin zu gelangen. Während nicht invasive Zellen außerstande sind, die Matrigelschicht zu überwinden, können invasive Zelltypen die Matrigelschicht durchwandern und durch die 8 μm großen Membranporen in die nährstoffreiche Gelmatrix unterhalb der Zellkultureinsätze eindringen.

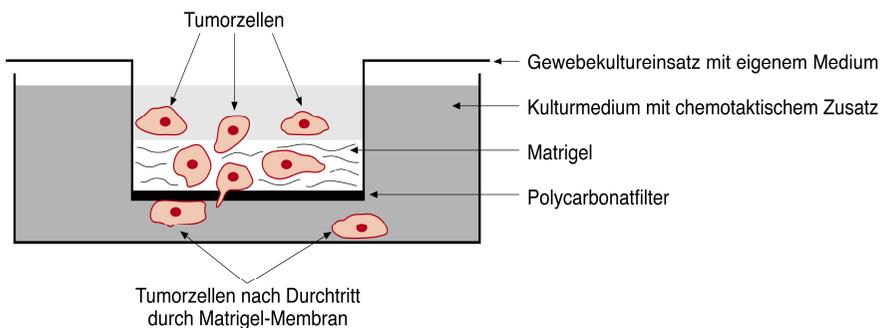


Abb.6: Schematische Darstellung eines Invasionsassays. Um in das Nährstoff reichere Kulturmedium zu gelangen migrieren die dazu fähigen Tumorzellen durch die Matrigelschicht, welche als Simulation einer extrazellulären Matrix (ECM) fungiert. Nicht invasive Zelltypen verbleiben im Gewebekultureinsatz und können durch Waschen entfernt werden (Wagener, 1999).

Nach Beendigung des Invasionsassays werden alle Zellen oberhalb der Membran entfernt. Die invasiven Zellen, welche die Membran durchwandern

konnten, werden dagegen fixiert und angefärbt, um sie nachfolgend im Mikroskop zu quantifizieren.

2.7.1. Durchführung der Invasionsassays

Vorbereitung der *BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion* – Kammern

Die Invasionskammern wurden den Herstellerangaben entsprechend aufgetaut, rehydratisiert und für die folgenden Experimente präpariert (*BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber–Guidelines for use*, Catalog No. 354480). Untersucht wurden zunächst die Zelllinien MV3, die keine CEACAM1-Expression aufweist, und MV3-CEACAM1-L, die durch stabile Transfektion der MV3-Zelllinie mit CEACAM1 generiert worden ist. In jede Vertiefung wurden 750 µl RPMI-Medium (+FCS) pipettiert und die *Inserts* luftblasenfrei eingesetzt. Dann wurde jede Invasionskammer mit $2,5 \times 10^4$ Einzelzellen in 500 µl RPMI-Medium versetzt, anschließend wurden 750 µl der verschiedenen konzentrierten Peptid-Lösungen in RPMI hinzugegeben. Zur Beobachtung der Zelllinien ohne Peptideinwirkung wurden jeweils 750 µl reines Medium hinzupipettiert. Für jede Peptidkonzentration, bzw. jeden Kontrollwert wurden mindestens 3 Invasionskammern mit Zellen belegt.

Die Invasionskammern wurden über 24 h in einem Inkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht invasiven Zellen, welche in der äußeren Invasionskammer verblieben sind durch spezielles Waschen (*Scrubbing*) entfernt. Die durchgewanderten Zellen auf der unteren Seite der Invasionskammer wurden dagegen mit dem Diff-Quick™-Verfahren nach Herstellerangaben gefärbt und fixiert. Daraufhin wurden die Zellen in den Invasionskammern unter 20 x Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde je Invasionsassay 3 verschiedene Sichtfeldauschnitte im Mikroskop ausgezählt

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von nativem und rekombinantem CEACAM1

Das native CEACAM1 wurde von Frau Dr. Horst aus dem Institut für Klinische Chemie bereitgestellt. Es wurde aus Granulozyten-Extrakt aufgereinigt. Das rekombinante CEACAM1 wurde gemeinsam mit Dr. Nollau aus dem Institut für Klinische Chemie mit transformierten CHO-Zellen hergestellt (siehe Abb. 7).

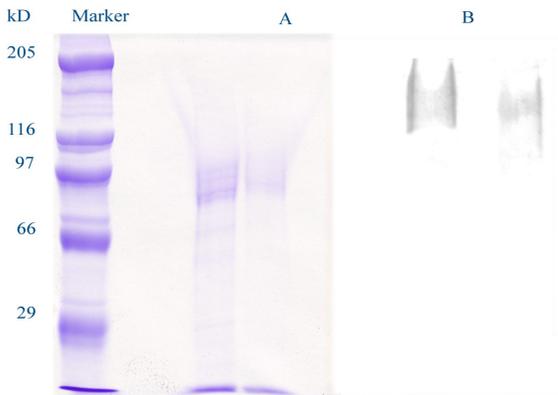


Abb.7: SDS-PAGE Gele (7,5 %) verschiedener CEACAM1 Präparationen. A: rekombinantes rCEACAM1 als Commassiefärbung; B: natives CEACAM1 als Silberfärbung. Aufgrund des fehlenden transmembranösen und cytoplasmatischen Anteils und der unvollständigen rekombinanten Glycosylierung weist rCEACAM1 ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa auf, während das vom nativen CEACAM1 ca. 160 kDa ausmacht.

Die CEACAM1-Präparationen wurden bei den verschiedenen *Random-Phage-Display Screenings* sowie bei nachfolgenden ELISA-Experimenten als Zielmolekül eingesetzt.

3.2. Identifizierung von CEACAM1 bindenden Peptiden mit Hilfe des *Random Phage Display Systems*

Zur Identifizierung von CEACAM1-Bindungspeptiden wurde das *Phage Display* Verfahren unter Verwendung der *Ph.D.-12TM* Bibliothek von New England Biolabs gewählt. Die Library besteht aus linearen Dodekapeptiden und besitzt eine Komplexität von ca. $2,7 \times 10^9$ verschiedenen Peptidsequenzen. Diese variablen Peptidsequenzen werden auf der Phagenoberfläche präsentiert und können bei ausreichend hoher Affinität mit CEACAM1, das an eine feste Oberfläche fixiert ist, eine Bindung einzugehen.

Mit diesem Verfahren besteht beim Einsatz von $2,7 \times 10^9$ Phagen zum 1. Panning eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass hochaffine bindende Motive selektioniert werden können. Diese Peptid-Bibliothek aus linearen Dodekapeptiden ermöglicht dabei im Vergleich zu zyklischen Heptapeptid-Bibliotheken sowohl die Selektion von vollständigen Bindungspeptidmotiven als auch von diskontinuierlichen oder konformationsabhängigen Bindungspeptiden.

3.2.1. Isolierung von CEACAM1 Bindungspeptiden durch *Biopanning*

Es wurden insgesamt 3 *Random Phage Display* Panning-Experimente gegen CEACAM1 und CEACAM1-Einzeldomänen bei unterschiedlichen Temperaturen mit jeweils 3 Panningschritten durchgeführt.

Panning 1 (nC-4°C) :	natives CEACAM1 bei 4°C
Panning 2 (rC-4°C):	rekombinantes CEACAM1 bei 4°C
Panning 3 (rC-37°C):	rekombinantes CEACAM1 bei 37°

Der Vorteil eines Pannings bei 4°C ist, dass das Zielprotein länger stabil bleibt, da Degradations- und Abbauprozesse langsamer ablaufen. Dem gegenüber ist die Wahrscheinlichkeit bei 37°C höher, physiologisch relevante Interaktionspartner zu finden.

<i>Biopanning</i> Ansatz	Nat. CEACAM1- 4°C	Rek. CEACAM1 4°C	Rek. CEACAM1 37°C
Phagentiter nach dem 3. Panning (in pfu)	2,5 x 10 ³	8,0 x 10 ²	3,5 x 10 ³
Sequenzierte Einzelklone	35	32	28
Konsensus-Sequenzen	7	6	3

Tabelle 1: Übersicht über die erfolgten *Biopanning*-Experimente und deren Ergebnisse.

3.2.2. Durchführung von Kontroll-ELISA zur Identifizierung von CEACAM1 bindender Peptid-Phagen

Nach Amplifizierung von Einzelklonen wurden Kontroll-ELISA's durchgeführt, in welchen geprüft wurde, ob die amplifizierten Phagenklone eine ausreichend hohe Affinität zu CEACAM1 aufweisen (siehe Abb. 8 und 9). Sequenziert

wurden nur diejenigen Klone, deren Extinktion im ELISA gegen CEACAM1 mindestens dreimal höher war als die der Negativkontrolle.

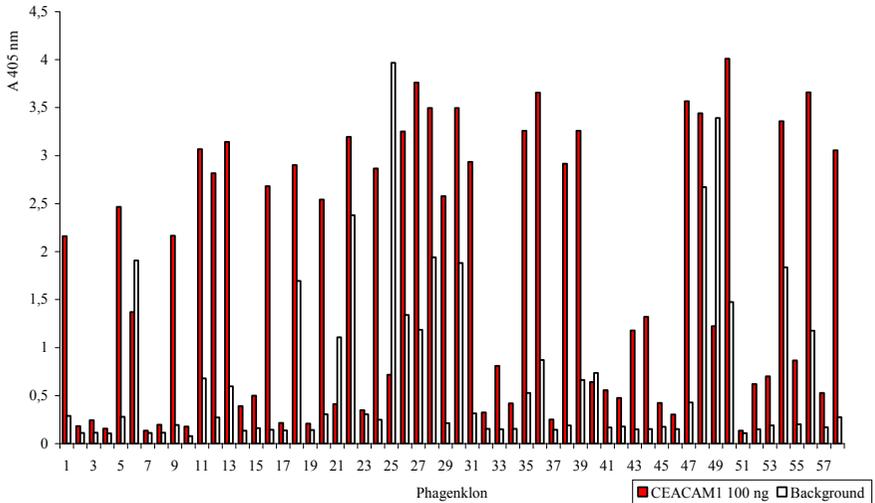


Abb. 8: Beispiel eines ELISAs zur Detektion von hochaffinen Phagenklonen gegen CEACAM1. Es wird deutlich, daß mindestens die Hälfte der gefundenen Phagenklone eine hohe Affinität zu CEACAM1 aufweisen, aber vereinzelt auch BSA-Binder selektiert worden sind.

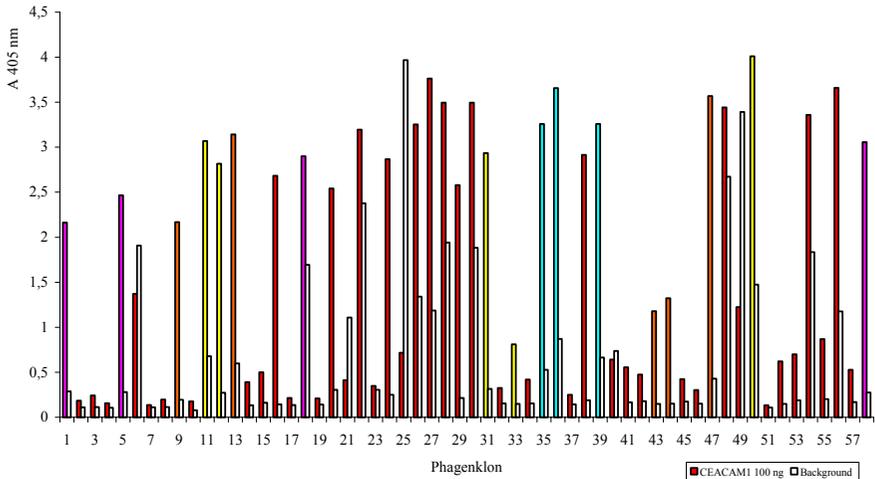


Abb. 9: Darstellung entdeckter Konsensus-Sequenzen innerhalb des ELISAs von Abb. 18 durch die Einzelfarben Violet, Gelb und Hellblau. Einmal entdeckte oder nicht sequenzierte Phagenklone sind weiterhin ROT gefärbt.

3.2.3. Darstellung der gefundenen Peptidsequenzen

Die Peptidsequenzen der selektierten Phagenklone sind in den Tabellen 2., 3. und 4. dargestellt, wobei jede Tabelle die Sequenzen des 3. Pannings eines *Random-Phage-Display*-Experiments enthält. Die Sortierung der Phagenklone in den Tabellen erfolgte nach folgenden Prioritäten:

- 1) Anzahl gefundener Klone mit gleichen Sequenzen (Konsensussequenzen)
- 2) übereinstimmende Sequenz-Motivmuster

Mehrfach auftretende Klone mit gleicher Sequenzen werden auch als „Konsensussequenzen“ bezeichnet. Ihr Vorkommen belegt, dass im Verlauf der *Panning*-Experimente Peptid-Phagen mit hoher Affinität zu CEACAM1 angereichert wurden.

Ein weiteres Prioritätskriterium ist das Auftreten übereinstimmender Sequenz-Motivmuster innerhalb verschiedener Dodekapeptide, wobei Homologien ab 3 Aminosäuren je Dodekapeptid berücksichtigt und farbig markiert wurden. Peptide mit homologen Sequenzmotiven wurden jeweils in Gruppen eingeteilt, die der Übersicht halber durch Querstriche abgetrennt sind. Sich entsprechende Aminosäuren wurden dabei primär durch die Farbe **Rot** hervorgehoben, in größeren „Motivgruppen“ wurde im Falle verschiedener Homologien auf einer Aminosäureposition auch noch die Farbe **Grün** verwendet. Bei der Markierung dieser Motive wurde berücksichtigt, dass bestimmte Aminosäuren eine große strukturelle und chemische Ähnlichkeit zu anderen Aminosäuren besitzen. So wurden z.B. die Aminosäuren Serin bei der Motivbetrachtung als äquivalent zu Threonin, bzw. Tyrosin als äquivalent zu Phenylalanin angesehen. Auch die stark hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin wurden in diesem Kontext als äquivalent eingestuft.

Anzahl der Phagen-Klone	<i>Random-Phage-Display-Experiment 1: natives CEACAM1 bei 4°C</i>											
	Aminosäureposition im Phagen-Peptid											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Phagen-Klone mit Konsensussequenzen und homologen Sequenzmotiven											
5	V	L	P	P	A	L	E	I	T	P	L	T
2	T	L	P	S	P	L	A	L	L	T	V	H
5	H	G	N	W	S	S	F	F	Q	S	Y	V
2	H	M	H	H	M	T	H	P	G	Y	Y	P
1	H	M	H	H	M	T	H	R	G	Y	Y	R
1	H	M	A	H	N	H	G	R	S	H	L	L
1	H	M	F	D	R	F	K	T	M	A	F	A
2	H	W	S	F	W	T	S	W	A	R	P	P
2	T	W	Q	E	W	S	W	W	H	P	G	P
1	T	W	D	Y	S	Y	W	W	F	T	P	V
2	N	N	D	T	V	L	I	S	P	T	A	S
1	A	N	T	Q	Q	L	N	S	L	Q	R	L
1	W	H	W	S	S	P	L	H	W	Y	N	P
1	W	H	S	Q	Y	T	P	W	W	R	G	S
1	W	H	X	Q	W	P	P	W	S	I	Q	P
1	W	H	W	Q	W	T	P	W	S	I	Q	P
1	G	T	R	H	W	G	S	R	T	I	Q	L
	Phagen-Klone ohne übereinstimmende Sequenzmotive											
1	G	T	R	H	W	G	S	R	T	I	Q	L
1	G	S	L	L	D	P	R	M	L	Y	S	H
1	F	H	K	N	X	P	I	W	W	X	P	P
1	D	A	Q	Q	L	Y	L	S	N	W	R	S
1	Q	D	V	H	L	T	Q	Q	S	R	Y	T

Tabelle 2: Peptidsequenzen der 35 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des *Random-Phage-Display-Experiments 1* (nC-4°C) : natives CEACAM1 bei 4°C. Zur Übersicht wurden Peptide mit homologen Sequenzabschnitten durch Querstriche zusammengefasst. Einzelne Sequenzmotive sind rot markiert.

Anzahl der Phagen-Klone	<i>Random-Phage-Display-Experiment 2: rekomb. CEACAM1 bei 4°C</i>											
	Aminosäureposition im Phagen-Peptid											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Phagen-Klone mit Konsensussequenzen und homologen Sequenzmotiven											
4	H	A	A	H	M	S	T	A	R	L	Y	L
4	A	K	T	E	L	R	D	L	G	Y	A	S
3		T	L	P	S	P	L	A	L	L	T	VH
2	I	S	P	A	V	P	L	Q	P	I	L	A
2	I	S	L	R	P	T	M	N	F	T	N	L
1	T	G	L	G	V	P	L	W	F	A	Q	W
1	T	P	P	P	R	L	H	S	P	I	Q	L
1	H	V	L	N	L	R	A	G	L	L	T	T
1	T	A	I	P	Y	W	L	Y	S	R	A	L
2	G	I	S	W	Q	Q	S	H	H	L	V	A
1	G	I	W	C	Q	Q	S	H	H	L	V	A
	Phagen-Klone ohne übereinstimmende Sequenzmotive											
1	H	S	Q	Q	N	L	W	M	A	M	L	R
1	H	S	S	P	H	F	S	R	H	G	L	L
1	I	S	S	P	R	S	A	P	T	P	P	Y
1	H	V	L	N	L	R	A	G	L	L	T	T
1	X	P	W	R	D	G	L	Q	L	T	L	X
1	F	M	P	W	S	N	P	A	S	P	R	H
1	S	G	A	L	S	P	N	P	S	T	L	P
1	N	S	N	N	A	T	L	Y	P	V	R	P
1	D	G	A	A	N	S	V	P	G	L	I	K
1	Y	M	D	P	L	F	P	T	Q	A	S	P

Tabelle 3: Peptidsequenzen der 32 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des *Random-Phage-Display-Experiments 2* (nC-4°C): rekombinantes CEACAM1 bei 4°C. Zur Übersicht wurden Peptide mit homologen Sequenzabschnitten durch Querstriche zusammengefasst. Einzelne Sequenzmotive sind rot, grün und violett markiert.

Anzahl der Phagen-Klone	<i>Random-Phage-Display-Experiment 3: rekomb. CEACAM1 bei 37°</i>											
	Aminosäureposition im Phagen-Peptid											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Phagen-Klone mit Konsensussequenzen und homologen Sequenzmotiven											
7	S	S	A	W	W	S	Y	W	P	P	V	A
1	T	T	Q	L	F	S	S	W	R	L	V	T
2	H	F	W	S	P	W	N	Y	F	E	N	Y
2	W	T	P	F	G	P	A	T	W	P	W	Y
1	W	X	T	P	Q	Q	Y	W	W	F	D	Y
1	T	W	M	Q	P	F	W	Y	F	P	A	S
1	X	R	M	Q	P	C	W	Y	F	P	A	S
1	F	W	T	P	P	L	L	P	F	D	W	F
1		W	I	P	P	L	L	M	P	W	M	YQ
1	H	F	P	T	F	W	N	E	W	Y	L	P
1	N	H	P	H	W	Q	I	Q	H	K	L	P
1	T	F	Y	D	W	Y	W	S	P	F	P	T
1	I	E	N	V	G	W	P	V	W	I	P	E
1	S	W	T	W	T	W	G	A	F	L	P	A
1	S	Y	P	M	S	W	W	N	W	T	P	L
1	H	H	D	T	L	T	W	S	W	L	T	W
1	H	F	F	P	P	T	I	P	H	F	F	W
	Phagen-Klone ohne übereinstimmende Sequenzmotive											
1	E	H	R	H	P	I	S	F	L	S	T	L
1	A	H	N	L	N	Y	K	P	L	R	H	P
1	F	R	F	G	I	M	L	I	L	H	G	R

Tabelle 4: Peptidsequenzen der 28 sequenzierten Phagenklone im 3. Panning des *Random-Phage-Display-Experiments 3* (rC-37°C) : rekombinantes CEACAM1 bei 37°. Zur Übersicht wurden Peptide mit homologen Sequenzabschnitten durch Querstriche zusammengefasst. Einzelne Sequenzmotive sind rot und grün markiert.

In allen drei Panning-Experimenten konnten CEACAM1 bindende Phagen selektiert werden, wobei zahlreiche Konsensussequenzen identifiziert wurden (siehe Abb. 9). Darüber hinaus wurden einzelne Sequenzmotive bei verschiedenen Experimenten übergreifend gefunden. Beispielsweise wurde die Sequenz TLPSPALLTVH sowohl beim *Random-Phage-Display*-Experiment 1 (natives CEACAM1 4°C) als auch beim *Random-Phage-Display*-Experiment 2 (rekombinantes CEACAM1 4°C) entdeckt. Darüber hinaus lässt sich dass darin enthaltene Sequenzmuster TLPXXLXLXXVX bei verschiedenen anderen experimentell entdeckten Sequenzen finden.

3.2.4. Quantitativer ELISA mit einem Phagenklon

Der SSA-Phagenklon aus dem Panningdurchgang 3 (rekombinantes CEACAM1 bei 37°) wurde insgesamt 7 mal gefunden und ist somit der am häufigsten gefundene Phagenklon aller Panningexperimente. Daher wurde er für einen quantitativen ELISA ausgewählt (siehe Abb. 10).

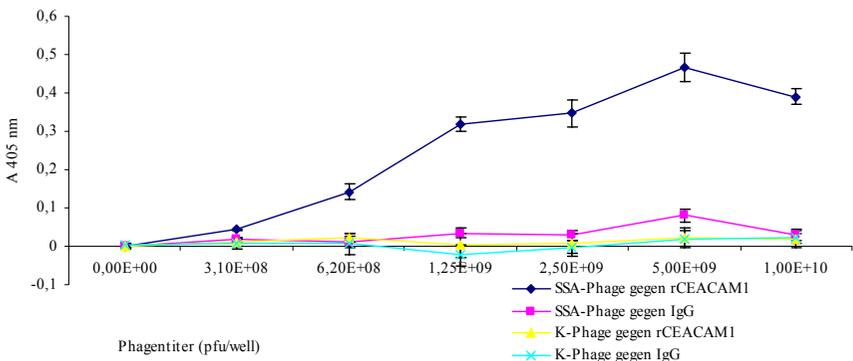


Abb. 10: Charakterisierung der Affinität des SSA-Phagenklons zu rCEACAM1. Verschiedene Konzentrationen des SSA-Phagenklons und eines nicht rCEACAM1 affinen Kontrollphagens wurden zu rCEACAM1 (1 µg/well), IgG (1 µg/well) und zu BSA (Blockierlösung, 5 mg/ml) gegeben, um dessen Affinität zu rCEACAM1 darzulegen. Der Extinktionswert des BSA wurde als Hintergrund den beiden Werten abgezogen.

3.2.5. Suche nach physiologischen CEACAM1-Interaktionspartnern über Sequenzhomologien zu Peptiden des *Random Phage Display Biopannings*

Die Konsensussequenzen der CEACAM1 bindenden Peptide wurden durch Recherchen in der *Swiss-Prot*-Proteindatenbank mit Hilfe von Standard-suchmaschinen des NCBI auf Homologien zu bekannten Proteinen untersucht, um so potentielle physiologische Liganden von CEACAM1 zu entdecken. Die Suche nach übereinstimmenden Sequenzmotiven wurde mit dem Programm *BLAST-RESEARCH* durchgeführt. Der Einsatz dieser Suchmaschine liefert einen Wert (*E Value*), der auf der Übereinstimmung in der Sequenz beruht (*Score*) und die Aussagekraft des Ergebnisses widerspiegelt. Ein Wert von 1 entspricht dabei der Wahrscheinlichkeit, dass in der *Swiss-Prot*-Bibliothek der aktuellen Größe von 167089 Einträgen eine weitere Sequenz mit demselben *Score* zufällig gefunden wird. Aufgrund der kurzen Sequenzen, die in der Suche eingesetzt wurden, musste der „*Expect*“-Wert (E-Wert) von 10 auf 1000 erhöht werden, um die statistische Schwelle der Signifikanz zu erweitern.

Da Bindungsmotive nur selten aus zwölf Aminosäuren bestehen, sondern zumeist erheblich kürzer sind (4 – 7 Aminosäuren), wurden bei der Datenbankanalyse auch Teilhomologien berücksichtigt. Es konnte kein Protein identifiziert werden, welches eine komplette Peptid-Sequenz beinhaltet, aber es wurden viele Proteine mit 50 - 90%iger Übereinstimmung zu den gefundenen 12-Aminosäure-Peptiden entdeckt, z.B. Integrin alpha 10, Endoglin, VEGFR 3 und das Melanoma assoziierte Antigen (siehe Tab. 6). Es wurden auch diverse Peptide mit Sequenzhomologien zu Mitgliedern der CEA-Familie gefunden (siehe Abb. 5). Sequenzhomologien von weniger als 5 Aminosäuren fanden bei der Suche nach potenziellen Liganden pauschal keine Berücksichtigung, da mit der steigenden Häufigkeit derartiger Treffer gleichzeitig deren Signifikanz abnimmt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein Peptid ein

diskontinuierliches Bindungsepitop mimikriert, in einem solchen Fall ließe sich nicht von der gefundenen Sequenz auf einen physiologischen Interaktionspartner schließen.

Die *Swiss-Prot*-Datenbank wurde mit sämtlichen gefundenen Sequenzen nach Teilmotiven hin durchsucht. Darüber hinaus wurde die Auswahl auf Proteine beschränkt, welche wie CEACAM1 membranständig positioniert sind, da nur solche Proteine überhaupt in der Lage sind mit CEACAM1 zu interagieren. Da dass beim *Random Phage Display* eingesetzte rekombinante CEACAM1 nur über den extrazellulären und transmembranösen Anteil von CEACAM1-L verfügte, wurden ausschließlich extrazellulär exprimierte Proteine, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle sowie deren transmembranöse Anteile betrachtet. Auch wurde auf einen thematischen Zusammenhang mit Tumorprogression, Zelladhäsion und Angiogenese geachtet, wobei die Gene Ontology Database als Referenz hinzugezogen wurde. Dennoch wurden über die Sequenzhomologien mehr als zweihundert *potenzielle* Interaktionspartner gefunden. Um die Signifikanz dieser *potenziellen* Interaktionspartner zu hinterfragen, wurde eine Betrachtung bereits bekannter Liganden durchgeführt (siehe Tab. 5).

Sequenz	Homologie-Parameter	Protein
HLPHRSNPGPQC		
Query: 6 SNPGPQ 11 SNP PQ Sbjct: 619 SNPSFQ 624	Expect = 236 Identities = 5/6 (83%) Positives = 5/6 (83%)	CEA5_HUMAN (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5)
WXTPQQYWFFDY		
Query: 4 PQQYWWF 10 P QY WF Sbjct: 266 PAQYSWF 272	Expect = 99 Identities = 5/7 (71%) Positives = 5/7 (71%)	CEA6_HUMAN (Nonspecific crossreacting antigen)
Query: 4 PQQYWWF 10 P QY WF Sbjct: 266 PAQYSWF 272	Expect = 99 Identities = 5/7 (71%) Positives = 5/7 (71%)	CEA5_HUMAN (Carcinoembryonic antigen)

Tabelle 5: Auswahl von Sequenzhomologien zu gefundenen CEACAM1 bindenden Dodeka-Peptiden vom *Random Phage Display Biopanning* zu Mitgliedern der CEA-Familie.

Sequenz	Homologie-Parameter	Protein
SSAWWSYWPPVA		
Query: 1 SSAWWS 6 SS+WWS	Expect = 8.4 Identities = 5/6(83%) Positives = 6/6(100%)	Hemagglutinin-neuraminidase
Sbjct:411 SSSWWS 416		
Query: 1 SSAWW 5 SSAWW	Expect = 11 Identities=5/5 (100%) Positives = 5/5(100%)	Insulin receptor precursor (IR) (CD220 antigen)
Sbjct:124 SSAWW 128		
Query: 1 SSAWWSYWPP 10 SSAWW PP	Expect = 40 Identities=7/10(70%) Positives =7/10 (70%)	Insulin-induced protein
Sbjct:124 SSAWWV--PP 131		
Query: 5 SSSFFQSY 11 SSFF SY	Expect = 30 Identities = 6/7 (85%) Positives = 6/7 (85%)	Melanoma-associated antigen C1
Sbjct:780 SSSFF-SY 785		
Query: 5 SSSFFQSYV 12 S FF YV	Expect = 30 Identities = 5/8(62%) Positives = 5/8(62%)	Endothelin-converting enzyme1 (ECE-1)
Sbjct:226 SPFFSVYV 233		
ISPAVLPQILA		
Query: 6 PLQPIL 11 PLQPIL	Expect = 16 Identities = 6/6 (100%) Positives = 6/6 (100%)	Integrin alpha-IV (VLA-4) (CD49d)
Sbjct: 604 PLQPIL 609		
Query: 3 PAVPLQPI 10 P+VPL PI	Expect = 29 Identities = 6/8(75%) Positives = 7/8 (87%)	Insulin receptor precursor (IR) (CD220 antigen)
Sbjct: 622 PSVPLDPI 629		
Query: 1 AKTELRLDGYA 11 A +LRDLG A	Expect = 4011 Identities = 7/11 (63%) Positives = 8/11 (72%)	Insulin-like growth factor binding protein complex acid labile
Sbj :590 AGLDLRLDGEA 600		
IPPHWKTYTIT		
Query: 1 IPPPHWKTYT 10 I PWH TY+	Expect = 1056 Identities = 6/10 (60%) Positives = 7/10 (70%)	B-cell receptor CD22 (Siglec-2)
Sbjct:386 ILPPWHAGTYYS 395		
Query: 4 WHWKTYT 10 WHW+ +T	Expect = 474 Identities = 4/7 (57%) Positives = 6/7 (85%)	Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3)
Sbjct:458 WHWRPWT 464		
WHWQWTPWSIQP		
Query: 1 WHWQ-WTP 7 WHW+ WTP	Expect = 3.7 Identities = 6/8 (75%) Positives = 7/8 (87%)	Vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor (VEGFR-3)
Sbjct:348 WHW WTP 355		
VLPPALEITPLT		
Query: 2 LPPALEITP 10 L P+LE+TP	Expect = 39 Identities = 6/9 (66%) Positives = 8/9 (88%)	Integrin alpha-10 precursor
Sbjct:648 LTPSLEVTP 656		
Query: 1 VLPPALEITPLT 12 V+P A TPLT	Expect = 3071 Identities = 7/12 (58%) Positives = 8/12 (66%)	Breast carcinoma amplified sequence 3 (GAOB1) (Maab1 protein)
Sbjct:43 VVPQAYSGLTPT 54		
TKVXMRLLMVSX		
Query: 3 VXMRLLMVS 11 V MRL +VS	Expect = 320 Identities = 6/9 (66%) Positives = 7/9 (77%)	ENDOGLIN PRECURSOR (CELL SURFACE MJ7/18 ANTIGEN)
Sbjct: 566 VSMRLNIVS 574		

Tabelle 6: Auswahl bestimmter Sequenzhomologien zu gefundenen CEACAM1 bindenden Dodeka-Peptiden vom *Random Phage Display* Biopanning im Bezug auf Zelladhäsionsmoleküle im Angiogenese- und Karzinogenesekontext.

Da CEACAM1 ein angiotaktischer Faktor ist, sind direkte Wechselwirkungen mit dem VEGF-Rezeptor 3 oder auch mit dem Insulin-Rezeptor denkbar. Zur Einschränkung der großen Anzahl *potenzieller* Interaktionspartner wurde deren Genexpressionsregulierung mit der Regulation der CEACAM1-Expression in verschiedenen physiologischen Zellwachstums-Experimenten durch die Genearray-Technologie (Affymetrix) verglichen (siehe Kapitel 3.5.7.).

3.2.6. Sequenzhomologien mit Bezug zur homophilen Interaktion

Bezüglich des extrazellulären Anteils ist CEACAM1 selbst der am besten charakterisierte Ligand von CEACAM1. Wie die andere Mitglieder der CEA-Familie bildet CEACAM1 Dimere in *cis* als auch in *trans* (Zhou *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1996). Entscheidend für die homophile Interaktion ist bei CEACAM1 die V1-Domäne (Watt *et al.*, 2001). Auch bei CEA (CEACAM5) wurde die essentielle Bedeutung der V1-Domäne entdeckt (siehe Abb. 11), wobei diese mit der variable Domäne von CEACAM1 strukturell fast identisch ist (siehe Abb. 12). In diesem Zusammenhang wurden die Bedeutung einzelner Subdomänen der V1-Domäne untersucht, indem Zellaggregationsassays mit verschiedenen CEA transfizierten CHO-Zellen durch geführt wurden. Bei 3 Subdomänen wurden einzelne Aminosäuren substituiert. Die jeweiligen CHO-Transfektanten wurden in Zellaggregationsassay hinsichtlich der homophilen Interaktion beobachtet (Taheri *et al.*, 2000).

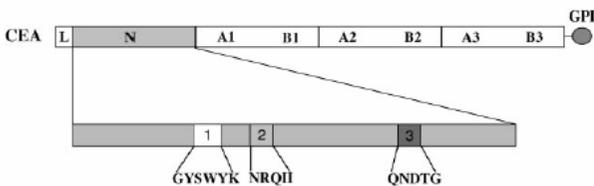


Abb. 11: Schematische Darstellung des Domänen-Aufbaus von CEA und von Sequenzabschnitten der (V1)-Domäne mit besonderer Bedeutung für die homophile Interaktion von CEA (Taheri *et al.*, 2003).

Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Skubitz <i>et al.</i> , 2001):	54-VHNLPPQQLF	GYSW ---
68		
Essentielle Subdomäne für Interzelluläre Adhäsion (Taheri <i>et al.</i> , 2000):	64-	GYSWK -
70		
RPD-Peptid aus Panning 4:	KXXXXP	YSWF IPF

Abb. 14: Vergleichende Darstellung eines Sequenzabschnitts von CEACAM1 mit essentieller Bedeutung für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und für die Interzelluläre Adhäsion mit einer Peptidsequenz aus dem *Random Phage Display Biopanning*.

Die beim Phage Display selektierten Peptide KXXXXPYSWFIPF und NNDTVLISPTAS enthalten also Teilstrukturen, welche bei der homophilen Interaktion von CEA (und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch von CEACAM1) von Bedeutung sind.

3.2.7. Datenabgleich mit Microarray Experimenten (Affymetrix)

Zur Einschränkung der über Sequenzhomologien gefundenen großen Anzahl *potenzieller* Interaktionspartner wurde die Regulierung ihrer Genexpression in Relation zur CEACAM1-Expression in verschiedenen Experimenten mit der Genarray-Technologie (Affymetrix) verglichen. So wurden z.B. Endothelzellen mit VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) stimuliert (Streichert *et al.*, 2003). In Zeitabständen wurden Zellen entnommen, die einem bestimmten Zeitpunkt entsprechende mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch Hybridisierung der jeweiligen cDNA mit den Genarray-Chips kann das Ausmaß der Regulation bestimmter Gene in Relation zum Zeitpunkt bestimmt werden. Diese Experimente zeigten zunächst, dass die Stimulierung von Endothelzellen zur Hochregulierung von CEACAM1 zu bestimmten Zeitpunkten führt. Die Daten wurden ferner bezüglich der gefundenen *potenziellen* Interaktionspartner dahingehend überprüft, ob diese unter derselben endothelialen Stimulation ähnlich wie CEACAM1 eine veränderte Expression zeigen, oder ob ihre zellulären Regulation unverändert bleibt (siehe Abb. 15). In dem Fall einer

zeitlich zusammenhängenden Hochregulation mit CEACAM1 könnte auch eine Interaktion mit diesem Protein stattfinden.

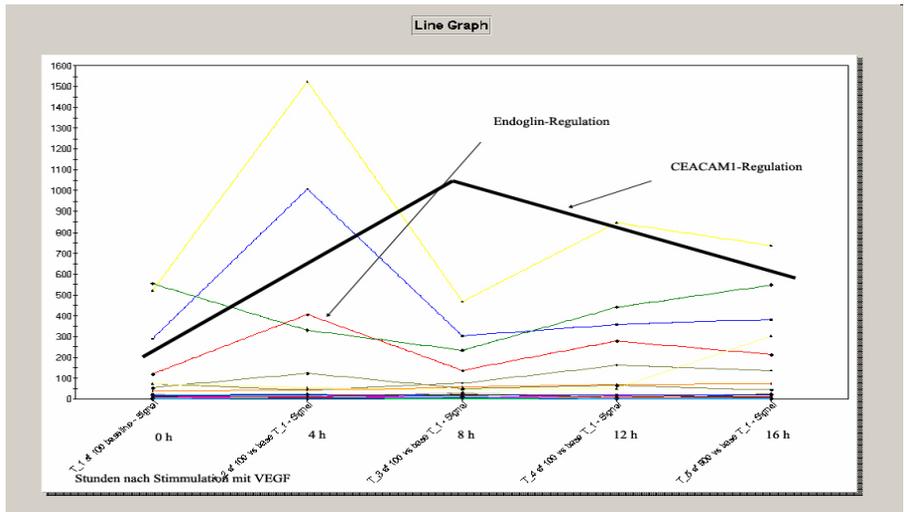


Abb. 15: Screenshot eines Vergleichs potenzieller CEACAM1-Liganden (nach Sequenz-homologien von *Random Phage Display* Peptiden) mit Microarray-Ergebnissen zur Stimulierung von Endothelzellen mit VEGF. Als potentiell koregulierter Interaktionspartner wurde u.a. Endoglin entdeckt.

3.3. Untersuchung einer potenziellen Lectin-Funktion von CEACAM1 durch ELISA-Experimente

Im Rahmen einer Kollaboration wurde bei einem *Random Phage Display* Projekt zur Generierung von Glykomimetika ein Peptid entdeckt, welches mit einer der hier entdeckten CEACAM1 affinen Konsensussequenzen identisch war. Da sowohl ein anderes Zielmolekül als auch eine andere Panning-Methode zum Einsatz kamen, war diese Übereinstimmung sehr überraschend. Die Entdeckung von Phagenklonen, die zum einen aufgrund von Selektion an einem Lectin glykomimikrierende Eigenschaften haben, zum anderen aber auch eine hohe Affinität zu rCEACAM1 besitzen, führte zu der spekulativen Frage, ob CEACAM1 über eine Lectin-Funktion verfügen könnte. Bei

Datenbankrecherchen bezüglich der Sequenz von CEACAM1 wurde darüber hinaus entdeckt, dass ein Sequenzabschnitt von CEACAM1 eine hohe Homologie zu beinahe der gesamten Familie der *Siglecs* (siehe Abb. 16) und weiteren Lectinen (siehe Abb. 17) besitzt .

CEACAM1 262-320	-ASNPPAQ-YSWLINGTFQQSTQE	-----	LFIPNITVNNSSGYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTE
Siglec-1/CD169	PDARF-SWYINGALLHEGPGSS	-----	LLLPAASSTDAAGSYHCRARDGHSASGSPSSPAVLTVL
Siglec-lantigen2	SRPPAQ-LALSHAGRLLASSTAASVPNTLRLELRGPQPRDE		GFYSCSARSPLGQANTSLEL60
Siglec-2/1	ANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQK	---	LRLEPVKVQHSQAYWCQGTNSV-GKGRSPLSTLTV58
Siglec-2/2 SB	CTANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEK	--	VHLPKLLPWHAGTYSCVAEN----- 48
Siglec-2/3	-SSNPPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFT	----	LNLREVTQKDGSGKYCCQVSNDRVTTVKTIIVTE
Siglec-L1	--SNPPARL-SWTWGSLLTSPSQSS	--	NLGVLELPRVHVKDEGEFTCRAQN----- 46
MAG1	SNPPPLL-TWMRDGTVLREAVAES	---	LLELEEVTPAEDGVYACLAENAYQDNRTVGLSVMY
Siglec-5	SBCTSNPPAHL-SW-FQGSPALNATPIS	--NTG	ILELRRVRSAAEEGGFTCRA----- 48
Siglec-6	---NPPAHL-SW-FQGFALNATPIS	--NTG	VLELPQVGSAAEGDFTCRA----- 43
Siglec-7	---SNPPARL-SW-TWRSLTLYPSQPS	--NPL	VLEL-QVHLGDEGEFTCRAQNSL---- 47
Siglec-8	---SNPPARL-SW-TRGSLTLCPSRSS	--NPG	LLELPRVHVRLDEGEFTCRAQNA----- 47
Siglec-9	--SNPPARL-SLSWRGLTLCPSQPS	--NPG	VLELPRVHVLRLDAEFTCRAQN----- 46
Siglec-11/1	SBCTSSPPARL-SWTRWQGTVGPSPQS	---DPG	VLELPPIQMEHEGEFTCRA----- 48
Siglec-11/2	T SQPPATL-SWVLQDRVLSSSHPWGPR	-TLG	LELRGVRAGDSGRFTCRAEN----- 52
CEACAM1 262-320	-ASNPPAQYSWLINGTFQQSTQE	-----	LFIPNITVNNSSGYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTE

Abb. 16: Darstellung einer Sequenzhomologie zwischen CEACAM1 und diversen Mitgliedern der *Siglec*-Familie (*Stialic acid binding Immunoglobulin like Lectin*). Die hohe Übereinstimmung dieses Sequenzbereiches von CEACAM1 im Bereich der B1-Domäne zu den *Siglec* führte zur Vermutung, dass es auch funktionelle Gemeinsamkeiten hinsichtlich einer Lectinfunktion geben könnte.

Zu diesen gehören auch pflanzliche (Arcelin) und bakterielle (PAI) Lectine. Darüber hinaus ist der besagte CEACAM1-Sequenzabschnitt auch teilweise homolog zu einem Sequenzbereich der CEACAM1-V1-Domäne (siehe Abb.17).

CEACAM1 B1-Domäne	284		LFIPNITVNNSSGYTCHANNS	305
CEACAM1 V1-Domäne	95	NSGRETIYPNALLIQNVTD	TGFYT	121
Siglec1	381		LLLPAASSTDA-GSYHCRARDG	302
Contactin mouse	457	NSSRILIWEDGSLEINNITRND	GGIYT	483
Contactin2	290	TTAEPTLQIFSVSFEDE	GTYCEAENS	317
Arcelin5A [<i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean)]	55	TGVGSNELPRVDSLGR	AFYSD	75
PAI [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>]	73	NVGGAITLIY	--NDVPGTGY--NN-	108
CEACAM1 B1-Domäne	284		LFIPNITVNNSSGYTCHANNS	305

Abb. 17: Sequenzhomologien verschiedener Lectine zu Sequenzbereichen von CEACAM1.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Bindung des SSA-Phagenklons an rCEACAM1 durch 1 M Fucose-Lösung quantitativ inhibiert wird, nicht aber durch gleichartig konzentrierte Glucose-, Mannose- oder Galactose-Lösungen (siehe Abb. 18). Da Fucose Bestandteil des physiologisch bedeutsamen Lewis x-Oligosaccharids ist, welches auch auf CEACAM1 exprimiert sind, wurden auch mit diesem Oligosaccharid Konkurrenzexperimente durchgeführt. Eine effektive Konkurrenz der SX1-Phagenklon-Bindung durch Lewis x-Oligosaccharide konnte nun bereits in einem Konzentrationsbereich von 0,3 mM beobachtet werden (siehe Abb. 19). Die Ergebnisse der Phagenklon-Konkurrenzassays geben Hinweise dafür, dass CEACAM1 möglicherweise über eine „Lectin-Domäne“ verfügt, welche Lewis x-Gruppen zu binden vermag. Möglicherweise bindet auch das Peptid des SSA-Phagenklons diese Domäne oder ihre unmittelbare Peripherie, so dass dessen Bindung an CEACAM1 durch die Oligosaccharide kompetitierbar ist.

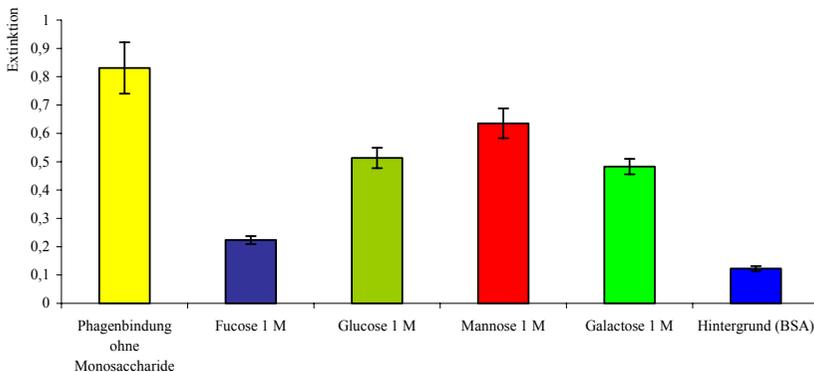


Abb. 18: Konkurrenz der SX1-Phagenbindung durch verschiedene Monosaccharide. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des SX1-Phagenklons durch Fucose effektiv gehemmt werden konnte, während andere Monosaccharide eine geringere Inhibition zeigen. Fucose ist ein Bestandteil der physiologisch wichtigen Oligosaccharide Lewis x und Sialyl-Lewis x, welche bei verschiedenen Zelladhäsionsprozessen entscheidende Funktionen haben.

Diese Befunde stellen bisher aber nur indirekte Nachweise für eine potenzielle CEACAM1-Lectin-Domäne dar.

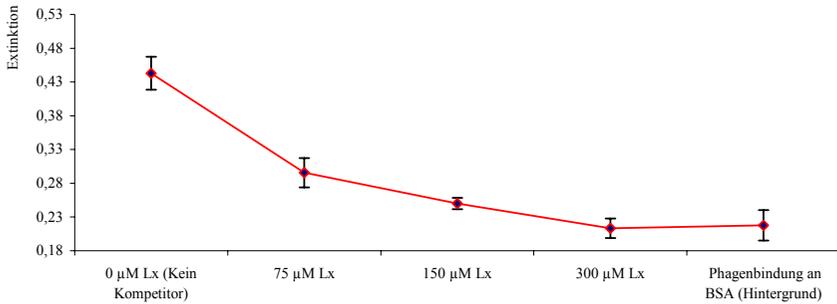


Abb. 19: Konkurrenz der SX1-Phagenbindung durch Lewis x-Trisaccharid. Durch Lewis x-Trisaccharid, welches Fucose als Bestandteil hat, konnte die SX1-Peptid-Phagenbindung bereits im mikromolaren Bereich gehemmt werden.

Es wurde darauf hin versucht, ELISA-Systeme zu etablieren, welche die direkte Bindung von Glykostrukturen an rCEACAM1 zeigen könnten. So wurden verschiedene Glyko-BSA-Konjugate in verschiedenen Konzentrationen auf ELISA-Platten immobilisiert, und anschließend mit rCEACAM1 versetzt. Es wurde gezeigt, dass rCEACAM1 konzentrationsabhängig an Lewis x- und Sialyl-Lewis x-Epitope bindet (siehe Abb. 20).

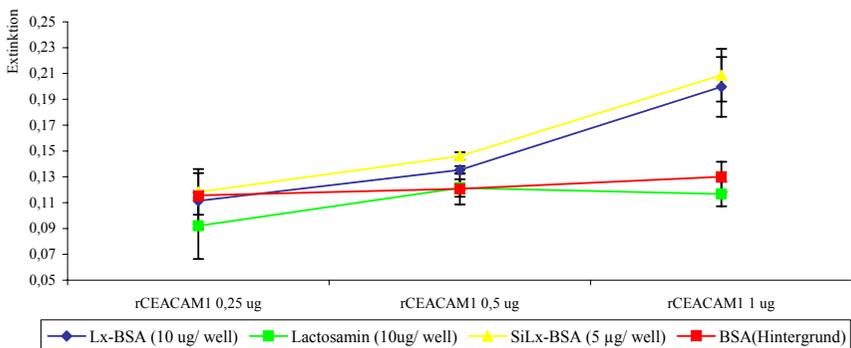


Abb. 20: Bindung von rCEACAM1 an immobilisierte BSA-Glykokonjugate. Verschiedene Konzentrationen von rCEACAM1 wurden mit den immobilisierten Glykokonjugate inkubiert und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper T84.1 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass rCEACAM1 eine Affinität zu Lewis x- und Sialyl-Lewis x-Glykokonjugaten besitzt, aber nicht zu Lactosamin-Glykokonjugaten.

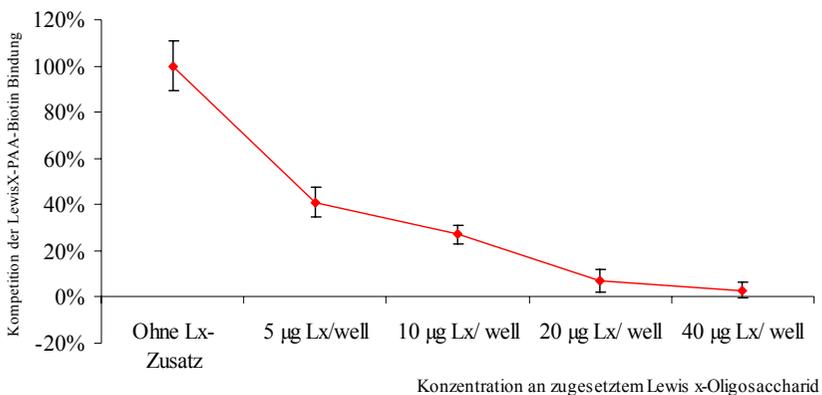


Abb. 21: Konkurrenz der Lewis x-PAA-Biotin Bindung an immobilisiertes rCEACAM1 durch Lewis x-Oligosaccharid als direkter Nachweis einer Affinität von Lewis x-Oligosaccharid-gruppen zu rCEACAM1. Es wurden 0,5 µg rCEACAM1/well immobilisiert und mit 16 µg Lewis x-PAA-Biotin und verschiedenen Konzentrationen Lewis x-Oligosaccharid zur Konkurrenz inkubiert. Nach dem Waschen wurden gebundene Lewis x-PAA-Biotin-Glyko-Konjugate mit Streptavidin-Peroxidase-Agens detektiert und über die Enzymfarbreaktion photometrisch bestimmt.

Allerdings sind die Schwankungen der Werte erheblich, wie den Standardabweichungen entnommen werden kann. In einem anderen System wurden biotinylierte Glykokonjugate (Lewis x-PAA) mit immobilisiertem CEACAM1 inkubiert, um anschließend mit Streptavidin-HRP detektiert zu werden. Die Bindung der Lewis x-PAA-Glykokonjugate war durch lösliches Lewis x-Oligosaccharid kompetitierbar (siehe Abb. 21).

3.4. Melanomzellen-Invasionsassays

3.4.1. Auswahl von Peptiden für Melanomzellen-Migrationsassays

Angesichts der großen Anzahl der gefundenen CEACAM1-bindenden Peptid-Phagen hatte die Auswahl von besonders aussichtsreichen Peptiden für Migrations-Assays nach stringenten Kriterien zu erfolgen. Da die durchzuführenden *in vitro*-Experimente unter physiologischen Bedingungen stattfinden sollten, wurden jene Peptide, welche beim 37°C-Panning isoliert worden waren, bevorzugt betrachtet. Des Weiteren wurde berücksichtigt, ob es Sequenzhomologien zu physiologisch interessanten *potenziellen* Liganden gab. Auch die Löslichkeit in physiologischen Nährpuffern wurde beachtet. Da der SX1-Phagenklon bereits (Kapitel 3.4.5) durch bestimmte Glykostrukturen kompetitierbare Bindungs-Eigenschaften zeigte, welche darauf hindeuten, dass CEACAM1 möglicherweise über eine Lectin-Domäne verfügt, schienen die Peptide dieses Phagenklons für weitere Experimente geeignet. Darüberhinaus stellte diese Peptidsequenz die häufigste Konsensussequenz unter den gefundenen Peptiden dar, und letztlich zeigte das Peptid auch noch interessante Sequenzhomologien u.a. zum Insulin-Rezeptor und dem *Endothelin-Converting-Enzyme*. Das zweite Peptid wurde aufgrund seiner Sequenz-Homologien und seiner guten Löslichkeit ausgewählt.

Peptid 1: **SX1**

Peptid 2: **EX1**

Als Negativkontrolle für diese beiden einzusetzenden Peptide wurden so genannte „*Scrambled*“ (frei übersetzt: „zusammengewürfelte“) Peptidvarianten entworfen. Dabei wird die Aminosäureabfolge innerhalb des Peptids zufällig gewählt, während Anzahl der einzelnen Aminosäuren gleich bleibt. Die beiden ausgewählten Phagenklon-Peptide (Biosynthan, Berlin) und ihre *Scrambled*-Varianten wurden C-terminal zusätzlich mit einem Cystein-Rest versehen, um

sie mittels geeigneter Methoden an BSA koppeln zu können. Die so hergestellten BSA-Konjugate konnten anschließend biotinyliert und somit in ELISA-Systemen mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat detektiert werden.

3.4.2. Quantitativer ELISA mit biotinylierten Peptid-BSA-Konjugaten

Bevor die Peptide in *in vitro* Experimenten eingesetzt werden, sollten nochmals ihre Bindungseigenschaften überprüft werden.

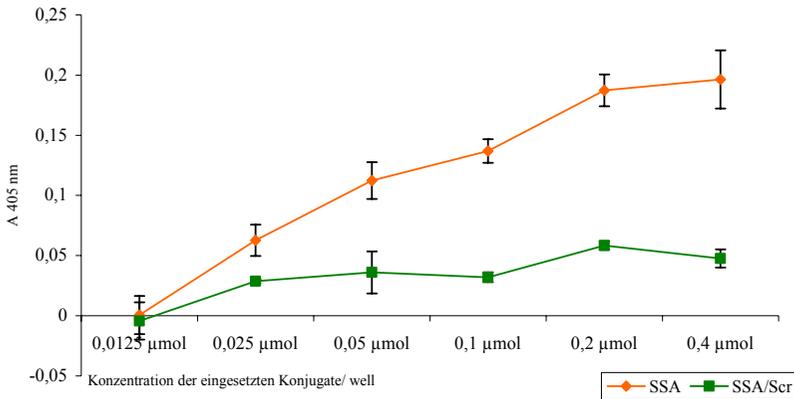


Abb. 22: Bindung biotinylierter SX1- und SX1-Scrambled-Peptid-Konjugate an rCEACAM1 (1 μg/well) in einem quantitativen ELISA.

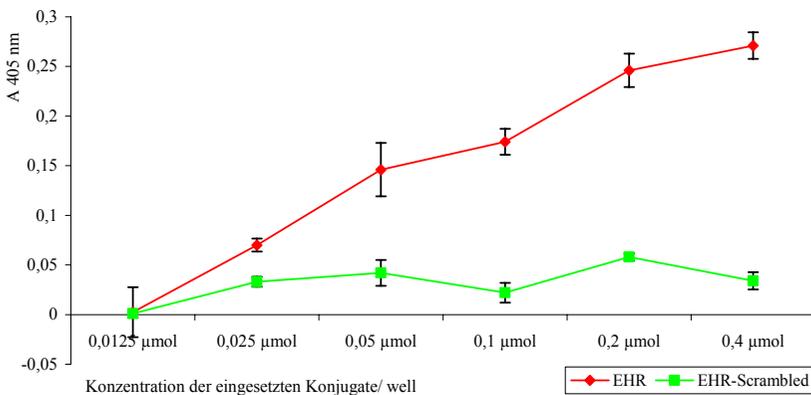
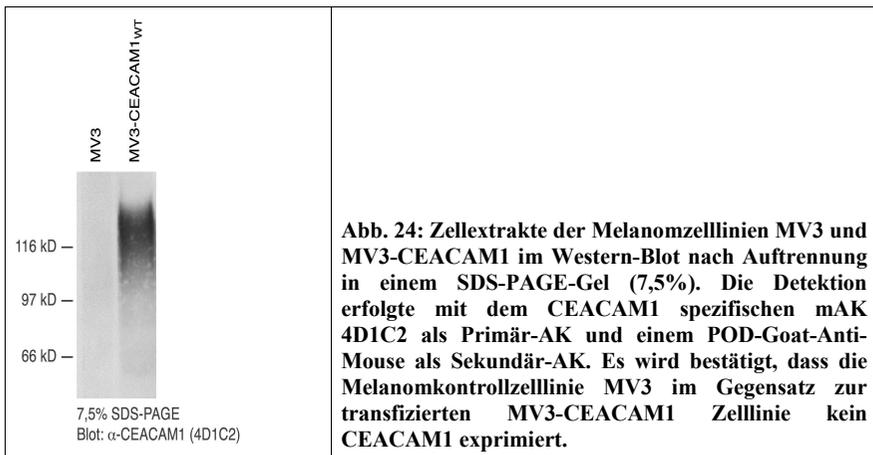


Abb. 23: Bindung biotinylierter EX1- und EX1-Scrambled-Peptid-Konjugate an rCEACAM1 (1 μg/well) in einem quantitativen ELISA.

Das SX1- und das EX1-Peptid-Konjugat zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung an rCEACAM1, die entsprechenden *Scrambled*-Varianten dagegen nicht (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Infolgedessen wurden die Peptide in den anstehenden *in vitro* Migrationsassays eingesetzt.

3.4.3. Invasionsassays mit MV3 – Melanomzellen

Es wurden zur Erforschung der CEACAM1 vermittelten Eigenschaften eine Zelllinie mit CEACAM1-Expression und eine ohne CEACAM1-Expression vergleichend betrachtet. Die Melanom-Zelllinie MV3 verfügt nativ über keine CEACAM1-Expression, wie immunhistologisch und per mRNA-Analytik nachgewiesen wurde (siehe Abb. 24).



Durch Transfektion wurde aus dieser Zelllinie die CEACAM1 exprimierende Zelllinie MV3-CEACAM1 geschaffen. Während die Zelllinie MV3-CEACAM1 in Folge zur Erforschung der Funktionalität von CEACAM1 eingesetzt wurde, diente die Zelllinie MV3 als zugehörige Negativkontrolle.

Die MV3-CEACAM1-Melanomzellen zeigen per se eine erhöhte Invasivität (ca. 40 %) verglichen mit den CEACAM1-negativen MV3-Melanomzellen (siehe Abb. 25) (Ebrahimnejad et al, 2004).

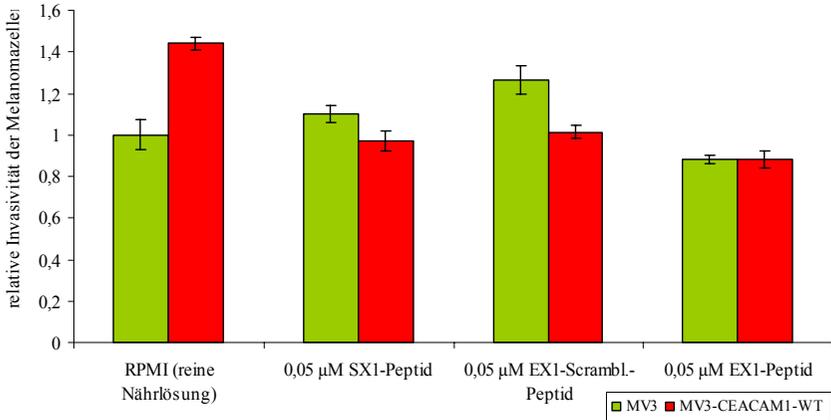


Abb. 25: MV3-Melanomazellen-Invasionsassay unter Zusatz von 2 Peptiden des *Random Phage Display Biopannings* (SX1 und EX1) und einem Kontroll-Peptid (EX1-Scrambled) in 0,05 µM Konzentration. Dabei wurde die Invasivität einer CEACAM1 negativen Melanomzelllinie (MV3) und einer CEACAM1 exprimierenden Zelllinie (MV3-CEACAM1) beobachtet. Die MV3-CEACAM1-Melanomzellen zeigen per se eine erhöhte Invasivität (ca. 40%) verglichen mit den MV3-Melanomzellen ohne CEACAM1 Expression. Die Zugabe der beiden beim Random-Phage-Display gefundenen Peptide (RPD-Peptide) sowie des Scrambled-Peptids (S-Peptid) bewirkt in 0,05 µM Konzentration eine deutliche Abnahme der Invasivität bei den MV3-CEACAM1-Melanomzellen um ca. 30 %.

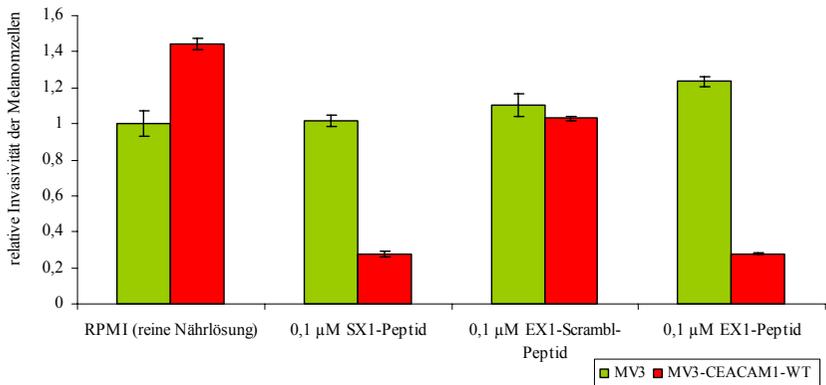


Abb. 26: MV3-Melanomazellen-Invasionsassay unter Zusatz von 2 Peptiden des *Random Phage Display Biopannings* (SX 1 und EX1) und einem Kontroll-Peptid (EX1-Scrambled) in 0,1 µM Konzentration. Wiederum wurde die Invasivität der CEACAM1 negativen Melanomzelllinie MV3 und der CEACAM1 exprimierenden Zelllinie MV3-CEACAM1 beobachtet. Bei einer Peptidkonzentration von 0,1 µM zeigt sich ein differenzierter Effekt auf die CEACAM1 exprimierenden Melanomzellen: die beim Random-Phage-Display selektierten Peptide zeigen eine Inhibition der Invasion um ca. 70 %, das Scrambled-Peptid (Kontrollpeptid) dagegen nicht. Ein Effekt der Peptide auf die MV3-Kontrollzelllinie (keine CEACAM1-Expression) ist nicht festzustellen.

Die Zugabe der beiden beim Random-Phage-Display gefundenen Peptide (RPD-Peptide) sowie des Scrambled-Peptids (S-Peptid) bewirkt in 0,05 μM olarer Konzentration eine deutliche Abnahme der Invasivität bei den MV3-CEACAM1-Melanomzellen um ca. 30 % (siehe Abb. 25). Dagegen bleibt die Invasivität der MV3-Kontrollzelllinie nahezu konstant, teilweise ist diese auch um ca. 10% erhöht. Bei Erhöhung der Peptidkonzentration auf 0,1 μM zeigt sich dagegen ein differenzierter Effekt auf die CEACAM1 exprimierenden Melanomzellen: die beiden RPD-Peptide zeigen eine Inhibition der Invasion um ca. 70 %, das Kontroll Peptid dagegen nicht (siehe Abb. 26). Ein Effekt auf die MV3-Kontrollzelllinie ist nicht festzustellen.

Es wurde somit bewiesen, dass die Peptide SX1 und EX1 *in vitro* die Migration CEACAM1 exprimierender Melanomzellen konzentrationsabhängig hemmen.

MV3-CEACAM1 Melanomzellen im BioCoat Matrigel - Invasionsassay mit Peptidzusätzen

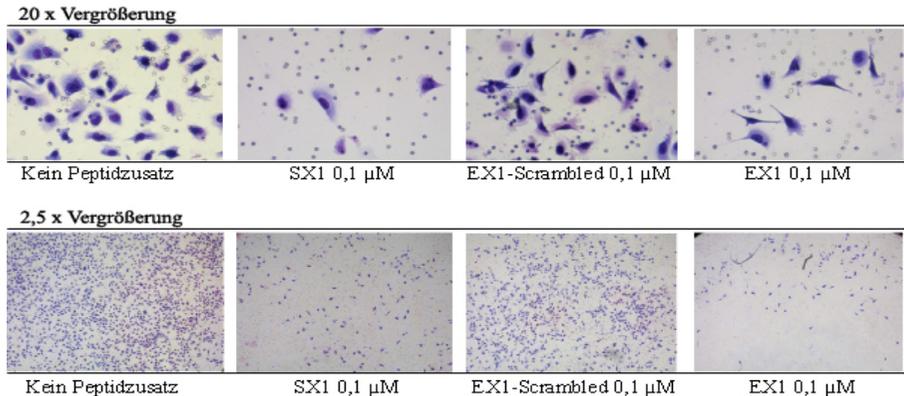


Abb. 27: Im Lichtmikroskop exemplarisch aufgenommene Photos der Ergebnisse der Invasionsassays unter Peptidzusatz mit MV3-CEACAM1-Melanomzellen. Die Zelldichte in den *BD BioCoat™ Matrigel™* -Kammern ist in 2,5 x und 20 x Vergrößerung abgebildet.

3.4.4. Invasionsassay mit G361 – Melanomzellen

In weiteren Experimenten wurde die Melanomzelllinie G361 verwendet, welche konstitutiv CEACAM1 exprimiert, und ansonsten in keiner Weise molekularbiologisch verändert wurde. Auch bei den Zellen der G361-Melanomzelllinie wurde die Invasivität durch die RPD-Peptide SX1 und EX1 gehemmt, während die RPD-Scrambled-Peptide deutlich geringere Effekte zeigten (siehe Abb. 28 und 29).

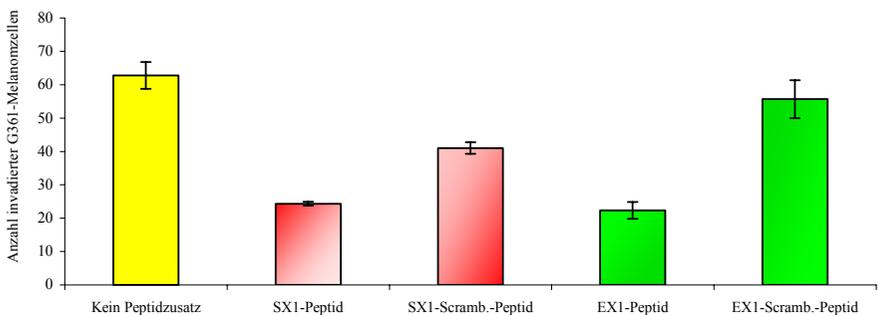


Abb. 28: Wirkung einer Konzentration von 0,05 µM der 2 RPD-Peptide EX1 und SX1 und der entsprechenden Kontrollpeptide EX1-Scrambl. und SX1-Scrambl. im Invasionsassay auf G361-Melanomzellen. Die SX1- und EX1 Peptid zeigen eine Inhibition der Invasion um ca. 60%, während dass Kontrollpeptid SX1-Scrambled eine leichte, nicht konzentrationsabhängige Inhibition um ca. 20% bewirkt.

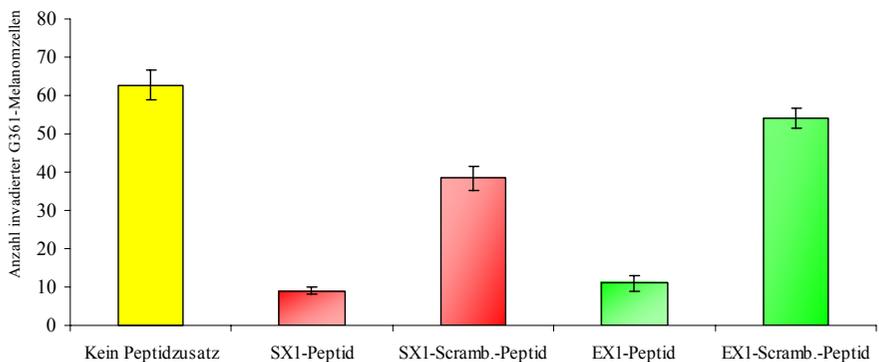


Abb. 29: Invasionsassay mit G361-Melanomzellen in Gegenwart von 0,1 µM der 2 RPD-Peptide EX1 und SX1 und der entsprechenden Kontrollpeptide EX1-Scrambled und SX1-Scrambled. Die SX1 und EX1-Peptide inhibieren die Invasion von G361-Melanomzellen konzentrationsabhängig, während die Scrambled-Peptide keinen deutlichen Effekt zeigen.

4. Diskussion

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist die Selektion zahlreicher CEACAM1 bindender Dodeka-Peptide durch *Random Phage Display* aus einer Ph.D.-12TM *Peptide Library* (NEB). Diese Methode stellt eine Art molekularbiologische Variante der kombinatorischen Chemie dar, in welcher eine Dodekapeptid-Bibliothek mit einer Komplexität von $2,7 \times 10^9$ Peptiden auf M13-Phagen präsentiert wird, wobei jeder Phage das in seiner DNA codierte Peptid fünffach am pIII-Hüllprotein präsentiert. In drei aufeinander folgenden Selektionsschritten (den sog. *Biopannings*) konnten in allen Experimenten CEACAM1 bindende Peptid-Phagen angereichert werden. Die Bindung dieser Phagen wurde zunächst im ELISA überprüft. Bei ausreichend hoher Bindungsstärke zu CEACAM1 erfolgte die Sequenzierung der Phagen-DNA. In *in vitro* Invasionsassays wurden einige der entdeckten Peptide auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber CEACAM1 exprimierenden Melanomzellen untersucht. Um potenzielle physiologische Interaktionspartner von CEACAM1 zu identifizieren, wurden mit der Sequenzinformation dieser Peptide Datenbankrecherchen durchgeführt.

Random Phage Display

Bei den Sequenzanalysen nach den durchgeführten *Biopannings* wurden insgesamt 110 Peptide identifiziert, wobei einige Dodeka-Sequenzen mehrfach gefunden wurden. Der mehrfache Nachweis dieser Konsensussequenzen (Peptide mit gleicher Sequenz) bestätigte die Funktionalität dieser Experimente (Devlin *et al.* 1990). Den Konsensussequenzen mit einem Anteil am Gesamtpeptidaufkommen von ca. 30% bis 50% stand aber auch immer eine große Anzahl an Einzelsequenzen gegenüber (siehe Tabellen 2, 3 und 4). Diese

verfügten teilweise über gleiche oder ähnliche Sequenzmotive, dennoch fand keine absolute Anreicherung einiger weniger Peptide statt. Hauptgrund dafür ist wahrscheinlich die Größe des Zielmoleküls von 110 kD (rCEACAM1), bzw. 160 kD (natives CEACAM1) und die damit verbundene Präsenz diverser verschiedener Epitope, welche die Anreicherung vieler verschiedener Phagenklone zur Folge hat. Möglicherweise hätte durch Durchführung von 4 oder noch mehr Panningschritten (statt der tatsächlich 3 erfolgten) die Anzahl verschiedener Phagenklone limitiert werden können. Da die verschiedenen Screenings unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Temperatur und Art der Präsentation von CEACAM1) durchgeführt wurden, unterscheiden sich die jeweils gefundenen Peptide erheblich. Vereinzelt wurden allerdings übergreifend gleiche Sequenzen gefunden, z.B. die Sequenz TLPSPLALLTVH beim Panning 1 (natives CEACAM1 4°C) als auch beim Panning 2 (rekombinantes CEACAM1 4°C). Das darin enthaltene Sequenzmuster LPXXLXL wurde des Weiteren noch bei insgesamt 16 verschiedenen Phagenklonen verschiedener Panning-Reihen entdeckt.

Vergleich der gefundenen Peptidsequenzen mit Protein-Datenbanken mit der BLAST Suchmaschine des National Center for Biotechnology Information

Es besteht die Möglichkeit, dass die selektierten Peptide den Bindungsepitopen physiologischer Interaktionspartner entsprechen. Jede Peptidsequenz wurde daher in der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Suchmaschine mit der Swiss-Prot-Datenbank auf mögliche Sequenzhomologien zu potentiellen Assoziierungs-partnern von CEACAM1 untersucht. Es wurde eine große Anzahl von Homologien zu Proteinen gefunden, die *potenzielle* physiologische Interaktionspartner darstellen könnten. Bezüglich des extrazellulären Anteils ist CEACAM1 selbst der am besten charakterisierte Ligand, wobei die homophile

Interaktion in *trans* bewiesen ist. (Zhou *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1996). Diese Bindung wird über die V1-Domäne vermittelt (Watt *et al.*, 2001). Bei der hoch homologen V1-Domäne von CEA wurden mehrere Aminosäuresequenzen ausgemacht, welche eine bedeutende Rolle bei der homophilen Interaktion von CEA in *trans* spielen (Taheri *et al.*, 2000). Die zwei entdeckten Phagen-Peptide KXXXPYSWFIPF und NNDTVLISPTAS enthalten Teilmotive, die diesen Subdomänen ähnlich sind, bzw. diesen entsprechen. Diese Befunde können dahingehend ausgelegt werden, dass die selektierten Peptide nicht nur eine hohe Affinität zu CEACAM1 besitzen, sondern möglicherweise auch den evolutionär ausprägen homophilen Bindungsepitopen gegen CEACAM1 entsprechen.

Während noch keine weiteren physiologischen Interaktionspartner der extrazellulären Domänen bekannt sind, wurden für die cytoplasmatische Domäne bereits verschiedene assoziierte Proteine charakterisiert. Dieses sind zum einen Src-Kinasen und die Phosphatasen SHP1 und SHP2, welche über Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung der Tyrosine in aktivierende und deaktivierende Signaltransduktionprozesse involviert sind (Brümmer *et al.*, 1995; Öbrink *et al.*, 2004). Zum Anderen konnte eine von der Phosphorylierung von Tyrosin 488 abhängige Assoziation *in vitro* und *in vivo* mit Paxillin und Integrin $\beta 3$ bewiesen werden (Ebrahimnejad *et al.*, 2000; Brümmer *et al.*, 2001). Viele der selektierten CEACAM1 affinen Peptide zeigen Homologien zu Mitgliedern der Integrin-Familie, z.B. Integrin α IIb, Integrin $\alpha 4$ und Integrin $\beta 6$. Nicht gefunden wurden allerdings Sequenzhomologien zu Integrin $\alpha \nu \beta 3$, welches im invasiven Trophoblasten und migrierenden Melanomzellen mit CEACAM1 über die cytoplasmatische Domäne assoziiert ist. Es könnte erwartet werden, dass auch extrazelluläre Bereiche von Integrin $\alpha \nu \beta 3$ entsprechend mit CEACAM1 interagieren, bzw. die von der Phosphorylierung Tyr488 abhängige Assoziation extrazellulär unterstützen, aber die generierten Peptide geben dafür keinerlei Hinweise. Da die aus den Sequenzhomologien gewonnenen

Erkenntnisse nur von spekulativer Natur sind, müssen weiterführende Experimente wie Co-Immun-präzipitationen zum tatsächlichen Nachweis einer Interaktion durchgeführt werden.

Der Abgleich der 200 potenziellen Interaktionspartner mit Daten aus Gene-Microarray Experimenten zur angiogenetischen Stimulation von Endothelzellen mit VEGF zeigte die Koregulation von CEACAM1 u.a. mit Endoglin (CD105). Endoglin ist ein Ko-Rezeptor für den Transforming Growth Factor (TGF) und wird auf angiogenetischen Endothelien von Tumoren exprimiert, wobei eine steigende Expression mit schlechter Prognose einhergeht. Endoglin wird teilweise in die Blutbahn sezerniert und hat die Eigenschaften eines unabhängigen prognostischen Markers (Ruoslahti, 2002; Duff *et al.*, 2003). In diesem Fall sprechen der funktionelle Zusammenhang, die zeitnahe zelluläre Regulation und die Sequenzhomologie zu einem mit *Random Phage Display* entdeckten Peptides für die mögliche Assoziation mit CEACAM1.

Untersuchungen zur möglichen Lectin-Funktion von CEACAM1

Die Zusammensetzung der extrazellulären Glykocalix von Zellen hat entscheidenden Einfluss auf deren Eigenschaften im Zellverband. Die Expression bestimmter Kohlenhydrate auf Tumorzellen kann zelluläres Verhalten verändern und mit verstärkter Migration und Metastasierung verbunden sein (Thies *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 1999). Wichtige Glykostrukturen in diesem Kontext sind z.B. Sialyl-Lewis x, Lewis x und Sialyl-Lewis a Strukturen. Die genauen Zusammenhänge zwischen Beschaffenheit der Glycocalix und bestimmten Karzinogenese Ereignissen sind allerdings weitgehend unbekannt. Auf Granulozyten ist CEACAM1 der Hauptträger von Lewis x Epitopen. Immunologisch wurde gezeigt, dass CEACAM1 von Anti-Lewis x Antikörpern erkannt wird. Auch das Vorhandensein von Sialyl-Lewis x

Epitopen wurde postuliert (Stocks/Kerr, 1993). Die massenspektrometrische Analyse der Glykostrukturen von granulozytärem CEACAM1 lieferte weiteren Beweis für die Präsenz von Lewis x-Oligosacchariden auf dem extrazellulären Anteil, während Sialyl-Lewis x Epitope in der verwendeten Präparation nicht entdeckt wurden (Lucka *et al.*, 2004).

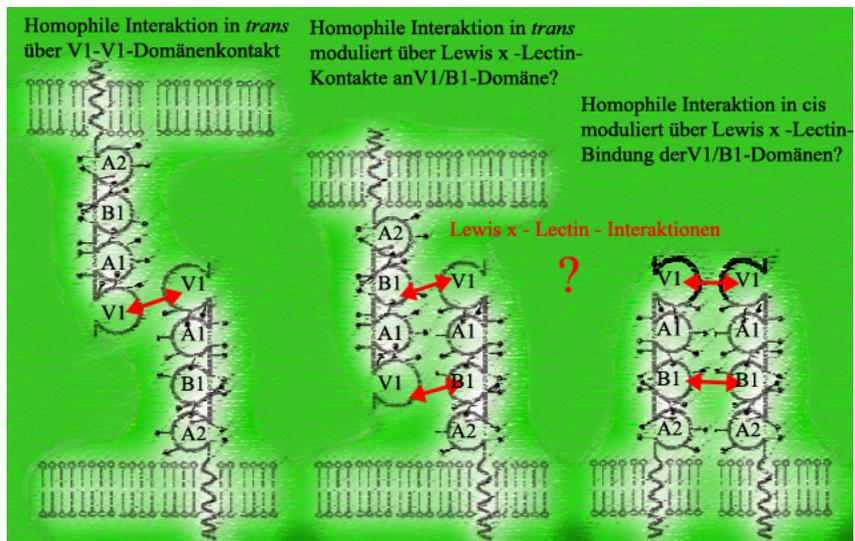


Abb. 30: Allgemein gilt der V1-V1-Domänenkontakt als Bindungsmechanismus der homophilen Interaktion in *trans* (Watt *et al.*, 2001), da u.a. Deletionsmutanten von CEACAM1 ohne V1-Domäne keine homophile Interaktion zeigen. Aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen Lectin-Domäne im Bereich der B1-Domäne könnte als spekulativer Mechanismus auch eine Interaktion unter Einbeziehung der B1-Domäne vermutet werden, bei dem die V1-Domäne nach wie vor essentiell mitwirkt. Insbesondere könnte eine modulierende Interaktion zwischen den zahlreich existierenden Lewis x Strukturen von CEACAM1 und einer spekulativ angenommenen Lectin-Domäne stattfinden.

Die funktionelle Bedeutung dieser Strukturen insbesondere im Rahmen von Metastasierungs- und Angiogenese-Prozessen ist aber noch unklar. Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmals Hinweise dafür gefunden, dass CEACAM1 möglicherweise eine selektive Affinität zu bestimmten Glykostrukturen besitzt. Eine der entdeckten Konsensussequenzen beim Screening gegen CEACAM1

war identisch mit einem Peptid, dass bei einem *Random Phage Display* Projekt eines Kooperationspartners zur Generierung von Fucose mimikrierenden Peptiden entdeckt wurde. Somit stellte sich die Frage, ob CEACAM1 eine Affinität zu bestimmten Glykostrukturen hat. Zudem wurden bei Sequenzanalysen von CEACAM1-Einzeldomänen Abschnitte mit Homologien zur Familie der *Siglecs* und anderen Lectinen entdeckt (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Da diese Sequenzhomologien nicht nur Säugetierlectine (*Siglec1/Contactin*) sondern auch bakterielle (*PAI*) und pflanzliche (*Arcelin*) Lectine umfassen, scheint diesen Motiven eine besondere Bedeutung bei der Zuckerbindung zuzukommen. Experimentell wurde gezeigt, dass die Bindung des SX1-Phagenklons an rCEACAM1 durch Fucose in molaren Konzentrationen und durch das Fucose enthaltenden Oligosaccharid Lewis x und in millimolaren Konzentrationen kompetitiert werden kann. Durch biotinylierte Glycoderivate konnte im ELISA eine direkte Affinität der Lewis x Oligosaccharide zu CEACAM1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben Hinweise, dass CEACAM1 über eine Lectin-Domäne verfügen könnte, welche Lewis x-Gruppen zu binden vermag.

In funktioneller Hinsicht wäre es denkbar dass z.B. die homophile Interaktion in *cis* und *trans* durch entsprechende Wechselwirkungen verstärkt wird. Zwar sind monomere Glycan-Protein-Bindungen in der Regel um ein vielfaches schwächer als Protein-Protein Wechselwirkungen, aber multimerer Glycan-Protein-Interaktionen können höhere Bindungsstärken erreichen. Bei der Bildung von CEACAM1-Dimeren würden jeweils Lewis x-Epitope präsentiert und gleichzeitig erkannt werden (siehe Abb. 30). Die sich somit ergänzenden Bindungskräfte wären immer noch schwach, könnten aber insgesamt eine subtile Modulation der homophilen Interaktion bzw. eine Art Feinabstimmung (*fine tuning*) forcieren. Dieser spekulative Mechanismus könnte durch eine direkte Interaktion von Lewis x Glycanen ergänzt werden (Geyer *et al.*, 2000).

Einsatz von Peptiden des *Random Phage Display Biopannings* in Melanomzellen-Invasionsassays

Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 ist funktionell in mehrfacher Hinsicht an der Progression von Krebserkrankungen beteiligt. Bei vielen epithelialen Tumorerkrankungen ist CEACAM1 herabreguliert. CEACAM1-L kann jedoch auch eine aktive Rolle bei der Tumورprogression spielen. So ist CEACAM1 an der angiogenetischen Ausbildung neuer Blutgefäße während der Tumurvaskularisation beteiligt (Ergün *et al.*, 2001). Zum anderen wird CEACAM1 bei Krebserkrankungen wie dem malignen Melanom und bestimmten Formen von Lungenkrebs (non-small lung carcinoma) verstärkt exprimiert, wobei es vor allem an der Invasionsfront mit Integrin $\alpha\beta 3$ kolokalisiert ist (Brümmer *et al.*, 2001; SieneI *et al.*, 2003). Beim malignen Melanom ist eine gesteigerte CEACAM1-Expression mit deutlich erhöhter Invasivität und Metastasierung verbunden und ist als prognostischer Marker der Messung der Dicke des Tumors überlegen (Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Thies *et al.*, 2002). Durch Hemmung von CEACAM1 im Rahmen invasiver Krebserkrankungen wie der des malignen Melanoms sowie des Angiogeneseprozesses bei der Tumurvaskularisation könnten möglicherweise Progression und Metastasierung maligner Erkrankungen gehemmt werden (siehe Abb. 31). Die Inhibition von Zelladhäsionsmolekülen kann durch spezifische Antikörper, geeignete chemische Wirkstoffe und Peptide erfolgen. In dieser Dissertation wurden durch *Random Phage Display* CEACAM1 bindende Dodeka-Peptide als potenzielle Antagonisten generiert. Protein-Protein-Wechselwirkungen sind die Hauptmechanismen der interzellulären und intrazellulären Kommunikation. Zahlreiche Peptide nehmen als Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren eine Schlüsselposition ein. Sie können als Medikamente in direkter oder modifizierter Form sowohl als

Agonisten (z.B. Insulin) als auch als Antagonisten zur Inhibition bestimmter Funktionen eingesetzt werden (Hruby *et al.*, 2002).

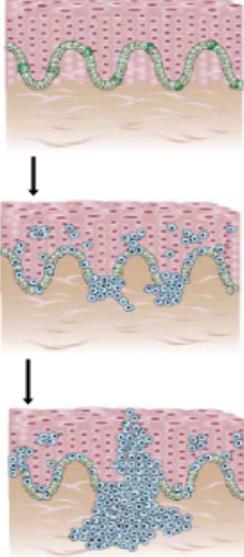
Invasionsassay als Modell für Penetration der Extrazellulären Matrix

Um mögliche biologischen Effekte der selektierten Peptide zu entdecken wurden diese in *in vitro* Invasionsassays mit CEACAM1 exprimierenden Melanomzellen im Vergleich zu CEACAM1-negativen Zellen untersucht. Diese Experimente wurden mit dem *BioCoat Matrigel Invasion*-System der Firma BD durchgeführt, in welchem eine dünne Matrigelschicht ein *in vitro* Modell für die extrazelluläre Matrix (ECM) darstellt (siehe Abb.6). Die Melanomzelllinie MV3 weist nativ keine CEACAM1 Expression auf. Durch entsprechende Transfektion wurde eine MV3-Zelllinien-Variante mit CEACAM1-Expression (MV3-CEACAM1) generiert, welche in Migrations- und Invasionsassays eine 50-80 % höhere Invasivität im Vergleich zur ursprünglichen MV3-Zelllinie aufwies (Ebrahimnejad *et al.*, 2004).

Die Peptide EX1 und SX1 des *Random Phage Display Screenings* bewirkten im Invasionsassay in 0,05 μM Konzentration eine Inhibition der Invasivität CEACAM1 exprimierender MV3-CEACAM1-Melanomzellen um ca. 30 % (siehe Abb. 25), bei einer Konzentration von 0,1 μM sogar eine Inhibition um ca. 85 % (siehe Abb. 26). Die Invasivität der CEACAM1-negativen Kontrollzelllinie MV3 blieb dagegen unverändert. In einem weiteren Experiment mit der konstitutiv CEACAM1 exprimierenden Melanomzelllinie G361 konnte die effektive inhibitorische Aktivität der beiden Peptide (siehe Abb. 28 und 29) bestätigt werden. Die zur Kontrolle eingesetzten sog. *Scrambled*-Varianten (Peptide gleicher Zusammensetzung bei unspezifischer Aminosäuren-Abfolge) dieser Peptide zeigten dagegen keine oder deutlich geringere Effekte.

Bedeutende Carzinogenese-Ereignisse mit verstärkter CEACAM1-Expression

A: Progression eines malignen Melanoms



B: Angiogenetisches Gefäßwachstum in Tumorgewebe

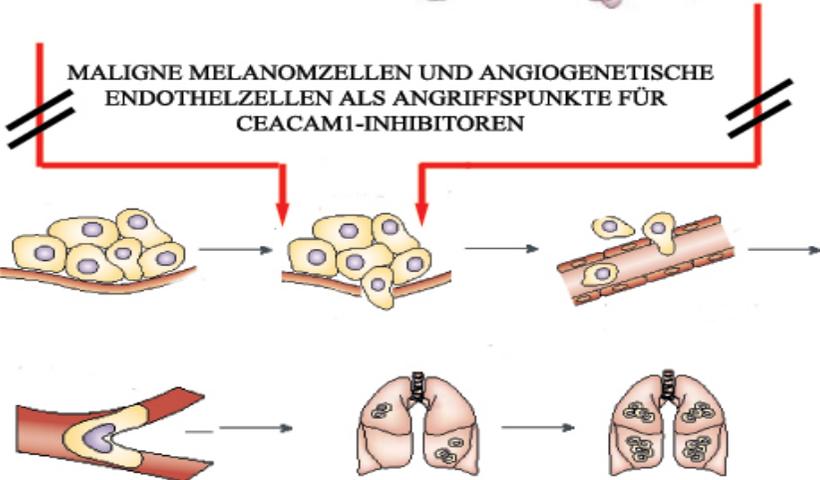
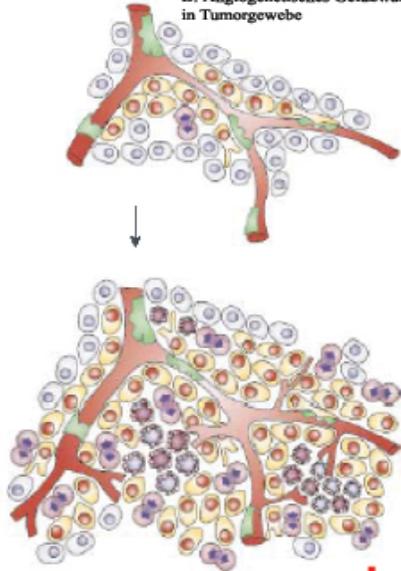


Abb. 31: Die Progression maligner Melanome und die Angiogenese in Tumorgeweben sind wichtige Faktoren bei Krebserkrankungen, da diese beiden Vorgänge zur Entstehung von Metastasen führen können. Beide Prozesse gehen mit starker CEACAM1-Expression einher, während konstitutive Melanozyten und Endothelzellen kaum oder gar kein CEACAM1 exprimieren. Die Inhibition von CEACAM1 könnte daher möglicherweise die Invasivität maligner Melanomzellen oder aktivierter Endothelzellen einschränken und somit Metastasierung verhindern. Die modifizierten Abbildungen entstammen folgenden Publikationen: Steeg *et al.*, 2003; Chin *et al.*, 2003 ; Bergers *et al.*, 2003.

Die beiden selektierten Peptide haben somit ab 0,1 μM Konzentration signifikante Effekte auf die Invasivität von Melanomzellen mit CEACAM1-Expression. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die Bindung von SX1 und EX1 an den extrazellulären Teil von CEACAM1 seine Funktionalität als migrationsförderndes Zelladhäsionsmolekül einschränkt, bzw. unterbunden wird. Möglicherweise mimikrieren diese Peptide die Bindungsepitope bisher unbekannter Signalmoleküle oder heterophiler Interaktionspartner der extrazellulären Domänen von CEACAM1.

Die Invasivität der MV3-CEACAM1 Melanomzellen wurde im Matrigel Invasionsassay auch durch die CEACAM1 spezifischen Antikörper 4D1C2 und 12-140-4 konzentrationsabhängig gehemmt, allerdings wurde eine signifikante Inhibition um ca. 70% erst bei Konzentration von 0,4 μM (4D1C2 mAB), bzw. 0,2 μM (12-140-4 mAB) beobachtet (Ebrahimnejad *et al.*, 2004). Damit sind beiden Peptide SX1 und EX1 mindestens um Faktor 2 effektivere Inhibitoren gegen CEACAM1 exprimierende maligne Melanomzellen. Aufgrund ihres wesentlich niedrigeren Molekulargewichts besitzen sie wahrscheinlich auch eine geringere Antigenität, was wiederum von therapeutischem Nutzen sein könnte.

Aufgrund der bedeutenden inhibitorischen Effekte auf die Invasivität maligner Melanomzellen sind weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der genauen Bindungsepitope der SX1- und EX1-Peptide sowie deren Interferenz mit potentieller Lectin-Funktionalität von großem Interesse. Diesbezügliche Erkenntnisse können helfen die besondere Bedeutung von CEACAM1 sowohl beim malignen Melanom als auch im übergreifendem Kontext weiter aufzuklären. Darüber hinaus könnten die generierten Peptide zur Entwicklung neuartiger Therapieformen gegen das maligne Melanom und andere Krebsformen führen.

5. Zusammenfassung

Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 ist funktionell in wichtige zellbiologische Prozesse wie Angiogenese, Erkennung und Internalisierung viraler Pathogene, Karzinogenese und Leukozyten-Aktivierung eingebunden. In Hinblick auf seine essentielle Bedeutung bei der Progression bestimmter Krebsformen wie des malignen Melanoms und bei Angiogeneseprozessen könnte die Hemmung von CEACAM1 durch spezifisch bindende Moleküle von therapeutischem Nutzen sein.

Hauptziel dieser Arbeit war die Generierung von Peptiden zur funktionellen Inhibition von CEACAM1, was mit der molekularbiologischen Methode des *Random Phage Displays* umgesetzt wurde. Natives und rekombinantes CEACAM1 wurden einer *Ph.D.-12™ Phage Display* Bibliothek (NEB) als Zielstrukturen in verschiedenen Selektionsansätzen (sog. *Biopannings*) präsentiert. Insgesamt wurden dabei 80 verschiedene CEACAM1 mit hoher Affinität bindende Dodeka-Peptide selektiert. In Invasionsassays zeigten zwei dieser Peptide (SX1 und EX1) eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Invasivität CEACAM1 exprimierender MV3-CEACAM1-Melanomzellen. Die Invasivität der CEACAM1-negativen Kontrollzelllinie MV3 blieb dagegen unverändert. In einem weiteren Experiment mit der Melanomzelllinie G361 konnte die inhibitorische Aktivität der beiden Peptide bestätigt werden. Die zur Kontrolle eingesetzten sog. *Scrambled*-Varianten (Peptide gleicher Zusammensetzung bei modifizierter Aminosäuren-Abfolge) dieser Peptide zeigten in keinem der durchgeführten Invasionsassays signifikante inhibitorische Effekte. Da die beiden durch *Random Phage Display* generierten Peptide SX1 und EX1 *in vitro* die Invasivität maligner Melanomzellen hemmen, könnten sie auch *in vivo* diese Eigenschaften zeigen

und somit Leitstrukturen zukünftiger Medikamente gegen das maligne Melanom oder andere Krebsformen darstellen.

Der das SX1-Peptid tragende SX1-Phagenklon zeigte Bindungseigenschaften gegen CEACAM1, die durch Lewis x Oligosaccharide konzentrationsabhängig kompetitiert werden konnten. Darauf aufbauende ELISA-Experimente konnten den Nachweis erbringen, dass Lewis x Strukturen auch eine direkte Affinität zu CEACAM1 besitzen. Somit wurden erstmals Hinweise dafür gefunden, dass CEACAM1 möglicherweise über lectinartige Eigenschaften verfügt. In diesem Zusammenhang durchgeführte Datenbankrecherchen ergaben überdies, dass CEACAM1 über 2 Sequenzabschnitte verfügt, welche hohe Homologien zu verschiedenen Lectinen zeigen. Da CEACAM1 selbst Träger von Lewis x Epitopen ist, könnten derartige Lectin-Eigenschaften bereits bekannte Funktionsmechanismen wie die homophile Interaktion beeinflussen. Die Kompetierbarkeit des SX1-Phagenklons durch diese Glykostrukturen zeigt gleichzeitig, dass das SX1-Peptid die Glykostrukturen mimikriert. Diese Befunde weisen auf eine funktionelle Bedeutung der postulierten Lectin-Domäne für die Assoziation von CEACAM1 mit sich selbst oder anderen Interaktionspartnern hin. Durch Vergleich der selektierten Peptidsequenzen mit Proteinsequenzen in Datenbanken wurden Hinweise auf *potenzielle* Interaktionspartner von CEACAM1 gefunden, welche durch Abgleichen mit experimentellen Daten zur CEACAM1-Funktionalität aus Microarray Experimenten (Affymetrix) konkretisiert werden konnten. So deuten diese Ergebnisse u.a. auf Endoglin als möglichen Liganden hin.

6. Summary

CEACAM1 is a cell adhesion molecule involved in developmental and pathological processes such as angiogenesis, recognition and internalization of viral pathogens, carcinogenesis and activation of leucocytes. Regarding that CEACAM1's function is in particular important for the progression of certain cancers such as malignant melanoma, the inhibition of CEACAM1 with specific binding molecules represents a possible therapeutic approach.

The main object of this thesis was the generation of peptide-antagonists for a functional inhibition of CEACAM1, which was realized with a molecular method called *Random Phage Display*. Native and recombinant CEACAM1 was presented to a *Ph.D.-12™ Phage Display* library (NEB) in repeated series of selection experiments, so called *pannings*. About 80 different peptides binding to CEACAM1 with high affinity were selected. In invasion assays two of these peptides (SX1 and EX1) demonstrated an inhibition the invasion of CEACAM1 expressing melanoma cells from the celline MV3-CEACAM1, whereas the invasion of a control melanoma celline MV3 without CEACAM1 expression remained unaffected. The inhibitory effects of the peptides SX1 and EX1 could be confirmed in a further invasion assay using the native melanoma celline G361. In none of these experiments the control scrambled versions of these two peptides lead to significant effects. As the peptides SX1 and EX1 inhibited the invasion of melanoma cells *in vitro*, they might also be capable to show these properties *in vivo*, thus they may represent useful blueprints for medical compounds against the malignant melanom or other forms of cancer. Furthermore, the phageclone SX1 displaying the SX1-peptide showed binding capacities to CEACAM1, which could be competitated by lewis x oligosaccharides in ELISA experiments. Subsequent ELISA experiments could

prove a direct affinity of lewis x structures to CEACAM1, demonstrating for the first time “lectin-properties” of CEACAM1. In addition database research revealed high homology between two parts of the CEACAM1 sequence with certain lectins. As CEACAM1 itself carries lewis x saccharides, the described lectin-properties could be involved into known biological mechanisms such as the homophilic interaction. The ability of the SX-1 phageclone to compete with lewis x oligosaccharides gives hints for the SX-1 peptide mimicing this glycostructure. These results point to a functional role of the supposed “lectin domain” for the association of CEACAM1 with itself or other interacting proteins. To gain information about possible interaction partners of CEACAM1, the sequences of CEACAM1 binding peptides selected by *Random Phage Display* were compared to protein sequences of the *swiss prot* database. The derived potential interaction partners were compared with related data from microarray experiments (Affymetrix) to the biological function of CEACAM1, and resulted among others in the discovery of endoglin as a possible physiological interaction partner of CEACAM1.

7. Literatur

Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E., Veillette, A. (1997). Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene 14*, 783-790.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarsröm, 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 (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res. 252*, 243-249.

Benhar, Itai (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances 19*, 1 – 33.

Bergers, G., Benjamin, L., (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, Volume 3, 401-410.

Brümmer, J., Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Schumacher, U., Löning, T., Bamberger, A.M., and Wagener, C. (2001). *Cis* Interaction of the Cell Adhesion Molecule CEACAM1 with Integrin $\beta 3$. *Am. J. Pathol.* 159, 537-546.

Brümmer, J., Neumaier, M., Göpfert, C. & Wagener, C. (1995). Association of pp60c-src with biliary glycoprotein, an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene 11*, 1649-1655.

Duff, S., LI, C., Garland, J., Kumar, S., (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*, Vol. 17 .

Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Unteregger, G., Wagener, C., Brümmer, J. (2000). Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res. 260*, 365-373.

Ebrahimnejad, A., Streichert, T., Nollau, P., Horst, A., Wagener, C., Bamberger, A., Brümmer, J. (2004). CEACAM1 Enhances Invasion and Migration of Melanocytic and Melanoma Cells. *American Journal of Pathology*, Vol. 165, No. 5, 1781–1787).

Enger R and Gabert HE (1998). basic mechanisms of metastasing. *Tumorbiologische Grundlagen und klinische Implikationen. Onkologe* 4, 682-688.

Ergün, S. , Kilic, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurbach, J.H., Horst, A. Weil, J. Malkanthi, F., Wagener, C. (2000). CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1): a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Molecular Cell*, 5, 311-320.

Geyer, A., Gege, C., and Schmidt, R.R. (2000). Calcium-dependent carbohydrate-carbohydrate recognition between Lewis(x) blood group antigens. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 3245–3249

Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Öbrink, B. and Singer, B. (2003). CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex induced activation. *J. Leukocyte Biol.* 74, 126-134.

Hood, J. and Cheresch, D., (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews cancer*, Volume 2, 91-100.

Hruby, Victor J. (2002). Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 1, 847-858.

Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., Beauchemin, N. (1999). The carboxy-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, 335-344.

Katz, A. Bradley (1997). Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered by phage display. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 27 – 45.

Lucka L, Fernando M, Grunow D, Kannicht C, Horst AK, Nollau P, Wagener C. Identification of Lewisx structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* 2004; 18,87-100.

Lynda Chin (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Reviews Cancer*, Volume 3, 559-570.

McCaffery J., Griffiths A.D., Winter G. And Chriswell D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-554.

Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P. & Wagener, C. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10744-10748.

Nollau, P., Scheller, H., Kona-Horstmann, M., Rohde, S., Hagenmüller, F., Wagener, C., Neumaier, M. (1997). Expression of CEACAM1 (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res.* 57, 2354-2357.

Ono, M., Skamoto, M., Ino, Y., Moriya, Y., Sugihara, K., Muto, T., Hirohashi, S. (1996). Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer* 78, 1179-1186.

Öbrink, B. (1997). CEA-adhesion molecules: multifunctional proteins with signalregulatory properties. *Curr. Op. Cell Biol.* 9, 616-626.

Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.-D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Löning, T., Wagener, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the CEA family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 35-41.

Ruoslahti (2002). Specialization of tumor vasculature. *Nature Reviews Cancer*. Volume 2, 83-90.

Scott, J.K. & Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-90.

Siene W, Dango S, Woelfle U, Morresi-Hauf A, Wagener C, Brümmer J, Mutschler W, Passlick B, Pantel K (2003). Elevated Expression of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 Promotes Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* ;9(6):2260-2266
Skubitz, K. M., Campbell, K.D., Ahmed, K., Skubitz, A.P.N. (1995). CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 155, 5382-5390.

Steege, P. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* Vol. 3, 55-63.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 191-197.

Streichert T., Nollau P., Wagener C., (2003). Functional and Gene Ontology Mapping in Endothelial Cells Following Stimulation with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Clin Chem Lab Med*;41(10):A95

Taheri, H. Uri Saragovi, and Clifford P. Stanners (2003). The Adhesion and Differentiation-inhibitory Activities of the Immunoglobulin Superfamily Member, Carcinoembryonic Antigen, Can Be Independently Blocked THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 17, Issue of April 25, pp. 14632–14639,

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. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 20, 2530-2536.

Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K., 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, 929-939.

Virji, M. Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A., Watt, S.M., (2000). Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable haemophilus influenzae. *Mol. Microbiol.*, 36, 784-795.

Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Wagener, C., Yang, Y.H.J., Crawford, F.G., Shively, J.E. (1983). Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen and related antigens as a model system: a systematic approach for the determination of epitope specificities of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 130, 2308-2315.

Yu, J. & Smith, G. P. (1996). Affinity maturation of phage displayed peptide ligands. *Methods Enzymol.* 267, 3–27.

8. Anhang

8.1. Tabellarischer Anhang

Daten zu Abb. 10: Charakterisierung der Affinität des SSA-Phagenklons zu rCEACAM1

Konzentration des SSA-Phagenklons SSAWWSWPPVA (pfu/ well)	0,0E+00	3,1E+08	6,2E+08	1,25E+09	2,5E+09	5,0E+09	1,0E+10
Phagenbindung an rCEACAM (1 µg/well)	0,079	0,16	0,276	0,438	0,564	0,608	0,687
	0,08	0,154	0,279	0,471	0,501	0,639	0,656
	0,073	0,158	0,243	0,441	0,503	0,682	0,649
Mittelwert Absorption 405 nm	0,0773	0,157	0,266	0,45	0,522	0,643	0,664
Stand.-Abweichung	0,00378	0,00305	0,0199	0,0182	0,0358	0,0371	0,0202
Phagenbindung an IgG (1 µg/well)	0,076	0,126	0,146	0,161	0,198	0,26	0,306
	0,088	0,13	0,144	0,156	0,178	0,281	0,291
	0,076	0,136	0,119	0,179	0,204	0,25	0,321
Mittelwert Absorption 405 nm	0,08	0,130	0,136	0,165	0,193	0,263	0,306
Stand.-Abweichung	0,0069	0,00503	0,01504	0,01209	0,0120	0,01361	0,01582
Phagenbindung an BSA (5 mg/ml)	0,102	0,118	0,125	0,131	0,191	0,175	0,303
	0,081	0,109	0,127	0,151	0,161	0,189	0,289
	0,075	0,115	0,122	0,11	0,174	0,169	0,248
Mittelwert Absorption 405 nm	0,086	0,114	0,124	0,130	0,175	0,177	0,28
Stand.-Abweichung	0,0141	0,00458	0,0025	0,020	0,0150	0,0102	0,0285

Tabelle A: ELISA-Ergebnisse mit dem SSA-Phagenklon.

Konzentration des Kontrollphagen WSPAKTALQHA (pfu/ well)	0,0E+00	3,1E+08	6,2E+08	1,2E+09	2,5E+09	5,0E+09	1,0E+10
Phagenbindung an rCEACAM (1 µg/well)	0,073	0,138	0,164	0,179	0,26	0,296	0,352
	0,069	0,126	0,153	0,22	0,248	0,267	0,312
	0,075	0,119	0,174	0,24	0,298	0,314	0,348
Mittelwert Absorption 405 nm	0,07233	0,127	0,1636	0,213	0,268	0,2923	0,33733
Stand.-Abweichung	0,00305	0,00960	0,01050	0,03109	0,02610	0,02371	0,02203
Phagenbindung an IgG (1 µg/well)	0,081	0,109	0,175	0,21	0,235	0,289	0,327
	0,088	0,13	0,144	0,156	0,259	0,321	0,35
	0,076	0,136	0,119	0,179	0,275	0,281	0,348

8.2. Gefahrstoffe

Gefahrstoff/Symbol/ besondere Hinweise	R-Sätze	S-Sätze
ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz	36/37/38	26-36
Aceton (F)	11	9-16-23.2-3
Acrylamid- /Bisacrylamidlösung (T)	45-46/23/24/25	53-36/37-45
Ammoniumchlorid Xn	22-36	22
BCIP (T)	61-20/21-36	53-45
Chloroform (Xn)	22-38-40-48/20/22	36/37
Ethidumbromid (T+)	22-26-36/37/38-40	26-28. 2-36/37-45
Formaldehyd (T)	23/24/25-34-40-43	26-36/37/39-45
Methanol (F;T)	11-23/25	7-16-24-45
Natriumhydroxid C	35	2-26-37/39
Phenol (T)	25/25-34	28.6-45
PMSF (T)	26/27/28-34-5	45-36/37/39-22
SDS (Xn)	22-36/38	
Xylol (Xn)	10-20/21-38	25

8.4. Danksagung

Herrn Prof. Dr. C. Wagener danke ich für die Überlassung eines hochinteressanten Dissertationsthemas und für die wohlwollende Unterstützung im Fortgang dieser Dissertation. Insbesondere bedanke ich mich für das mir auch auf forschersichen Durststrecken entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. P. Heisig (Institut für Pharmazeutische Biologie Hamburg) danke ich für das rege Interesse an meiner Arbeit, die freundliche Betreuung und die nette Aufnahme seine Arbeitsgruppe.

Frau Prof. M. Schachner (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg) danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die interessante Kooperation.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. Alireza Ebrahimnejad für seine motivierende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die das Laborleben wesentlich bereicherten. Insbesondere danke ich Ihm für das Austesten der RPD-Peptide in Melanomzellen-Invasions-Experimenten, welches entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Jens Franke danke ich für die erfolgreiche technische Zusammenarbeit beim Phagen Display, aus der durch überraschende Ergebnisse auch eine spannende inhaltliche Zusammenarbeit wurde.

Herrn Dr. Thomas Streichert danke ich für seine engagierte Kooperationsbereitschaft bezüglich der Microarray Experimente.

Frau Dr. Andrea Horst danke ich für die Bereitstellung nativen CEACAM1's.

Herrn Dr. Peter Nollau danke ich für die Bereitstellung des rekombinanten CEACAM1's.

Ein weiterer großer Dank geht an Herrn Dr. Oliver Tschenker für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Meinen Laborkollegen danke ich für die freundliche und motivende Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre, wobei ich Anja, Andrea, Christa, Carsten, Malti, Mirjam, Ingo, Martin, Thomas, Joe und Jens hervorheben möchte.

Mein größter Dank gilt meiner Frau und meinen Eltern, auf deren seelischen wie moralischen Beistand in Krisenzeiten Verlass war.

8.5. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Die hier vorliegende Arbeit wurde weder in ihrer jetzigen noch einer ähnlichen Form einem Fachbereich oder einer entsprechenden Institution einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht.

Hamburg, 2.12.05

Jan Alexander Hartmann
