

**Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls
CEACAM1 bei der Lymphgefäßneubildung im
experimentellen Modell der kutanen
Leishmaniose**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Thomas Bickert

aus Fulda

beim Department für Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

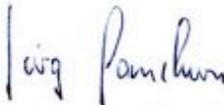
der Universität Hamburg

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 04. Juli 2008

Hamburg, den 18. Juni 2008




Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus möchte ich mich für das Lesen und die Bewertung dieser Arbeit bedanken.

Meinem Betreuer PD Dr. Uwe Ritter gilt mein besonderer Dank für die unermüdliche Bereitschaft, mir jederzeit mit zahlreichen und konstruktiven Anregungen und Diskussionen zur Seite zu stehen.

Frau Dr. Andrea Horst danke ich für die fachlichen Gespräche zur Angiogenese und die Bereitstellung der B6.*Ceacam1^{-/-}* Mäuse.

Frau Alexandra Veit und Frau Ulrike Richardt danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Laboralltag. Bei Frau Gudrun Großschupf möchte ich mich für die Hilfe bei histologischen Färbungen und bei Frau Dr. Christel Schmetz für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen bedanken. Außerdem danke ich allen Tierpflegerinnen und Tierpfleger für die zuverlässige Versorgung der Mäuse.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Kolleginnen und Kollegen verpflichtet, allen voran Nancy Brewig, meiner Mitstreiterin im Labor, Anke Osterloh, für die Einarbeitung in Photoshop und das kritische Lesen dieser Arbeit zusammen mit Birte Kretschmer, sowie Wiebke Hartmann, Katja Lühje, Bernd Lepenies, Frieda Jönsson und Angeles Jurado. Nicht nur im Labor, sondern auch außerhalb haben sie dazu beigetragen, dass es eine sehr schöne Zeit war.

Auch allen anderen hier nicht namentlich erwähnten Mitgliedern der Abteilung für Immunologie danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Atmosphäre.

Neben meinen Geschwistern Tatjana und Volker danke ich von Herzen meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht und mich fortwährend unterstützt haben.

Schließlich bin ich meiner Freundin Sarah unendlich dankbar, die sich hingebungsvoll um mich gekümmert hat und versuchte, mich allzeit zu motivieren.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbene Immunschwächekrankheit
APC	Allophycocyanin
B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-}	CEACAM1 defiziente Maus
B6.WT	Inzuchtmaus des Stammes C57BL/6
BEC	Blutendothelzelle
BGP	biliäres Glykoprotein
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumion
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene, engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CEA	Karzinomembryonales Antigen
CEACAM	dem Karzinomembryonalen Antigen verwandtes Zelladhäsionsmolekül engl.: <i>Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule</i>
CR	Komplementrezeptor
Cy5	ein Cyaninfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	engl.: <i>DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EPC	endotheliale Vorläuferzelle
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötale Kälberserum
Fcγ-R	Immunglobulin-G-Rezeptor
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC/SSC	Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht (engl.: <i>forward/side scatter</i>)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

gp63	Glykoprotein 63
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HBSS	engl.: <i>Hanks' buffered salt solution</i>
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IgV/IgC	variable/konstante Ig-Domäne
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
ITIM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LEC	Lymphendothelzelle
LPG	Lipophosphoglykan
LYVE-1	lymphendothelialer Hyaluronsäurerezeptor-1
MBP	Mannose bindendes Protein
MCP-1	engl.: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
MDF	Makrophagen deaktivierender Faktor
MECA-32	Panendothelzellantigen
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II
MMP	Matrixmetalloprotease
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO•	Stickstoffmonoxid-Radikal
N-terminal	aminoterminal
PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	engl.: <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cyanin-Tandemfarbstoff
PI3	Phosphatidylinositol 3
Prox-1	<i>Drosophila prospero</i> verwandtes Homöoboxgen

PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i>
SEM	Standardfehler, engl.: <i>standard error of the mean</i>
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TfA	engl.: <i>tube-forming assay</i>
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
VEGF	vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
VEGFR	vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Vaskuläre Systeme bei Säugetieren	1
1.1.1	Funktion und Aufbau des lymphatischen Systems	1
1.1.2	Lymphatische Marker	2
1.1.3	Die Entstehung des vaskulären Systems während der Embryonalentwicklung	3
1.1.4	Entstehung neuer Lymphgefäße im erwachsenen Organismus.....	5
1.2	Dem Karzinoembryonalen Antigen verwandte Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs).....	6
1.2.1	Aufbau und Vorkommen der unterschiedlichen CEACAMs	6
1.2.2	CEACAM1	7
1.2.3	Die Rolle von CEACAM1 in der Hämangiogenese	10
1.3	Die Leishmaniose.....	12
1.3.1	Der Parasit und sein Lebenszyklus.....	12
1.3.2	Verbreitung und klinische Manifestation beim Menschen.....	13
1.3.3	Immunologische Implikationen bei einer Infektion mit <i>Leishmania major</i>	15
1.3.4	Mausmodelle der kutanen Leishmaniose	17
1.4	Makrophagen.....	17
1.4.1	Einteilung und Reifung von Makrophagen	17
1.4.2	Funktionen von Makrophagen.....	18
1.4.3	Makrophagen und Gefäßneubildung	20
1.5	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Laborgeräte.....	22
2.1.2	Glas- und Plastikwaren	23
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	23
2.1.4	Mausstämme und Leishmanienstamm	23
2.1.5	Antikörper für Durchflusszytometrie (FACS) und Immunfluoreszenz (IF)	24
2.1.6	Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten	25

2.1.6.1	Reagenzien	25
2.1.6.2	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen.....	25
2.1.7	Material für zellbiologische Arbeiten.....	26
2.1.7.1	Reagenzien	26
2.1.7.2	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen.....	27
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden	29
2.2.1.1	Genotypisierung der B6. <i>Ceacam1^{-/-}</i> Mäuse	29
2.2.1.2	Aufreinigung von IgG Antikörpern aus <i>L. major</i> -Antiserum.....	30
2.2.1.3	Dialyse	30
2.2.1.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford.....	31
2.2.1.5	Konjugation von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	31
2.2.2	Zellbiologische Methoden	31
2.2.2.1	Leishmanienkultur.....	31
2.2.2.2	Zellzählung.....	32
2.2.2.3	Isolierung von Zellen aus Blut.....	32
2.2.2.4	Isolierung von Zellen aus Mauspfoten	32
2.2.2.5	Isolierung von Zellen aus Matrigelimplantaten	33
2.2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	33
2.2.2.7	Histologie	35
2.2.2.7.1	Probengewinnung und Durchführung der Gefrierschnitte.....	35
2.2.2.7.2	Immunfluoreszenz (IF)-Färbung	36
2.2.2.7.3	Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung	36
2.2.2.8	Untersuchung zur Röhrenbildung <i>in vitro</i> (TfA)	37
2.2.2.9	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	38
2.2.3	Tierversuche	38
2.2.3.1	Infektion von Mäusen mit Leishmanien und Messung der Schwellung	38
2.2.3.2	Gewinnung von polyklonalem Maus-anti- <i>L. major</i> Serum.....	39
2.2.3.3	Matrigelimplantationsversuch	39
2.2.3.4	Generierung von chimären Mäusen.....	40
2.2.4	Statistik	41

3	ERGEBNISSE.....	42
3.1	Lymphgefäßneubildung in B6.WT Mäusen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	43
3.1.1	Infektion von B6.WT Mäusen mit <i>L. major</i>	43
3.1.1.1	Infektionsverlauf und wachsendes Infiltrat	43
3.1.1.2	Nachweis lymphatischer Gefäße und LYVE-1 ⁺ Zellen im Infiltrat infizierter Pfoten ...	45
3.1.2	Matrigelimplantationsversuche mit B6.WT Mäusen	49
3.1.2.1	Einwandern verschiedener Zellen in Matrigelimplantate im zeitlichen Verlauf	50
3.1.2.2	Verkürzter Matrigelimplantationsversuch mit und ohne Leishmanien.....	53
3.1.2.2.1	Analyse der Zellen im Matrigelimplantat am Tag 7	53
3.1.2.2.2	Phänotyp LYVE-1 ⁺ Zellen im Matrigelimplantat.....	54
3.1.2.3	Immunfluoreszenz-Analysen von Matrigelimplantaten	55
3.2	Lymphgefäßneubildung nach Knochenmarktransfer mit einem kongenen Marker: B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäuse.....	58
3.2.1	Infektionsverlauf und Analyse des Infiltrats infizierter B6.WT ^{CD45.1} →B6.WT Mäuse..	58
3.2.2	Matrigelimplantationsversuch mit B6.WT ^{CD45.1} →B6.WT Mäusen.....	60
3.2.2.1	LYVE-1 ⁺ Zellen im Matrigelimplantat von B6.WT ^{CD45.1} →B6.WT Mäusen	60
3.2.2.2	LYVE-1 ⁺ Strukturen in Matrigelimplantaten von B6.WT ^{CD45.1} →B6.WT Mäusen.....	61
3.3	Lymphgefäßneubildung in B6.<i>Ceacam1</i>^{-/-} Mäusen	64
3.3.1	Infektion von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen mit <i>L. major</i>	64
3.3.1.1	Infektionsverlauf	64
3.3.1.2	Analyse des Infiltrats infizierter Pfoten.....	65
3.3.1.3	Defekte Neovaskularisierung infizierter Pfoten von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen	66
3.3.2	Analyse CD11b ^{high} /Ly-6C ^{high} Vorläuferzellen im Blut von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen.....	68
3.3.3	Matrigelimplantationsversuch mit B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen	69
3.3.3.1	Einwandern verschiedener Zellen in Matrigelimplantate von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen ..	69
3.3.3.2	Fehlende LYVE-1 ⁺ Strukturen in Matrigelimplantaten von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen	70
3.3.3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Matrigelimplantate	71
3.3.4	Plastisches Potential inflammatorischer Zellen von B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen.....	73
3.4	Lymphgefäßneubildung bei chimären Mäusen.....	74
3.4.1	Transfer von Knochenmark aus B6.WT Mäusen in B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäuse	74
3.4.1.1	Gefäßneubildung in B6.WT ^{CD45.1} →B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäuse <i>in vivo</i>	75
3.4.1.2	CD11b ^{high} /Ly-6C ^{high} Monozyten im Blut von B6.WT ^{CD45.1} →B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen	76
3.4.1.3	LYVE-1 ⁺ Zellen in Matrigelimplantaten von B6.WT ^{CD45.1} →B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen	77
3.4.2	Transfer von Knochenmark aus B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Mäusen in B6.WT Mäuse.....	79

4	DISKUSSION.....	81
4.1	Bedeutung LYVE-1⁺ Zellen bei der Gefäßbildung in Leishmanien-infizierten Mauspfoten und Matrigelimplantaten	82
4.2	Bewertung von Vorläuferzellen bei der Gefäßbildung	85
4.3	Gefäßreifung	88
4.4	Lymphvaskulogenese	90
4.5	Die Rolle von CEACAM1 bei der Lymphgefäßneubildung	92
4.6	Wirkmechanismen von CEACAM1	95
4.7	Ausblick.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
7	ANHANG	119

1 Einleitung

1.1 Vaskuläre Systeme bei Säugetieren

Bei Säugetieren gibt es zwei vaskuläre Systeme, den Blutkreislauf und das lymphatische System. Der Blutkreislauf mit dem Herz als Zentralorgan wurde erstmals 1628 beschrieben (Harvey, 1628). Zur selben Zeit wurde die Existenz von Lymphgefäßen entdeckt (Aselli, 1627). Im Gegensatz zum Blutkreislauf ist das lymphatische System nicht geschlossen. Die Lymphzirkulation ist unidirektional und sorgt für den Transport von Lymphe aus der Peripherie über sekundäre lymphatische Organe in den Blutkreislauf.

1.1.1 Funktion und Aufbau des lymphatischen Systems

Während die Hauptfunktion des Blutkreislaufs die Versorgung aller Organe und Körperteile mit Sauerstoff ist (Carmeliet, 2005), drainiert das Lymphsystem extrazelluläre Gewebsflüssigkeit. Diese entsteht durch den vom Blutdruck verursachten kontinuierlichen Austritt von Blutplasma in das Gewebe (Carmeliet, 2005). Somit kommt dem Lymphsystem eine wichtige Rolle in der Flüssigkeitshomöostase zu, dient aber auch der Beseitigung von Abbauprodukten aus den drainierenden Organen und dem Transport von Immunzellen.

In Säugetieren existieren Lymphgefäße überall dort, wo auch Blutgefäße vorhanden sind, wobei die Plazenta die einzige Ausnahme darstellt. Obwohl die Hornhaut normalerweise gänzlich frei von Gefäßen ist, kann es nach operativen Eingriffen oder bestimmten Augenerkrankungen auch hier zur Gefäßbildung kommen. Im zentralen Nervensystem übernimmt der Liquor die Rolle der Lymphe (Andrade und Jacomo, 2007; Cursiefen *et al.*, 2003)

Das offene Lymphsystem beginnt im Gewebe mit hochpermeablen, blind endenden Kapillaren, die aus einer einzigen Schicht von locker aneinandergelagerten, überlappenden Endothelzellen bestehen. Die an interzellulären Kontakten beginnenden Ankerfilamente sind mit der extrazellulären Matrix (ECM) verbunden und führen zur Öffnung interendothelialer

Verbindungen, sobald sich das interstitielle Volumen erhöht (Casley-Smith und Florey, 1961; Leak und Burke, 1966). Die Lymphflüssigkeit wird über immer größer werdende Gefäße zum Lymphknoten transportiert. Diese Gefäße bilden eine diskontinuierliche Basalmembran aus und besitzen Klappen, die einen Rückfluss verhindern. Große Lymphgefäße sind strukturell wie Venen aufgebaut. Neben einer Endothelzellschicht mit einer Basalmembran weisen sie auch eine Muskelschicht aus glatten Muskeln auf. Der Lymphfluss von den Kapillaren zum Lymphknoten kommt zum einen durch den Druck extrazellulärer Flüssigkeit im Gewebe, zum anderen durch die Körperbewegung und damit einhergehender Kompression der Gefäße durch die Skelettmuskulatur zustande (Oliver und Alitalo, 2005).

Durch afferente Gefäße (*Vas afferens*) gelangen neben Proteinen und Kohlenhydraten aus Gewebsflüssigkeit und dem Abbau der ECM auch aktivierte, dendritische Zellen (DCs) zu den Lymphknoten. Diese antigenpräsentierenden Zellen, die Fremdantigene in der Peripherie aufgenommen haben, treffen dort auf naive, antigenspezifische T- und B-Zellen und aktivieren diese zu Effektorzellen des adaptiven Immunsystems (Banchereau, Steinman 1998, Katakai, Harar 2004). Über ableitende Gefäße (*Vas efferens*) wird die Lymphflüssigkeit zu weiteren Lymphknoten transportiert, bevor sie schließlich über den Brustmilchgang (*Ductus thoracicus*) oder den Lymphgang (*Ductus lymphaticus*) zwischen der *Vena jugularis interna* und der *Vena subklavia* in die Blutbahn gelangt (Andrade und Jacomo, 2007).

Eine Besonderheit stellt die Lymphe des Magen-Darmtraktes dar, die auch *Chylus* genannt wird, da sie durch den Gehalt an Fetten milchig ist. Diese Darmlymphe wird über die Darmlymphknoten und den Brustmilchgang ebenfalls in die Blutbahn geleitet. Somit ist das Lymphsystem auch an der Fettabsorption beteiligt (Hong *et al.*, 2004).

1.1.2 Lymphatische Marker

Mittlerweile gibt es eine Anzahl von Proteinen, die von Lymphendothelzellen (LECs) exprimiert werden. Die bedeutendsten sind der Transkriptionsfaktor Prox-1 (*Drosophila prospero* verwandtes Homöoboxgen), das sialysierte Transmembranprotein Podoplanin, der lymphendotheliale Hyaluronsäurerezeptor-1 (LYVE-1), der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor Rezeptor-3 (VEGFR-3), der Endozytose-vermittelnde Chemokinrezeptor D6, das Chemokin CCL21 und Neuropilin-2 (Jackson, 2007). Dabei ist allerdings zu beachten, dass keines dieser Moleküle ausschließlich von LECs gebildet wird. Entweder werden sie zusätzlich in anderen Geweben oder unter pathologischen Bedingungen, z. B. in Tumoren, exprimiert. Im

Mausmodell wurde gezeigt, dass ein Fehlen von Prox-1 zur Entwicklung eines nicht lebensfähigen Embryos führt, der keine Lymphgefäße besitzt (Wigle und Oliver, 1999). Eine Zerstörung des Gens für VEGFR-3 führt ebenfalls zum Versterben des Mausembryos, allerdings aufgrund kardiovaskulärer Defekte, die durch das Fehlen der frühen vaskulären Expression von VEGFR-3 bedingt sind (Dumont *et al.*, 1998). Blockiert man VEGFR-3 erst nachdem es spezifisch auf LECs exprimiert wird, so führt dies zur Aplasie des Lymphsystems (Makinen *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass LYVE-1 defiziente Mäuse gesund erscheinen und weder Lymphdefekte noch morphologisch abnormale Gefäße besitzen (Gale *et al.*, 2007), obwohl LYVE-1 als einer der ersten und prominentesten Marker für LECs in der embryonalen Entwicklung gilt (Alitalo *et al.*, 2005; Oliver, 2004).

1.1.3 Die Entstehung des vaskulären Systems während der Embryonalentwicklung

Um die Mechanismen besser zu verstehen, die später im ausgewachsenen Organismus zur Neubildung von Lymphgefäßen beitragen, wird im folgenden Kapitel die Entstehung der Gefäße während der Embryonalentwicklung kurz dargestellt.

Als erste Gefäße entstehen Blutgefäße im Embryonalstadium von Säugetieren durch einen Prozess, der Vaskulogenese – Neubildung aus Vorläuferzellen - genannt wird. Aus dem zwischen Ektoderm und Endoderm gebildeten Mesoderm differenzieren sich unter anderem sog. Blutinseln (Risau und Flamme, 1995). Die äußeren Zellen dieser Blutinseln sind Angioblasten, Stammzellen, die sich später zu Endothelzellen entwickeln, während sich im Inneren der Blutinseln die hämatopoetischen Stammzellen befinden, die später die verschiedenen Blutzellen bilden. Diese Blutinseln fusionieren im Embryo zu einem primären Kapillarplexus (Risau und Flamme, 1995). Die frühen Blutgefäße exprimieren neben den Blutendothelmarkern CD31 (PECAM-1, engl.: *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) und MECA-32 (Panendothelzellantigen) auch die lymphatischen Marker LYVE-1 und VEGFR-3 (Dictor *et al.*, 2007). Lymphgefäße entstehen, wenn polarisierte Blutendothelzellen (BECs) den Transkriptionsfaktor Prox-1 bilden (Oliver, 2004) (Abb. 1.1 am Beispiel der Maus). Im Folgenden proliferieren diese Zellen, die neben Prox-1 auch positiv für LYVE-1 und VEGFR-3 sind, und bilden den Ursprung des lymphatischen Netzwerks. Gleichzeitig stellen Blutgefäße die Expression von LYVE-1 und VEGFR-3 ein (Dictor *et al.*, 2007). Ob nun das gesamte lymphatische System aus diesen spezialisierten Venen entsteht, wurde seit der Entdeckung des venösen Ursprungs kontrovers diskutiert (Wilting *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu dieser zentrifugalen Ausbreitung der Lymphgefäße im Organismus (Sabin, 1902) wird vermutet, dass es im Embryo analog zu den

Angioblasten, die zur *de novo* Formierung von Blutgefäßen führen, auch Lymphangioblasten gibt. Diese entstehen aus den spezialisierten Venen und wandern in die Peripherie. Dort führen sie zur Bildung von neuen Lymphgefäßen, die sich dann untereinander verbinden, also zentripetal zusammenwachsen (Huntington und McClure, 1908; Kampmeier, 1912).

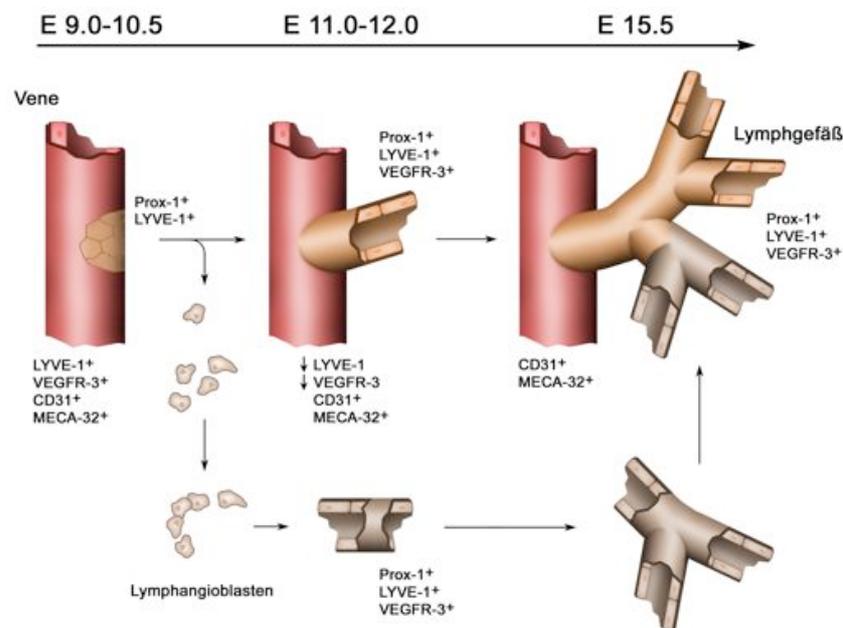


Abb. 1.1 Entstehung lymphatischer Gefäße aus Blutendothel in Säugtieren mit der Zeitachse am Beispiel der Maus. Bis zum Tag 11 im Mausembryo (E 11) sind BECs positiv für LYVE-1, VEGFR-3, CD31 und MECA-32. Am Tag 10 polarisieren venöse Endothelzellen und exprimieren Prox-1. Diese Zellen formieren sich entweder direkt zu Lymphgefäßen oder entwickeln sich zu Lymphangioblasten. Die neuen Lymphgefäße exprimieren die lymphatischen Marker Prox-1, LYVE-1 und VEGFR-3, während BECs die Expression dieser Proteine einstellen.

Während in Zebrafischen gezeigt wurde, dass lymphatische Gefäße nur aus venösen Gefäßen entstehen (Yaniv *et al.*, 2006), wurden in Vögeln Lymphangioblasten identifiziert, die in der embryonalen Entwicklung des Lymphsystems eine Rolle spielen (Schneider *et al.*, 1999). Kürzlich wurden auch im Mausembryo mesenchymale Zellen mit lymphendothelialen Charakteristika gefunden (Buttler *et al.*, 2006; Liersch *et al.*, 2006).

Inwieweit also Lymphangioblasten zum Aufbau des Lymphsystems beitragen, scheint artspezifisch zu sein. Kein Zweifel besteht jedoch darin, dass LECs im Embryo von venösen, also BECs, abstammen.

1.1.4 Entstehung neuer Lymphgefäße im erwachsenen Organismus

Auch im adulten Organismus kommt es unter bestimmten Bedingungen zum Gefäßwachstum. Das Sprossen neuer Kapillaren aus existierenden Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet. Der stärkste Induktor für Hämangiogenese ist die Hypoxie und für Lymphangiogenese die Entzündung (Carmeliet, 2005). Diese physiologischen Stimuli treten nicht nur bei Gewebsregenerierung und Wundheilung, sondern auch bei pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum, verschiedenen Augenerkrankungen oder Entzündungen auf (Karpanen und Alitalo, 2008).

Blutgefäße wachsen zum einen durch Proliferation der Endothelzellen, ausgelöst durch angiogene Faktoren wie den vaskulären Endothelzell-Wachstumsfaktor (VEGF)-A, den Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) oder Angiopoietin-1. Andererseits kommt es zum Einbau von hämatopoetischen endothelialen Vorläuferzellen (EPCs), die direkt durch den Blutstrom zum Ort der Hämangiogenese gelangen (Wiltling und Becker, 2006) (Abb. 1.2A).

Bei der Generierung neuer Lymphgefäße, die zeitlich etwas verzögert zur Hämangiogenese auftritt, ist man bisher davon ausgegangen, dass lymphangiogene Faktoren wie VEGF-C, VEGF-D oder Angiopoietin existierende Gefäße zum Auswachsen stimulieren (He *et al.*, 2004; Saharinen und Petrova, 2004) (Abb. 1.2A).

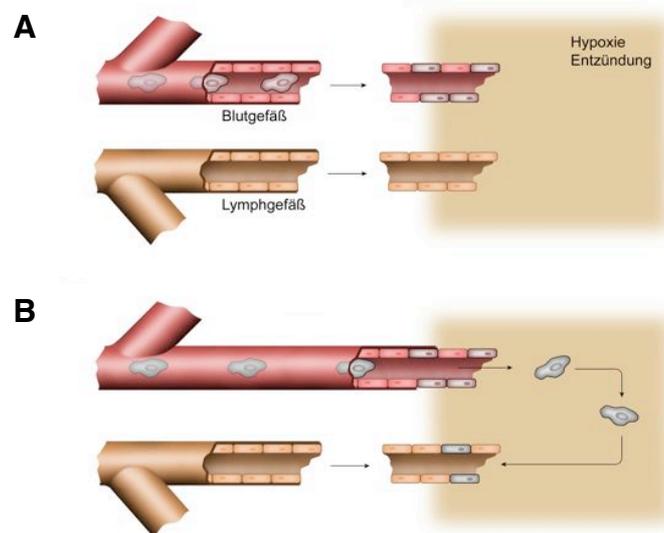


Abb. 1.2 Häm- und Lymphangiogenese im adulten Organismus. (A) Die Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen wird durch Hypoxie oder Entzündung induziert. Dabei integrieren zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) in existierende Blutgefäße, während die BECs gleichzeitig proliferieren. Für Lymphgefäße wurde lange Zeit angenommen, dass sie nur durch Proliferation ihrer LECs wachsen können. (B) Analog zur Hämangiogenese konnte gezeigt werden, dass auch beim Lymphgefäßwachstum endotheliale Vorläuferzellen beteiligt sind.

Neuere Forschungsarbeiten zeigen jedoch, dass auch bei der Lymphangiogenese hämatopoetische Vorläuferzellen aktiv zum Gefäßwachstum beitragen (Religa *et al.*, 2005; Salven *et al.*, 2003). Diese Vorläuferzellen aus dem Blut müssen das Blutendothel durchqueren, am Entzündungsort zu existierenden Lymphgefäßen wandern und integrieren dann zwischen die zusätzlich proliferierenden LECs (Abb. 1.2B).

Lymphangiogenese ist ein sehr wichtiger Prozess bei der Geweberegenerierung, tritt aber auch unter pathologischen Bedingungen auf. Die Identifizierung bestimmter Marker wie LYVE-1 und VEGFR-3 ermöglicht nun, die Mechanismen dieses stark regulierten und gerichteten Wachstums genauer zu analysieren.

1.2 Dem Karzinoembryonalen Antigen verwandte Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs)

Das Karzinoembryonale Antigen (CEA) wurde erstmals als Tumor-assoziiertes Antigen bei Darmkrebs beschrieben, von dem man vermutete, dass es als ursprünglich embryonales Protein während der Krebserkrankung im erwachsenen Menschen erneut exprimiert wird (Gold und Freedman, 1965). CEA wird zwar bei einigen Krebserkrankungen, wie Darm-, Brust- und Lungenkrebs, vermehrt gebildet, allerdings auch in einer Vielzahl gesunder embryonaler und adulter Gewebe exprimiert (Horst *et al.*, 2006). Die dem Karzinoembryonalen Antigen verwandten Zelladhäsionsmoleküle werden CEACAMs (engl.: *Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules*) genannt.

1.2.1 Aufbau und Vorkommen der unterschiedlichen CEACAMs

Aufgrund ihrer strukturellen Homologie gehören die CEACAMs zur Immunoglobulin (Ig)-Superfamilie und werden ausschließlich auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen exprimiert (Beauchemin *et al.*, 1999; Obrink, 1997). CEACAMs spielen eine Rolle bei komplexen zellulären Prozessen, zellulärer Erkennung und homo- und heterophiler Zell-Zell-Adhäsion (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Horst und Wagener, 2004). Bisher wurden 23 verschiedene Moleküle beschrieben. Der Mensch exprimiert zwölf verschiedene CEACAMs, während bei der

Maus 15 unterschiedliche CEACAMs identifiziert wurden (<http://cea.klinikum.uni-muenchen.de>; Zebhauser *et al.*, 2005).

Die CEACAMs besitzen zwischen einer und sieben extrazellulären, Ig-ähnlichen Domänen, die 85 bis 110 Aminosäuren lang sind und durch zwei gegenläufige β -Faltblattstrukturen gekennzeichnet sind (Vaughn und Bjorkman, 1996). Diese Ig-ähnlichen Strukturen lassen sich in variable (IgV) und konstante (IgC) Domänen einteilen. Während einige CEACAMs ausschließlich löslich vorkommen, sind andere über Glykosylphosphatidylinositol oder eine transmembrane Domäne mit der Zellmembran verankert. Manche CEACAMs können mit ihrem zytoplasmatischen Teil zelluläre Proteine direkt binden oder über phosphorylierbare Aminosäuren in zelluläre Signalkaskaden eingreifen.

Der extrazelluläre Teil der CEACAMs enthält zahlreiche N-Glykosylierungsstellen. Dabei können Zuckerreste bis zu 50 % des Molekulargewichts von CEACAMs ausmachen, wobei die Glykosylierung eines CEACAMs abhängig vom Zelltyp ist und mit dem Differenzierungsstatus der Zelle variieren kann (Lucka *et al.*, 2005).

1.2.2 CEACAM1

CEACAM1, in der Literatur auch als C-CAM, BGP (biliäres Glykoprotein) oder CD66a beschrieben, wird auf Epithelien, endothelialen Gefäßen und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Obrink, 1997; Prall *et al.*, 1996). Als Zelladhäsionsmolekül spielt es eine wichtige Rolle in der Signalübertragung bei Zell-Zell-Kontakten und der Regulation dieser Signale (Beauchemin *et al.*, 1999; Obrink, 1997).

CEACAM1 ist ein homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül. Der bedeutendste extrazelluläre Interaktionspartner ist CEACAM1 selbst (Sundberg *et al.*, 2004). Dabei kann es mit einem CEACAM1 Molekül auf einer anderen Zelle (in *trans*) oder auf derselben Zelle (in *cis*) interagieren. Zusätzlich kann CEACAM1 auch mit CEACAM5 oder CEACAM6 heterophile Interaktionen eingehen (Horst und Wagener, 2004). Diese Moleküle werden jedoch nicht in der Maus exprimiert. Weiterhin dient CEACAM1 auch als Rezeptor für verschiedene Pathogene wie das Maushepatitis Virus (Dveksler *et al.*, 1993), verschiedene Neisserien Arten (Toleman *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 1996), *Moraxella catarrhalis* (Hill und Virji, 2003), *Haemophilus influenzae* (Virji *et al.*, 2000) und *Escherichia coli* (Berger *et al.*, 2004). Für die spezifischen homo- und heterophilen Bindungen ist eine nicht glykosylierte β -Faltblattstruktur in der extrazellulären, aminoterminalen (N-terminalen) Domäne verantwortlich (Watt *et al.*, 2001).

Das komplette CEACAM1 (CEACAM1-4L) besitzt drei extrazelluläre IgC- und eine N-terminale IgV-Domäne (Abb. 1.3). Insgesamt kann es extrazellulär an 20 Stellen glykosyliert werden. An eine Transmembrandomäne schließt sich ein langer zytoplasmatischer Teil an. Durch alternatives Splicing gibt es in der Maus vier verschiedene Isoformen, während beim Menschen sogar zwölf verschiedene Isoformen bekannt sind (Zebhauser *et al.*, 2005). Neben dem vollständigen Molekül CEACAM1-4L gibt es in der Maus eine Form mit einem verkürzten zytoplasmatischen Teil, CEACAM1-4S. Zusätzlich können in beiden Varianten zwei extrazelluläre IgC-Domänen fehlen (CEACAM1-2L und CEACAM1-2S) (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Zebhauser *et al.*, 2005).

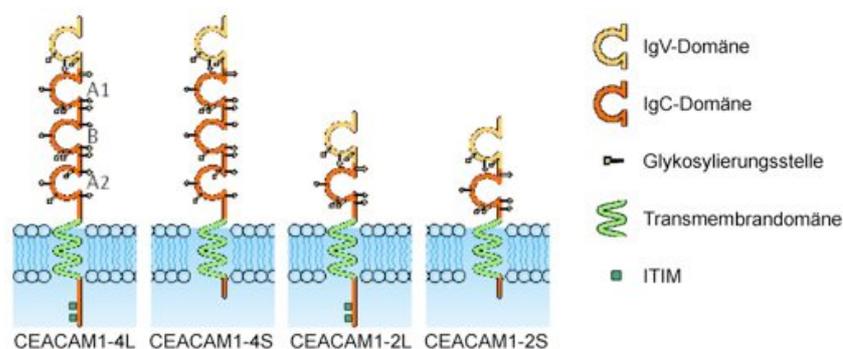


Abb. 1.3 verschiedene Isoformen von CEACAM1. Das komplette Molekül, CEACAM1-4L, besteht aus einer extrazellulären N-terminalen IgV-Domäne, gefolgt von drei IgC-Domänen. An eine transmembrane Domäne schließt sich ein langer zytoplasmatischer Teil mit phosphorylierbaren Aminosäuren in zwei ITIMs an. Durch alternatives Splicing entsteht entweder CEACAM1-4S mit einem kurzen zytoplasmatischen Teil, CEACAM1-2L mit nur einer IgC-Domäne und einem langen zytoplasmatischen Teil oder CEACAM1-2S mit nur einer extrazellulären IgC-Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. (nach Gray-Owen und Blumberg, 2006)

Im Gegensatz zum humanen *Ceacam1* Gen gibt es in der Maus zwei Allele, *Ceacam1a* und *Ceacam1b*, die sich vor allem in der N-terminalen Domäne unterscheiden (McCuaig *et al.*, 1993).

Das vollständige Protein (CEACAM1-4L) besteht aus 521 Aminosäuren, wovon 73 Aminosäuren den langen zytoplasmatischen Teil bilden, der zwei phosphorylierbare, inhibitorische Sequenzmotive (ITIMs, engl.: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) enthält. Durch diese phosphorylierbaren Tyrosin- und Serinreste (Tyr488, Tyr515 und Ser503) ist CEACAM1-L in die intrazelluläre Signalübertragung involviert (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Dimerisierung von CEACAM1-L führt zur Phosphorylierung dieser Tyrosinreste durch Kinasen der Src-Familie (Brummer *et al.*, 1995; Skubitz *et al.*, 1995), worauf tyrosinabhängige Phosphatasen, wie SHP-1 oder SHP-2, rekrutiert und aktiviert werden (Obrink, 1997). Durch Dephosphorylierung verschiedener Substrate können diese aktivierten Phosphatasen nun ein

Signal in Zellen dämpfen oder ganz inhibieren (Ravetch und Lanier, 2000). Für die Dimerisierung von CEACAM1 Molekülen ist die bereits erwähnte nicht glykosylierte N-terminale Domäne entscheidend. Allerdings beeinflussen intrazelluläre Kalziumionen (Ca^{2+}) diesen Prozess, da eine hohe Ca^{2+} -Konzentration zur Bindung von Ca^{2+} -geladenem Calmodulin an den zytoplasmatischen Teil von sowohl CEACAM1-L als auch CEACAM1-S führt. Dadurch wird eine Dimerisierung sterisch entweder verhindert oder es kommt zur Dissoziation von *cis*-Dimeren *in vitro* (Hunter *et al.*, 1996).

CEACAM1-L interagiert außerdem mit Proteinen des Zytoskeletts, wie Aktin (Da Silva-Azevedo und Reutter, 1999; Sadekova *et al.*, 2000; Schumann *et al.*, 2001), Paxillin (Ebrahimnejad *et al.*, 2000), Tropomyosin (Schumann *et al.*, 2001), Talin (Muller *et al.*, 2005) und Filamin A (Klaile *et al.*, 2005) sowie dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor) (Abou-Rjaily *et al.*, 2004), dem Insulinrezeptor (Najjar, 2002) und Integrin $\beta 3$ (Brummer *et al.*, 2001) in einer vom Phosphorylierungsstatus seines zytoplasmatischen Teils abhängigen Weise (Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Kuespert *et al.*, 2006; Najjar, 2002).

Im Gegensatz dazu besitzt CEACAM1-S nur einen zehn Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil ohne phosphorylierbare Aminosäurereste. Jedoch können diese zehn Aminosäuren Calmodulin, Tropomyosin und Aktin direkt binden und so mit dem Zytoskelett interagieren (Gray-Owen und Blumberg, 2006).

CEACAM1-vermittelte Signale können positiv oder negativ sein. Da beide Isoformen (S und L) in den meisten CEACAM1 positiven Zellen koexprimiert werden, wird vermutet, dass das Verhältnis beider Isoformen zueinander ausschlaggebend für die Art des entstehenden intrazellulären Signals ist (Singer *et al.*, 2000; Turbide *et al.*, 1997). Zusätzlich kann dieses Signal durch die Balance der rekrutierten Kinasen oder Phosphatasen reguliert werden (Sundberg *et al.*, 2004).

Die fast ubiquitäre Expression von CEACAM1 und die vielfältigen zellulären Interaktionspartner verweisen auf die Beteiligung von CEACAM1 an zahlreichen zell- und gewebespezifischen Prozessen wie Zellproliferation (Singer *et al.*, 2000), Tumorwachstum und -metastasierung (Ebrahimnejad *et al.*, 2004), Angiogenese (Horst *et al.*, 2006; Wagener und Ergün, 2000), Apoptose (Kirshner *et al.*, 2003), Epithelzellpolarisierung (Sundberg *et al.*, 2004), Lymphozytenaktivierung (Kammerer *et al.*, 1998) und Insulinmetabolismus (Najjar, 2002).

CEACAM1 wird auf vielen immunologischen Zellen wie Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen, T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und DCs exprimiert (Sundberg *et al.*, 2004), wobei eine Bindung in *trans* zu verzögerter Apoptose in Granulozyten (Singer *et al.*, 2005),

erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs (Kammerer *et al.*, 2001), verstärkte B-Zell Proliferation (Greicius *et al.*, 2003) und T-Zell Aktivierung (Kammerer *et al.*, 1998) führt. Allerdings wurde kürzlich auch eine Inhibierung der Lymphozytenaktivierung durch CEACAM1-L beschrieben (Gray-Owen und Blumberg, 2006).

Eine ähnliche kontroverse Rolle spielt CEACAM1 bei Krebserkrankungen. So unterdrückt es tumorigene Eigenschaften bei Darmkrebs (Leung *et al.*, 2006; Neumaier *et al.*, 1993; Nollau *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1993). Dafür scheint vor allem der zytoplasmatische Teil von CEACAM1-L verantwortlich zu sein, da eine CEACAM1-L Mutante ohne N-terminale IgV-Domäne, die essentiell für CEACAM1-vermittelte Zell-Zell-Bindung ist, auch mit Tumorwachstum in Nacktmäusen interferiert (Izzi *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite erhöht CEACAM1 das onkogene Potential von Melanomen, führt zu verstärkter Metastasierung und damit einhergehend zu einer schlechteren Prognose (Brummer *et al.*, 2001; Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Thies *et al.*, 2002).

1.2.3 Die Rolle von CEACAM1 in der Hämangiogenese

Nach der Initiierung der Blutgefäßneubildung durch hämangiogene Faktoren wie VEGF-A oder Angiopoietin sind Adhäsionsmoleküle essentiell für zelluläre Prozesse, die während der Angiogenese stattfinden. Dazu zählen zelluläre Migration, Aufbau des vaskulären Netzwerkes und Interaktion mit der ECM, um nur einige zu nennen (Carmeliet und Jain, 2000; Conway *et al.*, 2001; Horst und Wagener, 2004). In den letzten Jahren wurde immer wieder beschrieben, dass CEACAM1 auch bei der Neubildung von Blutgefäßen eine Rolle spielt und selbst hämangiogene Wirkung besitzt (Ergün *et al.*, 2000; Horst *et al.*, 2006).

So führt Sauerstoffmangel (Hypoxie) zu einer erhöhten Expression von CEACAM1 zusammen mit anderen hämangiogenen Wachstumsfaktoren in Ratten und Mäusen (Chen *et al.*, 2005). Außerdem wird CEACAM1 in Mikrogefäßen von stark proliferierenden und von Gefäßneubildung begleiteten menschlichen Geweben wie Plazenta und Endometrium gebildet (Prall *et al.*, 1996). Ebenfalls positiv für CEACAM1 sind Tumor-assoziierte Mikrogefäße und neu gebildete humane Blutkapillare, während große Blutgefäße im Menschen keine CEACAM1 Expression aufweisen (Ergün *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu sind in der Maus Blutgefäße generell positiv für CEACAM1 (Horst und Wagener, 2004).

Neben der Expression auf neu gebildeten Blutgefäßen gibt es eine enge Korrelation zwischen CEACAM1 und bekannten hämangiogenen Faktoren. So steigert CEACAM1 die Expression von

Angiopoietin, Angiogenin und VEGF-A, das seinerseits die Expression von CEACAM1 verstärkt (Chen *et al.*, 2005; Kilic *et al.*, 2005). Ergün *et al.* haben gezeigt, dass CEACAM1 die Proliferation, Chemotaxis und Gefäßbildung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen erhöhte (Ergün *et al.*, 2000). Somit weist CEACAM1 ähnliche hämangiogene Eigenschaften wie VEGF-A auf. Zusätzlich konnte die Gruppe dokumentieren, dass CEACAM1 synergistisch mit VEGF-A zum Auswachsen und Auswandern primärer humaner Endothelzellen führte und dabei die Wirkung von VEGF-A nicht nur potenzierte, sondern dass CEACAM1 sogar essentielle hämangiogene Effekte von VEGF-A erst vermittelt, da eine funktionelle Blockade von CEACAM1 mittels Antikörper VEGF-A-induzierte morphologische Ereignisse verhinderte (Ergün *et al.*, 2000). Durch Abschaltung der CEACAM1-Expression mittels siRNA wurde die positive Wirkung von CEACAM1 auf Wanderung und Invasion humaner Endothelzellen bestätigt (Kilic *et al.*, 2005).

Neben diesen Befunden auf zellulärer Ebene zeigten Horst *et al.*, dass in CEACAM1 defizienten Mäusen die Blutgefäßneubildung in implantierter, zellfreier ECM, die mit hämangiogenen Faktoren wie Angiopoietin-1, FGF oder VEGF-A komplementiert wurde, deutlich reduziert war. Zusätzlich kam es zu einer verminderten Neovaskularisierung und Umformung der Gefäße nach Ischämie durch Femoralarterienokklusion in diesen Tieren (Horst *et al.*, 2006). Eine Überexpression von CEACAM1-L spezifisch auf BECs unter dem Tie2-Promotor induzierte Gefäßwachstum und Gefäßintegrität *in vitro* und *in vivo* (Horst *et al.*, 2006).

Auch bei der Tumorphämangiogenese scheint CEACAM1 eine Rolle zu spielen, da die CEACAM1-Expression mit Metastasierung und schlechter Prognose bei Melanomen korreliert (Brummer *et al.*, 2001; Thies *et al.*, 2002). Dies lässt sich nicht nur dadurch erklären, dass CEACAM1 durch die Interaktion mit Integrin $\beta 3$ die Invasion und Wanderung von Tumorzellen induziert (Brummer *et al.*, 2001; Ebrahimnejad *et al.*, 2004). Vielmehr beeinflusst CEACAM1 auch die Tumorgefäßneubildung, da Integrin $\alpha v \beta 3$ ein Regulator der Hämangiogenese ist (Bello *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 1994; Petitclerc *et al.*, 1999; Rehn *et al.*, 2001).

Somit ist die Expression von CEACAM1 auf murinen Endothelzellen notwendig für frühe Prozesse der Hämangiogenese wie endotheliale Proliferation, Invasion und Differenzierung (Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Ergün *et al.*, 2000; Horst *et al.*, 2006). Trotz der beschriebenen Einflüsse von CEACAM1 auf die Neubildung von Blutgefäßen zeigt die CEACAM1 defiziente Maus keinerlei Auffälligkeiten bezüglich ihrer Vaskularisierung, was darauf hinweist, dass CEACAM1 keine Rolle bei gefäßbildenden Prozessen während der Entwicklung und unter physiologischen Bedingungen *in vivo* spielt (Hemmila *et al.*, 2004; Horst *et al.*, 2006).

1.3 Die Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, die durch Protozoen der Gattung *Leishmania* (*L.*) verursacht wird. Diese Parasiten werden durch Sandmücken übertragen und verursachen sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe, abhängig von der Leishmanienart und des Immunstatus des Wirtes (Schönian *et al.*, 2004; Von Stebut, 2007).

1.3.1 Der Parasit und sein Lebenszyklus

Leishmanien wurden erstmals 1903 von William B. Leishman und Charles Donovan unabhängig voneinander beschrieben (Donovan, 1903; Leishman, 1903). Leishmanien sind obligat intrazelluläre, einzellige Parasiten der Familie *Trypanosomatidae* mit einem biphasischen Lebenszyklus. In der Sandmücke liegen sie als lang gestreckte promastigote Leishmanien vor, die 10 bis 15 μm lang sind und eine Geißel besitzen. In den Vakuolen von Säugetierzellen hingegen transformieren sie zu 2,5 bis 6,8 μm großen, rundlichen Amastigoten, bei denen die Geißel in der Geißeltasche verschwindet und im Lichtmikroskop nicht mehr zu erkennen ist (Mehlhorn und Piekarski, 1998).

Es gibt über 30 verschiedene Leishmanienarten, die morphologisch nicht zu unterscheiden sind. Nur mit molekularbiologischen Methoden (Isoenzymanalyse, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Antikörpernachweis) lassen sich die einzelnen Erreger den Arten zuordnen (Schönian *et al.*, 2004).

Beim Stich einer weiblichen Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* werden 10 bis 100 hochinfektiöse, metazyklische, promastigote Leishmanien subkutan in den Wirt injiziert (Warburg und Schlein, 1986) (Abb. 1.4). Hunde und Nager stellen die Hauptwirte dar, wobei aber auch Katzen, Rinder, Pferde und der Mensch infiziert werden können. Im Säugetierwirt replizieren die Leishmanien in Vakuolen von Zellen des mononukleären Systems, vor allem in Makrophagen, in denen sie zunächst innerhalb von 2 bis 5 Tagen in die amastigote Form transformieren (Antoine *et al.*, 1998; Von Stebut, 2007). Durch massive Vermehrung der Leishmanien mittels longitudinaler, binärer Teilung in den Vakuolen platzen die Zellen schließlich, wodurch die Parasiten freigesetzt werden und weitere Zellen infizieren können (Ashford, 2000). Da infizierte Zellen auch im Blut vorkommen (Awasthi *et al.*, 2004), können die Parasiten bei einer erneuten Blutmahlzeit einer Stechmücke wieder auf diese übertragen werden. Dabei werden amastigote Leishmanien im Darm der Insekten freigesetzt. Innerhalb von

5 bis 10 Tagen vermehren sie sich stark und wandeln sich in die promastigote Form um. Diese begeißelten Leishmanien wandern dann aktiv in die Speicheldrüse der Mücke und werden bei der nächsten Blutmahlzeit in den Stichkanal injiziert (Pearson *et al.*, 1983; Von Stebut und Sunderkötter, 2007). Dadurch kommt es zur Infektion eines weiteren Wirtes.

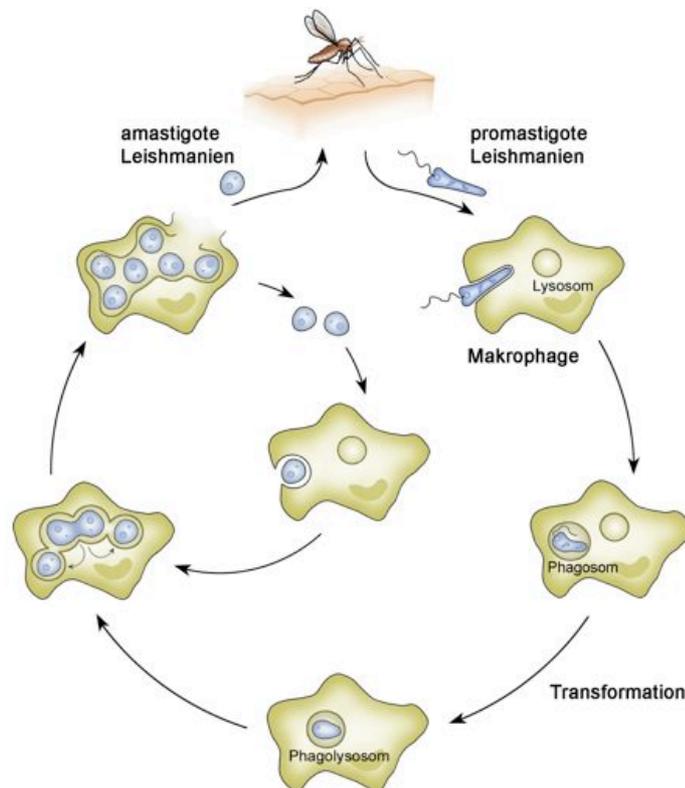


Abb. 1.4 Vereinfachter Lebenszyklus von Leishmanien. Bei der Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke werden metazyklische, promastigote Leishmanien subkutan injiziert. Die Parasiten werden von Makrophagen aufgenommen, transformieren zu amastigoten Leishmanien und replizieren im Phagolysosom. Die starke Vermehrung führt zum Aufplatzen der Wirtszelle, so dass die freigesetzten Erreger neue Zellen infizieren können. Der Lebenszyklus schließt sich, wenn erneut eine Sandmücke amastigote Leishmanien aufnimmt, die sich in der Mücke zu infektiösen Promastigoten entwickeln.

1.3.2 Verbreitung und klinische Manifestation beim Menschen

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählt die Leishmaniose zu einer der sechs bedeutendsten Tropenkrankheiten, die in über 88 Ländern der Welt, vor allem in Südamerika, Afrika, Westasien, aber auch im Mittelmeergebiet (Frankreich, Italien, Spanien und Griechenland), verbreitet ist. Weltweit gibt es 12 Millionen Infizierte, von denen jährlich 57000 Menschen sterben. Außerdem leben 350 Millionen Menschen in Risikogebieten, in denen sich jedes Jahr 2 Millionen Menschen neu infizieren (<http://who.int/leishmaniasis/burden/en>). Die

Leishmaniose gehört zu den Zoonosen, da sie von Tieren auf den Menschen und umgekehrt übertragen wird (Ashford, 2000; Gramiccia und Gradoni, 2005; Schönian *et al.*, 2004).

Der klinische Verlauf einer Leishmaniose beim Menschen ist maßgeblich abhängig von der jeweiligen Leishmanienart und dem Immunstatus des Menschen, wobei drei verschiedene Krankheitsbilder auftreten (Von Stebut und Sunderkötter, 2007). Bei der am häufigsten vorkommenden Hautleishmaniose (Afghanistan, Iran, Saudi Arabien, Syrien) kommt es zur Bildung einer lokalen, ulcerativen Hautläsion, die meist nach mehreren Monaten spontan unter Narbenbildung abheilt. Diese Erkrankung ist auch unter den Namen Bagdad ulcer, Orient- oder Aleppobeule bekannt und wird durch *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* oder *L. braziliensis* ausgelöst. Die Schleimhautleishmaniose (Brasilien, Peru, Bolivien), auch Uta oder Espundia genannt, wird meist durch *L. braziliensis* verursacht. Sie führt zu Geschwüren an Nase und Mund und geht einher mit einer massiven Gewebeerstörung der Schleimhäute und Knorpel und einer lebenslangen Entstellung der Menschen. Bei der viszeralen Leishmaniose (Bangladesh, Brasilien, Indien, Nepal, Sudan) manifestiert sich die Infektion im gesamten Organsystem und führt zu Fieber, Anämie, Gewichtsverlust und einem Anschwellen von Leber und Milz. Diese durch *L. donovani* oder *L. infantum* verursachte Erkrankung, auch als Dum-Dum-Fieber oder Kala Azar bekannt, verläuft ohne medikamentöse Behandlung oft tödlich (Ashford, 2000; Gramiccia und Gradoni, 2005).

Besondere Bedeutung gewinnt die Leishmaniose bei immunsupprimierten Patienten oder bei Personen, die an der erworbenen Immunschwächekrankheit (AIDS) erkrankt sind. Durch diese Koinfektion entsteht ein Synergieeffekt, bei welchem Leishmanien durch eine hohe Serumkonzentration an Tumornekrosefaktor (TNF) die Replikation des HI-Virus in Makrophagen verstärken, während das Virus durch die Zerstörung der CD4⁺ T-Zellen die adaptive Immunantwort gegen die Leishmanien vermindert (Cruz *et al.*, 2006).

In erster Linie werden Leishmanien-infizierte Patienten mit pentavalenten Antimonpräparaten wie N-Methylglucamin Antimonat oder Natriumstibogluconat behandelt. Sind diese durch Resistenzen des Erregers nicht wirksam oder kontraindiziert, verwendet man Amphotericin B, Allopurinol, Pentamidin, Paromomycin oder Miltefosine (Ashford, 2000; Cruz *et al.*, 2006; Schönian *et al.*, 2004).

1.3.3 Immunologische Implikationen bei einer Infektion mit *Leishmania major*

Als humanpathogener Parasit verursacht *L. major* eine ulzerierende, selbstheilende Hautleishmaniose (Von Stebut, 2007). Die Inkubationszeit beträgt beim Menschen zwischen wenigen Wochen und zwei bis drei Monaten. An der Infektionsstelle tritt zunächst eine rötliche Papel auf, die später ulzeriert. Die Hälfte aller Geschwüre, die durch *L. major* verursacht werden, heilen innerhalb von drei Monaten unter Narbenbildung ab (Von Stebut und Sunderkötter, 2007).

Zur Kontrolle einer Infektion mit *L. major* ist das Zusammenspiel der angeborenen und der adaptiven Immunantwort wichtig (Scott und Scharton, 1994). Auf Seiten der angeborenen Immunität stehen Makrophagen und NK-Zellen im Vordergrund. Bei der adaptiven Immunität ist die Induktion einer von Leishmanien-spezifischen T-Helferzellen des Typ 1 (T_H1) vermittelten Immunreaktion für die Beseitigung der Erreger entscheidend (Scharton-Kersten und Scott, 1995).

Hauptantigene infektiöser, promastigoter Leishmanien sind das Lipophosphoglykan (LPG) und das Glykoprotein 63 (gp63), die sich beide in der Glykokalyx der Leishmanien befinden (Elhay *et al.*, 1990). An diese Strukturen können sich Komplementfaktoren anlagern, die einen Großteil der Erreger durch den lytischen Komplex aus C5a-C9 eliminieren (Von Stebut und Sunderkötter, 2007). Die Bindung durch den Komplementfaktor C3b und dessen Spaltung zu C3bi führt außerdem zur Opsonisierung der Leishmanien. Durch die Bindung der Komplementfaktoren an die Komplementrezeptoren (CR) 1 und CR3 auf Makrophagen kommt es somit zur Phagozytose (Olivier *et al.*, 2005; Spath *et al.*, 2000). Zusätzlich können das Mannose bindende Protein (MBP) und der Mannose/Fukose Rezeptor auf Makrophagen an LPG bzw. gp63 binden (Chakraborty *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1994).

Nach erfolgter Phagozytose ist das LPG der promastigoten Leishmanien daran beteiligt, die Reifung des Endosoms zum Phagolysosom zu verhindern, so dass die Phagosomenbiogenese im Stadium des späten Endosoms arretiert wird (Dermine *et al.*, 2000). Aufgrund der höheren Temperatur und des etwas saureren Milieus in der Wirtszelle, verglichen mit der Situation in der Mücke, transformieren die Leishmanien in die amastigote Form. Da Amastigote ein anderes LPG exprimieren, kommt es zur Aufhebung der Reifungsblockade, was eine Ansäuerung des Phagosoms durch Verschmelzung mit Lysosomen zur Folge hat (Duclos und Desjardins, 2000). Da aber amastigote Leishmanien resistent gegenüber den sauren und lytischen Bedingungen in einem Phagolysosom sind, können sie in diesen überleben und sich durch mitotische Teilung vermehren (Antoine *et al.*, 1998). Bei der Phagozytose von Leishmanien kommt es nicht zur Aktivierung der Makrophagen und somit zu keiner Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

In der anfänglich symptomlosen Phase vermehren sich die Leishmanien intrazellulär in Phagozyten, die die Parasiten nicht abtöten können (Von Stebut, 2007). Allerdings entkommen nicht alle Parasiten der adaptiven Immunantwort, so dass eine Entzündungsreaktion entsteht, in der infizierte oder aktivierte dermale Zellen inflammatorische Zytokine und Chemokine ausschütten (Ritter und Körner, 2002). Dadurch werden Mastzellen, Neutrophile, Makrophagen und DCs an den Infektionsort rekrutiert, und es manifestiert sich eine erste Hautläsion (Belkaid *et al.*, 2000). Die inflammatorischen dermalen DCs können nun Leishmanienantigen, vermittelt durch den Immunglobulin-G-Rezeptor (Fc γ -R) oder das Lektin DC-SIGN (engl.: *DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*), im Infektionsherd aufnehmen (Caparros *et al.*, 2005; Woelbing *et al.*, 2006). Infolge der Antigenaufnahme reifen die DCs, wobei sie verstärkt den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II (MHC-II), kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD86 und den Chemokinrezeptor (CCR)7 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Ritter *et al.*, 2004b). Dabei ist CCR7, dessen Ligand das Chemokin CCL21 ist und von LECs gebildet und sekretiert wird (Kriehuber *et al.*, 2001), essentiell für das Auffinden lymphatischer Kapillaren in der Peripherie und die Migration der DCs zum Lymphknoten (Ohl *et al.*, 2004). Diese antigenträgenden DCs wandern im Lymphknoten in einen Bereich des äußeren Paracortex, der auch als „cortical ridge“ bezeichnet wird (Katakai *et al.*, 2004; Kissenpfennig *et al.*, 2005). In dieser Immunplattform treffen nun die reifen, antigenpräsentierenden DCs auf naive T-Zellen. Erkennt der spezifische T-Zellrezeptor einer naiven CD4⁺ T-Zelle das Leishmanienantigen im Komplex mit MHC-II Molekülen auf der Oberfläche der DC, so entstehen durch weitere kostimulatorische Signale (CD40, CD80, CD86) und lösliche Faktoren, insbesondere das Interleukin (IL)-12, Leishmanien-spezifische T_H1 Effektorzellen (Banchereau und Steinman, 1998), die essentiell zur Bekämpfung der Leishmaniose sind (Scharton-Kersten und Scott, 1995; Von Stebut und Udey, 2004). Diese T_H1-Effektorzellen proliferieren und exprimieren CCR4, CCR10 sowie die Liganden von E- und P-Selektin, was dazu führt, dass die T-Zellen über die Blutbahn an den Infektionsort in der Haut wandern können (Mora und von Andrian, 2006; Reiss *et al.*, 2001). In der Haut aktivieren diese T_H1-Zellen nun infizierte Makrophagen durch Sekretion von Interferon (IFN)- γ (Bogdan und Röllinghoff, 1998; Von Stebut und Udey, 2004). Dadurch können die Makrophagen verstärkt die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) bilden und mittels Stickstoffmonoxid-Radikalen (NO \bullet) die Parasiten in der parasitophoren Vakuole abtöten (Bogdan *et al.*, 2000). Auf diese Weise kommt es zur Beseitigung der Infektion.

1.3.4 Mausmodelle der kutanen Leishmaniose

Zur Untersuchung der Hautleishmaniose werden Mäuse subkutan mit *L. major* entweder in das Ohr (Belkaid *et al.*, 2000) oder die Hinterpfote (Bogdan und Röllinghoff, 1998) injiziert. Dabei kann der Verlauf der Infektion anhand der Gewebeschwellung am Infektionsort nachverfolgt werden. Allerdings korreliert die Ausprägung der Schwellung nicht unbedingt mit der Anzahl der Parasiten im Gewebe (Ritter *et al.*, 2004a).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass resistente Mäuse des Stammes C57BL/6 (B6.WT) eine *L. major*-Infektion durch Etablierung einer T_H1-Immunreaktion beseitigen (Sadick *et al.*, 1986; Sypek *et al.*, 1993). Dabei war die Induktion der IFN- γ -produzierenden T_H1-Effektorzellen abhängig von TNF und IL-12 (Mattner *et al.*, 1996; Wilhelm *et al.*, 2001).

In Inzuchtmäusen des Stammes Balb/c hingegen dominiert eine T_H2-Immunantwort, bei der es zur Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 kommt. Diese Tiere können eine Infektion mit *L. major* nicht kontrollieren und versterben (Blackwell, 1996).

1.4 Makrophagen

Bei einer Infektion mit Leishmanien dienen Makrophagen nicht nur als Wirtszellen, sondern sind auch an der Beseitigung dieser intrazellulären Erreger beteiligt. Auf der anderen Seite wurde beschrieben, dass Makrophagen in den Prozess der Hämangiogenese involviert sind (Knighton *et al.*, 1983; Sunderkötter *et al.*, 1994). Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass Makrophagen einen bedeutenden Einfluss auf die Neubildung von Lymph- und Blutgefäßen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen haben (Lewis und Pollard, 2006; Maruyama *et al.*, 2007; Moldovan, 2002). Aus diesem Grund soll an dieser Stelle kurz auf diese wichtigen Zellen des angeborenen Immunsystems eingegangen werden.

1.4.1 Einteilung und Reifung von Makrophagen

Die erste Beschreibung mobiler Phagozyten geht auf Ilya Metchnikoff am Ende des 19. Jahrhunderts zurück (Tauber, 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass Makrophagen in vielen unterschiedlichen Prozessen wie Entzündung, Entwicklung, Knochenmetabolismus, Angiogenese

und Wundheilung beteiligt sind (Roth und Ritter, 2006). Makrophagen und ihre Vorläufer gehören zum mononukleären System, welches früher retikuloendotheliales System genannt wurde (Hume *et al.*, 2002). Zu diesem System zählen neben Monozyten (Knochenmark, Blut) und Gewebemakrophagen (ubiquitär) auch Kupfer-Zellen (Leber), Mikroglia (Zentralnervensystem), Osteoklasten (Knochen), DCs (ubiquitär) und Langerhans-Zellen (Haut)(Roth und Ritter, 2006).

Blutmonozyten entstehen innerhalb von 6 bis 7 Tagen aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark in Anwesenheit von IL-3, dem Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Dabei durchlaufen sie die Stadien von Granulozyten-Monozyten-Vorläufer, Monoblasten und Promonozyten (Valledor *et al.*, 1998). Diese differenzieren durch M-CSF zu Makrophagen. Die Monozytenpopulation im peripheren Blut ist nicht homogen. So exprimieren unreife, aus dem Knochenmark stammende Monozyten CD11b^{high}/Ly-6C^{high} (Sunderkötter *et al.*, 2004). Reifung und Rekrutierung dieser Zellen in entzündete Gewebe führt zu Herunterregulierung von Ly-6C auf der Oberfläche von Monozyten. Außerdem gibt es eine CD11b^{high}/Ly-6C^{low} Population im Blut, von der man ausgeht, dass diese Zellen sich in der Entwicklung zu DCs befinden. Somit stellt die monozytäre Population im Blut ein Reservoir myeloider Vorläuferzellen dar, die das Potential haben, sich in verschiedene andere Zellen weiterzuentwickeln (Geissmann *et al.*, 2003).

1.4.2 Funktionen von Makrophagen

Bei einer entzündlichen Infektion oder Gewebeschädigung kommt es zur Rekrutierung von reifenden Monozyten und Makrophagen in das betroffene Gewebe. Durch die Expression von Selektinen und Integrinen des Blutendothels am Ort der Entzündung können diese Zellen dort anhaften und nach Auflösung von Zell-Zell-Kontakten das Blutendothel durchqueren (Alexander, 2000; Johnson-Leger *et al.*, 2000; Maslin *et al.*, 2005). Im Gewebe wandern die Makrophagen gerichtet durch das Chemokin CCL2 (früher MCP-1, engl.: *monocyte chemoattractant protein-1*) (Ritter und Körner, 2002; Rollins *et al.*, 1991). Dabei kommt es zur Polarisierung des Aktinzytoskeletts (Jones, 2000) und der kalzium-abhängigen Umorganisation des Mikrotubulsystems (Pettit und Fay, 1998).

Mononukleäre Zellen können durch Multiligandrezeptoren (PRRs, engl.: *pattern recognition receptors*) konservierte Motive auf Pathogenen (PAMPs, engl.: *pathogen-associated molecular patterns*) erkennen und eine Entzündungsreaktion auslösen (Janeway und Medzhitov, 2002). Zu

den PRRs gehören zum einen lösliche Proteine wie Komplementfaktoren oder das Mannan-bindende Protein, aber auch membrangebundenen Moleküle, zu denen die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs), der Makrophagen-Mannose-Rezeptor, der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor und CD14 gezählt werden. Mit diesen Rezeptoren können fremde Moleküle erkannt werden (Janeway und Medzhitov, 2002). Zur Phagozytose von Fremdpartikeln kommt es durch Fc γ -Rezeptoren, Komplementrezeptoren oder Rezeptoren der Scavenger-Familie (Underhill und Ozinsky, 2002). Weiterhin eliminieren Makrophagen apoptotische Zellen durch Phagozytose. Diese werden entweder durch die Oberflächenexpression von Phosphatylserin oder Thrombospondin, das sich auf apoptotischen Zellen anlagert, erkannt (Messmer und Pfeilschifter, 2000).

Während die Phagozytose apoptotischer Zellen zu keiner Entzündungsreaktion führt, bewirkt die Aufnahme von Fremdpartikeln durch Bindung an PRRs eine Aktivierung der Makrophagen. Diese produzieren und sezernieren daraufhin proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β , IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF, Leukotrien C4 und Thromboxan B2 (Aderem und Underhill, 1999; Fadok *et al.*, 1998). Die aufgenommenen Partikel werden im Phagolysosom durch lysosomale Hydrolasen verdaut. Außerdem kommt es durch die Aktivierung der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase zur Produktion von Superoxidanionen und Hydrogenperoxid, die dazu beitragen, mikrobielle Erreger abzutöten (Babior, 2002; Underhill und Ozinsky, 2002). Fragmente dieses Abbaus können auf MHC-II Moleküle geladen und von den Makrophagen auf der Zelloberfläche naiven T-Zellen präsentiert werden (Kiertcher und Roth, 1996; Ramachandra *et al.*, 1999). Durch weitere kostimulatorische Signale kommt es zur Aktivierung antigenspezifischer naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen. Somit üben Makrophagen neben DCs und B-Zellen die Funktion antigenpräsentierender Zellen aus.

Im Fall einer Leishmanieninfektion reichen die sauren Hydrolasen und die reaktiven Sauerstoffmoleküle nicht aus, um den Erreger im Phagolysosom abzutöten. Zum einen vermittelt das LPG der Leishmanien (Chan *et al.*, 1989), zum anderen das von Leishmanien gebildete Enzym Superoxid Dismutase (SOD) eine Protektion gegenüber reaktiven Superoxid-Radikalen (Ghosh *et al.*, 2003; Olivier *et al.*, 2005). Werden die infizierten Makrophagen jedoch durch IFN- γ , welches von T μ 1-Zellen sezerniert wird, aktiviert, so kommt es durch die Expression von iNOS zur Produktion von leishmanizidem NO \bullet (Brandonisio *et al.*, 2001; MacMicking *et al.*, 1997; Underhill und Ozinsky, 2002).

1.4.3 Makrophagen und Gefäßneubildung

Unter pathologischen Bedingungen spielen Makrophagen im Prozess der Gefäßneubildung eine wesentliche Rolle. Sie akkumulieren in Entzündungsherden und induzieren nicht nur Hämangiogenese (Arras *et al.*, 1998; Khmelewski *et al.*, 2004; Lewis und Pollard, 2006), sondern auch Lymphangiogenese (Maruyama *et al.*, 2007; Rutkowski *et al.*, 2006; Schledzewski *et al.*, 2006). Dabei wird vermutet, dass sie zum einen durch die Synthese von Matrixmetalloproteasen (MMPs) den Umbau der ECM fördern (Bingle *et al.*, 2002; Moldovan, 2002) und zum anderen häm- bzw. lymphangiogene Faktoren produzieren und sezernieren, die Endothelzellen zur Proliferation anregen.

So werden bei Tumorerkrankungen Tumor-assoziierte Makrophagen via CCL2, M-CSF und VEGF-A rekrutiert und gleichzeitig deren Aktivierung durch den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β , den Makrophagen deaktivierender Faktor (MDF) und Prostaglandin E2 verhindert (Bingle *et al.*, 2002; Elgert *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass diese Tumor-assoziierten Makrophagen VEGF-C produzieren und dadurch Tumorlymphangiogenese induzieren (Schoppmann *et al.*, 2006). Die Dichte dieser neu gebildeten, intratumoralen Lymphgefäße korreliert vor allem bei Melanomen, Kopf-Hals-Karzinomen und Bauchspeicheldrüsenkrebs mit Metastasierung und schlechter Prognose (Audet *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung

Im Mausmodell der kutanen Leishmaniose kommt es zu einer Schwellung der Pfoten, die mehrere Wochen andauert. Eine Studie über die Gefäßneubildung am Ort der Entzündung wurde bisher noch nicht durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass eine große Anzahl von Zellen zum Infektionsort rekrutiert wird, die mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden müssen, ist die Bildung neuer Blutgefäße zu erwarten. Ob es unter diesen inflammatorischen Bedingungen jedoch auch zu Neubildung von Lymphgefäßen kommt, ist bisher unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig die Gefäßneubildung während der akuten Phase der kutanen Leishmaniose zu untersuchen. Hierbei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- a) Kommt es zu einem Wachstum von Lymphgefäßen?
- b) Welche Mechanismen führen zu diesem Gefäßwachstum?
- c) Welche Rolle spielen dabei myeloide Zellen?

Da gezeigt wurde, dass CEACAM1 auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und wichtig für die Hämangiogenese ist (Horst *et al.*, 2006), sollte als zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit der Einfluss von CEACAM1 bei der Formierung neuer Lymphgefäße analysiert werden. Eine Beteiligung des Adhäsionsmoleküls wird dadurch wahrscheinlich, da die zellulären Prozesse bei der Hämangiogenese und Lymphangiogenese sehr ähnlich sind. So werden interendotheliale Zellverbindungen gelöst, Endothelzellen proliferieren und wandern, es kommt zur Degradierung von ECM, und schließlich wird die Integrität der Gefäße wiederhergestellt. Folgende Fragen standen hierbei im Focus:

- d) Ist CEACAM1 bei der Lymphgefäßneubildung beteiligt?
- e) Welche CEACAM1-exprimierenden Zellen sind dabei ausschlaggebend?
- f) Auf welche Weise ist CEACAM1 in diesen Prozess involviert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

CO ₂ -Inkubator	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Digitalkamera (Nikon E4500)	<i>Nikon</i> , Düsseldorf
ELISA-Reader MRX II	<i>Dynex Technologies GmbH</i> , Berlin
FACSCalibur Flow Cytometer	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
FACS-Software CELLQuest Pro	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus)	<i>Zeiss</i> , Jena
Fluoreszenzmikroskop-Kamera (C4742-95)	<i>Hamamatsu</i> , Herrsching
Fluoreszenzmikroskop-Software Openlab 5.0.2	<i>Improvision</i> , Coventry, UK
Fußdicken-Messgerät	<i>Kroeplin GmbH</i> , Schlüchtern
Gamma Bestrahlungsanlage (OB29/4)	<i>STS GmbH</i> , Braunschweig
Kryostat (FrigoCut 2800 E)	<i>Leica</i> , Nußloch
Magnetrührer	<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen
Messer für Kryostat (d-Messer)	<i>Leica</i> , Nußloch
Mikroskop (Olympus CK2)	<i>Olympus</i> , Hamburg
Mikrowelle	<i>Panasonic</i> , Wiesbaden
pH-Meter (WTW pH 537)	<i>Labotec</i> , Wiesbaden
Photometer	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Pipetten	<i>Abimed</i> , Langenfeld
Transmissions-Elektronenmikroskop (CM10)	<i>FEI</i> , Eindhoven, Niederlande
Rührstrudler	<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen
Schüttler	<i>Eppendorf-Nethler-Hinz</i> , Hamburg
Sterile Arbeitsbank (Hera Safe)	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Ultramikrotom (Ultracut E)	<i>Leica</i> , Nußloch
Umkehrmikroskop (Axiovert 200)	<i>Zeiss</i> , Jena
Wasserdeionisierungsanlage	<i>SG Clear</i> , Barsbüttel
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Zentrifuge (Biofuge fresco)	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Einbettsschalen (Tissue Tek Cryomold)	<i>Sakura, Finetek, Zoeterwoude, NL</i>
FACS-Röhrchen	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Kanülen	<i>Braun, Melsungen</i>
Neubauer-Zählkammer für Leishmanien (Tiefe 20 μm)	<i>Hecht-Assistent, Sondheim</i>
Neubauer-Zählkammer für Zellen (Tiefe 100 μm)	<i>Hecht-Assistent, Sondheim</i>
Objektträger (Lab-TekII, 4 Kammern)	<i>Nunc, Roskilde, Dänemark</i>
Objektträger für IHC (Superfrost)	<i>R. Langenbrinck, Teningen</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nürnberg</i>
Plastikpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	<i>Sarstedt, Nürnberg</i>
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	<i>Braun, Melsungen</i>
Sterilfilter (0,22 μm und 0,45 μm)	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
Zellkulturplatten (96 Näpfe, unbeschichtet)	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Zellsiebe (Cell Strainer, 70 μm , steril)	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Zellsiebe (CellTrics, 30 μm , unsteril)	<i>Partec GmbH, Münster</i>
Zentrifugenröhrchen (Falcon, 15 ml, 50 ml)	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen *Fluka* (Neu-Ulm), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma* (Deisenhofen) bezogen.

2.1.4 Mäusestämme und Leishmanienstamm

Mäusestämme:

C57BL/6J = B6.WT	B6.WT Mäuse, die die Isoform CD45.2 auf allen hämatopoetischen Zellen exprimieren <i>UKE, Hamburg</i>
C57BL/6J ^{CD45.1} = B6.WT ^{CD45.1}	B6.WT Mäuse, die die Isoform CD45.1 auf allen hämatopoetischen Zellen exprimieren <i>BNI, Hamburg</i>
Balb/c	<i>UKE, Hamburg</i>
B6. <i>Ceacam1</i> ^{-/-}	CEACAM1 defiziente Mäuse durch Deletion der ersten beiden Exons im <i>Ceacam1</i> Gen (Leung <i>et al.</i> , 2006) (Abb. 2.1) auf C57BL/6 Hintergrund; exprimieren CD45.2 Dr. A. Horst, <i>UKE, Hamburg</i>

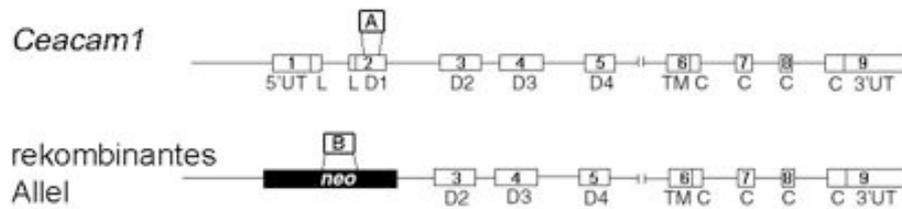


Abb. 2.1 *Ceacam1* Gen und *Ceacam1*^{-/-} Genlocus. Das *Ceacam1* Gen besteht aus neun Exons. In der B6.*Ceacam1*^{-/-} Maus wurde das Gen durch ein rekombinantes Allel ersetzt. Dabei wurden die beiden ersten Exons deletiert, die die Leader-Sequenz und die N-terminale Domäne codieren, und ein Neomycin-Resistenzgen eingefügt. Zusätzlich eingezeichnet sind die Bereiche für die Genotypisierung (A: spezifisch für das intakte *Ceacam1* Gen, B: spezifisch für das Neomycin-Resistenzgen im rekombinanten Allel). UT: untranslatierte Sequenz; L: Leader-Sequenz; D1-D4: extrazelluläre Ig-Domänen; TM: transmembrane Domäne; C: zytoplasmatischer Teil; *neo*: Neomycin-Resistenzgen (Leung *et al.*, 2006).

Leishmanienstamm:

L. major (MHOM/IL/81/FE/BNI)

BNI, Hamburg (Solbach 1986)

2.1.5 Antikörper für Durchflusszytometrie (FACS) und Immunfluoreszenz (IF)

Primärantikörper:

Spezifität und Konjugation	Klon	Verwendung	Herkunft
Ratte-anti-Maus CD11b PE	M1/70.15	FACS	CALTAG, Burlingame, USA
Ratte-anti-Maus CD11b PerCP-Cy5.5	M1/70	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD11b	M1/70	IF	BD Pharmingen, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD11c APC	HL3	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD45 FITC/PerCP	30-F11	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-Maus CD45.1 PE	A20	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-Maus CD45.1 biotin	A20	IF	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-Maus CD45.2 biotin	104	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD49b PE	Dx.5	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-Maus CEACAM1	pan IgG	FACS, IF	Dr. A. Horst, UKE, Hamburg
Ratte-anti-Maus F4/80 biotin	BM8	FACS	BMA Biomedicals, Augst, CH
Ratte-anti-Maus Gr-1 PE	RB6-8C5	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti- <i>L. major</i> Alexa488/647	pan IgG	FACS	eigene Herstellung
Ratte-anti-Maus Ly-6C	ER-MP 20	FACS	BMA Biomedicals, Augst, CH
Kaninchen-anti-Maus LYVE-1	pan IgG	FACS, IF	Upstate, Lake Placid, NY
Ratte-anti-Maus MECA-32 biotin	MECA-32	FACS, IF	BD Pharmingen, Heidelberg

Isotypkontrollen:

Spezifität und Konjugation	Klon	Verwendung	Herkunft
Maus IgG1 FITC	MOPC-31C	FACS	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Kaninchen IgG unkonjugiert	pan IgG	FACS	<i>Dianova GmbH</i> , Hamburg
Ratte IgG2a unkonjugiert/biotin/FITC	R35-95	FACS	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Ratte IgG2b unkonjugiert/biotin	A95-1	FACS	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg

Sekundärantikörper und Sekundärreagenzien:

Spezifität und Konjugation	Verwendung	Herkunft
Esel-anti-Kaninchen IgG Cy5	FACS	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-Kaninchen IgG TRITC	IF	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-Ratte IgG Cy5	FACS, IF	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-Ratte IgG PE	FACS	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Streptavidin-APC/PerCP	FACS	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Streptavidin-Alexa488	FACS, IF	<i>Mo Bi Tec</i> , Göttingen

2.1.6 Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten**2.1.6.1 Reagenzien**

Primer für Genotypisierung	<i>MWG-Biotech</i> , Ebersberg
<i>Ceacam1</i> -Primer	5'-CTGCCCCTGGCGCTTGGGA-3' 5'-ACATGAAATCGCACAGTCGC-3'
<i>neo</i> -Primer	5'-CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3' 5'-GCCGCCAAGCTCTTCAGCAA-3'
Bradford-Reagenz (Coomassie Plus Protein Assay Reagent)	<i>Pierce</i> , Rockford, USA
Dialyseschlauch (Porengröße 10 kDa)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Protein-G-Säule (Sephrose, HiTrap Protein G HP)	<i>Amersham</i> , Freiburg
Alexa Fluor 488/647 Protein labeling Kit	<i>Molecular Probes</i> , Eugene, USA

2.1.6.2 Kulturmedien, Puffer und StammlösungenGlycinpuffer (Protein-G-Säule):

0,1 M Glycin

pH 2,7

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl eingestellt, der Puffer anschließend entgast.

Phosphatpuffer (Protein-G-Säule):Puffer A: 20 mM Na₂HPO₄Puffer B: 20 mM NaH₂PO₄

Puffer A und Puffer B wurden gemischt, bis ein pH-Wert von 7,0 eingestellt war. Danach wurde der Phosphatpuffer entgast.

10x PBS (Phosphate Buffered Saline):

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄2,4 g KH₂PO₄ad 1 l dH₂O

pH 7,4

Tris-HCl:

1 M Tris-HCl

pH 8,0

2.1.7 Material für zellbiologische Arbeiten**2.1.7.1 Reagenzien**

2-Mercaptoethanol	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Aminosäuren (NEAA 100x)	<i>Cambrex</i> , Verviers, Belgien
Antibiotikum (Baytril, 2,5 %)	<i>Bayer AG</i> , Leverkusen
Augentropfen (Lacrigel)	<i>Dr. Winzer Pharma GmbH</i> , Berlin
BHI-Agar (Brain Heart Infusion Agar)	<i>Fluka</i> , Neu-Ulm
Bleiacetat	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar
Cohn-II (humane IgG-Fraktion)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Cytofix/Cytoperm und Perm/Wash Puffer	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
D-PBS (Dulbecco's-PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	<i>Pan, Biotech GmbH</i> , Frankfurt
Dispase (50 units/ml)	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
EBM-2 (Basales Endothelzellmedium)	<i>Cambrex</i> , Walkersville, MD
EDTA (500 mM)	<i>Calbiochem</i> , Schwalbach
Einbettmedium IF (Tissue Tek O.C.T. Compound)	<i>Sakura</i> , Finetek, Zoeterwoude, NL
Einbettmedium H&E (Eukitt)	<i>Kindler</i> , Freiburg
Einmalküvetten (Plastibrand)	<i>Brand</i> , Wertheim
Einmalmesser für Kryostat	<i>Leica</i> , Nußloch
Eosin	<i>Merck</i> , Darmstadt
Epon-Kit	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar
Fettstift DakoCytomation Pen	<i>DakoCytomation</i> , Glostrup, DK
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Glutaraldehyd	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar

Hämatoxylin	<i>Merck</i> , Darmstadt
HBSS (Hanks' Buffered Salt Solution) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Heparin (25.000 I.E.)	<i>Ratiopharm GmbH</i> , Ulm
HEPES (1 M)	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Kaninchenblut (defibriniert)	<i>Charles River</i> , Sulzfeld
Ketavet (100 mg/ml)	<i>Pharmacia GmbH</i> , Karlsruhe
Kollagenase-D	<i>Roche</i> , Mannheim
Latex-Kugeln (6,4 µm Durchmesser)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
L-Glutamin	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Matrigel	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Natrium-Cacodylat	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar
Osmiumoxid	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar
PenicillinG-Streptomycin Lösung (100 fach)	<i>Gibco/BRL GmbH</i> , Eggenstein
Permafluor	<i>Immunotech</i> , Marseille, Frankreich
Pyruvat	<i>Gibco/BRL GmbH</i> , Eggenstein
Rattenserum	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>Serva Feinbiochemika</i> , Heidelberg
Rompun (2 %)	<i>Bayer AG</i> , Leverkusen
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Silan (3-Aminopropyl-trimethoxysilan)	<i>Fluka</i> , Neu-Ulm
Trypanblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Tween 20	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Uranylacetat	<i>Plano GmbH</i> , Wetzlar
VEGF-C	<i>R&D Systems</i> , Wiesbaden

2.1.7.2 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Für die Zellkultur wurden die Medien und Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und der BHI-Agar für den Blutagar autoklaviert (20 min, 135 °C, 2 bar). Zur Inaktivierung des Komplementsystems im FCS und Rattenserum wurden diese vor Gebrauch für 45 min auf 56 °C erwärmt.

Aceton-Silan-Lösung:

375 ml Aceton
7,5 ml Silan

Anästhetikum:

10 mg/ml Ketavet
0,05 % Rompun in D-PBS

Block-Lösung (IF):

10 % FCS
1 % BSA in PBS

Blutagar:

50 ml Kaninchenblut (defibriniert)
50 ml NaCl (0,9 % in dH₂O)
1x PenicillinG-Streptomycin
200 ml BHI-Agar (52 g/l in dH₂O)

BSA-Medium:

RPMI 1640 Medium
10 % BSA
2mM L-Glutamin
1x PenicillinG-Streptomycin
50 μ M 2-Mercaptoethanol
10 mM HEPES
1x Aminosäuren (NEAA)
1 mM Pyruvat

Cohn-II-Stammlösung:

10 mg/ml in PBS

DAPI-Stammlösung:

500 μ g/ml in dH₂O

Endothelzellmedium:

EBM-2 Medium
3 % FCS

Eosin-Lösung:

1 g/l in dH₂O

Erythrozyten-Lysepuffer:

10 % 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)
90 % 0,16 M Ammoniumchlorid

FACS-Puffer:

3 % FCS
0,05 % Natriumazid in PBS

Fixierlösung (H&E):

2 % PFA in PBS

Glutaraldehyd-Puffer:

2 % Glutaraldehyd
0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer

Hämatoxylin-Lösung:

1 g/l Hämatoxylin
0,2 g NaJO₃
50 g Kalialaun
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure

Kollagenase-D-Stammlösung:

10 mg/ml in HBSS

Osmiumoxid-Lösung

1 % Osmiumoxid in Natrium-Cacodylat-Puffer

Paraformaldehyd-Lösung:

2 % Paraformaldehyd in PBS

PBS-BSA (IF):

1 % BSA in PBS

PBS-Tween (IF):

0,01 % Tween 20 in PBS

RPMI-Vollmedium:

RPMI 1640 Medium

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

1 fach PenicillinG-Streptomycin (Penicillin: 100 units/ml), Streptomycin: 100 μ g/ml)

50 μ M 2-Mercaptoethanol

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.1.1 Genotypisierung der B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse

Da bei der Zucht immer heterozygote B6.*Ceacam1*^{+/-} Tiere verpaart wurden, mussten die Nachkommen mittels PCR auf ihre CEACAM1 Expression hin kontrolliert werden. Die Genotypisierung wurde von Dr. A. Horst (UKE, Hamburg) nach einem kürzlich beschriebenen Protokoll durchgeführt (Leung *et al.*, 2006). In der PCR wurden zwei Primerpaare eingesetzt, die zum einen spezifisch für das *Ceacam1* Gen und zum andern für das Neomycin-Resistenzgen waren (vgl. Abb. 2.1). Bei Tieren mit intaktem *Ceacam1* Gen (B6.WT, B6.WT^{CD45.1}) war eine Bande von 250 Basenpaaren (bp) zu sehen, während bei B6.*Ceacam1*^{-/-} Tieren eine 550 bp große Bande auftrat (Abb. 2.2). In heterozygoten Tieren (B6.*Ceacam1*^{+/-}) konnten beide Gene nachgewiesen werden. Die Kontroll-PCR wurde von Dr. A. Horst (UKE, Hamburg) durchgeführt.

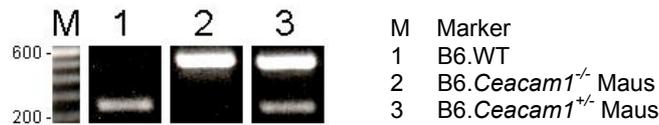


Abb. 2.2 Genotypisierung der B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse. Aus der Schwanzspitze der verschiedenen Mäuse wurde DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. In B6.WT Mäusen konnte das *Ceacam1* Gen mit Primern, die im Exon 2 binden, nachgewiesen werden (250 bp). In B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen fehlte dieses Fragment, wobei allerdings das Neomycin-Resistenzgen nachgewiesen werden konnte (550 bp). In DNA aus heterozygoten Nachkommen wurden beide Gene detektiert (Dr. A. Horst, UKE, Hamburg).

2.2.1.2 Aufreinigung von IgG Antikörpern aus *L. major*-Antiserum

Mittels einer Protein-G-Säule wurden *L. major*-spezifische Antikörper von anderen Serumproteinen getrennt. Bei dieser Methode binden die Antikörper mit ihrem Fc-Fragment an die Matrix der Protein-G-Säule, während alle anderen Proteine durch die Säule wandern. Zunächst wurde die Säule mit 100 ml Phosphatpuffer äquilibriert. Eine sterilfiltrierte (45 μ m) 1:1-Verdünnung des polyklonalen *L. major* Antiserums mit Phosphatpuffer wurde auf die Säule gegeben und nach dem vollständigen Durchlauf mit 100 ml Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper mit 50 ml Glycinpuffer eluiert. Durch Zugabe von 20 μ l Tris-HCl pro 1 ml Eluat wurde die Lösung neutralisiert. Zur weiteren Verwendung wurde die Protein-G-Säule mit Phosphatpuffer gewaschen und in 20 % Ethanol gelagert. Die aufgereinigte Antikörperlösung wurde mittels Dialyse in PBS umgepuffert, die Konzentration bestimmt und anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.

2.2.1.3 Dialyse

Für die Konjugation der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff müssen diese in PBS vorliegen, da Ammoniumionen und primäre Amine die Reaktion beeinträchtigen. Für diesen Pufferwechsel eignet sich die Dialyse, da man so niedermolekulare Substanzen aus einer Lösung entfernen kann. Zunächst wurde eine EDTA-Lösung (0,01 %) aufgekocht, in die der Dialyseschlauch für 10 min hineingelegt wurde. Nach Waschen mit deionisiertem Wasser wurde der Schlauch mit der Antikörperlösung beladen und in 10 l PBS gegeben. Unter Rühren erfolgte die Dialyse bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde die Konzentration der umgepufferten Antikörperlösung bestimmt.

2.2.1.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Proteinkonzentrationen kann man durch eine von Bradford entwickelte Methode photometrisch bestimmen (Bradford, 1976). Durch die Komplexierung von Proteinen mit Coomassie-Brillantblau kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 630 nm. Die Intensität der Extinktion bei 630 nm ist dabei ein Maß für die Menge an Protein. In einer Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen wurden zu 20 μl Proteinlösung 250 μl Bradford-Reagenz gegeben und die Extinktion bei 630 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Neben Doppelwerten der Probe wurde eine BSA-Verdünnungsreihe vermessen, um den genauen Proteingehalt der Antikörperlösung berechnen und eine Konzentration von 2 mg/ml in PBS einstellen zu können.

2.2.1.5 Konjugation von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für FACS- und IF-Analysen wurden aufgereinigte, polyklonale Seren von Maus-anti-CEACAM1 (Dr. A. Horst, UKE, Hamburg) und Maus-anti-*L. major* Antikörpern direkt mit Alexa Fluor Farbstoffen nach Herstellerangaben (Kits von *Molecular Probes*, Eugene, USA) konjugiert. 500 μl der Antikörperlösung wurden mit 50 μl einer 1 M Bicarbonat-Lösung in das Reaktionsgefäß mit dem Farbstoff gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Trennung von Antikörper-Farbstoff-Konjugaten von freien Farbstoffmolekülen wurde der Reaktionsansatz auf eine Säule mit Bio-Rad Bio Gel P-30 gegeben und mit 10 ml PBS eluiert. Dabei grenzte sich der konjugierte Antikörper beim Durchlaufen durch die Säule von den ungebundenen Farbstoffmolekülen ab. Auf diese Weise entstanden ein Maus-anti-CEACAM1 Alexa488 sowie ein Maus-anti-*L. major* Alexa488 und ein Maus-anti-*L. major* Alexa647 Antikörper.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Leishmanienkultur

Die Kultivierung promastigoter Leishmanien erfolgte in RPMI-Vollmedium auf Blutagar bei 28 °C und 5 % CO₂. 50 μl Blutagar wurden dabei im 45° Winkel in eine unbeschichtete Zellkulturplatte mit 96 Näpfen gegossen, so dass die Hälfte des Bodens frei von Agar war. Im Bereich vor dem Blutagar wuchsen die Leishmanien in 150 μl RPMI-Vollmedium zu einer konfluenten Schicht. Wöchentlich wurden die Leishmanien aus 12 Näpfen entnommen, in 15 ml RPMI-Vollmedium verdünnt und auf eine neue Zellkulturplatte verteilt. Um die Virulenz der

Leishmanien zu erhalten, erfolgte alle 7 bis 9 Wochen eine Mauspassage. Dazu wurden 3×10^6 Leishmanien in die rechte Hinterpfote von Balb/c Mäusen injiziert und die Zunahme der Schwellung wöchentlich kontrolliert. Vier Wochen nach Beginn der Infektion wurden die Leishmanien aus den Pfoten isoliert, indem diese mit einer Schere steril zerkleinert und durch ein Zellsieb (Cell Strainer) gedrückt wurden. Nach Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet in 16 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und zur Kultur auf eine Blutagarplatte ausgesät.

2.2.2.2 Zellzählung

Die Anzahl lebender Zellen wurde mit dem Trypanausschlusstest bestimmt. Der Test beruht darauf, dass nur tote Zellen mit Trypanblau angefärbt werden, da vitale Zellen den Farbstoff aus dem Zellinneren ausschließen. Zellsuspensionen wurden mit Trypanblau 1:1 oder 1:10 verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 100 μm) ausgezählt. Aus dem Produkt der durchschnittlichen Anzahl der Zellen aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor 1×10^4 , der Verdünnung und dem Volumen der Zellsuspension ergab sich die Gesamtzellzahl aller lebenden Zellen.

2.2.2.3 Isolierung von Zellen aus Blut

Aus der Schwanzvene der Mäuse wurden 5 bis 10 Tropfen Blut entnommen und eine Gerinnung mittels Heparin verhindert. Anschließend wurden 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer zu dem Blut gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Lyse mit 10 ml FACS-Puffer gestoppt wurde. Nach Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 min erfolgten noch zwei weitere Waschschrte und schließlich die Bestimmung der Zellzahl.

2.2.2.4 Isolierung von Zellen aus Mauspfoten

Infizierte oder naive Pfoten wurden am Gelenk abgetrennt, mit einer Schere zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml HBSS und 100 μl Kollagenase-D-Stammlösung gegeben. Der Verdau des grob zerkleinerten Gewebes erfolgte bei 37 °C auf einem Schüttler für 30 min. Die Zugabe von 10 μl EDTA-Lösung (500 mM) führte zur Inaktivierung der Kollagenase-D. Anschließend wurde der Ansatz vollständig auf ein Zellsieb (Cell Strainer) überführt und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durchgedrückt. Das Zellsieb wurde mit 10 ml FACS-Puffer durchgespült.

Nach der Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 min konnten die Zellen für FACS-Analysen und der Bestimmung der Zellzahl mittels FACS weiterverarbeitet werden.

2.2.2.5 Isolierung von Zellen aus Matrigelimplantaten

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Matrigelimplantate aus den Mäusen präpariert und die Zellen enzymatisch isoliert. Dazu wurde ein Implantat in 1,8 ml Dispase gegeben, mit einer Schere grob zerkleinert und für 90 min bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation bei 450 g und 4 °C für 10 min wurde das Pellet in HBSS resuspendiert, und es schloss sich ein Kollagenase-D-Verdau analog zu Kapitel 2.2.2.4 an. Mittels Trypanblau wurde die Anzahl aller lebenden Zellen pro Implantat bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entweder mittels FACS analysiert oder in einem funktionellen Test (TfA, Kapitel 2.2.2.8) eingesetzt.

2.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzellebene. Es beruht darauf, dass Zellen einzeln hintereinander durch eine Kapillare des FACS-Gerätes (engl.: *fluorescence-activated cell sorter*) den Lichtstrahl eines Argon-Ionen-Lasers passieren. Dabei detektieren Photomultiplikatoren die Streuung des Lichtes. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl.: *forward scatter*) ist das Licht, welches in Richtung des einfallenden Lichtstrahls gestreut wird. Es ist ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl.: *side scatter*) ist Licht, das im rechten Winkel gestreut wird und der zellulären Granularität entspricht. Mit Hilfe von spezifischen fluoreszenzkonjugierten Antikörpern kann man verschiedene Proteine einer Zelle nachweisen. Diese Proteine können sich auf der Zelloberfläche oder intrazellulär befinden. Die Antikörper, die spezifisch Proteine erkennen, besitzen einen Fluoreszenzfarbstoff, der entweder durch den Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm oder dem roten Dioden-Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm angeregt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome sind Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Alexa Fluor 488 in der Fluoreszenz 1 (FL1), Phycoerythrin (PE) in FL2, Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) oder ein PerCP-Cyanin-Tandemfarbstoff (PerCP-Cy5.5) in FL3 und Allophycocyanin (APC), ein Cyaninfarbstoff Cy5 oder Alexa Fluor 647 in FL4. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei direkt proportional zur Anzahl der zu untersuchenden Moleküle auf oder in einer einzelnen Zelle. Ausgewertet werden die Daten entweder in einem

Histogramm (Einparameterdarstellung) oder in einem Punktplot (dot-plot, Zweiparameterdarstellung). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um inflammatorische Zellen aus infizierten Mauspfoten und Matrigelimplantaten sowie Subpopulationen von Leukozyten aus dem peripheren Blut von Mäusen genauer zu untersuchen. Antikörperverdünnungen für extrazelluläre Antigene wurden in FACS-Puffer, für intrazelluläre Antigene in Cytoperm/Wash angesetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Färbevolumen betrug 100 μ l.

Zur extrazellulären Färbung von Molekülen wurden 2×10^5 Zellen aus Matrigelimplantaten oder 1×10^6 Leukozyten in FACS-Röhrchen überführt, pelletiert, in 100 μ l Cohn-II-Stammlösung resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Dadurch wurden Fc-Rezeptoren auf den Zellen blockiert, um eine unspezifischer Anlagerung der Färbeantikörper zu verhindern. Zum Waschen der Zellen nach jedem Färbeschritt wurden 4 ml FACS-Puffer hinzugegeben und 4 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Gefärbt wurde nach folgendem Schema (Antikörper und Verdünnung in Klammern):

1. Schritt: unkonjugierte Antikörper (anti-Ly-6C, 1:200)
2. Schritt: fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, der den Isotyp des ersten erkennt (anti-Ratte-Cy5, 1:250; anti-Ratte-PE, 1:100)
3. Schritt: Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit Serum aus demselben Organismus wie der unkonjugierte Primärantikörper (10 % Rattenserum)
4. Schritt: biotinylierte Antikörper (anti-CD45.2-biotin, 1:100; anti-F4/80-biotin, 1:200; anti-MECA-32-biotin, 1:200)
5. Schritt: fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Streptavidin-APC/PerCP/Alexa488, 1:1000)
6. Schritt: direkt markierte Antikörper (anti-CD11b-PE, 1:800; anti-CD11b-PerCP, 1:3000; anti-CD11c-FITC/PE, 1:100; anti-CD45-FITC/PerCP, 1:100; anti-CD45.1-PE, 1:100; anti-CEACAM1-Alexa488, 1:100; anti-CD49b-PE, 1:50; anti-Gr-1-PE, 1:50)

Um LYVE-1⁺ oder *L. major*⁺ Zellen nachzuweisen, wurde nach der Färbung extrazellulärer Moleküle eine intrazelluläre Färbung angeschlossen. Durch Inkubation mit 250 μ l Cytifix/Cytoperm für 10 min bei 4 °C wurden die Zellen fixiert und gleichzeitig durchlässig für die Färbeantikörper gemacht. Zum Waschen der Zellen wurden sie zunächst für 5 min bei 4 °C in 1 ml Cytoperm/Wash inkubiert und anschließend 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde nach demselben Prinzip wie vorher die Färbung fortgesetzt:

7. Schritt: unkonjugierte Antikörper (anti-LYVE-1, 1:300)
8. Schritt: fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Cy5, 1:250)
9. Schritt: direkt markierte Antikörper (anti-*L. major*-Alexa488/647, 1:100)

Zum Schluss wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und direkt am FACSCalibur Flow Cytometer analysiert und mit dem Programm CellQuest Pro ausgewertet. Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurden Kontrollfärbungen mit Isotyp-antikörpern durchgeführt.

Für FACS-Analysen von naiven oder infizierten Mauspfoten wurden die isolierten Zellen auf drei Färbungen aufgeteilt und wie beschrieben gefärbt. Am Ende wurden die Zellen in 160 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der Analyse wurden die Proben auf einen 30 μ m Filter (CellTrics) gegeben und mit 160 μ l FACS-Puffer durchgespült. Nach Zugabe von 10000 Latex-Kugeln wurde die Probe mit dem FACS-Gerät analysiert. Dabei wurde die Aufnahme gestoppt, sobald 3000 Latex-Kugeln detektiert wurden. Über das Produkt der Anzahl der aufgenommenen Zellen mit 3,33 (Anteil der aufgenommenen Zellen in der Probe) und 3 (Anzahl der Färbungen) ließ sich somit die Gesamtzellzahl, aber auch die Anzahl verschiedener Zellpopulationen in der Pfote berechnen.

2.2.2.7 Histologie

2.2.2.7.1 Probengewinnung und Durchführung der Gefrierschnitte

Naive und infizierte Pfoten sowie Matrigelimplantate wurden immunhistologisch untersucht. Bei dieser Methode werden dünne Gewebsschnitte hergestellt, auf denen gezielt zelluläre Strukturen oder Proteine angefärbt werden können. Prinzipiell kann man die Proben fixieren und in Paraffin einbetten oder in einem speziellen Einfriermedium kryokonservieren. Der Vorteil der letzteren Methode ist, dass Proteinepitope erhalten bleiben und besser mit Antikörpern angefärbt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kryokonservierung angewandt, um später in den Schnitten entweder Gefäßstrukturen (Immunfluoreszenz-Färbung) oder Gewebemorphologie (H&E-Färbung) zu visualisieren.

Pfoten und Matrigelimplantate wurden in O.C.T. Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Durchführung der Gefrierschnitte wurden sie bei -70 °C gelagert. Um das Anhaften von Gefrierschnitten zu erhöhen, wurden Objektträger mit Silan beschichtet, indem sie 20 Sekunden in eine Aceton-Silan-Lösung und anschließend

2 x 10 Sekunden in deionisiertes Wasser getaucht wurden. Nach Trocknung über Nacht konnten die Objektträger verwendet werden.

Mit einem Kryostaten wurden Gewebeschnitte von 10 μm Dicke hergestellt und auf die silanisierten Objektträger gebracht. Die kompletten Pfoten wurden mit einem sog. d-Messer und die Matrigelimplantate mit einem Einmalmesser geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde getrocknet.

2.2.2.7.2 Immunfluoreszenz (IF)-Färbung

Für die Färbung der Gefrierschnitte mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden diese 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und über Nacht getrocknet. Um die Färbung zu erleichtern, wurden die einzelnen Schnitte auf einem Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Nach erneutem Trocknen wurde einmal mit PBS-Tween für 4 min gewaschen, um das Einbettmedium (O.C.T. Compound) zu entfernen. Ab diesem Zeitpunkt musste ein Austrocknen der Schnitte verhindert werden. Deshalb wurde die Färbung in feuchten Kammern durchgeführt. Zum Waschen nach jedem Färbeschritt wurden die Objektträger dreimal für 4 min in PBS-Tween getaucht. Die Antikörperverdünnungen wurden in PBS-BSA angesetzt und in einem Volumen von 100 μl pro Schnitt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zunächst wurden 100 μl Block-Lösung auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Schritt: unkonjugierte Antikörper (anti-LYVE-1, 1:300; anti-CD11b, 1:50)
2. Schritt: fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-TRITC, 1:500;
anti-Ratte-Cy5, 1:500)
3. Schritt: Blockade unspezifischer Bindungsstellen (10 % Rattenserum)
4. Schritt: biotinylierte Antikörper (anti-CD45.1-biotin, 1:50; anti-MECA-32-biotin, 1:300)
5. Schritt: fluoreszenzmarkiertes Streptavidin und DAPI (Streptavidin-Alexa488, 1:500;
DAPI-Stammlösung, 1:1000)

4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) diente dabei der Anfärbung der Zellkerne, da es sich an AT-reiche DNA-Bereiche anlagert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Proben mit Permafluor überschichtet, einem Deckglas bedeckt und über Nacht getrocknet. Zur Bewertung unspezifischer Fluoreszenzsignale erfolgten Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden die gefärbten Schnitte analysiert, fotografiert und mit der Software Openlab 5.0.2 ausgewertet.

2.2.2.7.3 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung

H&E-Färbungen wurden in dieser Arbeit verwendet, um morphologische Untersuchungen anhand von Übersichtsfärbungen naiver und infizierter Mausepfoten durchzuführen. Dabei färbt Hämatoxylin saure (basophile) Strukturen wie DNA im Zellkern oder das raue Endoplasmatische Retikulum, während Eosin an basische (eosinophile) Strukturen vor allem Zellplasmaproteine bindet. Getrocknete Gefrierschnitte wurden über Nacht in Fixierlösung gelagert und anschließend 5 min in PBS gewaschen. Durch Färbung in Hämatoxylin-Lösung für 5 min erschienen die Zellkerne zunächst rötlich-braun und erhielten erst durch fünfminütiges Bläuen mit Leitungswasser, wodurch der pH-Wert erhöht wurde, die typische blauviolette Farbe. Mit Eosin-Lösung für 5 min wurden in einer Gegenfärbung Zellplasmaproteine hellrosa markiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz unter deionisiertem Wasser differenziert, bevor mit Hilfe einer Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration (70 %, 80 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 % Ethanol) das Wasser aus den Schnitten verdrängt wurde. Diese entwässerten Schnitte wurden schließlich im organischen Lösungsmittel Xylol geklärt, mit Eukitt überschichtet und einem Deckglas bedeckt. Nach dem Trocknen des Eukitts wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und fotografiert.

2.2.2.8 Untersuchung zur Röhrenbildung *in vitro* (TfA)

Zur Analyse der Plastizität von inflammatorischen Zellen wurde ein Experiment, in dem Zellen röhrenähnliche Strukturen bilden (engl.: *tube-forming assay*, TfA), durchgeführt. Dazu wurden Zellen nach sieben Tagen unter sterilen Bedingungen aus Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten isoliert (vgl. Kapitel 2.2.2.5). Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen in FCS-freiem BSA-Medium für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. In der Zwischenzeit wurden Objektträger, die 4 Kammern zur Zellkultur besaßen, mit Matrigel beschichtet. Dazu wurde Matrigel auf Eis aufgetaut, 1:1 mit Endothelzellmedium gemischt und ein 200 µl Aliquot in jede Kammer gegeben. Bei 37 °C polymerisierte das Gel innerhalb von 30 min. Nach Ernte und Auszählen der Zellen wurden 5 x 10⁵ Zellen in 500 µl Endothelzellmedium in eine Kammer des Objektträgers gegeben und für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Eine Analyse der Zellaggregate erfolgte mit einem Umkehrmikroskop. Zur statistischen Auswertung wurde die Anzahl der röhrenähnlichen Zellaggregate pro Kammer bestimmt.

2.2.2.9 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Um die genaue Beschaffenheit von Zell-Zell-Kontakten und Zellmorphologien zu untersuchen, reichen Auflösung und Kontrast von Lichtmikroskopen nicht aus. Mit der Elektronenmikroskopie, die darauf beruht, dass Elektronen eines beschleunigten Elektronenstrahls gestreut und adsorbiert werden, sobald sie auf ein Objekt stoßen, lassen sich Negativbilder von sehr kleinen Objekten darstellen. Dabei ist die Streuung abhängig vom Abstand zwischen Atomkern und Strahlelektron, der Geschwindigkeit des Strahlelektrons und der Kernladungszahl der Atomkerne im Objekt. Aufgrund der niedrigen Kernladungszahl der Atome biologischer Objekte (vor allem Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphor und Schwefel) ist der Streukontrast für elektronenmikroskopische Analysen unzureichend. Durch eine Osmiumoxid-Fixierung und einer Nachbehandlung mit alkalischen Schwermetallsalzlösungen wird der Kontrast in solchen Präparaten erhöht. Für diese Arbeit wurden Schnitte von Matrigelimplantaten aufgearbeitet und im Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert.

Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate wurden nach sieben Tagen aus Mäusen isoliert und in Glutaraldehyd-Puffer über Nacht fixiert. Kleine Fragmente der Matrigelimplantate wurden nach dreimaligem Waschen in Natrium-Cacodylat-Puffer für 60 min bei 4 °C in Osmiumoxid-Lösung nachfixiert und anschließend fünfmal in dH₂O gewaschen. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %, 100 % Ethanol) wurden die Probe zunächst entwässert, bevor der Alkohol durch das Lösungsmittel Propylenoxid ersetzt wurde (10 min Propylenoxid/Ethanol 1:1, 2 x 15 min Propylenoxid). In dem Lösungsmittel konnte nun das Einbettmedium Epon gelöst werden, das zunächst in einer 1:1 Lösung über Nacht inkubiert wurde, bevor reines Epon auf die Probe gegeben wurde, das bei 60 °C auspolymerisierte. Anschließend wurden 70 nm Ultradünnschnitte hergestellt, die zunächst mit Uranylacetat in 70 % Methanol und schließlich mit Bleiacetat (nach Reynolds, 1963) kontrastiert wurden. Eine Auswertung der Proben erfolgte im Transmissions-Elektronenmikroskop.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 Infektion von Mäusen mit Leishmanien und Messung der Schwellung

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden aus den Blutagarplatten entnommen und dreimal mit 10 ml sterilem D-PBS gewaschen (Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C für 10 min). Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung der Parasiten in Paraformaldehyd-Lösung in einer Neubauer Zählkammer (20 µm Tiefe, Kammerfaktor 5 x 10⁴) ausgezählt. Zur

Infektion von Mäusen wurden 3×10^6 Leishmanien in $50 \mu\text{l}$ Volumen in die rechte Hinterpfote subkutan injiziert. Durch die wöchentliche Messung des Durchmessers beider Hinterpfoten wurde der Infektionsverlauf anhand der Zunahme des Pfotendurchmessers verfolgt. Dabei wurde die prozentuale Zunahme des Durchmessers der infizierten rechten Pfote gegenüber der linken naiven Pfote in Prozent angegeben.

2.2.3.2 Gewinnung von polyklonalem Maus-anti-*L. major* Serum

Um Leishmanien positive Zellen in FACS-Analysen nachweisen zu können, wurde ein *L. major*-spezifisches Antiserum generiert. Dazu wurden B6.WT Mäuse subkutan mit *L. major* infiziert. Nach sechs Wochen wurde das Serum gewonnen, indem die Tiere mit $300 \mu\text{l}$ Anästhetikum intraperitoneal narkotisiert und Blut durch eine Herzpunktion entnommen wurde. Nach einigen Stunden bei Raumtemperatur konnte das Serum durch Zentrifugation (10 min, 10000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) von den geronnenen Blutbestandteilen getrennt werden.

2.2.3.3 Matrigelimplantationsversuch

Mit Hilfe von Matrigelimplantaten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Gefäßbildung untersucht. Dabei diente Matrigel als zellfreie Matrix, die in Mäuse subkutan injiziert wurde und in der neue Gefäße entstehen konnten. Matrigel eignet sich zu diesem Zweck besonders gut, da man es flüssig injizieren kann. Neben der Isolation von Einzelzellen durch einen enzymatischen Verdau lassen sich die Implantate für histologische Analysen aufarbeiten. Obwohl das Matrigel in Mäuse implantiert wird, gilt dies als *in vitro* Versuch. Matrigel ist ein zellfreier Extrakt aus der Basalmembran des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarcoms. Es ist reich an extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin, Typ IV Kollagen, Heparansulfat, Proteoglykanen, Entactin und Nidogen. Außerdem enthält es TGF- β , FGF und andere Wachstumsfaktoren des EHS Tumors. Bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ist das Gel flüssig und polymerisiert bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Zur Implantation des Matrigels wurden die Tiere mit $250 \mu\text{l}$ Anästhetikum intraperitoneal betäubt und erhielten Augentropfen, um ein Austrocknen der Netzhaut zu verhindern. Für den Zeitkurs über 34 Tage wurde 1 ml Matrigel auf Eis aufgetaut und entweder mit $300 \mu\text{l}$ *L. major* Parasiten in PBS (6×10^7 Leishmanien pro ml) oder $300 \mu\text{l}$ PBS gemischt. Für die Kurzzeitexperimente mit der Analyse am Tag 7 wurden außerdem $8,67 \mu\text{l}$ des Wachstumsfaktors VEGF-C ($250 \text{ ng}/\mu\text{l}$) zugesetzt. Das kalte Gel wurde den Mäusen rechts und links im unteren Bauchbereich subkutan injiziert und bildete nach

Polymerisation eine Matrix. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Gel als ganzes aus den Mäusen isoliert und für Einzelzellanalysen oder histologische Untersuchungen präpariert.

2.2.3.4 Generierung von chimären Mäusen

Alle aus hämatopoetischen Stammzellen abgeleiteten Zellen werden im Knochenmark gebildet. Um den Einfluss dieser hämatopoetischen Zellen im Prozess der Lymphgefäßneubildung zu untersuchen, wurden Mäuse mit chimärem Knochenmark hergestellt. Dazu wurden Rezipienten einer Gammastrahlung durch eine Caesium Quelle (^{137}Cs) von 11 gray ausgesetzt. Dabei kommt es zur Schädigung der DNA ohne die Funktionsfähigkeit der Zellen zu beeinträchtigen. Erst Zellteilungen führen zum Zelltod. Die bestrahlten Mäuse würden somit nach wenigen Wochen durch einen Mangel an Blutzellen sterben. Einen Tag nach der Bestrahlung erhielten die Mäuse 6×10^6 Knochenmarkzellen aus Ober- und Unterschenkel von Donormäusen. Diese wurden in einem Volumen von $250 \mu\text{l}$ PBS intravenös injiziert. Da die Bestrahlung und der Knochenmarktransfer zu einer Immunsuppression der Mäuse führt, wurden sie im Zeitraum von einer Woche vor der Bestrahlung bis fünf Wochen danach oral mit Antibiotikum (0,5 % Baytril im Trinkwasser) behandelt, um die Gefahr von Infektionen zu minimieren. Abbildung 2.3 zeigt, welche unterschiedlichen Mäuse mit chimärem Knochenmark generiert wurden.

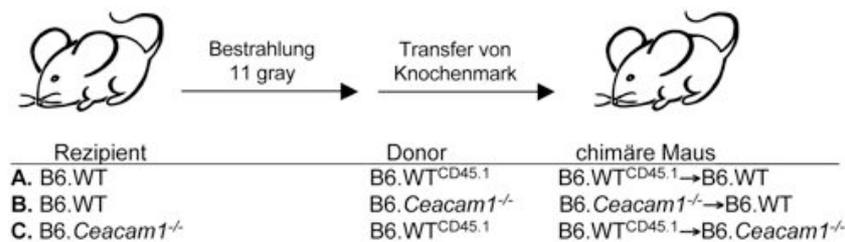


Abb. 2.3 unterschiedliche chimäre Mäuse. Mäuse wurden mit 11 gray bestrahlt und mit Donor-Knochenmark rekonstituiert. Dabei erhielten B6.WT Mäuse Knochenmark von B6.WT^{CD45.1} Mäusen (A) oder von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen (B). Zusätzlich erhielten bestrahlte B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse Knochenmark von B6.WT^{CD45.1} Tieren (C).

Zwei Monate nach dem Knochenmarktransfer wurde dieser mittels FACS-Analysen der peripheren Blutleukozyten überprüft (Abb. 2.4).

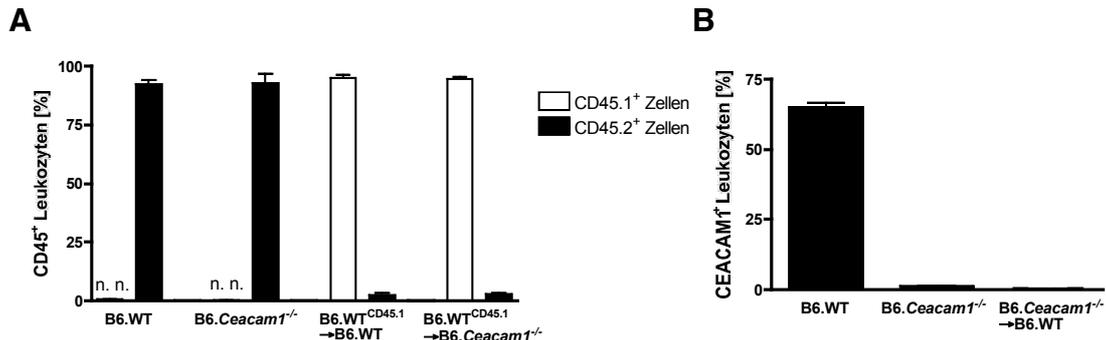


Abb. 2.4 Kontrolle des Knochenmarktransfers. (A) Periphere Leukozyten von B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäuse exprimieren die Isoform CD45.2 auf der Zelloberfläche (92,29 ± 2,08 %) und sind negativ für CD45.1. Nach Transfer von CD45.1⁺ Knochenmark in bestrahlte B6.WT oder B6.Ceacam1^{-/-} Mäuse waren 94,73 ± 0,78 % der Leukozyten positiv für CD45.1, während nur noch 2,41 ± 0,94 % der Zellen CD45.2 auf ihrer Oberfläche exprimierten. (B) Bei dem Transfer von CEACAM1⁺ Knochenmark in B6.WT Mäuse wurde das Knochenmark aus B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen verwendet, die Geschwister zu den B6.WT Tieren waren (durch Verpaarung heterozygoter Tiere). Dadurch exprimierten in diesen Tieren alle Zellen die Isoform CD45.2. Eine Kontrolle des Knochenmarktransfers erfolgte deshalb über die CEACAM1-Expression der Leukozyten. In B6.WT Mäusen waren 64,80 ± 1,68 % der Leukozyten positiv für CEACAM1, während in B6.Ceacam1^{-/-} und B6.Ceacam1^{-/-} → B6.WT Mäusen nur wenige Zellen unspezifisch angefärbt wurden (1,20 ± 0,07 %). n. n.: nicht nachweisbar.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0, wobei für die Berechnung der Signifikanzen der ungepaarte Student's t-test durchgeführt wurde.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prozess der Lymphgefäßneubildung während der kutanen Leishmaniose untersucht. Die Neubildung von Gefäßen ist für eine schnelle und narbenfreie Heilung von Läsionen und Wunden essentiell (Eming *et al.*, 2007). Während inflammatorische Zellen durch Blutgefäße zum Infektionsort gelangen, dienen Lymphgefäße vorrangig der Drainage extrazellulärer Flüssigkeit und dem Transport von reifen, aktivierten DCs zum Lymphknoten. Gerade bei einer stetig wachsenden Anzahl an infiltrierenden Zellen im Verlauf der Leishmanieninfektion, stellt sich die Frage, ob dabei Gefäße, insbesondere Lymphgefäße, in das Infiltrat wachsen und welche Zellen und Faktoren dabei eine Rolle spielen. Im Fokus der Analysen stand das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1, von dem bekannt ist, dass es bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist.

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. In Kapitel 3.1 wird die Lymphgefäßneubildung in B6.WT Mäusen während der Leishmaniose *in vivo* und *in vitro* beschrieben. Die Ergebnisse des folgenden Kapitels (3.2) zeigen anhand eines kongenen Markers auf transferierten Knochenmarkzellen, dass hämatopoetischen Zellen bei diesem Prozess beteiligt sind. Die essentielle Bedeutung von CEACAM1 bei der Neubildung von Lymphgefäßen *in vivo* und *in vitro* wird in Kapitel 3.3 beschrieben. Schließlich wird im letzten Kapitel gezeigt, dass eine Rekonstitution von CEACAM1⁺ hämatopoetischen Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zu einer normalen Vaskularisierung führt, während B6.WT chimäre Mäuse durch den Transfer von CEACAM1⁻ Knochenmark einen Phänotyp aufweisen, der dem von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen entspricht.

3.1 Lymphgefäßneubildung in B6.WT Mäusen *in vivo* und *in vitro*

In zwei verschiedenen Systemen wurde die Neubildung von Lymphgefäßen in Inzuchtmäusen des Stammes C57BL/6 (B6.WT) genauer untersucht. Zum einen wurden die Mäuse mit *L. major* infiziert, zum anderen wurde ihnen subkutan Matrigel implantiert. Durch die Anwesenheit der Leishmanien kam es in beiden Fällen zu einer Entzündungsreaktion, bei der die Bildung neuer Lymphgefäße untersucht wurde.

3.1.1 Infektion von B6.WT Mäusen mit *L. major*

B6.WT Mäuse sind resistent gegenüber einer Infektion mit dem obligat intrazellulären Parasiten *L. major* (Ritter *et al.*, 2004b). Eine Infektion führt zunächst zur Etablierung der Parasiten am Ort der Infektion und einer Gewebeschwellung. Aufgrund der Aktivierung Leishmanien-spezifischer T_H1-Zellen gelingt es diesen Mäusen, die Infektion innerhalb weniger Wochen zu beseitigen (Bogdan und Röllinghoff, 1998; Von Stebut und Udey, 2004).

3.1.1.1 Infektionsverlauf und wachsendes Infiltrat

Nach subkutaner Infektion von B6.WT Mäusen mit 3×10^6 metazyklischen, promastigoten Leishmanien in die rechte hintere Pfote kam es zu einer Schwellung, die in den ersten Wochen rapide anstieg und nach etwa drei bis vier Wochen ein Maximum erreichte (Abb. 3.1A). Dabei vergrößerte sich der Durchmesser der infizierten Pfote um etwa zwei Drittel gegenüber der nicht infizierten Pfote.

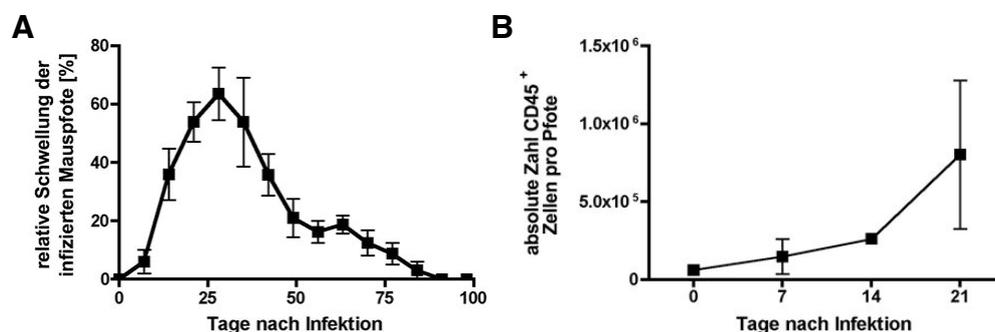


Abb. 3.1 Mauspfotenschwellung und Anzahl CD45⁺ Zellen in infizierten Pfoten. (A) Nach Infektion von B6.WT Mäusen mit *L. major* wurde der Verlauf durch wöchentliche Messung des Pfotendurchmessers kontrolliert und als relative Zunahme gegenüber der nicht infizierten Pfote dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM aus einem repräsentativen Experiment mit fünf Mäusen, das viermal wiederholt wurde. (B) Naive (Tag 0) und infizierte Mauspfoten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und die absolute Anzahl CD45⁺ Zellen mittels FACS-Analysen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je zwei Mauspfoten.

In den folgenden Wochen ging die Schwellung wieder zurück und verschwand nach etwa 10 bis 12 Wochen komplett. Einhergehend mit der Schwellung nahm die Anzahl der CD45⁺ Zellen in der Pfote in den ersten drei Wochen dramatisch zu. Sie stieg um das 13 fache von 62380 ± 4683 Zellen in der naiven Pfote auf 803200 ± 476600 Zellen am Tag 21 nach Infektion (Abb. 3.1B). Als hämatopoetischer Marker wird die Tyrosinphosphatase CD45 auf allen kernhaltigen, knochenmarkgenerierten Zellen exprimiert (Hermiston *et al.*, 2003) und eignet sich deshalb zur Bestimmung der Zellzahl inflammatorischer Zellen, die von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen.

In longitudinalen histologischen Schnitten infizierter Mauspfoten wurde deutlich, in welchem Ausmaß inflammatorische Zellen zu der Schwellung der Pfoten beitragen. In einer vergleichenden Übersichtsfärbung einer naiven und einer infizierten Pfote am Tag 21, an dem die Schwellung durchschnittlich $53,9 \pm 6,8 \%$ betrug, grenzte sich das ausgeprägte Infiltrat deutlich durch seine hohe Zelldichte von dem umgebenden Gewebe ab (Abb. 3.2A).

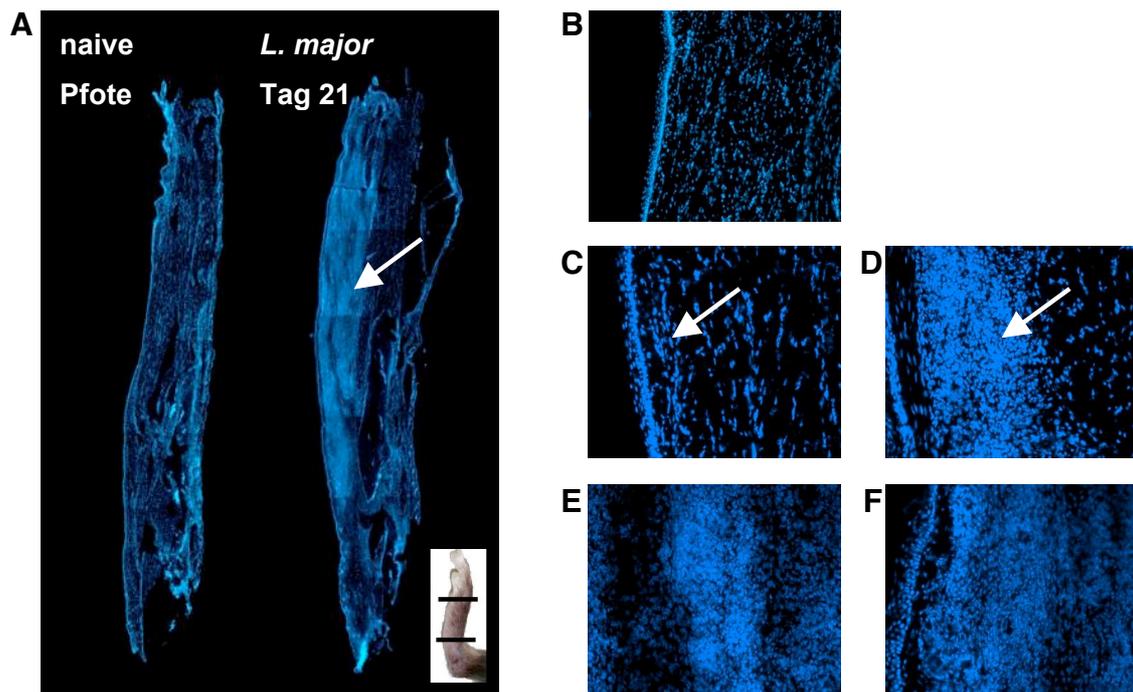


Abb. 3.2 Histologische Übersichtsfärbungen naiver und infizierter Mauspfoten. 10 μm dicke, longitudinale Schnitte von Mauspfoten wurden hergestellt und die Zellkerne mittels DAPI blau angefärbt. (A) Überblick über den gesamten Querschnitt einer naiven (links) und infizierten Pfote (rechts) bestehend aus mehreren 50 fach vergrößerten Aufnahmen. Das dichte Infiltrat ist deutlich zu erkennen (Pfeil). Zur Orientierung ist eine Mauspfote entsprechend dem Schnitt abgebildet und der dargestellte Abschnitt markiert. (B bis F) 200 fache Vergrößerung aus dem Bereich der Lauffläche einer naiven Pfote (B), 3 Tage (C), 6 Tage (D), 13 Tage (E) und 21 Tage (F) nach Infektion mit *L. major*. Pfeile in (C) und (D) markieren das wachsende Infiltrat, während dies in (E) und (F) die ganze Bildfläche einnimmt. Ganz links ist jeweils die Epidermis zu sehen. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Tieren.

Im zeitlichen Verlauf wurde deutlich, dass drei Tage nach Infektion bereits die ersten Zellen, aber erst wenig später, zwischen Tag 3 und 6, die Zellen in großer Anzahl einwanderten (Abb. 3.2B bis 3.2D). Sechs Tage nach Infektion war das Infiltrat zu dem normalen Gewebe deutlich abgrenzbar. In den folgenden Wochen wanderten weitere Zellen ein, so dass der Entzündungsherd größer, dichter und noch kompakter wurde (Abb. 3.2E und 3.2F).

3.1.1.2 Nachweis lymphatischer Gefäße und LYVE-1⁺ Zellen im Infiltrat infizierter Pfoten

Mit Hilfe von Antikörpern, die Epitope von LYVE-1 und MECA-32 erkennen, lassen sich Lymph- und Blutgefäße in Kryoschnitten anfärben (Banerji *et al.*, 1999; Liersch *et al.*, 2006). Wie zu erwarten, wurden sowohl Lymph- als auch Blutgefäße in der Haut von naiven Mäusen gefunden. Nach Infektion mit Leishmanien traten die Gefäße nicht nur in der Haut, sondern auch mitten im Infiltrat auf. Hierbei zeigte sich, dass Blutgefäße häufiger vorkamen und die Gefäßstrukturen größer waren als die der LYVE-1⁺ lymphatischen Gefäße (Abb. 3.3A bis 3.3C).

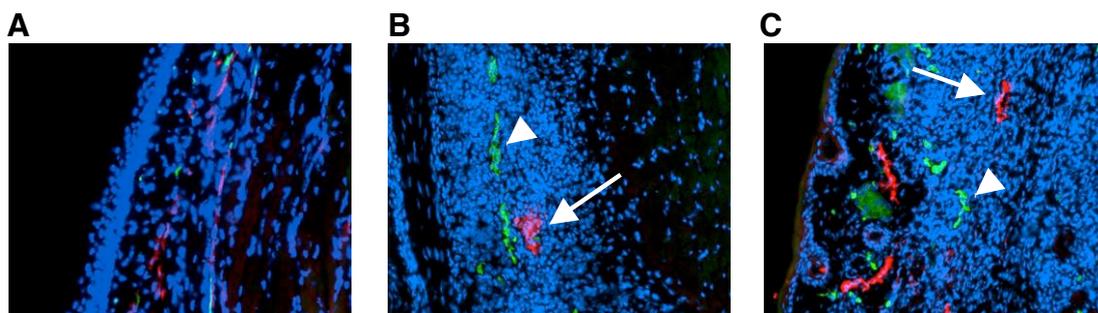


Abb. 3.3 Lymph- und Blutgefäße in naiven und infizierten Mauspfoten. Mittels Antikörper gegen LYVE-1 (rot) und MECA-32 (grün) wurden Lymph- und Blutgefäße in naiven Pfoten (A) und 6 Tage (B) bzw. 21 Tage (C) nach Infektion mit *L. major* detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Man beachte, dass sowohl Lymph- (Pfeil), als auch Blutgefäße (Pfeilspitze) mitten im entzündlichen Infiltrat zu finden waren. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in 200 facher Vergrößerung aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Mäusen.

Eine genauere quantitative Analyse der infiltrierenden Zellen im frühen Krankheitsverlauf zeigte, dass die meisten der CD45⁺ Zellen auch CD11b exprimierten (66,7 % am Tag 21 nach Infektion). CD11b (Mac-1) wird vor allem von Makrophagen und Granulozyten exprimiert, zwei wichtige phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems (Sunderkötter *et al.*, 2004). Die Zahl der CD11b⁺ Zellen in der Pfote stieg von 30020 ± 4683 Zellen vor der Infektion um das 17,8 fache auf 535600 ± 308900 Zellen am Tag 21 nach Infektion (Abb. 3.4). Somit stellten die CD11b⁺ Zellen die größte Gruppe der inflammatorischen Zellen nach Infektion mit *L. major* dar.

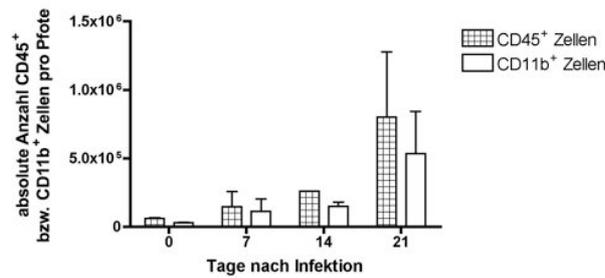


Abb. 3.4 Anzahl CD45⁺ und CD11b⁺ Zellen in naiven und infizierten Pfoten. Die absolute Anzahl CD45⁺ bzw. CD11b⁺ Zellen in naiven (Tag 0) oder *L. major*-infizierten Mauspfoten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analysen bestimmt. Zu beachten ist, dass alle CD11b⁺ Zellen auch gleichzeitig CD45 exprimierten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je zwei Mauspfoten.

In weiteren FACS-Analysen wurden Zellen, die LYVE-1 in den Mauspfoten exprimierten, genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass in Pfoten von naiven Mäusen LYVE-1⁺ Zellen sowohl in der CD45⁻ als auch in der CD45⁺ Population zu finden waren (Abb. 3.5). Die Anzahl CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen war dabei größer als die der CD45⁻/LYVE-1⁺ Zellen (Abb. 3.5B und 3.5C, linker oberer Quadrant).

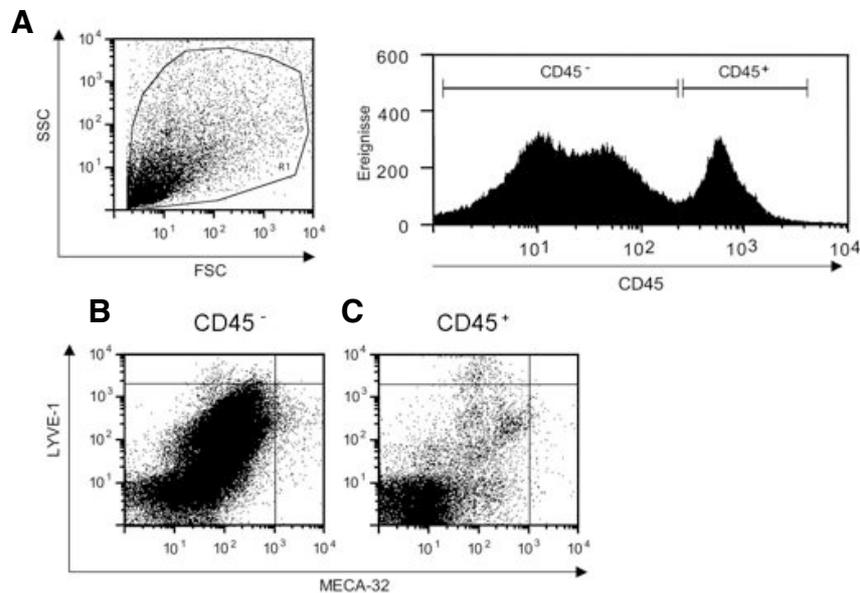


Abb. 3.5 LYVE-1⁺ Zellen in Mauspfoten sind CD45⁻ oder CD45⁺. (A) Zellen aus der Pfote einer naiven Maus wurden isoliert und mittels FACS-Analysen in CD45⁻ und CD45⁺ Zellen unterteilt. Anschließend wurde die Expression von LYVE-1 und MECA-32 auf CD45⁻ Zellen (B) und CD45⁺ Zellen (C) untersucht. Während MECA-32⁺ Zellen nur in der CD45⁻ Population zu finden waren (B, unterer rechter Quadrant), gab es sowohl CD45⁻/LYVE-1⁺ als auch CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen (B und C, linker oberer Quadrant). Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Tieren.

Interessanterweise waren alle BECs, die MECA-32 exprimierten, in der CD45⁻ Population zu finden (Abb. 3.5B, rechter unterer Quadrant). Eine CD45⁺/MECA-32⁺ Population existierte nicht. Da bekannt ist, dass lymphatische Endothelzellen in der Maus kein CD45 exprimieren (Kriehuber *et al.*, 2001), stellen CD45⁻/LYVE-1⁺ Zellen die eigentlichen LECs dar, während die CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen mit den in der Literatur beschriebenen LYVE-1⁺ Makrophagen in Verbindung gebracht werden können (Cho *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2008; Schledzewski *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007).

Die Anzahl dieser CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen veränderte sich während der Infektion mit *L. major*. So blieb sie innerhalb der ersten Woche nach Infektion relativ konstant, bevor sie nach 14 Tagen deutlich zunahm und ein Maximum erreichte. Drei Wochen nach Beginn der Infektion nahmen die CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen wieder ab (Abb. 3.6, jeweils oberer rechter Quadrant). Demgegenüber wuchs die CD45⁻/LYVE-1⁺ Population im Verlauf der Infektion kontinuierlich innerhalb der ersten drei Wochen (Abb. 3.6, jeweils oberer linker Quadrant). Am Tag 21 nach Infektion exprimierten etwa die Hälfte der LYVE-1⁺ Zellen gleichzeitig CD45.

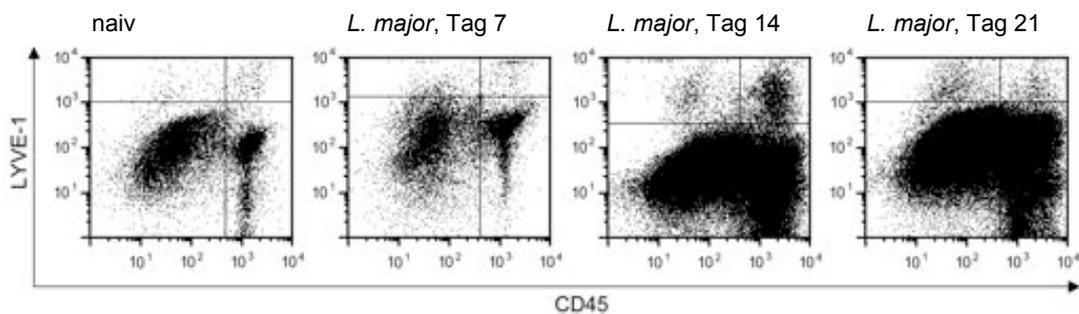


Abb. 3.6 CD45 Expression auf LYVE-1⁺ Zellen während der Infektion mit *L. major*. Zellen aus naiven oder infizierten Mauspfoten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und mittels FACS auf die Expression von CD45 und LYVE-1 analysiert. Während CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen (oberer rechter Quadrant) ein Maximum an Tag 14 nach Infektion aufwiesen, war dies für CD45⁻/LYVE-1⁺ Zellen (oberer linker Quadrant) am Tag 21 der Fall. Die gezeigten Daten stammen aus einem Versuch mit zwei Mäusen pro Zeitpunkt.

Außerdem stellte sich heraus, dass die CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen, die am Tag 14 nach Infektion in großer Anzahl vorlagen, zusätzlich CD11b und CEACAM1 exprimierten (Abb. 3.7A bis 3.7C, grüne Population). CD45⁻/LYVE-1⁺ Zellen hingegen waren weder positiv für CD11b noch CEACAM1 (Abb. 3.7A bis 3.7C, rote Population). Die absolute Anzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen verhielt sich analog zu der Population der CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen. Zunächst blieb die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Population konstant, stieg dann während der Infektion mit *L. major* an und erreichte am Tag 14 ein Maximum, bevor sie im weiteren Verlauf wieder abnahm (Abb. 3.7D).

Interessant ist auch der Anteil dieser $CD11b^+/LYVE-1^+$ Zellen an der $CD11b^+$ Population. In der naiven Maus exprimierten 15,67 % der $CD11b^+$ Zellen in der Pfote auch LYVE-1 (Abb. 3.7E). Dieser Anteil verringerte sich bereits nach einer Woche auf 3,18 %, erhöhte sich dann leicht, während nach 21 Tagen nur noch 0,38 % der $CD11b^+$ Zellen gleichzeitig LYVE-1 exprimierten (Abb. 3.7E).

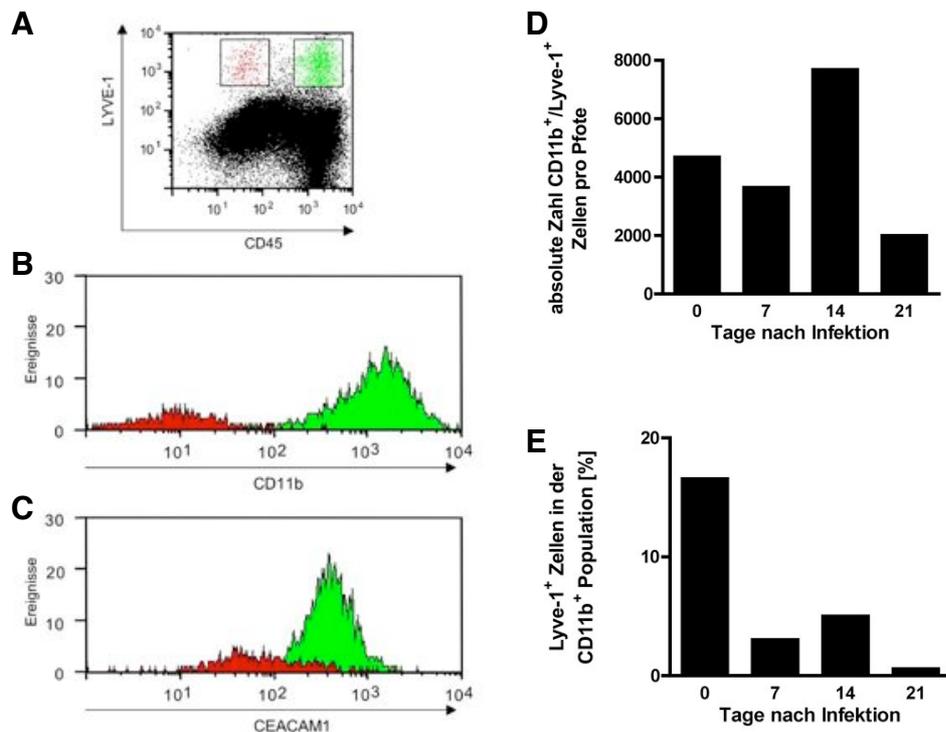


Abb. 3.7 Expressionsmuster und zelluläre Verteilung LYVE-1⁺ Zellen in infizierten Mauspfoten. (A-C) 14 Tage nach Infektion mit *L. major* wurden die Zellen aus den Pfoten isoliert. (A) FACS-Analysen zeigten, dass $CD45^+/LYVE-1^+$ Zellen (grün) gleichzeitig $CD11b$ (B) und $CEACAM1$ (C) exprimierten, während dies für $CD45^+/LYVE-1^+$ Zellen (rot) nicht der Fall war. (D) Die absolute Anzahl $CD11b^+/LYVE-1^+$ Zellen erreichte am Tag 14 nach Infektion ein Maximum in infizierten Mauspfoten. (E) Allerdings war der Anteil der LYVE-1⁺ Zellen in der $CD11b^+$ Population in naiven Mauspfoten am höchsten. Dargestellt sind Daten aus einem Versuch mit zwei Mäusen pro Zeitpunkt.

In histologischen Schnitten infizierter Mauspfoten wurde deutlich, dass fast alle inflammatorischen Zellen am Tag 21 nach Infektion $CD11b$ exprimierten (Abb. 3.8A und 3.8B). Ob allerdings die $CD11b^+/LYVE-1^+$ Zellen auch an der Bildung lymphatischer Gefäße beteiligt waren, konnte selbst bei großer Vergrößerung histologisch nicht eindeutig beantwortet werden (Abb. 3.8C bis 3.8E). An manchen Stellen lässt sich eine Koexpression von $CD11b$ und LYVE-1 auf LECs innerhalb des Infiltrats vermuten, während dies in anderen Bereichen ausgeschlossen werden konnte.

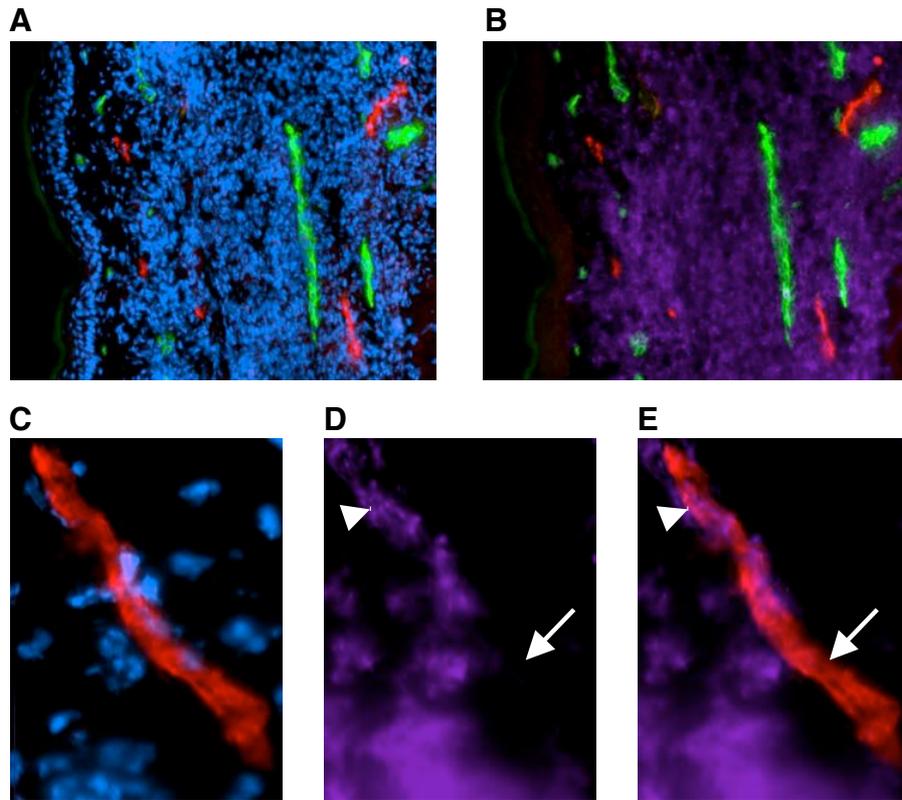


Abb. 3.8 Immunfluoreszenz-Analysen lymphatischer Gefäße in infizierten Mauspfoten. 21 Tage nach Infektion mit *L. major* wurden Mauspfoten kryokonserviert und histologisch aufgearbeitet. Zur Detektion von Lymph- und Blutgefäßen wurden 10 μm Schnitte mit Antikörpern gegen LYVE-1 (rot) und MECA-32 (grün) gefärbt. Die Expression von CD11b ist in lila dargestellt, während die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert wurden. (A) und (B) sind Übersichten in 200 facher Vergrößerung. (C bis E) stellen die 1000 fache Vergrößerungen eines lymphatischen Gefäßes im Infiltrat dar. Die Pfeilspitzen markieren Bereiche, in denen CD11b und LYVE-1 gleichzeitig detektiert wurden, während die Pfeile auf nur LYVE-1⁺ Regionen hinweisen. Gezeigt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Mäusen.

3.1.2 Matrigelimplantationsversuche mit B6.WT Mäusen

In dem Modell der kutanen Leishmaniose lassen sich LYVE-1⁺ Zellen nur unzureichend charakterisieren. Dies liegt daran, dass man in infizierten Pfoten nicht unterscheiden kann, ob die lymphatischen Gefäße neu gebildet wurden oder ob das Infiltrat um bereits existierende Lymphgefäße entstanden ist und die Gefäße dabei nur zu größeren ausgewachsen sind. Zusätzlich lassen sich in den relativ aufwendigen Präparationen nur sehr wenige LYVE-1⁺ Zellen für die Analysen gewinnen.

Aus diesem Grund wurde ein Matrigelimplantationsversuch etabliert, bei dem man inflammatorische Zellen selektiv isolieren und analysieren kann. Matrigel ist ein zellfreier

Extrakt aus der Basalmembran des Engelbreth-Holm-Swarm Maussarcomas und enthält Laminin, Typ IV Kollagen, Proteoglycane, Entactin, Nidogen und matrixabbauende Enzyme, deren Inhibitoren sowie weitere Wachstumsfaktoren (Norrby, 2006). Flüssiges Matrigel wurde subkutan in die Bauchregion von Mäusen injiziert, wo das Gel sofort polymerisiert und eine zellfreie Matrix in den Mäusen bildete.

3.1.2.1 Einwandern verschiedener Zellen in Matrigelimplantate im zeitlichen Verlauf

In B6.WT Mäuse wurden 300 μ l Matrigel mit oder ohne 4×10^6 Leishmanien subkutan appliziert. Nach verschiedenen Tagen wurden die Implantate herausgenommen, die Zellen mittels Dispase und Kollagenase-D isoliert, ausgezählt und im FACS analysiert.

Implantierte man reines Matrigel in B6.WT Mäuse, so befanden sich vier Tage später 661700 \pm 13100 Zellen im Matrigelimplantat (Abb. 3.9A). Diese Zahl verringerte sich im zeitlichen Verlauf, so dass am Tag 34 nach Implantation nur noch 245000 \pm 75000 Zellen (37 % gegenüber Tag 4) detektiert wurden. Mehr als die Hälfte dieser Zellen (53,1 %) exprimierte CD11b auf ihrer Oberfläche (Abb. 3.9B). Der Anteil dieser Zellen änderte sich im zeitlichen Verlauf nicht.

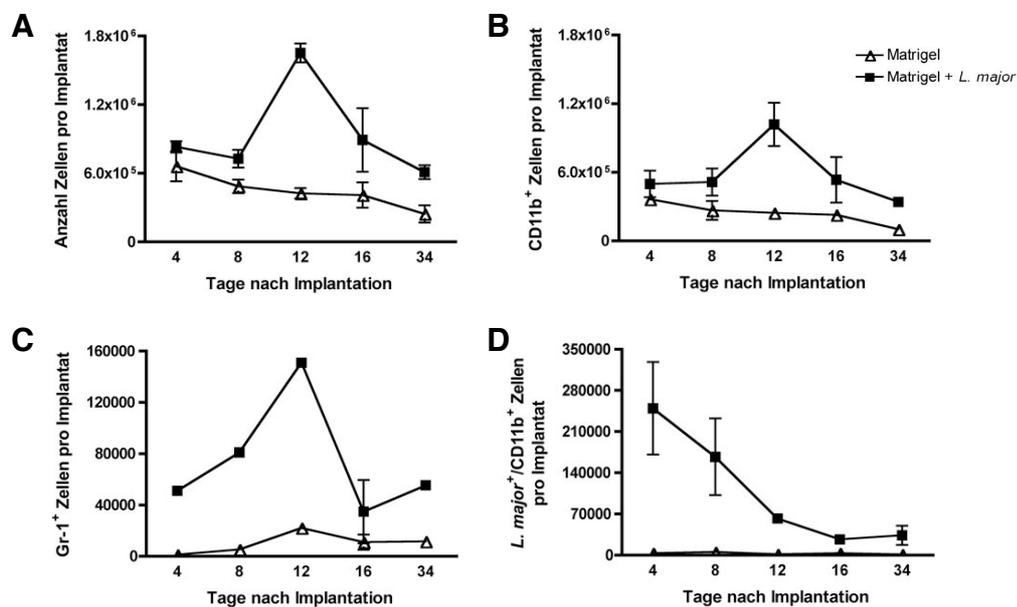


Abb. 3.9 Gesamtzellzahl und Anzahl verschiedener Subpopulationen im Matrigel-implantat. (A-D) Matrigel mit Leishmanien (schwarzes Quadrat) oder ohne (weißes Dreieck) wurde in B6.WT Mäuse implantiert und zu den gegebenen Zeitpunkten isoliert. Dargestellt ist die Anzahl der eingewanderten Zellen (A), der CD11b⁺ Zellen (B), der Gr-1⁺ Zellen (C) und der *L. major*⁺/CD11b⁺ Zellen im zeitlichen Verlauf als Mittelwerte \pm SEM. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen mit insgesamt sechs Mäusen pro Zeitpunkt.

In reinem Matrigel stieg die Anzahl der Gr-1⁺ Zellen bis zum Tag 12 nach Implantation leicht an und war dann wieder rückläufig (Abb. 3.9C). Gr-1 ist der prominenteste Marker für Granulozyten (Fleming *et al.*, 1993), wird allerdings auch auf myeloiden Suppressorzellen exprimiert (Bronte *et al.*, 2000). Während diese Zellen am Tag 4 nach Applikation nur 0,38 % der CD11b⁺ Zellen ausmachten, waren dies am Tag 12 bereits 9,07 % und am Ende des Zeitkurses 11,34 %. Leishmanien positive Zellen konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.9D).

Wurden Leishmanien in das Matrigel gemischt, so war die absolute Zellzahl zu jedem Zeitpunkt höher als bei reinem Matrigel (Abb. 3.9A). Am Tag 12 erreichte sie ein Maximum mit 1653000 ± 82500 Zellen. Gleichzeitig war die absolute Zahl der CD11b⁺ Zellen ebenso deutlich erhöht wie der Anteil dieser an der Gesamtzellzahl (Abb. 3.9B). So waren vier Tage nach Applikation 59,59 %, nach acht Tagen sogar 70,77 % und nach zwölf Tagen 61,65 % aller Zellen positiv für CD11b. Nach 34 Tagen lag dieser Wert wieder bei 55,98 % und entsprach annähernd dem von reinem Matrigel. Die Gr-1⁺ Zellen verhielten sich analog zur CD11b⁺ Population (Abb. 3.9C). Am Tag 4 exprimierten 10,25 % der CD11b⁺ Zellen auch den Marker Gr-1. Dieser Anteil stieg am Tag 8 auf 15,72 % und ging bis zum Ende des Zeitkurses auf 12,39 % zurück. Am Tag 4 waren 249600 ± 68740 CD11b⁺ Zellen auch positiv für Leishmanien bzw. Leishmanienantigen (Abb. 3.9D). Dies entsprach 50,04 % aller CD11b⁺ Zellen zu diesem Zeitpunkt. Bereits am Tag 8 waren mit 167100 ± 65270 Zellen nur noch 32,42 % der CD11b⁺ Zellen auch *L. major*⁺. Bis zum Ende des Zeitkurses ging dieser Anteil auf 9,83 % zurück.

Somit bewirkte die Anwesenheit der Parasiten im Matrigelimplantat eine deutlich gestiegene Zellzahl mit einem höheren Anteil an CD11b⁺ und Gr-1⁺ Zellen.

Weiterhin wurde der Verlauf der Zellen, die LYVE-1 exprimierten, in An- bzw. Abwesenheit von Leishmanien im Matrigelimplantat untersucht (Abb. 3.10). Auffällig dabei war, dass zu jedem Zeitpunkt und auch unabhängig von der Anwesenheit der Parasiten alle LYVE-1⁺ Zellen CD11b koexprimierten (Abb. 10A, jeweils oberer rechter Quadrant). Somit konnte die CD11b⁻/LYVE-1⁺ Zellpopulation aus infizierten Pfoten hier nicht wiedergefunden werden.

Im reinen Matrigel waren vier Tage nach Applikation 23230 ± 8362 Zellen zu finden (Abb. 3.10B). Diese Zahl blieb zunächst konstant und nahm zum Ende des Zeitkurses ab. Dabei entsprach der Anteil dieser Zellen an der CD11b⁺ Population bei allen Analysen relativ konstant $8,11 \pm 1,07$ % (Abb. 3.10C). In Anwesenheit von Leishmanien konnten am Tag 4 nach Applikation nur sehr wenige CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen isoliert werden (3599 ± 966) (Abb. 3.10B). Die absolute Zahl dieser Zellen stieg bis zum Tag 12 auf 87190 ± 18440 Zellen an.

Zum Ende des Zeitkurses nahm auch hier die Anzahl ab. Der prozentuale Anteil der LYVE-1⁺ Zellen an der CD11b⁺ Population stieg während des Zeitkurses kontinuierlich von anfangs $0,72 \pm 0,1$ % auf $12,39 \pm 3,42$ % an (Abb. 3.10C).

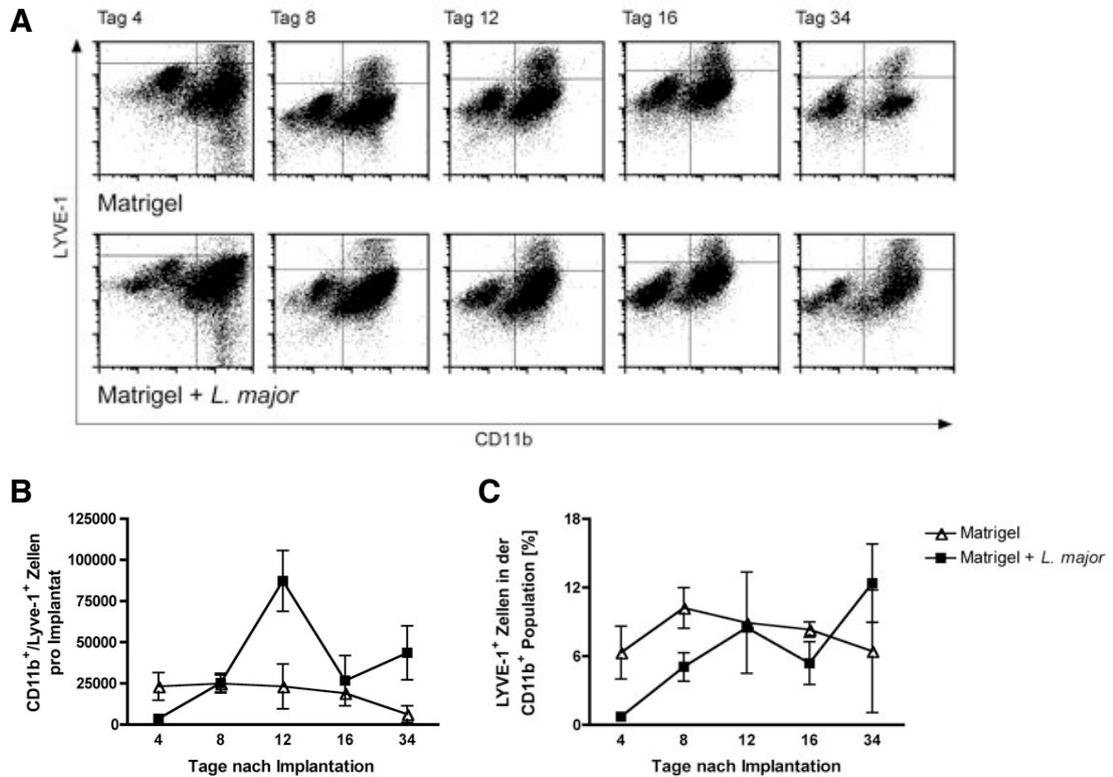


Abb. 3.10 CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im zeitlichen Verlauf des Matrigelimplantationsversuches. Matrigel mit und ohne Leishmanien wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aus B6.WT Mäusen explantiert und die darin enthaltenen Zellen bezüglich ihrer Expression von CD11b und LYVE-1 analysiert. (A) LYVE-1⁺ Zellen koexprimierten CD11b zu allen Zeitpunkten. (B) stellt die absolute Anzahl CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigel mit Leishmanien (schwarze Quadrate) und ohne (weiße Dreiecke) dar, während in (C) der Anteil der LYVE-1⁺ Population innerhalb der CD11b⁺ Zellen abgebildet ist. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit insgesamt sechs Mäusen pro Zeitpunkt.

In Matrigelimplantaten waren somit 100 % der LYVE-1⁺ Zellen auch positiv für CD11b. Durch die Anwesenheit der Leishmanien im Matrigelimplantat verringerte sich die Anzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen zunächst, stieg dann aber deutlich an. Das Maximum in der absoluten Zahl an Tag 12 nach Implantation entspricht dem Maximum dieser Zellen in Pfoten am Tag 14 nach Infektion mit *L. major* (vgl. Abb. 3.6 und 3.7).

3.1.2.2 Verkürzter Matrigelimplantationsversuch mit und ohne Leishmanien

Um für weitere Versuche definierte und effizientere Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde der Versuch etwas modifiziert. Zum einen wurden 500 ng VEGF-C pro Implantat in das Matrigel gemischt. VEGF-C ist ein Wachstumsfaktor für Lymphgefäße und signalisiert über VEGFR-3 auf LECs (Tammela *et al.*, 2005). Zum anderen wurde für den Zeitpunkt der Analyse Tag 7 nach Implantation festgesetzt, um die Rekrutierung und Entwicklung LYVE-1⁺ Zellen zu einem frühen Zeitpunkt untersuchen zu können.

3.1.2.2.1 Analyse der Zellen im Matrigelimplantat am Tag 7

Matrigelimplantate wurden nach sieben Tagen präpariert, die Zellen isoliert, ausgezählt und mittels FACS analysiert. Dabei war die Gesamtzellzahl pro Implantat durch die Anwesenheit der Parasiten (884000 ± 174500) im Matrigel signifikant 3,32 fach gegenüber reinem Matrigel (266600 ± 49940) gesteigert (Abb. 3.11A). Die CD11b⁺ Zellen machten zu diesem Zeitpunkt in reinem Matrigel 59,41 % aller Zellen und mit 68,33 % über zwei Drittel der eingewanderten Zellen in Leishmanien-enthaltenden Implantaten aus (Abb. 3.11B).

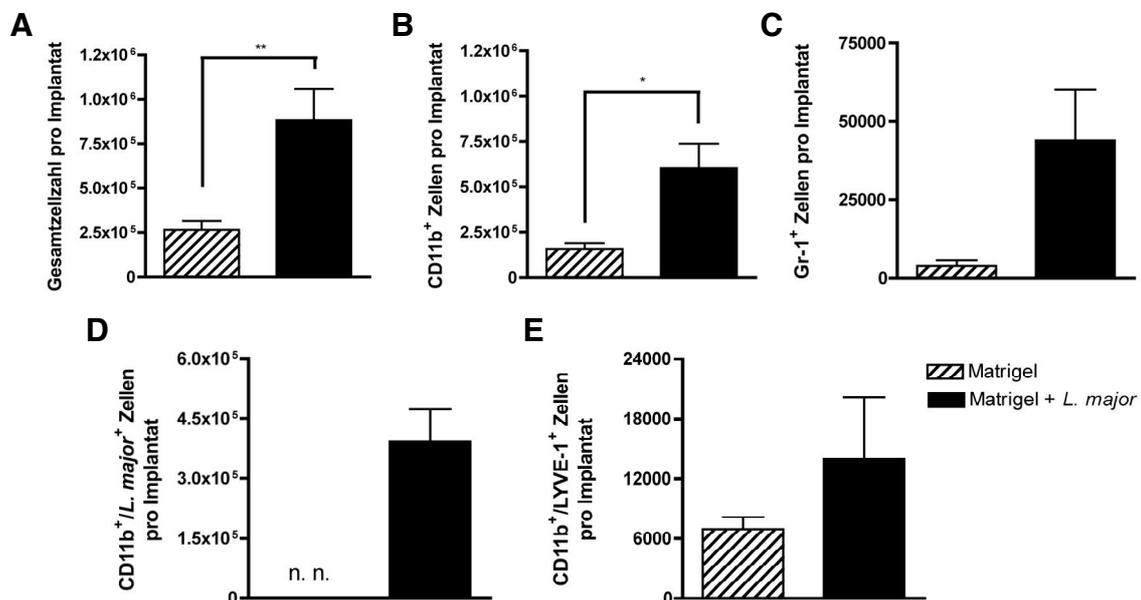


Abb. 3.11 Gesamtzellzahl und Zellzahlen verschiedener Subpopulationen in Matrigel-implantaten am Tag 7. Matrigel mit und ohne Leishmanien wurde B6.WT Mäusen appliziert und nach einer Woche reisoliert. Die Gesamtzellzahl (A), die Anzahl CD11b⁺ Zellen (B), Gr-1⁺ Zellen (C), CD11b⁺/*L. major*⁺ Zellen (D) und die Anzahl CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen (E) sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM aus fünf unabhängigen Versuchen mit insgesamt sieben Mäusen pro Gruppe. *p < 0,05, **p < 0,01; n.n.: nicht nachweisbar.

In reinem Matrigel konnten 3938 ± 1827 Gr-1⁺ Zellen detektiert werden, die in Anwesenheit der Parasiten mit 43950 ± 16200 Zellen 11,16-fach gesteigert waren (Abb. 3.11C). Im ersten Fall entsprach dies 2,49 % und in Leishmanien-enthaltendem Matrigel 7,28 % aller CD11b⁺ Zellen. Mit 392500 ± 81700 Zellen waren 64,98 % der CD11b⁺ Zellen positiv für Leishmanien oder Leishmanienantigen (Abb. 3.11D). In reinem Matrigel waren solche Zellen nicht nachweisbar. Auch die LYVE-1⁺ Zellen wurden quantifiziert (Abb. 3.11E). Wie bereits im Zeitkurs dargelegt, exprimierten alle LYVE-1⁺ Zellen in Matrigelimplantaten am Tag 7 gleichzeitig CD11b. In reinem Matrigel wurden 6953 ± 1193 Zellen und in Anwesenheit von Leishmanien 13950 ± 6222 CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen gefunden (4,39 % bzw. 2,31 % der CD11b⁺ Zellen).

Insgesamt spiegelt dieser Versuchsaufbau den Tag 8 im Zeitkurs wieder. Die Anwesenheit der Leishmanien im Implantat führte zu einer deutlichen Zunahme der infiltrierenden inflammatorischen Zellen, die überwiegend CD11b⁺ waren. Da in den weiteren Analysen die CD11b⁺ Subpopulation, die zusätzlich LYVE-1 exprimiert, genauer untersucht werden sollte, wurden alle weiteren Versuche mit Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten durchgeführt.

3.1.2.2.2 Phänotyp LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat

Für LYVE-1 exprimierende Zellen, die aus Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten isoliert wurden, konnte mittels FACS-Analysen ein Expressionsmuster erstellt werden (Abb. 3.12). Bei den Analysen wurde deutlich, dass alle LYVE-1⁺ Zellen positiv für CD45 und CD11b (Makrophagen, Granulozyten, myeloide dendritische Zellen) und negativ für CD11c (DCs), Gr-1 (Granulozyten) und Dx.5 (NK-Zellen) waren (Abb. 3.12). Anhand bestimmter Marker kann man den Differenzierungsgrad CD11b⁺ Zellen bestimmen. So exprimieren unreife Monozyten im Blut den Marker Ly-6C sehr deutlich (Sunderkötter *et al.*, 2004). Reifen diese Zellen, so kommt es zu einer Herunterregulation von Ly-6C. Ausdifferenzierte Makrophagen im Gewebe sind negativ für Ly-6C und positiv für F4/80 (Sunderkötter *et al.*, 2004). Die FACS-Analysen zeigten eindeutig, dass alle LYVE-1⁺ Zellen negativ für Ly-6C und positiv für F4/80 waren und so, zusätzlich zu der Expression von CD11b⁺, dem Phänotyp von ausdifferenzierten Makrophagen entsprachen. Außerdem waren alle LYVE-1⁺ Zellen auch positiv für die Expression von CEACAM1. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen *L. major* ergab, dass $56,18 \pm 4,82$ % der LYVE-1⁺ Zellen ebenfalls positiv für Leishmanien bzw. Leishmanienantigen waren.

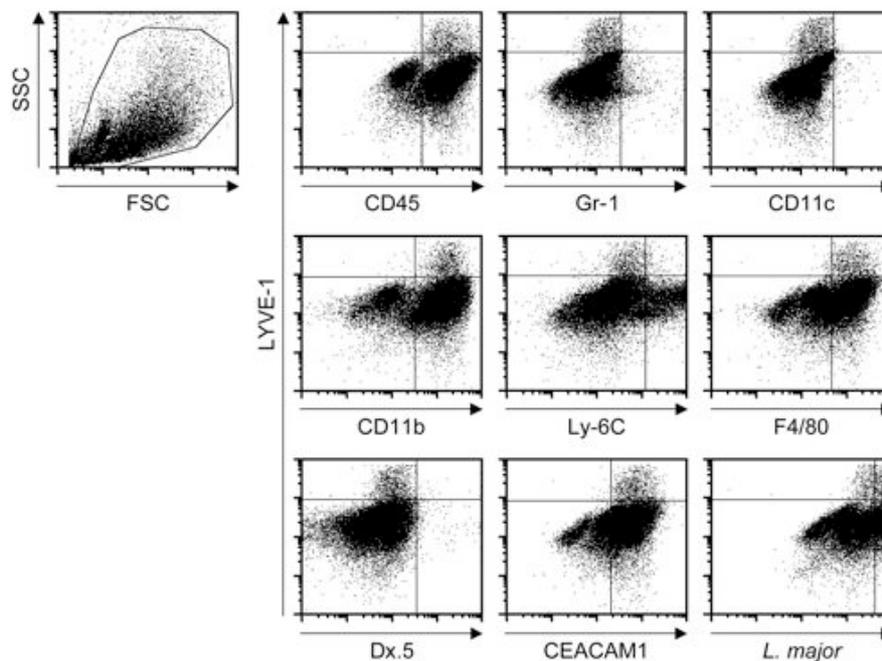


Abb. 3.12 Expressionsmuster LYVE-1⁺ Zellen in Leishmanien-enthaltenden Matrigel-implantaten. Nach sieben Tagen wurden die Matrigelimplantate aus den Mäusen isoliert und die LYVE-1⁺ Zellen mittels FACS-Analysen auf verschiedene Marker untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche mit insgesamt fünf Mäusen.

Somit entsprachen alle im Matrigelimplantat vorliegenden LYVE-1⁺ Zellen dem Phänotyp von Makrophagen, die gleichfalls die bevorzugten Wirtszellen der Leishmanien darstellen.

3.1.2.3 Immunfluoreszenz-Analysen von Matrigelimplantaten

Die Morphologie der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigel, die in FACS-Analysen den Phänotyp von Makrophagen aufwiesen, wurde histologisch untersucht. Dazu wurden Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate direkt nach der Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Später wurden 10 μm dicke Schnitte hergestellt und bezüglich verschiedener Marker analysiert. In der Übersicht von Abbildung 3.13, bei der die Zellkerne mittels DAPI angefärbt wurden, sieht man deutlich, dass bereits nach sieben Tagen Zellen in alle Bereiche des Implantats eingewandert sind. Auf der Unterseite des Präparates befindet sich die Bauchhaut, an die das Implantat anhaftet und die als Kontrolle diente.

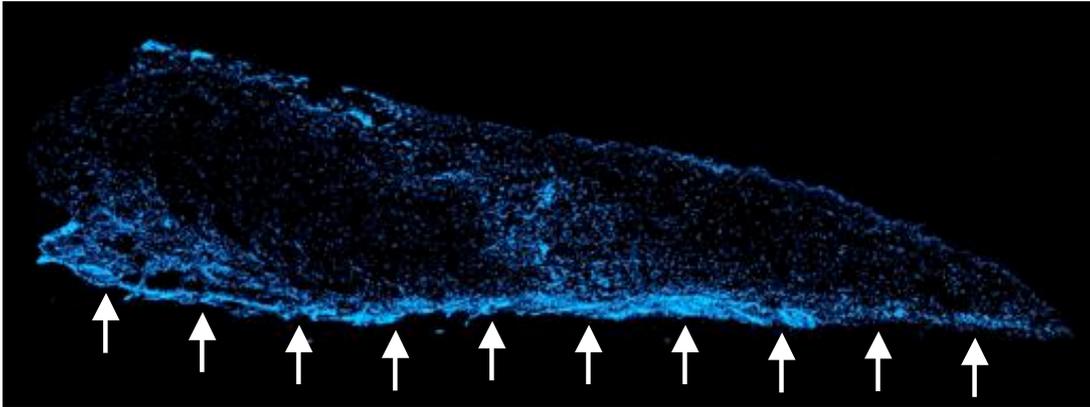


Abb. 3.13 Querschnitt durch ein Leishmanien-enthaltendes Matrigelimplantat am Tag 7. Nach einer Woche wurden Matrigelimplantate mit *L. major* isoliert und kryokonserviert. In 10 μm dicken Schnitten wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. Die Pfeile markieren die Bauchhaut der Maus, die sich im unteren Bereich der dargestellten Übersicht befindet. Diese wurde zusammen mit dem Matrigelimplantat isoliert und diente in weiteren Analysen als Kontrolle. Die Abbildung besteht aus vielen Einzelaufnahmen mit 50 facher Vergrößerung.

Bei weiteren immunhistologischen Untersuchungen wurden LYVE-1⁺ Zellen und MECA-32⁺ Zellen verteilt im Matrigelimplantat gefunden, die anastomosierende, gefäßartige Strukturen ausbildeten (Abb. 3.14A). Wie in der angrenzenden Haut (Abb. 3.14C) lagen die LYVE-1⁺ und MECA-32⁺ gefäßartigen Strukturen in enger Nachbarschaft zueinander. Außerdem zeigte sich, dass auch in dieser Analyse alle LYVE-1⁺ Zellen gleichzeitig CD11b exprimierten und bestätigte somit die früheren Ergebnisse der FACS-Analysen. Eine solche Korrelation konnte bei den MECA-32⁺ Zellen nicht festgestellt werden. Die Mehrzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat gruppierte sich jedoch nicht zu lymphgefäß-ähnlichen Strukturen, sondern lag als Einzelzellen im Implantat vor (Abb. 3.14B).

In der zum Matrigelimplantat angrenzenden Haut von B6.WT Mäusen konnten zur Kontrolle Lymph- und Blutgefäße identifiziert werden (Abb. 3.14C). Im Gegensatz zu den LYVE-1⁺ Gefäßen im Matrigelimplantat waren die Lymphgefäße der Haut immer negativ für CD11b.

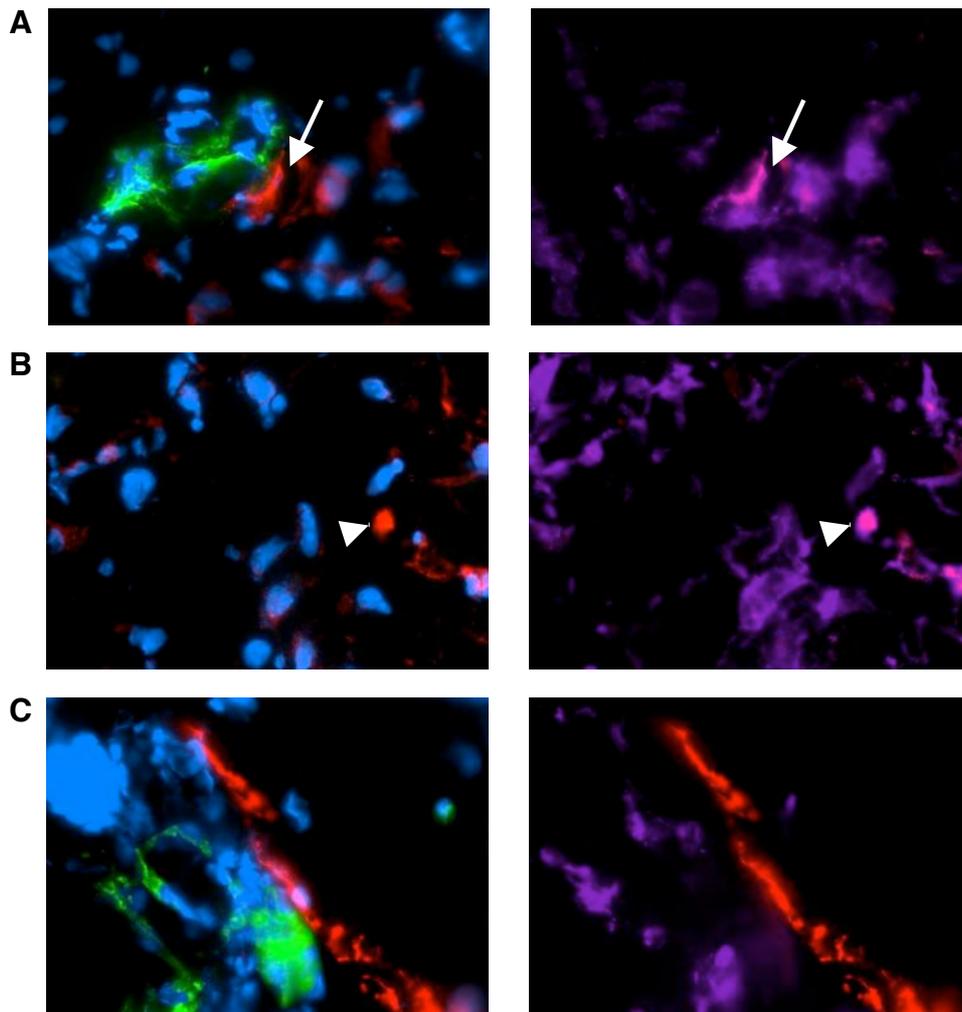


Abb. 3.14 Immunfluoreszenzanalysen LYVE-1⁺ Strukturen im Matrigelimplantat und der Haut. Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate wurden nach sieben Tagen isoliert und für histologische Analysen präpariert. Mittels spezifischer Antikörper wurden LYVE-1⁺ Zellen oder Strukturen (rot), MECA-32⁺ Blutgefäße (grün) und CD11b⁺ Zellen (lila) in Matrigelimplantaten (A und B) und der angrenzenden Haut (C) visualisiert. Zellkerne erscheinen durch eine DAPI-Färbung blau. Pfeile markieren eine lumenbildende, CD11b⁺/LYVE-1⁺, gefäßartige Struktur, während die Pfeilspitzen eine CD11b⁺/LYVE-1⁺ Einzelzelle aufzeigen. Ebenfalls zu beachten ist, dass LYVE-1⁺ Gefäße in der Haut negativ für CD11b sind. Dargestellt sind repräsentative Photographien aus vier Versuchen in 630 facher Vergrößerung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat auch positiv für CD11b waren. Dies war übereinstimmend mit den FACS-Analysen. Außerdem bildete ein Teil dieser CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen anastomisierende, lymphgefäß-ähnliche Strukturen im Matrigelimplantat aus, während die meisten dieser Zellen als Einzelzellen im Implantat vorlagen. Diese neuen Gefäße im Matrigelimplantat unterschieden sich jedoch in ihrem Expressionsmuster von den „normalen“ LECs in der Haut, die kein CD11b exprimierten.

3.2 Lymphgefäßneubildung nach Knochenmarkstransfer mit einem kongenen Marker: B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäuse

Ein kongenes System wurde etabliert, um den Ursprung der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen, die zum einen als Einzelzellen im Matrigelimplantat vorlagen, zum anderen aber auch gefäßartige Strukturen bildeten, zu bestimmen. Dabei sollte untersucht werden, ob die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen von Vorläuferzellen aus der Haut abstammten oder im Knochenmark generiert wurden.

Zu diesem Zweck wurden B6.WT Mäuse, die die Tyrosinphosphatase CD45 in der Isoform CD45.2 auf allen hämatopoetischen Zellen exprimierten, als Rezipienten letal bestrahlt und erhielten einen Tag später Knochenmark von B6.WT Mäusen, die die Isoform CD45.1 besaßen. In den so generierten chimären Mäusen (B6.WT^{CD45.1}→B6.WT) exprimierten alle hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark die Isoform CD45.1 und konnten dadurch von gewebeimmanenten Zellen unterschieden werden (vgl. Kapitel 2.2.3.4).

3.2.1 Infektionsverlauf und Analyse des Infiltrats infizierter B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäuse

Um zu überprüfen, ob die Bestrahlung bei der Generierung der kongenen Mäuse einen Einfluss auf den Verlauf der kutanen Leishmaniose hatte, wurden die Tiere mit *L. major* infiziert. Zumindest innerhalb der ersten drei Wochen nach Infektion wurde kein Unterschied in der Schwellung der Pfoten von B6.WT^{CD45.1}→B6.WT und B6.WT Mäusen festgestellt (Abb. 3.15A).

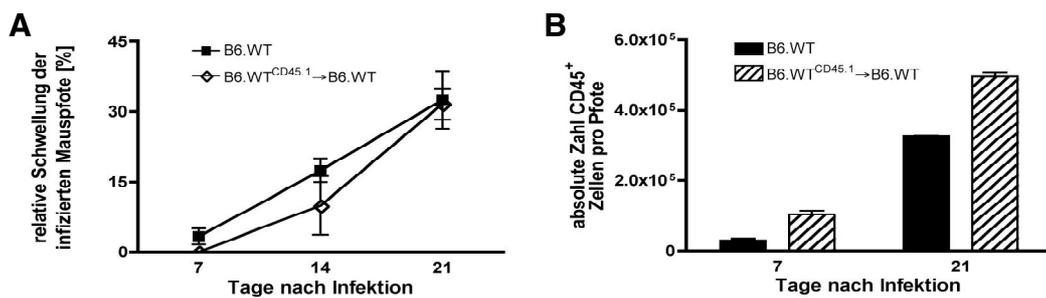


Abb. 3.15 Infektionsverlauf in B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen. B6.WT Mäuse (schwarze Quadrate oder Säulen) und B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäuse (weiße Rauten oder gestreifte Säulen) wurden mit *L. major* infiziert und der Verlauf in den ersten drei Wochen anhand der Schwellung der infizierten Pfoten gegenüber den nicht infizierten Pfoten kontrolliert (A). Zusätzlich wurde die Anzahl CD45⁺ Zellen in infizierten Mauspfoten mittels FACS-Analysen bestimmt (B). Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM der Daten von drei Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen pro Gruppe (A) bzw. eines Experimentes mit jeweils 2 Mäusen pro Zeitpunkt (B).

Die Anzahl der CD45⁺ Zellen in infizierten Pfoten von B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen war leicht, aber nicht signifikant gegenüber B6.WT Kontrollmäusen erhöht (Abb. 3.15B).

Mittels FACS-Analysen wurden LYVE-1⁺ Zellen aus der Pfote naiver und infizierter Mäuse hinsichtlich der Expression ihrer CD45-Isoform untersucht. In B6.WT Mäusen exprimierten alle CD45⁺ Zellen die Isoform CD45.2 (Abb. 3.16, 1. und 3. Spalte). LYVE-1⁺ Zellen wurden sowohl in der CD45.2⁺ als auch CD45.2⁻ Population gefunden (vgl. Kapitel 3.1.1.2).

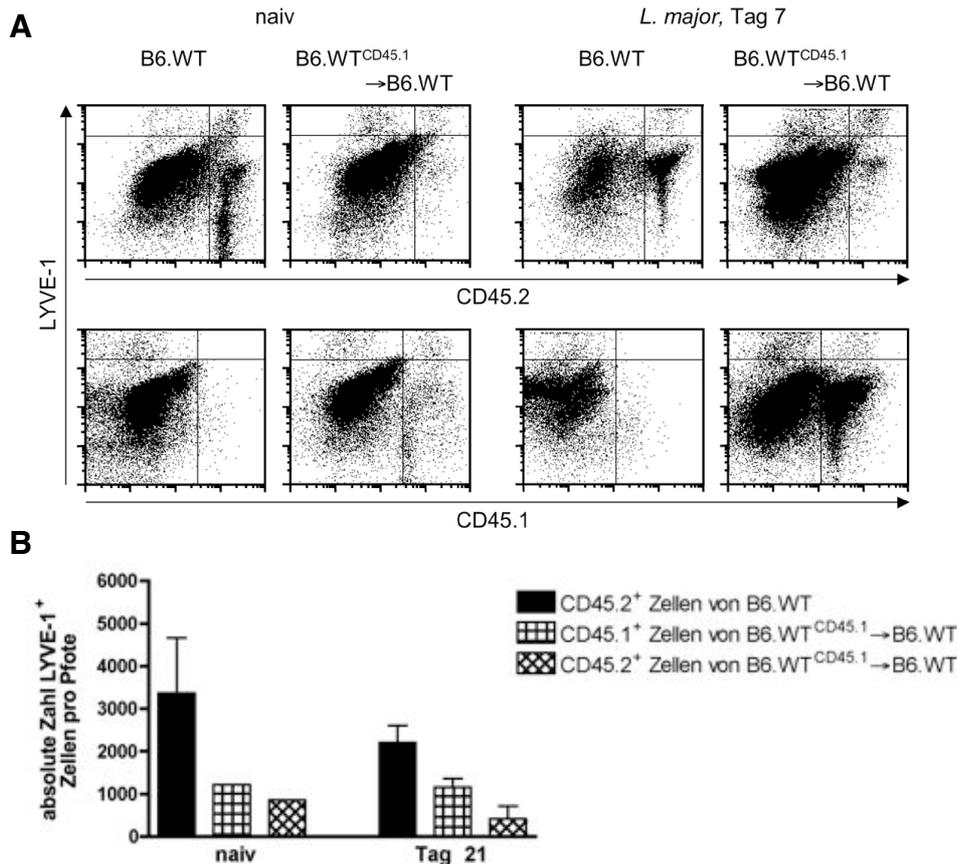


Abb. 3.16 CD45-Expression LYVE-1⁺ Zellen in Pfoten naiver und infizierter B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäuse. Zellen naiver und *L. major* infizierter Mauspfoten wurden aus B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen isoliert. Zellen von B6.WT Mäusen exprimierten nur die Isoform CD45.2, während in den knochenmarktransferierten B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen vornehmlich die Isoform CD45.1 dominierte. LYVE-1⁺ Zellen aus diesen Mäusen zeigten allerdings einen gemischten Phänotyp. Dabei existierten sowohl CD45.1⁺/LYVE-1⁺ Zellen als auch CD45.2⁺/LYVE-1⁺ Zellen. (B) repräsentiert die Mittelwerte ± SEM aus einem Experiment mit jeweils zwei Mäusen pro Gruppe.

In den chimären Mäusen hingegen waren die meisten CD45⁺ Zellen positiv für den Donormarker CD45.1 (Abb. 3.16, 2. und 4. Spalte). Nur wenige Zellen exprimierten noch den Rezipientenmarker CD45.2. Allerdings wiesen die LYVE-1⁺ Zellen in naiven und infizierten B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen einen gemischten Phänotyp auf, wobei sowohl CD45.1⁺/LYVE-1⁺

Zellen als auch CD45.2⁺/LYVE-1⁺ Zellen identifiziert wurden. Entweder stammten die CD45.2⁺/LYVE-1⁺ Zellen von Knochenmarkzellen ab, die der Bestrahlung entgangen sind, da die Erfolgsrate beim Transfer nur bei $94,73 \pm 0,78 \%$ lag (vgl. Abb. 2.4), oder sie wurden von gewebeimmanenten Vorläuferzellen gebildet.

Abbildung 3.16B fasst die Verteilung der CD45-Expression der LYVE-1⁺ Zellen in naiven Mäusen und am Tag 21 nach Infektion zusammen. In B6.WT Mäusen waren alle CD45⁺/LYVE-1⁺ Zellen positiv für CD45.2. In den knochenmarktransferierten Mäusen hingegen teilten sich die Zellen in die beiden Isoformen CD45.1 und CD45.2 auf. Dies war sowohl in naiven als auch infizierten Mäusen festzustellen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zumindest teilweise zu der CD45⁺/CD11b⁺/LYVE-1⁺ Population in naiven und infizierten Mauspfoten beitragen.

3.2.2 Matrigelimplantationsversuch mit B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen

Chimären Mäusen wurde Leishmanien-enthaltendes Matrigel implantiert und sieben Tage später analysiert. Damit sollte überprüft werden, welchen Anteil knochenmarkgenerierte Zellen bei der Gefäßneubildung unter diesen inflammatorischen Bedingungen ausmachten. Dies war gerade deswegen von Interesse, da im Matrigel alle LYVE-1⁺ Zellen einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp aufwiesen und somit potentiell von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen könnten.

3.2.2.1 LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat von B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen

Zunächst wurde die zelluläre Zusammensetzung der Matrigelimplantate, die Leishmanien enthielten, untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Gesamtzellzahlen pro Implantat mit 601700 ± 99010 Zellen in B6.WT und 625400 ± 85030 Zellen in den B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen nahezu identisch waren (Abb. 3.17A). In den Implantaten aus B6.WT Tieren war mit $81,49 \%$ der Anteil der CD11b⁺ Zellen geringfügig erhöht gegenüber einem Anteil von $71,49 \%$ in den chimären Tieren.

Interessant allerdings war die Verteilung der CD45-Expression unter den LYVE-1⁺ Zellen. In Matrigelimplantaten aus B6.WT Mäusen waren mit 4098 ± 1700 Zellen ($98,82 \%$) fast alle Zellen positiv für CD45.2 (Abb. 3.17B). Nur wenig LYVE-1⁺ Zellen wurden unspezifisch mit dem anti-CD45.1 Antikörper angefärbt (49 ± 23). In Matrigelimplantaten aus

B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen exprimierten 298 ± 55 (7,06 %) der LYVE-1⁺ Zellen den Rezipientenmarker CD45.2. Mit 3921 ± 1531 Zellen war die Mehrheit der LYVE-1⁺ Zellen (92,94 %) jedoch positiv für den Donorzellmarker CD45.1.

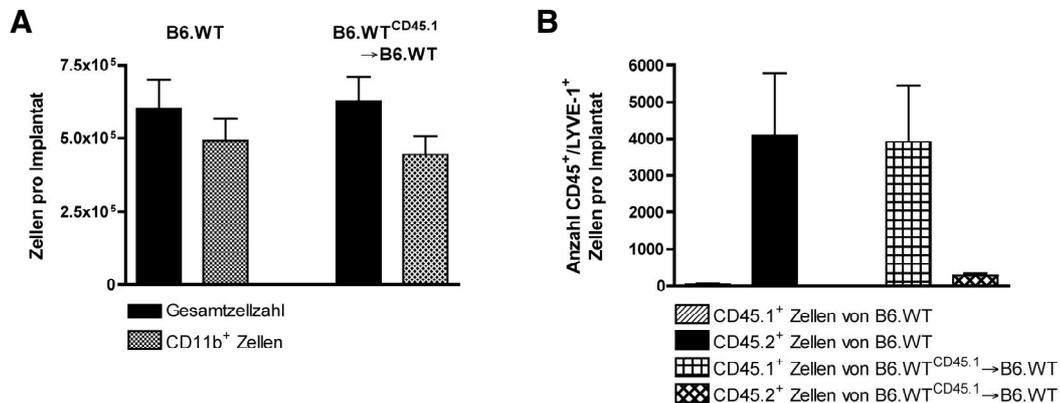


Abb. 3.17 Zellen in Matrigelimplantaten von B6.WT und B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen. Leishmanien-enhaltende Matrigelimplantate wurden nach einer Woche aus B6.WT und B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen isoliert. (A) Die Gesamtzellzahl und die Anzahl CD11b⁺ Zellen waren dabei identisch. (B) In Matrigelimplantaten aus B6.WT Mäusen exprimierten alle LYVE-1⁺ Zellen die Isoform CD45.2, während bei über 90 % der Zellen aus Matrigelimplantaten von knochenmarktransferierten Mäusen der Donormarker CD45.1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Versuchen mit insgesamt neun Tieren pro Gruppe.

Somit stammten in diesem System, entgegen den Analysen der infizierten Pfoten, fast alle LYVE-1⁺ Zellen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab.

3.2.2.2 LYVE-1⁺ Strukturen in Matrigelimplantaten von B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen

In histologischen Analysen wurden die Ergebnisse aus den Einzelzelluntersuchungen der Matrigelimplantate überprüft. Dabei sollte kontrolliert werden, ob sich LYVE-1⁺ Zellen auch in Implantaten von chimären Mäusen zu gefäßartigen Strukturen aneinander lagerten und ob diese Strukturen positiv für den Donorzellmarker CD45.1 waren. Theoretisch könnte es sein, dass es in Matrigelimplantaten von B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen durch den Generierungsprozess nicht mehr zur Ausbildung von LYVE-1⁺ Strukturen gekommen ist und die Ergebnisse der FACS-Analysen nur auf Untersuchungen von LYVE-1⁺ Einzelzellen beruhten.

Fluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen LYVE-1 zeigten, dass auch in Matrigelimplantaten aus B6.WT^{CD45.1} → B6.WT Mäusen LYVE-1⁺ Zellen gefäßartige Strukturen ausbilden konnten (Abb. 3.18, oben rechts). Die Zellen dieser Strukturen exprimierten gleichzeitig den

Donorzellmarker CD45.1 (gelbe Mischfarbe). Als Kontrolle diente die dem Matrigelimplantat angrenzende Haut. Lymphgefäße in diesem Bereich waren negativ für CD45.1 (Abb. 3.18, rechts unten) und CD45.2 (Daten nicht dargestellt). Um die Spezifität des anti-CD45.1 Antikörpers zu überprüfen, wurden Schnitte von Matrigelimplantate aus B6.WT Mäusen ebenfalls gefärbt. Die Analysen zeigten, dass es hier zu keiner Antikörperbindung kam (Abb. 3.18, linke Spalte). Unter Verwendung eines anti-CD45.2 oder allgemein eines anti-CD45 Antikörpers wurden auch in Matrigelimplantaten von B6.WT Mäusen LYVE-1⁺ Strukturen angefärbt (Daten nicht dargestellt).

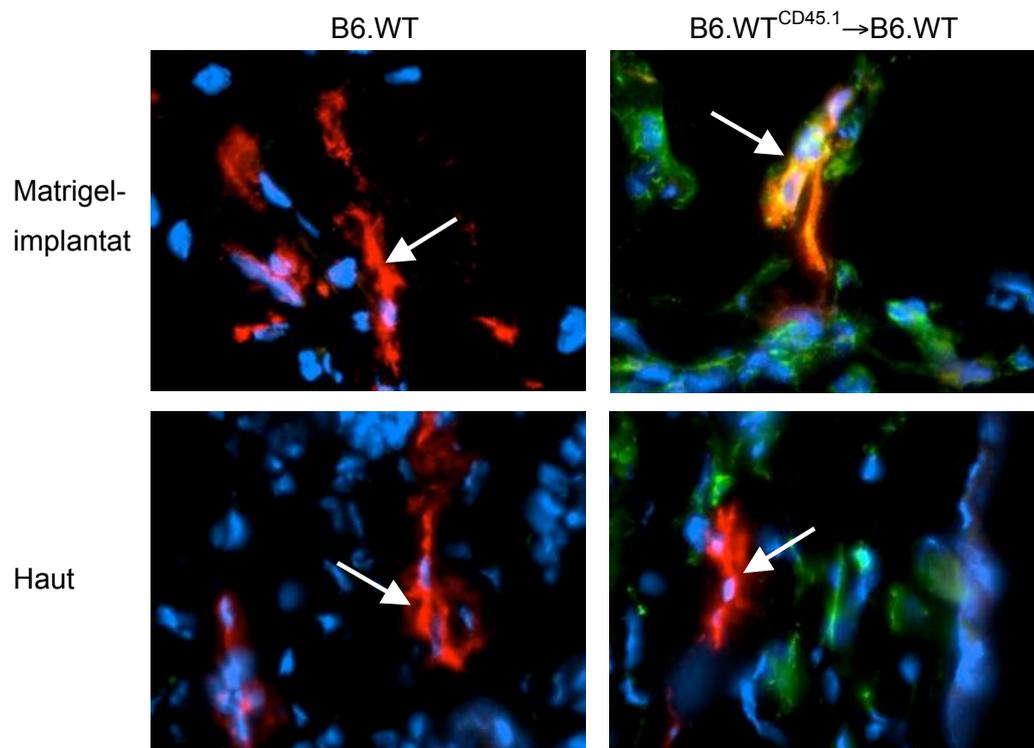


Abb. 3.18 Histologische Analysen von Matrigelimplantaten aus B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen. Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate wurden nach einer Woche isoliert, kryokonserviert und histologisch aufgearbeitet. LYVE-1⁺ Strukturen (rot) im Implantat (obere Reihe) und der dem Implantat angrenzenden Haut (untere Reihe) waren in B6.WT Mäusen negativ für CD45.1 (linke Spalte). In B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen (rechte Spalte) hingegen exprimierten LYVE-1⁺ gefäßartige Strukturen im Matrigelimplantat auch CD45.1 (gelbe Mischfarbe), während die Lymphgefäße in der Haut CD45.1⁻ waren. Die Pfeile zeigen auf LYVE-1⁺ Strukturen. Die Bilder in 630 facher Vergrößerung sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche mit insgesamt sechs Mäusen pro Gruppe.

Weitere Analysen zeigten, dass LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat von chimären Mäusen analog zu Implantaten aus B6.WT Tieren häufig längliche, gefäßartige Strukturen bildeten, die in enger Nachbarschaft zu Blutgefäßen zu finden waren, und immer eine Koexpression von CD11b aufwiesen (Abb. 3.19).

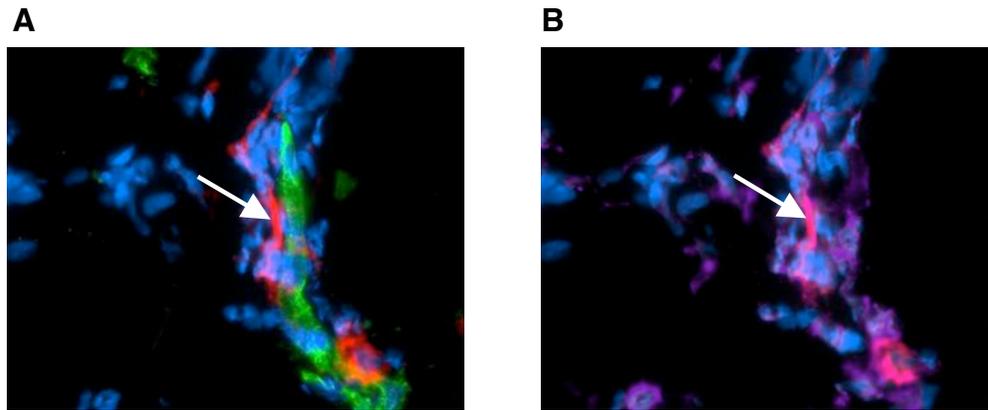


Abb. 3.19 Gefäßartige Strukturen im Matrigelimplantat von B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen. (A) LYVE-1⁺ (rot) und MECA-32⁺ (grün) gefäßartige Strukturen wurden in Schnitten von Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten dargestellt und die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. (B) Im gleichen Ausschnitt wurde die Expression von LYVE-1 (rot) und CD11b (lila) analysiert. Die Pfeile markieren eine CD11b⁺/LYVE-1⁺ Struktur. Die Photographien in 630 facher Vergrößerung repräsentieren die Daten aus zwei unabhängigen Versuchen mit insgesamt sechs Mäusen pro Gruppe.

Neben diesen LYVE-1⁺ lymphgefäß-ähnlichen Strukturen gab es auch in Matrigelimplantaten aus B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen analog zu Implantaten aus B6.WT Mäusen CD11b⁺/LYVE-1⁺ Einzelzellen (Daten nicht dargestellt).

Mit den Analysen chimärer Mäuse konnte gezeigt werden, dass CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in naiven und infizierten Pfoten zumindest teilweise von Knochenmarkzellen abstammten. Durch die Matrigelimplantationsversuche in diesen Mäusen wurde zudem deutlich, dass unter bestimmten Bedingungen neu gebildete gefäßartige Strukturen zu 100 % von hämatopoetischen Zellen abstammen können. Diese neuen Endothelzellen koexprimierten CD45, CD11b und LYVE-1.

3.3 Lymphgefäßneubildung in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

CEACAM1 wird auf Epithelien, Gefäßendothel und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Kürzlich wurde beschrieben, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle bei der Neubildung und Umgestaltung von Blutgefäßen spielt (Horst *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sollte nun der Einfluss von CEACAM1 auf die Neubildung von lymphatischen Gefäßen im experimentellen Modell der kutanen Leishmaniose *in vivo* und im Matrigelimplantationsversuch *in vitro* untersucht werden.

3.3.1 Infektion von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen mit *L. major*

Analog zu früheren Versuchen wurden B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse mit Leishmanien subkutan in die hintere rechte Pfote infiziert. Als Kontrollen dienten B6.WT Mäuse.

3.3.1.1 Infektionsverlauf

Nach Infektion mit *L. major* kam es in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zu einer signifikant ausgeprägteren Schwellung der infizierten Pfoten im Vergleich zu B6.WT Mäusen (Abb. 3.20A). Zusätzlich war der Heilungsprozess bei B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen deutlich verzögert und dauerte doppelt so lange wie bei den B6.WT Kontrolltieren.

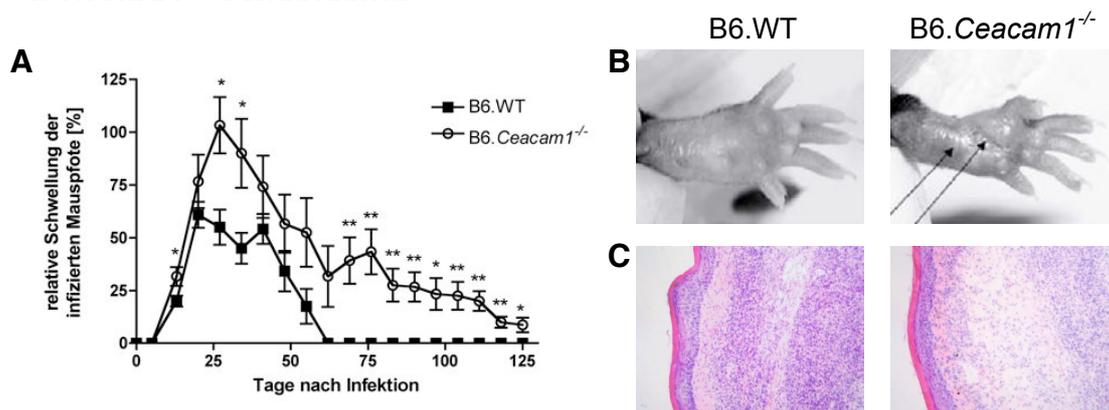


Abb. 3.20 Verlauf der Infektion mit *L. major* in B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. (A) Nach Infektion in die rechte hintere Pfote wurde der Infektionsverlauf anhand der Schwellung verfolgt. Diese ist angegeben als prozentuale Zunahme gegenüber der nicht infizierten, linken Pfote. (B) 40 Tage nach Infektion wiesen infizierte Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen Narben auf (Pfeile). (C) Zusätzlich kam es nur in infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zur Ödembildung, visualisiert in einer H&E-Färbung von Mauspfoten 21 Tage nach Infektion. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 12 Mäusen pro Gruppe. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Weiterhin wiesen infizierte Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen 40 Tage nach Infektion mit *L. major* Narben auf, die in B6.WT Mäusen nicht auftraten (Abb. 3.20B). Dieser Befund ließ vermuten, dass die ausgeprägte und übermäßige Schwellung in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen durch einen vaskulären Defekt ausgelöst wurde. Zum einen führen undichte Blutgefäße, zum anderen eine unzureichende Lymphdrainage zu einer Ansammlung extrazellulärer Gewebsflüssigkeit. Der daraus resultierende, dauerhaft erhöhte Gewebedruck könnte somit die Bildung von Narben bewirken. Histologische Untersuchungen von longitudinalen Schnitten durch infizierte Pfoten bestätigten, dass es in den infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zu einer verstärkten Ansammlung extrazellulärer Flüssigkeit und somit zur Ödembildung kam (Abb. 3.20C).

3.3.1.2 Analyse des Infiltrats infizierter Pfoten

Aufgrund der histologischen Befunde wurde die zelluläre Zusammensetzung infizierter Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen mittels FACS-Analysen genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der CD45⁺ Zellen in den Pfoten während der ersten drei Wochen nach Infektion den Werten von B6.WT Mäusen entsprach (Abb. 3.21A).

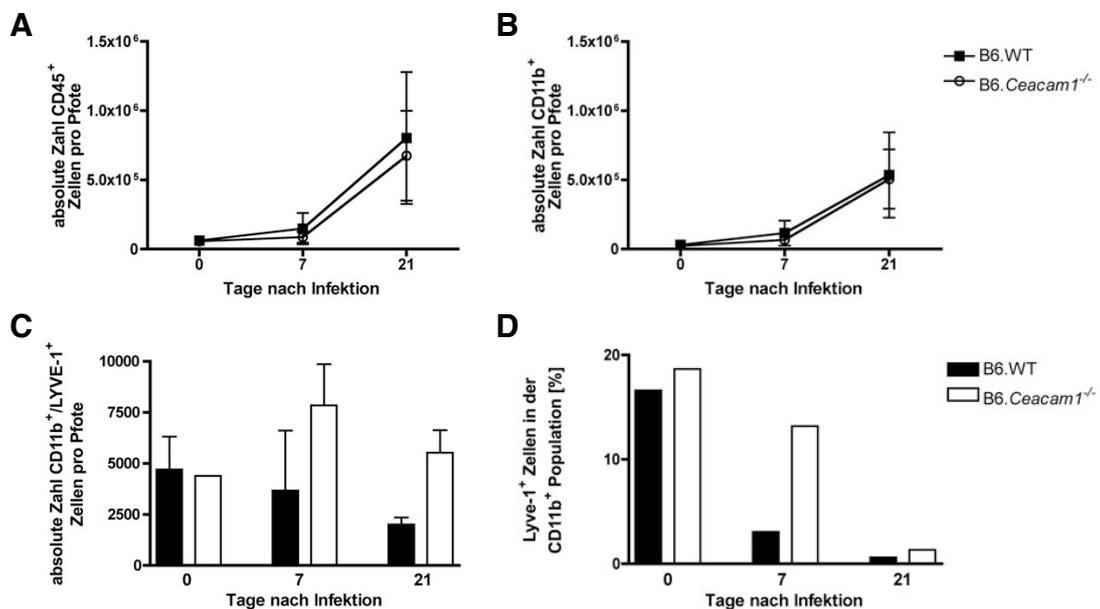


Abb. 3.21 Analyse der Zellen in infizierten Pfoten von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Nach Infektion mit *L. major* wurden die Pfoten zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert und die isolierten Zellen mittels FACS analysiert. Die Anzahl CD45⁺ Zellen (A) und CD11b⁺ Zellen (B) waren im Zeitverlauf bei beiden Gruppen identisch. (C) Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen während der Infektion gegenüber B6.WT Mäusen an. (D) Auch der Anteil der LYVE-1⁺ Zellen an der CD11b⁺ Population war zu allen Zeitpunkten in den infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM eines Versuches mit je zwei Mäusen pro Zeitpunkt.

Mit jeweils etwa 500000 CD11b⁺ Zellen in den infizierten Pfoten von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen am Tag 21 nach Infektion war auch hier kein Unterschied festzustellen (Abb. 3.21B). Eine erhöhte Schwellung der infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen am Tag 21 nach Infektion einhergehend mit einer konstanten Anzahl CD45⁺ Zellen entspricht einer erniedrigten Zelldichte und passt zu dem beobachteten Auftreten von Ödemen in diesen Mäusen.

Anders verhielt es sich mit der Anzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen. Während in naiven Pfoten von B6.WT Tieren und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nahezu gleich viele Zellen vorlagen, stieg die Anzahl dieser Zellen im Verlauf der Infektion in den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen, während sie in den Pfoten der B6.WT Mäuse abnahm (Abb. 3.21C). Mit einem Anteil von 18,66 % CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen an der CD11b⁺ Population in naiven B6.*Ceacam1*^{-/-} Tieren, 11,76 % am Tag 7 nach Infektion und 1,09 % drei Wochen nach Infektion war zu allen Zeitpunkten dieser Anteil deutlich erhöht gegenüber B6.WT Mäusen (Abb. 3.21D). Diese CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen exprimierten in B6.WT Mäusen CEACAM1 (Kapitel 3.1.1.2, Abb. 3.7C), und waren negativ für CEACAM1 in B6.*Ceacam1*^{-/-} Tieren (Daten nicht dargestellt).

Somit bestätigten gleiche Anzahlen CD45⁺ und CD11b⁺ Zellen in infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen und B6.WT Tieren die Ödembildung. Zusätzlich war die Zahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen während der Infektion mit *L. major* erhöht und entsprach einem größeren Anteil an der CD11b⁺ Population.

3.3.1.3 Defekte Neovaskularisierung infizierter Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

Die Bildung neuer lymphatischer Gefäße in den Leishmanien-infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen drei Wochen nach Infektion wurde immunhistologisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass im Infiltrat der Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen kaum Lymph- und Blutgefäße vorhanden waren (Abb. 3.23A, rechts). Gefäße konnten ausschließlich in der Dermis der Mauspfoten detektiert werden. Zudem bestätigte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI erneut die verringerte Zelldichte in infizierter B6.*Ceacam1*^{-/-} Mauspfoten im Vergleich zu B6.WT Kontrollmäusen. Die sehr sporadisch auftretenden LYVE-1⁺ Strukturen im Infiltrat infizierter Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen waren zum einen sehr klein (Abb. 3.23B, rechts), zum anderen ist die Funktionalität dieser Strukturen fraglich, da die Färbung mit einem anti-LYVE-1 Antikörper keine kontinuierliche Struktur erkennen ließ. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in B6.WT Mäusen nicht nur die infiltrierenden Zellen CEACAM1⁺ waren (Abb. 3.23C, links). Die neu gebildeten Lymphgefäße im Infiltrat exprimierten neben LYVE-1 auch CEACAM1. In

infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen fanden sich anstelle LYVE-1⁺ Gefäße vor allem LYVE-1⁺ Einzelzellen (Abb. 3.23C, rechts).

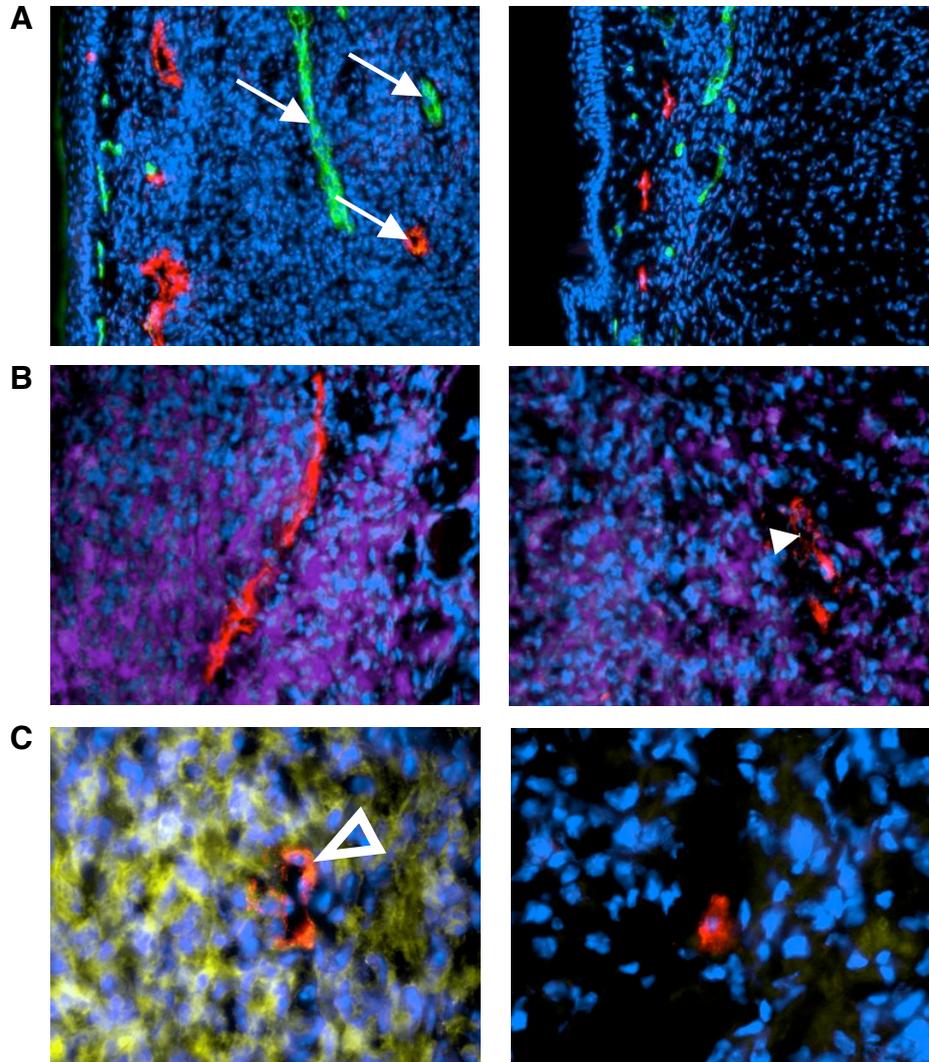


Abb. 3.22 Histologische Analyse der Gefäße infizierter Pfoten von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Die Tiere wurden mit *L. major* infiziert und die Pfoten nach drei Wochen histologisch aufgearbeitet. (A) Im Infiltrat von B6.WT Mäusen (linkes Bild) sind Lymphgefäße (LYVE-1⁺, rot) und Blutgefäße (MECA-32⁺, grün) zu finden (Pfeile), während diese in infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nur in der Haut vorkommen (rechtes Bild, 200 fache Vergrößerung). (B) Dargestellt sind LYVE-1⁺ Zellen (rot) und CD11b⁺ Zellen (lila) in 400 facher Vergrößerung. Die Pfeilspitze deutet auf ein nur diskontinuierlich angefärbtes Gefäß. (C) In 1000 facher Vergrößerung wurden LYVE-1⁺ Zellen (rot) und CEACAM1⁺ Zellen (gelb) visualisiert. Die offene Pfeilspitze markiert ein Lymphgefäß im Infiltrat einer infizierten B6.WT Maus, das CEACAM1⁺ ist (linkes Bild). In infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen wurden LYVE-1⁺ Einzelzellen detektiert (rechtes Bild) Die Zellkerne wurden in allen Abbildungen mit DAPI (blau) visualisiert. Die Photographien sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche mit insgesamt neun Mäusen pro Gruppe.

3.3.2 Analyse CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Vorläuferzellen im Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

In knochenmarktransferierten Mäusen konnte anhand eines kongenen Markers gezeigt werden, dass zumindest ein Teil der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen hämatopoetischen Ursprungs ist. Diese Zellen können nur über die Blutbahn in die infizierte Pfote gelangen. Da keine LYVE-1⁺ Leukozyten im Blut gefunden wurden (Daten nicht dargestellt) und die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantationsversuch den Makrophagenmarker F4/80 exprimierten (Kapitel 3.1.2.2.2, Abb. 3.12), liegt die Vermutung nahe, dass CD11b⁺ Vorläuferzellen in das Gewebe einwandern und erst später LYVE-1 exprimieren. Aus diesem Grund wurden CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Monozyten, die unreife Makrophagenvorläufer darstellen (Sunderkötter *et al.*, 2004), aus dem peripheren Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen und B6.WT Mäusen näher untersucht. Innerhalb der Leukozyten beider Tiere gab es eine CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Population, die in B6.WT Tieren zusätzlich positiv für CEACAM1 war (Abb. 3.23A).

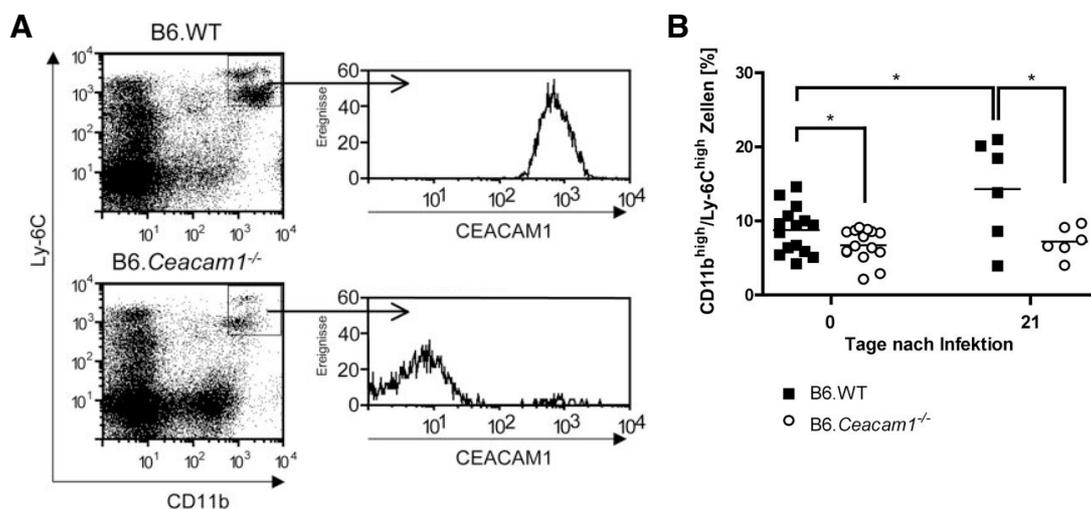


Abb. 3.23 Signifikante Reduktion der Monozytenpopulation im Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Leukozyten des peripheren Blutes von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen wurden bezüglich ihrer Expression von CD11b und Ly-6C untersucht. (A) Unreife Monozyten exprimierten CD11b^{high}/Ly-6C^{high} (Quadrate innerhalb der Punktediagramme). Diese Zellen sind in B6.WT Mäusen deutlich positiv für CEACAM1. (B) Nicht nur in naiven Mäusen (Tag 0) ist der prozentuale Anteil dieser Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen gegenüber B6.WT Mäusen signifikant reduziert, sondern auch während der Infektion mit *L. major*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit insgesamt 15 Mäusen pro Gruppe (naiv), bzw. aus zwei unabhängigen Versuchen mit sechs Mäusen pro Gruppe (Tag 21). * $p < 0,05$.

Allerdings war diese Population in naiven B6.*Ceacam1*^{-/-} Tieren mit $6,71 \pm 0,56$ % der Leukozyten signifikant gegenüber $8,76 \pm 0,81$ % in B6.WT Mäusen reduziert (Abb. 3.23B). Während der prozentuale Anteil der CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Zellen im Blut infizierter B6.WT Mäuse signifikant auf $14,31 \pm 2,81$ % an Tag 21 anstieg, erhöhte sich dieser Anteil in den B6.*Ceacam1*^{-/-}

Mäusen nur sehr gering auf $7,21 \pm 0,84 \%$. Somit blieb diese deutliche Reduktion der $CD11b^{\text{high}}/Ly-6C^{\text{high}}$ Monozyten im Blut auch während der Infektion mit *L. major* erhalten.

3.3.3 Matrigelimplantationsversuch mit *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen

Um die Neubildung von Lymphgefäßen auch in *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen unter inflammatorischen Bedingungen näher untersuchen zu können, wurde Leishmanien-enthaltendes Matrigel den Mäusen implantiert und Analysen analog zu früheren Versuchen durchgeführt. *B6.WT* Mäuse dienten hierbei als Kontrolle.

3.3.3.1 Einwandern verschiedener Zellen in Matrigelimplantate von *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen

Matrigel wurde mit Leishmanien gemischt und *B6.WT* und *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen subkutan appliziert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen aus den Implantaten isoliert. Die absolute Zellzahl und die Anzahl der $CD11b^+$ Zellen pro Matrigelimplantat von *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen (651600 ± 80740 und 522200 ± 61090) waren im Vergleich zu den Zahlen von *B6.WT* Mäusen leicht erhöht (736200 ± 114800 und 617400 ± 104000) (Abb. 3.24A). Dabei blieb der Anteil der $CD11b^+$ Population an der Gesamtzellzahl in den Implantaten beider Mäuse relativ konstant (80,14 % zu 83,86 %). Vergleicht man die Zellzahlen der $CD11b^+/LYVE-1^+$ Zellen, die aus den Matrigelimplantaten der jeweiligen Mäuse isoliert wurden, fällt auf, dass in Implantaten aus *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen mit 7315 ± 2.387 Zellen die Anzahl um 32,5 % höher lag als in den *B6.WT* Mäusen (5522 ± 1621) (Abb. 3.24B).

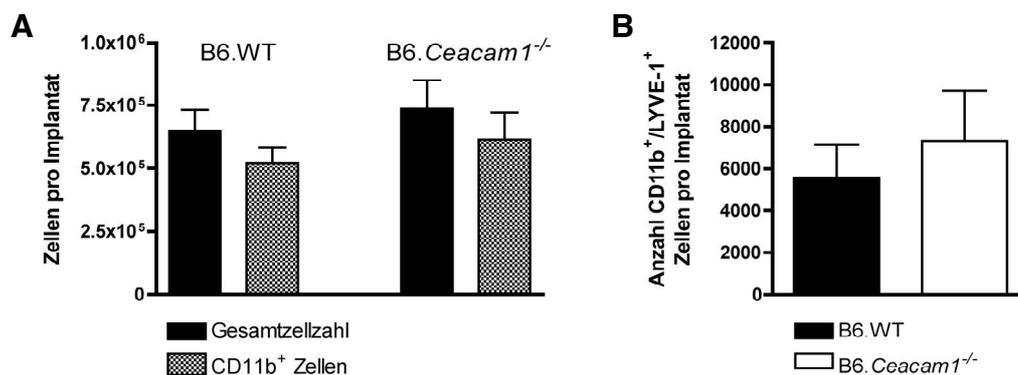


Abb. 3.24 Zellen im Matrigelimplantat von *B6.WT* und *B6.Ceacam1^{-/-}* Mäusen. Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate wurden nach sieben Tagen isoliert und die Gesamtzellzahl und die Anzahl der $CD11b^+$ Zellen (A) sowie die Anzahl der $CD11b^+/LYVE-1^+$ Zellen (B) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt acht Mäusen pro Gruppe.

Diese gesteigerte Anzahl CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat ist analog zu den erhöhten Zahlen in naiven und infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen gegenüber B6.WT Tieren (Kapitel 3.3.1.2, Abb. 3.21). Wie bereits gezeigt, exprimierten CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen aus B6.WT Mäusen CEACAM1 auf ihrer Oberfläche (Kapitel 3.1.2.2.2, Abb. 3.12), während diese Zellen aus Implantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen negativ für CEACAM1 waren (Daten nicht dargestellt).

3.3.3.2 Fehlende LYVE-1⁺ Strukturen in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

FACS-Analysen zeigten, dass in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen eine größere Anzahl CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen als in B6.WT Mäusen vorlag. Um zu erfahren, ob diese Zellen ebenfalls LYVE-1⁺ lymphgefäß-ähnliche Strukturen ausbilden konnten, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Matrigelimplantate durchgeführt.

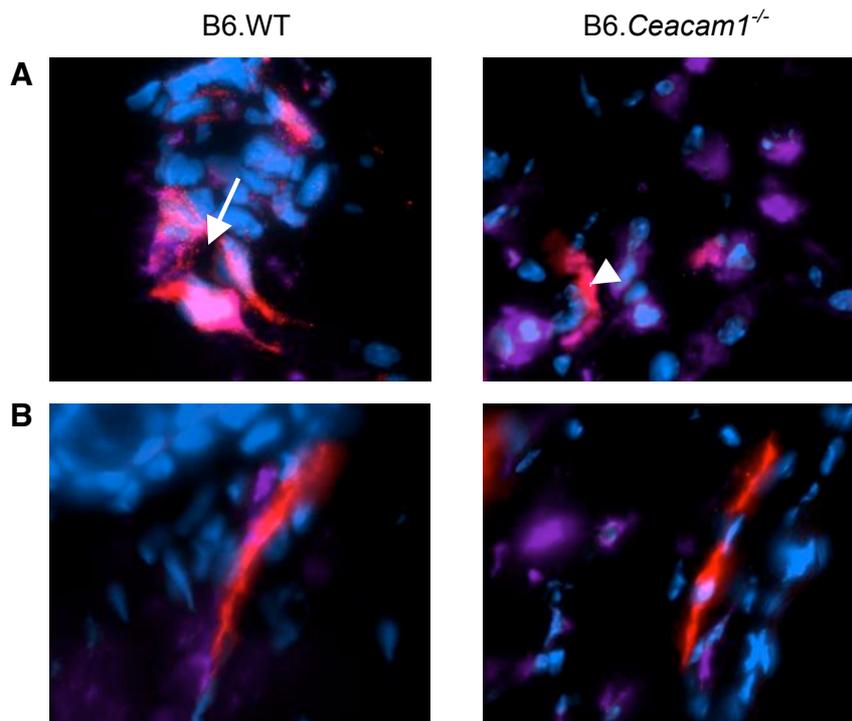


Abb. 3.25 Histologische Untersuchungen LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Leishmanien-enthaltende Matrigelimplantate wurden nach sieben Tagen isoliert und histologisch aufgearbeitet. (A) CD11b⁺ (lila)/LYVE-1⁺ (rot) Zellen bildeten in Matrigelimplantaten von B6.WT Mäusen anastomosierende gefäßartige Strukturen (linkes Bild, Pfeil), die in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen völlig fehlten. LYVE-1⁺ Zellen lagen hier lediglich als Einzelzellen vor (rechtes Bild, Pfeilspitze). (B) In der angrenzenden Haut von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen waren alle Lymphgefäße CD11b⁺. In den 1000 fachen Vergrößerungen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. Die Abbildungen repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit insgesamt acht Mäusen pro Gruppe.

In Implantaten von B6.WT Mäusen existierten anastomosierende gefäßartige Strukturen (Abb. 3.25A, links). In B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen hingegen fehlten diese Strukturen gänzlich. LYVE-1⁺ Zellen konnten zwar im Matrigelimplantat nachgewiesen werden und koexprimierten CD11b, aber sie gruppierten sich nicht und formten keine gefäßähnlichen Strukturen (Abb. 3.25A, rechts). CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in Matrigelimplantaten aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen lagen nur als Einzelzellen vor. In der Haut von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen jedoch waren intakte Lymphgefäße vorhanden (Abb. 3.25B).

CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen konnten somit in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.WT Mäusen detektiert werden. Allerdings waren nur CEACAM1⁺ Zellen in der Lage, sich zu gruppieren und gefäßartige Strukturen zu bilden. In B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen lagen die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen ausschließlich als Einzelzellen vor, die kaum Kontakte zu Nachbarzellen aufwiesen.

3.3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Matrigelimplantate

Um einen besseren Einblick in die Morphologie der in den Matrigelimplantaten vorliegenden Zellen zu bekommen, wurden Implantate aus B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen elektronenmikroskopisch analysiert. In diesen wurden Leishmanien-enthaltende Phagozyten in vergleichbarer Anzahl und vergleichbarer Leishmanienlast gefunden (Abb. 3.26A und 3.26E). Zellen in Matrigelimplantaten von B6.WT Mäusen bildeten gefäßartige Strukturen, die von Zellmembranen umschlossen wurden (Abb. 3.26B und 3.26D). Dabei wiesen die Zellen untereinander intensive Zellkontakte auf. In Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen konnten solche Strukturen nur selten gefunden werden (Abb. 3.26F und 3.26H). Oft lagen die Zellen lose aneinander und bildeten keine membranumschlossenen Lumen. Bei den elektronenmikroskopischen Analysen wurde außerdem deutlich, dass die ECM in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen häufig chaotisch vorlag. In Implantaten von B6.WT Mäusen war das Kollagen wesentlich regelmäßiger in gebündelten Strukturen angeordnet. Schließlich zeigten die Untersuchungen, dass in gefäßbildenden Zellen niemals Leishmanien enthalten waren.

Diese elektronenmikroskopischen Daten entsprechen den bisher dargestellten Befunden und weisen zum einen auf reduzierte Zell-Zell-Kontakte und gestörte Zell-Zell-Interaktionen von Zellen, die kein CEACAM1 exprimieren. Zum anderen ist die ECM in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen strukturell verändert zur ECM in Implantaten von B6.WT Mäusen.

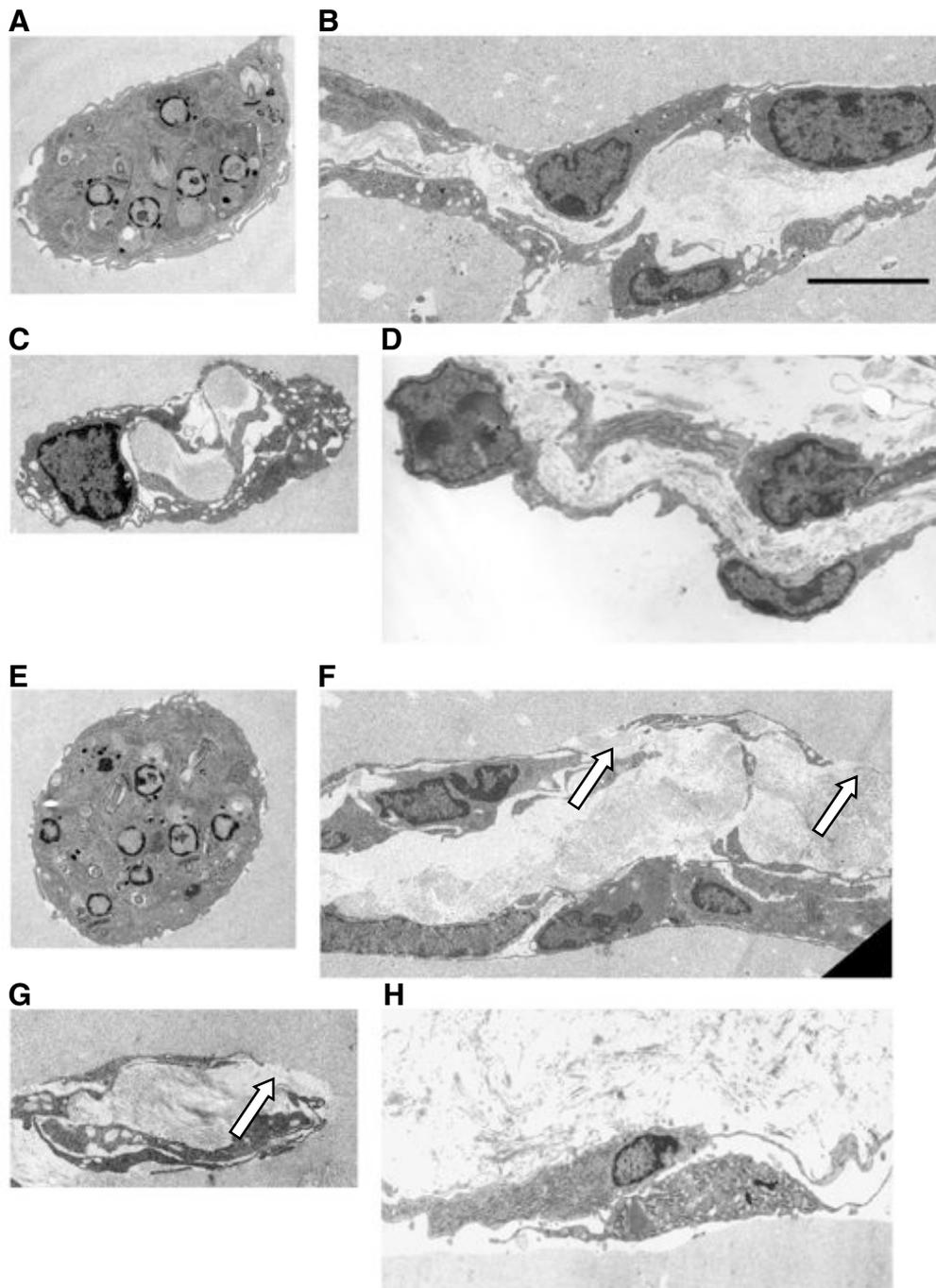


Abb. 3.26 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Matrigelimplantaten aus B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. Matrigelimplantate wurden nach einer Woche aus B6.WT (A bis D) und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen isoliert und für elektronenmikroskopische Analysen aufgearbeitet. (A und E) In Implantaten beider Mäuse lagen *L. major* infizierte Phagozyten vor. (B bis D) Matrigelimplantate von B6.WT Mäusen enthielten Zellen, die membranumschlossene gefäßartige Strukturen ausbildeten. (F bis H) In Implantaten von B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen waren solche Strukturen nur selten zu finden und nicht kontinuierlich von Membranen umgeben (Pfeile) oder lagen ohne größere Zellkontakte aneinander. Auffällig war die relativ unstrukturierte ECM in Implantaten von B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. Außerdem beinhalteten Zellen, die gefäßartige Strukturen bildeten, keine Leishmanien. Diese Analyse wurde zweimal mit insgesamt zwei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Scala 5 μm . (D und H) wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Horst, UKE, Hamburg zur Verfügung gestellt.

3.3.4 Plastisches Potential inflammatorischer Zellen von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass ein Fehlen von CEACAM1 auf inflammatorischen Zellen zu einer veränderten Morphologie führte. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob die Fähigkeit, gefäßähnliche Strukturen auszubilden, mit der Expression von CEACAM1 korreliert. Dazu wurden Zellen nach sieben Tagen aus Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen isoliert. Diese inflammatorischen Zellen wurden anschließend auf Matrigel beschichteten Objektträgern in basalem Endothelzellmedium für zwei Tage kultiviert. Die mikroskopische Auswertung ergab, dass sowohl Zellen aus B6.WT als auch aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen aggregierten und sich zu röhrenähnlichen Strukturen gruppierten (Abb. 3.27A).

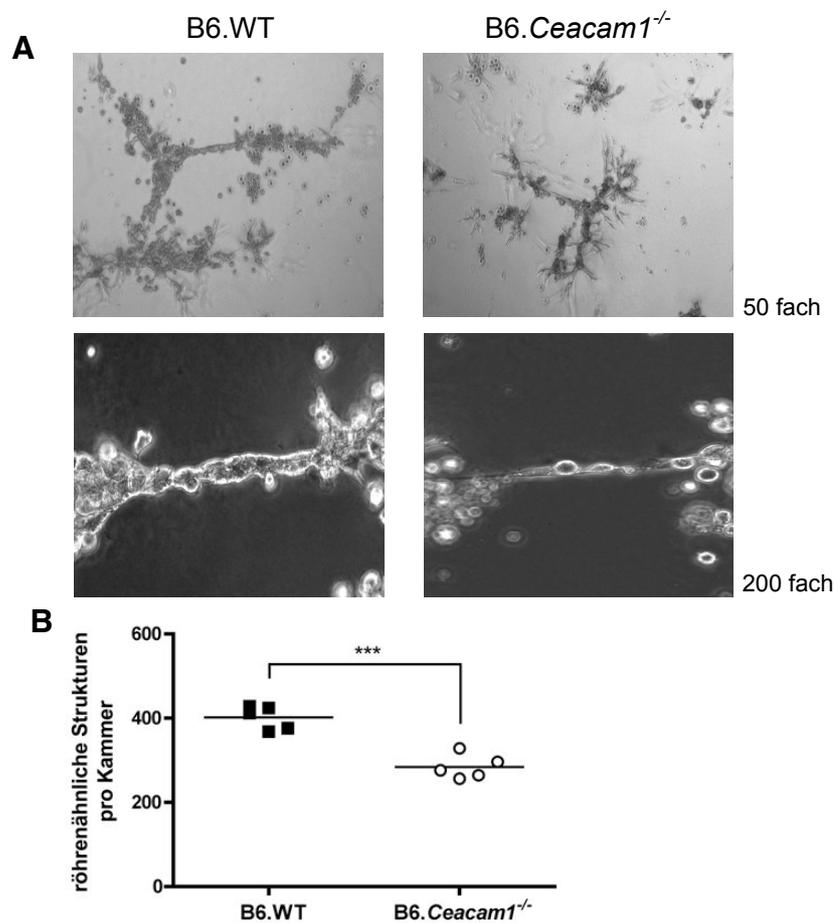


Abb. 3.27 Vergleich der Plastizität inflammatorischer Zellen von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Nach einer Woche wurden die Zellen aus Leishmanien-enthaltenden Matrigelimplantaten von B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen isoliert und für zwei Tage auf Matrigel beschichteten Objektträgern in Endothelzellmedium kultiviert. (A) Inflammatorische Zellen aus B6.WT Mäusen bildeten größere Zellaggregate und Netzwerke verglichen mit Zellen aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. (B) Anzahl der röhrenähnlichen Strukturen pro Kammer auf einem Objektträger dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Die Daten stammen aus einem Versuch und repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. ***p < 0,001.

Allerdings zeigte sich, dass die Zellen von B6.WT Mäusen deutlich mehr und wesentlich größere Zellaggregate bildeten. Die einzelnen röhrenartigen Strukturen waren zudem ausgeprägter und verzweigter. Eine statistische Auswertung der Anzahl der gefäßähnlichen Strukturen pro Kammer eines 4-Kammern-Objekträgers bestätigte, dass mit $401,6 \pm 12,43$ röhrenähnliche Strukturen bei Zellen aus Matrigelimplantaten von B6.WT Mäusen und mit $284,0 \pm 12,90$ Strukturen bei Zellen von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen die Anzahl signifikant reduziert war (Abb. 3.27B). Somit bestätigte sich die Vermutung, dass inflammatorische Zellen von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen ein verringertes morphologisches Potential besitzen.

Zusammenfassend zeigte sich in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen ein Defekt in der Lymphgefäßneubildung unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro*. Zellen dieser Mäuse wiesen zudem eine unzureichende Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, veränderte extrazelluläre Matrix in Matrigelimplantaten und eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung röhrenähnlicher Strukturen auf.

3.4 Lymphgefäßneubildung bei chimären Mäusen

Die bisher gezeigten Daten weisen darauf hin, dass die fehlende CEACAM1-Expression auf hämatopoetischen CD11b⁺ Zellen die Defekte bei B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen verursachen könnte. In diesem Fall sollte es durch den Transfer von CEACAM1⁺ Knochenmark aus B6.WT Mäusen in bestrahlte B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse möglich sein, die unter inflammatorischen Bedingungen inhibierte Gefäßneubildung wieder zu induzieren. Andererseits müsste der Transfer von CEACAM1⁻ Knochenmark aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen in bestrahlte B6.WT Mäuse die Neovaskularisierung während der Leishmaniose deutlich reduzieren.

3.4.1 Transfer von Knochenmark aus B6.WT Mäusen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse

Durch die Rekonstitution bestrahlter B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse mit Knochenmark aus B6.WT Mäusen soll die verstärkte Pathologie nach Infektion mit *L. major* aufgehoben und die Fähigkeit, neue Lymphgefäße zu bilden, induziert werden. Die so generierten B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-}

Mäuse sollten also dem Phänotyp von B6.WT Mäusen entsprechen. Um Donor- und Rezipientenzellen unterscheiden zu können, wurde das bereits etablierte kongene Markersystem verwendet, in welchem die Donorzellen die Isoform CD45.1 und die Zellen des Rezipienten die Isoform CD45.2 exprimierten (vgl. Kapitel 3.2). Der erfolgreiche Knochenmarkstransfer wurde nach acht Wochen mittels FACS-Analysen des peripheren Blutes kontrolliert (vgl. Kapitel 2.2.3.4, Abb. 2.4). B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse dienten in den folgenden Experimenten als Kontrollen.

3.4.1.1 Gefäßneubildung in B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse *in vivo*

B6.WT, B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse wurden mit *L. major* infiziert und nach drei Wochen histologisch analysiert. In einer H&E-Färbung wurde deutlich, dass das Infiltrat von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen 21 Tage nach Infektion mit *L. major* wesentlich strukturierter und kompakter war als in infizierten Pfoten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen (Abb. 3.28A). Eine Ödembildung war hier nicht mehr zu erkennen. Damit entsprach die Morphologie derjenigen der B6.WT Mäuse.

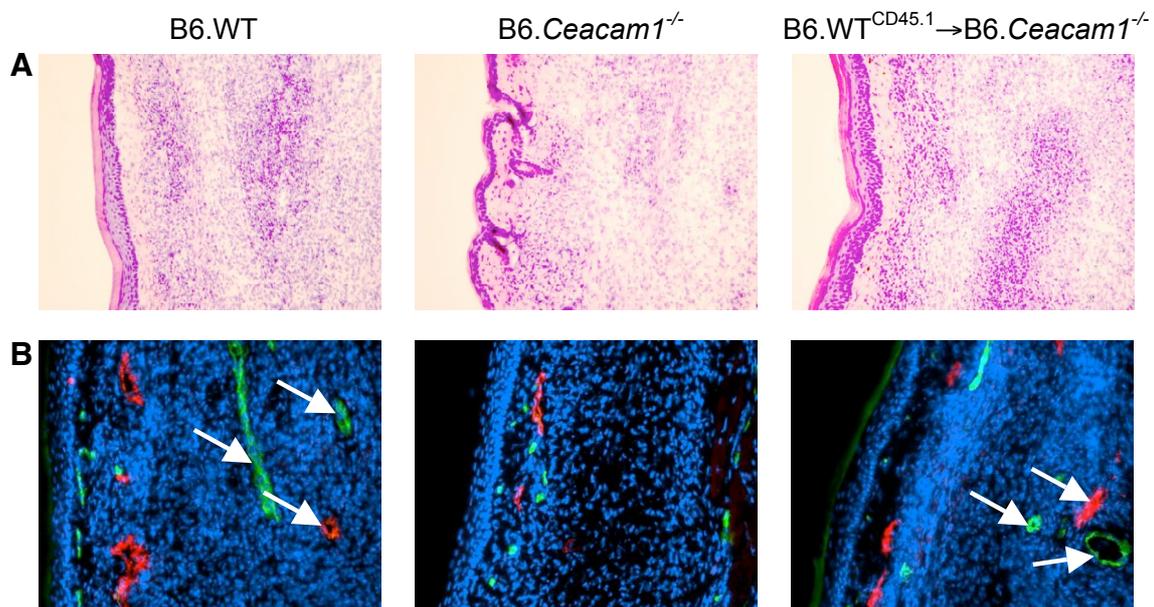


Abb. 3.28 Morphologie und Vaskularisierung des Infiltrats in infizierten Mauspfoten von B6.WT, B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Die verschiedenen Mausgruppen wurden mit *L. major* infiziert und die Mauspfoten nach drei Wochen histologisch analysiert. (A) H&E-Übersichtsfärbung der jeweiligen infizierten Pfoten. (B) Lymphgefäße (LYVE-1⁺, rot) und Blutgefäße (MECA-32⁺, grün) wurden in den Schnitten visualisiert und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Gefäße im Infiltrat wurden durch Pfeile markiert. Dieser Versuch wurde einmal mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Mittels anti-LYVE-1 und anti-MECA-32 Antikörper wurden Lymph- und Blutgefäße in Gefrierschnitten angefärbt. Wie bereits beschrieben (Kapitel 3.3.1.3, Abb. 3.22), konnte bei B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse keine Vaskularisierung in infizierten Pfoten detektiert werden (Abb. 3.28B). Durch den Transfer von CECAM1⁺ Knochenmark kam es zu einer deutlichen Ausbildung von Lymph- und Blutgefäßen im Infiltrat analog zur Situation in B6.WT Kontrollmäusen.

Somit konnte durch den Transfer von CECAM1⁺ Knochenmark aus B6.WT Mäusen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse die defekte Neovaskularisierung wieder induziert und gleichzeitig die Ödembildung verhindert werden.

3.4.1.2 CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Monozyten im Blut von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen

Während der Infektion mit *L. major* war die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut, die CD11b^{high}/Ly-6C^{high} exprimierten, in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen signifikant gegenüber B6.WT Mäusen reduziert (vgl. Kapitel 3.3.2, Abb. 3.23). Eine Analyse dieser Zellen im Blut von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen 21 Tage nach Infektion zeigte, dass diese Population wieder vollständig hergestellt wurde. Während im peripheren Blut von B6.WT Mäusen $14,31 \pm 2,81$ % der Leukozyten CD11b^{high}/Ly-6C^{high} waren, konnten in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nur $7,21 \pm 0,84$ % nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Diese signifikante Dezimierung der Vorläuferzellen konnte durch den Transfer von CECAM1⁺ Knochenmark aus B6.WT Mäusen aufgehoben werden, so dass in B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen drei Wochen nach Infektion mit *L. major* entsprechend den B6.WT Mäusen $15,55 \pm 3,18$ % Vorläuferzellen im peripheren Blut detektiert wurden.

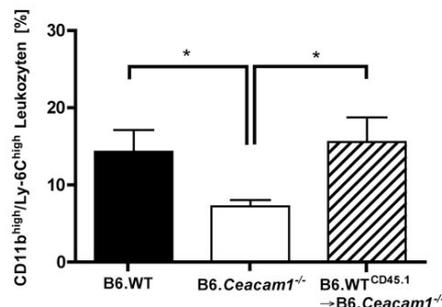


Abb. 3.29 CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Zellen im peripheren Blut von B6.WT, B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. 21 Tage nach Infektion mit *L. major* wurde der prozentuale Anteil CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Zellen im Blut mittels FACS-Analysen bestimmt. Dabei fanden sich im Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen signifikant weniger Zellen als im Blut von B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus einem Versuch mit 3 Mäusen pro Gruppe.

3.4.1.3 LYVE-1⁺ Zellen in Matrigelimplantaten von B6.WT^{CD45.1}→B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen

Um die Neovaskularisierung in den knochenmarkstransferierten B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen näher zu untersuchen, wurde der Matrigelimplantationsversuch durchgeführt. Einzelzellanalysen mittels FACS ergaben, dass die Gesamtzellzahl, die Anzahl der CD11b⁺ und die Anzahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen deutlich, aber nicht signifikant gegenüber B6.WT Mäusen erhöht war (Abb. 3.30A und 3.30B). Dieser Befund wurde bereits früher beschrieben (Kapitel 3.3.3.1, Abb. 3.24). Bei B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen, die Knochenmark von B6.WT Mäusen erhalten haben, zeigte sich in allen Fällen ein intermediärer Effekt, wobei der Anteil der CD11b⁺ Zellen an der Gesamtzellpopulation immer konstant blieb (B6.WT: 85,12 %, B6.Ceacam1^{-/-} 86,07 %, B6.WT^{CD45.1}→B6.Ceacam1^{-/-} 84,42 %). Zusätzlich wurde die CD45-Expression der LYVE-1⁺ Zellen untersucht. Erneut waren alle LYVE-1⁺ Zellen aus Matrigelimplantaten positiv für CD45, wobei LYVE-1⁺ Zellen aus B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen CD45.2 exprimierten, während 97,63 % der LYVE-1⁺ Zellen aus Implantaten der B6.WT^{CD45.1}→B6.Ceacam1^{-/-} Mäuse positiv für den Donormarker CD45.1 und nur 2,37 % für den Rezipientenmarker CD45.2 waren (Abb. 3.30C).

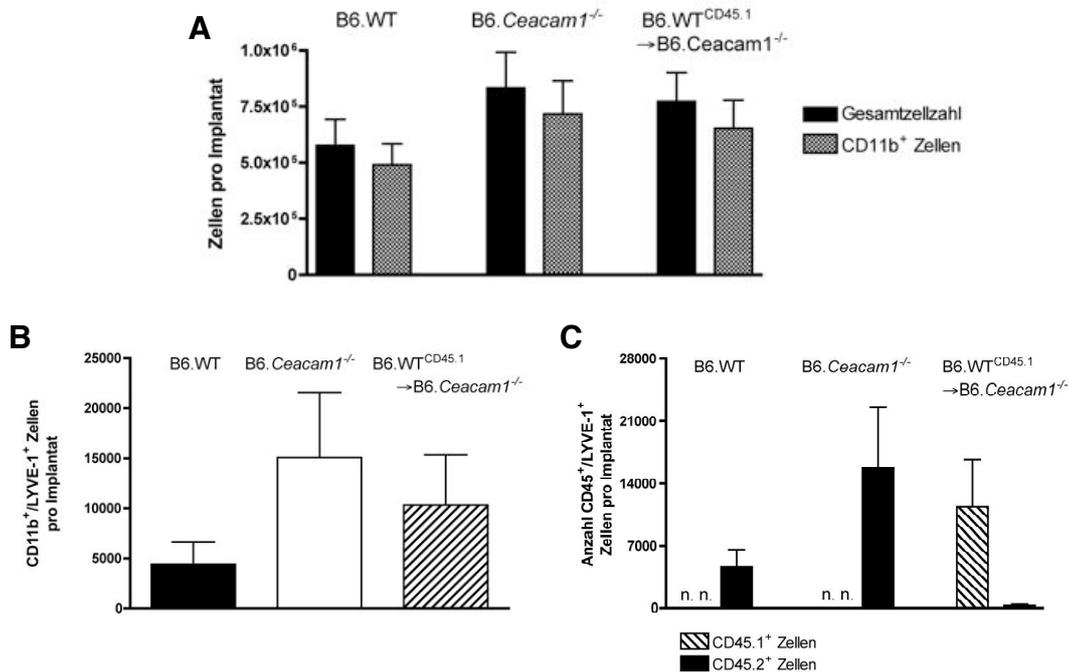


Abb. 3.30 Zellpopulationen im Matrigelimplantat aus B6.WT, B6.Ceacam1^{-/-} und B6.WT^{CD45.1}→B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. Leishmanien-enthaltendes Matrigel wurde den verschiedenen Mausgruppen implantiert, nach einer Woche isoliert und die Zellen mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen und die Anzahl CD11b⁺ Zellen (A) und die Anzahl CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen (B) pro Implantat. (C) Zusätzlich wurde die CD45-Isoform der LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat der jeweiligen Mäuse bestimmt. Die Daten stammen aus zwei Versuchen mit insgesamt sechs Mäusen pro Gruppe. n. n.: nicht nachweisbar.

Diese Daten bestätigten noch einmal die Ergebnisse der Versuche mit den B6.WT^{CD45.1}→B6.WT Mäusen, wonach die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen, die im Matrigelimplantat lymphgefäß-ähnliche Strukturen bildeten zu 100 % von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammten (vgl. Kapitel 3.2.2).

Weiterhin wurde in histologischen Untersuchungen die Morphologie der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in Matrigelimplantaten von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen untersucht. Wie bereits beschrieben formten diese Zellen in Implantaten von B6.WT Mäusen gefäßartige Strukturen, während sie sich in Implantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nicht gruppieren und nur als Einzelzellen vorlagen (vgl. Kapitel 3.3.3.2, Abb. 3.25). In Matrigelimplantaten von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zeigte sich, dass die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen sich wieder zu größeren Aggregaten zusammenlagerten und gefäßartige Strukturen ausbildeten (Abb. 3.31). Diese ähnelten stark den Strukturen in Matrigelimplantaten von B6.WT Tieren.

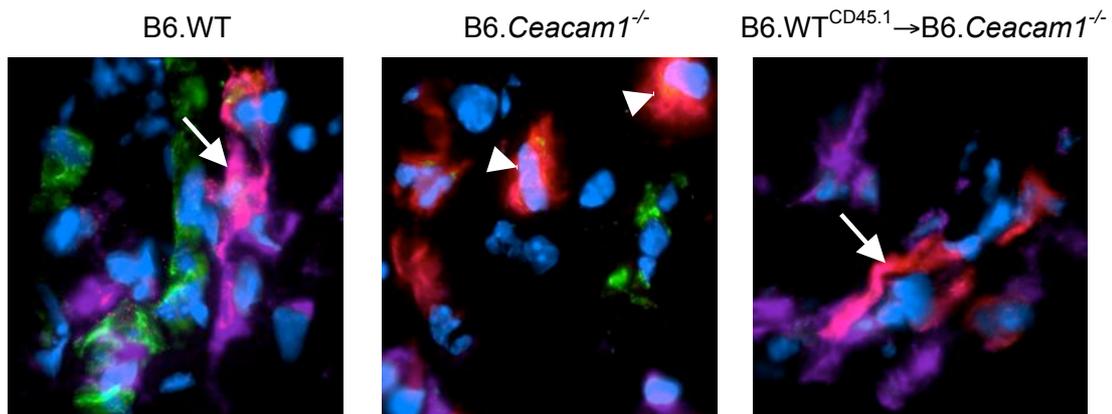


Abb. 3.31 Gefäßartige Strukturen in Implantaten von B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Lymphgefäße (LYVE-1⁺, rot) und Blutgefäße (MECA-32⁺, grün) wurden in Matrigelimplantaten aus den jeweiligen Mäusen visualisiert. Zusätzlich erscheinen CD11b⁺ Zellen lila. Während in Matrigelimplantaten von B6.WT und B6.WT^{CD45.1}→B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen CD11b⁺/LYVE-1⁺, gefäßartige Strukturen zu finden sind (Pfeile), liegen LYVE-1⁺ Zellen in Implantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nur als Einzelzellen vor (Pfeilspitzen). Die Abbildungen in 1000 facher Vergrößerung repräsentieren die Ergebnisse eines Versuches mit drei Tieren pro Gruppe.

Somit konnte in Matrigelimplantaten aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen durch den Transfer von CEACAM1⁺ Knochenmark aus B6.WT Mäusen eine Vaskularisierung wieder induziert werden.

3.4.2 Transfer von Knochenmark aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen in B6.WT Mäuse

Durch den Transfer von CEACAM1⁺ Knochenmark in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse konnten Lymphödeme in infizierten Pfoten und inhibierte Vaskularisierung aufgehoben werden. Dass dieser Effekt allein durch hämatopoetische Zellen vermittelt wird, sollte in einem Versuch geklärt werden, in dem CEACAM1⁻ Knochenmark aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen in bestrahlte B6.WT Mäuse übertragen wurde (Generierung und Kontrolle der Mäuse vgl. Kapitel 2.2.3.4, Abb. 2.4). B6.WT und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse dienten wiederum als Kontrollen.

Zum einen wurden B6.*Ceacam1*^{-/-}→B6.WT Mäuse mit *L. major* infiziert und die Pfoten nach drei Wochen für histologische Analysen aufgearbeitet. Andererseits wurde auch diesen Tieren Leishmanien-enthaltendes Matrigel subkutan implantiert, nach einer Woche isoliert und histologisch analysiert (Abb. 3.32).

Dabei zeigte sich, dass nach Infektion mit *L. major* das Infiltrat in den Pfoten der B6.*Ceacam1*^{-/-}→B6.WT Mäuse ebenso locker angeordnet war wie in den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen und es gleichfalls zur Ödembildung kam (Abb. 3.32A). Immunfluoreszenzanalysen, bei denen Lymph- und Blutgefäße in infizierten Mauspfoten visualisiert wurden, bestätigten, dass im Infiltrat der B6.*Ceacam1*^{-/-}→B6.WT Mäuse keine Lymphgefäße vorhanden waren (Abb. 3.32B).

Schließlich wurde auch der Matrigelimplantationsversuch durchgeführt. Während im Implantat aus B6.WT Mäusen LYVE-1⁺ Zellen gefäßartige Strukturen bildeten, waren diese in Matrigelimplantaten aus B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.*Ceacam1*^{-/-}→B6.WT Mäuse nicht zu finden (Abb. 3.32C). Hier lagen CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen nur vereinzelt vor und bildeten keine Aggregate.

Zusammenfassend demonstrierte dieser Versuch, dass der Phänotyp der B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse durch den Transfer von Knochenmark in B6.WT Mäuse induziert werden konnte. Dabei war sowohl die Lymphgefäßneubildung *in vivo* während der Leishmaniose als auch *in vitro* im Matrigelimplantationsversuch im Vergleich zu B6.WT Mäusen inhibiert.

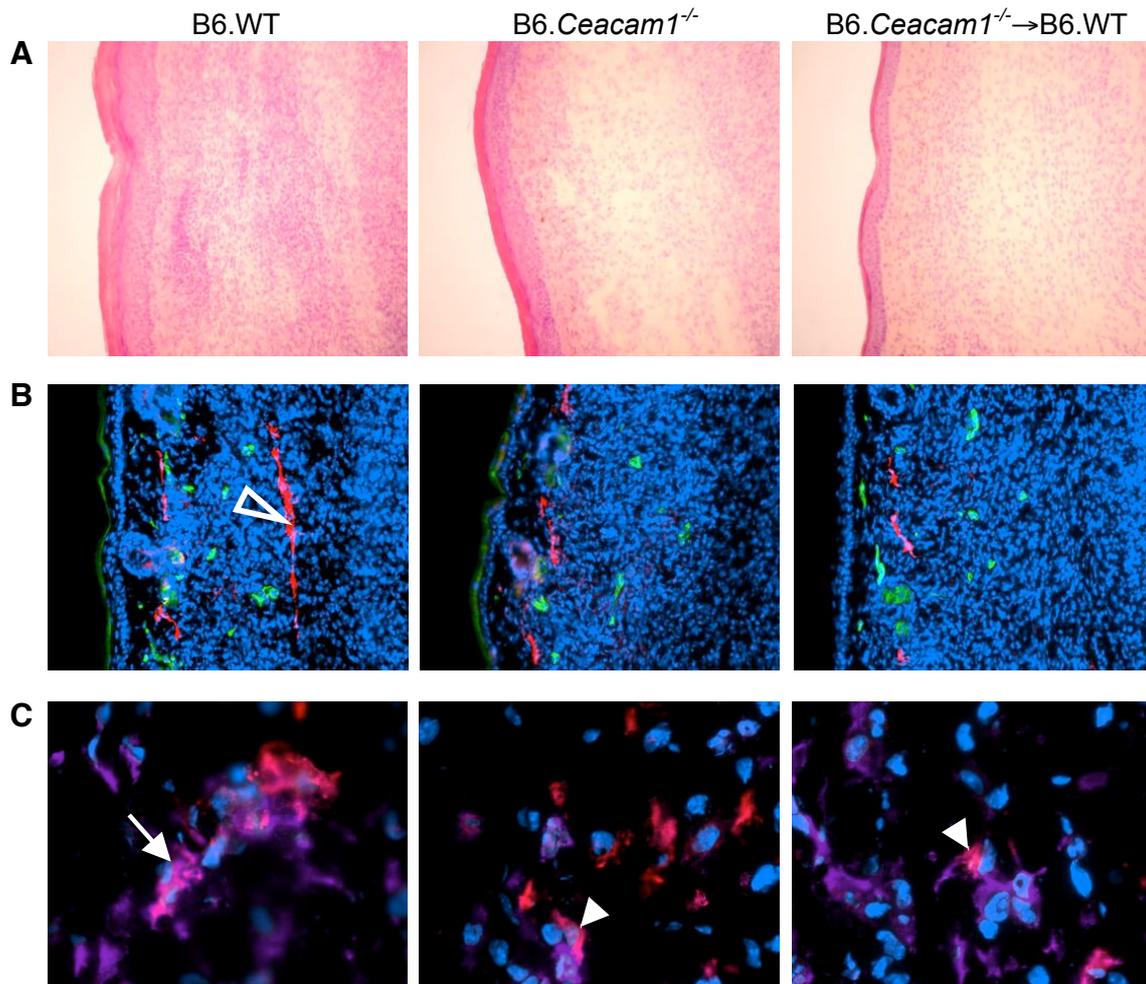


Abb. 3.32 Histologische Analysen von infizierten Mauspfoten und Matrigelimplantaten von B6.WT, B6.Ceacam1^{-/-} und B6.Ceacam1^{-/-}→B6.WT Mäusen. (A und B) Die verschiedenen Mausgruppen wurden mit *L major* infiziert und die Pfoten am Tag 21 histologisch analysiert. (A) In H&E-Färbungen zeigte sich ein kompaktes Infiltrat in infizierten Pfoten von B6.WT Mäusen, während dies in B6.Ceacam1^{-/-} und B6.Ceacam1^{-/-}→B6.WT Mäusen viel lockerer war, und es bei diesen Mäusen zur Ödembildung kam. (B) Der Nachweis von Lymphgefäßen (LYVE-1⁺, rot) und Blutgefäßen (MECA-32⁺, grün) bestätigte, dass Lymphgefäße nur im Infiltrat von B6.WT Mäusen (offene Pfeilspitze) vorhanden waren, jedoch in B6.Ceacam1^{-/-} und B6.Ceacam1^{-/-}→B6.WT Mäusen fehlten. (C) In Matrigelimplantaten aus B6.WT Mäusen bildeten LYVE-1⁺ Zellen (rot), die gleichzeitig CD11b exprimierten (lila), gefäßartige Strukturen (Pfeil), während diese Zellen in Implantaten von B6.Ceacam1^{-/-} und B6.Ceacam1^{-/-}→B6.WT Mäusen nur als Einzelzellen vorlagen (Pfeilspitze). Die Daten sind repräsentativ für einen Versuch mit je zwei Mäusen pro Gruppe.

4 Diskussion

Die Mechanismen der adaptiven Immunantwort gegen Leishmanien sind weitgehend bekannt (Alexander *et al.*, 1999; Sacks und Noben-Trauth, 2002; Von Stebut, 2007). Ob es allerdings unter den inflammatorischen Bedingungen der kutanen Leishmaniose zu einer Neovaskularisierung des Infiltrats kommt und welche Faktoren dabei beteiligt sind, wurde bislang nicht untersucht und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Neovaskularisierung und im Speziellen der Prozess der Lymphgefäßneubildung ist trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren noch nicht aufgeklärt. Vor allem ist umstritten, ob es spezifische Vorläuferzellen für LECs gibt und welche Bedeutung monozytären Zellen dabei zukommt (Karpanen und Alitalo, 2008; Schatteman *et al.*, 2006).

BECs und LECs haben viele Gemeinsamkeiten. Funktionell kleiden sie Gefäße für den Transport von Zellen und extrazellulärer Flüssigkeit aus. Aber auch ihr genetisches Programm ist sehr ähnlich. Genexpressionsanalysen kultivierter Endothelzelllinien haben ergeben, dass 98 % der exprimierten Gene in BECs und LECs identisch sind. Außerdem befinden sich Endothelzellen unter homöostatischen Bedingungen in einem ruhenden Zustand mit einer sehr geringen Teilungsrate, bei der sich nur 1 von 10000 Zellen zu einem Zeitpunkt im Zellzyklus befindet (Hanahan und Folkman, 1996).

Zusätzlich gibt es eine enge Verbindung zwischen der Bildung neuer Blut- und Lymphgefäße (Cao *et al.*, 1998; Jussila und Alitalo, 2002; Oliver und Detmar, 2002). Neben wenigen hormoninduzierten Prozessen wie der Eizellreifung, dem Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut, bei Schwangerschaft und Laktation, in denen es zur Hämangiogenese kommt (Nicosia *et al.*, 2006), tritt Gefäßwachstum im adulten Organismus vor allem unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen, Tumorerkrankungen, Hautverletzungen oder Hypoxie auf (Karpanen und Alitalo, 2008).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Gefäßwachstum *in vivo* am Beispiel einer Infektion mit dem Parasiten *L. major* als inflammatorischen Stimulus und *in vitro* anhand von Matrigelimplantaten untersucht.

4.1 Bedeutung LYVE-1⁺ Zellen bei der Gefäßbildung in Leishmanien-infizierten Mauspfoten und Matrigelimplantaten

Histologische Analysen von Leishmanien-infizierten Pfoten resistenter B6.WT Mäuse zeigten, dass innerhalb des Infiltrats Blut- und Lymphgefäße existierten. Da diese Gefäße in der naiven Pfote in einer solchen Anzahl nicht vorlagen, musste es zu einer Neubildung gekommen sein. Genauere Analysen der infiltrierenden Zellen zeigten, dass es sich hierbei vor allem um monozytäre CD45⁺/CD11b⁺ Zellen handelte. Dies war zu erwarten, da phagozytierende Zellen wie Granulozyten und Makrophagen, die diese Marker exprimieren, eine wichtige Rolle in der Beseitigung der Leishmanien spielen (Sacks und Noben-Trauth, 2002). Ebenso wurde gezeigt, dass Hypoxie und Entzündungen, die beiden Hauptinduktoren für Blut- bzw. Lymphgefäßwachstum, mit der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, insbesondere Makrophagen, einhergehen (Maruyama *et al.*, 2007; Maruyama *et al.*, 2005; Venneri *et al.*, 2007).

In Leishmanien-infizierten Mauspfoten konnten zwei unterschiedliche LYVE-1⁺ Populationen identifiziert werden. Dabei handelte es sich zum einen um LYVE-1⁺/CD45⁻ Zellen und zum anderen um LYVE-1⁺/CD45⁺/CD11b⁺ Zellen. Erstere entsprechen den normalen LECs in der Haut, von denen bekannt ist, dass sie den hämatopoetischen Marker CD45 im adulten Organismus nicht exprimieren (Kriehuber *et al.*, 2001). Die zweite Population ähnelt den kürzlich beschriebenen LYVE-1⁺ Makrophagen, die unter inflammatorischen Bedingungen in Geweben identifiziert wurden (Cho *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2008; Schledzewski *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007).

Da eine weitergehende Analyse dieser Zellen in infizierten Pfoten aus praktischen Gründen unmöglich war, wurden Matrigelimplantationsversuche mit Leishmanien durchgeführt. Dabei zeigten histologische Analysen, dass es auch in den Matrigelimplantaten, analog zu der Situation in infizierten Mauspfoten, zur Neubildung lymphgefäß-ähnlicher Strukturen kam. Einzelzellanalysen der in den Implantaten vorliegenden Zellen zeigten, dass erstaunlicherweise 100 % der LYVE-1⁺ Zellen in diesem System positiv für CD45 und CD11b waren. Dies bedeutete, dass in den Matrigelimplantaten noch keine „normalen“ Lymphgefäße nach der bisherigen Definition vorlagen, da sie diese Marker nicht exprimieren (Kriehuber *et al.*, 2001). Weitere FACS-Analysen dieser LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat schlossen aus, dass es sich um Granulozyten, DCs oder NK-Zellen handelte, die ebenfalls CD11b auf ihrer Oberfläche besitzen (Manzo, 1998; Nikolic *et al.*, 2003; Terstappen *et al.*, 1990). Vielmehr zeigte der Nachweis des

Markers F4/80, bei gleichzeitiger Abwesenheit von Ly-6C, auf den Zellen, dass es sich auch nicht mehr um Monozyten, sondern um LYVE-1⁺ Makrophagen handelte, da reife Monozyten die Expression von Ly-6C herunterregulieren und Makrophagen im Gewebe F4/80⁺ sind (Sunderkötter *et al.*, 2004).

Ein weiterer Beleg dafür, dass diese CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen einer Subpopulation von Makrophagen zuzuordnen sind, ist, dass etwa die Hälfte dieser Zellen positiv mit dem anti-*L. major* Antikörper detektiert wurden. Dies bedeutet, dass diese Zellen entweder von Leishmanien infiziert worden waren oder dass sie Leishmanienantigen von abgetöteten Parasiten beherbergten. Da Makrophagen die eigentlichen Wirtszellen der Leishmanien darstellen (Sacks und Noben-Trauth, 2002; Von Stebut, 2007) und gleichfalls durch Phagozytose Gewebe von Fremdanigenen befreien (Johnston, 1988; Underhill und Ozinsky, 2002), weist alles darauf hin, dass diese Zellen dem Phänotyp ausdifferenzierter Gewebemakrophagen entsprechen.

Wie bereits erwähnt, zeigten histologische Untersuchungen der Matrigelimplantate, dass die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen nicht nur als Einzelzellen vorlagen, sondern sich auch zu größeren Zellaggregaten formierten und dabei anastomisierende Strukturen bildeten (vgl. Abb. 3.14). Morphologisch ähnelten diese gefäßartigen Gebilde den ebenfalls in den Matrigelimplantaten auftretenden neu gebildeten Blutgefäßen. Sowohl die Strukturen im Matrigelimplantat als auch die Blut- und Lymphgefäße in der Haut befanden sich in enger Nachbarschaft zueinander. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Strukturen im Matrigel Vorläufer lymphatischer Gefäße sind und dass die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen an der Bildung neuer Lymphgefäße aktiv beteiligt sind.

Die Rolle von CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen bei der Neubildung von lymphatischen Gefäßen wird derzeit kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten wurde postuliert, dass diese Zellen als LYVE-1⁺ Makrophagen nur in enger räumlicher Nähe zu LECs zu finden sind und das Wachstum neuer Lymphgefäße dadurch beeinflussen, dass sie durch die Produktion des lymphangiogenen Faktors VEGF-C existierende LECs zur Proliferation anregen (Cho *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2008; Karpanen und Alitalo, 2008; Kerjaschki, 2005). Ein Einbau dieser LYVE-1⁺ Makrophagen in neue Gefäße wurde dabei explizit ausgeschlossen (He *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2008; Schledzewski *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu und analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie wurde in zwei Arbeiten eindeutig gezeigt, dass es bei neu gebildeten Lymphgefäßen in der Hornhaut von Mäusen zum Einbau CD11b⁺ hämatopoetischer Zellen kam (Maruyama *et al.*, 2005; Religa *et al.*, 2005). Somit können diese CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen anscheinend auf zwei

unterschiedlichen Weisen, der Produktion lymphangiogener Faktoren oder dem direkten Einbau, Lymphgefäßneubildung fördern (Kerjaschki, 2005).

Diese zweigeteilte Funktion der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen spiegelt die Morphologie dieser Zellen in den Matrigelimplantaten wieder. Zum einen lagen diese als Einzelzellen, zum anderen als anastomisierende Strukturen vor. Detaillierte elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Leishmanien nur in einzelnen Phagozyten im Matrigelimplantat und niemals in gefäßartigen Strukturen gefunden wurden. Somit können LYVE-1⁺ Makrophagen als Einzelzellen Leishmanien oder Leishmanienantigen aufnehmen. Beteiligen sie sich jedoch an der Neubildung von Gefäßen, so sind sie immer negativ für Leishmanien, was für einen spezialisierteren Phänotyp spricht.

Da im Blut keine CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht dargestellt), ist es wahrscheinlich, dass die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes generiert wurden und sich erst im Gewebe weiter differenzierten. Inwieweit diese beiden phänotypisch sehr ähnlichen Populationen zusammenhängen, bleibt unklar. Zum einen könnten sich beide Populationen getrennt aus Monozyten entwickeln. Denkbar wäre aber auch, dass die LYVE-1⁺ Makrophagen allgemein Vorläufer für lymphendotheliale Zellen darstellen. In diesem zweiten Fall wäre davon auszugehen, dass diese Makrophagen noch eine hohe phagozytotische Aktivität besitzen, obwohl sie LYVE-1 schon exprimierten. LYVE-1, der als der früheste lymphatische Marker in der embryonalen Entwicklung gilt (Alitalo *et al.*, 2005; Oliver, 2004), hat keine Funktion in der Entstehung lymphatischer Gefäße unter homöostatischen Bedingungen, da Mäuse, die LYVE-1 nicht exprimieren, morphologisch unauffällige und funktionsfähige Lymphgefäße besitzen (Gale *et al.*, 2007). Somit dürfte die alleinige Expression von LYVE-1 die Aktivität dieser Makrophagen nicht weiter inhibieren. Erst eine weitere Spezialisierung dieser Zellen, die sich in der Gefäßbildung äußert, verhindert die Phagozytose von Leishmanien. Auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass eine Infektion mit den Leishmanien die Weiterentwicklung der LYVE-1⁺ Makrophagen in LECs blockiert. Von Leishmanien ist bekannt, dass sie zumindest intrazelluläre Differenzierungsmechanismen beeinflussen können. So verzögern sie nach der Infektion von Makrophagen die Reifung des Phagosoms, in dem sie erst zu amastigoten Leishmanien transformieren müssen, durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (Duclos und Desjardins, 2000). Somit erscheint eine Unterteilung der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in LYVE-1⁺ Makrophagen und lymphatische Vorläuferzellen sinnvoll, auch wenn sie im Rahmen dieser Arbeit nicht durch die Expression unterschiedlicher Marker definiert werden konnten.

Zusammenfassend wurde dargelegt, dass es zwei unterschiedliche CD11b⁺/LYVE-1⁺ Populationen geben muss. Während die eine morphologisch und funktionell dem Phänotyp von Makrophagen entspricht, die Phagozytose betreiben und als Einzelzellen vorliegen, hat die andere das Potential, lymphgefäß-ähnliche Strukturen zu bilden, und weist keine phagozytotische Aktivität mehr auf. Wie diese beiden Populationen jedoch von ihrer Entwicklung her zusammenhängen und wie sie sich durch Marker von einander unterscheiden lassen, bleibt unklar.

4.2 Bewertung von Vorläuferzellen bei der Gefäßbildung

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen gefäßartige Strukturen bilden und somit als Vorläuferzellen für LECs bei der Formierung neuer lymphatischer Gefäße unter inflammatorischen Bedingungen dienen können. Dieser Nachweis gelang jedoch nur in Matrigelimplantaten und nicht im Mausmodell *in vivo*.

Ähnlich schwierig war es, die Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen bei der Neubildung von Blutgefäßen zu beweisen. Vor zehn Jahren wurden endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) erstmals beschrieben (Asahara *et al.*, 1997). Zuvor ging man davon aus, dass Hämangioblasten nur im Embryo existieren und Gefäßwachstum nur durch Proliferation bereits existierender BECs stattfindet (Tomanek und Schatteman, 2000). Mittlerweile wurde in verschiedenen Modellen (Tumorerkrankung, Hypoxie) gezeigt, dass hämatopoetische Zellen in neue Blutgefäße integrieren und dabei bis zu 30 % der Endothelzellen in den neuen Blutgefäßen ausmachen (Asahara *et al.*, 1999; Ruzinova *et al.*, 2003). Neben diesen EPCs, die im Blut zirkulieren, gibt es immer mehr Hinweise, dass auch im adulten Organismus Hämangioblasten im Knochenmark existieren (Bailey *et al.*, 2006; Peichev *et al.*, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002). Diese exprimieren in der Maus CD117, Sca-1, CD34, VEGFR-2 und CXCR4, während sie im Menschen durch die Expression von CD133, CD34, VEGFR-2 und CXCR4 charakterisiert sind (Schatteman *et al.*, 2006).

Daneben werden auch zunehmend monozytäre Zellen, die CD14 und CD11b exprimieren, als Vorläuferzellen diskutiert (Fernandez-Pujol *et al.*, 2000; Garmy-Susini und Varner, 2005; Rehman *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass diese Zellen monozytäre und blutendotheliale

Marker koexprimieren und gefäßartige Strukturen ausbilden können (Fernandez-Pujol *et al.*, 2001; Schmeisser *et al.*, 2001). Allerdings ist die Rolle von Monozyten bei der Hämangiogenese bislang noch unklar. Analog zu den LYVE-1⁺ Makrophagen wurden auch hier Tie-2⁺ Monozyten vor allem in Tumormodellen identifiziert (De Palma *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2007; Venneri *et al.*, 2007), die aber eher als Modulatoren der Blutgefäßneubildung angesehen werden (Dirkx *et al.*, 2006). Durch die Produktion hämangiogener Faktoren wie VEGF-A, FGF oder Angiopoietin sollen sie vor allem Hämangiogenese induzieren, und nicht als Vorläuferzellen beim Gefäßwachstum dienen (Schatteman *et al.*, 2006).

In einem Matrigelimplantationsversuch in Mäusen, im Aufbau analog zu dem in dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass FGF in Matrigel Hämangiogenese induzierte (Murayama *et al.*, 2002). Durch den Transfer von Knochenmarkzellen, die *lacZ* unter dem Tie-2-Promotor exprimierten, wurde nachgewiesen, dass etwa 27 % der BECs von neu gebildeten Gefäßen im Matrigelimplantat von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammten. Um den Einbau hämatopoetischer Zellen in Lymphgefäße zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein kongenes Maussystem etabliert, das auf der Expression verschiedener CD45-Isoformen beruht. Dass dabei blutendotheliale Vorläuferzellen nicht detektiert wurden, war zu erwarten, da einerseits zirkulierende EPCs kein CD45 exprimieren (Liu *et al.*, 2008; Timmermans *et al.*, 2007). Andererseits wurde gezeigt, dass monozytäre Zellen, die sich unter hämangiogenen Bedingungen *in vitro* innerhalb von 4 bis 6 Tagen zu Endothelzellen differenzieren, in diesem Stadium kein CD45 mehr exprimieren (Rohde *et al.*, 2006). Da die Analysen in der vorliegenden Arbeit bezüglich der Matrigelimplantate erst am Tag 7 durchgeführt wurden, wäre eine CD45-Expression möglicher monozytärer Blutendothelvorläuferzellen nicht mehr nachweisbar gewesen, da sie zu diesem Zeitpunkt schon vollständig dem Phänotyp von BECs entsprochen hätten.

Während die Existenz endothelialer Vorläuferzellen in der Hämangiogenese als allgemein anerkannt gilt, ist dies bei der Bildung neuer lymphatischer Gefäße noch umstritten. Die Proliferation existierender LECs gilt weithin als einzige Möglichkeit für lymphendotheliales Wachstum im adulten Organismus (Jeon *et al.*, 2008; Karpanen und Alitalo, 2008). Allerdings gibt es vermehrt Hinweise, dass unter bestimmten Versuchsbedingungen auch bei der Lymphgefäßneubildung Vorläuferzellen direkt beteiligt sind (Kerjaschki, 2005; Maruyama *et al.*, 2005; Religa *et al.*, 2005). So berichteten Maruyama *et al.*, dass in einem Hornhaut-Transplantationsmodell neu gebildete Lymphgefäße aus hämatopoetischen CD11b⁺ Zellen entstanden sind (Maruyama *et al.*, 2005). Religa *et al.* beschreiben ebenfalls die Integration von Zellen aus dem Knochenmark in neu gebildete Lymphgefäße in Hornhäuten und Tumoren

(Religa *et al.*, 2005). Andere Arbeiten hingegen kommen zu dem Schluss, dass inflammatorische CD11b⁺ Zellen mit LECs interagieren und durch die Produktion lymphangiogener Faktoren wie VEGF-C und VEGF-D bestehende lymphatische Gefäße zur Proliferation anregen (Jeon *et al.*, 2008; Karpanen und Alitalo, 2008; Schledzewski *et al.*, 2006). Ähnliches wurde auch für CD14⁺, VEGFR-3⁺ Tumor-assoziierte Makrophagen beschrieben, die VEGF-C und VEGF-D exprimierten und Tumorlymphangiogenese induzierten (Schoppmann *et al.*, 2006).

In *L. major*-infizierten Mauspfoten konnten mittels FACS-Analysen CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen detektiert werden. In histologischen Untersuchungen gelang jedoch kein klarer Nachweis der CD11b-Expression auf neu gebildeten lymphatischen Gefäßen. Im Matrigelimplantationsversuch hingegen waren 100 % der LYVE-1⁺ Zellen positiv für CD11b. Dies galt auch für die lymphgefäß-ähnlichen Strukturen im Implantat. Um zu untersuchen, ob diese CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark abstammten, wurde Knochenmark mit einem kongenen Marker in bestrahlte Mäuse transferiert. Bei dem Prozess der Hämangiogenese gibt es nämlich Hinweise, dass sich Progenitorzellen für neue Blutgefäße innerhalb der mehrschichtigen humanen Blutgefäße in einer „vaskulogenen Zone“ befinden und ebenfalls zum Gefäßwachstum beitragen (Zengin *et al.*, 2006). Zusätzlich sollte ausgeschlossen werden, dass diese Zellen von anderen gewebe- bzw. hautimmanenten Vorläuferzellen abstammten, da bekannt ist, dass gewebeimmanente Zellen beim Wachstum von Blutgefäßen eine dominante Rolle spielen können (Khmelewski *et al.*, 2004).

In dem kongenen System wurden B6.WT Mäuse, die die Isoform CD45.2 exprimierten, bestrahlt. Anschließend erhielten sie CD45.1⁺ Knochenmark. Somit ließ sich anhand der CD45-Expression nicht nur feststellen, ob die LYVE-1⁺ gefäßbildenden Zellen im Matrigelimplantat von gewebeimmanenten Vorläuferzellen des Rezipienten oder von Knochenmarkvorläuferzellen des Donors abstammten, sondern auch gleichzeitig ausschließen, dass existierende LECs proliferierten. Dabei ist zu erwähnen, dass gewebeimmanente Zellen im Gegensatz zu den sich schnell teilenden Knochenmarkzellen durch die Bestrahlung nicht abgetötet wurden. Mit Hilfe des kongenen Systems konnte im Matrigelimplantationsversuch eindeutig gezeigt werden, dass nicht nur die LYVE-1⁺ Makrophagen, sondern auch die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen, die lymphgefäß-ähnliche Strukturen bildeten, von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark abstammten, da sie zu fast 100 % den Donormarker CD45.1 exprimierten (vgl. Abb. 3.17). Anscheinend stellt Matrigel dabei ein spezielles System dar, da eine völlige Neubildung lymphatischer Gefäße bislang in keinem Modell gezeigt wurde. Überdies exprimierten diese Zellen auch nach sechs Wochen noch CD45 und CD11b. Dies zeigt, dass die neu gebildeten lymphgefäß-ähnlichen Strukturen im Matrigel sich nicht zu „normalen“ Lymphgefäßen

weiterentwickelten. Dabei wäre eine Herunterregulation dieser Vorläuferzellmarker im Rahmen der Gefäßreifung zu erwarten gewesen.

4.3 Gefäßreifung

Die unter Hypoxie oder Entzündung neu gebildeten Gefäße unterscheiden sich im Aufbau, ihrer Funktionalität und dem Expressionsmuster von präexistierenden Gefäßen. Stellt sich nach Beendigung einer pathologischen Störung wieder eine homöostatische Situation ein, in der ein Gleichgewicht zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren besteht, kommt es zur Ausreifung der Gefäße, die schließlich morphologisch und funktionell identisch zu präexistierenden Gefäßen sind (Hillen und Griffioen, 2007). Unter Gefäßreifung versteht man die vollständige Erlangung des endothelialen Phänotyps durch Einstellung von Proliferation, die Wiederherstellung der Dichtigkeit der Gefäße durch Ausbildung einer Basalmembran und die Anlagerung funktioneller akzessorischer Zellen (Jain, 2003; Lamouille *et al.*, 2002; Tammela *et al.*, 2007).

Bei Tumorerkrankungen kommt es durch die starke Expression von häm- und lymphangiogenen Faktoren vor allem der VEGF-Familie zur Gefäßneubildung, die für das weitere Wachsen des Tumors essentiell ist. So unterscheiden sich diese neuen Tumorblutgefäße deutlich von normalen Blutgefäßen. Zum einen geht die physiologische Gefäßordnung verloren, in der kleinere Kapillare immer von größeren Gefäßen abzweigen. Zum anderen besitzen sie oft nur eine diskontinuierliche Basalmembran, sind geweitet, gewunden, mit chaotischem und unregelmäßigem Blutfluss und bilden tote Enden (Jain, 2005; Mariotti und Maier, 2006). Da sie zusätzlich keine funktionellen akzessorischen Zellen wie Perizyten oder Muskelzellen aufweisen, handelt es sich eigentlich um unreife und dysfunktionelle Blutgefäße, die zudem teilweise löchrig sind, was zu einem Austreten von Blut führt (Mariotti und Maier, 2006; McDonald und Choyke, 2003). Analog dazu berichteten Jeon *et al.* von einer unkontrollierten Ausbildung nicht funktionsfähiger und morphologisch veränderter Lymphgefäße nach Applikation von humanen Eierstockkrebszellen in Mäusen (Jeon *et al.*, 2008). Zusätzlich zeigten sie, dass die hohen Konzentrationen angiogener Faktoren, vornehmlich der VEGF-Familie, von Tumor-assoziierten CD11b⁺ Zellen gebildet wurden. Somit müssen auch neu gebildete Lymphgefäße reifen, um eine vollständige Funktionalität zu erreichen.

Der Reifungsprozess von neu gebildeten lymphatischen Gefäßen wurde von Rutkowski *et al.* in einem Haut-Regenerationsmodell in der Maus beschrieben (Rutkowski *et al.*, 2006). Dabei wurde ein 2 mm breites Stück Haut ringsherum aus dem Schwanz einer Maus entfernt und durch Kollagen ersetzt. Einhergehend mit einer hohen Konzentration an VEGF-C akkumulierten im distalen Schwanzbereich zunächst LYVE-1⁺ Zellen, die sich zu gefäßartigen Strukturen aneinander lagerten. Diese Strukturen breiteten sich dann vom distalen zum proximalen Schwanzbereich aus. Erst nach Ausbildung eines ineinander verbundenen Netzwerkes von Lymphgefäßen kam es zur Reifung dieser Gefäße, die durch die Bildung einer diskontinuierlichen Basalmembran, visualisiert durch das Heparansulfatproteoglykan Perlecan, nachverfolgt werden konnte. Die Blutgefäßneubildung setzte zeitlich früher ein, wobei neue Gefäße von allen Seiten und insbesondere von tiefer liegenden Blutgefäßen in die Kollagenmatrix hineinwuchsen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass ein wichtiger Faktor für die Neubildung und die Reifung lymphatischer Gefäße der gerichtete Druck der extrazellulären Gewebsflüssigkeit sei (Rutkowski *et al.*, 2006).

Übertragen auf die Situation in den Matrigelimplantaten könnte dies eine Erklärung dafür sein, warum die lymphgefäß-ähnlichen Strukturen nicht zu normalen Lymphgefäßen ausreifen. Da in dem auspolymerisierten kompakten Gel nur wenige Blutgefäße zu finden waren, konnte auch nur begrenzt Flüssigkeit aus diesen austreten, so dass es kaum zu einem gerichteten extrazellulären Flüssigkeitsdruck gekommen sein dürfte. Somit verharrten diese Zellen in einem unreifen Stadium und exprimierten weiterhin CD11b und CD45. Anders ist dabei die Situation in Leishmanien-infizierten Mauspfoten zu bewerten. Durch die Entzündungsreaktion und die Produktion hämangiogener Faktoren werden Blutgefäße durchlässiger. Zusammen mit dem wachsenden Infiltrat und dem Anschwellen der Pfote dürfte es hier analog zu dem Haut-Regenerationsmodell zu einem ausreichenden Flüssigkeitsdruck gekommen sein, der die Reifung der neu gebildeten Lymphgefäße induzieren könnte.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die LYVE-1⁺ Makrophagen und die gefäßbildenden CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen im Matrigelimplantat denselben hämatopoetischen Ursprung haben, liegt die Vermutung nahe, dass die Makrophagen als Vorläuferzellen für die neu gebildeten Lymphgefäße fungieren. Zum einen wurde ein Einbau von CD11b⁺ Makrophagen in lymphatische Gefäße in einem Hornhaut-Transplantationsmodell bereits gezeigt (Maruyama *et al.*, 2005), und zum anderen besitzen Makrophagen eine sehr große morphologische Plastizität. So beschrieben Sharifi *et al.*, dass Pleiotrophin, ein hämangiogenes Chemokin, das vor allem in der Embryonalentwicklung exprimiert wird, in Makrophagen von etablierten humanen und murinen Zelllinien dazu führte, dass sie monozytäre Marker wie CD14 herunterregulierten und

statt dessen Blutendothelmarker wie Tie-2 und CD34 synthetisierten (Sharifi *et al.*, 2006). Dabei konnte ein vollständiger Übergang von Makrophagen zu funktionsfähigen BECs gezeigt werden, was einer Transdifferenzierung entspricht. Ein analoger Prozess bei der Bildung neuer Lymphgefäße in den Matrigelimplantaten erscheint somit wahrscheinlich. Ebenfalls dafür spricht, dass alle LYVE-1⁺ Zellen im Implantat, sowohl die Makrophagen als auch die gefäßbildenden CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen, den Marker F4/80 für Gewebemakrophagen exprimierten. Dies legt nahe, dass LYVE-1⁺ Makrophagen zu Endothelzellen transdifferenzieren und sich nicht direkt von Monozyten zu LECs entwickeln.

4.4 Lymphvaskulogenese

Der Prozess, wie neue Lymphgefäße gebildet werden, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Ursprünglich wurde angenommen, dass im adulten Organismus neue Lymphgefäße durch Auswachsen bestehender Gefäße entstehen, wobei LECs durch lymphangiogene Faktoren zur Proliferation angeregt werden (He *et al.*, 2004; Karpanen und Alitalo, 2008). Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass dabei in unterschiedlichem Ausmaß Vorläuferzellen eingebaut werden (Religa *et al.*, 2005; Salven *et al.*, 2003). Diese Art des Gefäßwachstums entspricht der Lymphangiogenese (Abb. 4.1A).

Die Ergebnisse aus den Matrigelimplantationsversuchen in dieser Arbeit führen jedoch zu einem anderen möglichen Mechanismus, der Lymphvaskulogenese (Abb. 4.1B). Dabei wandern CD11b⁺ Vorläuferzellen in entzündetes Gewebe, akkumulieren und bilden Zellaggregate, die dann lymphatische Marker exprimieren und *de novo* gefäßähnliche Strukturen bilden. Diese eigenständigen Strukturen wachsen dann zu existierenden Lymphgefäßen aus. Alternativ können sich diese CD11b⁺ Zellen auch direkt an existierende Lymphgefäße anlagern.

Ein solcher Prozess, wie er bei der Entstehung des Lymphsystems während der Embryonalentwicklung stattfindet (Karpanen und Alitalo, 2008; Oliver, 2004), wurde nun auch für die Lymphgefäßneubildung im adulten Tier in einem Hornhaut-Transplantationsmodell und einem Haut-Regenerationsmodell beschrieben (Maruyama *et al.*, 2005; Rutkowski *et al.*, 2006). Speziell Maruyama *et al.* identifizierten in vaskularisierten Hornhäuten mittels konfokaler Mikroskopie abgeschlossene, anastomisierende LYVE-1⁺ Strukturen, die am Gefäßwachstum beteiligt waren.

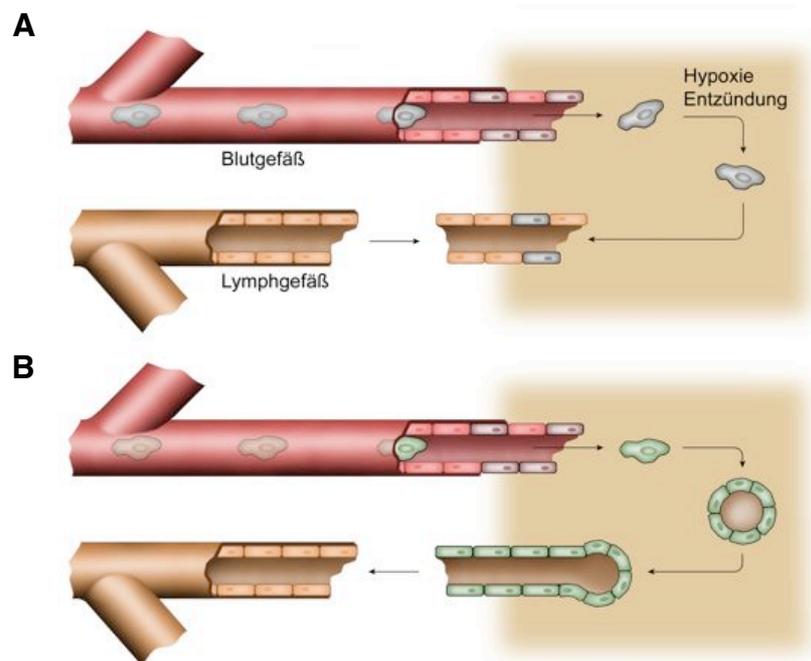


Abb. 4.1 Neubildung von Lymphgefäßen. (A) Lymphangiogenese: Durch entzündungsinduzierte lymphangiogene Faktoren kommt es zur Proliferation existierender LECs sowie dem partiellen Einbau von Vorläuferzellen. (B) Lymphvaskulogenese: $CD11b^+$ Vorläuferzellen akkumulieren im Infiltrat, aggregieren zu lumenbildenden Strukturen und exprimieren frühe lymphatische Marker (LYVE-1). Diese neuen Lymphkapillaren wachsen zu präexistierenden Lymphgefäßen und werden dadurch an das Lymphsystem angeschlossen. Unter homöostatischen Bedingungen reifen diese frühen Gefäße zu funktionellen Lymphgefäßen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass es im Matrigelimplantat zur Lymphvaskulogenese kam. Die Tatsache, dass annähernd 100 % der neu gebildeten lymphgefäßähnlichen Strukturen hämatopoetische Marker exprimierten, zeigt, dass sie von myeloiden Vorläuferzellen abstammten. Bei diesen Vorläuferzellen handelt es sich wahrscheinlich um $LYVE-1^+$ Makrophagen. Wären im Matrigelimplantat Gefäße auch durch Lymphangiogenese gewachsen, so müssten zumindest die durch Proliferation entstandenen neuen LECs negativ für die Marker $CD11b$ und $CD45$ sein.

Im Gegensatz dazu ist es unmöglich zu unterscheiden, ob neue Lymphgefäße in Leishmanien-infizierten Mausepfoten durch Lymphangiogenese oder Lymphvaskulogenese entstanden sind. Erschwert werden solche Untersuchungen dadurch, dass nicht bekannt ist, wie schnell Vorläuferzellen *in vivo* nach ihrem Einbau den Phänotyp von LECs annehmen können und somit nicht mehr von proliferierenden LECs unterschieden werden können. Insgesamt scheint es am wahrscheinlichsten, dass *in vivo* beide Prozesse zum Lymphgefäßwachstum beitragen.

4.5 Die Rolle von CEACAM1 bei der Lymphgefäßneubildung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen lymphgefäß-ähnliche Strukturen in Matrigelimplantaten bilden können. Durch detaillierte Analysen stellte sich heraus, dass diese Zellen in hohem Maße das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Gleichzeitig konnte CEACAM1 auf neu gebildeten Lymphgefäßen in Leishmanien-infizierten Mauspfoten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.22). Unter homöostatischen Bedingungen exprimieren Lymphgefäße CEACAM1 jedoch normalerweise nicht (Horst und Wagener, 2004; Kilic *et al.*, 2007).

Die Beteiligung von CEACAM1 an einer Vielzahl von komplexen Prozessen wie Zelldifferenzierung und Gewebeumbau ist bekannt (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Horst und Wagener, 2004). Aufgrund der offensichtlichen Homologien bei der Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen im adulten Organismus und der kürzlichen Beschreibung, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Hämangiogenese unter hypoxischen Bedingungen spielt (Horst *et al.*, 2006), liegt es nahe, dass das Protein auch bei der Bildung neuer Lymphgefäße beteiligt sein könnte. Da B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse vital und fertil sind und unter physiologischen Bedingungen keine vaskulären Auffälligkeiten zeigen (Hemmila *et al.*, 2004; Horst *et al.*, 2006), scheint die Expression von CEACAM1 für die Ausbildung lymphatischer Gefäße während der Embryonalentwicklung nicht notwendig zu sein. Allerdings wurde gezeigt, dass CEACAM1 im Menschen unter pathologischen Bedingungen wie Prostatakrebs mit Podoplanin kolokalisiert, also in Tumor-assoziierten Lymphgefäßen exprimiert wird, während dies in normalen Lymphgefäßen nicht der Fall ist (Kilic *et al.*, 2007). Dies korreliert mit der Expression von CEACAM1 auf neu gebildeten LECs im Infiltrat Leishmanien-infizierter Pfoten (vgl. Abb. 3.22). Auf der anderen Seite wurde beschrieben, dass die Expression von CEACAM1 auf humanen Endothelzellen zu einem lymphatischen Phänotyp in einem transitionalen Stadium, z. B. bei viralen Infektionen oder dem Kaposi Sarkom, führte (Hirakawa *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Fehlen von CEACAM1 im Modell der kutanen Leishmaniose in Mäusen mit einer verstärkten Pathologie. Dies wurde deutlich durch eine ausgeprägtere Schwellung der infizierten Pfoten im Vergleich zu B6.WT Mäusen, eine Narbenbildung und eine geringere Dichte inflammatorischer Zellen am Infektionsort, einhergehend mit dem Auftreten von lokalen Ödemen. Dennoch konnten keine Unterschiede in der Immunantwort gegen *L. major* zwischen B6.*Ceacam1*^{-/-} und B6.WT Mäusen festgestellt

werden. In diesem Zusammenhang wurden die Leishmanienlasten in infizierten Mauspfoten am Tag 49 nach Infektion, Leishmanien-spezifische Antikörpertiter verschiedener Subtypen im zeitlichen Verlauf sowie die Schwellungen der Mauspfoten nach einer Reinfektion analysiert (Daten im Anhang, Abb. 7.1 bis 7.3). Somit kam es in beiden Mausstämmen zur Induktion einer zellulären und humoralen Immunantwort, die ausreichte, den parasitären Erreger erfolgreich zu bekämpfen. Obwohl einerseits beschrieben wurde, dass CEACAM1 die B-Zell Proliferation und T-Zell Aktivierung fördert (Greicius *et al.*, 2003; Kammerer *et al.*, 1998), andererseits jedoch inhibitorisch auf die Lymphozytenaktivierung wirkt (Gray-Owen und Blumberg, 2006), zeigte sich, dass CEACAM1 im Mausmodell der kutanen Leishmaniose keinen Einfluss auf die Induktion einer protektiven Immunantwort hat.

Histologische Untersuchungen der infizierten Mauspfoten zeigten allerdings, dass im Infiltrat der B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse Blut- und Lymphgefäße dramatisch reduziert waren (vgl. Abb. 3.22). Dieser Befund spricht dafür, dass im Vergleich zu B6.WT Mäusen die lokale Gefäßneubildung in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen beeinträchtigt ist. Die defekte Neovaskularisierung liefert außerdem eine Erklärung für die verstärkte Pathologie in den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen während der Leishmaniose. Die proinflammatorischen Bedingungen in den infizierten Pfoten führen zur Induktion hämangiogener Faktoren (Guadagni *et al.*, 2007), die wiederum die Permeabilität der Blutgefäße erhöhen (Thurston, 2002). Da jedoch in den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen eine Gefäßneubildung ausbleibt, akkumuliert die aus den Blutgefäßen austretende extrazelluläre Flüssigkeit in den infizierten Pfoten, und es kommt zu einer ausgeprägteren Schwellung und Ödembildung.

Die defekte Neovaskularisierung in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse konnte im Matrigelimplantationsversuch bestätigt werden. CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen formten in den Implantaten keine lymphgefäß-ähnlichen Strukturen wie sie in Matrigelimplantaten von B6.WT Mäusen zu finden waren. Vielmehr lagen diese Zellen nur vereinzelt im Matrigel vor (vgl. Abb. 3.25).

Potentielle Vorläuferzellen dieser CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen stellen CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Monozyten im Blut dar, die in inflammatorische Gewebe infiltrieren, dort zu Makrophagen differenzieren und dabei Ly-6C herunterregulieren (Sunderkötter *et al.*, 2004). Übereinstimmend mit den Daten von Sunderkötter *et al.* konnte eine signifikante Zunahme dieser Zellen im Blut von B6.WT Mäusen nach einer Infektion mit *L. major* festgestellt werden (Sunderkötter *et al.*, 2004). Auffällig jedoch war, dass gerade diese Population im Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen signifikant in naiven und infizierten Tieren verringert war. Somit könnte also eine deutlich reduzierte Vorläuferpopulation zu der mangelnden Gefäßneubildung führen. Dessen ungeachtet jedoch kam es zu einer Anreicherung von CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen, die in B6.WT Mäusen

CEACAM1 exprimierten, im entzündlichen Infiltrat infizierter Mauspfoten und in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Dies zeigt, dass in entzündeten Geweben die Rekrutierung und Generierung der LYVE-1⁺ Zellen, die als potentielle lymphatische Vorläuferzellen fungieren, durch das Fehlen von CEACAM1 nicht beeinträchtigt war. Vielmehr war die absolute Zahl der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen sogar leicht, aber nicht signifikant, in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen gegenüber B6.WT Mäusen erhöht. Da die CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen offensichtlich nicht die Fähigkeit besaßen, lymphgefäßartige Strukturen auszubilden, könnte die vermehrte Generierung der potentiellen Vorläuferzellen einen kompensatorischen Hintergrund haben. Allerdings führte die verstärkte Generierung der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen nicht zur Ausbildung von neuen Lymphgefäßen.

Ob nun die Expression von CEACAM1 auf den CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen oder auf LECs, die unter homöostatischen Bedingungen zwar negativ für CEACAM1 sind (Horst und Wagener, 2004; Kilic *et al.*, 2007), jedoch in Leishmanien-infizierten Pfoten dieses Molekül exprimierten (vgl. Abb. 3.22), entscheidend war, wurde in weiteren Versuchen geklärt. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die inflammatorischen Zellen aus Matrigelimplantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen einen funktionellen Defekt aufwiesen. In einem Versuch zur Plastizität dieser Zellen bildeten sie kleinere Zellaggregate und signifikant weniger röhrenähnliche Strukturen als entsprechende Zellen aus B6.WT Mäusen (vgl. Abb. 3.27). Zum anderen führte der Transfer von CEACAM1⁺ Knochenmark in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse dazu, dass es während der Leishmaniose zu einer normalen Vaskularisierung in den infizierten Pfoten kam und keine Ödembildung mehr auftrat (vgl. Abb. 3.28). Gleichzeitig war der Pool an CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Zellen im Blut während der Infektion wieder auf dem Niveau von B6.WT Mäusen. Auch im Matrigelimplantationsversuch bildeten CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen wieder lymphgefäß-ähnliche Strukturen. Dieser Versuch beweist, dass die Expression von CEACAM1 auf hämatopoetischen Zellen und nicht auf inflammatorischen LECs ausschlaggebend für die zur Pathologie führende Inhibition der Lymphgefäßneubildung war. Übereinstimmend mit diesem Befund konnte die Gefäßneubildung *in vivo* und *in vitro* blockiert werden, wenn CEACAM1⁻ Knochenmark aus B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen in bestrahlte B6.WT Mäuse übertragen wurde. Dabei kam es analog zu den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zu einer Ödembildung einhergehend mit fehlenden Blut- und Lymphgefäßen im Infiltrat infizierter Pfoten und Matrigelimplantaten (vgl. Abb. 3.32).

Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CEACAM1 auf hämatopoetischen Zellen für die Lymphgefäßneubildung essentiell ist. Ein Fehlen von CEACAM1 führte zu einer verringerten zellulären Plastizität der myeloiden Vorläuferzellen.

4.6 Wirkmechanismen von CEACAM1

Induziert durch Pathogene (*Neisserien*, *Escherichia coli*), inflammatorische Zytokine (TNF, IFN- γ) oder Integrinbindung (CD11b/CD18 = Mac-1) kommt es zur Mobilisierung von CEACAM1 aus intrazellulären Vesikeln (Ducker und Skubitz, 1992; Gray-Owen und Blumberg, 2006; Kuespert *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Da Leishmanien zum einen via Mac-1 von Makrophagen aufgenommen werden (Olivier *et al.*, 2005; Spath *et al.*, 2000) und es während einer Infektion zur Produktion von TNF kommt (Ritter *et al.*, 2008), konnte erwartungsgemäß eine starke Expression von CEACAM1 auf inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden.

Da CEACAM1 mit seiner extrazellulären Domäne als Adhäsionsmolekül fungiert und CEACAM1-L mit seiner zytoplasmatischen Domäne in intrazelluläre Signaltransduktionswege eingreifen kann, gibt es mehrere verschiedene Möglichkeiten, wie CEACAM1 funktionell den Prozess der Lymphgefäßneubildung beeinflussen kann. Diese werden im folgenden Teil diskutiert.

A. CEACAM1 erhöht Überlebensrate monozytärer Zellen

Es wurde gezeigt, dass CEACAM1-L-vermittelte Signale über die Phosphatidylinositol 3 (PI3) Kinase das Überleben humaner Monozyten fördern (Yu *et al.*, 2006). Gleichzeitig ist dieser PI3 Kinase/Akt Signalweg in das Überleben blutendothelialer Vorläuferzellen involviert (Llevadot *et al.*, 2001). Die deutlich reduzierte Lymphgefäßneubildung in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen könnte somit auf ein verstärktes Absterben der monozytären Zellen zurückzuführen sein, zumal die Anzahl der CD11b^{high}/Ly-6C^{high} Monozyten im Blut von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen signifikant reduziert war. Allerdings waren B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse in der Lage, CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in gleichem Ausmaß wie B6.WT Mäuse zu generieren. Ein verstärktes Absterben dieser Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen konnte durch Vitalfärbungen nicht bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).

B. CEACAM1 ist lymphangiogener Faktor

Forschungsarbeiten der letzten Jahre legten dar, dass CEACAM1 als angiogener Faktor zur Bildung neuer Blutgefäße beiträgt (Ergün *et al.*, 2000; Kilic *et al.*, 2005; Tilki *et al.*, 2006; Wagener und Ergün, 2000). So induzierte CEACAM1, das unter hypoxischen Bedingungen von

Endothelzellen verstärkt gebildet wird (Chen *et al.*, 2005; Ergün *et al.*, 2000), die Proliferation humaner BECs *in vitro* (Wagener und Ergün, 2000) und wirkte dabei additiv mit VEGF-A, dem Hauptinduktor der Hämangiogenese (Ergün *et al.*, 2000). Zusätzlich korrelierte die verstärkte Expression von CEACAM1 mit der Bildung neuer Blutgefäße bei Prostatakrebs (Tilki *et al.*, 2006). Eine analoge lymphangiogene Wirkung wurde kürzlich von Kilic *et al.* postuliert (Kilic *et al.*, 2007). Sie zeigten, dass eine Überexpression von CEACAM1 in humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen eine Reprogrammierung dieser zu lymphatischen Endothelzellen bewirkte, die Prox-1, LYVE-1, VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 exprimierten. Dabei war die Wirkung von CEACAM1 abhängig von den phosphorylierbaren Tyrosinresten im zytoplasmatischen Teil von CEACAM1-L. Ob CEACAM1 wirklich als lymphangiogener Faktor zu bewerten ist, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht zu. Dies müsste in zukünftigen Versuchen genauer analysiert werden.

C. CEACAM1 ist wichtig für den Gewebeumbau

Als Zelladhäsionsmolekül ist CEACAM1 beteiligt an interzellulären Prozessen. Dazu gehört die Umgestaltung von Geweben, die gerade unter inflammatorischen Bedingungen in hohem Maße auftritt. Gleichzeitig kommt es dabei zu einer verstärkten Expression von CEACAM1 (Ducker und Skubitz, 1992; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Damit Zellen im Gewebe wandern können, müssen Strukturen der ECM immer wieder ab- und neu aufgebaut werden. MMPs stellen dabei die wichtigsten ECM-degradierenden Enzyme dar (Rundhaug, 2005). Gerade für MMP2 und MMP9 wurde gezeigt, dass sie beim Gewebeumbau (Gillard *et al.*, 2004; Stamenkovic, 2003), endothelialer Zellmigration (Haas *et al.*, 1998; Jadhav *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004) und dem gefäßbildenden Potential lymphendothelialer Zellen (Nakamura *et al.*, 2004) beteiligt sind. Auffällig in elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Matrigelimplantate war, dass die ECM in Implantaten von B6.WT Mäusen viel geordneter und die Kollagenfasern in gebündelten Einheiten vorlagen (vgl. Abb. 3.26). In Implantaten von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen war eine solche Struktur nicht zu erkennen. In der Hämangiogenese wurde gezeigt, dass die Struktur der ECM wichtig für die Bildung neuer Blutgefäße ist. So wird nur intaktes, fibrilläres Typ IV Kollagen von den Integrinen $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ gebunden, die auf BECs exprimiert werden und ihre Proliferation und Migration induzieren, während degradiertes Typ IV Kollagen diese Integrine nicht bindet (Kalluri, 2003). Ob CEACAM1 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von ECM-degradierenden oder synthetisierenden Enzymen hat, ist bisher nicht

bekannt. Genauere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind notwendig, um mehr über den Zusammenhang zwischen CEACAM1 und der Struktur der ECM zu erfahren.

Bei der Bildung neuer Blutgefäße induziert der hämangiogene Faktor VEGF-A einen Gewebeumbau, durch den es zu einer weiteren Freisetzung ECM-gebundener hämangiogener Faktoren wie VEGF-A und FGF kommt (Kalluri, 2003; Mariotti und Maier, 2006; Rundhaug, 2005). Allerdings bewirkt der Abbau von ECM auch gleichzeitig die Freisetzung von anti-hämangiogenen Faktoren, zu denen Angiostatin als Fragment aus Plasminogen und Endostatin, Canstatin und Tumstatin als Fragmente aus Kollagen zählen (Maeshima *et al.*, 2002; Mariotti und Maier, 2006; O'Reilly *et al.*, 1994; Panka und Mier, 2003; Skovseth *et al.*, 2005). Neben ihren hämangiogenen Eigenschaften wirken VEGF-A und FGF auch lymphangiogen, allerdings in einem geringeren Ausmaß (Auguste *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Hirakawa *et al.*, 2005). Inwieweit Fragmente aus dem Abbau von ECM auch anti-lymphangiogene Wirkung besitzen, ist derzeit noch unklar. Somit könnte jedoch der gestörte ECM-Umbau in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen die Lymphgefäßneubildung auch durch ein verschobenes Verhältnis von pro- und anti-lymphangiogenen Faktoren inhibieren.

Dadurch, dass CEACAM1 mit Integrin $\beta 3$ interagieren kann (Brummer *et al.*, 2001; Ebrahimnejad *et al.*, 2004; Skubitz *et al.*, 2001), gibt es eine Integrin-vermittelte Verbindung von CEACAM1 und der ECM. Als endotheliale Zelladhäsionsmoleküle haben Integrine einen großen Einfluss bei der Hämangiogenese. So vermitteln vor allem Integrin $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ Signale für Zellwanderung, Positionierung, Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung (Conway *et al.*, 2001; Munoz-Chapuli *et al.*, 2004). Da myeloide Zellen neben weiteren Integrienen auch das Integrin $\beta 3$ (Jin *et al.*, 2006) und gleichzeitig CEACAM1 exprimieren, wäre es möglich, dass eine Interaktion dieser Moleküle auf CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen die Zellwanderung und Differenzierung zu lymphgefäß-ähnlichen Strukturen induziert. Durch das Fehlen von CEACAM1 auf CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen wäre somit dieser Prozess gestört und würde zu dem beschriebenen Befund führen, dass CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen zwar generiert werden, aber sich funktionell nicht zu gefäßartigen Strukturen zusammenlagern können.

D. CEACAM1 ist involviert in Zellwanderung

Wie bereits diskutiert, kann CEACAM1 durch die Interaktion mit Integrienen die Wanderung von Zellen beeinflussen. Ein weiteres Molekül, das in die gerichtete Wanderung von Zellen involviert ist, stellt die Fokale Adhäsionskinase (FAK) dar. Diese reguliert die Organisation des Zytoskeletts und rekrutiert andere Moleküle wie die Src-Tyrosinkinasen (Mariotti und Maier,

2006). Es konnte gezeigt werden, dass in einem Wundheilungsmodell *in vitro* erhöhte CEACAM1-Expression die Phosphorylierung von FAK bewirkte (Klaile *et al.*, 2005). Dies könnte auf einem synergistischen Effekt beruhen, da CEACAM1-L ebenfalls durch die Rekrutierung von Src-Kinasen phosphoryliert wird (Brummer *et al.*, 1995; Skubitz *et al.*, 1995). Weiterhin wurde eine zytoplasmatische Interaktion von CEACAM1-L mit Filamin A beschrieben (Klaile *et al.*, 2005). Da Filamin A intrazelluläre Aktinfilamente mit der ECM via β -Integrine verbindet (Mariotti und Maier, 2006), kann CEACAM1 auch hier Einfluss auf die zelluläre Beweglichkeit und Änderung der Zellform nehmen.

E. CEACAM1 erhöht zelluläre Plastizität

Der Einbau von Vorläuferzellen bei der Neubildung von Lymphgefäßen erfordert von diesen eine zelluläre Plastizität, da sie sich zu LECs entwickeln müssen. Dass CEACAM1 dabei eine Rolle spielt und in der Regulation eines bestimmten morphogenetischen Programms involviert ist, wurde kürzlich anhand der Bildung gefäßartiger Strukturen und endothelialer Netzwerkformierung in Explantaten von Mauseorten beschrieben (Ergün *et al.*, 2000; Horst *et al.*, 2006). Dabei war die Phosphorylierung der beiden zytoplasmatischen Tyrosinreste und des Serinrestes für die CEACAM1-induzierte Hämangiogenese essentiell (Horst *et al.*, 2006). Zusätzlich zu den morphologischen Einflüssen von CEACAM1 ist bekannt, dass Makrophagen eine sehr hohe Plastizität besitzen und unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen transdifferenzieren können (Bohgaki und Kitaguchi, 2007; Sharifi *et al.*, 2006).

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen direkt bei der Bildung lymphgefäß-ähnlicher Strukturen beteiligt sind und die Expression von CEACAM1 *in vitro* und *in vivo* essentiell zur Bildung von Zellaggregaten und gefäßähnlichen Strukturen ist, lässt dies den Schluss zu, dass CEACAM1 in die zelluläre Plastizität dieser möglichen lymphendothelialen Vorläuferzellen involviert ist.

Zusätzlich sind zellmorphologische Veränderungen immer mit dem Umbau des Zytoskeletts verbunden. Nicht nur über Integrine, sondern auch über direkte Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts wie Aktin, Paxillin oder Tropomyosin (Da Silva-Azevedo und Reutter, 1999; Ebrahimnejad *et al.*, 2000; Sadekova *et al.*, 2000; Schumann *et al.*, 2001) könnte CEACAM1-L, und teilweise auch CEACAM1-S, diese zelluläre Plastizität vermitteln.

F. CEACAM1 bildet dynamische Adhärenzverbindungen

Vermittelt durch homophile Bindung gilt CEACAM1 als Zelladhäsionsmolekül (Obrink, 1997; Sundberg und Obrink, 2002). Dabei wird die Zelladhäsion reguliert durch die Moleküldichte auf der Zelloberfläche und der Bindung von Calmodulin, Src-Kinasen sowie SHP-1 und SHP-2 Phosphatasen an den langen zytoplasmatischen Teil (Ocklind und Obrink, 1982). In polarisierten Nierenepithelzellen wurde gezeigt, dass CEACAM1-S nur apikal, während CEACAM1-L apikal und lateral vorhanden war (Sundberg *et al.*, 2004). Laterales CEACAM1-L wurde dabei in Adhärenzverbindungen, nicht aber in Desmosomen oder der *Zonula occludens* detektiert. Eine Überexpression von CEACAM1-L in Nierenepithelzellen führte durch die Reduzierung von Desmosomen zu einem dynamischeren Typ von interzellulärer Adhäsion, die vermehrte Zellmotilität ermöglichte (Sundberg *et al.*, 2004). In anderen Studien hingegen korrelierte die Expression von CEACAM1-S und nicht CEACAM1-L mit der Bildung von Lumen bei Epithelzellen der Brust (Huang *et al.*, 1999; Kirshner *et al.*, 2003).

Somit führt die Expression von verschiedenen CEACAM1-Isoformen zu dynamischen Zell-Zell-Verbindungen, die wichtig sind für die Anlagerung von Vorläuferzellen und die Ausbildung von Lumina in Zellaggregaten (Wright *et al.*, 2002). Beide Vorgänge wurden in Matrigelimplantaten von B6.WT, jedoch nicht in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen beobachtet.

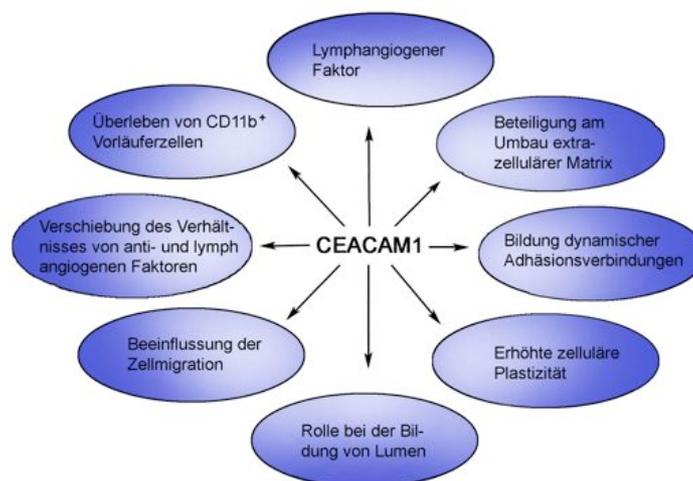


Abb. 4.2 Zusammenfassung der Einflussnahme von CEACAM1 auf unterschiedliche Prozesse im Zusammenhang mit der Neubildung von Lymphgefäßen.

Abbildung 4.2 zeigt einen Überblick der Mechanismen, über die CEACAM1 bei der Lymphgefäßneubildung Einfluss nehmen könnte. Für die unterschiedlichen Aspekte gibt es derzeit nur Anhaltspunkte. Um herauszufinden, auf welche Weise CEACAM1 letztendlich bei der Bildung neuer Lymphgefäße beteiligt ist und welche weiteren Moleküle dabei eine Rolle spielen, wird das Ziel zukünftiger Forschung sein.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen neue Lymphgefäße durch Lymphvaskulogenese entstehen, wobei CD11b⁺/LYVE-1⁺ Vorläuferzellen zunächst unreife lymphgefäß-ähnliche Strukturen bilden. Bei diesem Prozess ist das zelluläre Adhäsionsmolekül CEACAM1 funktionell beteiligt. Da CEACAM1 nicht nur auf neu gebildeten Lymphgefäßen exprimiert wird, sondern auch auf CD11b⁺/LYVE-1⁺ Vorläuferzellen, erscheint es möglich, durch die Modulation der Expression von CEACAM1, Einfluss auf die Gefäßneubildung in verschiedenen pathologischen Prozessen zu nehmen. Allerdings ist dafür noch intensive Forschungsarbeit notwendig.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- a) Findet der Prozess der Lymphvaskulogenese auch *in vivo* statt?
- b) Beginnt die Lymphvaskulogenese im Matrigelimplantat an existierenden Gefäßen oder *de novo* von aggregierenden CD11b⁺ Zellen?
- c) Lässt sich durch Injektion von blockierenden anti-CEACAM1 Antikörpern Lymphgefäßneubildung in B6.WT Mäusen inhibieren?
- d) Welche CEACAM1-Isoform ist wichtig für die Entstehung neuer Lymphgefäße, und wie vermittelt CEACAM1 diese Lymphgefäßneubildung?
- e) Gibt es eine Korrelation zwischen humanen lymphatischen Erkrankungen und Mutationen im CEACAM1 Gen-Lokus?

Antworten auf diese Fragen würden das Verständnis des Lymphsystems unter inflammatorischen Bedingungen wesentlich verbessern. Gerade bei Krebserkrankungen, in denen Lymphgefäßwachstum zur Metastasierung beiträgt, ist eine Bewertung der CD11b⁺/LYVE-1⁺ Vorläuferzellen von großer Bedeutung, da sie ggf. zur Tumorprogression beitragen. Aus diesem Grund wäre es auch interessant zu klären, ob es in verschiedenen Tumormodellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen zu einer inhibierten Bildung von Tumorlymphgefäßen und damit korrelierender verringerter Tumormetastasierung im Vergleich zu B6.WT Mäusen kommt.

5 Zusammenfassung

Über die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem parasitären Erreger der kutanen Leishmaniose, *L. major*, konnten in etablierten murinen Infektionsmodellen viele Erkenntnisse gewonnen werden. Allerdings gibt es noch keine Forschungsarbeiten, die sich mit dem Thema der Neovaskularisierung in den von Leishmanien verursachten Hautentzündungen am Ort der Einstichstelle des Überträgers und dem Einfluss dieser Gefäßneubildung, im Speziellen der Lymphgefäßneubildung, auf den Heilungsverlauf befassen. Neben diesem Themenbereich wurde zusätzlich der Einfluss des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 auf die Bildung neuer Lymphgefäße im Mausmodell der Leishmaniose *in vivo* und *in vitro* evaluiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden neu gebildete LYVE-1⁺ Lymphgefäße im entzündlichen Infiltrat von infizierten Pfoten Leishmanien-resistenter B6.WT Mäuse gefunden, die deutlich CEACAM1 exprimierten. Einzelzellanalysen infizierter Mauspfoten ergaben, dass unterschiedliche LYVE-1⁺ Populationen existierten. Zum einen wurden CD45⁺/LYVE-1⁺ LECs, zum anderen CD45⁺/CD11b⁺/LYVE-1⁺ Makrophagen-ähnliche Zellen identifiziert. In Matrigelimplantationsversuchen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die letztgenannten Zellen den Phänotyp von Gewebemakrophagen besaßen und gleichzeitig das Potential hatten, lymphgefäß-ähnliche Strukturen zu bilden. Allerdings reiften diese Strukturen nicht zu normalen Lymphgefäßen, sondern verharrten in einem unreifen Zustand, in dem die LYVE-1⁺ Zellen dauerhaft die Marker CD45, CD11b und CEACAM1 exprimierten. Weiterhin konnte mittels Knochenmarktransfer gezeigt werden, dass diese Zellen von myeloiden Vorläuferzellen abstammten. Dabei liegt nahe, dass die LYVE-1⁺ Zellen mit dem Phänotyp von Makrophagen in entzündeten Geweben ein Reservoir für potentielle LECs darstellen und lymphatische Strukturen *de novo* bilden können, ein Prozess der kürzlich als Lymphvaskulogenese beschrieben wurde.

Im zweiten Teil dieser Arbeit zeigte sich, dass CEACAM1 defiziente Mäuse eine verstärkte Schwellung und Ödembildung nach Infektion mit *L. major* aufwiesen. Dies konnte auf eine fehlende Neovaskularisierung des sich bildenden Infiltrats zurückgeführt werden. Auch in Matrigelimplantaten zeigte sich, dass CEACAM1⁻/CD11b⁺/LYVE-1⁺ Zellen keine lymphgefäß-ähnlichen Strukturen ausbildeten. Obwohl die monozytäre Population im Blut von B6.*Ceacam1*⁻ Mäusen signifikant reduziert war, konnten die B6.*Ceacam1*⁻ Mäusen die potentiellen CD11b⁺/LYVE-1⁺ Vorläuferzellen in ausreichendem Maße generieren. Allerdings wiesen die

inflammatorischen Zellen von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen eine verringerte zelluläre Plastizität sowie eine veränderte Modulation der ECM auf. Dass gerade die Expression von CEACAM1 auf myeloiden Zellen entscheidend für die Induktion der Gefäßneubildung war, konnte anhand des Transfers von CEACAM1⁺ Knochenmark von B6.WT Mäusen in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse bzw. CEACAM1⁻ Knochenmark von B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen in B6.WT Mäuse gezeigt werden.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass myeloide CD11b⁺/CEACAM1⁺/LYVE-1⁺ Zellen unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen *de novo* lymphatische Gefäße *in vitro* bilden können. Welche Rolle diesem Mechanismus *in vivo* zukommt und auf welche Weise CEACAM1 daran beteiligt ist, wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abou-Rjaily, G. A., S. J. Lee, D. May, Q. Y. Al-Share, A. M. Deangelis, R. J. Ruch, M. Neumaier, H. Kalthoff, S. H. Lin and S. M. Najjar** (2004) CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor-mediated cell proliferation. *J Clin Invest* 114(7):944-952.
- Aderem, A. and D. M. Underhill** (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Alexander, J., A. R. Satoskar and D. G. Russell** (1999) Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18:2993-3002.
- Alexander, J. S.** (2000) Rho, tyrosine kinase, Ca(2+), and junctions in endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 87(4):268-271.
- Alitalo, K., T. Tammela and T. V. Petrova** (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438(7070):946-953.
- Andrade, M. and A. Jacomo** (2007). Anatomy of the human lymphatic system. in *Cancer metastasis and the lymphovascular system*. Springer, New York.
- Antoine, J. C., E. Prina, T. Lang and N. Courret** (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6(10):392-401.
- Arras, M., W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper and W. Schaper** (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101(1):40-50.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner** (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85(3):221-228.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner** (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302):964-967.
- Aselli, G.** (1627) De Lactibus sive Lacteis Venis, Quarto Vasorum Mesarai corum Genere novo invento. *J. B. Bidellium, Mediolani, Milano*.
- Ashford, R. W.** (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30(12-13):1269-1281.
- Audet, N., N. J. Beasley, C. MacMillan, D. G. Jackson, P. J. Gullane and S. Kamel-Reid** (2005) Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131(12):1065-1070.
- Auguste, P., S. Javerzat and A. Bikfalvi** (2003) Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 314(1):157-166.
- Awasthi, A., R. K. Mathur and B. Saha** (2004) Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119(6):238-258.
- Babior, B. M.** (2002) The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 4(11):1023-1024.

- Bailey, A. S., H. Willenbring, S. Jiang, D. A. Anderson, D. A. Schroeder, M. H. Wong, M. Grompe and W. H. Fleming** (2006) Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35):13156-13161.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-252.
- Banerji, S., J. Ni, S. X. Wang, S. Clasper, J. Su, R. Tammi, M. Jones and D. G. Jackson** (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144(4):789-801.
- Beauchemin, N., P. Draber, G. Dveksler, P. Gold, S. Gray-Owen, F. Grunert, S. Hammarstrom, K. V. Holmes, A. Karlsson, M. Kuroki, S. H. Lin, L. Lucka, S. M. Najjar, M. Neumaier, B. Obrink, J. E. Shively, K. M. Skubitz, C. P. Stanners, P. Thomas, J. A. Thompson, M. Virji, S. von Kleist, C. Wagener, S. Watt and W. Zimmermann** (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 252(2):243-249.
- Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon and D. Sacks** (2000) A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165(2):969-977.
- Bello, L., V. Lucini, G. Carrabba, C. Giussani, M. Machluf, M. Pluderi, D. Nikas, J. Zhang, G. Tomei, R. M. Villani, R. S. Carroll, A. Bikfalvi and P. M. Black** (2001) Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res* 61(24):8730-8736.
- Berger, C. N., O. Billker, T. F. Meyer, A. L. Servin and I. Kansau** (2004) Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol* 52(4):963-983.
- Bingle, L., N. J. Brown and C. E. Lewis** (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196(3):254-265.
- Blackwell, J. M.** (1996) Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112 SupplS67-74.
- Bogdan, C. and M. Röllinghoff** (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28(1):121-134.
- Bogdan, C., M. Röllinghoff and A. Diefenbach** (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173:17-26.
- Bohgaki, M. and H. Kitaguchi** (2007) Conversion of cultured monocytes/macrophages into endothelial-like cells through direct contact with endothelial cells. *Int J Hematol* 86(1):42-48.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brandonisio, O., M. A. Panaro, M. Sisto, A. Acquafredda, L. Fumarola, D. Leogrande and V. Mitolo** (2001) Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 43 Suppl 11-6.
- Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo and P. Zanovello** (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96(12):3838-3846.
- Brooks, P. C., R. A. Clark and D. A. Cheresh** (1994) Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264(5158):569-571.

- Brummer, J., A. Ebrahimnejad, R. Flayeh, U. Schumacher, T. Loning, A. M. Bamberger and C. Wagener** (2001) cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol* 159(2):537-546.
- Brummer, J., M. Neumaier, C. Gopfert and C. Wagener** (1995) Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11(8):1649-1655.
- Buttler, K., A. Kreysing, C. S. von Kaisenberg, L. Schweigerer, N. Gale, M. Papoutsis and J. Wilting** (2006) Mesenchymal cells with leukocyte and lymphendothelial characteristics in murine embryos. *Dev Dyn* 235(6):1554-1562.
- Cao, R., A. Eriksson, H. Kubo, K. Alitalo, Y. Cao and J. Thyberg** (2004) Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94(5):664-670.
- Cao, Y., P. Linden, J. Farnebo, R. Cao, A. Eriksson, V. Kumar, J. H. Qi, L. Claesson-Welsh and K. Alitalo** (1998) Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24):14389-14394.
- Caparros, E., D. Serrano, A. Puig-Kroger, L. Riol, F. Lasala, I. Martinez, F. Vidal-Vanaclocha, R. Delgado, J. L. Rodriguez-Fernandez, L. Rivas, A. L. Corbi and M. Colmenares** (2005) Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210(2-4):185-193.
- Carmeliet, P.** (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070):932-936.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain** (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257.
- Casley-Smith, J. R. and H. L. Florey** (1961) The structure of normal small lymphatics. *Quart J Exp Physiol* 46:101-106.
- Chakraborty, R., P. Chakraborty and M. K. Basu** (1998) Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent *L. donovani* promastigotes. *Biosci Rep* 18(3):129-142.
- Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen and B. R. Bloom** (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7):2453-2457.
- Chen, W. J., H. W. Chen, S. L. Yu, C. H. Huang, T. D. Wang, J. J. Chen, C. T. Chien, H. Y. Chen, P. C. Yang and Y. T. Lee** (2005) Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Shock* 24(2):124-131.
- Cho, C. H., Y. J. Koh, J. Han, H. K. Sung, H. Jong Lee, T. Morisada, R. A. Schwendener, R. A. Brekken, G. Kang, Y. Oike, T. S. Choi, T. Suda, O. J. Yoo and G. Y. Koh** (2007) Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 100(4):e47-57.
- Conway, E. M., D. Collen and P. Carmeliet** (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49(3):507-521.
- Cruz, I., J. Nieto, J. Moreno, C. Canavate, P. Desjeux and J. Alvar** (2006) Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 123(3):357-388.
- Cursiefen, C., L. Chen, M. R. Dana and J. W. Streilein** (2003) Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea* 22(3):273-281.
- Da Silva-Azevedo, L. and W. Reutter** (1999) The long isoform of the cell adhesion molecule C-CAM binds to actin. *Biochem Biophys Res Commun* 256(2):404-408.

- De Palma, M., C. Murdoch, M. A. Venneri, L. Naldini and C. E. Lewis** (2007) Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 28(12):519-524.
- Dermine, J. F., S. Scianimanico, C. Prive, A. Descoteaux and M. Desjardins** (2000) Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2(2):115-126.
- Dictor, M., S. Mebrahtu, M. Selg, Z. Lokmic and L. Sorokin** (2007). Lymphatic origin from embryonic stem cells. in *Cancer Metastasis and the Lymphvascular System*. Springer, New York.
- Dirkx, A. E., M. G. Oude Egbrink, J. Wagstaff and A. W. Griffioen** (2006) Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80(6):1183-1196.
- Donovan, C.** (1903) Memoranda: On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. *British Medical Journal* 279.
- Ducker, T. P. and K. M. Skubitz** (1992) Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 52(1):11-16.
- Duclos, S. and M. Desjardins** (2000) Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 2(5):365-377.
- Dumont, D. J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman and K. Alitalo** (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282(5390):946-949.
- Dveksler, G. S., C. W. Dieffenbach, C. B. Cardellichio, K. McCuaig, M. N. Pensiero, G. S. Jiang, N. Beauchemin and K. V. Holmes** (1993) Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* 67(1):1-8.
- Ebrahimnejad, A., R. Flayeh, G. Unteregger, C. Wagener and J. Brummer** (2000) Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 260(2):365-373.
- Ebrahimnejad, A., T. Streichert, P. Nollau, A. K. Horst, C. Wagener, A. M. Bamberger and J. Brummer** (2004) CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 165(5):1781-1787.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva and D. W. Mullins** (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 64(3):275-290.
- Elhay, M., M. Kelleher, A. Bacic, M. J. McConville, D. L. Tolson, T. W. Pearson and E. Handman** (1990) Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 40(2):255-267.
- Eming, S. A., B. Brachvogel, T. Odorisio and M. Koch** (2007) Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* 42(3):115-170.
- Ergün, S., N. Kilik, G. Ziegeler, A. Hansen, P. Nollau, J. Gotze, J. H. Wurnbach, A. Horst, J. Weil, M. Fernando and C. Wagener** (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5(2):311-320.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson** (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101(4):890-898.

- Fernandez-Pujol, B., F. C. Lucibello, U. M. Gehling, K. Lindemann, N. Weidner, M. L. Zuzarte, J. Adamkiewicz, H. P. Elsasser, R. Muller and K. Havemann** (2000) Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 65(5):287-300.
- Fernandez-Pujol, B., F. C. Lucibello, M. Zuzarte, P. Lutjens, R. Muller and K. Havemann** (2001) Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol* 80(1):99-110.
- Fleming, T. J., M. L. Fleming and T. R. Malek** (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151(5):2399-2408.
- Gale, N. W., R. Prevo, J. Espinosa, D. J. Ferguson, M. G. Dominguez, G. D. Yancopoulos, G. Thurston and D. G. Jackson** (2007) Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol* 27(2):595-604.
- Garmy-Susini, B. and J. A. Varner** (2005) Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer* 93(8):855-858.
- Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman** (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71-82.
- Ghosh, S., S. Goswami and S. Adhya** (2003) Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage. *Biochem J* 369(Pt 3):447-452.
- Gillard, J. A., M. W. Reed, D. Buttle, S. S. Cross and N. J. Brown** (2004) Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair Regen* 12(3):295-304.
- Gold, P. and S. O. Freedman** (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122(3):467-481.
- Gramiccia, M. and L. Gradoni** (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35(11-12):1169-1180.
- Gray-Owen, S. D. and R. S. Blumberg** (2006) CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* 6(6):433-446.
- Green, P. J., T. Feizi, M. S. Stoll, S. Thiel, A. Prescott and M. J. McConville** (1994) Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 66(2):319-328.
- Greicius, G., E. Severinson, N. Beauchemin, B. Obrink and B. B. Singer** (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol* 74(1):126-134.
- Guadagni, F., P. Ferroni, R. Palmirotta, I. Portarena, V. Formica and M. Roselli** (2007) Review. TNF/VEGF cross-talk in chronic inflammation-related cancer initiation and progression: an early target in anticancer therapeutic strategy. *In Vivo* 21(2):147-161.
- Haas, T. L., S. J. Davis and J. A. Madri** (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273(6):3604-3610.
- Hanahan, D. and J. Folkman** (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3):353-364.

- Harvey, W.** (1628) *Exertatio anatomico de motu cordis et sanguinis in animalibus. Frankfurt, Guilielmi Fitzeri.*
- He, Y., I. Rajantie, M. Ilmonen, T. Makinen, M. J. Karkkainen, P. Haiko, P. Salven and K. Alitalo** (2004) Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 64(11):3737-3740.
- Hemmila, E., C. Turbide, M. Olson, S. Jothy, K. V. Holmes and N. Beauchemin** (2004) Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J Virol* 78(18):10156-10165.
- Hermiston, M. L., Z. Xu and A. Weiss** (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21:107-137.
- Hill, D. J. and M. Virji** (2003) A novel cell-binding mechanism of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 48(1):117-129.
- Hillen, F. and A. W. Griffioen** (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4):489-502.
- Hirakawa, S., Y. K. Hong, N. Harvey, V. Schacht, K. Matsuda, T. Libermann and M. Detmar** (2003) Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 162(2):575-586.
- Hirakawa, S., S. Kodama, R. Kunstfeld, K. Kajiya, L. F. Brown and M. Detmar** (2005) VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 201(7):1089-1099.
- Hong, Y. K., J. W. Shin and M. Detmar** (2004) Development of the lymphatic vascular system: a mystery unravels. *Dev Dyn* 231(3):462-473.
- Horst, A. K., W. D. Ito, J. Dabelstein, U. Schumacher, H. Sander, C. Turbide, J. Brummer, T. Meinertz, N. Beauchemin and C. Wagener** (2006) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 116(6):1596-1605.
- Horst, A. K. and C. Wagener** (2004). CEA-related CAMs. in *Handbook of experimental pharmacology*. Springer, New York.
- <http://cea.klinikum.uni-muenchen.de>.
- <http://who.int/leishmaniasis/burden/en>.
- Huang, J., J. D. Hardy, Y. Sun and J. E. Shively** (1999) Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. *J Cell Sci* 112 (Pt 23):4193-4205.
- Hume, D. A., I. L. Ross, S. R. Himes, R. T. Sasmono, C. A. Wells and T. Ravasi** (2002) The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 72(4):621-627.
- Hunter, I., H. Sawa, M. Edlund and B. Obrink** (1996) Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem J* 320 (Pt 3):847-853.
- Huntington, G. S. and C. F. W. McClure** (1908) The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *Anat Rec* 21-18.
- Izzi, L., C. Turbide, C. Houde, T. Kunath and N. Beauchemin** (1999) cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18(40):5563-5572.
- Jackson, D. G.** (2007). Lymphatic markers, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. in *Cancer Metastasis and the Lymphovascular System*. Springer, New York.

- Jadhav, U., S. Chigurupati, S. S. Lakka and S. Mohanam** (2004) Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Int J Oncol* 25(5):1407-1414.
- Jain, R. K.** (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6):685-693.
- Jain, R. K.** (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307(5706):58-62.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jeon, B. H., C. Jang, J. Han, R. P. Kataru, L. Piao, K. Jung, H. J. Cha, R. A. Schwendener, K. Y. Jang, K. S. Kim, K. Alitalo and G. Y. Koh** (2008) Profound but dysfunctional lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor ligands from CD11b+ macrophages in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 68(4):1100-1109.
- Jin, H., J. Su, B. Garmy-Susini, J. Kleeman and J. Varner** (2006) Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Res* 66(4):2146-2152.
- Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions and B. A. Imhof** (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113 (Pt 6):921-933.
- Johnston, R. B., Jr.** (1988) Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 318(12):747-752.
- Jones, G. E.** (2000) Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 68(5):593-602.
- Jussila, L. and K. Alitalo** (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82(3):673-700.
- Kalluri, R.** (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3(6):422-433.
- Kammerer, R., S. Hahn, B. B. Singer, J. S. Luo and S. von Kleist** (1998) Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur J Immunol* 28(11):3664-3674.
- Kammerer, R., D. Stober, B. B. Singer, B. Obrink and J. Reimann** (2001) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J Immunol* 166(11):6537-6544.
- Kampmeier, O. F.** (1912) The value of the injection method in the study of the lymphatic development. *Anat Rec* 6:223-233.
- Karpanen, T. and K. Alitalo** (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 3:367-397.
- Katakai, T., T. Hara, J. H. Lee, H. Gonda, M. Sugai and A. Shimizu** (2004) A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 16(8):1133-1142.
- Kerjaschki, D.** (2005) The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest* 115(9):2316-2319.
- Khmelewski, E., A. Becker, T. Meinertz and W. D. Ito** (2004) Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circ Res* 95(6):E56-64.
- Kiertscher, S. M. and M. D. Roth** (1996) Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59(2):208-218.

- Kilic, N., L. Oliveira-Ferrer, S. Neshat-Vahid, S. Irmak, K. Obst-Pernberg, J. H. Wurmbach, S. Loges, E. Kilic, J. Weil, H. Lauke, D. Tilki, B. B. Singer and S. Ergün** (2007) Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. *Blood* 110(13):4223-4233.
- Kilic, N., L. Oliveira-Ferrer, J. H. Wurmbach, S. Loges, F. Chalajour, S. Neshat-Vahid, J. Weil, M. Fernando and S. Ergün** (2005) Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem* 280(3):2361-2369.
- Kirshner, J., C. J. Chen, P. Liu, J. Huang and J. E. Shively** (2003) CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2):521-526.
- Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust and B. Malissen** (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22(5):643-654.
- Klaile, E., M. M. Muller, C. Kannicht, B. B. Singer and L. Lucka** (2005) CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration. *J Cell Sci* 118(Pt 23):5513-5524.
- Knighton, D. R., T. K. Hunt, H. Scheuenstuhl, B. J. Halliday, Z. Werb and M. J. Banda** (1983) Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221(4617):1283-1285.
- Kriehuber, E., S. Breiteneder-Geleff, M. Groeger, A. Soleiman, S. F. Schoppmann, G. Stingl, D. Kerjaschki and D. Maurer** (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 194(6):797-808.
- Kuespert, K., S. Pils and C. R. Hauck** (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 18(5):565-571.
- Lamouille, S., C. Mallet, J. J. Feige and S. Bailly** (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100(13):4495-4501.
- Leak, L. V. and J. F. Burke** (1966) Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat* 118(3):785-809.
- Leishman, W. B.** (1903) On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. *British Medical Journal* 11252-1254.
- Leung, N., C. Turbide, M. Olson, V. Marcus, S. Jothy and N. Beauchemin** (2006) Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene* 25(40):5527-5536.
- Lewis, C. E., M. De Palma and L. Naldini** (2007) Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res* 67(18):8429-8432.
- Lewis, C. E. and J. W. Pollard** (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66(2):605-612.
- Liersch, R., F. Nay, L. Lu and M. Detmar** (2006) Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood* 107(3):1214-1216.
- Liu, Y. N., J. Zhang, Q. H. He, X. Dai and L. Shen** (2008) Isolation and characterization of epithelial progenitor cells from human fetal liver. *Hepatol Res* 38(1):103-113.

- Llavadot, J., S. Murasawa, Y. Kureishi, S. Uchida, H. Masuda, A. Kawamoto, K. Walsh, J. M. Isner and T. Asahara** (2001) HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108(3):399-405.
- Lucka, L., M. Fernando, D. Grunow, C. Kannicht, A. K. Horst, P. Nollau and C. Wagener** (2005) Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* 15(1):87-100.
- MacMicking, J., Q. W. Xie and C. Nathan** (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
- Maeshima, Y., A. Sudhakar, J. C. Lively, K. Ueki, S. Kharbanda, C. R. Kahn, N. Sonenberg, R. O. Hynes and R. Kalluri** (2002) Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* 295(5552):140-143.
- Makinen, T., T. Veikkola, S. Mustjoki, T. Karpanen, B. Catimel, E. C. Nice, L. Wise, A. Mercer, H. Kowalski, D. Kerjaschki, S. A. Stacker, M. G. Achen and K. Alitalo** (2001) Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J* 20(17):4762-4773.
- Manzo, G.** (1998) Natural killer cell reactivity: activation and cytolysis mechanism models, involving heat shock protein, haemopoietic histocompatibility, major histocompatibility complex and complement molecules. *Med Hypotheses* 51(1):5-9.
- Mariotti, M. and J. A. M. Maier** (2006). Angiogenesis: an overview. in *New Frontiers in Angiogenesis*. Springer, Dordrecht.
- Maruyama, K., J. Asai, M. Ii, T. Thorne, D. W. Losordo and P. A. D'Amore** (2007) Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol* 170(4):1178-1191.
- Maruyama, K., M. Ii, C. Cursiefen, D. G. Jackson, H. Keino, M. Tomita, N. Van Rooijen, H. Takenaka, P. A. D'Amore, J. Stein-Streilein, D. W. Losordo and J. W. Streilein** (2005) Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest* 115(9):2363-2372.
- Maslin, C. L., K. Kedzierska, N. L. Webster, W. A. Muller and S. M. Crowe** (2005) Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 3(4):303-317.
- Mattner, F., J. Magram, J. Ferrante, P. Launois, K. Di Padova, R. Behin, M. K. Gately, J. A. Louis and G. Alber** (1996) Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol* 26(7):1553-1559.
- McCuaig, K., M. Rosenberg, P. Nedellec, C. Turbide and N. Beauchemin** (1993) Expression of the Bgp gene and characterization of mouse colon biliary glycoprotein isoforms. *Gene* 127(2):173-183.
- McDonald, D. M. and P. L. Choyke** (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9(6):713-725.
- Mehlhorn, H. and G. Piekarski** (1998). Grundriss der Parasitenkunde. in Gustav Fischer, Stuttgart.
- Messmer, U. K. and J. Pfeilschifter** (2000) New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 22(10):878-881.
- Moldovan, N. I.** (2002) Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. *J Hematother Stem Cell Res* 11(2):179-194.

- Mora, J. R. and U. H. von Andrian** (2006) T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 27(5):235-243.
- Muller, M. M., B. B. Singer, E. Klaile, B. Obrink and L. Lucka** (2005) Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood* 105(10):3925-3934.
- Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada and M. Angel Medina** (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61(17):2224-2243.
- Murayama, T., O. M. Tepper, M. Silver, H. Ma, D. W. Losordo, J. M. Isner, T. Asahara and C. Kalka** (2002) Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* 30(8):967-972.
- Najjar, S. M.** (2002) Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab* 13(6):240-245.
- Nakamura, E. S., K. Koizumi, M. Kobayashi and I. Saiki** (2004) Inhibition of lymphangiogenesis-related properties of murine lymphatic endothelial cells and lymph node metastasis of lung cancer by the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270. *Cancer Sci* 95(1):25-31.
- Neumaier, M., S. Paululat, A. Chan, P. Matthaes and C. Wagener** (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22):10744-10748.
- Nicosia, R. F., W. H. Zhu and A. C. Aplin** (2006). Regulation of postangiogenic vascular regression. in *New Frontiers in Angiogenesis*. springer, Dordrecht.
- Nikolic, T., M. F. de Bruijn, M. B. Lutz and P. J. Leenen** (2003) Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int Immunol* 15(4):515-524.
- Nollau, P., H. Scheller, M. Kona-Horstmann, S. Rohde, F. Hagenmuller, C. Wagener and M. Neumaier** (1997) Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res* 57(12):2354-2357.
- Norrby, K.** (2006) In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 10(3):588-612.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage and J. Folkman** (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79(2):315-328.
- Obrink, B.** (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol* 9(5):616-626.
- Ocklind, C. and B. Obrink** (1982) Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *J Biol Chem* 257(12):6788-6795.
- Oh, P., Y. Li, J. Yu, E. Durr, K. M. Krasinska, L. A. Carver, J. E. Testa and J. E. Schnitzer** (2004) Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429(6992):629-635.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster** (2004) CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21(2):279-288.
- Oliver, G.** (2004) Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 4(1):35-45.
- Oliver, G. and K. Alitalo** (2005) The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:457-483.

- Oliver, G. and M. Detmar** (2002) The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 16(7):773-783.
- Olivier, M., D. J. Gregory and G. Forget** (2005) Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18(2):293-305.
- Panka, D. J. and J. W. Mier** (2003) Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 278(39):37632-37636.
- Pearson, R. D., D. A. Wheeler, L. H. Harrison and H. D. Kay** (1983) The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5(5):907-927.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore and S. Rafii** (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95(3):952-958.
- Petitclerc, E., S. Stromblad, T. L. von Schalscha, F. Mitjans, J. Piulats, A. M. Montgomery, D. A. Cheresh and P. C. Brooks** (1999) Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 59(11):2724-2730.
- Pettit, E. J. and F. S. Fay** (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev* 78(4):949-967.
- Prall, F., P. Nollau, M. Neumaier, H. D. Haubeck, Z. Drzeniek, U. Helmchen, T. Loning and C. Wagener** (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44(1):35-41.
- Ramachandra, L., R. S. Chu, D. Askew, E. H. Noss, D. H. Canaday, N. S. Potter, A. Johnsen, A. M. Krieg, J. G. Nedrud, W. H. Boom and C. V. Harding** (1999) Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev* 168:217-239.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier** (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* 290(5489):84-89.
- Rehman, J., J. Li, C. M. Orschell and K. L. March** (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107(8):1164-1169.
- Rehn, M., T. Veikkola, E. Kukk-Valdre, H. Nakamura, M. Ilmonen, C. Lombardo, T. Pihlajaniemi, K. Alitalo and K. Vuori** (2001) Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3):1024-1029.
- Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell and E. C. Butcher** (2001) CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194(10):1541-1547.
- Religa, P., R. Cao, M. Bjorndahl, Z. Zhou, Z. Zhu and Y. Cao** (2005) Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels. *Blood* 106(13):4184-4190.
- Reynolds, E. S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Risau, W. and I. Flamme** (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Ritter, U. and H. Körner** (2002) Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24(6):295-301.

- Ritter, U., A. Lechner, K. Scharl, Z. Kiafard, J. Zwirner and H. Körner** (2008) TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol* 197(1):29-37.
- Ritter, U., J. Mattner, J. S. Rocha, C. Bogdan and H. Körner** (2004a) The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect* 6(6):559-565.
- Ritter, U., F. Wiede, D. Mielenz, Z. Kiafard, J. Zwirner and H. Körner** (2004b) Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived and spleen dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76(2):472-476.
- Rohde, E., C. Malischnik, D. Thaler, T. Maierhofer, W. Linkesch, G. Lanzer, C. Guelly and D. Strunk** (2006) Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 24(2):357-367.
- Rollins, B. J., A. Walz and M. Baggiolini** (1991) Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78(4):1112-1116.
- Rosenberg, M., P. Nedellec, S. Jothy, D. Fleiszer, C. Turbide and N. Beauchemin** (1993) The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 53(20):4938-4945.
- Roth, J. and J. Ritter** (2006). Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. in *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, Berlin.
- Rundhaug, J. E.** (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9(2):267-285.
- Rutkowski, J. M., K. C. Boardman and M. A. Swartz** (2006) Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(3):H1402-1410.
- Ruzinova, M. B., R. A. Schoer, W. Gerald, J. E. Egan, P. P. Pandolfi, S. Raffi, K. Manova, V. Mittal and R. Benezra** (2003) Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 4(4):277-289.
- Sabin, F. R.** (1902) The lymphatic system in human embryos, with considerations of the morphology of the system as a whole. *Am. J. Pathol.* 1367-389.
- Sacks, D. and N. Noben-Trauth** (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2(11):845-858.
- Sadekova, S., N. Lamarche-Vane, X. Li and N. Beauchemin** (2000) The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol Biol Cell* 11(1):65-77.
- Sadick, M. D., R. M. Locksley, C. Tubbs and H. V. Raff** (1986) Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to *Leishmania* antigens in vitro. *J Immunol* 136(2):655-661.
- Saharinen, P. and T. V. Petrova** (2004) Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 101476-87.
- Salven, P., S. Mustjoki, R. Alitalo, K. Alitalo and S. Raffi** (2003) VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 101(1):168-172.
- Scharton-Kersten, T. and P. Scott** (1995) The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J Leukoc Biol* 57(4):515-522.

- Schatteman, G. C., O. Awad and M. Dunnwald** (2006). The old and the new bone marrow-derived endothelial cell precursors. in *New Frontiers in Angiogenesis*. Springer, Dordrecht.
- Schledzewski, K., M. Falkowski, G. Moldenhauer, P. Metharom, J. Kzhyshkowska, R. Ganss, A. Demory, B. Falkowska-Hansen, H. Kurzen, S. Ugurel, G. Geginat, B. Arnold and S. Goerdt** (2006) Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol* 209(1):67-77.
- Schmeisser, A., C. D. Garlich, H. Zhang, S. Eskafi, C. Graffy, J. Ludwig, R. H. Strasser and W. G. Daniel** (2001) Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49(3):671-680.
- Schmeisser, A. and R. H. Strasser** (2002) Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res* 11(1):69-79.
- Schneider, M., K. Othman-Hassan, B. Christ and J. Wilting** (1999) Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn* 216(4-5):311-319.
- Schönian, G., A. Al-Jawabreh and W. Presber** (2004) Diagnosis of Leishmania infections. *J Lab Med* 28(6):498-505.
- Schoppmann, S. F., A. Fenzl, K. Nagy, S. Unger, G. Bayer, S. Geleff, M. Gnant, R. Horvat, R. Jakesz and P. Birner** (2006) VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery* 139(6):839-846.
- Schulz, A., K. Mellenthin, G. Schönian, B. Fleischer and C. Drosten** (2003) Detection, differentiation and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 41(4):1529-1535.
- Schumann, D., C. J. Chen, B. Kaplan and J. E. Shively** (2001) Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J Biol Chem* 276(50):47421-47433.
- Scott, P. and T. Scharton** (1994) Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with Leishmania major. *Ann N Y Acad Sci* 730:84-92.
- Sharifi, B. G., Z. Zeng, L. Wang, L. Song, H. Chen, M. Qin, M. R. Sierra-Honigmann, S. Wachsmann-Hogiu and P. K. Shah** (2006) Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(6):1273-1280.
- Singer, B. B., E. Klaile, I. Scheffrahn, M. M. Muller, R. Kammerer, W. Reutter, B. Obrink and L. Lucka** (2005) CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur J Immunol* 35(6):1949-1959.
- Singer, B. B., I. Scheffrahn and B. Obrink** (2000) The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 60(5):1236-1244.
- Skovseth, D. K., M. J. Veuger, D. R. Sorensen, P. M. De Angelis and G. Haraldsen** (2005) Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo. *Blood* 105(3):1044-1051.

- Skubitz, K. M., K. D. Campbell, K. Ahmed and A. P. Skubitz** (1995) CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 155(11):5382-5390.
- Skubitz, K. M., K. D. Campbell and A. P. Skubitz** (2001) Synthetic peptides from the N-domains of CEACAMs activate neutrophils. *J Pept Res* 58(6):515-526.
- Spath, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco and S. M. Beverley** (2000) Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):9258-9263.
- Stamenkovic, I.** (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200(4):448-464.
- Sundberg, U., N. Beauchemin and B. Obrink** (2004) The cytoplasmic domain of CEACAM1-L controls its lateral localization and the organization of desmosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 117(Pt 7):1091-1104.
- Sundberg, U. and B. Obrink** (2002) CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 115(Pt 6):1273-1284.
- Sunderkötter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets and P. J. Leenen** (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172(7):4410-4417.
- Sunderkötter, C., K. Steinbrink, M. Goebeler, R. Bhardwaj and C. Sorg** (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55(3):410-422.
- Sypek, J. P., C. L. Chung, S. E. Mayor, J. M. Subramanyam, S. J. Goldman, D. S. Sieburth, S. F. Wolf and R. G. Schaub** (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177(6):1797-1802.
- Tammela, T., T. V. Petrova and K. Alitalo** (2005) Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol* 15(8):434-441.
- Tammela, T., A. Saaristo, T. Holopainen, J. Lyytikka, A. Kotronen, M. Pitkonen, U. Abo-Ramadan, S. Yla-Herttuala, T. V. Petrova and K. Alitalo** (2007) Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 13(12):1458-1466.
- Tauber, A. I.** (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(11):897-901.
- Terstappen, L. W., Z. Hollander, H. Meiners and M. R. Loken** (1990) Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leukoc Biol* 48(2):138-148.
- Thies, A., I. Moll, J. Berger, C. Wagener, J. Brummer, H. J. Schulze, G. Brunner and U. Schumacher** (2002) CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 20(10):2530-2536.
- Thurston, G.** (2002) Complementary actions of VEGF and angiopoietins on blood vessel permeability and growth in mice. *J Anat* 200(5):529.
- Tilki, D., S. Irmak, L. Oliveira-Ferrer, J. Hauschild, K. Miethel, H. Atakaya, P. Hammerer, M. G. Friedrich, G. Schuch, R. Galalae, C. G. Stief, E. Kilic, H. Huland and S. Ergun** (2006) CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene* 25(36):4965-4974.

- Timmermans, F., F. Van Hauwermeiren, M. De Smedt, R. Raedt, F. Plasschaert, M. L. De Buyzere, T. C. Gillebert, J. Plum and B. Vandekerckhove** (2007) Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(7):1572-1579.
- Toleman, M., E. Aho and M. Virji** (2001) Expression of pathogen-like Opa adhesins in commensal *Neisseria*: genetic and functional analysis. *Cell Microbiol* 3(1):33-44.
- Tomanek, R. J. and G. C. Schatteman** (2000) Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 261(3):126-135.
- Turbide, C., T. Kunath, E. Daniels and N. Beauchemin** (1997) Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res* 57(13):2781-2788.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky** (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-852.
- Valledor, A. F., F. E. Borrás, M. Cullell-Young and A. Celada** (1998) Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63(4):405-417.
- Vaughn, D. E. and P. J. Bjorkman** (1996) The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 16(2):261-273.
- Venneri, M. A., M. De Palma, M. Ponzoni, F. Pucci, C. Scielzo, E. Zonari, R. Mazziere, C. Doglioni and L. Naldini** (2007) Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109(12):5276-5285.
- Virji, M., D. Evans, J. Griffith, D. Hill, L. Serino, A. Hadfield and S. M. Watt** (2000) Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 36(4):784-795.
- Virji, M., K. Makepeace, D. J. Ferguson and S. M. Watt** (1996) Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *neisseriae*. *Mol Microbiol* 22(5):941-950.
- Von Stebut, E.** (2007) Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 17(2):115-122.
- Von Stebut, E. and C. Sunderkötter** (2007) Kutane Leishmaniasis. *Der Hautarzt* 58(5):445-459.
- Von Stebut, E. and M. C. Udey** (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 6(12):1102-1109.
- Wagener, C. and S. Ergün** (2000) Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res* 261(1):19-24.
- Warburg, A. and Y. Schlein** (1986) The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 35(5):926-930.
- Watt, S. M., A. M. Teixeira, G. Q. Zhou, R. Doyonnas, Y. Zhang, F. Grunert, R. S. Blumberg, M. Kuroki, K. M. Skubitz and P. A. Bates** (2001) Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* 98(5):1469-1479.
- Weiss, R., S. Scheibhofer, J. Thalhamer, T. Bickert, U. Richardt, B. Fleischer and U. Ritter** (2006) Epidermal inoculation of *Leishmania*-antigen by gold bombardment results in a chronic form of leishmaniasis. *Vaccine* 24:2525-2533.
- Wigle, J. T. and G. Oliver** (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98(6):769-778.

- Wilhelm, P., U. Ritter, S. Labbow, N. Donhauser, M. Röllinghoff, C. Bogdan and H. Körner** (2001) Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol* 166(6):4012-4019.
- Wilting, J. and J. Becker** (2006) Two endothelial cell lines derived from the somite. *Anat Embryol (Berl)* 211 Suppl 157-63.
- Wilting, J., M. Papoutsi, K. Buttler and J. Becker** (2007). Embryonic Development of the lymphovascular system and tumor lymphangiogenesis. in *Cancer Metastasis and the Lymphovascular System*. Springer, New York.
- Woelbing, F., S. L. Kostka, K. Moelle, Y. Belkaid, C. Sunderkoetter, S. Verbeek, A. Waisman, A. P. Nigg, J. Knop, M. C. Udey and E. von Stebut** (2006) Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203(1):177-188.
- Wright, T. J., L. Leach, P. E. Shaw and P. Jones** (2002) Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res* 280(2):159-168.
- Xu, H., M. Chen, D. M. Reid and J. V. Forrester** (2007) LYVE-1-positive macrophages are present in normal murine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(5):2162-2171.
- Yaniv, K., S. Isogai, D. Castranova, L. Dye, J. Hitomi and B. M. Weinstein** (2006) Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 12(6):711-716.
- Yu, Q., E. M. Chow, H. Wong, J. Gu, O. Mandelboim, S. D. Gray-Owen and M. A. Ostrowski** (2006) CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. *J Biol Chem* 281(51):39179-39193.
- Zebhauser, R., R. Kammerer, A. Eisenried, A. McLellan, T. Moore and W. Zimmermann** (2005) Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* 86(5):566-580.
- Zengin, E., F. Chalajour, U. M. Gehling, W. D. Ito, H. Treede, H. Lauke, J. Weil, H. Reichenspurner, N. Kilic and S. Ergün** (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133(8):1543-1551.

7 Anhang

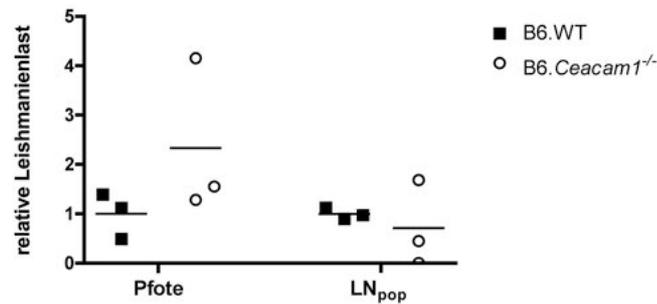


Abb. 7.1 Leishmanienlast in Geweben von infizierten B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. Mit einer real-time PCR-Analyse wurde die Leishmanienlast sieben Wochen nach Infektion mit *L. major* in infizierten Pfoten und drainierenden poplitealen Lymphknoten (LN_{pop}) bestimmt (vgl. Schulz *et al.*, 2003). Zur Vergleichbarkeit wurde auf Maus-Aktin normiert. Dargestellt ist die relative Leishmanienlast in Gewebe von B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen bezogen auf die Leishmanienlast in Gewebe von B6.WT Mäusen. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Leishmanien in infizierten Pfoten und drainierenden Lymphknoten von B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen vergleichbar war. Die Daten stammen aus einem Versuch mit drei Mäusen.

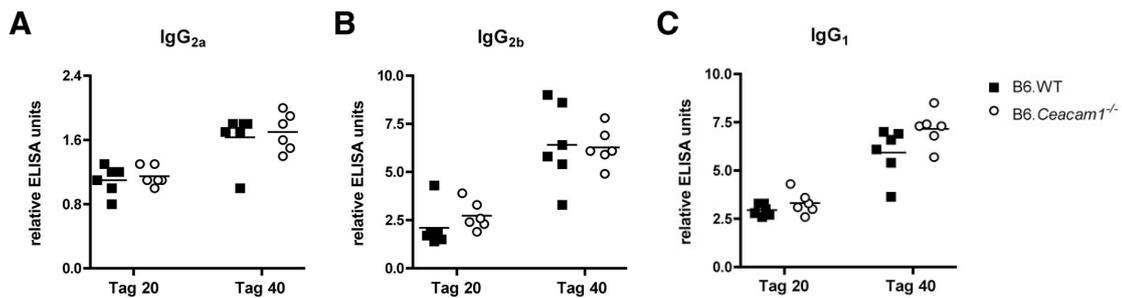


Abb. 7.2 Leishmanien-spezifische Antikörper im Serum von B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. 20 und 40 Tage nach Infektion mit *L. major* wurde den Mäusen Blut entnommen und Leishmanien-spezifische Antikörper verschiedener Subtypen mittels ELISA detektiert (vgl. Weiss *et al.*, 2006). Dabei stellt sich heraus, dass zu allen Zeitpunkten in beiden Mausgruppen identische Titer an Leishmanien-spezifischem IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₁ im Blut vorlagen. Die Daten stammen aus einem Experiment mit sechs Mäusen.

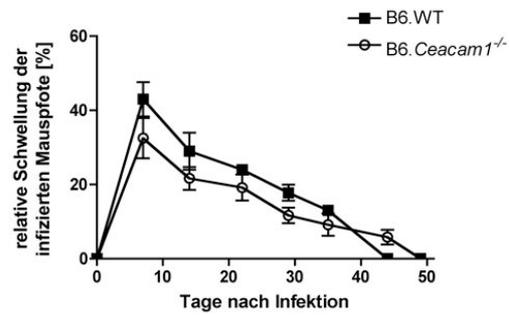


Abb. 7.3 Verlauf der Reinfektion in B6.WT und B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen. Nach Abheilen der Primärinfektion wurden die Tiere mit *L. major* in die linke Pfote reinfiziert. Zur Kontrolle des Verlaufs wurde der Durchmesser der infizierten Pfoten wöchentlich gemessen und mit der abgeheilten rechten Pfote verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von einem Versuch mit sechs Mäusen pro Gruppe.