

Aus dem Institut für Anatomie I
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. med. G. M. Rune

Direkte Interaktion zwischen dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1
und dem Angiogeneseinhibitor Endostatin

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Serap Yilmaz

aus Pinneberg/Deutschland

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Fiedler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Brümmer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Ergün

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	6
2.1. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	7
2.2. CEACAM1(Carcinoembryonal Antigen-related Cell Adhaesion Molecule1)	10
2.3. Endostatin	12
2.4. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Antikörper, Chemikalien und Substanzen	19
3.2. Herstellung von Granulozytenextrakt, Aufreinigung von CEACAM1	21
3.3. Herstellung von rekombinantem Endostatin und Biotin-Konjugation	22
3.4. Immunhistochemie am Glomus Caroticumtumor und Prostatakarzinom	23
3.5. SDS-PAGE und Western Blot	26
3.6. Overlay-Assay mittels Western Blot	27
3.7. Overlay-Assay mittels Biotin-konjugiertem Endostatin	28
3.8. Ko-Immunopräzipitation mit Immunaффinitätschromatographie	29
4. Ergebnisse	31
4.1. Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 in neuformierten Blutgefäßen eines Glomus Caroticumtumors	31
4.2. Nachweis einer Ko-Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 in neuformierten Blutgefäßen eines Prostatakarzinoms	33
4.3. Nachweis einer Bindung von rekombinantem Endostatin an CEACAM1 im Granulozytenextrakt und an aufgereinigte CEACAM1-Form	36
4.3.1. Bindungsuntersuchungen mittels Overlay-Assay	38
4.3.2. Bindung von Endostatin und CEACAM1 im Ko-Immunopräzipitationsversuch	41

5. Diskussion	43
5.1. Endostatin und CEACAM1 sind in neuformierten Blutgefäßen phasenabhängig ko-lokalisiert.	45
5.2. Endostatin bindet an CEACAM1 aus Granulozytenextrakt und an die aufgereinigte CEACAM1-Form.	46
6. Abkürzungsverzeichnis	50
7. Literaturverzeichnis	51
8. Danksagung	68
9. Lebenslauf	69
10. Eidesstattliche Versicherung	70

1. Zusammenfassung

Angiogenese beschreibt die Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen. Angiogenese findet sowohl in physiologischen als auch pathologischen Vorgängen, wie z.B. in malignen Tumoren statt. So konnte gezeigt werden, dass Angiogenese für das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren von essentieller Bedeutung ist. Angiogenese wird durch ein Zusammenwirken von pro- und antiangiogenetisch wirksamen Faktoren reguliert. Auch an den morphogenetischen Veränderungen der neugebildeten Blutgefäße sind eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren involviert, unter denen die Zelladhäsionsmoleküle neben den pro- und antiangiogenetisch wirksamen Faktoren eine bedeutende Rolle spielen. Während dieser morphogenetischen Vorgänge finden direkte und indirekte Interaktionen unter den beteiligten Faktoren statt, wobei diese Interaktionen teilweise von dem jeweiligen Gefäßentwicklungsstadium abhängig sind. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 liegt hauptsächlich in Membran-gebundener Form vor, es gibt aber lösliche Formen. Beide Formen von CEACAM1 wirken offensichtlich proangiogenetisch. Endostatin ist ein potenter Angiogeneseinhibitor, welches seine antiangiogenetischen Eigenschaften nach der Abspaltung vom Kollagen 18 entwickelt. Bis zum Beginn dieser Arbeit war berichtet worden, dass sowohl CEACAM1 als auch Endostatin besonders stark in der Wand neuformierter Blutgefäße nachzuweisen sind. Ob beide Moleküle hierbei miteinander agieren und somit durch Interaktion die Morphogenese der Blutgefäße beeinflussen, war unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Interaktion beider Faktoren besteht. In immunhistochemischen Untersuchungen von Blutgefäßen eines Glomus Caroticumtumors konnte sowohl CEACAM1 als auch Endostatin an der Blutgefäßwand nachgewiesen werden. Nachfolgende Untersuchungen am Prostatakarzinomgewebe zeigten an den Tumorblutgefäßen mitunter eine stadienabhängige Ko-Lokalisation beider Faktoren. Weiterhin konnte in proteinbiochemischen Bindungsversuchen unter Verwendung von rekombinant hergestelltem Endostatin und CEACAM1 aus Granulozytenextrakten gezeigt werden, dass Endostatin an CEACAM1 bindet. Diese Bindung konnte in Ko-Immunopräzipitationsuntersuchungen bestätigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Endostatin offensichtlich direkt an CEACAM1 bindet und dass Endostatin in einem bestimmten Abschnitt der Gefäßentwicklung, zum Beispiel im Rahmen der Tumervaskularisation, mit CEACAM1 gemeinsam in der Blutgefäßwand ko-lokalisiert ist. Da dies in einer frühen Phase der Gefäßentwicklung stattfindet, könnte diese Interaktion die Gefäßwandstabilisierung und somit die Gefäßreifung beeinflussen. Ob und in welcher Form diese Interaktion beider Faktoren die Formierung neuer Blutgefäße moduliert, in pro- oder antiangiogenetischer Weise eingreift, bedarf weiterer Untersuchungen.

2. Einleitung

Angiogenese beschreibt die Aussprossung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman, 1984; Risau, 1997; Carmeliet, 2000). Dieser Prozess findet sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Vorgängen statt. Somit ist Angiogenese ein wesentlicher Bestandteil des Auf- und Abbaus des Endometriums, bei zyklischen Veränderungen des Ovars, bei der Wundheilung, bei pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum und Metastasierung (Folkman und Shing, 1992; Modlich et al., 1996). Des Weiteren spielt Angiogenese bei diabetischer Mikro- und Makroangiopathie und bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis eine wichtige Rolle (Folkman, 1995).

Hierbei bilden die strukturelle Formation und Reifung von Blutgefäßen komplexe Prozesse, die unter physiologischen Bedingungen aufeinander abgestimmt sind und folgende Schritte beinhalten (Folkman and D'Amore, 1996; Hanahan, 1997). Die Aussprossung der neuen Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen wird zunächst über eine Zunahme der lokalen Gefäßdurchlässigkeit und die damit verbundene Extravasation von Plasmaproteinen wie z.B. Fibrinogen initiiert (Carmeliet, 2000). Diese Permeabilitätssteigerung erfolgt meistens an den Stellen der Gefäßwand, an denen die zukünftigen Gefäße aussprossen sollen. Es kommt dann zu einer Degradierung der Basalmembran durch Proteasen der Metalloproteinasenfamilie (Vu et al., 1998; Koshikawa et al., 2005). Hierdurch wird schließlich der Endothelzellverband völlig aufgelöst und es kommt dann zur Migration und Proliferation von Endothelzellen. Die neuen Endothelzellen werden von den pro-angiogenetischen Faktoren in der Umgebung angelockt und werden somit zu einer gerichteten Migration angeregt. Dieser Prozess endet mit der Formierung neuer Kapillaren, die zunächst nur aus den so genannten endothelialen Tubes (Röhren) bestehen (Risau und Flamme, 1995). Damit ist der erste Schritt der Gefäßneubildung vollzogen. In weiteren Schritten erfolgt die Ausreifung der neugebildeten Blutgefäße. Diese umfasst die

Neubildung einer Basalmembran und die Integration der peri-endothelialen Zellen, wie Perizyten (bei Kapillaren) oder glatten Muskelzellen (bei größeren Gefäßen) in die Gefäßwand, welche die Struktur der neugebildeten Gefäße unterstützt und stabilisiert (Folkman und D'Amore, 1996; Hanahan, 1997; Ergün et al., 2005).

Der Prozess der Angiogenese wird durch das Zusammenwirken von Angiogeneseaktivatoren initiiert und durch ein Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese reguliert (Hanahan und Folkman, 1996), von denen einige potente Vertreter unten kurz beschrieben werden sollen.

2.1. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Zu den bekanntesten Angiogeneseaktivatoren gehören der VEGF, der FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), der PDGF (Platelet Derived Growth Factor), das Angiogenin, das Interleukin 8, der Granulozyten-stimulierende Wachstumsfaktor G-CSF, Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 mit den dazu gehörigen Zelloberflächenrezeptoren. Der VEGF ist einer der zentralen Mediatoren der Angiogenese. Die VEGF-Expression wird durch viele Hormone, Zytokine (z.B. b-FGF (Stavri et al., 1995), TGF- β (Houck et al., 1992), Interleukin 6, PDGF, EGF), Oncogene (Fernandez et al., 2001) und Ausfall von Tumorsuppressorgenen induziert (Folkman and Kalluri, 2003). Weiterhin führen ATP-Mangel und Hypoxie zu einer verstärkten VEGF-Expression (Sheweiki et al., 1992; Levy et al., 1996). VEGF ist ein Glykopeptid und weist als Monomer ein Molekulargewicht von ca. 22-24 kDa und als Dimer ein Molekulargewicht von ca. 42-48 kDa auf. Die VEGF-Familie umfasst heute 5 Mitglieder wie VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. Der VEGF-A hat mehrere Isoformen, welche durch alternatives *Splicen* der pre-mRNA entstehen und sich in der Aminosäurekettenlänge unterscheiden (VEGF¹²¹, VEGF¹⁴⁵, VEGF¹⁶⁵, VEGF¹⁸⁹ und VEGF²⁰⁶) (Klagsbrun and D'Amore, 1996). Die Splicevarianten des VEGF-A unterscheiden

sich in der Löslichkeit und in ihrer Bindungsfähigkeit zu Heparin (Olofsson et al., 1996; Joukov et al., 1996). Der VEGF-A bindet an den Rezeptoren VEGFR-1 (fms-like tyrosin kinase, kurz FLT-1) und VEGFR-2 (kinase-insert domain receptor, kurz FLK-1 oder beim Menschen KDR) (DeVries et al., 1992; Terman et al., 1992). Der VEGF-C und VEGF-D interagieren mit dem Rezeptor VEGFR-2, besitzen jedoch eine höhere Affinität zu dem Rezeptor VEGFR-3 (FLT-4) (Kaipainen et al., 1995; Achen et al., 1998). Die genannten VEGF-Rezeptoren gehören zur Familie der transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die VEGFR-1 und -2 werden hauptsächlich auf Endothelzellen, aber auch auf normalen und malignen hämatopoetischen Progenitorzellen (z.B. AML-Blasten) und Zellen einiger solider Tumoren exprimiert (O'Byrne et al., 2000; Kato et al., 2002). Der VEGFR-3 wird bevorzugt auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert. Die Interaktion der VEGFs mit ihren Rezeptoren führt in der Regel über Rezeptordimerisierung zu deren Aktivierung mit anschließender Autophosphorylierung und Stimulierung intrazellulärer Signalketten.

Der VEGF-A führt zur Angiogenese durch Aktivierung der Migration und Proliferation von Endothelzellen mit anschließender Formierung endothelialer Tubes (Connolly et al., 1991; Ferrara et al., 1999). Die Expression der VEGF-Familie korreliert mit dem Blutgefäßwachstum während der Embryogenese (Breier et al., 1992; Peters et al., 1993). Weiterhin stellt der VEGF einen essentiellen Faktor für die Entwicklung des embryologischen Gefäßsystems und seine Aufrechterhaltung dar, wie Untersuchungen an Knock-out-Mäusen ergaben. Es konnte gezeigt werden, dass bereits der Verlust eines Allels des VEGF-Gens letal für den Organismus ist (Carmeliet et al., 1996).

Der VEGF ist außerdem ein potenter Gefäßpermeabilitätsfaktor, der die Gefäßpermeabilität um etwa 50.000 fache stärker als Histamin steigert (Brown et al., 1993; Senger et al., 1993). Diese Eigenschaften weisen die Isoformen von VEGF-A in unterschiedlicher Ausprägung auf. Nicht nur während der Angiogenese sondern auch unter normalen Bedingungen spielt VEGF-A für die

Regulation der Gefäßpermeabilität eine essentielle Rolle. Hinsichtlich der Angiogenese ist anzumerken, dass die pathologische Steigerung der Gefäßpermeabilität, z.B. durch eine erhöhte Expression von VEGF, in den meisten Fällen den initialen Schritt zur Aktivierung der Angiogenese bedeutet. Dies ist in den meisten Fällen mit der völligen Destabilisierung der Gefäßwand und der strukturellen Desintegration der Endothelzellen sowie der Loslösung der so genannten peri-endothelialen Zellen von der Gefäßwand verbunden (Ergün et al., 2005). Vollständigkeitshalber muss hier erwähnt werden, dass VEGF-C und -D neben der Angiogenese insbesondere für die Lymphangiogenese von entscheidender Bedeutung sind (Mandriota et al., 2001; Alitalo und Carmeliet, 2002).

In einer neueren Studie wurde aufgezeigt, dass Endothelzellen direkt an immobilisierten VEGF-Isoformen VEGF¹⁶⁵ und VEGF¹⁸⁹ adhären können (Hutchings et al., 2003). Offensichtlich erfolgt diese Bindung durch Integrine an der Zelloberfläche. Weiterhin fördert an Extrazellulärmatrix gebundener VEGF neben der Endothelzelladhäsion auch die Migration und das Überleben der Endothelzellen (Hutchings et al., 2003).

Ein wichtiger Stimulus, der die Expression von VEGF steigert, ist Hypoxie (Shweiki et al., 1992). Dieser Mechanismus spielt insbesondere bei der Vaskularisierung von Tumoren eine wichtige Rolle. Beispielsweise werden in hypoxischen Tumorbereichen die heterodimeren Transkriptionsfaktoren HIF-1 α / HIF-1 β (hypoxia inducible factor 1 α / β) aktiviert, welche zu einer Steigerung der VEGF-mRNA-Transkription führen und damit die VEGF-Expression steigern (Levy et al., 1996).

Neben dem VEGF und anderen oben kurz erwähnten löslichen Angiogenesefaktoren spielen auch Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, da sie in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind und somit für die morphogenetischen Prozesse während der Formierung neuer Blutgefäße von entscheidender Bedeutung sind (Dejana, 1996;

Bischoff, 1997). Zelladhäsionsmoleküle sind unter anderem Substratadhäsionsmoleküle wie die Integrine, Calcium-abhängige Cadherine (z.B.: für Endothelzellen VE-Cadherin), heterotypische Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Intercellular Adhaesion Molecule I), N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) und das CEACAM1 (Carcinoembryonal Antigen-related Cell Adhaesion Molecule 1). Mit wenigen Ausnahmen sind die Mitglieder der heterotypischen Adhäsionsmoleküle transmembranöse Moleküle. In ihrem extrazytoplasmatischen Anteil haben sie Immunglobulin-ähnliche Domänen. Über ihren intrazytoplasmatischen Anteil vermitteln sie Signale an das Zytoskelett (Heicappell, 1996). Ein detailliertes Darstellen der Rolle von Zelladhäsionsmolekülen bei der Angiogenese würde den Umfang der vorliegenden Arbeit überschreiten. Daher soll hier nur auf die Bedeutung von CEACAM1 bei der Angiogenese näher eingegangen werden, das pro-angiogenetisch wirkt und als morphogenetischer Effektor von VEGF funktioniert (Ergün et al., 2000; Kilic et al., 2005).

2.2. CEACAM1 (Carcinoembryonal Antigen-related Cell Adhaesion Molecule 1)

CEACAM1, früher auch bekannt als BGP (biliary glycoprotein) beim Menschen oder als C-CAM bei der Ratte, ist ein Zelladhäsionsmolekül, das in die Familie des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) gehört und strukturell in die Superfamilie der Immunglobuline einzuordnen ist (Öbrink et al., 1997). Es hat extra-, transmembranöse- und zytoplasmatische Domänen und ist in glykosylierter Form ca. 160 kDa schwer. Physiologisch ist CEACAM1 an der luminalen Oberfläche zahlreicher Epithelien, wie z.B. Epithel des Darms, der weiblichen Brustdrüse, der Prostata und der Harnblase sowie in Granulozyten, Lymphozyten und angiogenetisch aktivierten Endothelzellen exprimiert. Darüber hinaus kommt CEACAM1 in Endothelzellen der Blutgefäße von regenerativen Geweben, wie z.B. Plazenta, vor. Aber auch in pathologischen Vorgängen, beispielsweise in malignen Tumoren, wird CEACAM1 exprimiert. So konnte eine CEACAM1-Expression in einer Vielzahl von Karzinomen, wie z.B. in bestimmten Stadien des

Prostatakarzinoms (Busch et al., 2002), Bronchialkarzinom (Sienel et al., 2003) und anderen Malignomen, wie z.B. malignen Melanom (Thies et al., 2002) nachgewiesen werden. In glykosylierter Form kommt es in einer hohen Menge in menschlichen Granulozyten vor. Unter den aus menschlichen Granulozytenmembranen isolierten Glykoproteinen ist CEACAM1 der Hauptträger von Lewis^x Strukturen (Stocks et al., 1990; Lucka et al., 2004). Das lösliche CEACAM1 zeigt proangiogenetische Eigenschaften, indem es die Proliferation, die Chemotaxis und die Tubeformierung der Endothelzellen fördert. Zudem wird die CEACAM1-Expression in Endothelzellen durch VEGF sowohl auf der mRNA-Ebene als auch der Proteinebene erhöht (Ergün et al., 2000). Interessanterweise wird die durch VEGF induzierte Formierung von endothelialen Tubes durch simultane Applikation des monoklonalen Antikörpers gegen CEACAM1 4D1/C2 (Ergün et al., 2000) oder durch das zelluläre Ausschalten von CEACAM1 mittels siRNA (Kilic et al., 2005) gehemmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass CEACAM1 bei der Morphogenese der Blutgefäße als ein Haupteffektor des VEGF funktioniert (Ergün et al., 2000).

Interessante Aspekte ergaben immunhistochemische Untersuchungen von CEACAM1 an Geweben mit einer Neovaskularisation. CEACAM1 konnte an Endothelzellen kleiner unreifer Blutgefäße sowohl bei der physiologischen als auch bei der pathologischen Angiogenese, wie z.B. Tumovaskularisierung, nachgewiesen werden. Ausgereifte und ruhende Gefäße wiesen keine CEACAM1-Immunfärbung auf. Weitere Untersuchungen belegten, dass diese endotheliale Hochregulierung von CEACAM1 über bisher noch im Wesentlichen unbekanntes Signalwege zu einer Hochregulierung von proangiogenetischen Faktoren, wie z.B. VEGF, Interleukin-8, Angiopoitin-1 und Angiogenin führt (Kilic et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt in Epithelzellen eine Herunterregulierung von CEACAM1 zur Aktivierung der Angiogenese, wie kürzlich am Beispiel des Harnblasen-Karzinoms (Olivera-Ferrer et al., 2004) und des Prostatakarzinoms (Tilki et al., 2006) gezeigt wurde. Hierbei war vor allem die Expression von

VEGF-C und -D hochreguliert, so dass anzunehmen ist, dass CEACAM1 hierbei sowohl proangiogenetisch als auch lymphangiogenetisch wirkt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass CEACAM1 in einer frühen Phase der Gefäßentwicklung in Endothelzellen hoch reguliert wird und zusammen mit anderen proangiogenetischen Faktoren diese frühe Phase der Formierung von Kapillaren steuert. Dass CEACAM1 pro-angiogenetisch wirkt und auch die Arteriogenese, die das Wachstum der bereits bestehenden Kollateralgefäße beschreibt, aktiviert, konnte kürzlich durch in vivo-Untersuchungen an CEACAM1-transgenen und CEACAM1-Knock-out Mäusen bestätigt werden (Horst et al., 2006). Bisher gibt es jedoch wenige Informationen über mögliche Interaktionspartner von CEACAM1 in der frühen Phase der Gefäßneubildung.

2.3. Endostatin

Insbesondere haben die wissenschaftlichen Arbeiten der letzten 10 – 15 Jahre gezeigt, dass neben den Angiogeneseaktivatoren auch endogene Angiogeneseinhibitoren existieren. Unter den Angiogeneseinhibitoren sind bisher das Alpha-Interferon, Plättchen Faktor 4, Thrombospondin-1 und -2, Angiostatin, Prolaktin, löslicher basophiler FGF-Rezeptor, Tumstatin und Endostatin bekannt (Folkman und Kalluri, 2003). Im Folgenden soll auf die Rolle von Endostatin näher eingegangen werden.

Endostatin ist ein 20 kDa schweres c-terminales Fragment des Kollagen 18 und wurde von O'Reilly et al. 1997 als Angiogeneseinhibitor beschrieben. Es wird durch Enzyme wie Elastase und Cathepsin vom Kollagen 18 abgespalten und entwickelt in dieser Form seine anti-angiogenetischen Effekte (Wen et al., 1999; Felbor et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Endostatin als ein potenter Angiogeneseinhibitor Tumorwachstum in experimentellen Tumormodellen an Mäusen signifikant blockieren kann (O'Reilly et al., 1997; Dhanabal et al., 1999; Jia et al., 2004). In Untersuchungen, die sich mit der Blutgefäßentwicklung und deren

Reifung beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass Endostatin spezifisch die Endothelzellproliferation und besonders die Endothelzellmigration hemmt. Die Behandlung experimenteller Tumore mit rekombinant hergestelltem Endostatin führte zu einer Tumorregression bis hin zu minimalen Läsionen (O'Reilly et al., 1997). Immunhistochemisch zeigte sich eine Blockierung der Angiogenese bei verstärkter Apoptose der Tumorzellen (O'Reilly et al., 1997; Dhanabal et al., 1999).

Auch in *in vitro* Angiogeneseversuchen konnte gezeigt werden, dass Endostatin die Proliferation und Migration von Endothelzellen hemmt. Die durch VEGF initiierte Formierung von Kapillaren *in vitro* (endotheliale Tubes) wurde durch simultane Zugabe von Endostatin dahin gehend verändert, dass zwar die Anzahl der neu gebildeten Kapillaren zurück ging, aber die bestehenden Kapillaren beständiger und stabiler waren als die, die sich ohne eine zusätzliche Zugabe von Endostatin entwickelten. Ebenso war die Überlebenszeit der in *in vitro* Versuchen gebildeten Kapillaren unter der Behandlung mit Endostatin verlängert (Ergün et al., 2001). Endostatin lässt sich in immunhistochemischen Untersuchungen an der Basalmembran einiger Epithelien und der Gefäßwände sowie insbesondere auch an elastischen Fasern der Wände größerer Blutgefäße nachweisen (Miosge et al., 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass während der angiogenetischen Aktivierung die Immunfärbung für Endostatin bevorzugt in den kleinen Gefäßen zu finden ist. Die Färbung war besonders stark in der Wand der Blutgefäße, die eine Schicht von peri-endothelialen Zellen aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die großen reifen Blutgefäße, die mehrere Schichten glatter Muskulatur besaßen, keine Immunfärbung für Endostatin auf. Immunelektronenmikroskopisch konnte die Endostatin-Immunfärbung zwischen den Endothelzellen und der Basallamina sowie an den interendothelialen Kontaktzonen von neuen, strukturell noch instabilen Blutgefäßen lokalisiert werden (Ergün et al., 2001).

In experimentell gewachsenen Tumoren wurde die Endostatinimmunfärbung besonders in den Tumorgefäßen nachgewiesen, die in der Tumorrandzone zu finden waren. Die Tumorrandzone zeichnet sich durch eine besonders starke angiogenetische Aktivität aus. In dieser Zone erfolgt auch die Invasion des Tumorgewebes in die Umgebung, wo wiederum weitere Blutgefäße zur Aussprossung neuer Blutgefäße angeregt werden. Dass Endostatin insbesondere in den Blutgefäßen dieser Tumorzone nachzuweisen ist, deutet auf eine potentielle Rolle des Endostatins bei der Morphogenese neuer Blutgefäße hin. Tatsächlich wurde berichtet, dass Endostatin zur Stabilisierung und Reifung der neugebildeten Gefäße beiträgt (Ergün et al., 2001).

Der genaue Wirkmechanismus des Endostatins ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Eine Vielzahl von Interaktionen des Endostatins mit verschiedenen Angiogenese-relevanten Faktoren sind bisher publiziert worden (Dixelius et al., 2002, 2003; Nyberg et al., 2003; Yokoyama und Ramakrishnan, 2004). Insbesondere sind Untersuchungen im Hinblick auf mögliche Bindungspartner des Endostatins Gegenstand aktueller Forschungen.

Für den Ablauf der Angiogenese sind zwei Prozesse, nämlich Proliferation und Migration von Endothelzellen, notwendig. Die Migration von Endothelzellen erfordert einen kontinuierlichen Auf- und Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. In Zell-Zell-Interaktionen, wie sie in interzellulären Kontaktzonen zu finden sind, sind u.a. β -Catenine involviert. In einer neueren Studie konnte eine Interaktion des Endostatins mit β -Catenin nachgewiesen werden. Endostatin bewirkte eine Tyrosinphosphorylierung des β -Catenins, welches zu einer Lockerung bzw. Loslösung der Zell-Zell-Kontakte führte (Dixelius et al., 2002). Als weitere Interaktionspartner des Endostatins werden Integrine diskutiert (Rehn et al., 2001; Wickstrom et al., 2002; Zhang et al., 2006). Integrine sind heterodimere Rezeptorkomplexe, die Kontakte zur Extrazellulärmatrix herstellen und Signale in die Zelle übertragen können.

In Zell-Matrix-Interaktionen spielen Integrine eine essentielle Rolle. Integrine sind heterodimere transmembranöse Rezeptorkomplexe, die aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten aufgebaut sind. Die Untereinheiten werden in Alpha und Beta unterteilt, von denen bislang 18 verschiedene Alpha- und 8 verschiedene Beta-Subtypen bekannt sind (Stupack und Cheresch, 2004). Die verschiedenen Alpha- und Beta-Subtypen können sich zu verschiedenen Heterodimeren verbinden. Bislang sind 24 verschiedene Heterodimere bekannt (Ivaska et al., 2000). Integrine ermöglichen Zellkontakte zu Proteinen der Extrazellulärmatrix und dienen der Signalübertragung zwischen den Zellen und der Extrazellulärmatrix (Watt, 2002). Die bevorzugte Bindungssequenz von Integrinen ist eine Gly-Asp-Sequenz (RGD), wie sie in den Matrixproteinen Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen und Kollagen vorhanden ist (Ruoslahti et al., 1996). Auch bei der Angiogenese spielen die Integrine eine zentrale Rolle (Alghisi und Ruegg, 2006). Für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, welcher als ein Rezeptor des Vitronectins fungiert, konnte eine Beteiligung an der Angiogenese (Brooks et al., 1994) und der Vaskularisierung maligner Tumoren, wie Mammakarzinomen (Gasparini et al., 1998), beschrieben werden. Auch für das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin konnte eine Beteiligung an der Angiogenese nachgewiesen werden (Friedlander et al., 1996).

Im Gegenzug konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Antikörpern oder eines Antagonisten gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin die Angiogenese gehemmt und die Apoptose von angiogenetisch aktiven Blutgefäßen induziert werden kann (Brooks et al., 1994; Kumar, 2003). Gleichermäßen konnte in *in vitro* Untersuchungen durch Zugabe eines $\alpha_v\beta_3$ / $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Antagonisten S247 eine Hemmung der Angiogenese und in experimentellen Tumormodellen eine Hemmung des Wachstums von Kolonkarzinometastasen nachgewiesen werden (Reinmuth et al., 2003).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Endostatin an $\alpha_5\beta_1$ -Integrin bindet (Rehn et al., 2001; Sudhakar et al., 2003). Durch Verbesserung der Bindungseigenschaften des Endostatins mittels Kopplung einer RGD-Sequenz an das Endostatinmolekül konnte eine stärkere Bindung

an $\alpha_5\beta_1$ -Integrin erzielt werden. Hierdurch kam es zu einer Erhöhung der antiangiogenen Wirkungen des Endostatins mit einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums (Yokoyama und Ramakrishnan, 2004).

Als einen weiteren Erklärungsansatz für die anti-angiogenetische Wirkung des Endostatins wurde die Interaktion des Endostatins mit dem VEGFR-2 angenommen (Kim et al., 2002). In einer neueren Studie konnte in einem *in vivo* Modell mit Mäusen, denen Kolon-Karzinomzellen subkutan injiziert worden waren, gezeigt werden, dass unter einer Behandlung mit Endostatin einerseits das Tumorwachstum gehemmt wurde, andererseits die VEGFR-2-Expression in den Kolon-Karzinomzellen reduziert war (Jia et al., 2004). Die eigentliche VEGF-Expression wurde durch eine Endostatin-Behandlung nicht beeinflusst. Es gilt als gesichert, dass der VEGF/VEGFR-2-Signalweg der Wichtigste für die Tumorangiogenese, das Tumorwachstum und Metastasierung ist (Jia et al., 2004).

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Angiogenese ist der lokale Abbau der Extrazellulärmatrix, um u.a. eine Endothelzellmigration zu ermöglichen. Hierfür sind katalytische Enzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), erforderlich (Brinckerhoff und Matrisian, 2002). Eine Interaktion des Endostatins mit Metalloproteinasen konnte ebenfalls gezeigt werden. Endostatin hemmt die Aktivierung und die katalytische Aktivität bestimmter Tumor-assoziiierter Matrix-Metalloproteinasen, wie MMP-2, -9 und -13. Hierdurch konnte in den Versuchsreihen eine Endothelzell- und Tumorzellinvasion vermindert werden (Kim et al., 2000; Nyberg et al., 2003). In neueren Untersuchungen an der Retina von Mäusen konnte belegt werden, dass durch Endostatinbehandlung die durch VEGF induzierte Steigerung der Gefäßpermeabilität und die Neovaskularisation, die zur Ablösung der Netzhaut führen, signifikant reduziert werden können (Takahashi et al., 2003).

Zusammenfassend kann man aus diesen Daten hervorheben, dass Endostatin während der Entwicklung der Blutgefäße in einem frühen Stadium proteolytisch vom Kollagen 18 abgespalten und in die Morphogenese der Blutgefäße einbezogen wird. In dieser Phase der Gefäßentwicklung wird Endostatin somit in der Gefäßwand der unreifen Blutgefäße stark akkumuliert und nachweisbar. Anzunehmen ist daher, dass insbesondere in dieser frühen Phase der Gefäßentwicklung besondere Bindungspartner für Endostatin exprimiert bzw. lokalisiert werden müssen, damit sie Endostatin binden und zu der beobachteten Akkumulation des Endostatins in der Basalmembran und in endothelialen Kontaktzonen neuer Blutgefäße führen. Neben einer Reihe von Faktoren, welche als Bindungspartner für Endostatin in Frage kommen und oben kurz beschrieben wurden, ist es auffällig, dass sowohl Endostatin als auch CEACAM1 in einer frühen Phase der Gefäßentwicklung in der Wand der neuen Blutgefäße sichtbar werden und nach struktureller Reifung dieser Blutgefäße wieder verschwinden. Obwohl dies auch eine zufällige Erscheinung sein kann, so gilt es zu überprüfen, ob und in wieweit beide Faktoren während der Morphogenese neuer Blutgefäße miteinander interagieren können.

2.4. Zielsetzung

Ziel und somit die Arbeitshypothese der vorliegenden Dissertationsarbeit war, ob eine direkte Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin mit proteinbiochemischen Methoden nachweisbar ist und wenn ja, welche Bedeutung dies für die Formierung neuer Blutgefäße haben könnte. Zu diesem Ziel wurden zunächst immunhistochemische Versuche an Gewebeschnitten eines Tumors des Glomus caroticums durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl Endostatin als auch CEACAM1 in einem Teil der neuformierten Blutgefäße nachweisbar sind. Es folgten immunhistochemische Untersuchungen an Prostatakarzinomgewebe für Kollagen 18/Endostatin und CEACAM1. Hier konnte in einem Teil der Tumor-assoziierten Blutgefäße eine Ko-Lokalisation beider Faktoren in der Gefäßwand nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch

proteinbiochemische Verfahren eine Bindung des Endostatins an CEACAM1 nachgewiesen werden. In den Bindungsversuchen wurden Proteinextrakte aus menschlichen Granulozyten und das aus diesen Extrakten aufgereinigte CEACAM1 sowie rekombinant hergestelltes humanes Endostatin verwendet. Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche weisen auf eine Bindung beider Faktoren bzw. von Endostatin an CEACAM1 hin. Diese Bindung wurde anschließend durch Ko-Immunoprecipitationsversuche bestätigt.

Zusammenfassend ist fest zu halten, dass die hier aufgestellte Arbeitshypothese einer direkten Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin bestätigt wurde. Die Art der Interaktion, ob Endostatin beispielsweise als ein Ligand des CEACAM1 fungiert, bedarf noch weitergehender Untersuchungen. Auch sollte geklärt werden, in welcher Form diese Interaktion das Verhalten der Endothelzellen bei der Angiogenese beeinflusst, um damit nicht zuletzt die tatsächliche Relevanz dieser Interaktion hinsichtlich der Regulation der Angiogenese und Tumervaskularisierung besser verstehen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Antikörper, Chemikalien und Substanzen

Antikörper:

- hES: Der monoklonale Antikörper (mAb hES) gegen humanes Endostatin wurde von Dr. T. Boehm im Labor von Prof. Dr. J. Folkman (Children`s Hospital/ Harvard Medical School, Boston, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- Der polyklonale Antikörper (pAb hES) gegen humanes Endostatin mit Kreuzreaktivität gegen die Muttersubstanz von Endostatin, das Kollagen Typ 18, wurde käuflich erworben von R&D Systems (AF 570).
- 4D1/C2: Dieser monoklonale Antikörper gegen humanes CEACAM1 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Wagener, Institut für Klinische Chemie, UKE, überlassen.
- T84.1: Ein monoklonaler Antikörper gegen CEACAM1 mit Kreuzreaktivität gegen Antigene der CEA-Familie, wurde uns ebenfalls von Prof. Dr. C. Wagener, Institut für Klinische Chemie, UKE, überlassen.
- Anti-Mouse-IgG–Peroxidase bzw. anti-Rabbit-IgG–Peroxidase sind sekundäre Antikörper gegen Maus- bzw. Kaninchen-Immunglobulin-G Peroxidase gekoppelt, wurden bei der Firma ImmunoPure, PIERCE (Cat.:31432) erworben.

Chemikalien für SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidegelelektrophorese) und Western Blot:

- Zur Herstellung von zwei Trenngelen á 8%-Stärke wurden 4,6 ml Wasser, 2,7 ml Acrylamid, 2,5 ml Tris (pH 8,8), 100µl SDS 10%, 100 µl Ammoniumpersulfat, 6 µl TEMED angesetzt.

- Für das Sammelgel wurden 2,5 ml je Kammer eingesetzt: 3,4 ml Wasser, 830 µl Acrylamid, 630 µl Tris (pH 6,8), 50 µl SDS 10 %, 50 µl Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED.
- Nicht-reduziertes Laemmli-Puffer wurde wie folgt zusammengesetzt: 4% SDS, 12% Glycin, 50mM Tris (pH 6,8), 0,01% Bromphenolblau.
- Der Gibco Proteinmarker, Benchmark Prestained Protein Ladder, ist von Life Technologies erworben.
- Das Blockingreagenz besteht aus: 5% Magermilchpulver gelöst in TBS/TWEEN 0,1%.
- Das ECL-Reagenz wurde von Amersham, Braunschweig (RPN 2106) geliefert,
- die Nitrocellulose-Transfermembrane von PROTRAN Schleicher&Schuell, (Cat.: 10401196).
- Für das Laufpuffer wurde ein 5-facher Ansatz gewählt: 15,14 g Tris, 93,8 g Glycin, 5 ml SDS 20% ad 1 Liter Aqua dest. und für
- das Transferpuffer ein 10-facher Ansatz: 121 g Tris, 145 g Glycin ad 1 Liter Aqua dest.
- Laufkammer und Transferapparatur sind von BioRad, Miniprotean III.
- Fuji-RX Film.

Substanzen für Immunhistochemie:

- Normales Kaninchen Serum (2% NRS), Cat.: S2632, Sigma
- Normales Schweine Serum (2% NSS), DAKO Code X0901.
- Antikörper-Anti-Rabbit IgG Biotin gekoppelt, Cat.: E0353, DAKO
- Antikörper-Anti-Mouse IgG Biotin gekoppelt, Cat.: E0354, DAKO
- Mouse PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase), Cat.: P0850, DAKO
- Rabbit PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase), Cat.: Z0113, DAKO
- Antikörper-Anti-Mouse IgG Alkalische Phosphatase gekoppelt, Cat.: A-3563 Sigma.

- Avidin-Biotin-Komplex Reagenz, Vectastain ABC-Kit PK-6100 Standard Elite, Linaris
- Entwicklungslösung für Peroxidase-Reaktion: 45ml Phosphatpuffer (PB), 1ml DAB (Diaminobenzidinhydrochlorid), 100 µl Ammoniumchlorid, 900µl Nickelsulfat, 900µl Glucose 10%, 150µl Glucoseoxidase aus Ansatz: 1,2 mg auf 1ml Aqua dest.
- Entwicklungslösung für Alkalische Phosphatase-Reaktion (Verwendung bei Doppelfärbung im Prostatakarzinom)

3.2. Herstellung von Granulozytenextrakt und Aufreinigung von CEACAM1

Die Gewinnung von Proteinextrakten aus menschlichen Granulozyten, die CEACAM1 in einer großen Menge enthalten, erfolgte im Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Aus Vollblut von gesunden Spendern wurden die Granulozyten aus dem Buffy Coat nach der Methode Stoffel et al. (1993) isoliert. Zunächst wurde das Blut bei 2000 rpm über 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Zellsediment wurde in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, um die Erythrozytenfraktion zu entfernen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Granulozyten gewonnen. Um die Membranproteine der Granulozyten zu extrahieren, wurde Extraktionspuffer hinzugegeben, anschließend erneut zentrifugiert und der Überstand mit den Membranproteinen der Granulozyten aufgenommen. Die Proben wurden als Aliquots bei -20°C aufbewahrt und erst kurz vor der Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur aufgetaut. Für SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Overlay-Assays wurden 20 µl Proteinextrakt in 10 µl Laemmli-Puffer aufgenommen.

Aufreinigung des CEACAM1 aus dem Proteinextrakt menschlicher Granulozyten:

Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls im Institut für Klinische Chemie (UKE). Aus dem Proteinextrakt menschlicher Granulozyten wurde mittels eines

Immunaффinitätschromatographieverfahrens unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen CEACAM1 T84.1, welcher an eine CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt war, CEACAM1 aufgereinigt. Die gebundene CEACAM1-Fraktion wurde mit Glycinpuffer (0.2 M Glycin/HCL, pH 2,8) eluiert und anschließend über eine Gelfiltration aufgereinigt (Superdex 200 HR, Column Size XK 26/60, Pharmacia). Die CEACAM1-enthaltende Fraktion wurde anschließend über eine Ultrafiltration (Amicon Membran, Cutoff 100 kDa) konzentriert und mit Perchloracetazid (PCA) extrahiert. Die Reinheit wurde durch Silberfärbung kontrolliert. Die Spezifität wurde durch Western Blot-Analysen mit dem monoklonalen CEACAM1-Antikörper (4D1/C2) kontrolliert. Die Western Blot-Analyse ergab eine Bande bei ca. 160 kDa. Die Probe wurde im Verhältnis 2:1 mit Laemmli-Puffer gemischt.

3.3. Herstellung von rekombinantem Endostatin und Biotin-Konjugation von Endostatin

Die rekombinante Herstellung von humanem Endostatin wurde mittels eines bakteriellen Expressionsvektors in *E. coli* durchgeführt. Vor Beginn der Endostatinsequenz wurde ein His-TAG (6 Histidin-Reste) integriert, so dass rekombinantes Endostatin mit dem His-TAG fusioniert gebildet wurde. An Hand dieses His-TAG konnte in Zusammenarbeit mit Hr. Dr. Ebrahimnejad (Institut für Klinische Chemie, UKE) rekombinantes Endostatin mittels einer Nickel-Chelatchromatographie (Ni-Nitriloessigsäure-Säule) aufgereinigt werden. Die Reinheit der Probe wurde durch Silberfärbung und die Spezifität durch Western Blot-Analysen nachgewiesen. Die Konzentration des Endostatins betrug 300 ng/μl. Die Endostatinproben wurden in Aliquots bei -20°C aufbewahrt und kurz vor der Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur aufgetaut.

Biotin-Konjugation von Endostatin:

Von der Firma Sigma (H-1759) wurde 5 mg NHS-Biotin bezogen, dieses wurde in 1 ml DMF (Dimethylformamid) (Merck) gelöst. Die Biotinkonzentration betrug 10 µg/µl. Das Mengenverhältnis zur Koppelung sah für 1 mg Endostatin eine Biotinmenge von 50 µg vor. Für die Probe wurde 500 µl Endostatin mit 1,5 µl Biotin vermischt und inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf dem Überkopfschüttler. Wichtig ist für den Umgang mit biotinhaltigen Proben, dass man Glasgefäße benutzen und die Probe vor Lichteinfall schützen sollte. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes, überschüssiges Biotin durch ein Dialyseverfahren entfernt. Das nun Biotin-konjugierte Endostatin wurde in einem Mengenverhältnis von 1:50 in PBS gelöst und in den Overlay-Assays eingesetzt.

3.4. Immunhistochemie

Glomus Caroticumtumor

Für immunhistochemische Untersuchungen an Glomus Caroticumtumoren wurden aus den Tumorpräparaten unmittelbar nach der operativen Resektion kleine Gewebeblöcke entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von diesen Gewebeblöcken wurden Kryostatschnitte in Serie von 6-8µm Dicke hergestellt, auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und für ca. 5 Min. luftgetrocknet. Danach erfolgte die Fixierung der Schnitte mit frisch angesetztem Paraformaldehyd (4%) für 15 Min. Die Schnitte wurden der immunhistochemischen Behandlung unterzogen, bei der folgende Antikörper verwendet wurden:

- a.) monoklonaler Antikörper gegen humanes Endostatin: hES (1:10000) (300ng/ml)
- b.) monoklonaler Antikörper gegen CEACAM1: 4D1/C2 (1:200) (1µg/ml).

Die Antigene des Endostatin und CEACAM1 wurden nach der von Davidoff und Schulze (1990) beschriebenen Kombination aus der Methode Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) und der

Methode Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) visualisiert. Die in Serie angefertigten Gefrierschnitte wurden nach dem Waschen mit PBS mit normalem Kaninchenserum (2%) für 30 Min. weiterbehandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Durch die in Serie Anfertigung der Gefrierschnitte waren fast gleiche bis sehr ähnliche Gewebestrukturen auf den nacheinander folgenden Schnitten zu sehen. Dieses war wichtig, da auf einem Schnitt Endostatin nachgewiesen wurde und auf dem nachfolgenden Schnitt CEACAM1. Die Schnitte wurden jeweils mit den primären Antikörpern mAb hES (1:10000) und mAb 4D1/C2 (1:200) über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden Schnitte statt dem primären Antikörper nur mit dem sekundären Antikörper gegen Maus-IgG inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Schnitte in PBS (2 x 10 Min.) gewaschen und für 30 Min. mit dem sekundären Antikörper gegen Maus IgG-(Biotin gekoppelt 1:250) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Schnitte in PBS (2x10 Min.) erfolgte eine weitere Behandlung mit der Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase (1:100) für 30 Min. Nachfolgend wurden die Schnitte nach dem Waschen mit einem Avidin-Biotin-Komplex Reagenz (1:250, 30 Min.) behandelt. Nach abschließendem Waschen für 3 x 10 Min. in PBS wurde die Peroxidase-Reaktion durch Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid entwickelt (Davidoff und Schulze 1990). Für die Entwicklung der Peroxidase-Reaktion wurde die nach Itoh et al. (1979) und nach Zaborszky und Leranath (1985) modifizierte Verstärkungsmethode mit Nickel und Glukoseoxidase durchgeführt. Nach Zugabe der Entwicklungslösung wurde die Entwicklung der Immunfärbung abgewartet, diese dauerte im Schnitt ca. 20 Minuten. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Abgießen der Entwicklungslösung und Aufnahme der Schnitte in PBS gestoppt. Alle Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, mit DePeX (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt und mit einem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Leica, Deutschland) analysiert und fotografiert.

Prostatakarzinomgewebe

Es wurden immunhistochemische Ko-Lokalisationsversuche von Endostatin und CEACAM1 an Paraffinschnitten des Prostatakarzinomgewebes durchgeführt. Das Prostatakarzinomgewebe wurde nach operativer Resektion in Formalin fixiert. Anschließend wurden kleine Gewebeblöcke entnommen und in Paraffin eingebettet. Es wurden dünne Gewebeschnitte von 6-8 µm Dicke mittels Mikrotom angefertigt, die anschließend auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und für 30 Minuten luftgetrocknet wurden. Es wurden hauptsächlich die Schnitte verwendet, die nebeneinander normales Gewebe und dysplastische Anteile, wie hochgradiges PIN, enthielten. Die Schnitte wurden in absteigender Alkoholreihe rehydriert. In dieser Versuchsreihe wurde eine Doppelfärbung mit dem monoklonalen CEACAM1 Antikörper 4D1/C2 und dem polyklonalen Antikörper gegen humanes Endostatin/Kollagen 18 (pAK hES) durchgeführt. Es erfolgte zunächst die Immunfärbung gegen CEACAM1 und Entwicklung mit Alkalischer Phosphatase-Reaktion, welche für die Differenzierung in der Doppelfärbung eine rote Färbung ergibt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit normalem Kaninchenserum (NRS 2%) für 30 Min. behandelt, anschließend in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem mAb (4D1/C2) gegen CEACAM1 über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper gegen Maus-IgG, welcher Alkalische Phosphatase gekoppelt war (30 Min., RT), inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die Reaktion durch Hinzugeben von Entwicklungslösung visualisiert. Nach Visualisierung der CEACAM1-Immunfärbung erfolgte die zweite Immunfärbung der Schnitte mit dem polyklonalen Antikörper gegen Endostatin/Kollagen 18. Hierfür wurden die Schnitte ausgiebig in PBS gewaschen. Anschließend mit normalem Schweine Serum (NSS 2%) für 30 Min. inkubiert. Nachdem Waschen in PBS wurde der polyklonale Antikörper gegen Endostatin/Kollagen 18 aufgetragen und die Schnitte über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst mit sekundärem Antikörper gegen Rabbit-IgG (Biotin gekoppelt) (1:250, 30 Min.) und nach dem Waschen mit dem Antikörper gegen Rabbit (Peroxidase-Anti-

Peroxidase) für 30 Min. behandelt. Die Visualisierung erfolgte über Entwicklung der Peroxidasereaktion und Verstärkungsmethode mit Nickel und Glukoseoxidase. Die Immunfärbung von CEACAM1 ergab eine rote Markierung, die von Endostatin ergab eine schwarze Markierung. Anschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und eingedeckelt.

3.5. SDS-PAGE und Western Blot

Eine Bindung des Endostatins an CEACAM1 sollte durch Bindungsversuche untersucht werden. Hierzu wurden CEACAM1 enthaltender Granulozytenextrakt und aufgereinigtes CEACAM1 aus Granulozyten verwendet.

Zu Beginn des Western Blot-Verfahrens wurden die oben genannten CEACAM1 Proben zur Denaturierung in Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) (Verhältnis 2:1) aufgenommen und für 5 Min. bei 96° C gekocht. Je 30µl der Proben wurden aufgetragen und mittels einer 8 % SDS-PAGE (bei 100 mA) getrennt. Anschließend wurden die Proteine durch ein Tank-Blotting Transfervverfahren (60 Min. bei 350 mA) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde über Nacht in einer Blockierungslösung (5% Magermilchpulver) bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS (Tris Buffered Saline)/Tween 0,1 % für 3 x 10 Min. wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem primären Antikörper behandelt. Die primären Antikörper wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in TBS/T aufgelöst und auf die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler hinzu gegeben. Die primären Antikörper waren je nach Versuchsaufbau:

- a) monoklonaler Antikörper gegen humanes Endostatin hES in einer Konzentration von 0,75 µg/ml und einer Verdünnung von (1: 2000),
- b) monoklonaler Antikörper 4D1/C2 gegen CEACAM1 in einer Konzentration von 0,9 µg/ml und einer Verdünnung von (1:300).

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen intensiv mit TBS/T gewaschen (3x10 Min.) und mit dem passenden sekundären Antikörper gegen Maus IgG-Peroxidase-gekoppelt (1:5000) ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS/T (3x10 Min.) wurde die Reaktion durch ein Chemielumineszenz-Verfahren durch Zugabe von ECL-Reagenz autoradiographisch auf einem Fuji-RX Film sichtbar gemacht.

3.6. Overlay-Assay mittels Western Blot

Das **Overlay-Assay** wurde anlehnend an das Protokoll von Merdes et al. (1991) durchgeführt. Dieses stellt ein proteinbiochemisches Verfahren dar, mit dem man die Bindung zweier Proteine untersuchen kann.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuchen wurden CEACAM1 enthaltene Proben (Granulozytenextrakt und aufgereinigtes CEACAM1) nach SDS-PAGE getrennt und auf eine Membran transferiert. Auf diese Membran wurde eine Endostatin-haltige Probenlösung (rekombinantes Endostatin Verdünnung 1:50) als Overlay aufgebracht und für 24 Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ungebundene Fraktion der Endostatin-Probe durch intensives Waschen in TBS/T von der Membran entfernt. Anschließend erfolgte nach der Western Blot-Technik die Behandlung der Membran mit dem primären Antikörper gegen Endostatin (mAb hES) (1 Std., Schüttler, Raumtemperatur). Es folgte nach intensivem Waschen der Membran in TBS/T die Inkubation mit dem sekundären Antikörper gegen Maus IgG (Peroxidase gekoppelt). Anschließend wurde die Membran intensiv gewaschen und die Reaktion durch das Chemilumineszenzverfahren mit ECL-Reagenz entwickelt und auf einem Film sichtbar gemacht.

3.7. Overlay-Assay mittels Biotin-konjugiertem Endostatin

Eine weitere Möglichkeit ein Overlay-Assay durchzuführen, ist über eine Markierung des Proteins, welcher als Overlay auf die Membran inkubiert wird, mit z.B. Biotin. In unseren Bindungsversuchen haben wir Endostatin mit Biotin markiert. Diese Methode ist kürzer und direkter als die oben beschriebene Methode mit Nachweis durch Western Blot, da sie ohne Antikörper auskommt und direkt die Bindung des Biotin-konjugierten Endostatins an Proteine der Membran nachweist. Eine eventuelle Störung durch unspezifische Reaktion der Antikörper kann hier von Beginn an umgangen werden. Die Herstellung von Biotin-konjugiertem Endostatin wurde im Kapitel Material beschrieben.

In den Overlay-Bindungsversuchen wurde, wie oben beschrieben, eine CEACAM1 enthaltende Probe auf ein Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE getrennt und auf eine Membran transferiert. Die Versuchsdurchführung verläuft bis zur Overlay Inkubation mit dem Biotin gekoppelten Endostatin identisch wie bei der Durchführung des Overlay-Assay mit Nachweis über Western Blot-Technik. Unterschiede gibt es jedoch in den folgenden Punkten:

Die CEACAM1-Proben dürfen vor dem Auftragen auf das Gel nicht denaturiert werden, also entfällt der Schritt mit dem fünfminütigen Aufkochen der Proben. Weiterhin darf den CEACAM1-Proben kein β -Mercaptoethanol zu gegeben werden. Aus diesem Grund wurden die Proben in β -Mercaptoethanol freiem Laemmli-Puffer aufgenommen. Ein weiterer Punkt ist, dass die Overlayinkubation bei 4° C und abgedunkelt erfolgen sollte.

Konkret wurden die CEACAM1 enthaltenden Proben (Granulozytenextrakt und aufgereinigtes CEACAM1) durch SDS-PAGE getrennt, auf eine Membran transferiert und über Nacht mit Blockierungslösung behandelt. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen und mit Biotin-konjugiertem Endostatin als Overlay inkubiert (24 Stunden, abgedunkelt, schüttelnd bei 4°C). Am folgenden Tag wurde ungebundenes Biotin-konjugiertes Endostatin durch 3 x 10 Min. Waschen in PBS von der Membran entfernt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit dem

Avidin-Biotin-Komplex Reagenz (1: 250) für 1 Stunde. Nach anschließendem Waschen für 3 x 10 Min. in PBS wurde die Peroxidase-Reaktion durch Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid entwickelt (Davidoff und Schulze 1990). Für die Entwicklung der Peroxidase-Reaktion wurde die nach Itoh et al. (1979) und nach Zaborszky und Leranath (1985) modifizierte Verstärkungsmethode mit Nickel und Glukoseoxidase durchgeführt. Nach Zugabe dieser Entwicklungslösung wurde die Bandenentwicklung auf der Membran abgewartet. Diese dauerte im Schnitt ca. 20 Minuten. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Abgießen der Entwicklungslösung und Aufnahme der Membran in PBS gestoppt.

3.8. Ko-Immunopräzipitation mit Immunaффinitätschromatographie

Über eine Immunaффinitätschromatographie wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Mit diesem Verfahren kann ein bestimmtes Antigen aus einer Antigenmischung mittels eines spezifischen Antikörpers, welcher an eine Matrix gekoppelt wurde, spezifisch gebunden und immobilisiert werden. In einem weiteren Schritt kann das gebundene Protein eluiert und in weiteren spezifischen Analysen untersucht werden.

Wir führten eine Ko-Immunopräzipitation durch, um eine Bindung oder Komplexbildung von CEACAM1 und Endostatin aus einer Probenmischung beider Faktoren nachzuweisen.

Hierfür wurde eine Immunaффinitätschromatographiesäule, die mit einer CNBr-Sepharose Matrix bestückt war, verwendet. An die Matrix wurde der monoklonale CEACAM1 Antikörper T84.1 gekoppelt. Eine Probenmischung aus Granulozytenextrakt und Endostatin wurde in einem Mischungsverhältnis 50 µg Granulozytenextrakt: 300 ng Endostatin hergestellt. Diese Probenmischung wurde durch die Immunaффinitätschromatographiesäule laufengelassen. Ungebundene Proteine wurden durch mehrfaches Waschen mit dem Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Eluierung der selektiv an den Antikörper T84.1 gebundenen Proteine durch pH-Wert Änderung mittels Zugabe von Glycin-Puffer. Dieses Eluat und die

Ausgangsmischung von Granulozytenextrakt und Endostatin wurden in Western Blot-Analysen untersucht. Hierfür wurden je 30 µl Probe von der Probenmischung (Endostatin und Granulozytenextrakt) und des Eluats (zweifach) auf ein Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE getrennt und auf eine Membran transferiert.

Der Membranabschnitt mit der Probenmischung (Endostatin und Granulozytenextrakt) und eine Laufspur der Eluatprobe wurden mit dem Endostatin spezifischen mAb hES inkubiert, nachfolgend mit sekundärem Antikörper behandelt und die Reaktion nach dem Chemilumineszenzverfahren auf einem Film sichtbar gemacht. Ein weiterer Membranabschnitt, der die zweite Laufspur der Eluatprobe enthielt, wurde mit dem CEACAM1 spezifischen mAb 4D1/C2 inkubiert, nachfolgend mit sekundärem Antikörper behandelt und die Reaktion nach dem Chemilumineszenzverfahren auf einem Film sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

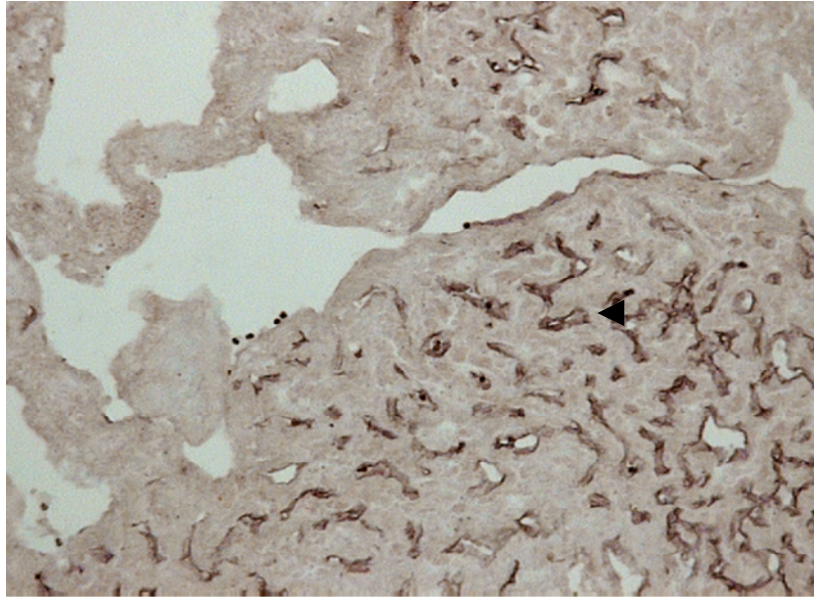
4.1. Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 in neuformierten Blutgefäßen eines Glomus Caroticumtumors

An 4 Fällen von Patienten mit einem Glomus Caroticumtumor wurden immunhistochemische Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 durchgeführt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen unter Verwendung des CEACAM1 monoklonalen Antikörpers 4D1/C2 ergaben eine deutliche spezifische Färbung in kleinen Blutgefäßen des Glomus Caroticumtumors (Abb. 1A). Bei sehr dichter Vaskularisierung waren beinahe alle kleinen Blutgefäße mehr oder weniger stark markiert für CEACAM1, während die großen Blutgefäße keine Immunfärbung für CEACAM1 aufwiesen. An Serienschnitten des gleichen Tumorgewebes durchgeführte Immunfärbung für Endostatin ergab eine starke Immunfärbung in großen, teilweise erweiterten Gefäßen, während die ganz kleinen Blutgefäße entweder keine Endostatinfärbung aufwiesen oder aber nur schwach markiert waren (Abb. 1B).

Der Vergleich der beiden Abbildungen ergab, dass nur in einem Teil der kleinen Blutgefäße CEACAM1 und Endostatin mit einer deutlichen Immunfärbung gleichzeitig vorhanden sind, während in ganz kleinen und großen Blutgefäßen keine überlappende Immunfärbung beider Faktoren vorzufinden war. In parallel dazu durchgeführten Kontrollfärbungen unter alleiniger Verwendung des sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG-Biotin-konjugiert) konnte keine spezifische Färbung gefunden werden (nicht gezeigt).

A



B

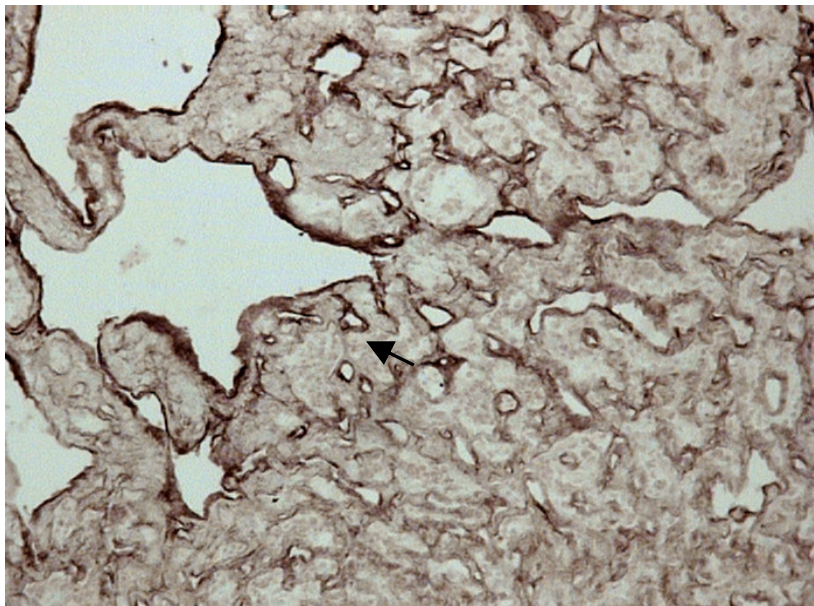


Abb. 1A-B: Immunfärbung für Endostatin und CEACAM1 am Glomus Caroticumtumor. Immunfärbung für CEACAM1 mit dem mAb 4D1/C2 zeigte eine Markierung in den sehr kleinen, offensichtlich unreifen Tumorgefäßen (A, Pfeilkopf). Immunfärbung für Endostatin mit dem mAb hES ergab eine starke Markierung in großen Blutgefäßen und eine eher schwächere in kleinen Blutgefäßen (B, Pfeil). X 400. Gegenfärbung mit Kernechtrot.

4.2. Nachweis einer Ko-Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 in neuformierten Blutgefäßen eines Prostatakarzinoms

Um zu klären, ob das im Glomus Caroticustumor nachgewiesene Immunfärbungsmuster für Endostatin und CEACAM1 auch in anderen Tumoren vorhanden ist, wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Am Beispiel des Prostatakarzinoms wurden Immunfärbungen für Endostatin und CEACAM1 mittels Einzel- als auch der Doppelimmunfärbung am gleichen Schnitt durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass auch im Prostatakarzinomgewebe CEACAM1 hauptsächlich in kleinen Blutgefäßen des Prostatakarzinoms zu finden ist. CEACAM1 wird offensichtlich in einer sehr frühen Phase der Tumorentwicklung in Endothelzellen der Tumorgefäße exprimiert, da schon in der Phase des hochgradigen PIN (Prostate Intra-epithelial Neoplasia) die dem dysplastischen Epithel benachbarten Blutgefäße CEACAM1 aufweisen (Abb. 2 A und B). Dagegen ist die normalerweise an der luminalen Oberfläche des Prostataepithels vorhandene CEACAM1-Immunfärbung (siehe Abb. 2 E, Pfeilkopf) bereits in diesem Stadium nicht mehr nachweisbar.

Die Endostatin-Immunfärbung hingegen ist nur in der Wand einiger PIN-assoziiierter Blutgefäße zu finden (Abb. 2 C). Im Vergleich zu CEACAM1 bleibt die Endostatin-Immunfärbung in diesen Arealen deutlich schwächer, während sie in größeren Blutgefäßen z.B. in soliden Tumorarealen deutlich stärker ausgeprägt ist (Abb. 2 D).

In normalen Arealen des Prostatagewebes ergab die Doppelimmunfärbung für Endostatin/Kollagen 18 und CEACAM1 eine bereits in der Literatur beschriebene Lokalisation von CEACAM1 an der luminalen Oberfläche des normalen Epithels (Abb. 2 E, rötliche Färbung), während die Kollagen 18-Immunfärbung in den Wänden der Blutgefäße zu finden war (Abb. 2 E, schwarze Färbung). Die für Kollagen 18-positiven Blutgefäße in normalem

Prostatagewebe waren weder für CEACAM1 noch für Endostatin positiv, wenn man eine Färbung mit dem monoklonalen Antikörper für Endostatin durchführte. Die Doppelimmunfärbung für Endostatin unter Verwendung des polyklonalen Endostatin-Antikörpers (hES) und für CEACAM1 unter Verwendung des monoklonalen CEACAM1-Antikörpers (4D1/C2) am Prostatakarzinom und PIN ergab eine Ko-Lokalisation beider Faktoren in der Wand einiger, vor allem dem PIN-Gewebe assoziierter Blutgefäße (Abb. 2 F).

In den entsprechenden Kontrollimmunfärbungen mit den verwendeten sekundären Antikörpern wurde keine spezifische Immunfärbung nachgewiesen (nicht gezeigt).

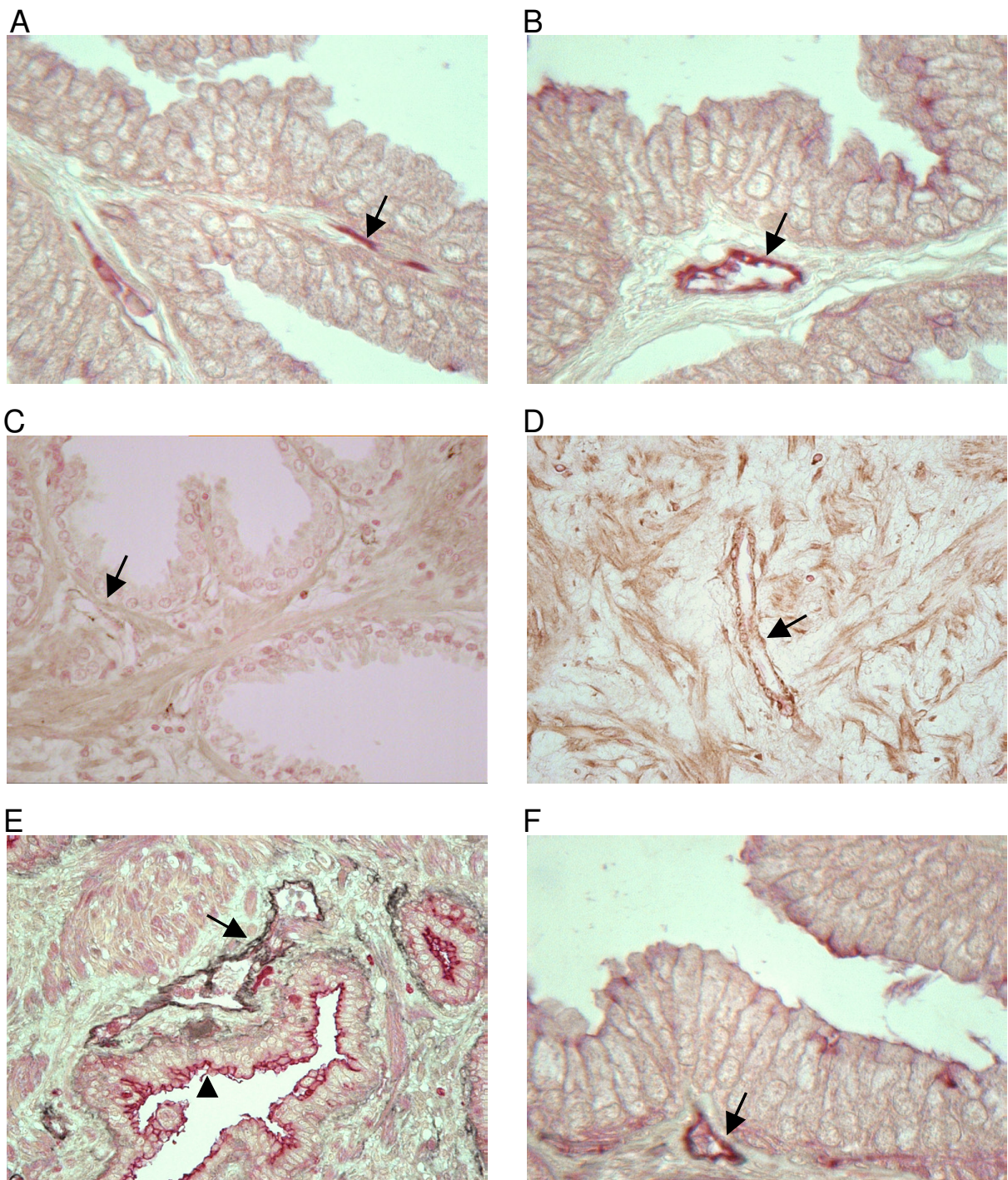


Abb. 2 A-F: Einzel- und Doppelimmunfärbung für Endostatin und CEACAM1 am Prostatakarzinomgewebe. CEACAM1 Immunfärbung mit dem mAb 4D1/C2 ergab Markierungen an kleinen, eher unreif wirkenden Blutgefäßen (A und B). Endostatin-Immunfärbung mit dem mAb hES zeigt nur in einigen PIN-assoziierten Blutgefäßen (C) und in Blutgefäßen im Bereich mit soliden Tumoranteilen eine Markierung (D). Doppelimmunfärbung für CEACAM1 und Kollagen 18/Endostatin in Anteilen von normalem Prostatagewebe zeigte eine CEACAM1-Immunfärbung an der luminalen Prostataepithelseite (Pfeilkopf, rote Immunfärbung) und für Kollagen 18/Endostatin in der Blutgefäßwand (Pfeil, schwarze Immunfärbung) (E). Doppelimmunfärbung für CEACAM1 (mAb 4D1/C2) und Endostatin (pAb hES) ergab im Prostatakarzinom, insbesondere in PIN-assoziierten Bereichen eine Ko-Lokalisation beider Faktoren (Pfeil, rote und schwarze Markierung) (F). X 400. A-F: Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Diese Beobachtungen ließen annehmen, dass CEACAM1 und Endostatin in dieser frühen Phase der Morphogenese von Blutgefäßen miteinander interagieren könnten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden proteinbiochemische Analysen zur Untersuchung möglicher Bindungsinteraktionen zwischen CEACAM1 und Endostatin durchgeführt.

4.3. Nachweis einer Bindung von rekombinatem Endostatin an CEACAM1 im Granulozytenextrakt und an aufgereinigte CEACAM1-Form

In diesen Versuchsreihen sollte untersucht werden, ob rekombinant hergestelltes Endostatin und das aus menschlichen Granulozyten isolierte CEACAM1 eine Bindung eingehen. Rekombinant hergestelltes Endostatin hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Endostatin kann in SDS-PAGE Untersuchungen auch in mehreren Banden zur Darstellung kommen, da es auch als Di-, Tri- und Tetramere vorliegen kann. Das rekombinant hergestellte Endostatin wurde bezüglich der Reinheit durch Silberfärbung des SDS-PAGE-Gels und bzgl. der Spezifität in Western Blot-Analysen mittels des mAb hES untersucht.

Nach der CEACAM1-Aufreinigung mittels der Immunchromatographie, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, konnte CEACAM1 relativ sauber gewonnen werden, wenn man die Silbergefärbung der aufgereinigten CEACAM1-Form mit der Silbergefärbung des Granulozytenextraktes (Abb. 3, Abschnitt A) vergleicht. Die zusätzliche Bande der aufgereinigten CEACAM1-Form in der Silbergefärbung (Abb. 3, Abschnitt A, Laufspur 2) bei ca. 50 kDa konnte nicht weiter identifiziert werden. Da bei den anschließenden Western Blot-Untersuchungen unter Verwendung des mAb gegen CEACAM1 4D1/C2 diese Bande im Granulozytenextrakt ebenfalls nachzuweisen war, ist zu vermuten, dass es sich hierbei um ein Spaltprodukt des CEACAM1 handeln könnte (Abb. 3, Abschnitt B, Laufspur 1).

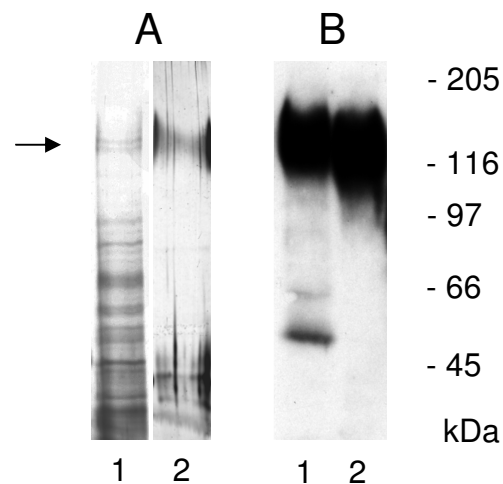


Abb. 3: Silbergelfärbung (Abschnitt A) und Western Blot-Analyse (Abschnitt B) mittels des monoklonalen Antikörpers 4D1/C2 gegen CEACAM1 zeigten Reinheit und Spezifität von CEACAM1 im Granulozytenextrakt (1) und aufgereinigte CEACAM1-Form (2)(←).

Ob eine direkte Interaktion beider Faktoren, CEACAM1 und Endostatin, besteht, wurde in proteinbiochemischen Bindungsversuchen anhand von Overlay-Assays untersucht.

Der Endostatin-spezifische monoklonale Antikörper hES erkennt keine Antigene des Granulozytenextraktes. Vor Beginn der Bindungsversuche musste ausgeschlossen werden, dass der Endostatin spezifische mAb hES keine Kreuzreaktivität mit Proteinen des Granulozytenextraktes aufwies. Zur Überprüfung wurden Granulozytenextrakte mittels SDS-PAGE getrennt, die Membran wurde mit dem monoklonalen Antikörper gegen Endostatin hES behandelt und die Reaktion wurde auf einem Film sichtbar gemacht. Die Entwicklung ergab keine spezifische Bande. Eine anschließende Behandlung der Membran mit dem monoklonalen Antikörper gegen CEACAM1 4D1/C2 und weiterer Entwicklung ergab eine deutliche Bande bei 160 kDa. (Abb.4). Hiermit konnte gezeigt werden, dass der mAb gegen Endostatin hES keine Proteine des Granulozytenextraktes erkennt. Ob eine ausreichende Proteinmenge des

Granulozytenextraktes auf der Membran vorhanden war, wurde über eine Kontrollbehandlung der Membran unter Verwendung des CEACAM1 spezifischen mAb überprüft.

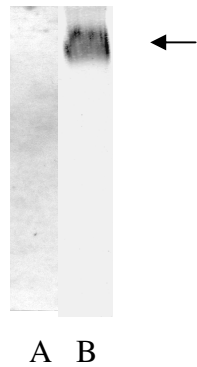


Abb. 4: Western Blot-Analyse am Granulozytenextrakt mit dem monoklonalen Antikörper hES gegen Endostatin. Nach der Entwicklung zeigte sich keine sichtbare Reaktion (A). Die anschließende Inkubation derselben der Membran mit dem monoklonalen Antikörper 4D1/C2 gegen CEACAM1 zeigte eine starke Bande bei 160 kDa (\leftarrow), welche CEACAM1 entspricht (B). Folglich besteht keine Kreuzreaktivität des Endostatin Antikörpers hES mit Proteinen des Granulozytenextraktes.

4.3.1. Bindungsuntersuchungen mittels Overlay-Assay

Endostatin bindet an CEACAM1 aus Granulozytenextrakt im Overlay-Assay mit Nachweis über Western Blot. Hinsichtlich des Nachweises einer Bindung von Endostatin an CEACAM1 wurden Overlay-Assays und anschließende Western Blot-Analysen durchgeführt. Zwei Granulozytenextraktproben wurden auf ein Gel aufgetragen, mittels der SDS-PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran mit 2 Laufspuren der Granulozytenextrakte wurde in der Mitte geteilt. Die eine Membranhälfte wurde mit Endostatin als Overlay inkubiert, die andere nicht, da sie als Kontrolle diente. Nach Behandlung beider Membranhälften mit dem mAb hES wurde die Reaktion entwickelt und auf einem Film sichtbar gemacht. Auf der mit Endostatin vorbehandelten Membranhälfte zeigte sich eine Bande bei 160 kDa. Die Membranhälfte ohne Endostatin-Inkubation zeigte keine spezifische Reaktion (Abb. 5). Dieses Ergebnis deutete auf eine Bindung des Endostatins an ein Protein aus dem Granulozytenextrakt hin, welches ein Molekulargewicht von ca. 160 kDa aufwies und dem CEACAM1 entsprechen konnte. Weiterhin konnte erneut gezeigt werden, dass der verwendete mAb hES selbst keine Antigene des Granulozytenextraktes erkennt, da sich auf

der Membranhälfte ohne Endostatin-Inkubation keine spezifische Reaktion entwickelte. Eine Kreuzreaktivität des mAb hES konnte somit erneut ausgeschlossen werden. Die gezeigten Ergebnisse waren in mehreren Versuchsdurchgängen reproduzierbar.

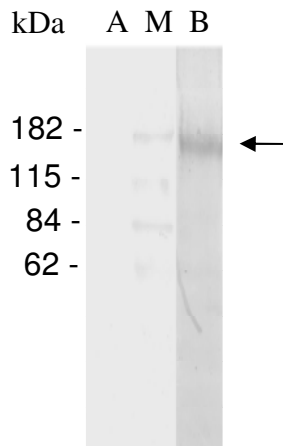


Abb. 5: Overlay-Assay mit Western Blot-Technik. M: Proteinmarker. Granulozytenextraktproben wurden jeweils in die Laufspuren der Membranabschnitte A und B aufgeladen. Abschnitt B wurde mit Endostatin im Overlay-Assay inkubiert. Abschnitt A diente als Kontrollmembran ohne Inkubation mit Endostatin. Beide Membranabschnitte wurden mit dem mAb hES gegen Endostatin behandelt. Es zeigte sich nur in dem mit Endostatin vorbehandelten Abschnitt (B) eine spezifische Bande bei 160 kDa (←) als Hinweis auf eine Bindung von Endostatin an CEACAM1 in diesem Bereich.

Endostatin bindet an aufgereinigte CEACAM1-Form aus Granulozyten. Zur Bestätigung der Annahme, dass Endostatin an CEACAM1 aus dem Granulozytenextrakt bindet, wurden Overlay-Assays unter Verwendung von aufgereinigtem CEACAM1 durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde aufgereinigtes CEACAM1 aufgetragen, nach SDS-PAGE getrennt und auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde mit Endostatin als Overlay inkubiert und die Reaktion nach Behandlung mit mAb hES entwickelt. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Bande bei 160 kDa (Abb. 6). Somit konnte gezeigt werden, dass Endostatin auch an die aufgereinigte CEACAM1-Form bindet. Die intensive Bandenbildung könnte durch die Aufreinigung des CEACAM1 begründet sein, da hierdurch höhere Konzentrationen des Proteins erzielt werden. Der Aufreinigungsprozess kann zudem mit leichten Konformationsänderungen am CEACAM1-Molekül einhergehen, welche auch die potentiellen Endostatin-Bindungsstellen betreffen könnten. Möglich wäre außerdem, dass durch die Aufreinigung CEACAM1 aus der sonst hauptsächlich membrangebundenen Form löslich gemacht wird und hierdurch die Endostatin Bindungsstellen besser exponiert werden könnten.

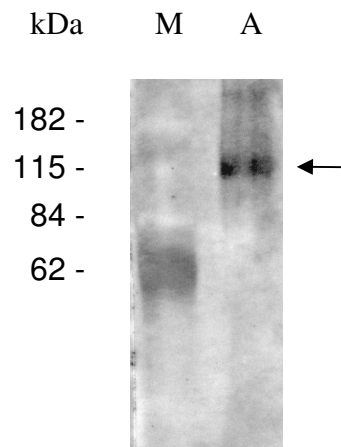


Abb. 6: Overlay-Assay mittels Western Blot-Analyse. Aufgereinigte CEACAM1-Form wurde aufgetragen und nach SDS-PAGE getrennt. Die Membran wurde mit Endostatin als Overlay inkubiert. Anschließend erfolgte die Western Blot-Analyse mit mAb hES gegen Endostatin. Es zeigte sich eine ca. 160 kDa schwere Bande (A) (←). M: Proteinmarker.

Biotin-konjugiertes Endostatin bindet an CEACAM1 aus Granulozytenextrakt im Overlay-Assay. In den zuvor beschriebenen Bindungsversuchen des Endostatins an CEACAM1 wurde das Western Blot-Verfahren angewendet, bei dem die Anwendung von Antikörpern erforderlich ist. Da hierbei mögliche Kreuzreaktivitäten auftreten können, wurde versucht, die Bindungsversuche ohne den Nachweis durch Antikörper durchzuführen. Hierfür wurde Biotin-konjugiertes Endostatin in den Overlay-Assays verwendet.

Im folgenden Bindungsversuch wurden Granulozytenextrakte auf 2 Gele aufgetragen, nach SDS-PAGE getrennt und auf Membrane transferiert. Die erste Membran wurde mit Biotin-konjugiertem Endostatin inkubiert. Die zweite Membran, die als Kontrolle diente, wurde nur mit Biotin behandelt. Nachfolgend wurden beide Membranen mit dem Avidin-Biotin-Reagenz behandelt und die Reaktion auf den Membranen entwickelt. Die Reaktion ergab auf der Membran, die mit Biotin-konjugiertem Endostatin inkubiert war, eine Bande bei 160 kDa. Die Kontrollmembran, die mit Biotin allein behandelt war, zeigte keine Reaktion (Abb. 7). Dieses Ergebnis spricht für eine spezifische Bindung des Biotin-konjugierten Endostatins an CEACAM1 aus dem Granulozytenextrakt. Da der Kontrollversuch mit alleiniger Biotin-Inkubation ohne Endostatin keine Reaktion zeigte, konnte eine sekundäre Reaktion des Biotins ausgeschlossen werden.

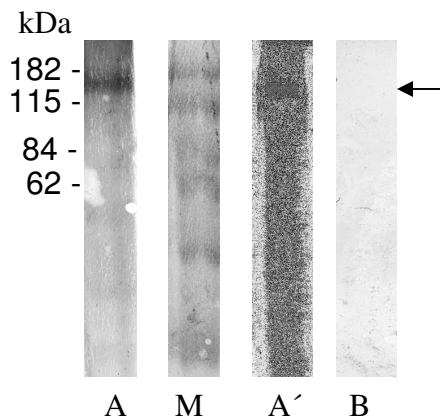


Abb. 7: Overlay-Assay mit Biotin-konjugiertem rekombinantem Endostatin. Granulozytenextraktproben wurden auf die Laufspuren A, A' und B aufgetragen. Die Membranabschnitte mit den Laufspuren A und A' wurden mit Biotin-konjugiertem Endostatin inkubiert. Der Abschnitt mit Laufspur B wurde nur mit Biotin inkubiert und diente als Kontrolle. Die Reaktion wurde direkt auf der Membran entwickelt und ergab auf den Abschnitten A und A' eine deutliche Bande bei 160 kDa (←). Abschnitt B zeigte keine Bande. M: Proteinmarker.

4.3.2. Bindung von Endostatin und CEACAM1 im Ko-Immunopräzipitationsversuch

Die vorangegangenen Overlay-Assays deuten auf eine chemische Bindung oder Komplexbildung von Endostatin und CEACAM1 hin. Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Granulozytenextrakt und Endostatin wurden in einer Probenmischung gemischt. Dieses Probengemisch wurde durch eine Immunaffinitätschromatographiesäule, welche mit dem monoklonalen Antikörper gegen CEACAM1 T84.1 bestückt war, laufen gelassen. Die spezifisch gebundene Fraktion wurde eluiert und in Western Blot-Analysen untersucht.

Aufgrund der Annahme, dass beide Faktoren in der Probenmischung gebunden oder als Komplex vorliegen könnten, wurde untersucht, ob Endostatin ebenfalls in vorhandener Komplexbildung mit CEACAM1 ko-präzipitiert werden konnte.

In den anschließenden Western Blot-Analysen konnte unter Verwendung des Endostatin-Antikörpers (mAb hES) eine sehr starke Bande bei ca. 20 kDa nachgewiesen werden. Darüber hinaus kommen noch etwa vier weitere Banden höheren Molekulargewichtes zur Darstellung. Angenommen werden kann, dass in der starken Bande bei 20 kDa Endostatin detektiert wurde. Die weiteren, allerdings schwächeren Banden mit höherem Molekulargewicht könnten

Endostatin-Di-, Tri- und Tetrameren entsprechen. Die Western Blot-Analyse der Eluatprobe aus der Immunaффinitätschromatographiesäule mit dem Endostatin-Antikörper hES ergab eine deutliche Bande bei ca. 20 kDa. Aufgrund der Bandenerkennung durch den Endostatin-Antikörper hES muss angenommen werden, dass in dieser Bande Endostatin detektiert wurde. Nicht zuletzt weil sich diese Bande des Eluats und die starke Bande in der Untersuchung des Probengemisches in gleicher Höhe wieder finden lassen. Diese Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass Endostatin aufgrund einer Bindung oder Komplexbildung mit CEACAM1 durch den CEACAM1-Antikörper ko-präzipitiert werden konnte. Entsprechend dieser Annahme konnte in der Western Blot-Analyse der Eluatprobe unter Verwendung des CEACAM1-Antikörpers 4D1/C2 eine starke Bande bei ca. 160-180 kDa nachgewiesen werden, welche CEACAM1 entspricht (Abb. 8).

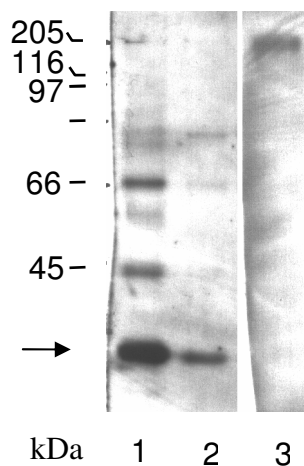


Abb. 8: Ko-Immunopräzipitation von Endostatin und CEACAM1 aus dem Granulozytenextrakt. In der Laufspur 1 wurde ein Probengemisch aus Endostatin und CEACAM1 aufgetragen. Die Laufspuren 2 und 3 wurden mit der Eluatprobe, welche aus der Immunaффinitätssäule mittels mAb T84.1 gegen CEACAM1 gewonnen wurde, beladen. Der Membranabschnitt mit den Laufspuren 1 und 2 wurde anschließend mit dem mAb hES gegen Endostatin behandelt. Nach Entwicklung der ECL-Reaktion zeigte sich im Probengemisch (1) eine starke Bande bei ca. 20 kDa und weitere, schwerere Banden passend zu Endostatin-Dimeren. Die Eluatprobe (2) zeigte eine deutliche Bande bei 20 kDa passend zu Endostatin (←). Der Abschnitt mit der Laufspur 3, welcher mit der Eluatprobe beladen war, wurde mit mAb gegen CEACAM1 4D1/C2 behandelt. Hier zeigte sich eine deutliche CEACAM1-Bande bei ca. 160-180 kDa (Pfeilkopf).

Die in diesem Versuch über Immunaффinitätschromatographie gewonnene Eluatprobe enthält demnach Endostatin und CEACAM1. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Endostatin und CEACAM1 eine Bindung oder Komplexbildung eingehen können, so dass sich Endostatin über eine Bindung/Komplexbildung an CEACAM1 nachweisen lässt.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit belegt erstmalig, dass der Angiogeneseinhibitor Endostatin direkt mit dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1, welches eine pro-angiogenetische Wirkung besitzt, interagiert. Die proteinbiochemischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass Endostatin direkt an CEACAM1 bindet. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen eine Ko-Lokalisation von Endostatin und CEACAM1 in der Wand neuer Tumorgefäße in einer frühen Phase der Gefäßentwicklung und lassen vermuten, dass die Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin offensichtlich in einem bestimmten Zeitabschnitt der Gefäßentwicklung stattfindet.

Eine der wesentlichen Voraussetzungen der Neubildung von Blutgefäßen ist die Morphogenese der Gefäßwand, die durch die Bildung regulärer Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen, eine regulär strukturierte Basalmembran der Gefäßwand und die Integration der peri-endothelialen Zellen in die Gefäßwand gekennzeichnet ist (Dejana, 2004). Es wurde bereits gezeigt, dass Endostatin die morphogenetischen Prozesse der neuen Blutgefäße beeinflusst und die neuformierten endothelialen Tubes stabilisiert (Ergün et al., 2001). Hierbei wurde postuliert, dass Endostatin dadurch einerseits die angiogenetische Potenz der neuen Blutgefäße reduzieren, andererseits auch ihre Durchlässigkeit herabsetzen würde. Tatsächlich konnten spätere Arbeiten an Knock-out-Mäusen belegen, dass das Vorhandensein von Kollagen 18, der Muttersubstanz von Endostatin, für die normale Durchlässigkeit der Retinagefäße von entscheidender Bedeutung ist (Takahashi et al., 2003). Das Fehlen von Kollagen 18 resultiert in einer pathologisch gesteigerten Extravasation und Ablösung der Retina, wie man sie z.B. bei der diabetischen Retinopathie beobachtet. Diese Befunde sind insofern nicht verwunderlich, da Kollagen 18 als Bestandteil der Basalmembran am Aufbau der Gefäßwand eine Rolle spielen kann. Im Unterschied zu der Muttersubstanz ist jedoch für Endostatin kennzeichnend, dass diese Substanz vor allem an der Wand neuformierter Blutgefäße, z.B. der Tumorgefäße stark akkumuliert ist,

nicht jedoch an der Wand reifer ruhender Blutgefäße (Ergün et al., 2001; Schuch et al., 2005), wenn man einmal von der Lokalisation des Endostatins an elastischen Fasern in der Wand großer Blutgefäße (Miosge et al., 1999) absieht. In zahlreichen Publikationen seit der Entdeckung von Endostatin (O`Reilly et al., 1997) konnte die anti-angiogenetische und anti-tumorigene Wirkung von Endostatin in experimentellen Tumormodellen bestätigt werden (Dhanabal et al., 1999; Jia et al., 2004). Zurzeit wird Endostatin bei weiteren klinischen Studien eingesetzt.

Diese strukturellen Vorgänge der Gefäßneubildung und Gefäßreifung werden durch eine Vielzahl von Faktoren initiiert und kontrolliert. Unter diesen Faktoren kommt den Zelladhäsionsmolekülen eine wichtige Bedeutung zu (Dejana, 2004). Hierbei wurde vor kurzem gezeigt, dass das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 pro-angiogenetische Effekte besitzt und die löslichen Formen von CEACAM1 die durch VEGF induzierte morphogenetischen Prozesse während der Neubildung von Blutgefäßen maßgeblich unterstützen (Ergün et al., 2000). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass CEACAM1 in der frühen Gefäßentwicklung in Endothelzellen exprimiert wird, während es in Endothelzellen ruhender, also angiogenetisch inaktiver Blutgefäße, nicht nachweisbar ist. Somit wurde gezeigt, dass CEACAM1 erst während der angiogenetischen Aktivierung in vaskulären Endothelzellen hochreguliert wird. Kürzlich wurde diese Situation *in vitro* nachgeahmt und konnte somit in weiteren Analysen belegt werden, dass die Überexpression von CEACAM1 in menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen die Expression potenter angiogenetischer Faktoren, wie VEGF, Angiogenin, Angiopietin-1 und -2 sowie IL-8 signifikant erhöht (Kilic et al., 2005). Hierbei konnten diese Ergebnisse insofern durch weitere Analysen gesichert werden, dass das Ausschalten der CEACAM1-Expression in Endothelzellen durch spezifische siRNA-Technik zu einer Blockierung der von VEGF induzierten endothelialen Kapillarbildung *in vitro* führt (Kilic et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch das epitheliale CEACAM1, das an der luminalen Oberfläche zahlreicher normaler Epithelien nachweisbar ist, die angiogenetische

Aktivität indirekt beeinflusst. Neuere Untersuchungen am Harnblasen- und Prostatakarzinom (Oliveira-Ferrer et al., 2004; Tilki et al., 2006) belegen, dass die Expression von CEACAM1 in normalen Epithelien mit einer Unterdrückung der Expression potenter angiogenetischer Faktoren einhergeht und somit die angiogenetische Aktivierung benachbarter Blutgefäße blockiert.

Zusammenfassend spielen beide Moleküle, Endostatin und CEACAM1, offensichtlich in einer frühen Phase der Morphogenese von Blutgefäßen eine wichtige Rolle. Die Untersuchungen hier belegen, dass dies nicht nur eine zufällige zeitliche Überlappung der beiden Moleküle ist, sondern, dass offensichtlich beide Moleküle miteinander direkt interagieren.

5.1. Endostatin und CEACAM1 sind in neuformierten Blutgefäßen phasenabhängig ko-lokalisiert.

Die hier vorgelegten Befunde anhand immunhistochemischer Untersuchungen an Prostatakarzinomgewebe zeigen, dass Kollagen 18, die Muttersubstanz von Endostatin, in der Wand normaler Blutgefäße und auch der Tumorgefäße, vermutlich in der Basalmembran der Gefäßwand, zu finden ist. Endostatin selbst ist hauptsächlich in der Wand der Tumorgefäße akkumuliert, wie bereits in früheren Publikationen berichtet wurde (Ergün et al., 2001; Schuch et al., 2005). Übereinstimmend mit den kürzlich publizierten Daten (Tilki et al., 2006) konnte CEACAM1 insbesondere in den kleinen Blutgefäßen des Prostatakarzinoms, und hierbei vor allem in den mit dem High Grade PIN-assoziierten (Prostate Intraepithelial Neoplasia) und angiogenetisch aktiven Blutgefäßen nachgewiesen werden. Da PIN die frühe noch nicht invasive Phase des Prostatakarzinoms darstellt, bei der jedoch die angiogenetische Gefäßneubildung offensichtlich bereits aktiviert ist, eignet sich diese Phase für das Studium möglicher Interaktionen zwischen CEACAM1 und Endostatin, die wie oben beschrieben in der frühen Phase der Blutgefäßentwicklung in Endothelzellen bzw. in der Wand dieser Gefäße vorhanden

sind. Die hier vorgelegten Ergebnisse aus immunhistochemischen Ko-Lokalisationversuchen belegen, dass CEACAM1 und Endostatin in einer bestimmten Phase der Gefäßentwicklung in der Wand neuformierter bzw. angiogenetisch aktiver Tumorgefäße ko-lokalisiert sind. Des Weiteren zeigen diese Befunde, dass die CEACAM1-Immunfärbung vor allem in unreifen und instabilen Blutgefäßen, die offensichtlich keine reguläre Anbindung der peri-endothelialen Zellen in ihrer Wand aufweisen, stärker vorhanden ist als die Immunfärbung für Endostatin. Umkehrt nimmt die Immunfärbung für Endostatin mit zunehmender Stabilisierung der neuen Gefäße an Stärke zu, so dass die Interaktion zwischen beiden Faktoren, CEACAM1 und Endostatin, vermutlich auf ein kurzes Zeitfenster der vaskulären Morphogenese limitiert zu sein scheint. Die entscheidende Frage war nach diesen Befunden, inwiefern tatsächlich eine direkte Bindung von Endostatin zu CEACAM1 vorliegt. Hierzu wurden dann proteinbiochemische Analysen durchgeführt.

5.2. Endostatin bindet an CEACAM1 aus Granulozyten und an die aufgereinigte CEACAM1- Form.

In zahlreichen Publikationen ist berichtet worden, dass menschliche Granulozyten CEACAM1 in hoher Menge in ihrer Zellmembran enthalten (Prall et al., 1996). Für die Bindungsversuche wurden daher Granulozytenextrakte oder das aus menschlichen Granulozytenextrakten aufgereinigte CEACAM1 verwendet. Endostatin wurde rekombinant hergestellt und in den Bindungsversuchen eingesetzt. Die hier vorgelegten Ergebnisse aus den Overlay-Assays, bei denen das mit Biotin-konjugierte Endostatin eingesetzt und über eine direkte Färbung mittels Nickel-verstärkter Glukoseoxidase-Technik nachgewiesen wurde, lassen eine spezifische Bande in Höhe der zu erwartenden CEACAM1-Bande erkennen. Dieser Befund belegt, dass das Biotin-konjugierte Endostatin an das zuvor über SDS-PAGE getrennte und auf eine Nitrocellulose-Membran transferierte CEACAM1 bindet. Übereinstimmend damit zeigen auch die Ergebnisse

mit der Western Blot-Technik unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen das menschliche Endostatin den Nachweis einer Bindung von nicht-konjugiertem Endostatin an der CEACAM1-enthaltenden Nitrocellulose-Membran in der zu erwartenden Höhe von CEACAM1. Diese Bindungsergebnisse konnten sowohl unter Verwendung der Granulozytenextrakte als auch des aus diesen Extrakten isolierten CEACAM1 mehrfach reproduziert werden. In einem Gegenversuch konnte die Bindung von Endostatin an CEACAM1 durch die Inkubation der CEACAM1-enthaltenden Nitrocellulose-Membran mit dem CEACAM1-spezifischen monoklonalen Antikörper 4D1/C2 vor der Zugabe von Endostatin blockiert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Bindung von Endostatin an CEACAM1.

Diese Daten aus den Bindungsanalysen werden auch durch die hier vorgelegten Ergebnisse aus den Ko-Immunopräzipitationsanalysen unterstützt. Die nach der Inkubation des Proteinextraktes menschlicher Granulozyten mit dem rekombinanten menschlichen Endostatin durchgeführte Immunopräzipitation mittels des CEACAM1-spezifischen Antikörpers T84.1 zeigt, dass hierdurch nicht nur CEACAM1, sondern auch Endostatin mit präzipitiert wurde. Die der Immunopräzipitation anschließenden Western Blot-Analysen unter Verwendung des monoklonalen Endostatinantikörpers weisen nach, dass Endostatin mit CEACAM1 aus dem Proteingemisch präzipitiert werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass Endostatin nicht nur an das denaturierte CEACAM1, wie es im Rahmen des Overlay-Assays nachgewiesen wurde, sondern auch an nativem CEACAM1 bindet. Diese Ergebnisse sind starke Hinweise darauf, dass vermutlich auch *in Situ* eine direkte Interaktion oder Bindung zwischen CEACAM1 und Endostatin stattfindet.

Zusammenfassend lassen die hier vorgestellten Ergebnisse schlussfolgern, dass Endostatin an CEACAM1 bindet ungeachtet darauf, ob CEACAM1 in Endothelzellen oder in Granulozyten exprimiert ist. Die potentiellen Auswirkungen einer Interaktion von Endostatin mit dem granulozytären CEACAM1, z.B. bei der Modulierung entzündlicher Prozesse stellen einen

interessanten Aspekt dar, können jedoch hier nur als eine Fragestellung aufgeworfen werden. In der Wand der neuformierten Blutgefäße könnte die Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin dazu führen, dass die pro-angiogenetischen Effekte von CEACAM1 durch Bindung an Endostatin unterdrückt werden. Da CEACAM1 in einem Teil der neuformierten Blutgefäße sowohl an den inter-endothelialen Kontaktzonen als auch an der basalen, also der Basalmembran der Gefäßwand zugewandten Seite, exprimiert wird, ist es anzunehmen, dass über die Interaktion der beiden Faktoren die inter-endothelialen Adhäsionsprozesse verbessert und das neue endotheliale Gefäßrohr an der Basalmembran besser verankert wird. Durch Vermittlung solcher Vorgänge können Signalwege zum Zytoskelett und somit möglicherweise auch die Polarisierung der Endothelzellen während der vaskulären Morphogenese beeinflusst werden. Damit könnte die Grundlage für spezialisierte inter-endotheliale Verbindungen gebildet werden, die dann von anderen Molekülen, wie VE-Cadherin oder Occludine vermittelt werden (Feldman et al., 2005; Cavallaro et al., 2006). Diese Interpretation wird auch durch bereits publizierte Daten unterstützt, die zeigen, dass Endostatin über Adhäsionsprozesse die Organisation des endothelialen Zytoskeletts reguliert (Dixelius et al., 2002). Inwieweit die Interaktion mit CEACAM1 diese Prozesse beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch könnte Endostatin unter anderem auch dadurch anti-angiogenetisch wirken und gleichzeitig die Blutgefäße in einen ruhenden stabilisierten Phänotyp überführen und die gesteigerte Durchlässigkeit der neuen Blutgefäße herabsetzen. Diese Interpretation wird weiter dadurch unterstützt, dass tatsächlich in Endothelzellen der Blutgefäße mit der stärksten Immunfärbung für Endostatin die CEACAM1-Immunfärbung entweder nicht nachweisbar oder nur sehr schwach vorhanden ist. Andererseits könnte man sich umgekehrt vorstellen, dass durch die Bindung von Endostatin an CEACAM1 die anti-angiogenetischen Effekte von Endostatin eher blockiert werden, da das Vorhandensein von CEACAM1 verhindert, dass Endostatin in der Gefäßwand an den Partnern bindet, über die es seine Angiogenese-hemmenden Effekte entfaltet. Zukünftige Arbeiten sind notwendig, um die funktionelle Relevanz der Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin zu evaluieren und zu

überprüfen, ob und welche der oben genannten Hypothesen zu treffen. Durch die Klärung dieser Fragen könnten die Mechanismen der Endostatinwirkung besser verstanden und neue Wege anti-angiogenetischer Tumorthherapie entwickelt werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
b-FGF	basophile fibroblast growth factor
c-DNA	Complementary Desoxyribonucleic acid
CEACAM1	Carcinoembryonal Antigen-related Cell Adhaesion Molecule 1
HisTag	Histidin-Kette aus 6 Histidinen an einem Terminus des Proteins
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 alpha
HIF-1 β	hypoxia inducible factor 1 beta
kDa	Kilo Dalton
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger-Ribonucleic acid
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PIN	Prostate Intra-epithelial Neoplasia
PBS	Phosphate buffered saline
RGD-Sequenz	Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate Polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris buffered saline
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (Fms-like tyrosin kinase-1, kurz FLT-1)
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (Kinase-insert domain receptor, kurz FLK-1/KDR)
VEGFR-3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (Fms-like tyrosine kinase-4, kurz Flt-4)

7. Literaturverzeichnis

Achen M, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K and Stacker SA (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Cell Biology* Vol. 95, Issue 2, 548-553

Alghisi GC and Ruegg C (2006) Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. *Endothelium* 13(2):113-35

Alitalo K and Carmeliet P (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1(3):219-27

Barnett TR, Drake L and Pickle W (1993) Human biliary glycoprotein gene: Characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol* 13:1273-1282

Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarstrom S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M and others (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* 252, 243-249

Bischoff J (1997) Cell Adhesion and Angiogenesis. *J Clin. Invest.* Vol. 100, Number 11, S37-39

Breier G, Albrecht U, Sterrer S and Risau W (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114:521-532

Brinckerhoff CE and Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog became a prince. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* Vol. 3

Brooks PC, Clark RA and Cheresh DA (1994) Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264(5158):569-71

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M et al. (1994) Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-64

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF and Van de Water L (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176:1375-1379

Brown LF, Berse B, Jackman R, Tognazzi K, Manseau E, Dvorak HF and Senger DR (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143:1255-1262

Brummer J, Neumaier M, Göpfert C and Wagener C (1995) Association of pp60^{c-src} with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-1655

Busch C, Hanssen TA, Wagener C, Öbrink B (2002) Down-Regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: Correlation with loss of Cell Polarity, increased Proliferation Rate and Gleason Grade 3 to 4 Transition. *Human Pathology* Volume 33, No. 3

Bussolino F, Mantovani A and Persico G (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS* 22:251-256

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhard C et al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439

Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* Vol. 6, Number 3

Cavallaro U, Liebner S, Dejana E (2006) Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res.*10;312(5):659-67

Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K, Millirons P, Lin SH (1993) Structure and Function of C-CAM1. *J Biol Chem* Vol. 268, 24303-24310

Connolly DT (1991) Vascular permeability factor: A unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47:219-223

Davidoff MS and Schulze W (1990) Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP) - and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: An amplification alternative in immunohistochemical staining. *Histochemistry* 93:531-536

Dejana E (1996) Endothelial Adherens Junctions: Implications in the Control of Vascular Permeability and Angiogenesis. *J Clin Invest.* Vol. 98, 1949-1953

Dejana E (2004) Endothelial Cell-Cell Junctions: Happy Together. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* Vol. 5

DeVries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N and Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991

Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, Stillman IE, Lombardo M, Iruela-Arispe ML, Simons M and Sukhatme VP (1999) Endostatin: Yeast Production, Mutants, and Antitumor Effect in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 59, 189-197

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M and Sukhatme VP (1999) Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Bio Chem.* Vol. 274, Issue 17, 11721-11726

Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukatme VP (1999) Cloning, Expression, and in Vitro Activity of Human Endostatin. *Biochem. and Biophys. Research Communications* 258, 345-352

Ding I, Sun JZ, Fenton B, Liu WM, Kimsely P, Okunieff P, Min W (2001) Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. *Cancer Research* 61(2):526-31

Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L (2002) Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organisation. *Cancer research* 62 1944-1947

Dixelius J, Cross MJ, Matsumoto T and Claesson-Welsh L (2003) Endostatin action and intracellular signaling: β -Catenin as a potential target? *Cancer Letters* 196(1):1-12

Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C and Haubeck HD (1991) Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Letters* 56:173-179

Ergün S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Fernando M, Wagener C (2000) CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1: A Potent Angiogenic Factor and a Major Effector of Vascular Endothelial Growth Factor. *Molecular Cell* Vol. 5, 311-320

Ergün S, Kilic N, Wurmbach JH, Ebrahimnejad A, Fernando M, Sevinc S, Kilic E, Chalajour F, Fiedler W, Lauke H, Lamszus K, Hammerer P, Weil J, Herbst H, Folkman J (2001) Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis* 4: 193-206

Ergün S, Tilki D, Oliveira-Ferrer L, Schuch G and Kilic N (2005) Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis. *Cancer lett.* 2006, 238(2):180-7. Epub 9.Aug.2005

Felbor U, Dreier L, Bryant RAR et al. (2000) Secreted Cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 19:1187-94

Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP (2005) Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57(6):883-917

Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C et al. (2001) Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst*; 93:208-13

Ferrara N (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56, 794–814

Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285:1182–1186

Folkman J (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51(6):601-604

Folkman M and Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1:27-31

Folkman J and D'Amore P (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87:1153-5

Folkman J and Kalluri R (2003) Tumor Angiogenesis. *Cancer Medicine*, 6. Edition

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA and Cheresch DA (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270(5241):1500-2

Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY, Ranierra G, Miceli R and Cheresch DA (1998) Vascular integrin $\alpha v \beta 3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clinical Cancer Research* Vol 4 Issue 11 2625-2634

Grant DS, Kleinman HK (1997) Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79:317-33

Hanahan D and Folkman J (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* Vol. 86, 353-364

Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50

Heicappell R (1996) Adhäsionsmoleküle bei urologischen Tumoren. *Urologe* 35:363-369

Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R (1998) Crystal structure of the angiogenesis inhibitor at 1.5 Å resolution. *EMBO J* 17 (6):1656

Horst A, Ito W, Dabelstein J, Schumacher U, Sander H, Turbide C, Brümmer J, Meinertz T, Beauchemin N and Wagener C (2006) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodelling in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 116(6):1596-605

Houck KA, Leung DW, Rowland AM et al. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *JBC* 267:26031-7

Hutchings H, Ortega N, Plouët J (2003) Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J* 02-0691

Iughetti P, Suzuki O, Godoi PH, Ferreira Alves VA, Sertie AL, Zorick T, Soares F, Camargo A, Moreira ES, di Loreto C, Moreira-Filho CA, Simpson A, Oliva G, Passos-Bueno MR (2001) A Polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 61:7375-7378

Ivaska J and Heino J (2000) Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *CMLS* Vol 57, No 1, 16-24

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T and Beauchemin N (1999) Cis-Determinants in the cytoplasmatic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18:5563-5572

Jia YH, Dong XS, Wang XS (2004) Effects of endostatin on expression of vascular endothelial growth factor and its receptors on neovascularization in colonic carcinoma implanted in nude mice. *World J Gastroenterology* 10(22):3361-3364

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov DA, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGF-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15:290-298

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T et al. (1995) Expression of the fms-like tyrosin kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Aca Sci USA* 92:3566-70

Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai J, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme VP (2001) Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol. Cell* 7: 811-822

Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Tsukada K, Kuwano H (2002) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 22(6C):3977-84

Kilic N and Ergün S (2001) Methods to evaluate the formation and stabilization of blood vessels and their role in tumor growth and metastasis. In Brooks SA and Schumacher U (eds), *Metastasis Research Protocols*. Humana Press Oxford

Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Wurmbach JH, Loges S, Chalajour F, Neshat-Vahid S, Weil J, Fernando M, Ergun S (2005) Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem.* 280(3):2361-9

Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG (2000) Endostatin inhibits Endothelial and Tumor Cellular Invasion by Blocking the Activation and Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase 2. *Cancer Research* 60 (19): 5410

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS and Kwon YG (2002) Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *JBC* 277 Issue 31, 27872-27879

Klagsbrun M and D`Amore P (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 259-70

Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V and Seiki M (2005) Membrane-type Matrix Metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a Processing Enzyme for human Laminin γ 2 Chain. *JBC* Vol. 280, Issue 1, 88-93

Kumar CC (2003) Integrin α v β 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets* 4(2):123-31

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271:2746-53

Lucka L, Fernando M, Grunow D, Kannicht C, Horst AK, Nollau P and Wagener C (2004) Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* Vol.14 no.12 pp. 1-14

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G and Pepper MS (2001) Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J* 20:672-682

Merdes A, Brunkener M, Horstmann H, Georgatos SD (1991) Filensin: a new vimentin-binding, polymerization-competent, and membrane-associated protein of the lens fiber cell. *J Cell Biol.* 115:397-410

Miosge N, Sasaki T, Timpl R (1999) Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *FASEB* 13 (13):1743-50

Modlich U, Kaup FJ and Augustin HG (1996) Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab. Invest.* 74:771-780

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

Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann M, Rohde S, Hagenmuller F, Wagener C and Neumaier M (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.* 57:2354-2357

Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, Luostarinen J, Heljasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T, Salo T (2003) Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9 and -13. *JBC* 278(25):22404-11.

Obrink B (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr.Opin. Cell. Biol.* 9:616-626

O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP, Gatter K, Harris AL (2000) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 82(8):1427-32

Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M, Ergun S (2004) Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res* 64(24):8932-8

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, Von Euler G, Joukov V, Sachsel O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U (1996) Vascular endothelial growth factor, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc natl Acad Sci USA* 93:2576-2581

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* Vol.88, 277-285

Peters KG, DeVries C, Williams LT (1993) VEGF Receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8915-9

Prall F, Nolau P, Neumaier M, Haunbeck HD, Drzenieck Z, Helmchen U, Loning T and Wagener C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44:35-41

Rehn M and Pihlajaniemi T (1994) Alpha 1 (XVIII), collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4234-8

Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo C, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Vuori K (2001) Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1024-1029

Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana C, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM (2003) $\alpha v \beta 3$ Integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Research* 63:2079-2087

Risau W, Lemon V (1988) Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol.* 125:441-450

Risau W and Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:73-91

Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674

Roberts WG, Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Science* 108:2369-2379

Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for Integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715

Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen BR, Timpl R (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO* 17(15):4249

Scappatici FA, Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, Johnson F, Engelman EG, Nolan GP (2001) Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity *in vitro* and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol-Ther. J Am. Soc. of Gene Therapy* 3(2):186-96

Schuch G, Oliveira-Ferrer L, Loges S, Laack E, Bokemeyer C, Hossfeld DK, Fiedler W and Ergün S (2005) Antiangiogenic treatment with endostatin inhibits progression of AML *in vivo*. *Leukemia* 19, 1312-1317

Senger DR, Van De Water L, Brown L, Nagy J, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackmann R, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12:303-324

Sheweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845

Shuster CB, Herman IM (1998) The Mechanics of vascular cell motility. *Microcirculation* 5: 239-257

Sienel W, Dango S, Woelfle U, Morresi-Hauf A, Wagener C, Brümmer J, Mutschler W, Passlick B, Pantel K (2003) Elevated expression of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion

Molecule 1 promotes Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 2260- 2266

Singer BB, Scheffrahn I and Obrink B (2000) The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 60:1236-1244

Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA et al. (1995) Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92:11-4

Stocks SC, Albrechtsen M and Kerr MA (1990) Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine, Le^x) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *J Biochem.* 268, 275-280

Stoffel A, Neumaier M, Gaida FJ, Fenger U, Drzeniek Z, Haubeck HD and Wagener C (2003) Monoclonal, anti-domain and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,000 granulocyte membrane antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family. *J Immuno.* 150, 4978-4984

Stupack DG and Chersesh DA (2004) Integrins and Angiogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 64:207-38

Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M and Kalluri R (2003) Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ -integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 100, Issue 8, 4766-4771

Takahashi K, Saishin Yos., Saishin Yum., Silva RL, Oshima Y, Oshima S, Melia M and Campochiaro PA (2003) Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularisation and retinal detachment. *FASEB J* 02-0824

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME et al. (1992) Identification of the KDR tyrosin kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Comm.* 187:1579-86

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze HJ, Brunner G and Schumacher U (2002) CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the Development of Metastatic Disease. *J Clin Oncology* Vol 20, Issue 10, 2530-2536

Tilki D, Irmak S, Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Miethe K, Atakaya H, Hammerer P, Friedrich MG, Schuch G, Galalae R, Stief CG, Kilic E, Huland H and Ergun S (2006) CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene*, in publishing.

Veikkola T and Alitalo K (1999) VEGFs receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol* 9 (3), 211-220

Vu TH et al. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93. 411-422

Wagener C and Ergun S (2000) Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res* 261:19-24

Watt F (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* Vol. 21, No 15 pp. 3919-3926

Wen W, Moses MA, Wiederschain D et al. (1999) The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Research* 59: 6052-6

Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J (2002) Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res.* 62(19):5580-9

Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lowik C, Timpl R, Olsen BR (1999) Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* 18:4414-4423

Yokoyama Y, Ramakrishnan S (2004) Addition of integrin binding sequence to a mutant human endostatin improves inhibition of tumor growth. *International Journal of Cancer* Vol. 111, Issue 6:839-848

Zhang M, Yang Y, Yan M, Zhang J (2006) Downregulation of vascular endothelial growth factor and integrin beta3 by endostatin in a mouse model of retinal neovascularization. *Exp Eye Res.* 82 (1):74-80

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S. Ergün danke ich besonders für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine intensive Betreuung und seine kritischen Anregungen.

Frau Dr. rer. nat. M. Fernando danke ich für ihre Betreuung und Unterstützung, sowie ihr Engagement, welches einen hohen Beitrag am Fortgang dieser Arbeit hatte.

Frau Prof. Dr. med. G. Rune danke ich ausdrücklich dafür, dass ich die wissenschaftlichen Experimente im Rahmen dieser Dissertation in den Laboratorien ihres Institutes durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. M. Davidoff danke ich sehr für seine großzügige Hilfestellung und dafür, dass ich in seinem Labor immunohistochemische Untersuchungen durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. C. Wagener, Direktor der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg danke ich für die Bereitstellung des CEACAM1-Antikörpers.

Ganz herzlich danke ich den medizinisch technischen Assistentinnen des Anatomischen Institutes, Frau B. Kruck, Frau B. Knutz und Frau C. Kretschmar für ihre liebevolle Begleitung und ihre hervorragende technische Hilfestellung.

Nicht zuletzt möchte ich ganz ausdrücklich meinem liebevollen Ehemann und meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung und Geduld ich mich meiner Arbeit nicht so intensiv hätte widmen können.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname u. Name: Serap Yilmaz, geb. Secer
 Geburtsdatum- und ort: 15.07.1976 in Pinneberg
 Familienstand: verheiratet, eine Tochter (5 ½ J.)
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

August 1986 – Mai 1992 Matthias-Claudius-Realschule in Pinneberg
 August 1992 – Juni 1995 Johannes-Brahms-Gymnasium in Pinneberg
 Abitur Note 2,1

Hochschulausbildung

Oktober 1995 ein Semester Pharmazie an der Uni. HH
 April 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Uni. HH
 März 1998 Ärztliche Vorprüfung
 April 1999 I. Staatsexamen
 September 2001 II. Staatsexamen
 Dezember 2002 III. Staatsexamen
 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung gut (2,16)

Ärztin im Praktikum

Juli 2003- Oktober 2004 Krankenhaus Großhansdorf
 Pneumologisch-Internistische Abteilung

Assistenzärztin

Oktober 2004- November 2004 Krankenhaus Großhansdorf
 Pneumologisch-Internistische Abteilung

Seit Dezember 2004 Kliniken Maria Hilf, St. Kamillus Krankenhaus
 Abteilung für Pneumologie, Schlaf- und
 Beatmungsmedizin in Mönchengladbach

Veröffentlichung

Fulminantes Rechtsherzversagen bei pulmonaler
 mikroskopischer Tumorzelembolie – eine seltene
 Differentialdiagnose. Yilmaz S, Galle J, Welcker L,
 Kanzow G. Pneumologie 2004; 6: 400-403.

Sprachkenntnisse

Muttersprache Türkisch,
 Fremdsprachen Englisch und Französisch

Hamburg im August 2006

Serap Yilmaz

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: