



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

**Die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen dem  
Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 und dem Angiogeneseinhibitor Endostatin  
bei der Gefäßneubildung**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Elif Ege Erenler  
Aus Stuttgart / Deutschland

Hamburg 2009

**Angenommen vom Fachbereich der  
Universität Hamburg am: 17.07. 2009**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Ergün**

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler**

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher**

Meinen Eltern und meinem Bruder  
in Liebe

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1. Allgemeine Einführung in die Angiogenese	5
2.2. Angiogenesefaktoren	7
2.2.1. VEGF-Familie und VEGF-Rezeptoren	7
2.2.2. CEACAM 1	12
2.2.3. Angiopoietine	16
2.2.4. Endostatin	17
2.3. Arbeitshypothese und Zielsetzung	21
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1. Antikörper, Chemikalien und Substanzen	23
3.2. Zellkultur	24
3.3. Transfektion der Zellen	24
3.4. Endotheliales Tubeformierungsassay	25
3.5. Wound-Assay	26
3.6. Immunhistochemische Analysen	26
3.7. Quantitative real-time RT-PCR Analysen	28
3.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse	29
3.8.1. Wound-Assay	29
3.8.2. Tubeformierungsassay	29
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
4.1. Immunfärbung Endostatin und CEACAM1 in frühen Tumorgefäßen	30
4.2. Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin bei endothelialer Migration	30
4.3. CEACAM1 Überexpression und CEACAM1 Silencing in HDMECs unter Verwendung von Endostatin bei der endothelialen Tubeformierung	33
4.4. Immunlokalisation von CEACAM1 und Endostatin in <i>in vitro</i> induzierten endothelialen Tubes	37

<b>5. DISKUSSION</b>	<b>39</b>
<b>5.1. CEACAM1 und Endostatin sind in die frühe Morphogenese der Blutgefäße involviert</b>	<b>39</b>
<b>5.2. CEACAM1 silencing schwächt die anti-angiogenetische Wirkung von Endostatin bei der endothelialen Migration</b>	<b>42</b>
<b>5.3. CEACAM1 silencing schwächt die inhibitorische Wirkung von Endostatin bei der endothelialen Tubeformierung</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>47</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>57</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>60</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b>	<b>62</b>
<b>10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>64</b>

# 1. Zusammenfassung

Angiogenese, die als Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen definiert ist, findet sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Vorgängen statt. Es konnte gezeigt werden, dass Angiogenese bei dem Wachstum und der Metastasierung von soliden Tumoren eine Rolle spielt. Bei diesem komplexen Prozess spielen neben pro- und antiangiogenetischen Faktoren auch Zelladhäsionsmoleküle eine essentielle Rolle. Abhängig von dem jeweiligen Gefäßentwicklungsstadium finden direkte und indirekte Interaktionen zwischen den verschiedenen Faktoren statt. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule1) ist in Endothelzellen angiogenetisch aktivierter Blutgefäße hoch reguliert und wirkt proangiogenetisch. Endostatin ist ein potenter Angiogeneseinhibitor, welches seine antiangiogenetischen Eigenschaften nach Abspaltung vom Kollagen 18 entfaltet. Bis zum Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Endostatin als auch CEACAM1 besonders stark in der Wand neu formierter Blutgefäße zu finden sind und eine direkte Interaktion beider Faktoren in Form einer stadienabhängigen Ko-Lokalisation besteht. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Endostatin direkt an CEACAM1 bindet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, in wie weit die Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin für die Regulation der Morphogenese von Kapillaren und für die Migration und Tubebildung der Endothelzellen eine Rolle spielt. Im Wound-Assay konnte gezeigt werden, dass CEACAM1-Silencing in primären menschlichen Endothelzellen (HDMECs) die antimigratorischen Effekte von Endostatin abschwächt. Bei *in vitro* endothelialen Tube-Assays war die Zahl, die Länge und das Netzwerk von Tubes unter

Applikation von VEGF+Endostatin oder VEGF+Endostatin+Angiopoietin-1 gesteigert, wenn HDMECs mit CEACAM1-Silencing verwendet wurden, und die darauf folgende immunhistochemische Färbung dieser Tubes zeigte eine Veränderung am Lokalisationsmuster von Endostatin in Abhängigkeit von CEACAM1-Präsenz versus Abwesenheit. Die vorliegende Arbeit belegt erstmalig, dass die angiogenesehemmenden Effekte von Endostatin von der endothelialen Präsenz des CEACAM1 abhängig sind und die Interaktion zwischen Endostatin und dem proangiogenetischen Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 endotheliale Funktionen wie Migration und Tubebildung beeinflussen. Weitere *in vivo* Analysen sind notwendig, um die klinisch-funktionelle Interaktion zwischen Endostatin und CEACAM1 bei der Neubildung von Blutgefäßen und bei der antiangiogenetischen Tumorthherapie evaluieren zu können.



## **2. Einleitung**

### **2.1. Allgemeine Einführung in die Angiogenese**

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

Angiogenese wird durch ein Gleichgewicht zwischen Angiogeneseaktivatoren wie beispielsweise VEGF, Angiopoietin-1 (Ang-1), Fibroblast Growth Factor (FGF), Angiogenin sowie Angiogeneseinhibitoren wie Endostatin und Angiostatin, reguliert, die parakrin und/ oder autokrin auf die Gefäße wirken (Folkman 2003; Hanahan und Folkman 1996; O'Reilly et al., 1997; O'Reilly et al., 1994; Pepper 1997; Plendl et al., 2002). Auch Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine, VE-Cadherin, ICAM und VCAM spielen eine wesentliche Rolle bei der funktionellen Modulierung der Kapillarbildung und der Gefäßpermeabilitätsregulierung (Carmeliet et al., 1999; Kevil et al., 1998; Vitolo et al., 1996). Ein weiteres sehr wichtiges Zelladhäsionsmolekül ist CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule1), das proangiogenetische Signalkaskaden aktiviert und somit bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt (Ergun et al., 2000; Kilic et al., 2005).

Als proangiogen bezeichnet man die Faktoren, deren Expression oder parakrine Wirkung zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Tubeformierung von Endothelzellen führt. Als antiangiogen bezeichnet man die Faktoren, die eine angiogene Antwort der Endothelzellen hemmen oder somit hemmend auf die Neubildung von Blutgefäßen wirken (Folkman und Ingber 1992).

Die Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden stellt einen komplexen Prozess dar.

a) Proliferation und Migration von Endothelzellen: Es kommt zu einer Zunahme der Gefäßdurchlässigkeit und damit verbunden zu einer Extravasation von Plasmaproteinen, zum Beispiel Fibrinogen (Carmeliet 2000). Daraufhin kommt es durch Proteasen der Metalloproteinasenfamilie zur Degradierung der Basalmembran (Koshikawa et al., 2005; Vu et al., 1998). Nun wird der Endothelzellverband aufgelöst und es kommt zur Proliferation und Migration von Endothelzellen.

b) Formierung der Endothelzellen zu einem ersten Gefäßrohr: Endothelzellen werden durch proangiogenetische Faktoren zu einer gerichteten Migration angeregt. Dieser Prozess endet mit der Formierung neuer Kapillaren, die erst nur aus den endothelialen Tubes (Gefäßrohre) bestehen.

c) Integration von peri-endothelialen Zellen: In weiteren Schritten erfolgt die Ausreifung der neugebildeten Blutgefäße. Dies beinhaltet die Ausbildung einer neuen Basalmembran und die Integration der peri-endothelialen Zellen wie Perizyten (bei Kapillaren) oder glatten Muskelzellen (bei größeren Gefäßen) in der Gefäßwand. Dies dient der Stabilisierung und Unterstützung der neuen Gefäßstruktur (Ergun et al., 2006; Folkman und D'Amore 1996; Hanahan 1997).

## 2.2. Angiogenesefaktoren

### 2.2.1. VEGF-Familie und VEGF-Rezeptoren

#### VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF)

Bei dem Protein VEGF-A handelt es sich um ein homodimeres Glykopeptid von 45 kDa und um einen Wachstumsfaktor. Es ist ein Schlüsselprotein in der Regulation der Angiogenese und wirkt auf Endothelzellen mitogen. VEGF-A, auch als VEGF bezeichnet, wird von Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und auch Tumorzellen gebildet und die Expression von vielen Hormonen, Zytokinen (z.B. b-FGF (Stavri et al., 1995), TGF- $\beta$  (Houck et al., 1992), Interleukin-6, PDGF, EGF), Onkogene (Fernandez et al., 2001) und Ausfall von Tumorsuppressorgenen induziert. 1989 gelang es den Arbeitsgruppen von Ferrara und Henzel, die VEGF als Heparin-bindendes Protein aus den FSH (Follikelstimulierendes Hormon)-produzierenden Zellen der Hypophyse zu isolieren (Ferrara und Henzel 1989), VEGF zu isolieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass VEGF neben der endothelialen Proliferation auch die Migration und die Tubebildung der Endothelzellen *in vitro* steigert (Ferrara et al., 2003; Leung et al., 1989). Von VEGF sind bislang fünf verschiedene Isoformen bekannt. Sie werden durch alternatives Splicing der mRNA, eines aus acht Exons bestehenden Gens, generiert: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>, wovon VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, und VEGF<sub>189</sub> die Hauptisoformen darstellen. Sie alle besitzen eine Heparinbindungsdomäne (Klagsbrun und D'Amore 1996). Außerdem unterscheiden sich die 5 Isoformen in ihrer Löslichkeit: VEGF<sub>121</sub> ist frei löslich, während VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> komplett an die extrazelluläre Matrix gebunden sind. VEGF<sub>165</sub> findet man sowohl löslich als auch in gebundener Form vor. VEGF<sub>145</sub> ist eine seltene Variante und man kann es in unterschiedlichen

Tumorzelllinien im weiblichen Genitaltrakt finden (Poltorak et al., 1997). Außerdem wurde in einer neueren Studie aufgezeigt, dass Endothelzellen offensichtlich durch Integrine direkt an VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> adhären können (Hutchings et al., 2003).

VEGF ist essentiell beteiligt an der Vaskulogenese, die die *de novo* Gefäßbildung durch vaskuläre Stammzellen beschreibt (Breier et al., 1992; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996), und an der normalen und tumorinduzierten Angiogenese (Senger et al., 1993). Ebenso wichtig ist seine Wirkung bei der Gefäßneubildung bei Wundheilung, der rheumatoiden Arthritis (Fava et al., 1994; Koch et al., 1994) und der Angiogenese für das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren.

Dies konnte an Untersuchungen mit Knockout-Mäusen für VEGF gezeigt werden. Wegen defekter oder nicht erfolgter Vaskularisierung starben diese Mäuse am Embryonaltag 8-9. Ebenso versterben Mäuse mit nur einem fehlenden VEGF-Allel am 11.-12. Embryonaltag aufgrund von Defekten in der frühen vaskulären Entwicklung (Ferrara et al., 2004).

VEGF ist außerdem ein potenter Gefäßpermeabilitätsfaktor, der die Gefäßpermeabilität um etwa das 50.000-fache gegenüber Histamin steigert (Senger et al., 1990; Senger et al., 1986). Deswegen wird VEGF auch als VPF (Vascular Permeability Factor) bezeichnet (Dvorak 2002). Weiterhin wurde beschrieben, dass VEGF durch Lockerung der inter-endothelialen Kontakte (Tight junctions) und der Induktion der Fenestrierung von Venen- und Kapillarendothel permeabilitätssteigernd wirkt. Hinsichtlich der Angiogenese ist anzumerken, dass die pathologische Steigerung der Gefäßpermeabilität in den meisten Fällen der erste Schritt zu ihrer Aktivierung ist. Dies ist meist mit der völligen Destabilisierung

der Gefäßwand verbunden, gefolgt von der Desintegration der Endothelzellen und der Loslösung der peri-endothelialen Zellen von der Gefäßwand (Ergun et al., 2006).

### VEGF-C und VEGF-D

VEGF-C und VEGF-D sind im Gegensatz zu VEGF und VEGF-B das Resultat aus posttranslational proteolytischer Prozessierung (Joukov et al., 1997; Stacker et al., 1999). Diese beiden Mitglieder der VEGF-Familie besitzen sowohl eine mitogene Wirkung auf Endothelzellen als auch eine Wirkung als lymphangiogenetische Wachstumsfaktoren. Dies geschieht über die Bindung an VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). Während Embryonen mit einer VEGF-C-Deletion aufgrund der fehlenden Ausbildung von Lymphgefäßen nicht lebensfähig sind (Karkkainen et al., 2004), ist die Funktion von VEGF-D während der Embryonalentwicklung nicht bekannt. VEGF-D ist zum größten Teil während der Embryogenese in der Lunge und Haut zu finden (Farnebo et al., 1999). Außerdem wird es von Melanomzellen exprimiert. Am Beispiel dieses Tumors konnte gezeigt werden, dass VEGF-D sowohl bei der Tumorangiogenese als auch bei der Lymphangiogenese eine wichtige Rolle spielt (Achen et al., 2001). VEGF-D steigert in Melanomen das Lymphgefäßwachstum und die lymphatische Metastasierung (Stacker et al., 2001). Auch bei der lymphatischen Metastasierung von intrathorakalen Lungentumoren spielen VEGF-C und VEGF-D eine Rolle (Ishii et al., 2004). Inwieweit VEGF-C und VEGF-D angiogenetische oder lymphangiogenetische Effekte zeigen, scheint von ihren Interaktionen mit den Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 im Endothel abhängig zu sein.

### VEGF-E (Orf-virus-derived VEGF)

Das VEGF-E (VEGF<sub>orf</sub>) Gen konnte aus dem Orf Parapoxvirus isoliert werden. VEGF-E bindet an VEGFR-2 (KDR). Es bindet aber nicht an VEGFR-1 (Meyer et al., 1999). Es wirkt mitogen auf Endothelzellen und steigert in *in vivo*-Versuchen die Gefäßpermeabilität (Ogawa et al., 1998).

### VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt-4), Neuropilin (Nrp) -1 und -2

Die VEGF-Familie entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an seine Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, sowie Neuropilin-1 und -2, die als Ko-Rezeptoren für VEGFR-2 dienen. Es handelt sich dabei um hochaffine Rezeptoren, die der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren angehören. VEGF bindet an zwei dieser Tyrosinkinase-Rezeptoren, VEGFR-1 (Fetal Liver Tyrosine Kinase, Flt-1) und VEGFR-2 (Kinase-Domain Region, KDR oder Flk-1). Sie unterscheiden sich hinsichtlich der von ihnen induzierten Signalkaskaden. VEGF-3 (Flt-4) dient hauptsächlich als Bindungspartner für VEGF-C und VEGF-D und gehört derselben Rezeptorfamilie an. Weiterhin interagiert VEGF mit einer weiteren Gruppe von Faktoren, den Neuropilinen-1 und -2 (Nrp-1/-2). Sie dienen als Ko-Rezeptoren und amplifizieren einerseits die Interaktion von VEGF mit seinem Rezeptor VEGFR-2 und steigern somit die Affinität von VEGF zu dem VEGFR-2. Alle diese Rezeptoren sind hauptsächlich in Endothelzellen der Blutgefäße zu finden (Achen et al., 1998; Joukov et al., 1996; Millauer et al., 1993; Quinn et al., 1993). Sie werden aber auch von Osteoblasten, Monozyten/Makrophagen und Perizyten der Kapillarwand exprimiert (Barleon et al., 1996; Takagi et al., 1996; Takahashi et al., 1995). Durch die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren, insbesondere an den VEGFR-2, kommt es zur Proliferation der Endothelzellen und zu einer Zunahme

der Gefäßpermeabilität. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass VEGFR-2 den Hauptmediator der angiogenen und mitogenen Wirkung von VEGF auf Endothelzellen darstellt. Analysen an VEGF-Rezeptor-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass VEGFR-1 und VEGFR-2 für die Differenzierung der Endothelzellen aus den Hämangioblasten (Asahara und Kawamoto 2004; Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995) und für die darauf folgende Formierung endothelialer Gefäßrohre unverzichtbar sind. Schaltet man den VEGFR-2 aus, sterben die Knockout-Mäuse am 8. Embryonaltag, da nicht genügend Endothelzellen vorhanden sind. VEGFR-1 Knockout-Mäuse haben zwar ausreichend Endothelzellen, sterben aber aufgrund der Unfähigkeit, sie zu ersten Gefäßrohren zu formieren, bzw. aufgrund des Unterbleibens einer stabilen Kapillarbildung am 9.-10. Embryonaltag (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995).

Die Expression von VEGFR-2 unterliegt einer Autoregulation: VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D führen zu einer Hochregulierung von VEGFR-2 (Shima et al., 1995; Stacker et al., 2001). Die Neuropiline (Nrp-1/-2) spielen eine Rolle in der Immunologie und der neuronalen Entwicklung, sind aber auch in die Angiogenese involviert. Nrp-1 bindet VEGF, VEGF-B und PlGF (Placenta-like Growth Factor), Nrp-2 bindet VEGF, VEGF-C und PlGF (Ferrara et al., 2003). Nrp-1 dient als Ko-Rezeptor. Er verstärkt die Interaktion zwischen VEGF und VEGFR-2, formt Komplexe mit VEGFR-1 und steigert die Tumorangio-genese *in vivo* (Soker et al., 1998). Nrp-2 wird zusätzlich auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert. Mutiertes Nrp-2 führt zu Abnormitäten in der Formation kleiner Lymphgefäße in Mäusen.

### Placenta-like Growth Factor (PlGF)

PlGF existiert in drei Isoformen. Sie entstehen durch alternatives Splicen (Nagy et al., 2003). Es kann Heterodimere mit VEGF bilden (DiSalvo et al., 1995). PlGF wird überwiegend in der Plazenta, in Herz- und Lungengewebe exprimiert (Persico et al., 1999). Es bindet als Homodimer mit hoher Affinität an VEGFR-1 und Neuropilin-1, interagiert aber nicht mit VEGFR-2 (Park et al., 1994). PlGF bildet Heterodimere mit VEGF und bindet dann an VEGFR-2.

### VEGF-B

Die genaue Rolle von VEGF-B (auch als VEGF-related Factor/ VRF bezeichnet) ist noch nicht vollständig bekannt. Es ähnelt dem Placenta-like Growth Factor in vielen Aspekten (Joukov et al., 1997) und ist ein Ligand für VEGFR-1 und Neuropilin-1 (Nrp-1). Mit VEGF kann es Heterodimere bilden. Es wird in den beiden Isoformen VEGF-B<sub>167</sub> und VEGF-B<sub>186</sub> exprimiert (Olofsson et al., 1996). Die prädominante Form stellt VEGF-B<sub>167</sub> dar. Es ist in großen Mengen in gestreifter Muskulatur, im Myokard und braunem Fettgewebe vorhanden (Salven et al., 1998). Dies weist auf eine Rolle in der Vaskularisierung von Muskulatur oder braunem Fettgewebe hin. VEGF-B-Knockout-Mäuse überleben, haben aber ein kleineres Herz, eine abnorme koronare Vaskularisierung und eine verminderte Toleranz gegenüber kardialen Ischämien (Bellomo et al., 2000).

### **2.2.2. CEACAM 1**

CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule1) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das in die Familie des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) gehört. Es ist strukturell in die Superfamilie der Immunglobuline einzuordnen



(Obrink 1997). Es kann sowohl homophile als auch heterophile Bindungen zu anderen Mitgliedern der CEA-Familie eingehen (Rojas et al., 1990).

CEACAM1 war früher auch unter dem Namen BGP (Biliary Glycoprotein) beim Menschen oder als C-CAM bei der Ratte bekannt. In glykolisierter Form ist es 160 kDa schwer und hat extramembranöse, transmembranöse und zytoplasmatische Domänen (Beauchemin et al., 1999; Lin und Guidotti 1989; Thompson et al., 1991). Physiologisch wird CEACAM1 an der luminalen Oberfläche von Epithelien zahlreicher Hohlorgane oder Drüsen wie Prostata, kolorektale Organe und Brustdrüse exprimiert (Prall et al., 1996). Es ist ebenfalls in Leukozyten in hohen Mengen zu finden. CEACAM1 wird in Endothelzellen angiogenetisch aktivierter kleiner Blutgefäße bei der Tumorstromavaskularisierung, der Vaskularisierung des Endometriums, der Wundheilung und der Entzündungsprozesse exprimiert (Ergun et al., 2000; Kilic et al., 2005; Wagener und Ergun 2000), wohingegen in Endothelzellen ruhender und reifer Blut- bzw. Lymphgefäße CEACAM1 nicht nachweisbar ist.

In seiner glykolisierten Form kommt es in menschlichen Granulozyten in hohen Mengen vor. In seiner löslichen Form besitzt CEACAM1 proangiogenetische Eigenschaften: Es fördert die Chemotaxis, die Proliferation und die Tubebildung der Endothelzellen. Ergun et al. konnten zeigen, dass CEACAM1 angiogenetische Eigenschaften besitzt und an der durch VEGF induzierten Morphogenese der Blutgefäße maßgeblich beteiligt ist. Die Stimulation von HDMECs mit VEGF führt zu einer Hochregulierung der CEACAM1-Expression (Ergun et al., 2000; Wagener und Ergun 2000). Die durch VEGF induzierte endotheliale Tubebildung wird durch das Ausschalten von CEACAM1 mittels siRNA (Kilic et al., 2005) gehemmt. Auch die Applikation des monoklonalen

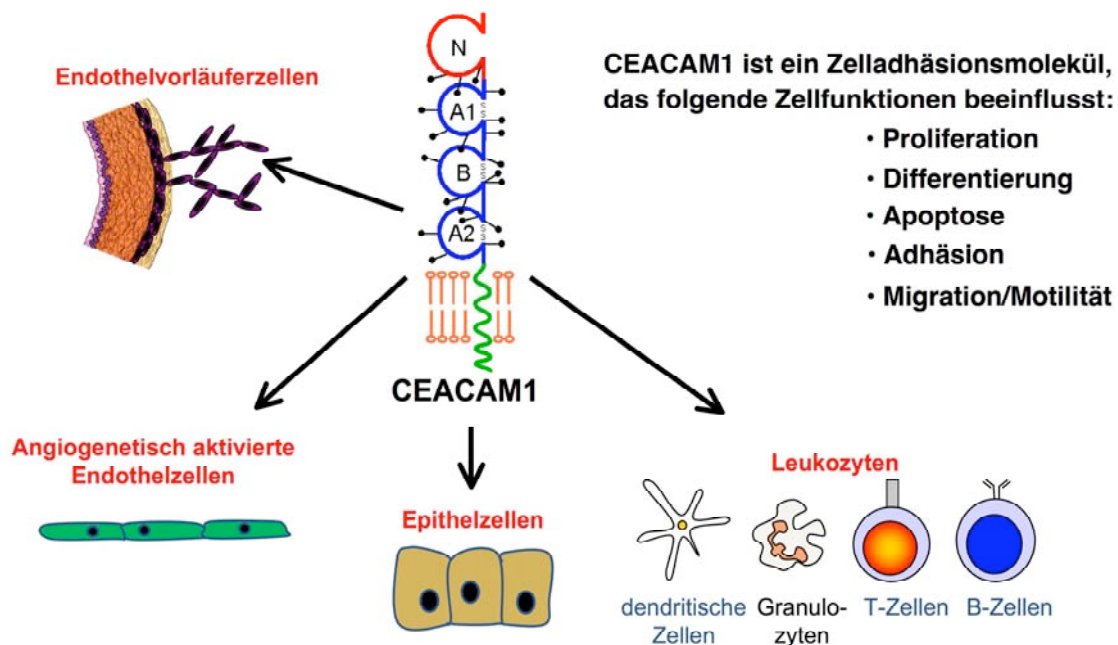
Antikörpers gegen CEACAM1, 4D1/C2, führt zur Hemmung der endothelialen Tubebildung.

Eine weitere Rolle spielt CEACAM1 in pathologischen Vorgängen. Beispielsweise kann man eine CEACAM1-Expression in bestimmten Stadien des Bronchialkarzinoms (Sienel et al., 2003) und des Prostatakarzinoms (Busch et al., 2002) nachweisen. Erstmals zeigten Hixson et al. (Hixson et al., 1985) die Beteiligung von CEACAM1 bei der Tumorentstehung, indem sie eine Abnahme der CEACAM1-Expression auf der Proteinebene im hepatozellulären Karzinom nachwies. Basierend auf weiteren Ergebnissen, die eine Herabregulierung von CEACAM1 im Kolon-(Nollau et al., 1997), Brust-(Riethdorf et al., 1997) und Endometriumkarzinom (Bamberger et al., 1998) zeigten, wurde dem CEACAM1 eine tumorsuppressive Aktivität zugesprochen.

Weitere interessante Ergebnisse ergaben immunhistochemische Untersuchungen für CEACAM1. An Endothelzellen kleiner unreifer Blutgefäße konnte CEACAM1 sowohl bei der physiologischen als auch bei der pathologischen Angiogenese nachgewiesen werden, wohingegen bei ausgereiften und ruhenden Gefäßen keine Immunfärbung zu sehen war. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Hochregulierung von CEACAM1 zu einer Hochregulierung von proangiogenetischen Faktoren wie z.B. VEGF, Angiopoietin-1 und Angiogenin führt (Kilic et al., 2005). Eine Herunterregulierung von CEACAM1 in Epithelzellen führt hingegen zur Aktivierung der Angiogenese. Dies wurde am Beispiel des Harnblasenkarzinoms (Oliveira-Ferrer et al., 2004) und des Prostatakarzinoms (Tilki et al., 2006) gezeigt. Interessanterweise war nach epithelialer Herunterregulierung von CEACAM1 durch siRNA neben der proangiogenetischen Wirkung auch eine lymphangiogenetische Wirkung nachweisbar, da die

Expression von VEGF-C und VEGF-D signifikant anstieg. In einer weiteren, kürzlich erschienenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 zu einer Reprogrammierung von vaskulären Endothelzellen zu lymphatischen Endothelzellen führt und in Tumorlymphgefäßen exprimiert wird (Kilic et al., 2007). Über homophile Bindung des membrangebundenen CEACAM1 wird nicht nur Zell-Zell-Adhäsion vermittelt, sondern werden auch Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Eine der bisher nicht ausreichend geklärten Fragen ist, ob CEACAM1 als Rezeptor für lösliche Liganden dient. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass der Angiogeneseinhibitor Endostatin direkt an CEACAM1 bindet. Bisher gibt es jedoch kaum Informationen über die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin.

### CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1



**Abb.1: CEACAM1 und seine Funktionen:** In seiner glykolisierten Form kommt es in menschlichen Leukozyten in hohen Mengen vor. In seiner löslichen Form besitzt CEACAM1 proangiogenetische Eigenschaften: Es fördert die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und die Migration der Endothelzellen.

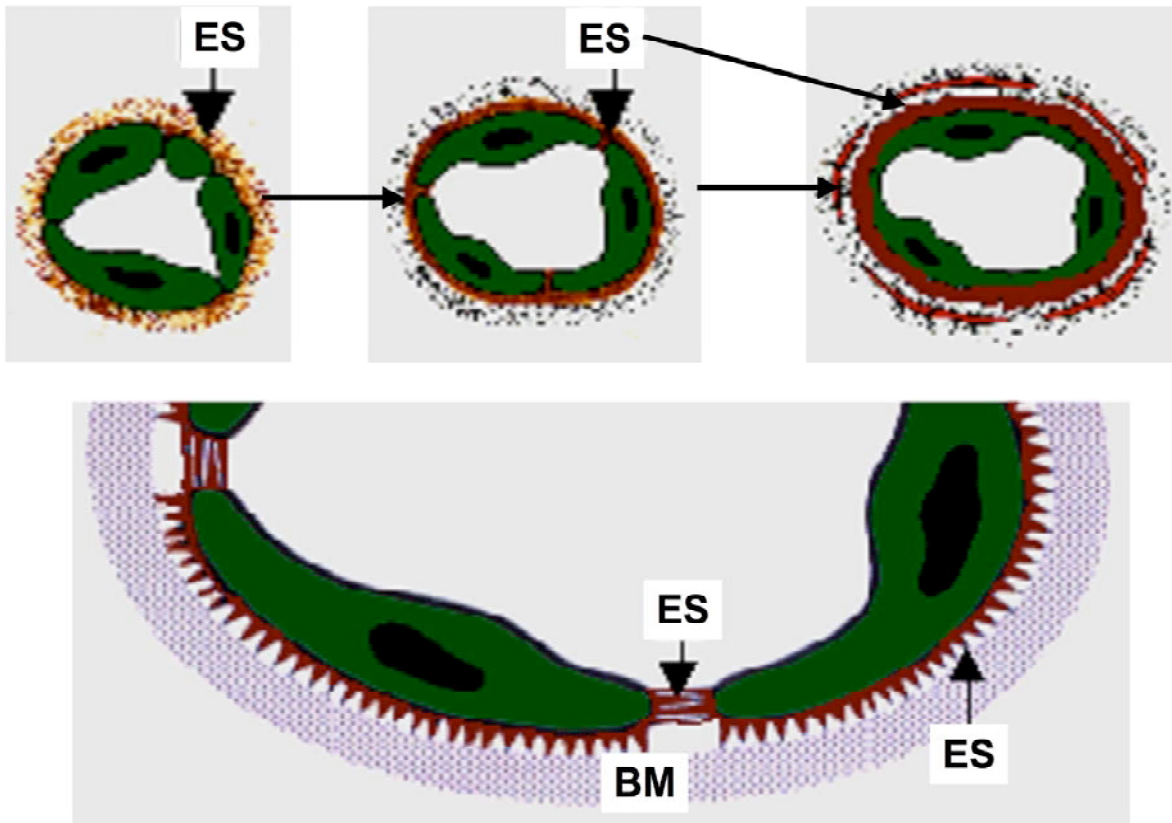
### **2.2.3. Angiopoietine**

Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen die Angiopoietine. Sie wurden in den letzten Jahren als bedeutende Angiogeneseregulatoren erkannt (Augustin et al., 2009; Maisonpierre et al., 1997; Suri et al., 1996; Thurston 2003). Sie binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne von Tie-2, bei dem es sich um einen endothel-spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor handelt. Angiopoietin-1 (Ang-1) ist ein Agonist und aktiviert den Tie-2-Signalweg durch Phosphorylierung von Tie-2. Es hat in erster Linie eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen, weniger eine proliferative Wirkung (Witzenbichler et al., 1998). Im Gegensatz dazu wirkt Angiopoietin-2 (Ang-2) als Antagonist und löst durch die Bindung an den Rezeptor Tie-2 keine Phosphorylierung des Rezeptors aus. Es stellt somit einen kompetitiven Inhibitor des Ang-1 dar. In der Angiogenese wirkt Ang-1 als ein Gefäß-stabilisierender Faktor, der den Einbau von Perizyten und glatten Muskelzellen in die Gefäßwand fördert. Ang-2 hingegen wirkt destabilisierend auf Gefäße und steigert mit VEGF die Angiogenese (Thurston 2003). Ang-1 alleine oder in Kombination mit VEGF ist für das Überleben von Endothelzellen und neugebildeten Blutgefäßen von großer Bedeutung (Kwak et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Verhältnis zwischen Ang-1 und Ang-2 sich in Tumoren zugunsten von Ang-2 verschiebt (Ahmad et al., 2001). In dieser Konstellation wirkt Ang-2, vor allem zusammen mit VEGF-A, gefäßdestabilisierend und fördert die Angiogenese. Ohne VEGF kommt es bei erhöhter Expression von Ang-2 zur Regression von Blutgefäßen .

#### **2.2.4. Endostatin**

Neben Alpha-Interferon, Plättchen Faktor 4, Thrombospondin-1 und-2, Angiostatin, Prolaktin, löslicher basophiler FGF-Rezeptor und Tumstatin zählt das Endostatin zu den Angiogeneseinhibitoren (Folkman und Kalluri, 2003(O'Reilly et al., 1997), auf dessen Rolle nun näher eingegangen werden soll.

Bei Endostatin handelt es sich um ein 20 kDa schweres C-terminales Fragment des Kollagen 18, das durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird. Erst nach einer solchen Spaltung durch Enzyme wie Elastase und Cathepsin entfaltet Endostatin seine antiangiogenetischen Effekte (Felbor et al., 2000; O'Reilly et al., 1997; Wen et al., 1999), indem es die endotheliale Proliferation und Migration und somit die Angiogenese hemmt. Endostatin wurde vom Erstentdecker O'Reilly et al., 1997 aus der Arbeitsgruppe von J. Folkman (Boston, USA) als Angiogeneseinhibitor beschrieben. Sie konnten in experimentellen Tumormodellen mit Mäusen zeigen, dass Endostatin das Wachstum und die Metastasierung dieser Tumore hemmt, so dass bei den behandelten Tumoren anschließend eine nur in histologischer Analyse mit dem Lichtmikroskop nachweisbare Minimalläsion übrig blieb, die avaskulär war (O'Reilly et al., 1997).



**Abb.2: Endostatin:** Endostatin wird während der Entwicklung der Blutgefäße in die Morphogenese der Blutgefäße einbezogen. In dieser Phase wird Endostatin in der Gefäßwand also stark akkumuliert und nachgewiesen. (Zeichnung: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen)

Ein weiterer Mechanismus ist die Wirkung von Endostatin an der Struktur der Gefäßwand. So konnte gezeigt werden, dass in neu formierten Blutgefäßen Endostatin zu einer Stabilisierung der Gefäßwand führt. Deswegen wurde postuliert, dass Endostatin zur Reifung der Blutgefäße führt, und damit zu einer Reduktion der Gefäßpermeabilität beiträgt. In *in vivo* und *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Endostatin die durch VEGF initiierte Formierung von Kapillaren blockiert, aber die bestehenden Kapillaren beständiger und stabiler waren als die, die sich ohne Endostatinbehandlung entwickelten. Auch die Lebensdauer der kapillarähnlichen endothelialen Tubes war länger als die, die ohne Endostatinbehandlung gebildet wurden. (Ergun et al., 2001).

Der genaue Wirkmechanismus des Endostatins ist jedoch weitestgehend unbekannt. Verschiedene Mechanismen wurden bisher für die antiangiogenetische Wirkung von Endostatin verantwortlich gemacht. Zu nennen sind eine Vielzahl von Interaktionen des Endostatins mit verschiedenen Faktoren, zum Beispiel dem  $\beta$ -Catenin (Dixelius et al., 2002). So sind in Zell-Zell-Interaktionen u.a.  $\beta$ -Catenine involviert. Die Migration von Endothelzellen, welche für den Ablauf der Angiogenese notwendig ist, erfordert einen kontinuierlichen Auf- und Abbau von Zell-Zell-Interaktionen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Endostatin eine Tyrosinphosphorylierung des  $\beta$ -Catenins bewirkt, welches zur Lockerung bzw. Loslösung der Zell-Zell-Kontakte führte (Dixelius et al., 2003). Auch Zell-Matrix-Interaktionen spielen für den Ablauf der Angiogenese eine wichtige Rolle. In diesen Interaktionen ist vor allem die Rolle von Integrinen von Bedeutung. Integrine sind heterodimere Rezeptorkomplexe, die aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten aufgebaut sind und die Kontakte zur Extrazellulärmatrix herstellen und somit Signale in die Zelle übertragen. Die Untereinheiten werden in Alpha- und Beta-Subtypen unterteilt. Bislang sind 18 verschiedene Alpha- und 8 verschiedene Beta-Subtypen bekannt (Stupack und Cheresch 2004). Die bevorzugte Bindungssequenz von Integrinen ist eine Gly-Asp-Sequenz. Man findet sie in den Matrixproteinen Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen und Kollagen (Ruoslahti 1996).

Bei der Angiogenese spielen die Integrine eine zentrale Rolle. So konnte für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin 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., 1995).

Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass Endostatin an  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin bindet (Rehn et al., 2001; Sudhakar et al., 2003). Durch eine verbesserte Bindungseigenschaft des Endostatins durch Kopplung einer Gly-Asp-Sequenz an das Endostatinmolekül konnte eine stärkere Bindung erzielt und dadurch die antiangiogene Wirkung des Endostatins erhöht werden (Yokoyama und Ramakrishnan 2004). Kürzlich konnte von der gleichen Arbeitsgruppe ebenfalls gezeigt werden, dass Endostatin über das  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin an Zellen eines Ovarialtumors bindet und somit die Vaskularisierung inhibiert (Yokoyama und Ramakrishnan 2007).

Endostatin wird während der Entwicklung der Blutgefäße in die Morphogenese der Blutgefäße einbezogen. In dieser Phase wird Endostatin in der Gefäßwand stark akkumuliert und nachgewiesen. Daher kann postuliert werden, dass es in der frühen Phase der Gefäßentwicklung besondere Bindungspartner für Endostatin in der Gefäßwand geben muss. Einige bisher identifizierte Bindungspartner von Endostatin sind unten aufgestellt:

- Heparin / „Heparan sulfate proteoglycans
- Zink
- VEGFR-2 (KDR/Flk-1)
- Glypikane
- Integrine
- Tropomyosin

Neben oben beschriebenen Faktoren, welche als Bindungspartner in Frage kommen, wurde kürzlich auch in einer Dissertationsschrift von Dr. Serap Yilmaz eine Bindungsinteraktion mit CEACAM1 nachgewiesen, das -wie Endostatin auch- in der frühen Phase der Gefäßentwicklung in der Wand neuer Blutgefäße zu



finden ist. So konnte an einer Untersuchung am Prostatakarzinomgewebe an den Tumorblutgefäßen eine Ko-Lokalisation beider Faktoren gezeigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Endostatin an CEACAM1 bindet. Da dies in einer frühen Phase der Gefäßentwicklung stattfindet, könnte diese Interaktion die Gefäßreifung beeinflussen. Ob und in welcher Form beide Faktoren miteinander interagieren und welche Bedeutung dem zugesprochen wird, gilt es zu überprüfen.

### **2.3. Arbeitshypothese und Zielsetzung**

Trotz der Identifizierung zahlreicher Faktoren, die offensichtlich mit Endostatin interagieren oder an die Endostatin bindet, ist es noch nicht gelungen einen Signalrezeptor für Endostatin zu identifizieren, wodurch die antiangiogenetischen Effekte von Endostatin erklärt/verstanden werden können.

Da Endostatin und CEACAM 1 in der frühen Phase der Gefäßneubildung im Rahmen der Tumervaskularisierung und auch der Wundheilung in den Wänden der neuen Gefäße zu finden sind, wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass die Interaktion beider Faktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation der Angiogenese spielen kann.

In einer Dissertationsarbeit von Frau Dr. Serap Yilmaz konnte kürzlich dokumentiert werden, dass Endostatin tatsächlich an CEACAM 1 bindet. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war also, experimentell zu überprüfen, inwieweit die Interaktion zwischen Endostatin und CEACAM 1 für die Regulation der Morphogenese von Kapillaren, für die Migration der Endothelzellen im Wound Assay und hinsichtlich der Expression potenter angiogenetischer Faktoren wie z.B. Faktoren der VEGF-Familie und Angiopoietine eine Rolle spielt.

Zu diesem Zweck wurden *in vitro* endotheliale Tube Assays und Wound Assays mit anschließender immunhistochemischer Färbung sowie quantitativer Real Time RT-PCR Analysen unter Verwendung von CEACAM1 überexprimierender versus CEACAM1 gesilenceter menschlicher mikrovaskulärer Endothelzellen durchgeführt.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Antikörper, Chemikalien und Substanzen**

##### Antikörper

- hES: Der polyklonale Antikörper (pAb hES) gegen humanes Endostatin wurde käuflich erworben von R&D Systems
- 4D1C2: Dieser monoklonale Antikörper gegen humanes CEACAM1 wurde von Prof. Dr. C. Wagener, Institut für Klinische Chemie, UKE, zur Verfügung gestellt.

##### Substanzen für die Immunhistochemie

- Normales Kaninchen Serum (2% NRS), Sigma
- Normales Schweineserum (2% NSS), DAKO
- Antikörper-Anti-Rabbit IgG Biotin gekoppelt, DAKO
- Antikörper-Anti-Mouse IgG Biotin gekoppelt, DAKO
- Mouse PAP (Peroxidase Anti Peroxidase), DAKO
- Rabbit PAP (Peroxidase Anti Peroxidase), DAKO
- Avidin-Biotin-Komplex Reagenz, Vectastain ABC-Kit PK-6100 Standard Elite, Linaris
- Entwicklungslösung für Peroxidase-Reaktion: 45ml Phosphatpuffer (PB), 1ml DAB (Diaminobenzidinhydrochlorid), 100µl Ammoniumchlorid, 900µl Nickelsulfat, 900µl Glucose 10%, 150µl Glucoseoxidase aus Ansatz: 1,2mg auf 1ml Aqua dest.

### **3.2. Zellkultur**

Für die Versuche wurden käuflich erworbene Endothelzellen (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells; HDMECs) von PromoCell, Heidelberg, Deutschland verwendet.

Diese wurden in gelatinbeschichteten Flaschen in „Endothelial Cell Growth“-Medium (PromoCell) mit 5% fetalem Kälberserum kultiviert.

Bei Konfluenz der Zellen wurden diese für den Tubeformierungsassay und den Wound- Assay benutzt.

Die Zellen wurden immer bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% Luftfeuchtigkeit kultiviert

### **3.3. Transfektion der Zellen**

Für die Überexpression von CEACAM1 in den genannten Zellen wurde das Plasmid pcDNA 3.1/ Hygro(-)plasmid (Clontech, CA, USA) verwendet, in das die CEACAM1-cDNA in voller Sequenzlänge ligiert wurde, dann als pcDNA 3.1/CEACAM 1 bezeichnet. Für CEACAM1 Silencing wurde die siRNA-Technik genutzt. Die Zielregionen für die si-RNA-Sequenzen wurden entsprechend der von Elbashir et al. publizierten Methoden aus der CEACAM1-cDNA ausgewählt (Elbashir et al., 2002): Zielsequenz (cDNA) TS 210: 5`AATGTTGCAGAGGGGAAGGAG und Zielsequenz (cDNA) TS 152: 5`AACCTTCTGGAACCCGCCAC. Als Kontrolle für CEACAM1-Silencing diente die Zielsequenz (cDNA) 5`AACGTACGCGGAATACTTCGA des Luciferase-Gens. Die Präparation des siRNA-Dupletts erfolgte mithilfe des „Silencer™ siRNA Construction Kit“ (Ambion, Inc., TX, USA).

HDMECs wurden in 6 und 48-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und anschließend mit 2µg des Plasmids pcDNA 3.1/Hygro(-), 2µg des Plasmidkonstruktes pcDNA 3.1/ CEACAM1, 2µg der CEACAM1 si-RNA(1µg TS

152 und 1µg TS 210) und 2µg der Luciferase si-RNA mithilfe des Opti-MEM I Reduced Serum Mediums und Lipofectamin PLUS Reagents (Invitrogen, CA, USA) entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers transfiziert. Sie wurden danach für den Tubeformierungsassay und den Wound-Assay benutzt. Eine weitere Methode der Transfektion wurde mithilfe des Amaxa-Nukleofektor-Kits (Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland) nach Gebrauchsanleitung durchgeführt.

### **3.4. Endotheliales Tubeformierungsassay**

Für diesen Versuch wurde ein dreidimensionales Typ-I Kollagengel (Vitrogen 100, Collagen Corp., CA, USA) verwendet, welches in 48-Well Kulturschalen (Costar, Cambridge, MA, USA) vorbereitet wurde. Dies wurde bereits schon beschrieben (Ergun et al., 1996). Nach der Polymerisation des Kollagengels im Inkubator bei 37°C wurden die transfizierten und Wildtyp-HDMECs in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$ /well in 300µl MV Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit 5% FCS auf die 48-Well Kulturschale verteilt. Das Medium wurde bei Konfluenz der Zellen durch Basalmedium mit 5% FCS ohne weitere Zusätze ersetzt. 24 Stunden später wurden die CEACAM1 überexprimierenden HDMECs und CEACAM1 gesilencierten sowie die mit leerem Vektor bzw. Luciferase-siRNA transfizierten HDMECs mit VEGF, Endostatin und Angiopoietin-1 einzeln bzw. in Kombination stimuliert.

Die Wells wurden nach 24 Stunden mit einem Zeiss Phasenkontrastmikroskop fotografiert (Zeiss, Jena, Deutschland).

### **3.5. Wound-Assay**

Für den Wound-Assay wurden CEACAM1 transfizierte und Wildtyp HDMECs in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$ /well in 300µl MV Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit 5% FCS in 48-Well Kulturschalen bei 37°C kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80% wurde mithilfe einer 100µl Eppendorf-Pipettenspitze eine senkrechte Wunde durch das Zentrum jedes Wells gezogen und das MV Medium durch Basalmedium mit 5% FCS ersetzt. Nach der Aufnahme dieser Wunden mit dem Zeiss Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) bei 20-facher Vergrößerung wurden die Wells einzeln oder in Kombination mit VEGF, Endostatin und Angiopoietin-1 stimuliert. Danach wurde der Verschluss des Wundareals nach 24 Stunden beobachtet und erneut fotografiert.

### **3.6. Immunhistochemische Analysen**

Für die immunhistochemischen Analysen dienten die durchgeführten Tubeformierungsassays. Die stimulierten Zellen wurden samt des Kollagengels in Bouin'scher Lösung fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Von diesen in Paraffin eingebetteten Blöcken wurden 5-7µm dicke Schnitte angefertigt und für immunhistochemische Analysen eingesetzt.

Für die Untersuchung wurden chromalaun-gelatine beschichtete Objektträger benutzt, auf die die Gewebeschnitte aufgezogen und über Nacht bei 37°C gelassen wurden. Dieser Schritt dient der besseren Haftung der Schnitte an dem Objektträger. Um die Gewebestruktur beurteilen zu können und die Bereiche mit den meisten Tubeformierungen identifizieren zu können, wurden von den Gewebeblöcken jeweils die ersten beiden Schnitte mit Hematoxylin/Eosin (HE) gefärbt.

Die hier eingesetzte Methode der Immunhistochemie ist von Kilic und Ergün (Kilic und Ergun, 2001) ausführlich beschrieben.

Zu Beginn der immunhistochemischen Untersuchung wurden alle Schnitte in absteigender Alkoholreihe deparaffiniert bzw. rehydriert. Bei Benutzung eines polyklonalen Antikörpers mussten die Schnitte noch mit Wasserstoffperoxid behandelt werden. Dieser Schritt dient der Unterdrückung einer unspezifischen Peroxidasefärbung. Nach der Waschung mit PBS wurden die Schnitte mit normalem Schweine- oder Kaninchenserum für 30 Minuten inkubiert, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu unterdrücken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den zu untersuchenden primären Antikörpern 4D1C2 und Endostatin über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erst 3x10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären biotin-gekoppelten Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung für 3x10 Minuten und anschließend die Inkubation mit dem PAP-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Waschung von 2x10 Minuten erfolgte die Behandlung mit dem ABC-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach abschließendem Waschen für 3 x 10 Minuten in PBS und 10 Minuten in PB 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 dann in

aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, mit DePeX (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt und mit einem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Leica, Deutschland) analysiert und fotografiert.

### **3.7. Quantitative real-time RT-PCR Analysen**

Aus den transfizierten und Wildtyp-HDMECs Zellen wurde zelluläre RNA mittels Trizol-Reagenz (Life Technologies) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Danach erfolgte die Transkription von 3 µg RNA in cDNA mit Hilfe des „You-Prime First-Strand“-cDNA Synthese Kits (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Die RT-PCR wurde mit dem „Light Cycler“ (Roche, Basel, Schweiz) unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers SYBR Green für die relative Quantifikation durchgeführt. Es wurden folgende Primärsequenzen eingesetzt:

GAPDH Primer: 5`-TGATGACATCAAGAAGGTGG-3`

GAPDH Gegenstrang Primer: 5`-TTTCTTACTCCTTGGAGGCC-3`

VEGF Strang Primer: 5`-CCTCCGAAACCATGAACTTT-3`

VEGF Gegenstrang Primer: 5`-TTCTTTGGTCTGCATTCACTT-3`

VEGF-D Strang Primer: 5`-ATGGACTCTCGCT-3`

VEGF-D Gegenstrang Primer: 5`-ATCGGAACACGTTACACAA-3`

Angiopoietin-1 Strang Primer: 5`-TTCCTTTCCTTTGCTTTCCTC-3`

Angiopoietin-1 Gegenstrang-Primer: 5`-CTGCAGAGCGTTTGTGTTGT-3`

Angiopoietin-2 Strang Primer: 5`-AACATCCCAGTCCACCTGAG-3`

Angiopoietin-2 Gegenstrang Primer: 5`-GGTCTTGCTTTGGTCCGTTA-3`

Mithilfe einer Standardkurve wurde die relative Menge der analysierten Gene in den Proben ermittelt. Es wurden dabei bekannte Konzentrationen eines das zu analysierende Gen enthaltenden Plasmids (logarithmische Verdünnung) gegen die PCR-Zykluszahl (Crossing Point) aufgetragen. Die Daten zweier unabhängiger



Analysen für das jeweilige Gen und die jeweilige Probe wurden gemittelt, und die kalkulierte Menge jedes Faktors wurde auf die Werte des „Housekeeping“- Gens GAPDH bezogen.

### **3.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse**

#### **3.8.1. Wound-Assay**

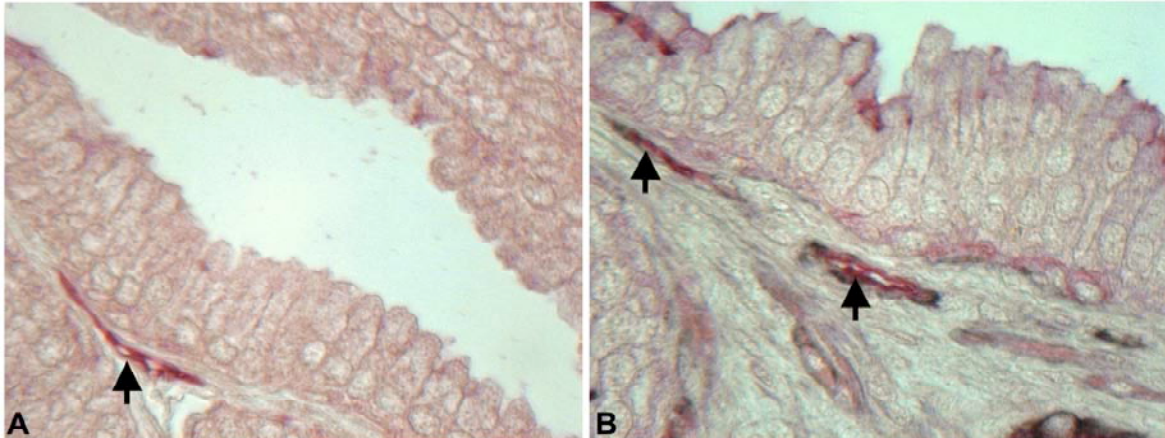
Für die Auswertung des Wound-Assays wurden die relativen Abstände der Wundränder der Einfachheit wegen am Computer in Zentimetern gemessen. Diese Abstände entsprechen einer ca. 200-fachen Vergrößerung. Die Wundabstände betragen nach Ziehen der Wunde alle  $8 \text{ cm} \pm 0,5 \text{ cm}$

#### **3.8.2. Tubeformierungsassay**

Beim endothelialen Tubeformierungsassay erfolgte eine semiquantitative Auswertung anhand der Messung der Tubelänge. Ein normales Vorhandensein von Tubes wurde mit einem + bewertet. Bei verstärkter Tubeformierung erfolgte die Auswertung mit ++. Bei übermäßigen Tubes wurde mit +++ bewertet.

## 4. Ergebnisse

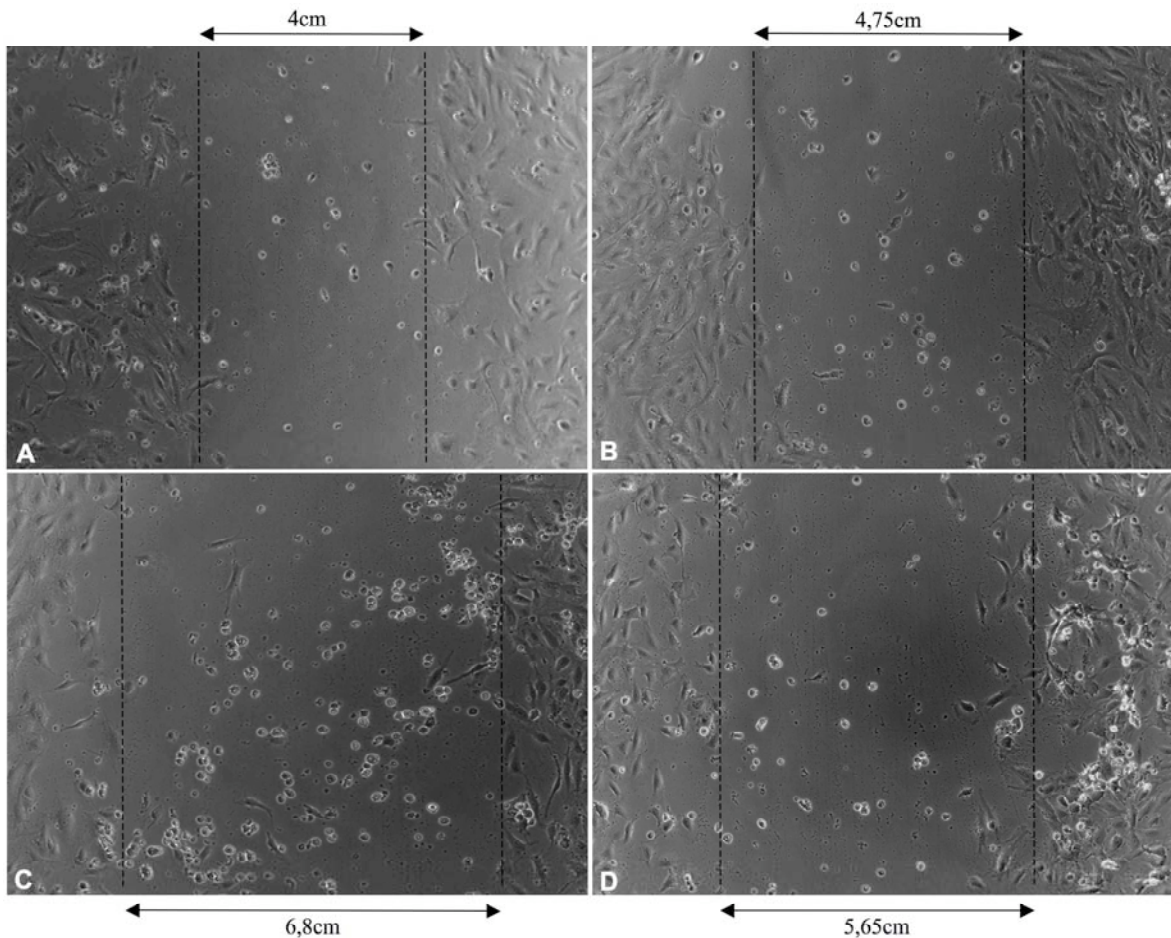
### 4.1. Immunfärbung Endostatin und CEACAM1 in frühen Tumorgefäßen



**Abb.3A-B: Doppelimmunfärbung für CEACAM1 (rot) und humanes Endostatin (dunkelbraun) an Paraffinschnitten des Prostatakarzinoms.** In frühen noch unreifen Blutgefäßen (Pfeil) des Prostata Tumors ist nur eine CEACAM1-Immunfärbung nachweisbar (A). Die normalerweise an der luminalen Oberfläche des Prostataepithels vorhandene CEACAM1-Immunfärbung ist im Tumorgewebe nicht mehr zu finden. In anderen teilweise stabilisierten Tumorgefäßen (Pfeile) ist jedoch eine Immunfärbung für beide Faktoren, nämlich CEACAM1 (rot) und Endostatin (dunkelbraun) ko-lokalisiert (B).

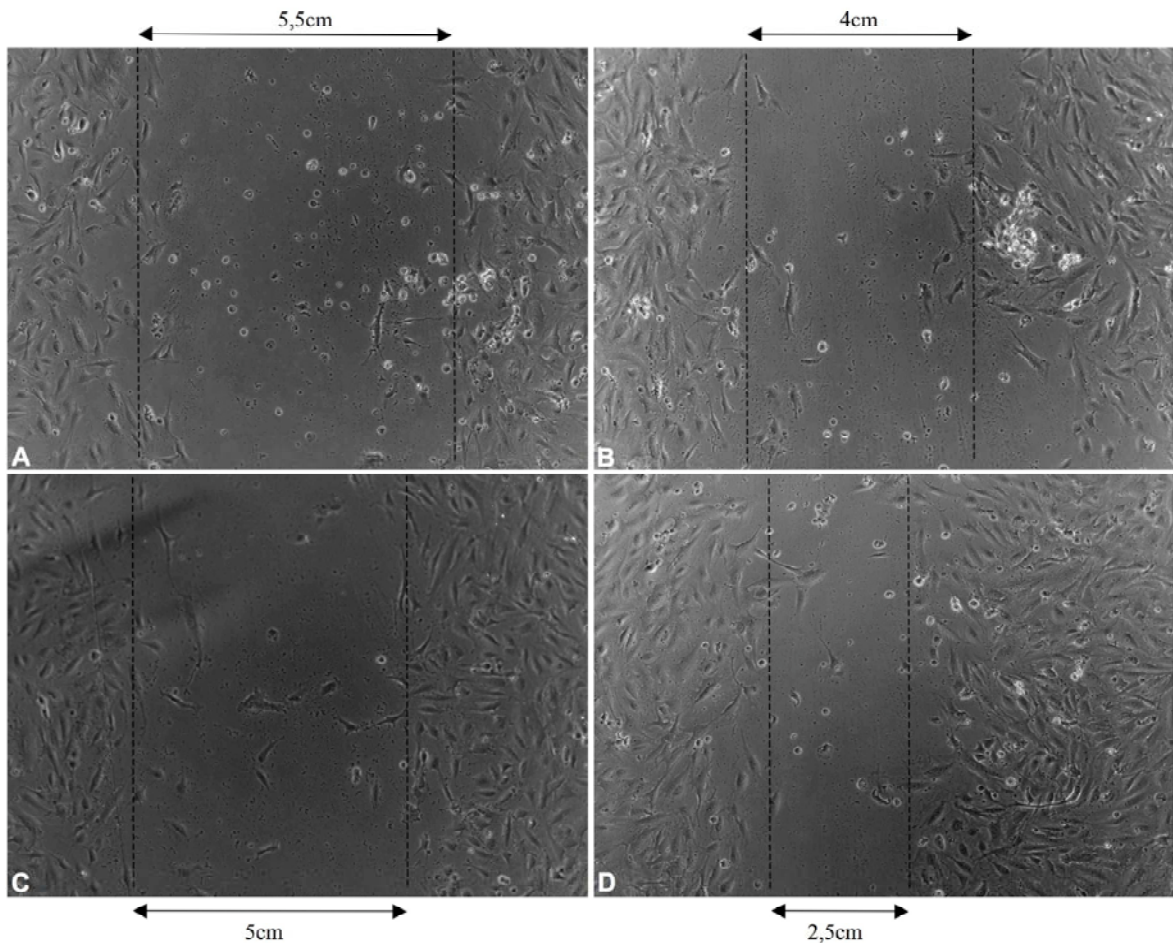
### 4.2. Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin bei endothelialer Migration

Um die Effekte von Endostatin und CEACAM1 auf die Morphogenese der Blutgefäße zu untersuchen, wurden *in vitro* Wound-Assays unter Verwendung von HDMECs durchgeführt. Die HDMECs wurden hierfür wie oben beschrieben mit CEACAM1 transfiziert, so dass CEACAM1 gesilencete (CC1sil) und CEACAM1 überexprimierende (CC1ex) Zellen verglichen werden konnten. Danach wurden die Zellen mit VEGF-A, Endostatin, Angiopoietin-1 einzeln oder in verschiedenen Kombinationen stimuliert und das Migrationsverhalten der Zellen nach 24 Stunden beobachtet und fotografiert.



**Abb. 4A-D: Effekte von Endostatin bei CEACAM1-Überexpression versus CEACAM1-Silencing in HDMECs bei der endothelialen Migration.** A=CC1ex-VEGF; B=CC1sil-VEGF; C=CC1ex-ES; D=CC1sil-ES. Der Wound-Assay zeigt, dass bei VEGF-A stimulierten CC1ex HDMECs der Wundabstand kleiner (A) ist als bei CC1sil HDMECs, die mit VEGF-A stimuliert wurden (B). Bei CC1ex HDMECs, die mit Endostatin stimuliert wurden (C) ist der Wundabstand nach 24 Stunden größer als bei CC1sil HDMECs (D).

Der Einsatz von VEGF-A dient als positive Kontrolle, welches die endotheliale Migration induziert. Der mittlere relative Abstand der Wundränder war bei Applikation von VEGF an CC1ex HDMECs bei 200-facher mikroskopischer Vergrößerung nach 24 Stunden verringert von 8cm auf 4cm (Abb.4A). Im Vergleich dazu war der Abstand bei CC1sil HDMECs unter VEGF-Stimulation von 8cm auf 4,75cm reduziert (Abb.4B). Bei Zugabe von Endostatin alleine hat sich der Wundabstand bei CC1 HDMECs von 8cm auf 6,8cm verkleinert (Abb.4C), wohingegen er bei CC1sil HDMECs von 8cm auf 5,65cm zurückgegangen ist (Abb.4D).



**Abb. 5A-D: Wound-Assay an CEACAM1-überexprimierenden versus gesilenceten HDMECs und die Bedeutung von Endostatin:** A=CC1ex-ES+VEGF; B=CC1sil-ES+VEGF; C=CC1ex-ES+VEGF+Ang-1; D=CC1sil-ES+VEGF+Ang-1. Der inhibitorische Effekt von Endostatin wird hier bei CC1sil HDMECs, die mit Endostatin und VEGF-A stimuliert wurden, beinahe aufgehoben und der Wundabstand verringert sich auf 4cm (B), im Gegensatz zu CC1ex HDMECs, die die gleiche Stimulation erhalten haben (A). Auch bei der Kombination von VEGF-A, Endostatin und Ang-1 gibt es bei CC1sil HDMECs einen deutlicheren Wundverschluß (D) als bei CC1ex HDMECs, die mit dieser Dreierkombination stimuliert wurden (C).

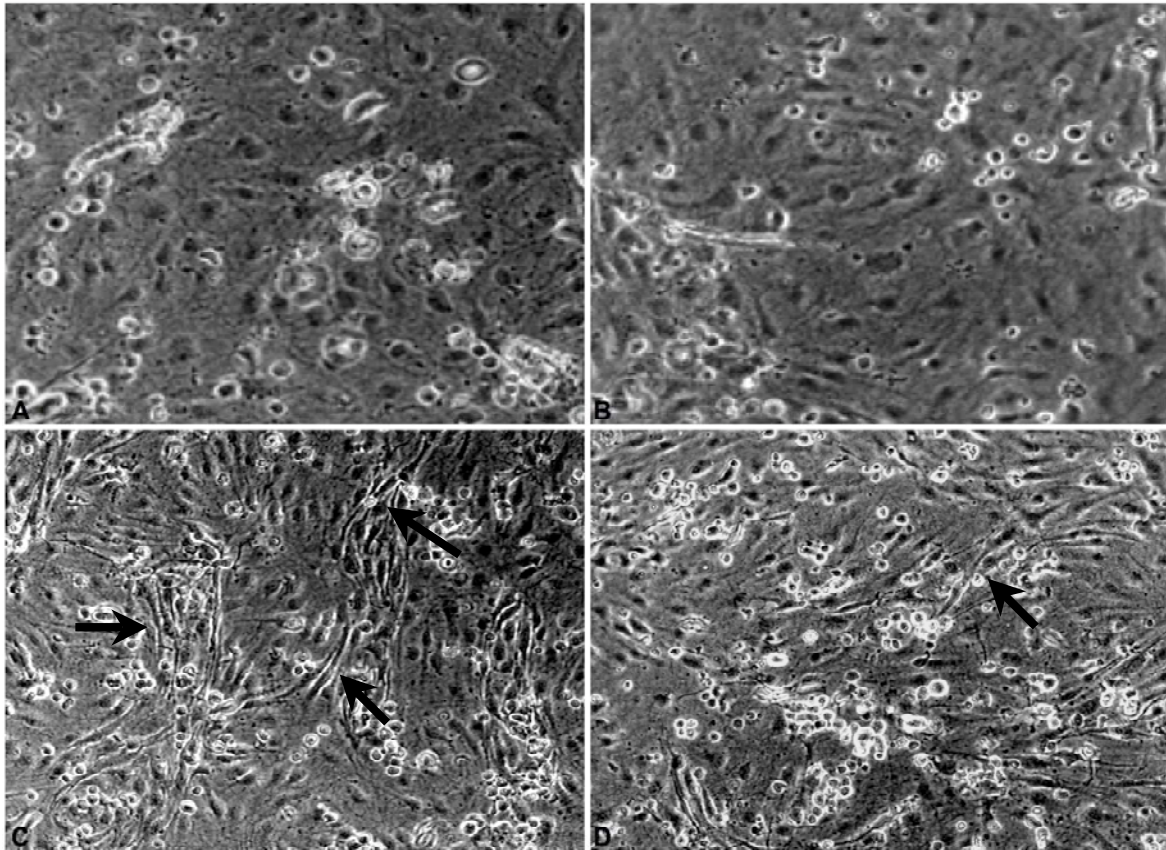
Der Wundabstand betrug 24 Stunden nach der kombinierten Zugabe von Endostatin und VEGF-A zu CC1ex HDMECs nach ursprünglichen 8cm nur noch 5,5cm (Abb.5A), wohingegen er sich bei der Stimulation von CC1sil HDMECs mit der gleichen Kombination von Endostatin und VEGF-A von 8cm auf 4cm verkleinerte (Abb.5B).

Im nächsten Schritt wurde eine dreier Kombination aus VEGF-A, Endostatin und Angiopietin-1 (Ang-1) eingesetzt. Während der Wundabstand sich 24 Stunden

nach der Stimulation der CC1ex HDMECs mit VEGF-A plus Endostatin und Ang-1 von 8cm auf 5cm reduzierte (Abb.5C), betrug er nach der Stimulation von CC1sil HDMECs mit gleicher Kombination von Faktoren für 24 Stunden nur noch 2,5cm (Abb.5D).

### **4.3. CEACAM1 Überexpression und CEACAM1 Silencing in HDMECs unter Verwendung von Endostatin bei der endothelialen Tubebildung**

Um die Bedeutung der Interaktion von Endostatin mit CEACAM1 bei den durch Endostatin hervorgerufenen Effekten zu untersuchen, wurde neben dem Wound-Assay auch das endotheliale Tubebildungsassay durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls transfizierte HDMECs verwendet. CEACAM1 überexprimierende (CC1ex) und CEACAM1 gesilencete (CC1sil) HDMECs wurden auf das bereits polymerisierten Kollagengel gebracht und bis zu einem subkonfluenten Zustand kultiviert. Anschließend wurden CC1sil HDMECs und CC1ex HDMECs mit VEGF-A, Endostatin, Angiopoietin-1 einzeln oder in unterschiedlicher Kombination stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die endothelialen Tubes fotografiert und die Länge der Tubes semiquantitativ evaluiert und miteinander verglichen.

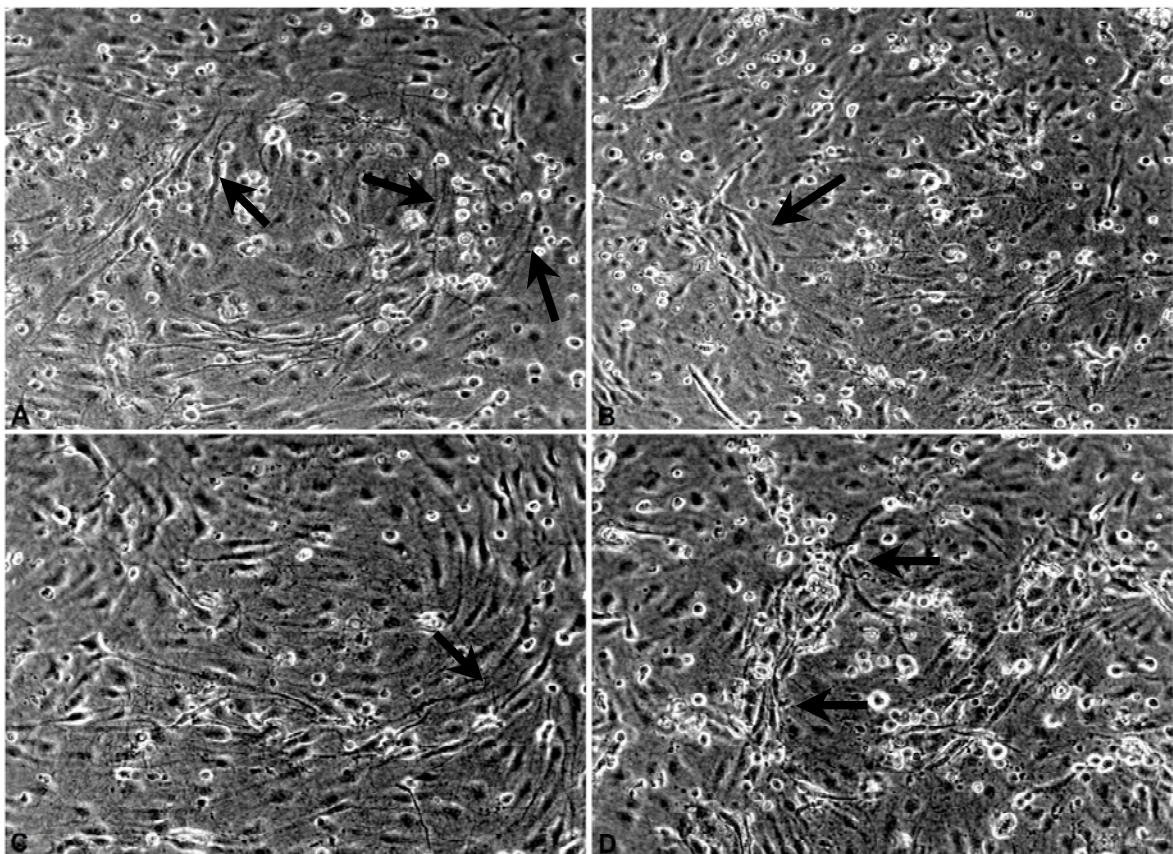


**Abb.6A-D: Endotheliales Tubebildungsassay: Effekte von CEACAM1-Überexpression versus CEACAM1-Silencing in HDMECs auf die Morphogenese der Blutgefäße.** A=CC1ex-Kontrolle; B=CC1sil-Kontrolle; C=CC1ex-VEGF; D=CC1sil-VEGF. Die VEGF induzierten Tubes bei CC1ex HDMECs (Pfeile, C) werden reduziert bei CC1sil HDMECs, die mit VEGF stimuliert sind (Pfeil, D). Als Kontrolle wurden unbehandelte HDMECs eingesetzt (A und B), die keine Tubebildung zeigen.

Nach der Stimulation mit VEGF-A für 24 Stunden wurde bei CC1ex HDMECs eine signifikant stärkere Tubebildung (+++) (Abb.6C) im Vergleich zu unbehandelten CC1ex HDMECs, die als Kontrolle verwendet wurden beobachtet (Abb.6A). Nach der Stimulation von CC1sil mit VEGF-A hingegen konnte eine signifikant schwächere Tubebildung (+) gefunden werden (Abb.6D). Die unbehandelten CC1sil HDMECs wurden als Kontrolle verwendet und zeigten erwartungsgemäß keine Tubebildung (Abb.6B).

Appliziert man jedoch die beiden Faktoren -VEGF-A und Endostatin- zusammen zu CC1sil HDMECs, so kam es zu einer deutlichen Formierung von endothelialen

Kapillaren *in vitro*. Beim Vergleich von CC1ex HDMECs und CC1sil HDMECs nach der Stimulation mit der Kombination der beiden Faktoren konnte festgestellt werden, dass auch hierbei die endotheliale Ausschaltung von CEACAM1 in einer fast kompletten Aufhebung der inhibitorischen Wirkung von Endostatin resultierte. Ein semiquantitativer Vergleich zeigte, dass bei der Stimulation von CC1ex HDMECs mit VEGF-A plus Endostatin eine mit einem einfachen (+) (Abb.7A) gewertete Tubebildung zu sehen war, während die Tubebildung bei der Stimulation von CC1sil HDMECs mit der gleichen Kombination mit einem zweifachen (++) gewertet wurde (Abb.7B).



**Abb.7A-D: CEACAM1-Überexpression versus CEACAM1-Silencing in HDMECs und endotheliale Tubebildung *in vitro*:** A=CC1ex-VEGF-A+ES; B=CC1sil-VEGF-A+ES; C=CC1ex-VEGF-A+Ang-1+ES; D=CC1sil-VEGF-A+Ang-1+ES. Der inhibitorische Effekt von Endostatin wird bei der Stimulation von VEGF-A plus Endostatin bei CC1sil HDMECs nahezu aufgehoben (B, Pfeil) im Gegensatz zu CC1ex HDMECs (A, Pfeile). Bei Kombination von VEGF-A, Ang-1 und Endostatin ist bei CC1ex HDMECs (C, Pfeil) eine geringere Tubebildung zu sehen als bei CC1sil HDMECs (D, Pfeile).

Im nächsten Schritt wurde auch die Wirkung der Kombination aus VEGF-A, Endostatin und Ang-1 in Zusammenhang mit endothelialer Präsenz versus Abwesenheit studiert. Die Kombination von VEGF-A, Ang-1 und Endostatin führt bei CC1ex HDMECs zu einer mit einem einfachen (+) zu wertenden Tubebildung (Abb.7C), während bei den CC1sil HDMECs dieser Effekt mit (+++) zu bewerten war (Abb.7D).

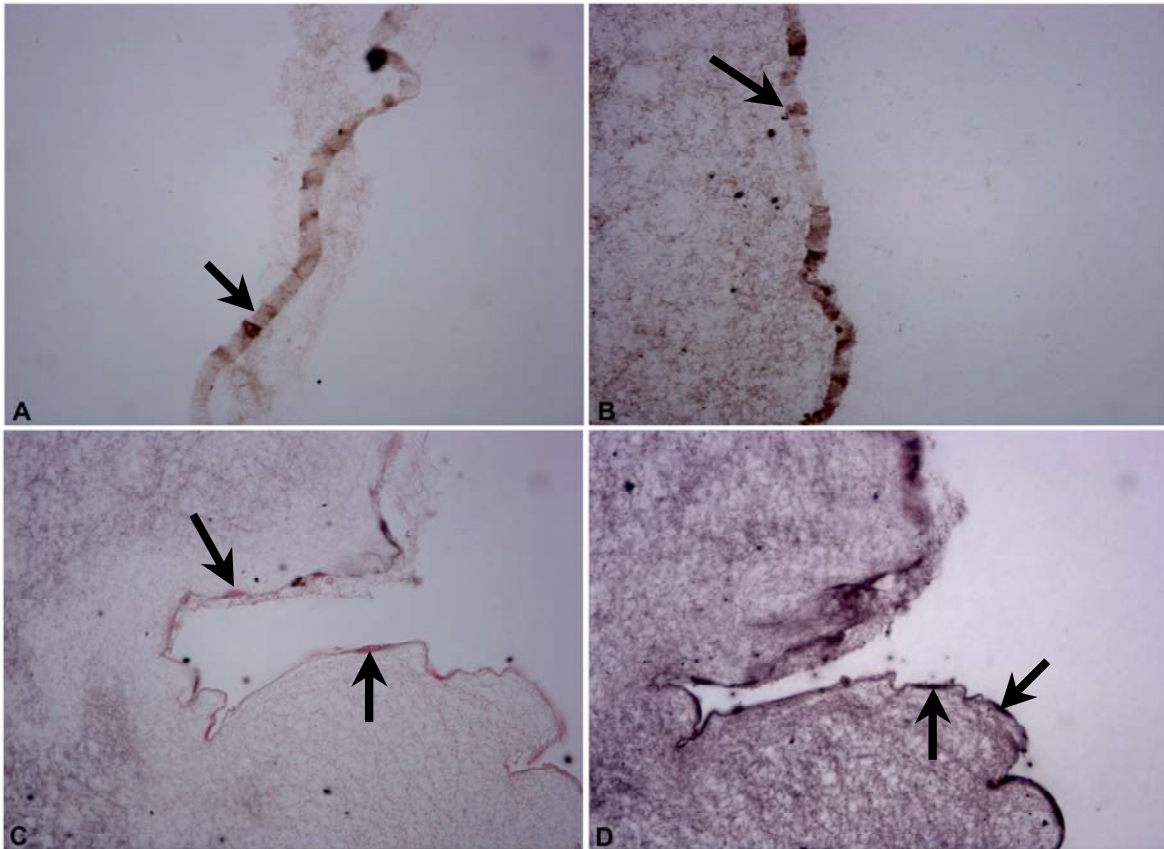
Die folgende Tabelle (Tabelle 1) gibt übersichtlich die Ergebnisse dieser semiquantitativen Auswertung wieder.

<b>Tabelle 1:</b>	<b>CC1ex</b>	<b>CC1sil</b>
VEGF-A	+++	+
Endostatin	0	0
Endostatin+VEGF-A	+	++
Endostatin+Ang-1	0	0
Endostatin+Ang-1+VEGF	+	+++



#### **4.4.Immunlokalisation von CEACAM1 und Endostatin in in vitro induzierten endothelialen Tubes**

Um die Lokalisation von CEACAM1 und Endostatin in Endothelzellen, die im Rahmen der oben beschriebenen Tubeassayanalysen in die Formierung endothelialer Tubes involviert waren, zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen an Schnitten von den in Paraffin eingebetteten Kollagengelen mit Tubes durchgeführt. Die immunhistochemischen Analysen für CEACAM1 wurden mit dem monoklonalen Antikörper 4D1C2 und die für Endostatin mit dem polyklonalen Antikörper gegen Endostatin (hES) durchgeführt. Wie unten exemplarisch an den mit VEGF plus Endostatin stimulierten Tubes dargestellt, zeigten diese Analysen, dass in CC1ex HDMECs das Muster der Immunfärbung für CEACAM1 (Abb.8A) und für Endostatin (Abb.8B) sich sehr ähneln und beide vor allem in der interendothelialen Kontaktzone, also zwischen den benachbarten Endothelzellen, an der Geloberfläche zu finden sind. In CC1sil HDMECs war die Immunfärbung für CEACAM1 erwartungsgemäß nur in wenigen Zellen zu finden (Abb.8C) und das in Abb.8A vorgefundene Muster war nicht mehr nachweisbar. Dagegen war die Färbung für Endostatin an CC1sil-HDMECs erstens starker in der Intensität als in CC1ex HDMECs und zweitens hauptsächlich an der basalen Seite des Endothelzellverbandes, also zwischen den Endothelzellen und dem darunter liegenden Kollagengel, zu finden (Abb.8D).



**Abb. 8A-D: Immunhistochemische Färbung des Tubelformierungsassays mit hES und 4D1C2:** A=CC1ex-VEGF+ES, gefärbt mit dem Antikörper: 4D1C2; B=CC1ex-VEGF+ES, gefärbt mit dem Antikörper: hES; C=CC1sil-VEGF+ES, gefärbt mit dem Antikörper: 4D1C2; D=CC1sil-VEGF+ES, gefärbt mit dem Antikörper: hES. In CC1ex HDMECs zeigt sich sowohl für CEACAM1(Abb.8A, Pfeil) und für Endostatin (Abb.8B, Pfeil) die Immunfärbung in der interendothelialen Kontaktzone. Bei CC1sil HDMECs ist nur eine geringe Anzahl der Zellen für die Immunfärbung für CEACAM1 positiv (Abb.8C, Pfeile), bei der Immunfärbung für Endostatin jedoch zeigt sich eine stärkere Intensität und die Färbung ist vor allem an der basalen Seite des Endothelzellverbandes zu finden (Abb.8D, Pfeile)

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit belegt erstmalig, dass die Interaktion zwischen dem Angiogeneseinhibitor Endostatin und dem proangiogenetischen Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 endotheliale Funktionen wie Migration und Tubebildung beeinflusst. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass a) CEACAM1-Silencing (CC1sil) in primären menschlichen Endothelzellen (HDMECs) die antimigratorischen Effekte von Endostatin im Wound-Assay abschwächt und der Wundverschluss durch VEGF schneller erfolgt, als bei Wildtyp oder CEACAM1-überexprimierenden (CC1ex) HDMECs, b) bei CC1ex HDMECs die antimigratorische Wirkung von Endostatin stärker als bei Wildtyp HDMECs ist, c) auch bei *in vitro* endothelialen Tube-Assay die Zahl, die Länge und das Netzwerk von Tubes unter Applikation von VEGF+ Endostatin oder VEGF+ Endostatin+ Angiopoietin-1 gesteigert war, wenn HDMECs mit CC1sil verwendet wurden, und d) in anschließenden Immunfärbungen an solchen Tubes eine Veränderung am Lokalisationsmuster von Endostatin in Abhängigkeit von CEACAM1 Präsenz versus Abwesenheit nachgewiesen werden konnte.

### 5.1. CEACAM1 und Endostatin sind in die frühe Morphogenese der Blutgefäße involviert

Bei der Neubildung von Blutgefäßen spielen die morphogenetischen Prozesse der Gefäßwand eine entscheidende Rolle für deren Überleben und Funktion. Die Morphogenese der Gefäßwand ist charakterisiert durch die Bildung regulärer Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen, die Integration der peri-endothelialen Zellen in die Gefäßwand und einer regulär strukturierten Basalmembran (Dejana 2004). Endostatin beeinflusst die morphogenetischen Prozesse der neuen

Blutgefäße und stabilisiert dadurch die endothelialen Tubes (Ergun et al., 2001). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass Endostatin die angiogenetische Potenz der neuen Blutgefäße reduzieren und auch ihre Durchlässigkeit herabsetzen könnte. Tatsächlich konnten spätere Publikationen belegen, dass das Vorhandensein von Kollagen 18/Endostatin für die Aufrechterhaltung einer normalen Durchlässigkeit der Retinagefäße von entscheidender Bedeutung ist (Takahashi et al., 2003). Während das Fehlen von Kollagen 18/Endostatin zu einer Ablösung der Retina führte wie bei der diabetischen Retinopathie, konnte durch Überexpression von Kollagen 18 sowohl die Retinaablösung als auch die abnormal hohe Gefäßdurchlässigkeit blockiert werden. Diese Ergebnisse zusammen mit den von Ergün et al. (Ergun et al., 2001) zuvor publizierten Befunden, die Endostatin in der Basalmembran und in den interendothelialen Kontaktzonen der neuen Gefäße lokalisieren, belegen, dass Endostatin in die morphogenetischen Prozesse der neuen Gefäße involviert ist. Da auch im Rahmen eines experimentellen Tumors therapeutisch appliziertes Endostatin hauptsächlich in der Wand neuer Tumorgefäße akkumuliert war, jedoch nicht in der Wand reifer normaler Blutgefäße (Ergun et al., 2001; Schuch et al., 2005), ist anzunehmen, dass diese morphogenetische Rolle von Endostatin für die antiangiogenetische Tumorthherapie von Bedeutung sein kann.

Auch CEACAM1 ist in angiogenetisch aktivierten vaskulären Endothelzellen hochreguliert und ist ultrastrukturell sowohl an der luminalen als auch an der basolateralen Seite der neuformierten endothelialen Gefäßrohre zu finden (Ergun et al., 2000). Nicht nur die Überexpression des membran-gebundenen CEACAM1, sondern auch die Zugabe von löslichem CEACAM1 zu menschlichen Endothelzellen induzieren Kapillarbildung und verstärken die VEGF-induzierte

Neubildung von Blutgefäßen. So führte das zelluläre Ausschalten von CEACAM1 in primären menschlichen Endothelzellen via siRNA oder durch Applikation des CEACAM1-spezifischen Antikörpers zu einer völligen Blockade der VEGF-induzierten endothelialen Tubes *in vitro* (Ergun et al., 2000; Kilic et al., 2005). Dagegen zeigen sowohl die hier vorgelegten Ergebnisse als auch die bisher publizierten Befunde, dass die CEACAM1-Überexpression in vaskulären Endothelzellen angiogenetische Effekte in Gang setzt und die durch VEGF-induzierte *in vitro* Kapillarbildung unterstützt. Als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül kann CEACAM1 Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen vermitteln und somit zur Formierung endothelialer Lumenbildung beitragen.

Weiterhin ist beschrieben, dass CEACAM1 mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  interagiert (Ebrahimnejad et al., 2004). Interessanterweise konnte in Versuchen gezeigt werden, dass auch Endostatin durch Bindung an  $\alpha_v$ -Integrin eine tumorsuppressive Wirkung in Bronchialkarzinomen entfaltet (Cui et al., 2007). Durch solche Interaktionen könnten CEACAM1 und Endostatin auch die Interaktion zwischen den Endothelzellen und der Extrazellulärmatrix modulieren und somit die Morphogenese der neuen Gefäße funktionell beeinflussen. Die bereits gezeigte Lokalisation von CEACAM1 und Endostatin an der basolateralen Seite des neuformierten endothelialen Gefäßrohres unterstützt ebenfalls diese Interpretation. Da beide, nämlich CEACAM1 und Endostatin, in der Wand neuformierter kleiner Blutgefäße in besonders hohen Mengen nachzuweisen sind, liegt die Vermutung nahe, dass beide Moleküle auch direkt miteinander interagieren könnten. Tatsächlich konnte in einer kürzlich vorgelegten Dissertationsarbeit nachgewiesen werden, dass Endostatin an CEACAM1 bindet (Yilmaz, Serap; 2006, Universität Hamburg).

## **5.2. CEACAM1 silencing schwächt die anti-angiogenetische Wirkung von Endostatin bei der endothelialen Migration**

Die hier vorgelegten Ergebnisse aus dem endothelialen Wound-Assay belegen überraschenderweise, dass das zelluläre Ausschalten von CEACAM1 in primären menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) den inhibitorischen Effekt von Endostatin an der Migration von Endothelzellen *in vitro* schwächt. Überraschend deswegen, weil die endotheliale Präsenz von CEACAM1 per se proangiogenetisch wirkt (Kilic et al., 2005), und somit es zunächst paradox erscheint, dass der Angiogenesehemmer Endostatin auf die Interaktion mit dem proangiogenetischen Molekül CEACAM1 angewiesen ist. Im Vergleich zu der Applikation von Endostatin zu Wildtyp HDMECs oder zu CC1ex-HDMECs allein oder in Kombination mit VEGF und/oder Ang-1 war bei der Behandlung der CC1sil-HDMECs mit Endostatin oder Endostatin+VEGF oder Endostatin+VEGF+Ang-1 der inhibitorische Effekt von Endostatin signifikant reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin vermutlich die für endotheliale Migration wichtigen intrazellulären Signalwege, das Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen oder Endothelzell-Matrix-Kontakte moduliert. Ein möglicher Weg hierzu wäre eine Änderung am Expressionsmuster angiogeneserelevanter Faktoren, die indirekt die genannten endothelialen Eigenschaften beeinflussen könnten. Trotz großer Anstrengungen anhand quantitativer RT-PCR-Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht schlüssig nachgewiesen werden, ob und inwieweit die Zugabe von Endostatin in Abhängigkeit von CEACAM1-Präsenz versus CEACAM1-Abwesenheit in HDMECs die Expression solcher Faktoren wie VEGF-A, -C, -D und deren Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3, Ang-1 und Ang-2 beeinflusst. Weitere Analysen hierzu sind notwendig, um diesen Weg besser überprüfen zu können.

Hinweise auf einen potentiellen Einfluss von Endostatin auf die Aktivität von Faktoren, die die Zell-Zell-Kontakte regulieren, sind bereits in der Literatur zu finden. Eine der in diesem Zusammenhang für die antiangiogenetische Wirkung von Endostatin verantwortlich gemachten Mechanismen ist die Interaktion des Endostatins mit dem  $\beta$ -Catenin (Dixelius et al., 2002; Dixelius et al., 2003), das bei der Herstellung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Interaktionen eine wichtige Rolle spielt. Denn die Migration von Endothelzellen, welche für den Ablauf der Angiogenese notwendig ist, erfordert einen kontinuierlichen Auf- und Abbau von Zell-Zell-Interaktionen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Endostatin eine Tyrosinphosphorylierung des  $\beta$ -Catenins bewirkt, welches zur Lockerung bzw. Loslösung der Zell-Zell-Kontakte führte (Dixelius et al., 2003). Auf der anderen Seite konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 direkt mit  $\beta$ -Catenin interagiert (Jin et al., 2008). Eine weitere Erklärung für den Einfluss der Interaktion zwischen CEACAM1 und Endostatin auf die endotheliale Migration könnte die bereits publizierte Interaktion von Endostatin mit dem VEGFR-2 bieten (Young-Min et al., 2002). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Endostatin direkt an KDR/Flk-1 bindet und damit die VEGF-induzierte Phosphorylierung von KDR/Flk-1 in Endothelzellen unterdrückt, die Bindung von VEGF an Endothelzellen und an seinem Oberflächenrezeptor KDR/Flk-1 inhibiert. Ebenfalls bereits publizierte Ergebnisse belegen, dass die Überexpression von CEACAM1 in HDMECs zu einer signifikanten Hochregulierung von VEGFR-2 führt (Kilic et al., 2005). Umgekehrt könnte das hier durchgeführte CC1sil in HDMECs die Expression von VEGFR-2 reduzieren und somit die Interaktion von Endostatin mit diesem in der Angiogenese essentiellen Signalweg unterbinden. Die genauen mechanistischen Prozesse, die

in Abhängigkeit von CEACAM1 die antimigratorische Wirkung von Endostatin beeinflussen, sind noch nicht genau geklärt und bedürfen weiterer Analysen.

### **5.3. CEACAM1 silencing schwächt die inhibitorische Wirkung von Endostatin bei der endothelialen Tubebildung**

Wie bei der endothelialen Migration belegen die hier vorgelegten Befunde anhand des *in vitro* endothelialen Tubebildungsassays, dass auch bei dieser Untersuchung das zelluläre Ausschalten von CEACAM1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch siRNA die Wirkung von Endostatin schwächt. Vor allem die Bildung der endothelialen Tubes ist ein Prozess, der stark von der Interaktion zwischen Endothelzellen und Extrazellulärmatrix abhängig ist und mit einer Polarisierung der Endothelzellen in basale und apikale Abschnitte einhergeht. Auch bei diesen morphogenetischen Prozessen scheint die Endostatinwirkung von der Präsenz von CEACAM1 abhängig zu sein. Denn bei der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten kombinierten Anwendung von VEGF-A und Endostatin wurde eine Hemmung der *in vitro*-Kapillarbildung durch Endostatin nur bei den Wildtyp- und CC1ex HDMECs beobachtet, während bei den für CC1sil HDMECs entweder keine Änderung zu sehen war oder sogar manchmal tendenziell mehr Tubes zu sehen waren. Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang war, dass die alleinige Gabe von VEGF für CC1sil HDMECs keine nennenswerte Tubebildung induzierte, wie auch in früheren Publikationen gezeigt war (Kilic et al., 2005; Oliveira-Ferrer et al., 2004), während die kombinierte Gabe von VEGF und Endostatin zur deutlichen Tubebildung führte. Diese Befunde lassen vermuten, dass Endostatin in Abhängigkeit seiner Interaktionspartner offensichtlich unterschiedliche und sogar gegensätzliche Effekte bei der Neubildung von Gefäßen herbeiführen kann. Diese Daten stimmen



mit den von Rehn et al publizierten Ergebnissen überein, die zeigen konnten, dass in Abhängigkeit davon, ob Endostatin immobilisiert war oder löslich appliziert wurde, gegensätzliche Effekte an der endothelialen Migration und Proliferation zu beobachten waren (Rehn et al., 2001).

Ein weiterer in diesem Zusammenhang zu diskutierender Aspekt ist, dass Endostatin in murinen Tumormodellen wirksam die Tumolvaskularisierung blockiert und zu einem signifikanten Rückgang der Tumorgröße sowie zu einer Unterdrückung der Metastasierung führt, während in klinischen Studien bisher keine nennenswerten Erfolge erzielt werden konnten. Vergleicht man die endotheliale Expression von CEACAM1 bei der Maus und beim Menschen, so stellt man fest, dass bei der Maus CEACAM1 nicht nur in Endothelzellen der Tumorgefäße, sondern auch in Endothelzellen der ruhenden Blutgefäße exprimiert ist, während es bei beim Menschen fast nur in angiogenetisch aktivierten Endothelzellen im Rahmen der Tumorerkrankung oder Entzündung nachzuweisen ist. Dies könnte erklären, warum Endostatin offensichtlich bei der Maus, nicht jedoch beim Menschen antiangiogenetisch wirksam wird, da beim Menschen CEACAM1 als Interaktionspartner nicht von Beginn an in Endothelzellen vorhanden ist und zudem vermutlich nur in einem Teil der Tumorgefäße in ausreichender Menge exprimiert wird.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse erstmalig, dass die angiogenesehemmenden Effekte von Endostatin von der endothelialen Präsenz des CEACAM1 abhängig sind. In zwei für die Angiogenese entscheidenden endothelialen Funktionen wie die Migration und Tubelformierung, zeigt Endostatin *in vitro* kaum eine hemmende Wirkung, wenn zuvor CEACAM1 in HDMECs durch

siRNA ausgeschaltet wurde. Weitere *in vivo* Analysen sind notwendig, um die klinisch-funktionelle Interaktion zwischen Endostatin und CEACAM1 bei der Neubildung von Blutgefäßen und bei der antiangiogenetischen Tumorthherapie evaluieren zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K. und Stacker, S. A. (1998). "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 548-53.

Achen, M. G., Williams, R. A., Minekus, M. P., Thornton, G. E., Stenvers, K., Rogers, P. A., Lederman, F., Roufail, S. und Stacker, S. A. (2001). "Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis." *J Pathol* 193: 147-54.

Asahara, T. und Kawamoto, A. (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C572-9.

Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. und Alitalo, K. (2009). "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 165-77.

Bamberger, A. M., Riethdorf, L., Nollau, P., Naumann, M., Erdmann, I., Gotze, J., Brummer, J., Schulte, H. M., Wagener, C. und Loning, T. (1998). "Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer." *Am J Pathol* 152: 1401-6.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A. und Marme, D. (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." *Blood* 87: 3336-43.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarstrom, S., Holmes, K. V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S. H., Lucka, L., Najjar, S. M., Neumaier, M., Obrink, B., Shively, J. E., Skubitz, K. M., Stanners, C. P., Thomas, P., Thompson, J. A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S. und Zimmermann, W. (1999). "Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family." *Exp Cell Res* 252: 243-9.

Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M. M., Tonks, I. D., Grimmond, S. M., Townson, S., Wells, C., Little, M., Cummings, M. C., Hayward, N. K. und Kay, G. F. (2000). "Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia." *Circ Res* 86: E29-35.

Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G. und Cheresch, D. A. (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* 79: 1157-64.

Busch, C., Hanssen, T. A., Wagener, C. und B, O. 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." *Hum Pathol* 33: 290-8.

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* 6: 389-95.

Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D. und Dejana, E. (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* 98: 147-57.

Cui, R., Ohashi, R., Takahashi, F., Yoshioka, M., Tominaga, S., Sasaki, S., Gu, T., Takagi, Y. und Takahashi, K. (2007). "Signal transduction mediated by endostatin directly modulates cellular function of lung cancer cells in vitro." *Cancer Sci* 98: 830-7.

Davidoff, M. und Schulze, W. (1990). "Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining." *Histochemistry* 93: 531-6.

Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 261-70.

DiSalvo, J., Bayne, M. L., Conn, G., Kwok, P. W., Trivedi, P. G., Soderman, D. D., Palisi, T. M., Sullivan, K. A. und Thomas, K. A. (1995). "Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer." *J Biol Chem* 270: 7717-23.

Dixelius, J., Cross, M., Matsumoto, T., Sasaki, T., Timpl, R. und Claesson-Welsh, L. (2002). "Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization." *Cancer Res* 62: 1944-7.

Dixelius, J., Cross, M. J., Matsumoto, T. und Claesson-Welsh, L. (2003). "Endostatin action and intracellular signaling: beta-catenin as a potential target?" *Cancer Lett* 196: 1-12.

Dvorak, H. F. (2002). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy." *J Clin Oncol* 20: 4368-80.

Ebrahimnejad, A., Streichert, T., Nollau, P., Horst, A. K., Wagener, C., Bamberger, A. M. und Brummer, J. (2004). "CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells." *Am J Pathol* 165: 1781-7.

Ergun, S., Davidoff, M. und Holstein, A. F. (1996). "Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated." *Cell Tissue Res* 286: 93-102.

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

Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurmbach, J. H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M. und Wagener, C. (2000). "CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor." *Mol Cell* 5: 311-20.

Ergun, S., Tilki, D., Oliveira-Ferrer, L., Schuch, G. und Kilic, N. (2006). "Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis." *Cancer Lett* 238: 180-7.

Farnebo, F., Piehl, F. und Lagercrantz, J. (1999). "Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung." *Biochem Biophys Res Commun* 257: 891-4.

Fava, R. A., Olsen, N. J., Spencer-Green, G., Yeo, K. T., Yeo, T. K., Berse, B., Jackman, R. W., Senger, D. R., Dvorak, H. F. und Brown, L. F. (1994). "Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue." *J Exp Med* 180: 341-6.

Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R. A., Ploegh, H. L., Olsen, B. R. und Mothes, W. (2000). "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII." *EMBO J* 19: 1187-94.

Fernandez, A., Udagawa, T., Schwesinger, C., Beecken, W., Achilles-Gerte, E., McDonnell, T. und D'Amato, R. (2001). "Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2." *J Natl Cancer Inst* 93: 208-13.

Ferrara, N., Gerber, H. P. und LeCouter, J. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* 9: 669-76.

Ferrara, N. und Henzel, W. J. (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-8.

Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P. und Novotny, W. (2004). "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer." *Nat Rev Drug Discov* 3: 391-400.

Folkman, J. (1984). "What is the role of endothelial cells in angiogenesis?" *Lab Invest* 51: 601-4.

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

Folkman, J. (2003). "Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs." *Cancer Biol Ther* 2: S127-33.

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

Folkman, J. und Ingber, D. (1992). "Inhibition of angiogenesis." *Semin Cancer Biol* 3: 89-96.

Folkman, J. und Shing, Y. (1992). "Angiogenesis." *J Biol Chem* 267: 10931-4.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. und Breitman, M. L. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." *Nature* 376: 66-70.

Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varnier, J. A. und Cheresh, D. A. (1995). "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins." *Science* 270: 1500-2.

Gasparini, G., Brooks, P. C., Biganzoli, E., Vermeulen, P. B., Bonoldi, E., Dirix, L. Y., Ranieri, G., Miceli, R. und Cheresh, D. A. (1998). "Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer." *Clin Cancer Res* 4: 2625-34.

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

Hanahan, D. und Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* 86: 353-64.

Hixson, D. C., McEntire, K. D. und Obrink, B. (1985). "Alterations in the expression of a hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable rat hepatocellular carcinomas." *Cancer Res* 45: 3742-9.

Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. und Ferrara, N. (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." *J Biol Chem* 267: 26031-7.

Hutchings, H., Ortega, N. und Plouet, J. (2003). "Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation." *FASEB J* 17: 1520-2.

Ishii, H., Yazawa, T., Sato, H., Suzuki, T., Ikeda, M., Hayashi, Y., Takanashi, Y. und Kitamura, H. (2004). "Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs)." *Lung Cancer* 45: 325-37.

- Jin, L., Li, Y., Chen, C. J., Sherman, M. A., Le, K. und Shively, J. E. (2008). "Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain." *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 849-59.
- Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U. und Alitalo, K. (1997). "Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C." *J Cell Physiol* 173: 211-5.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996). "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases." *EMBO J* 15: 1751.
- Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1997). "Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C." *EMBO J* 16: 3898-911.
- Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., Jeltsch, M., Jackson, D. G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C. und Alitalo, K. (2004). "Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins." *Nat Immunol* 5: 74-80.
- Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E. und Alexander, J. S. (1998). "Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins." *J Biol Chem* 273: 15099-103.
- Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Neshat-Vahid, S., Irmak, S., Obst-Pernberg, K., Wurmbach, J. H., Loges, S., Kilic, E., Weil, J., Lauke, H., Tilki, D., Singer, B. B. und Ergun, S. (2007). "Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1." *Blood* 110: 4223-33.
- Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Wurmbach, J. H., Loges, S., Chalajour, F., Neshat-Vahid, S., Weil, J., Fernando, M. und Ergun, S. (2005). "Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1." *J Biol Chem* 280: 2361-9.
- Klagsbrun, M. und D'Amore, P. A. (1996). "Vascular endothelial growth factor and its receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 259-70.
- Koch, A. E., Harlow, L. A., Haines, G. K., Amento, E. P., Unemori, E. N., Wong, W. L., Pope, R. M. und Ferrara, N. (1994). "Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis." *J Immunol* 152: 4149-56.
- Koshikawa, N., Minegishi, T., Sharabi, A., Quaranta, V. und Seiki, M. (2005). "Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain." *J Biol Chem* 280: 88-93.

Kwak, H. J., So, J. N., Lee, S. J., Kim, I. und Koh, G. Y. (1999). "Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells." *FEBS Lett* 448: 249-53.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. und Ferrara, N. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* 246: 1306-9.

Lin, S. H. und Guidotti, G. (1989). "Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. The primary structure of the ecto-ATPase is similar to that of the human biliary glycoprotein I." *J Biol Chem* 264: 14408-14.

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* 277: 55-60.

Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J. und Dehio, C. (1999). "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases." *EMBO J* 18: 363-74.

Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W. und Ullrich, A. (1993). "High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis." *Cell* 72: 835-46.

Modlich, U., Kaup, F. J. und Augustin, H. G. (1996). "Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion." *Lab Invest* 74: 771-80.

Nagy, J. A., Dvorak, A. M. und Dvorak, H. F. (2003). "VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 13: 169-75.

Nollau, P., Prall, F., Helmchen, U., Wagener, C. und Neumaier, M. (1997). "Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization." *Am J Pathol* 151: 521-30.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. und Folkman, J. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." *Cell* 88: 277-85.

O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Cao, Y., Moses, M., Lane, W. S., Sage, E. H. und Folkman, J. (1994). "Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 471-82.



Obrink, B. (1997). "CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties." *Curr Opin Cell Biol* 9: 616-26.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y. und Shibuya, M. (1998). "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain." *J Biol Chem* 273: 31273-82.

Oliveira-Ferrer, L., Tilki, D., Ziegeler, G., Hauschild, J., Loges, S., Irmak, S., Kilic, E., Huland, H., Friedrich, M. und 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: 8932-8.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K. und Eriksson, U. (1996). "Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-81.

Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A. und Ferrara, N. (1994). "Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR." *J Biol Chem* 269: 25646-54.

Pepper, M. S. (1997). "Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 605-19.

Persico, M. G., Vincenti, V. und DiPalma, T. (1999). "Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF)." *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 31-40.

Plendl, J., Gilligan, B. J., Wang, S. J., Lewis, R., Shinnars, B., Vandembroek, K. und Auerbach, R. (2002). "Primitive endothelial cell lines from the porcine embryonic yolk sac." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38: 334-42.

Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E. und Neufeld, G. (1997). "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix." *J Biol Chem* 272: 7151-8.

Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H. D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T. und 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.

Quinn, T. P., Peters, K. G., De Vries, C., Ferrara, N. und Williams, L. T. (1993). "Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7533-7.

Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-Valdre, E., Nakamura, H., Ilmonen, M., Lombardo, C., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K. und Vuori, K. (2001). "Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1024-9.

Riethdorf, L., Lisboa, B. W., Henkel, U., Naumann, M., Wagener, C. und Loning, T. (1997). "Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland." *J Histochem Cytochem* 45: 957-63.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* 386: 671-4.

Rojas, M., Fuks, A. und Stanners, C. P. (1990). "Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent intercellular adhesion molecule." *Cell Growth Differ* 1: 527-33.

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

Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K. und Joensuu, H. (1998). "Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors." *Am J Pathol* 153: 103-8.

Schuch, G., Oliveira-Ferrer, L., Loges, S., Laack, E., Bokemeyer, C., Hossfeld, D. K., Fiedler, W. und Ergun, S. (2005). "Antiangiogenic treatment with endostatin inhibits progression of AML in vivo." *Leukemia* 19: 1312-7.

Senger, D. R., Connolly, D. T., Van de Water, L., Feder, J. und Dvorak, H. F. (1990). "Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor." *Cancer Res* 50: 1774-8.

Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Feder, J. und Dvorak, H. F. (1986). "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines." *Cancer Res* 46: 5629-32.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. und Schuh, A. C. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* 376: 62-6.

Shima, D. T., Deutsch, U. und D'Amore, P. A. (1995). "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability." *FEBS Lett* 370: 203-8.

Sieneel, W., Dango, S., Woelfle, U., Morresi-Hauf, A., Wagener, C., Brummer, J., Mutschler, W., Passlick, B. und Pantel, K. (2003). "Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* 9: 2260-6.

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. und Klagsbrun, M. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* 92: 735-45.

Stacker, S. A., Caesar, C., Baldwin, M. E., Thornton, G. E., Williams, R. A., Prevo, R., Jackson, D. G., Nishikawa, S., Kubo, H. und Achen, M. G. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." *Nat Med* 7: 186-91.

Stacker, S. A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R. J., Moritz, R., Karpanen, T., Alitalo, K. und Achen, M. G. (1999). "Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers." *J Biol Chem* 274: 32127-36.

Stavri, G. T., Zachary, I. C., Baskerville, P. A., Martin, J. F. und Erusalimsky, J. D. (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.

Stupack, D. G. und Cheresh, D. A. (2004). "Integrins and angiogenesis." *Curr Top Dev Biol* 64: 207-38.

Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M. und 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 U S A* 100: 4766-71.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." *Cell* 87: 1171-80.

Takagi, H., King, G. L. und Aiello, L. P. (1996). "Identification and characterization of vascular endothelial growth factor receptor (Flt) in bovine retinal pericytes." *Diabetes* 45: 1016-23.

Takahashi, K., Saishin, Y., Silva, R. L., Oshima, Y., Oshima, S., Melia, M., Paszkiet, B., Zerby, D., Kadan, M. J., Liau, G., Kaleko, M., Connelly, S., Luo, T. und Campochiaro, P. A. (2003). "Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment." *FASEB J* 17: 896-8.

Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R. und Ellis, L. M. (1995). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer." *Cancer Res* 55: 3964-8.

Thompson, J. A., Grunert, F. und Zimmermann, W. (1991). "Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives." *J Clin Lab Anal* 5: 344-66.

Thurston, G. (2003). "Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis." *Cell Tissue Res* 314: 61-8.

Tilki, D., Irmak, S., Oliveira-Ferrer, L., Hauschild, J., Miethe, K., Atakaya, H., Hammerer, P., Friedrich, M. G., Schuch, G., Galalae, R., Stief, C. G., Kilic, E., Huland, H. und Ergun, S. (2006). "CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer." *Oncogene* 25: 4965-74.

Vitolo, D., Paradiso, P., Uccini, S., Ruco, L. P. und Baroni, C. D. (1996). "Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: relation to angiogenesis and spread." *Histopathology* 28: 521-8.

Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M. und Werb, Z. (1998). "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes." *Cell* 93: 411-22.

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

Wen, W., Moses, M. A., Wiederschain, D., Arbiser, J. L. und Folkman, J. (1999). "The generation of endostatin is mediated by elastase." *Cancer Res* 59: 6052-6.

Witzenbichler, B., Maisonpierre, P. C., Jones, P., Yancopoulos, G. D. und Isner, J. M. (1998). "Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2." *J Biol Chem* 273: 18514-21.

Yilmaz, S. (2006). "Direkte Interaktion zwischen dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 und dem Angiogeneseinhibitor Endostatin." *Dissertationsarbeit, UKE Hamburg.*

Yokoyama, Y. und Ramakrishnan, S. (2004). "Addition of integrin binding sequence to a mutant human endostatin improves inhibition of tumor growth." *Int J Cancer* 111: 839-48.

Yokoyama, Y. und Ramakrishnan, S. (2007). "Binding of endostatin to human ovarian cancer cells inhibits cell attachment." *Int J Cancer* 121: 2402-9.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
Ak	Antikörper
Ang-1/-2	Angiopoietin-1/-2
C-CAM	Cell-Cell Adhesion Molecule
CC1	CEACAM1 Überexpression
CC1sil	CEACAM1 Silence
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1
DAB	Diaminobenzidinhydrochlorat
EGF	Epidermal Growth Factor
ES	Endostatin
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flk-1(KDR)	Fetal Liver Kinase (Kinase-insert Domain Receptor)
Flt-1, -4	Fms-like Tyrosine kinase-1,-4
FSH	Follikel-Stimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HDMECs	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
hES	humanes Endostatin
HE	Hämatoxylin/Eosin

ICAM	Inter-Cellular Cell Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
kDA	Kilo Dalton
KDR (Flk-1)	Kinase-insert Domain Receptor (Fetal Liver Kinase-1)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
Nrp-1/-2	Neuropilin-1/-2
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PIGF	Placenta-like Growth Factor
RNA	Ribonucleotid Acid
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
siRNA	small interfering Ribonucleotid Acid
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Tie	Tyrosine Kinase with Immunglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domains
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A,-B,-C,-D,-E	Subtypen der VEGF-Familie
VEGFR-1,-2,-3	VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1),-2 (KDR,Flk-1),-3 (Flt-4)

VPF

Vascular Permeability Factor

VRF

Vascular Endothelial Growth Factor-Related  
Protein

## 8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. S. Ergün für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine individuelle und hervorragende Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er mich immer mit ausgezeichnetem Rat unterstützte.

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

Frau Dr. rer. nat. L. Oliveira-Ferrer danke ich sehr für die Unterstützung und unvergessliche Betreuung bei den Experimenten, für das gute Arbeitsklima und für die Zusammenarbeit, die sehr viel Spaß gemacht hat.

Frau Dr. rer. nat. S. Irmak möchte ich herzlich für die freundschaftliche und moralische Unterstützung sowie für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre tatkräftige Hilfe danken.

Ich danke Frau J. Hausschild für die Hilfe, Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima und nicht zuletzt für die Unterstützung bei den Light Cyclers Analysen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. med. N. Kilic, Frau Dr. med. D. Tilki, Frau Dr. med. E. Zengin, Frau G. Steffens für die gute Zusammenarbeit bedanken.



Ich danke Dr. med. G. Schuch für die Unterstützung und dafür, dass ich einige Experimente in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte.

Außerdem möchte ich Familie Gröninger danken für Ihre liebevolle Unterstützung und für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift.

Nicht zuletzt danke ich ganz ausdrücklich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Liebe und emotionale Unterstützung, ohne die ich mich meiner Arbeit nicht so intensiv hätte widmen können.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Elif Ege Erenler  
Geburtsdatum: 04.05.1981  
Geburtsort: Stuttgart  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1987-1991 Grundsschule Heusteig in Stuttgart  
1991-2000 Ev. Mörrike-Gymnasium in Stuttgart mit Erwerb der  
allgemeinen Hochschulreife  
2000-2001 Freiwilliges Soziales Jahr, Geriatrische  
Rehabilitationsklinik Stuttgart-Böblingen

### Hochschulausbildung

10 / 2001 Beginn des Medizinstudiums an der Universität  
Hamburg  
09 / 2004 1. Ärztliche Prüfung (Physikum)  
10 / 2008 2. Ärztliche Prüfung

### Praktisches Jahr

08 / 2007 – 10 / 2007 Allgemein Chirurgie, Asklepios Klinik Altona  
10 / 2007 – 12 / 2007 Kinderchirurgie, Altonaer Kinderkrankenhaus  
10 / 2007 – 04 / 2008 Wahltertial Pädiatrie, Altonaer Kinderkrankenhaus  
04 / 2008 – 07 / 2008 Innere Medizin, Asklepios Klinik Altona

## **Berufsausbildung**

seit 03 / 09

Assistenzärztin in der Abteilung für Pädiatrie  
im Altonaer Kinderkrankenhaus Hamburg

## **Forschungstätigkeit**

09 / 2005 – 12 /2007

Experimentelle Doktorarbeit zum Thema: „ Die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 und dem Angiogeneseinhibitor Endostatin bei der Gefäßneubildung“ bei Prof. Dr. med. S. Ergün im Institut für Anatomie I des UKE, Hamburg

## 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.

Hamburg, den

Unterschrift:

.....

