UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation

mit der Sektion Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Hubertus-Wald Tumorzentrum (UCCH)

CEACAM1-vermittelte Regulation von metastasierungs- und angiogeneserelevanten Genen in Endothel- und Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anna Lena Görtz
aus Engelskirchen

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.10.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer**

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: **PD Dr. Sabine Riethdorf**

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 3
2. EINLEITUNG 4
2.1. Die Metastasierung von Tumorzellen 4
2.1.1. Einführung in die Tumormetastasierung 4
2.1.2. Die metastasierenden Zellen 5
2.1.3. Das Mikromilieu 6
2.1.4. Cancer dormancy 7
2.2. Angiogenese 8
2.3. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) 11
2.3.1. Zelladhäsionsmoleküle 11
2.3.2. Die Immunglobulin-Superfamilie 12
2.3.3. CEACAM1 – Ein Mitglied der CEA-Familie 13
2.3.4. CEACAM1 - Vorkommen und Struktur 14
2.3.5. Rolle von CEACAM1 in der Angiogenese 15
2.3.6. Rolle von CEACAM1 in der Tumorgenese 16
2.3.7. Weitere Funktionen von CEACAM1 17
2.4. Heparansulfatproteoglykane und Heparanase 18
2.4.1. Heparansulfatproteoglykane 18
2.4.2. Heparanase - molekulare und biochemische Eigenschaften 19
2.4.3. Lokalisation, Sekretion und Wiederaufnahme 20
2.4.4. Regulation von Genexpression und Sekretion 22
2.4.5. Funktionen 24
2.4.6. Heparanase 2 25
2.5. Inhibitor of differentiation 3 (Id3) 26
2.6. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) 27
3. MATERIAL UND METHODEN 29
3.1. Material 29
3.1.1. Tabelle 1: Geräte 29
3.1.2. Tabelle 2: Plastikware und Verbrauchsmaterial 30
3.1.3. Tabelle 3: Glasware 30
3.1.4. Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien 30
3.1.5. Tabelle 5: Kits 32
3.1.6. Tabelle 6: Lösungen 33
3.1.7. Tabelle 7: Zellen 33
3.1.8. Tabelle 8: Medien und Zusätze 33
3.2. Methoden 34
3.2.1. Kultivierung von Zellen 34
3.2.2. Bestimmung der Zellzahl 34
3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen 34

3.2.4. Transfektion von Zellen 35
3.2.5. Isolation von Gesamt-RNA 36
3.2.6. cDNA-Synthese 36
3.2.7. Quantitative RT- PCR 36
3.2.8. Lyse von Zellen 38
3.2.9. Bestimmung der Proteinmenge 39
3.2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 39
3.2.11. Western Blot 40
4. ERGEBNISSE 41
4.1. CEACAM1-induzierte mRNA-Expression von Heparanase, PLAU und Id3 in primären Endothelzellen 41
4.2. CEACAM1-induzierte Proteinexpression von Heparanase in primären Endothelzellen 44
4.3. CEACAM1-induzierte mRNA-Expression von Heparanase in Tumorepithelzellen 46
4.4. CEACAM1-induzierte Proteinexpression von Heparanase in Tumorepithelzellen 48
5. DISKUSSION 49
6. ZUSAMMENFASSUNG 53
7. LITERATURVERZEICHNIS 55
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 64
9. DANKSAGUNG 66
10. LEBENSLAUF 67
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 68

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Ein wesentlicher Schritt zur Metastasierung ist der Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße. Aus diesem Grund sind Angiogenese und Lymphangiogenese hierfür von entscheidender Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bereits in frühen Stadien der Tumorentwicklung das Zelladhäsionsmolekül carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in den Endothelzellen der Blut- und Lymphkapillaren hochreguliert ist. Zudem wurde ersichtlich, dass diese Konstellation mit der Aktivierung der Angiogenese/Lymphangiogenese in den Tumor benachbarten Arealen einhergeht (Oliveira-Ferrer et al. 2004, Tilki et al. 2006, Kilic et al. 2007).

In Vorarbeiten wurde mittels eines Angiogenese- RT² Profiler™ PCR Arrays der Effekt von CEACAM1-Anwesenheit bzw. -Abwesenheit auf die Genexpression verschiedener für die Angiogenese relevanter Gene in Endothelzellen untersucht. Diese Analysen gaben Hinweise darauf, dass CEACAM1 möglicherweise auch Einfluss auf metastasieurungsrelevante Gene haben könnte.

Ziel dieser Arbeit sollte es nun sein, die potentielle CEACAM1-induzierte Regulation von Heparanase, urokinase-plasminogen activator (PLAU) und inhibitor of differenciation 3 (Id3) in Endothelzellen zu untersuchen. Hierfür wurde die Expression von CEACAM1 in primären Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC) genetisch verändert und anschließend die Expression der oben genannten Faktoren auf RNA- und Proteinebene analysiert.

HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit

a) CEACAM1-Expressionsvektor
b) leerem Expressionsvektor (Negativkontrolle zu a)
c) CEACAM1-small interfering (si)RNAs
d) Luciferase-siRNAs (Negativkontrolle zu c)

transient transfiziert.

Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden die Proben mittels qRT-PCR nach der Expression von Heparanase, PLAU und Id3 untersucht. Darüber hinaus wurden Proteine aus den vier Gruppen isoliert und mittels Western Blot die Expression der genannten Faktoren analysiert.

Aufgrund der bereits in früheren Arbeiten gezeigten Rolle von CEACAM1 in Epithelzellen (Oliveira-Ferrer et al. 2004, Tilki et al. 2007), sollte der CEACAM1-induzierte Effekt auf die Expression von Heparanase, PLAU und Id3 in Tumorepithelzellen am Beispiel des Harnblasenkarzinommodells ebenfalls untersucht werden.

2. EINLEITUNG

2.1. Die Metastasierung von Tumorzellen

2.1.1. Einführung in die Tumormetastasierung

Der Begriff Metastasierung ist eine „allgemeine Bezeichnung für Krankheitsprozesse, bei denen eine Absiedlung von Zellen oder Zellverbänden über den Blut- oder Lymphweg in primär nicht erkrankte Körperregionen stattfindet“ (Pschyrembel 2002). Der folgende Abschnitt soll sich vorwiegend der Verschleppung maligner Tumorzellen widmen.

1829 gebrauchte Jean Claude Recamier erstmals den Begriff „Metastasierung“, an der nun seit beinahe 200 Jahren geforscht wird (Talmadge und Fidler 2010). Im Jahr 1889 veröffentlichte Stephen Paget seine „seed and soil“-Theorie, die besagt, dass die Verteilung von sekundärem Tumorwachstum nicht dem Zufallsprinzip unterliegt. Er vergleicht die Tumorzellen mit Samen einer Pflanze: wenn diese ihre Samen sät, werden sie in alle Richtungen getragen, sie können jedoch nur leben und wachsen, wenn sie auf fruchtbaren Boden fallen. Durch Autopsiebefunde von Frauen mit letalem Mammakarzinom konnte er zeigen, dass die metastasierenden Zellen eine Organspezifität zeigten (Paget 1889). Dieser Grundgedanke bildet auch heute noch den Ausgangspunkt aktueller Theorien.

Die Metastasierung ist im Tumorgeschehen von größter klinischer Bedeutung, da die Mehrzahl der Todesfälle durch Krebserkrankungen durch Metastasen verursacht wird (Bos et al. 2010). Maligne Primärtumoren können oft chirurgisch reseziert werden, aber die Zellen, die die Fähigkeit zur Migration durch den Körper und zur Ansiedlung und Proliferation in fernen Organen gewinnen, sind oft die Zellen, die die schädlichsten Effekte erzielen und am schwersten therapeutisch zu bekämpfen sind (Coghlin und Murray 2010).

Es handelt sich bei der Metastasierung um einen Prozess, der typischerweise aus folgenden Schritten besteht: Verlust der zellulären Adhäsion, lokale Invasion, Intravasion, Überleben innerhalb der vaskulären Zirkulation, Extravasion und Kolonisation (Nguyen et al. 2009, Coghlin und Murray 2010).

Die Metastasierung ist der Teil des Tumorgeschehens, der lange Zeit vernachlässigt wurde, sodass noch viel Bedarf an Forschung besteht. Es existieren verschiedene Theorien und Modelle, die diesen Prozess zu beschreiben versuchen.

So beschreiben Coghlin und Murray (2010) beispielsweise zwei Modelle, die die zeitliche Komponente in den Vordergrund stellen:

Das Modell der späten Dissemination besagt, dass primäre Tumore sich erst etablieren müssen. Erst wenn sie groß genug sind, um die Zellaberrationen zu unterstützen, die für die Migration und das

Überleben notwendig sind, bilden sie den Ausgangspunkt für metastatische Zellen. Die migrierenden Zellen sollten also mit den primären Tumorzellen genetisch übereinstimmen.
Das Modell der frühen Dissemination geht hingegen davon aus, dass einige Zellen den Tumor schon viel früher in der Tumorgenese verlassen und sich genetisch unterschiedlich in ektopen Geweben weiterentwickeln. Dort generieren sie dann eine weitere Kaskade metastatischer Zellen (Coghlin und Murray 2010).

2.1.2. Die metastasierenden Zellen

Eine wichtige Frage, die sich stellt, ist, was die Zellen ausmacht, die zur Metastasierung neigen, oder ob generell jede Tumorzelle das Potential besitzt. Die exakte Beantwortung dieser Frage lässt weiterhin auf sich warten.
In den letzten Jahren wurde vermehrt vermutet, dass sog. Tumorstammzellen (cancer stem cells = CSCs) diese Fähigkeit zugeschrieben werden könnte.
Wie in normalen Geweben sind auch in Tumorgewebe nicht alle Zellen gleich. Nach der Stammzell-Theorie bestehen maligne Tumoren sowohl aus CSCs, die ein großes proliferatives Potential besitzen, sowie aus weiter differenzierten Zellen mit eingeschränktem proliferativem Potential. Wie auch normale somatische Stammzellen besitzen CSCs die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Weiterdifferenzierung. Im Gegensatz zu somatischen Stammzellen geschieht dies bei den CSCs jedoch in weitestgehend unkontrollierter Weise (Pardal et al. 2003). Zudem ist die Anzahl an Zellen mit spezifischen CSC-Oberflächenmarkern in Tumoren relativ hoch, verglichen mit verhältnismäßig kleinen Anteilen von normalen Stammzellen in gesunden Geweben (Coghlin und Murray 2010).
Allerdings wird an der Stammzell-Theorie immer wieder Kritik geäußert und kontrovers diskutiert, da sie klinisch nicht ausreichend belegt ist. Zudem sind verschiedene Berichte über CSCs widersprüchlich, was ihre Identifizierung, ihre Charakteristika und die Korrelation zwischen klinischem Outcome und Tumor-CSC-Status betrifft (Talmadge und Fidler 2010). Studien über Mauslymphome und Leukämie zeigten beispielsweise, dass zumindest einige Krankheiten und deren Metastasen von einer relativ großen Anzahl (>10%) von Tumorzellen, eventuell sogar der Mehrheit ausgehen können (Kelly et al. 2007).
Einigkeit besteht jedoch über die metastatische Heterogenität. So konnten Wu et al. (2008) z.B. beim Mammakarzinom nachweisen, dass erhebliche Heterogenität sowohl zwischen primärem Tumor und Metastasen als auch zwischen den multiplen Metastasen untereinander besteht. Heterogenität besteht auch zwischen den einzelnen Zellen des Primärtumors bezüglich ihres metastatischen Potentials (Fidler und Kripke 1977), sodass nicht alle tumorösen Zellen die gleichen metastatischen Fähigkeiten besitzen, sondern bestimmte Tumorsubpopulationen mit metastatischem Potential vorhanden sind.
Auch wenn Uneinigkeit darüber herrscht, welche Zellen (und in welcher relativen Menge) zur Metastasierung befähigt sind, so ist doch gewiss, dass es sich bei dem Prozess selber um einen sehr

ineffektiven handelt. Nur ein äußerst kleiner Anteil der Zellen, die sich von dem Primärtumor lösen, sind in der Lage Makrometastasen zu bilden. Die Hauptprobleme scheinen dabei nach Studien von Luzzi et al. (1998), die mangelhafte Fähigkeit einzelner Zellen zur Initiierung von Wachstum und die eingeschränkte Fähigkeit, aus Mikrometastasen Makrometastasen zu bilden, zu sein. Durch Injektion von B16F1 Melanomzellen in Mäuselebern zeigten sie, dass an Tag 3 noch 80% der injizierten Zellen lebten und extravasierten, jedoch nur 1/40 dieser überlebenden Zellen Mikrometastasen bildete und lediglich jede 100. Mikrometastase zur Makrometastase heranwachsen konnte (Luzzi et al. 1998). Obwohl also eine große Menge Tumorzellen in die Blutbahn freigegeben wird, beispielsweise etwa 3-4 x 10^6 pro 24 Stunden pro Gramm Gewebe beim Mammakarzinom der Ratte (Butler und Gullino 1975), ist nur ein Bruchteil davon befähigt Makrometastasen zu bilden.

2.1.3. Das Mikromilieu

Wie bereits erwähnt, siedeln sich metastatische Zellen eines Tumors nur in bestimmten Geweben an („seed and soil“-Theorie), sodass davon auszugehen ist, dass bestimmte Grundvoraussetzungen gegeben sein müssen, wie beispielsweise ein entsprechendes Mikromilieu. Zu diesem gehören sowohl die umgebenden benignen Zellen, als auch die extrazellulären Komponenten der Gewebe.

In jedem Schritt der Metastasierung spielt das Mikromilieu eine besondere Rolle. Sowohl in der Blutbahn als auch im Zielgewebe müssen metastatische Zellen überleben, was eine Anpassung an das jeweilige Mikromilieu erfordert. Hierfür rekrutieren die Tumorzellen nicht-maligne Zellen. Viele von ihnen werden aus dem Knochenmark rekrutiert, insbesondere Zellen der myeloiden Reihe (Joyce und Pollard 2009).

Im gesunden Gewebe herrscht eine rege Interaktion zwischen verschiedensten Zellen. Diese besitzen eine positionelle Identität, sodass ihre Lokalisation definiert ist. Zusätzlich ist ihre Anzahl limitiert. Durch Mutationen in Tumoronkogenen und Tumorsuppressorgenen ist die Limitierung aufgehoben. Es werden jedoch nicht alle Interaktionen mit benignen umgebenden Zellen und mit der extrazellulären Architektur aufgegeben, sodass diese sogar zu einer Tumorsuppression führen können (Joyce und Pollard 2009).

Das Mikromilieu des soliden Tumors ist u.a. durch ein reaktives Stroma charakterisiert, das durch viele Leukozyten und inflammatorische Mediatoren charakterisiert ist. Verbindungsglied zwischen Entzündung und Tumor bilden sog. tumor-associated macrophages (TAMs). Makrophagen allgemein machen bis zu 50% der Tumormasse aus, was ihre Wichtigkeit verdeutlicht. TAMs sind u.a. an Metastasierung, Tumorzellproliferation, Angiogenese, Immunmodulation und Matrix-Umsatz beteiligt. TAMs produzieren eine Vielzahl an Molekülen, unter ihnen Tumornekrosefaktor (TNF) α, Interleukin (IL)1-β und Proteasen, die als wichtige Faktoren in dem Prozess der Metastasierung fungieren (Solinas et al. 2009).

Proteasen wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), urokinase-specific plasminogen activator (uPA) und Cathepsine zerstören die Basalmembran und öffnen somit den Weg für invasive Tumorzellen. TAMs übernehmen ebenfalls Funktionen in der Intravasion. Sie produzieren epidermal growth factor (EGF) und binden an epidermal growth factor receptor (EGFR) auf Tumorzellen, andersherum binden Tumorzellen an den macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) auf TAMs (Mareel et al. 2009). Beide Rezeptoren sorgen für die Bildung von Invadopodien auf Tumorzellen und Podosomen auf TAMs (Condeelis und Pollard 2006). Extravasion von Tumorzellen wird durch Makrophagen unterstützt, indem sie Zytokine (IL-1, IL-18, TNF) produzieren, die die Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen stimulieren (Mareel et al. 2009).

TAMs sind nur ein Beispiel von Zellen, die Teil des Mikromilieus sind, daneben sind aber auch viele andere Zellen wie Endothelzellen und Fibroblasten involviert, die sowohl direkt als auch indirekt durch Expression von verschiedenen Metaboliten die Metastasierung vorantreiben.

Zudem sind die Tumorzellen selber an der Bildung einer für sie typischen Umgebung beteiligt. Besonders unter hypoxischen Bedingungen produzieren Tumorzellen Faktoren, die das Mikromilieu modulieren und Angiogenese und Metastasierung fördern. Diese Faktoren ermöglichen es den Tumorzellen, sich von dem dichten Typ-I-Kollagen-Netzwerk zu lösen und ins Gefäßsystem zu gelangen. Von besonderer Bedeutung sind dabei die durch Tumorzellen induzierte Hoch- und Herrunterregulierung von MMPs und ihrer Inhibitoren, den tissue inhibitors of matrix metalloproteases (TIMPs) (Park et al. 2010). Beispielsweise zeigten Zhang et al. (2010), dass intravasale Prostatakarzinomzellen eine erhöhte Expression von MMPs (-1, -2, -9, -10, -13) aufweisen.

2.1.4. Cancer dormancy

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei der Metastasierung um einen relativ ineffektiven Prozess. Selbst der größte Teil der tumorösen Zellen, die ein fernes Gewebe erreicht haben, führt nicht zur sofortigen Metastasierung, sondern geht entweder im Rahmen der Apoptose zugrunde oder bleibt als solitäre ruhende Zellen bestehen (Townson und Chambers 2006).

Cancer dormancy bzw. metastatic latency beschreiben den Zeitraum im Tumorgeschehen, in dem es zwar zu Tumorzellabsiedlungen gekommen ist, diese sich jedoch noch in einer Ruhephase befinden. Dabei unterscheidet man ruhende Mikrometastasen von solitären ruhenden Zellen (Townson und Chambers 2006).

Bei ruhenden Metastasen handelt es sich um Zellabsiedlungen des Primärtumors, die sich in einem Stadium der Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose befinden. Eine Inhibierung der Angiogenese limitiert durch eine Erhöhung der Apoptoserate das Tumorwachstum (Holmgren et al. 1995). Im Gegensatz dazu befinden sich solitäre ruhende Zellen in einem Stadium, in dem sie weder proliferieren, noch apoptotisch werden (Luzzi et al. 1998).

An diesem Ruhezustand der Tumorzellen sind verschiedene Mechanismen beteiligt, darunter die Störung der Signaltransduktion zwischen Wachstumsfaktoren und Adhäsion, was zu einer Missinterpretation des Mikromilieus durch die Tumorzellen, mit der Folge eines G0-G1-Arrestes führt. Außerdem die mangelhafte Angiogenese und die Immunkontrolle (Aguirre-Ghiso 2007).
Tumorerkrankungen können auch noch Jahre und Jahrzehnte nach scheinbarer Heilung wieder auftreten. Dies scheint zumindest teilweise in Zusammenhang mit dem Vorhandensein von ruhenden Tumorzellen zu stehen (Townson und Chambers 2006).
Von einer klinischen Relevanz dieser Zellen ist also auszugehen. Die Frage, was genau zu einer möglichen Reaktivierung führen könnte, ist jedoch noch nicht vollends geklärt und wird weiterhin erforscht.

2.2. Angiogenese

Der menschliche Körper wird von einem großen Blutgefäßnetz durchzogen, über das u.a. Nährstoffe wie Glucose, Fette und Aminosäuren sowie Sauerstoff in alle Regionen des Körpers geleitet werden. Das von den Geweben produzierte CO_2 und die Stoffwechselabbauprodukte werden wiederum über dieses System abtransportiert. Sämtliche Gewebe sind auf diese Versorgungswege angewiesen, so dass im Fall von Wachstum neue Blutgefäße ausgebildet oder bereits bestehende ausgebaut werden müssen.
Der Prozess der de novo Synthese von Blutgefäßen in der Embryonalentwicklung wird als Vaskulogenese bezeichnet und ist eines der ersten Ereignisse der Embryogenese. Aus embryonalen Stammzellen des Mesoderms differenzieren sich Hämangioblasten, die als pluripotente Progenitorzellen Ursprung von sowohl Angioblasten als auch hämatopoetischen Zellen sind.
Die Angiogenese hingegen beschreibt die Phase der Erweiterung des primären vaskulären Plexus durch Aussprossung und Umbau der Kapillaren in ein hoch organisiertes System (Karamysheva 2008, Carmeliet 2005). Sie ist sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen von Bedeutung. Nach der Geburt trägt die Angiogenese zum Organwachstum bei, im adulten Organismus verhalten sich die meisten Gefäße jedoch still. Eine Ausnahme stellt das weibliche Reproduktionssystem dar, in dem Gefäßausbau physiologischerweise im ovariellen Zyklus und während der Schwangerschaft in der Plazenta stattfindet (Carmeliet 2005). Trotz des angiogenem Stillstandes behalten Endothelzellen die Fähigkeit schneller Teilung auf entsprechende Stimuli bei. Formation und Wachstum von Blutgefäßen unterliegen jedoch einer strikten Kontrolle und werden nur unter bestimmten Voraussetzungen wie beispielsweise Wundheilung, Hypoxie und Entzündung aktiviert. Eine strikte Regulation dieses Systems ist von großer Bedeutung, da sowohl exzessives

Wachstum als auch die unzureichende Ausbildung von Gefäßen zu ernsthaften Erkrankungen führen (Karamysheva 2008).

Die Angiogenese stellt einen komplexen mehrschrittigen Prozess dar, induziert durch die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren zugunsten der proangiogenen.

Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung: Einen der ersten Schritte in der Angiogenese stellt die Dilatation existierender Gefäße als Reaktion auf gesteigerte Sticktoffmonoxid (NO)-Konzentrationen dar (Conway et al., 2001). Sowohl Hypoxie als auch NO gelten durch Steigerung von hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) als Induktoren von vascular endothelial growth factor (VEGF) (Kimura und Esumi 2003). Dieser vermittelt eine vaskuläre Permeabilitätssteigerung, die durch die Umlagerung von Adhäsionsmolekülen und Cadherinen generiert wird und die Lockerung interendothelialer Bindungen zur Folge hat (Eliceiri et al. 1999). Die gesteigerte Permeabilität führt zu einer Extravasion von Plasmaproteinen, die eine Übergangsmatrix bilden, die für die Migration aktivierter Endothelzellen unerlässlich ist (Conway et al. 2001). Eine weitere Gruppe von Wachstumsfaktoren bilden die Angiopoietine. Um eine zu starke Extravasion zu verhindern bindet Angiopoietin (Ang) 1 an den Tyrosinkinaserezeptor (Tie) 2 und vermittelt einen stabilisierenden Effekt. Es trägt insbesondere zur Stabilisierung von Endothelzellen mit umliegenden Zellen und Matrix bei. Ang 2 hingegen bildet seinen natürlichen Antagonisten, bindet ebenfalls an Tie 2, blockiert diesen und unterstützt die VEGF-induzierte Plastizität (Gale und Yancopoulos 1999).

Degradation von Basalmembran und extrazellulärer Matrix: Nach Fenestrierung der Endothelzellschicht besteht der nächste wichtige Schritt in der Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (ECM) durch eine Vielzahl proteolytischer Enzyme. Beteiligt sind u.a. viele verschiedene Matrixmetalloproteinasen und Heparanase, die neben der proteolytischen Spaltung sich in der Matrix befindende Wachstumsfaktoren freisetzen (Nelson et al. 2000, Vlodavsky et al. 1990).

Endothelzellproliferation und -migration: Ist der Weg einmal frei, beginnen proliferierende Endothelzellen zu wandern und locker miteinander verbundene Gefäßstraßen zu bilden. Nicht alle Endothelzellen reagieren in gleicher Weise auf angiogene Stimuli, um eine Beschädigung des vorhandenen Netzwerkes mit folgender Minderversorgung des Gewebes zu vermeiden. Nur bestimmte Endothelzellen innerhalb bestehender Kapillaren, sog. Tip-cells, werden rekrutiert um die angiogene Expansion einzuleiten. Diese ändern aufgrund der angiogenen Stimuli ihren Phänotyp, sodass sie die Fähigkeit zur Migration, Invasion und Sekretion von Proteasen gewinnen. Tip-cells reagieren auf den in Richtung Tumorzellen steigenden VEGF-Gradienten, der die Migrationsrichtung angibt. Normale Endothelzellen folgen, die neu geformten Kapillaren fusionieren mit anderen und bilden Lumen (Karamysheva 2008).

Gefäßreifung: Für ein stabiles Gefäßnetz sind Endothelzellen nicht ausreichend. Während der sog. vaskulären Myogenese werden durch endotheliale Sekretion von platelet-derived growth factor (PDGF) Pericyten und smooth muscle cells (SMCs) rekrutiert, interzelluläre Bindungen verstärkt und so die Stabilität der Gefäße gewährleistet. Zusätzlich inhibieren sie endotheliale Proliferation und Migration und fördern die Produktion von ECM. Die Migration der Muskelzellen entlang der bestehenden Endothelzellschläuche wird auch als Arteriogenese bezeichnet (Carmeliet 2000).

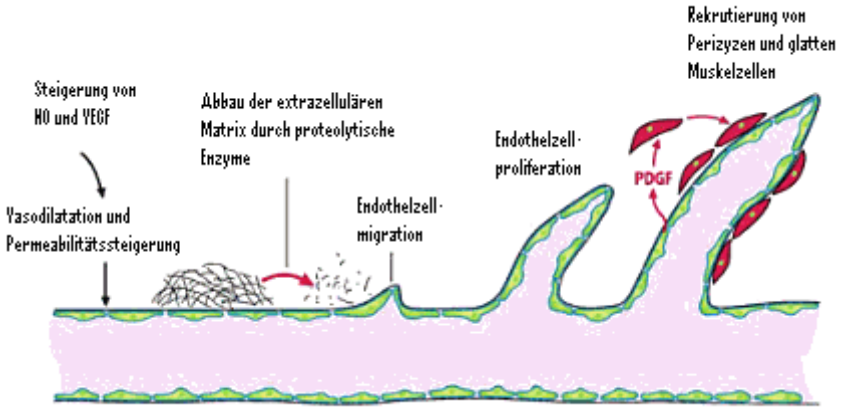


Abb. 2: Angiogenese

Die Steigerung von beispielsweise NO und VEGF führt zu einer Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung der Gefäße. Proteolytische Enzyme werden freigesetzt und erzielen einen Abbau der extrazellulären Matrix. Zudem finden Endothelzellmigration und –proliferation statt. Als weiterer Schritt erfolgt eine Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen zur Stärkung der Gefäßstabilität. Modifizierte Abbildung nach Schmidt und Lang (Schmidt und Lang 2007).

Auch im Tumorwachstum ist die Angiogenese von größter Bedeutung. In der frühen Phase ist die Zellpopulation des Tumors klein (einige Carcinoma in Situ umfassen $<10^6$ Zellen) und kann per Diffusion ernährt werden, sodass eine Vaskularisation nicht notwendig ist; er befindet sich folglich noch in der prävaskulären Phase. Ab einer Tumorgröße von 2-3 mm^2 können nicht mehr alle Bereiche des Tumors per Diffusion erreicht werden und Blutgefäße sprossen ein, um einen Untergang der Tumorzellen durch Hypoxie zu verhindern (Folkman 1990, Folkman 1995). Dieser sog. „angiogenic switch“ kann je nach Tumortyp und Umgebung in verschiedenen Stadien der Tumorprogression geschehen (Bergers 2003).

Zudem besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen Angiogenese und Tumormetastasierung. Die Angiogenese stellt eine kritische Komponente der Tumormetastasierung dar, indem sie Tumorzellen einen effizienten Weg bietet, den primären Tumor zu verlassen und in das Blutsystem zu gelangen. Dies wird durch die erhöhte Dichte von immaturen, hochpermeablen Blutgefäßen mit

geringen Basalmembranen, und weniger interzellulären Kontakten als in normalen Gefäßen, ermöglicht. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang VEGF, welcher die Hyperpermeabilität der Gefäßwände fördert, weshalb er auch als vascular permeability factor (VPF) bekannt ist (Zetter et al. 1998, Dvorak et al. 1995). Die erhöhte vaskuläre Permeabilität sorgt zudem für eine Erhöhung des interstitiellen Flüssigkeitsdruckes, was ein „passive escape“ der Tumorzellen durch das Stroma fördert (Moserle und Casanovas 2013). In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation zwischen Blutgefäßdichte und metastatischem Potential nachgewiesen werden. Anhand des invasivem Mammakarzinoms zeigten Weidner et al. 1991 beispielsweise, dass eine erhöhte Dichte angiogenetischer Mikrogefäße mit einem höheren Metastasierungsgrad einhergeht.

2.3. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)

2.3.1. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind Zelloberflächenproteine, die für Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen zuständig sind. Sie sind von besonderer Bedeutung für die Bildung normaler Gewebestruktur und -funktion und sind an einer Reihe physiologischer Prozesse wie Morphogenese, Embryogenese, Organogenese, immunologische Funktionen, Wundheilung und Entzündung beteiligt (Makrilia et al. 2009). Neben der Funktion der Adhäsion sind diese Moleküle aber auch an der Modulation von Signaltransduktion beteiligt, andererseits können Signaltransduktionswege wiederum die Funktion der Zelladhäsion modulieren, sodass eine wechselseitige Beziehung besteht (Cavallaro u. Christofori 2004).

Es werden vier große Gruppen der Zelladhäsionsmoleküle unterschieden: Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie.

Cadherine sind eine Gruppe von transmembranösen Glykoproteinen, die die Hauptmediatoren von Calcium-abhängigen Zell-Zell-Bindungen sind. Adhäsion zwischen einzelnen Zellen wird im Wesentlichen durch tight junctions, adherens junctions und Desmosomen sichergestellt. Cadherine bilden die Hauptkomponente von sowohl adherens junctions als auch Desmosomen und häufen sich an Stellen der Zell-Zell-Kontakte der meisten Gewebe an. Es handelt sich bei den Zell-Zell-Interaktionen um homophile Protein-Protein-Bindungen, sodass fast ausschließlich Cadherine desselben Typs aneinander binden (Cavallaro u. Christofori 2004).

Integrine sind Zelloberflächen-Glykoprotein-Rezeptoren deren extrazelluläre Domäne die Funktion eines Rezeptors für ECM-Proteine einnimmt, beispielsweise für Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen. Zusätzlich binden sie Liganden des Gerinnungssystems wie Thrombospondin,

Von-Willebrand-Faktor (vWF) und Faktor X und andere Zelladhäsionsmoleküle. Eine wichtige Rolle spielen sie, neben der Zelladhäsion, bei bidirektionalen Signaltransduktionsmechanismen. Eine bedeutende pathologische Stellung nehmen sie bei Transformation und Tumorwachstum, Invasion und Migration, Metastasierung und Angiogenese ein (Makrilia et al. 2009).

Bei den Selektinen handelt es sich um Calcium-abhängige Zelloberflächenproteine, die wiederum in drei Untergruppen unterteilt werden: L-Selektin (v.a. von Leukozyten exprimiert), P-Selektin (auf Thrombozyten und Endothelzellen vorkommend) und E-Selektin (auf aktivierten Endothelzellen). U.a. bei Entzündungsprozessen und Gewebsdefekten sind Selektine von Bedeutung, indem sie die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen herstellen und so das sog. Leukozytenrollen induzieren, das ein Bestandteil des Prozesses der Extravasion von Entzündungszellen in umgebendes Gewebe ist (Tedder et al. 1995). Auch an pathophysiologischen Prozessen wie der Metastasierung sind Selektine beteiligt, indem sie Verbindungen mit Tumorzellen herstellen und so den Austritt maligner Zellen aus der Blutbahn fördern (Läubli und Borsig 2010).

Auf die Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie wird folgend näher eingegangen.

2.3.2. Die Immunglobulin-Superfamilie

Die Mitglieder der immunglobulin superfamily of cell adhesion molecules (IgCAMs) bilden eine große Gruppe von Zelloberflächen-Glykoproteinen, die auf Zell-Zell-Bindungen spezialisiert sind (Kuespert et al. 2006). Sie unterstützen Calcium-unabhängig sowohl homophile als auch heterophile Adhäsion (Vaughn und Bjorkman 1996).

Alle IgCAMs weisen mindestens eine immunglobulin (Ig)-like Domäne auf, eine Struktur, die durch zwei aneinander gelegte β-Faltblattstrukturen charakterisiert ist (Kuespert et al. 2006). Diese bestehen aus zwei antiparallel laufenden Strängen, zwischen denen sich ein hydrophobes Milieu bildet und die zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Williams und Barclay 1988). Eine Subklassifikation teilt die Ig-Faltblätter basierend auf Sequenz und strukturellen Ähnlichkeiten weiter in Ig variable (IgV) und Ig konstante (IgC)-1 und -2 Domänen ein (Vaughn und Bjorkman 1996).

IgCAMs sind in verschiedenen biologischen Prozessen von Bedeutung, beispielsweise der Entwicklung des Nervensystems und der Immunantwort. Teilweise ist ihre Expression durch Zytokine wie TNF-α, IL-1 und Interferon-γ induziert (Makrilia et al. 2009).

Andererseits wurden verschiedene maligne Erkrankungen mit ihnen in Verbindung gebracht. Viele Tumorzellen besitzen u.a. die Fähigkeit, sich spezifisch an endotheliale Zelladhäsionsmoleküle zu setzen, die normalerweise das Leukozytenrollen regulieren. Langley et al. (2001) zeigten, dass die Expression des vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mit dem Metastasierungsmuster des Melanoms korreliert. Als weiteres Beispiel wurde eine Dysregulation der Expression des neural cell adhesion molecule (NCAM) mit verschiedenen soliden Tumoren wie Wilms-Tumor, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Neuroblastom und Melanom in Verbindung gebracht (Tezel et al. 2001). Neben

genannten Beispielen ist auch für viele weitere Mitglieder der Familie der IgCAMs, wie intercellular adhesion molecule (ICAM), mucosal addressin cell adhesion molecule (Mad CAM), platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) und carcinoembryonic antigen (CEA) die Beteiligung an malignen Geschehen nachgewiesen (Makrilia et al. 2009).

2.3.3. CEACAM1 – Ein Mitglied der CEA-Familie

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) ist ein prominenter Vertreter der CEA-Familie. 1965 berichteten Gold und Freedman erstmals über das Auffinden hoher Konzentrationen eines Tumor-spezifischen Antigens in Kolonkarzinomgewebe und beschrieben damit CEA als erstes Mitglied der CEA-Familie.

Die Kodierung der CEACAM-Proteine erfolgt durch die CEA-Genfamilie dessen Lokalisation Zimmermann et al. (1988) auf dem langen Arm des Chromosoms 19 nachweisen konnten.

Mittlerweile wurden 22 Gene dieser Familie entdeckt, die wiederum in die Untergruppen der CEACAMs und der pregnancy-specific glycoproteins (PSG) unterteilt werden. Der Gruppe der CEACAMs gehören ein sekretiertes und elf Zelloberflächenproteine an (Sadarangani et al. 2011).

Die CEACAM-Moleküle bestehen jeweils aus einer N-terminalen Domäne (N domain), deren Sekundärstruktur homolog zu der der IgV-Domäne ist. Dieser schließt sich eine unterschiedliche Anzahl von IgC-ähnlichen Domänen an, die zwischen keiner und sechs IgC-Domänen schwankt. Dies sorgt, zusammen mit der posttranslationalen Modifikation, wie beispielsweise unterschiedlicher Glykosylierung, für den deutlichen Größenunterschied, der bei den Proteinprodukten gefunden wird (Thompson et al. 1991).

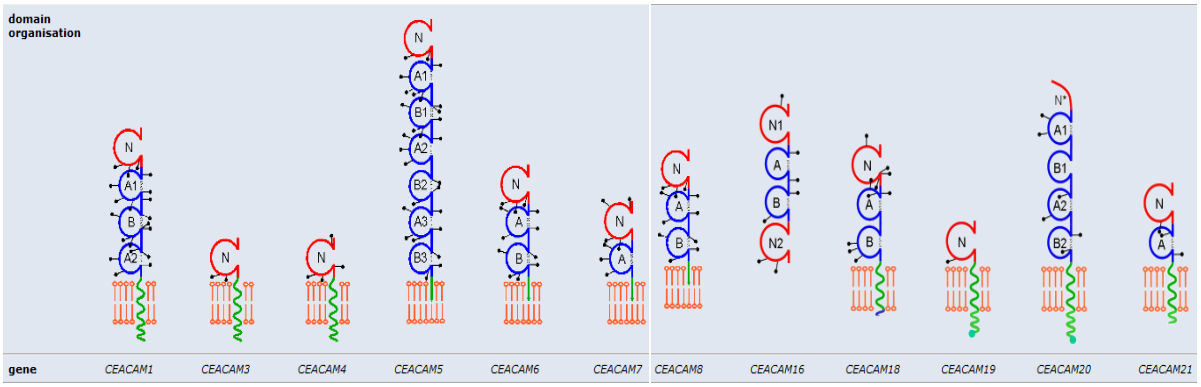


Abb. 3: Übersicht der Mitglieder der CEACAM-Familie

Aufbau der Mitglieder der humanen CEACAM-Familie. N = N-terminale IgV-like Domäne, A = IgC-like Domäne (Typ A), B = IgC-like Domäne (Typ B). = N-Glykosilierungsstelle.(Zimmermann 2011).

Die Moleküle der CEACAM-Familie unterstützen interzelluläre Bindungen durch teilweise homophile Verknüpfungen (CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6) und zum anderen durch heterophile (CEACAM1-CEACAM5, CEACAM1-CEACAM6, CEACAM5-CEACAM6, CEACAM6-CEACAM8). Interessanterweise scheint nach heutigem Wissensstand CEACAM3 eine besondere Stellung innerhalb der Familie einzunehmen, da die Fähigkeit Zell-Zell-Bindungen zu knüpfen zu fehlen scheint und seine einzig beschriebenen Bindungspartner die CEACAM-spezifischen bakteriellen Adhäsine sind (Sadarangani et al. 2011).

2.3.4. CEACAM1 - Vorkommen und Struktur

Im Laufe der Jahre durchlief CEACAM1 einer Reihe von Nomenklaturänderungen. Erstmals beschrieben wurde es in Hepatozyten der Ratte und wurde entsprechend seiner Eigenschaften cell-cell-adhesion molecule (C-CAM) genannt. Unabhängig davon wurde in der humanen Gallenflüssigkeit ein Glykoprotein entdeckt, dass der CEA-Familie angehörte und mit dem Namen biliary glycoprotein (BGP) versehen wurde. In humanen Granulozyten gehört das Protein zu den CD66 cluster of differentiation Proteinen, sodass es zusätzlich den Namen CD66a bekam. Letztendlich einigte man sich nun auf den Namen CEACAM1 (Wagener und Ergün 2000).

CEACAM1 zeigt die größte Verteilung in verschiedenen Geweben im Vergleich zu den anderen Familienmitgliedern und konnte nicht nur auf Epithelzellen, sondern auch auf verschiedenen Leukozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich kann die Expression in anderen Zellen wie Endothelzellen und T-Zellen induziert werden (Kuespert et al. 2006).

Bei CEACAM1 handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein, das, wie viele andere IgCAMs, in verschiedenen Spleiß-Varianten vorkommt. In voller Länge besteht CEACAM1 aus einer amino-terminalen, membrandistalen immunoglobulin variable-region-like (IgV-like) Domäne am N-Terminus des Proteins, gefolgt von bis zu drei membanproximalen immunoglobulin constant-regiontype-2-like (IgC2-like) Domänen. Dem schließen sich die transmembranöse Domäne und der zytoplasmatische Schwanz an. Die extrazellulären Domänen sind stark glykosyliert, sodass meist mehr als die Hälfte des Rezeptorgewichtes aus Kohlenhydrate besteht.

Im Menschen sind 11 verschiedene Spleißvarianten bekannt, die sich durch die Anzahl der extrazellulären Ig-like-Domänen, den Membrananker und den zytoplasmatischen Schwanz unterscheiden. Die am häufigsten human vorkommenden Isoformen sind CEACAM1-4L, CEACAM1-3L, CEACAM1-4S und CEACAM1-3S (Gray-Owen und Blumberg 2006).

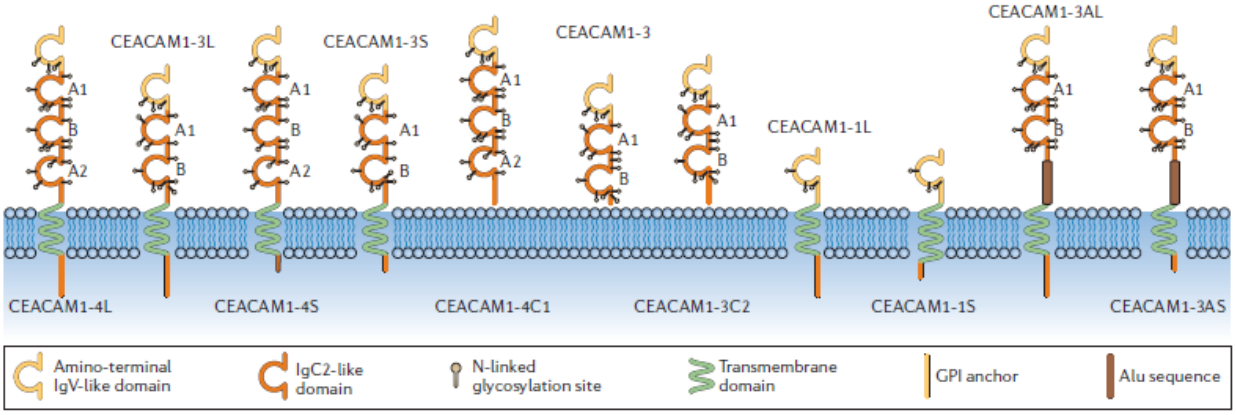


Abb. 4: Natürlich vorkommende Isoformen von CEACAM1

Das für CEACAM1 kodierende Gen beinhaltet 9 Exons, die durch alternatives Spleißen zu den 11 verschiedenen Isoformen führt. Die Buchstaben neben den extrazellulären Domänen geben die Unterform der IgC2-like-Domänen (A1, A2 und B) an. Die Zahl im Name des Rezeptors gibt Aufschluss über die Anzahl der IgC2-like-Domänen und der dahinter stehende Buchstabe steht für die Größe des zytoplasmatischen Schwanzes (L = long, S = short). C steht für einen unique termini und A für einen alu family repeat. GPI = Glycosylphosphatidylinositol. (Gray-Owen und Blumberg 2006).

Die lange zytoplasmatische Domäne (L-Domäne) besteht aus 71-73 Aminosäuren (AS), wohingegen die kurze (S-Domäne) nur 10-12 AS beinhaltet. Die L-Domäne enthält zwei phosphorylierbare Tyrosinenden, die bei der S-Domäne fehlen (Öbrink et al. 2008). Außerdem sind einige Serine und Threonine Ziel von Phosphorylierung, die somit ebenfalls an Signaltransduktion und Protein-Protein-Interaktion beteiligt sind (Kuespert et al. 2006). In den meisten CEACAM1-exprimierenden Zellen existieren beide zytoplasmatischen Domänen nebeneinander, das Verhältnis zwischen ihnen variiert jedoch und kann situativ verschoben sein, beispielsweise in Tumorgewebe (Turbide et al. 1997). Die Sequenzen um die zwei Tyrosinreste innerhalb der L-Domäne bilden ein immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM), das in verschiedenen Situationen wichtiger Ausgangspunkt inhibitorischer Signale von CEACAM1 ist (Chen et al. 2001).

CEACAM1 stellt also einen wichtigen Vertreter der Zelladhäsionsmoleküle dar, auf dessen physiologische und pathologische Eigenschaften im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.3.5. Rolle von CEACAM1 in der Angiogenese

CEACAM1 kann sowohl physiologischerweise in Mikrogefäßen regenerierender Gewebe wie der Plazenta, Endometrium und Granulationsgewebe nach Wundheilung gefunden werden als auch in pathologischen Prozessen wie verschiedenen Tumoren. Diese Erkenntnisse sowie das Auffinden von CEACAM1 in endothelialen Progenitorzellen weisen auf eine aktive Rolle des Proteins in der Angiogenese hin (Wagener und Ergün 2000). CEACAM1 kann im luminalen sowie im basalen Teil endothelialer Zellen von Mikrogefäßen nachgewiesen werden, in großen Blutgefäßen ist es jedoch nicht vorhanden (Ergün et al. 2000).

In Versuchen mit human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) konnte ein additiver Effekt von CEACAM1 und VEGF in Bezug auf Gefäßformierung nachgewiesen werden. CEACAM1

verstärkt signifikant die angiogenen Effekte von VEGF wie Proliferation, Migration und Gefäßformierung. Zusätzlich wird durch VEGF die Expression von CEACAM1 sowohl auf messenger (m)RNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert (Ergün et al. 2000). Andererseits ist aber auch CEACAM1 fähig die Expression von VEGF zu steigern (Kilic et al. 2005).

Membran gebundenes CEACAM1 in angiogenetisch aktiven Endothelzellen steigert nicht nur die Expression von VEGF, sondern auch weiterer angiogener Faktoren wie IL-8, Angiogenin, Ang1, Ang2 und Tie-2 (der Rezeptor für Ang1 und Ang2). Auf der anderen Seite führt eine Überexpression von CEACAM1 zur Herunterregulierung von Kollagen XVIII, der Muttersubstanz des Angiogeneseinhibitors Endostatin, erniedrigten Endostatin-Protein-Leveln und Herunterregulierung des Tyrosinkinase-Rezeptors Tie-1 (Kilic et al. 2005).

2.3.6. Rolle von CEACAM1 in der Tumorgenese

2004 veröffentlichten Oliveira-Ferrer et al. ihre Ergebnisse über CEACAM1 in Bezug auf Blasentumore. CEACAM1 scheint eine entscheidende Rolle, v.a. beim Übergang vom oberflächlichen nicht-invasiven und nicht-vaskularisierten zum invasiven und vaskularisierten Typ zu spielen. Eines der ersten Anzeichen des Switches scheint das Verschwinden von CEACAM1 im dysplastischen Urothel zu sein. Dies führt wiederum zur Hochregulierung von VEGF-C und VEGF-D, was wiederum einen Anstieg von CEACAM1 im Endothel zur Folge hat. Die Anwesenheit von CEACAM1 in normalem Epithel scheint also die Rolle eines Tumorsuppressors zu übernehmen, bei malignem Wachstum erfolgt jedoch eine Herunterregulierung, was demgegenüber durch das vermehrte Auftreten von CEACAM1 in Endothelien zu einer Aktivierung der Angiogenese führt (Oliveira-Ferrer et al. 2004). Dies gilt auch für andere Tumore. Beispielsweise wurde 2006 die Beteiligung von CEACAM1 beim angiogenen Switch im Prostatakarzinom und an erhöhter Vaskularisation nachgewiesen (Tilki et al. 2006).

CEACAM1 hat die Funktion eines Tumorsuppressors. Allerdings trifft dies nur unter bestimmten Bedingungen zu. Wie oben beschrieben, kommen CEACAM1-L und CEACAM1-S gleichzeitig in Geweben vor. Solange das Verhältnis zwischen den beiden Spleißvarianten dem von normalem Gewebe entspricht, bleibt die tumorsuppressive Wirkung bestehen. Eine Verschiebung des Verhältnisses führt jedoch mit einer höheren Inzidenz zur Formation von Tumoren (Turbide et al. 1997).

Die Tumor-inhibitorische Wirkung von CEACAM1 scheint abhängig von den cis-Determinanten der zytoplasmatischen L-Domäne zu sein. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Tumorwachstums. Die extrazelluläre N-Domäne auf der anderen Seite scheint keinen Einfluss auf tumoröse Eigenschaften von Zellen zu haben (Izzi et al. 1999).

Die Rolle von CEACAM1 in der Tumorgenese ist jedoch sehr komplex und oben genannte Funktionen und Mechanismen gelten nicht für jede Art von Tumoren. Herunterregulierung des

Proteins in Tumorzellen von kolorektalen, Leber-, Brust-, Prostata-, Harnblasen-, Hoden- und Nierenkarzinomen scheint zu einer Steigerung der Tumorzellproliferation zu führen (Öbrink 2008). Demgegenüber findet eine merkbare Expression von CEACAM1 in gesundem Schilddrüsengewebe und benignen Tumoren desselben nicht statt. In malignen Tumoren der Schilddrüse hingegen, insbesondere metastasierenden, konnte eine signifikante Erhöhung der Konzentration nachgewiesen werden (Liu et al. 2007). Ähnliches gilt für das maligne Melanom, wo ein Anstieg von CEACAM1 insbesondere die Tendenz zur Metastasierung beeinflusst (Thies et al. 2002), sowie Magen- und Lungenkarzinom (Kinugasa et al. 1998, Öbrink 2008).

2.3.7. Weitere Funktionen von CEACAM1

Zelladhäsion: Schon aus dem Namen des Proteins ist auf dessen Funktion als Adhäsionsmolekül zu schließen. Wie bereits erwähnt, bindet es homophil an andere CEACAM1-Proteine sowie heterophil an CEACAM5 und CEACAM6. Allerdings bildet es nicht generell starke interzelluläre Verbindungen, sondern wirkt als Sensormolekül an der Zelloberfläche und reguliert so die zelluläre Signaltransduktion (Öbrink 2008).

Vaskulogenese: 2009 wiesen Gu et al. die Beteiligung von CEACAM1 an der Formierung neuer Blutgefäße während des Prozesses der Ebryogenese *in vitro* nach. Interessanterweise scheint die Vaskulogenese in CEACAM1$^{-/-}$ Mäusen unbeeinträchtigt zu sein, sodass Gu et al. schlussfolgerten, dass *in vivo* die Aufgaben von CEACAM1 von anderen Proteinen übernommen werden können. Ein wahrscheinlicher Kandidat dafür scheint PECAM-1 zu sein.

CEACAM1 als Pathogen-Rezeptor: Im Menschen dient CEACAM1 als Ziel von verschiedenen gram-negativen Bakterien der nasopharyngealen, intestinalen und urogenitalen Mukosa. V.a. Neisseria gonorrhoeae, N. lactamica, N. meningitidis, N. subflava, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, und Escherichia coli benutzen Adhäsine wie opacity (Opa) Proteine um an Mitglieder der CEACAM-Familie zu binden. Durch die Bindung ermöglichen die Adhäsionsmoleküle den Bakterien die Internalisierung in die Zelle (Voges et al. 2010).

Regulation der Insulinkonzentration: 1985 wurde CEACAM1 unter dem Namen pp120 als Substrat der Insulin-Rezeptor assoziierten Tyrosinkinase in Hepatozyten der Ratte entdeckt (Rees-Jones und Taylor, 1985). Es dient wiederum nur die L-Form, nicht die S-Form der intrazellulären Domäne als Substrat der Kinase, die Tyr^{488} des intrazellulären Schwanzes phosphoryliert (Najjar et al. 1995). CEACAM1 erhöht durch extrazelluläre Bindung von Insulin dessen Rezeptor-induzierte Endozytose und Degradierung und spielt somit eine Rolle in der Insulin-Clearance des Blutes (Najjar 2002).

Metastasierung: Eine Beteiligung von CEACAM1 im Prozess des Metastasierung wiesen u.a. Tsukada et al. 2009 am Beispiel des Hepatoblastoms nach. So konnten sie zeigen, dass ein Verlust von CEACAM1 mit einer extrem erhöhten Rate von hämatogener pulmonaler Metastasierung einhergeht.

Zusammenfassend soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass CEACAM1 nicht einfach nur der Zelladhäsion dient, sondern seine Beteiligung in verschiedensten Prozessen wie Zellproliferation, Apoptose und Morphogenese, Invasion und Migration, Angiogenese, Lymphangiogenese, Insulinhaushalt, Rolle als Pathogenrezeptor und der Inhibierung des zytotoxischen Effektes von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Öbrink 2008).

2.4. Heparansulfatproteoglykane und Heparanase

2.4.1. Heparansulfatproteoglykane

Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) sind ubiquitär vorkommende Makromoleküle, die auf der Zelloberfläche, in der ECM und in Basalmembranen vieler verschiedener Zellen und Geweben von Vertebraten und Invertebraten vorkommen (Li und Vlodavsky 2009, Ilan et al. 2006).

Proteoglykane bestehen aus einer oder mehrerer Glycosaminoglykan (GAG)-Ketten, die kovalent an ein Protein gebunden sind. Die GAGs setzen sich aus Hexosaminen (D-Glukosaminen oder D-Galaktosaminen) und entweder Uronsäure oder Galaktose zusammen, die in unverzweigter, alternierender Folge angeordnet sind. Diese tragen an diversen Positionen Sulfatsubstituenten, im Falle der HSPGs Heparansulfat (Kjellen und Lindahl 1991).

In der ECM binden HSPGs an verschiedene Proteine (z.B. Laminin, Fibronektin, Collagen Typ IV) und tragen so bedeutsam zu Aufbau und Stabilität dieser und der zellulären Architektur bei. Zusätzlich sind sie von großer Bedeutung für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Neben den stabilisierenden Aufgaben dienen HSPGs als Speicher für eine große Anzahl an Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF), VEGF, keratin growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF) und transforming growth factor β (TGFβ), die spezifisch an die Heparansulfatglykosaminoglykan-Ketten binden. Durch die Bindung einer Vielzahl bioaktiver Moleküle an Zelloberfläche und ECM übernehmen die Heparansulfat-Ketten eine Funktion in der Kontrolle von physiologischen und pathologischen Prozessen wie Morphogenese, Gewebereparatur, Entzündung, Vaskularisation und Metastasierung. Desweiteren haben HSPGs die Funktion eines Ko-Rezeptors, indem das Proteoglykan zusammen mit anderen Oberflächenmolekülen einen funktionellen Rezeptorkomplex bildet (McKenzie 2007, Ilan et al. 2006).

2.4.2. Heparanase - molekulare und biochemische Eigenschaften

Heparanase ist eine Endoglycosidase die an der Zelloberfläche, in der ECM und der Basalmembran spezifisch Heparansulfat abbaut und so zu Degradierung und Umbau beiträgt.

Dong et al. lokalisierten 2000 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) das Heparanase-Gen auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 4 in Position 4q22. Dieses besteht aus 14 Exons und 13 Introns, die über 50 kb umfassen. Exprimiert wird das Gen in Form zweier mRNA-Varianten, die durch alternatives Spleißen entstehen: HPSE 1a (5kb) und HPSE 1b (1,7kb). HPSE 1a enthält alle 14 Exons wohingegen bei HPSE 1b Exon 1 und 14 fehlen (Dong et al. 2000).

Humane Heparanase cDNA besteht aus einem offenen Leseraster aus 1758 bp, die für ein Polypeptid, bestehend aus 543 Aminosäuren kodieren und ein molekulares Gewicht von 61,192 kDa haben (Vlodavsky et al. 1999).

Sind Transkription und Prozessierung im Zellkern abgeschlossen, gelangt die mRNA ins Zytoplasma und wird zur Synthese des Heparanase-Proteins durch Translation und co- und posttranslationale Modifikation genutzt. Zunächst wird ein 35 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid der Prä-Proheparanase beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum entfernt. Daraufhin finden Glykosylierungen an 6 N-Glykosylierungsorten statt und Pro-Heparanase wird als latentes ~65 kDa-Protein sezerniert (Ilan et al. 2006). Pro-Heparanase unterzieht sich einer proteolytischen Spaltung in ein 8 kDa-Polypeptid am N-Terminus, ein 50 kDa-Polypeptid am C-Terminus und ein 6 kDa-Verbindungspeptid, das sich zwischen ersteren beiden befindet. Voraussetzung für die enzymatische Aktivität der Heparanase ist die heterodimere Formation von 8- und 50 kDa-Einheit (Levy-Adam et al. 2003). Hulett et al. postulierten 2000, dass Heparanase eine triosephosphate isomerase (TIM)-barrel-Form annimmt, eine Sekundärstruktur bestehend aus acht α-Helices und acht parallelen β-Strängen ähnlich denen anderer Glykosylhydrolasen. In der 50 kDa-Untereinheit befinden sich sechs der α/β-Einheiten, die zwei anderen werden von der 6 kDa-Einheit beigesteuert. Das 6 kDa-Verbindungsstück inhibiert die Enzymaktivität durch Blockade, sodass die proteolytische Abspaltung desselben unabkömmlich für die Heparanase-Aktivierung ist (Nardella et al. 2004). Intrazelluläres Processing findet in späten Endosomen (Nadav et al. 2002) und in Lysosomen (Goldshmidt et al. 2002) statt. Maximale Processing-Aktivität konnte bei einem pH-Wert von 4-5 festgestellt werden, wohingegen bei pH 7 keine Aktivität mehr detektierbar ist (Cohen et al. 2005).

a)

b)

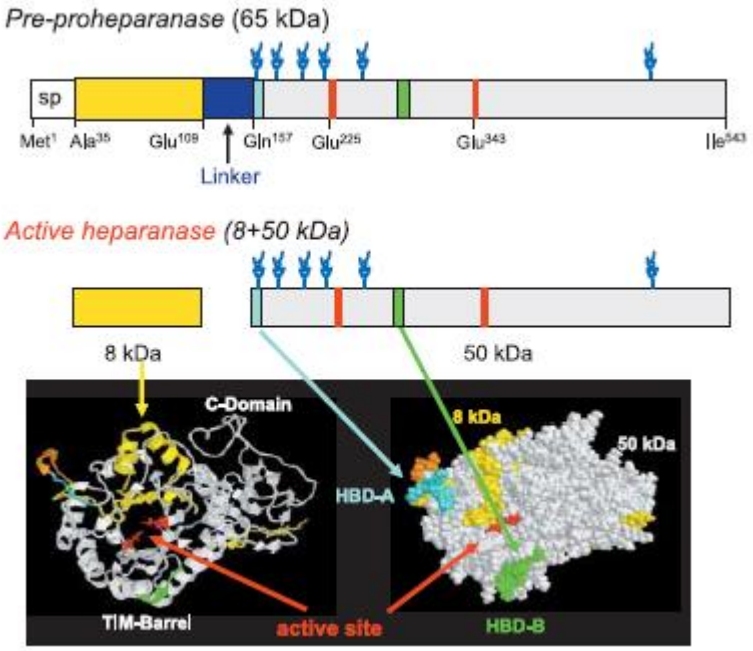


Abb. 5: Heparanase

(a) Processing und Aktivierung von Heparanase. Das Signalpeptid (sp) und das Linker-Segment werden während des Processings durch Proteasen abgespalten. **(b)** Modell des aktiven Heparanase-Heterodimers (50+8 kDa). HBD = Heparin / Heparansulfat-Bindedomäne. (Li und Vlodavsky 2009).

2.4.3. Lokalisation, Sekretion und Wiederaufnahme

Heparanase ist sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert. Innerhalb der Zelle erfüllt sie eine wichtige Housekeeping-Funktion in den späten Endosomen und Lysosomen, wo sie an der Prozessierung und dem Recycling von Heparansulfat von internalisierten HSPGs beteiligt ist. Neben genannten Zellorganellen konnte ihr Vorkommen auch im Nukleus, perinukleären Regionen und der Plasmamembran gezeigt werden. Intrazelluläre Heparanasevorräte können bei Bedarf mobilisiert und an die Zelloberfläche relokalisiert oder nach extrazellulär sekretiert werden (McKenzie 2007).

Die Tatsache, dass Heparanase nicht umgehend zugänglich für ihre extrazellulären Substrate ist, weist auf regulatorische Mechanismen hin, durch die intrazelluläre, lysosomale Heparanase als Antwort auf lokale oder systemische Reize sekretiert wird. Die Notwendigkeit eines geeigneten Stimulus wird auch durch Studien unterstützt die zeigen, dass eine Überexpression von Heparanase in Tumorzellen nicht zwangsweise mit einer vermehrten Sekretion verbunden ist, und dass das Enzym nur selten von normalen Zellen ausgeschleust wird. Ausnahmen bilden Thrombozyten und Mastzellen, in denen Heparanase in sekretorischen Granula akkumuliert und als Antwort auf Aktivierung freigesetzt wird (Ilan et al. 2006). Desweiteren findet Heparanase-Expression unter normalen Umständen in der Plazenta, Keratinozyten, Lymphozyten und Neutrophilen Granulozyten statt (Ilan et al. 2006).

Zusätzlich konnte das Vorhandensein von Heparanase auch in neuronalen Zellen und Gliazellen (insbesondere Astrozyten) nachgewiesen werden (Zhang et al. 2006).

Bei verschiedenen Zelltypen, beispielsweise Primären Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen, konnte gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit besitzen, extrazelluläre latente 65kDa-Heparanase wieder zu internalisieren (McKenzie 2007). Dies geschieht nachgewiesenerweise durch Bindung des Enzyms an HSPGs, low-density lipoprotein receptor-related protein, Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und möglicherweise andere receptor associated proteine-sensitive Rezeptoren. Jeder Rezeptor einzeln scheint für die Aufnahme von Heparanase entbehrlich zu sein. Allerdings gebrauchen verschiedene Zelltypen wahrscheinlich verschiedene Kombinationen der Rezeptoren, um ihre Heparanase-Aktivität zu regulieren (Vreys et al. 2005).

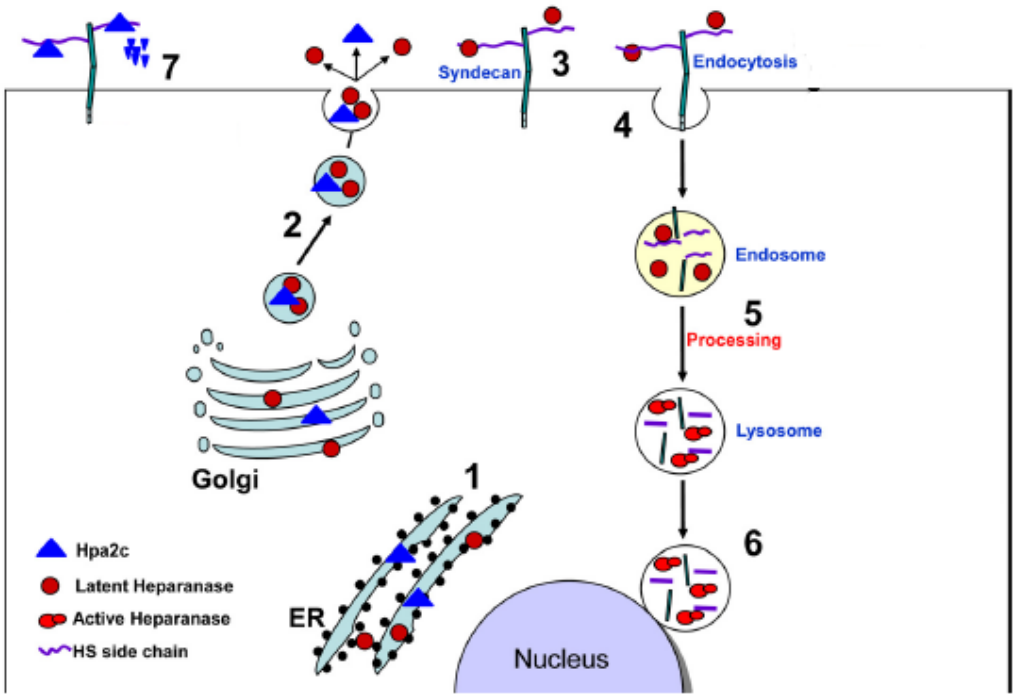


Abb. 6: Schematische Darstellung der Biosynthese von Heparanase und Hpa2

Zunächst werden Heparanase und Hpa2 aufgrund ihres Signalpeptides in das Lumen des ER aufgenommen **(1),** dann an den Golgi-Apparat geschickt und via abknospender Vesikel sezerniert **(2)**. Beide reagieren schnell mit Zellmembran-HSPGs, beispielsweise mit Mitgliedern der Syndekan-Familie **(3)**. Die Bindung von Heparanase ist von einer schnellen Endozytose des Heparanase-HSPG-Komplexes gefolgt **(4)**, das dann in endozytotischen Vesikeln wie Endosomen akkumuliert (5). Die Konversion von Endosomen zu Lysosomen resultiert in Heparanase Processing und Aktivierung **(5)**. Diese akkumuliert in perinukleären lysosomalen Vesikeln **(6)**. Im Gegensatz dazu verbleibt Hpa2 gebunden an Syndekanen an der Zelloberfläche ohne internalisiert zu werden **(7)**. Modifizierte Abbildung nach Levy-Adam et al. (Levy-Adam et al. 2010).

2.4.4. Regulation von Genexpression und Sekretion

Momentan ist nur ein Gen (HPSE) bekannt, das für ein Protein mit enzymatischer Heparanase-Aktivität kodiert (Vlodavsky 2008). Verschiedene Wege der Beeinflussung der Genregulation von Heparanase sind bisher erforscht.

Cytosin-Methylierung des Heparanase-Promoters spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Heparanase-Expression, indem es zur Inaktivierung des betroffenen Allels führt. So beschrieben Shteper et al. (2003) die cis-inhibitorische Wirkung der DNA-Methylierung. Ihren Experimenten ist zu entnehmen, dass Zelllinien, die positiv auf Heparanase-Expression getestet wurden, mindestens ein unmethyliertes Allel enthalten. Im Gegensatz dazu enthalten Zellen mit fehlender Heparanase-Aktivität, beispielsweise humane Chorionkarzinom (JAR)- und Ratten-Glioma (C-6)- Zellen nur voll methylierte Heparanase-Allele (Shteper et al. 2003).

Eine weitere wichtige Komponente der Genregulation bildet das Tumorsuppressorgen p53, ein Transkriptionsfaktor, der viele verschiedene zelluläre Promoter reguliert und eine der häufigsten genetischen Abänderungen in humanen Tumoren darstellt. Wildtyp p53 bindet an den Heparanase-Promoter und inhibiert so seine Aktivität. Demgegenüber sind mutante Varianten von p53 nicht in der Lage diesen inhibitorischen Effekt zu gewährleisten. Einige p53-Mutanten bedingen sogar eine Aktivierung der Heparanase-Promoter-Aktivität. Unter normalen Bedingungen wird also das Heparanase-Gen durch p53 reguliert, wohingegen mutante Inaktivierung desselben während der Tumorgenese die Heparanase-Expression induziert, was einen möglichen Erklärungsansatz für die stetig steigenden Heparanase-Level während der Tumorgenese bildet (Baraz et al. 2006).

Auch im Rahmen von Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ ist die Genexpression von Heparanase betroffen. Die Induktion der Heparanase-Transkription durch die Schlüsselmediatoren der Entzündungsreaktion TNF-α und INF-γ wurde in kultivierten Endothelzellen nachgewiesen (Edovitsky et al. 2006).

Östrogen ist ein weiterer Effektor der Genregulation. Elkin et al. (2003) demonstrierten die Ansprechbarkeit des Heparanase-Promoters auf Östrogen. Der Effekt der mRNA induzierten Heparanase-Transkription trat in Östrogen-Rezeptor-positiven, nicht jedoch in Östrogen-Rezeptor-negativen Mamma-Karzinom-Zelllinien auf.

Die Behandlung von Endothelzellen mit hohen Glukosemengen führt ebenfalls zu einer Hochregulierung der Heparanase-Expression, wohingegen Zellen, die sowohl hohen Dosen Glukose als auch Insulin bzw. hohen Dosen Glukose und Heparin ausgesetzt wurden, diesen Effekt nicht zeigten. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Hochregulierung von Heparanase durch Glukose durch Insulin und Heparin wiederum unterdrückt wird (Han et al. 2007).

Rao et al. zeigten 2010, dass Mutationen der Onkogene RAS und BRAF, wie sie in verschiedenen Tumoren vorkommen, verantwortlich für eine gesteigerte Heparanase-Expression sind. Mutante rat sarcoma (RAS)- bzw. rapidly growing fibrosarcoma B (BRAF)-Gene waren in der Lage, direkt den

Heparanse1-Promoter zu aktivieren und die Heparanase1-Gen-Expression zu induzieren. Ausschaltung der BRAF-Expression in einer BRAF-mutierten KAT-10-Tumor-Zelllinie führte zu einer Suppression der Heparanase1-Genexpression und gesteigerten Heparansulfat-Leveln an der Zelloberfläche. Nicht nur die Mutationen genannter Onkogene, sondern auch ihrer upstream Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGFR könnten in einer Vielzahl von verschiedenen Tumoren zu erhöhter Heparanase1-Expression führen (Rao et al. 2010).

Desweiteren wurde 2011 von Masola et al. gezeigt, dass als Reaktion auf hohe Albumin- und glykosyliertes Albumin-Spiegel die Heparanase-Expression über die AKT/phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalkaskade in adulten tubulären Zellen der Niere ansteigt.

Versuche unter hypoxischen Bedingungen, wie sie häufig in Tumorgewebe vorkommen, stellen dar, dass sowohl die Level von Heparanase mRNA, also auch Protein und Enzymaktivität unter diesen ansteigen. Dies wird zumindest teilweise vom nukleären Transkriptionsfaktor κB (NF-κB) kontrolliert (Wu et al. 2010).

Anhand von Mamma-Karzinomzellen konnte bewiesen werden, dass eine Überexpression von extrazellulärer Superoxid-Dismutase zu einer Reduktion der Heparanase-Promotoraktivität und somit verminderter Expression des Enzyms führt (Teoh et al. 2009).

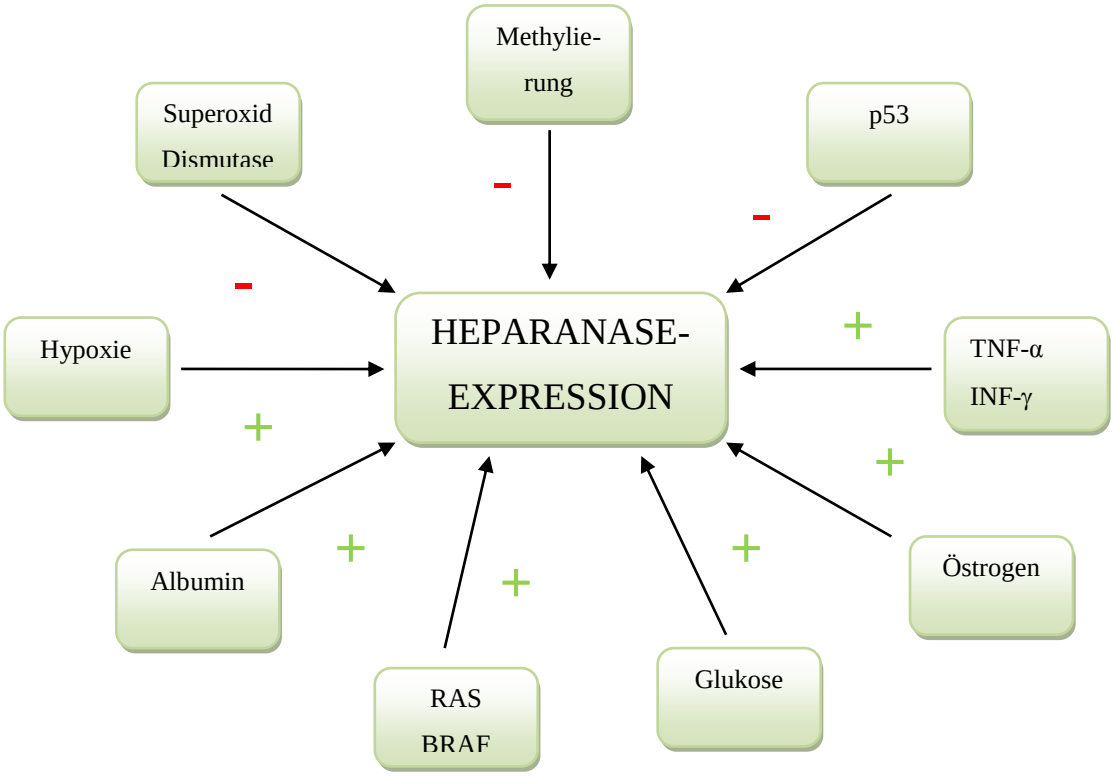


Abb. 7: Regulation der Heparanase-Expression

+ : Steigerung der Expression, - : Hemmung der Expression

2.4.5. Funktionen

Normale Gewebeentstehung und Gewebeumgestaltung: Bisher ist nur relativ wenig über die physiologische Mitwirkung von Heparanase in Bezug auf normale Zellen und Gewebe bekannt. Die Expression von Heparanase mRNA in normalen humanen Geweben ist primär auf die Plazenta, lymphoide Organe und Keratinozyten beschränkt. Hohe Level des Enzyms sind auch in Blutplättchen detektiert worden (Nasser 2008). Heparanase scheint eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Implantation zu spielen, wo dessen invasive Eigenschaften den Embryo bei dem Anschluss an das maternale Uterusepithel unterstützen (Dempsey 2000). Eine weitere physiologische Funktion von Heparanase besteht in der Unterstützung der Wundheilung. Das Enzym wird natürlicherweise in der Haut und in Granulationsgewebe von Wunden exprimiert. Eine Erhöhung der Heparanaseaktivität fördert den Wundverschluss durch Migration von Keratinozyten und gesteigerte Blutgefäßreifung und Wundangiogenese (Zcharia 2005). Desweiteren konnte eine Beteiligung von Heparanase beim Haarwachstum nachgewiesen werden (Zcharia 2005).

Angiogenese: Einerseits fördert Heparanase die Angiogenese in gutartigen Prozessen wie der Wundheilung, andererseits stellt sie jedoch einen bedeutenden Faktor dar, der die Angiogenese in Tumoren, sowohl benigner als auch maligner Art, mitbestimmt.
Durch die Spaltung von Heparansulfat in der ECM und an Zelloberflächen, insbesondere der Basalmembran, ebnet Heparanase direkt den Weg für neue Blutgefäße. Zusätzlich werden in der ECM gebundene Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF, VEGF) freigesetzt, die die Angiogenese zusätzlich unterstützen (Nasser 2008). Immunhistochemische Färbungen von Kolonkarzinomgewebe ließen eine hohe Expression von Heparanase im Endothelium sprießender Kapillaren und kleiner Gefäße erkennen, nicht hingegen in ausgereiften Blutgefäßen (Elkin et al 2001).
Neuere Studien zeigen, dass Heparanase zusätzlich indirekt zur Angiogenese beiträgt. Nichtenzymatische Effekte wie die Expression von angiogenen Mediatoren, beispielsweise tissue factor (TF) und VEGF, vermittelt durch p38 und Src Aktivierung, konnten nachgewiesen werden (Cohen-Kaplan et al. 2008).
Neben arterieller und venöser Angiogenese wird auch die Lymphangiogenese von der Heparanase-Expression beeinflusst. Eine positive Korrelation zwischen Lymphgefäßdichte und Heparanase-Expression konnte gezeigt werden. Zusätzlich scheinen Heparanase-exprimierende Tumorzellen Lymphgefäßendothelien zu penetrieren, sodass die Mobilisierung metastatischer Zellen zunimmt (Cohen-Kaplan et al. 2008).

Metastasierung und Tumorwachstum: Die Expression von Heparanase in Tumorzellen korreliert mit gesteigertem metastatischen Potenzial und Tumorwachstum. Die Spaltbildung in der Basalmembran durch Spaltung von Heparansulfat fördert die Extravasion von im Blut befindlichen Tumorzellen und somit die Metastasierung (Vlodavsky und Friedmann 2001).

Heparanase ist also sowohl für die Etablierung von vaskulären Netzwerken verantwortlich, die das Tumorwachstum erst ermöglichen (s.o.) als auch für die Ausbreitung tumoröser Zellen. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Heparanase-positiven Tumoren eine signifikant höhere Rate lokaler und ferner Metastasierung und ein geringeres postoperatives Überleben zeigen (Ilan et al. 2006).

Entzündung: Auch bei Entzündungsreaktionen ist die Degradierung der Basalmembran notwendig, um die Extravasion von Immunzellen und Plasmakomponenten zu erlauben. Schon in frühen Stadien der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp kann die Aktivierung der Heparanase-Transkription nachgewiesen werden. Die Schlüsselmediatoren der Entzündung INF-γ und TNF-α induzieren die Heparanase-Expression, die von lokalen Endothelzellen am Entzündungsherd ausgeschüttet wird (Edovitsky et al. 2006).

Neuritogenese: 2011 publizierten Cui et al., dass auch in der Neuritogenese von einer Beteiligung von Heparanase auszugehen ist. Diese fördert in ihrer nicht-enzymatischen 65kDa-Form das durch nerve growth factor (NGF) induzierte Nervenwachstum über den p38 MAPK pathway.

Weitere nicht-enzymatische Aktivitäten: Unabhängig von seiner Endoglykosidase-Aktivität ist Heparanase in der Lage Zelladhäsion in der ECM zu vermitteln, was wiederum zu Umbauten des Aktin-Zytoskelettes führt (Goldshmidt et al. 2003).
Latente 65-kDa Heparanase ist fähig auch ohne enzymatische Aktivität Endothelzellen zu aktivieren. Durch Phosphorylierung wird das Akt signaling gesteigert und desweiteren PI3K-abhängige endotheliale Zellmigration und -invasion gefördert (Gingis-Velitski et al. 2004).
Eine Steigerung der Genexpression von VEGF in Gegenwart von Heparanase konnte nachgewiesen werden, die durch die Aktivierung des Src pathway bedingt ist. Ebenfalls deutlich wurde eine Korrelation zwischen VEGF-Protein- und -mRNA Leveln und Phosphorylierung von p38, das als Teil einer Signalkaskade an der VEGF-Induktion beteiligt ist (Zetser et al. 2006).

2.4.6. Heparanase 2

2000 beschrieben McKenzie et al. erstmals die Klonierung einer complementary (c)DNA, die für ein vorher nicht gekanntes menschliches Protein kodiert, genannt Heparanase 2 (Hpa2). Alternatives Spleißen des Hpa2 Transkripts führt zu drei verschiedenen mRNAs, die für verschiedene Proteine mit 480, 534 und 592 Aminosäuren kodieren (Hpa2a, Hpa2b, Hpa2c). Bei allen drei handelt es sich um intrazelluläre, membrangebundene Enzyme (McKenzie et al. 2000).
Heparanase und Hpa2 teilen einige biochemische Eigenschaften. Wie bereits für Heparanase beschrieben, gelangt auch Hpa2 zum endoplasmatischen Retikulum (ER)/Golgi Apparat, wo es glykosyliert wird. Allerdings wird einzig Hpa2c sekretiert, was möglicherweise darauf zurückzuführen

ist, dass bestimmte Glykosylierungsstellen bei den Spleißvarianten Hpa2a und Hpa2b verloren gegangen sind (Arvatz et al. 2011).

Trotz der biochemischen Ähnlichkeiten weisen die beiden Proteine verschiedene Eigenschaften auf. Nach dem Ausschleusen aus der Zelle verbleibt Hpa2, im Gegensatz zu Heparanase, gebunden an Syndekane an der Zelloberfläche. Sie scheint nicht befähigt zu sein, wieder internalisiert zu werden, sodass sie in endozytotischen Vesikeln wie Endosomen und Lysosomen nicht nachgewiesen werden konnte. Anstelle dessen werden Hpa2-Level durch lokale Proteolyse reguliert, möglicherweise durch membranständige Proteasen wie Metalloproteinasen. So fehlt Hpa2 auch die Fähigkeit Heparansulfat zu spalten, durch die Heparanase sich auszeichnet (Levy-Adam et al. 2010).

Levy-Adam et al. wiesen in *in vitro* Versuchen nach, dass Hpa2c interessanterweise zur Inhibierung der enzymatischen Aktivität von sowohl rekombinanter als auch endogener Heparanase führt. Klinische Relevanz ergibt sich aus der in Färbungen gezeigten inversen Korrelation zwischen Heparanase2-Konzentration in Tumorgewebe und Metastasierung. Diese leitet sich aus der inhibitorischen Wirkung von Hpa2c auf Heparanase ab, die vermutlich auf ihrer hohen Affinität zu Heparin und Heparansulfat und ihrer Fähigkeit sich an Heparanase zu binden ab (Levy-Adam et al. 2010).

Im Vergleich zu Heparanase ist Hpa2 jedoch relativ unerforscht und weitere Ergebnisse über Verhalten und Funktion stehen noch aus.

2.5. Inhibitor of differentiation 3 (Id3)

Inhibitor of differentiation (Id3) ist ein Mitglied der „inhibitor of differentiation“-Proteinfamilie, einer Gruppe von Transkriptions-Regulatoren. Ihr Name bezieht sich auf ihre Fähigkeit, die Differenzierung von verschiedenen Zellen zu inhibieren, indem sie die DNA-Bindungsaktivität vieler Transkriptionsfaktoren, die die Expression zelltypspezifischer Gene regulieren, inhibieren. Bisher sind 4 Mitglieder dieser Familie bekannt: Id1, Id2, Id3 und Id4 (Lim und Wu 2005).

Den verschiedenen Id-Proteinen ist gemein, dass sie eine helix-loop-helix (HLH)-Domäne besitzen (Chen und Lim 1997). Im Gegensatz zu anderen HLH-Proteinen besitzen sie jedoch keine DNA-Bindungsstelle. Id-Proteine sind befähigt, mit anderen HLH-Proteinen nichtfunktionale heterodimere Komplexe zu bilden. Dadurch verhindern sie wiederum deren Bindung an DNA-Sequenzen, sodass sie einen negativen Regulator für andere HLH-Proteine darstellen (Benezra et al. 1990). Eine Bindung erfolgt v.a. an Klasse I basic helix-loop-helix (bHLH)-Proteine, auch als E-Proteine bekannt, was diese wiederum daran hindert, Homodimere oder Heterodimere mit Klasse II bHLH zu bilden. Dies führt zu einer Inhibierung von Genexpression (Lim und Wu, 2005). Auch andere Transkriptionsfaktoren können von allen oder einzelnen Id-Proteinen gebunden werden, darunter

beispielsweise paired-box (Pax)-5 (Roberts et al. 2001) und das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (pRb) (Iavarone et al. 1994).

In der embryonalen Entwicklung kann Id3 in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden, darunter Gehirn und Rückenmark aber auch Gliedmaßen und Zahnanlagen. Im Laufe der Entwicklung nimmt die Konzentration in den meisten Geweben jedoch kontinuierlich ab (Ellmeier und Weith 1995). Ähnlich verhalten sich auch Id1 und Id3, wohingegen Id4 eher auf neuronales Gewebe und weiter differenzierte Regionen anderer Gewebe beschränkt zu sein scheint (Jen et al. 1996). Auch in adulten Zellen ist die Id3-Expression weit verbreitet, jedoch nicht ubiquitär. Die Expressionslevel variieren stark zwischen den verschiedenen Geweben und sind *in vitro* teilweise erst nach Exposition an bestimmte Stimuli detektierbar. Zudem sind auch starke Schwankungen innerhalb eines Zelltyps je nach Wachstumsstand und physiologischem Status einer Zelle vorhanden (Lim und Wu 2005). Unter den Zellen, die Id3 exprimieren befinden sich neben organspezifischen Zellen auch solche wie Adipozyten, B- und T-Zellen und glatte Muskelzellen (Doran et al. 2010).

Durch Änderung der Id3-Konzentration in verschiedenen Geweben in bestimmten Situationen konnten Rückschlüsse auf einige seiner Funktionen gezogen werden.

Für vorliegende Arbeit von Interesse ist seine Mitbeteiligung an der Angiogenese. Sowohl in der embryonalen als auch in der Tumorangiogenese scheint Id3 involviert zu sein. So kann Id3 schon in der Embryogenese in Endothelzellen nachgewiesen werden (Jen et al. 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Id3-Knockout-Mäusen Blutgefäße nicht die Fähigkeit besitzen zu sprießen, sich zu verzweigen und Lumen normalen Kalibers während der Tumorprogression zu bilden. Dies scheint durch die auf dem Fehlen von Id3 basierende Dysregulation von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen zu sein (Benezra et al. 2001).

Das Mitwirken von Id3 ist jedoch auch in vielen anderen, sowohl physiologischen als auch pathologischen, Prozessen nachgewiesen, darunter beispielsweise die Neurogenese (Lyden et al. 1999). Zudem verhält sich Id3 in vielen Tumoren wie ein Onkogen (Lim und Wu, 2005). Auch eine Mitbeteiligung an Infektionen des Zentralen Nervensystems wird vermutet (Tzeng et al. 1999). Andererseits wiesen Doran et al. (2010) eine atheroprotektive Wirkung von Id3 nach.

In vielen Prozessen bleibt die genaue Beteiligung von Id3 jedoch weiterhin unklar und wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

2.6. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) ist ein fibrinolytisches Enzym, das wie auch tissue-type plasminogen activator (tPA) natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommt und Plasminogen in Plasmin umwandelt (McMahon und Kwaan 2008). Die Serinprotease ist auch unter dem Namen

Urokinase bekannt, da es erstmalig im Urin detektiert und seine Herkunft in den Nierenzellen nachgewiesen wurde (Bernik und Kwaan 1969). Das für uPA kodierende Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 10 und ist unter dem Namen PLAU bekannt (Rajput et al. 1985).

uPA wird zunächst als einkettiges Proenzym Pro-Urokinase freigesetzt und dann relativ rasch durch Plasmin oder Kallikrein in das aus zwei Ketten bestehende uPA umgewandelt (McMahon und Kwaan, 2007). uPA bindet an den uPA-Rezeptor (uPAR) was in einer Spaltung von Plasminogen zu Plasmin resultiert. Neben dem sich auf der Zelloberfläche befindlichen uPAR ist auch ein löslicher Rezeptor, soluble uPAR (suPAR), zu finden (Blasi und Carmeliet 2002). Zusätzlich zum aktiven uPA kann der uPAR auch pro-uPA und mit plasminogen activator inhibitors (PAI) komplexiertes uPA binden (Tapiovaaraet al. 1993).

Das durch Spaltung entstandene aktive Enzym Plasmin degradiert u.a. Fibrin und aktiviert MMPs, die dann wiederum die ECM degradieren. Dabei ist der tPA-generierte Weg primär für die Fibrin-Homöostase und der uPA-Weg primär für Phänomene wie Zellmigration und Gewebeumgestaltung zuständig (Collen 1999).

Der uPA-uPAR-Komplex ist ein multifunktionales System, das an vielen Prozessen wie Wundheilung, Angiogenese, Invasion, der Immunantwort, Vaskulärem Umbau, Metastasierung und malignen Tumoren beteiligt ist. Für all diese Prozesse ist die durch dieses System generierte Degradierung der ECM von Bedeutung. Zusätzlich ist aber auch eine Beteiligung an anderen Tumor-assoziierten Prozessen wie Adhäsion, Migration und Proliferation durch Interaktion mit Molekülen der Zelloberfläche (z.B. Integrine und Vitronectin) und durch Aktivierung von Signalkaskaden bekannt (Raghu et al. 2010).

Interessanterweise stellten Riemenschneider et al. durch Studien 2006 die Vermutung auf, dass bestimmte Polymorphismen des PLAU-Gens in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer gebracht werden können. Dies scheint auf die Fähigkeit von Plasmin zurückzuführen zu sein, β-Amyloid zu spalten. Bei Trägern des Risiko-Allels und verminderter Plasmin-Konzentration wurden höhere Plaqueanteile nachgewiesen (Riemenschneider et al. 2006).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Tabelle 1: Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Inkubator	C200	Labotect, Göttingen
Sterile Werkbank	LaminAir® HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Axio Scope. A1	Carl Zeiss, Jena
Kamera	AxioCam MRC	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzleuchte		Carl Zeiss, Jena
Wasserbad		Köttermann Labortechnik, Uetze
Gefrierschrank		Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg
Gefrierschrank	Liebherr Premium	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank		Bosch, Stuttgart
Kühlschrank	Liebherr Comfort	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlschrank	vario-cooler	Bosch, Stuttgart
Nucleofector	Nucleofector™	Lonza, Basel, Schweiz
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Spectrophotometer	NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Light Cycler	Light Cycler	Roche, Basel, Schweiz
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Schüttler	KM-2	Edmund Bühler, Hechingen
Schüttler	3015	GFL, Burgwedel
Stromquelle	POWER PAC 200	Biorad, Hercules, Californien, USA
Röntgenfilmentwickler	Curix 60	AGFA, Bonn
Scanner	GS-800 Calibrated Densitometer	Biorad, Hercules, Californien, USA
Elektrophorese-Kammer	Novex Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Blot-Kammer	MINI PROTEAN II™	Biorad, Hercules, Californien, USA
Röntgenfilmkassette		Rego, Augsburg
Waage	Pioneer™	OHAUS, Parsippany, NJ, USA
Cycler	FTS-320 Thermal Sequencer	Fröbel Labortechnik, Lindau

Magnetrührer	IKMAG®RH	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Thermostat	5320	Eppendorf, Hamburg
Pipettus		Eppendorf, Hamburg

3.1.2. Tabelle 2: Plastikware und Verbrauchsmaterial

Materialbezeichnung	Materialtyp	Hersteller
Kulturflasche 25 cm²	Tissue Culture Flask T25	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflasche 75 cm²	Tissue Culture Flask T75	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Pipette Tip	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Einfrier-Tubes	CryoPure Tube	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-Platten	Multiwell™	Falcon Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA
Tubes	Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Einmalhandschuhe	Peha-soft®satin	Hartmann, Heidenheim
Schaber	Cell Scraper	Sarstedt, Nümbrecht
Nucleofector-Cuvetten und –Pipetten	Amaxa® Basic Nucleofector® Kit	Lonza, Basel, Schweiz
Photometer-Cuvetten	UVette®	Eppendorf, Hamburg
FACS-Tubes	Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzetten	Cell Trics®	Partec GmbH, Münster

3.1.3. Tabelle 3: Glasware

Materialbezeichnung	Materialtyp	Hersteller
Glaspipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Advantage™ Serological pipet	Falcon Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA
Zähl-Kammer	Neubauer-Kammer	MSG, Wuppertal
Light Cycler Cuvetten	LightCyclerCapillaris (20µl)	Roche, Basel, Schweiz

3.1.4. Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien- / Reagenzbezeichnung	Handelsname	Hersteller
pcDNA3.1(-)/hygro		Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA3.1(-)/CC1		Oliveira-Ferrer et al., 2004
pcDNA3.1(-)/CC1-mutiert		AG Oliveira-Ferrer
control siRNA	Silencer® Select Negative Control #1 siRNA	Ambion, Austin, Texas, USA
siRNA/CC1	CEACAM Silencer® Select siRNA	Ambion, Austin, Texas, USA
GFP	pmax GFP®	Lonza, Basel, Schweiz

Nukleofektion-Lösung	Basic Nucleofector® Solution, Primary Endothelial Cells	Lonza, Basel, Schweiz
ß-Mercaptoethanol		Serva, Heidelberg
Ethanol		Walter CMP GmbH, Kiel
Random Primer		Invitrogen, Carlsbad, USA
GAPDH forward Primer	GAPDH-for	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
GAPDH reverse Primer	GAPDH-rev	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
CEACAM1 forward Primer	hCC1 1252-for	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
CEACAM1 reverse Primer	hCC1 11357-rev	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
Heparanase forward Primer	HPSE 583-FP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
Heparanase reverse Primer	HPSE 698-RP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
ID3 forward Primer	ID3-888-FP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
ID3 reverse Primer	ID3-1045-RP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
PLAU forward Primer	PLAU-1583-FP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
PLAU reverse Primer	PLAU-1738-RP	MWG Eurofins GmbH, Ebersberg
DEPC Wasser	DEPC-Treated Water	Ambion, Austin, Texas, USA
Proteas Inhibitor Cocktail (PI)		Roche, Basel, Schweiz
Natriumorthovanadat (SOV)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein Assay		Biorad, Hercules, Californien, USA
Heparanase-Antikörper	Monoclonal Anti-Human Heparanase 1 (HPA1) Antibody, Clone HP130	InSight, Rehovot, Israel
β-Aktin-Antikörper	β-Aktin (C4) (Quelle: Mouse)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
CEACAM-1-Antikörper	Anti-human CEACAM-1, #AF2244	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-goat	Anti-goat IgG (H+L) (Quelle: Rabbit)	Pierce Antibodies, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG-HRP (Quelle: Goat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-mouse	Anti-mouse IgG-HRP (Quelle: Goat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver	Blotting grade, pulv.	Carl Roth, Karlsruhe

Nitrocellulose Membran	Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman, Dassel
Filterpapier	Chromatography paper	Whatman, Dassel
Protein-Detektions-Lösung	Amersham ECL Plus Western blotting detection reagents	GE Healthcare, Fairfield, USA
Film	Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Fairfield, USA
Dithiothreitol	20x DTT	Fermentas, St. Leon-Rot
Lämmli-Puffer	5x Protein Loading Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Polyacrylamid-Gel	NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Running- Puffer	NuPAGE® MOPS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Marker	Page Ruler™ PLUS Prestained Protein	Fermentas, St. Leon-Rot
RIPA-Puffer	RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Albumin bovine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin EDTA		PAA, Pasching, Österreich
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)		GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween		Merck-Schuchardt, Darmstadt
Glycin		Carl Roth, Karlsruhe
Tris	TRIS-hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Sodium chloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.5. Tabelle 5: Kits

Name	Inhalt	Hersteller
DNAse Kit	RDD Puffer, RNAse freies Wasser, DNAse	Qiagen, Hilden
RNeasy mini Kit	Buffer RLT, Buffer RPE, Buffer RW1, RNAse freies Wasser, QIAshredder spin column, RNeasy mini column, Collection Tube	Qiagen, Hilden
Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads- Kit		GE Healthcare, Fairfield, USA
LightCyler®FastStart DNA		Roche, Basel, Schweiz

Maser PLUS SYBR Green I-Kit		
Lipofektion-Kit	Lipofectamine™ Reagent, PLUS-Reagent, OPTI-MEM®	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.1.6. Tabelle 6: Lösungen

Name	Inhalt
TBS-T	20 mM Tris, 0,137 M NaCl, pH 7,6; +1 ml Tween-20/l
Transfer-Puffer für Nitro-cellulosemembranen	100 nM Tris, 193 nM Glycin

3.1.7. Tabelle 7: Zellen

Name	Herkunft	Firma
RT4	Harnblasenkarzinomzellen	UKE, Abteilung Urologie, Hamburg
HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells)	Endothelzellen	PromoCell GmbH, Heidelberg
HDLEC (Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells)	Lymphendothelzellen	PromoCell GmbH, Heidelberg

3.1.8. Tabelle 8: Medien und Zusätze

Name	Firma
McCoy's 5A: #C73220	PromoCell GmbH, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium MV 2 inkl. Supplement Mix	PromoCell GmbH, Heidelberg
MCDB 131	GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA
Epidermal growth factor (EGF)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Hydrocortison (#H088)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FBS (fetal bovine serum)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich

Einfriermedium cryo-safe	c.c. pro GmbH, Neustadt
OPTIMEM	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen (HDMEC, HDLEC, RT4) erfolgte in einem Inkubator mit einem CO_2-Gehalt von 5 %, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C.

Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) sind aus menschlicher Haut isolierte Endothelzellen. Human dermal lymphatic endothelial cells (HDLEC) sind aus der menschlichen Dermis isolierte Lymphendothelzellen. Als Nährmedium für die beiden von PromoCell stammenden Zelllinien diente Endothelial Cell Growth Medium MV 2.

Bei der RT4-Zelllinie handelt es sich um menschliche Harnblasenkarzinomzellen. Das Kulturmedium der RT4-Zellen bestand aus McCoy-Medium mit einem Zusatz von 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin.

Die adhärenten Zellen wurden in 75 cm²- bzw. 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert und je nach Konfluenz alle drei bis fünf Tage passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Folgend wurden sie zur Ablösung mit 2 ml bzw. 1 ml Trypsin für 4 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin mit doppelter Menge Medium gestoppt, ein Teil der aus Trypsin, Nährmedium und Zellen bestehenden Lösung zurück in die Flasche gegeben und diese mit Medium auf 10 ml bzw. 5 ml aufgefüllt.

3.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärenten Zellen zunächst vom Kulturflaschenboden gelöst (s.o.), und als Suspension in ein Kulturröhrchen überführt. Aus diesem wurden 10 µl auf einen Objektträger mit Neubauer-Zählkammer gegeben. Vier Eckquadrate à 1,0 mm² (entspricht 0,1 µl Zellsuspension) wurden ausgezählt, daraus der Mittelwert gebildet und dieser entsprechend multipliziert, um die Zellzahl der gesamten Suspension zu erhalten.

3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese aus der Flasche gelöst, die Suspension in ein Kulturröhrchen gegeben und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zell-Medium-Suspension wurde daraufhin in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Aufgetaut wurden Zellen aus Kurzzeitlagerung bei -80°C und aus Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Zunächst wurden die Zellen im Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C verflüssigt und folgend in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. In diese wurden zusätzliche 5 ml 37°C warmes Kulturmedium gegeben. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.4. Transfektion von Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in Form eins Plasmids bzw. von small interfering RNA (siRNA) in die Wirtszelle erfolgte als transiente Transfektion mittels Lipofektion und Nukleofektion.
Um eine Überexpression des Proteins CEACAM1 zu erzielen wurden Zellen mit dem Vektor 3.1(-) / CC1 transfiziert. Als Negativkontrolle für spätere Untersuchungen erfolgte ebenfalls eine Transfektion mit dem leeren Vektor 3.1(-).
Die Herunterregulierung des Proteins CEACAM1 wurde durch das Einbringen von CEACAM1-spezifischer siRNA in die Zelle herbeigeführt. Als entsprechende Negativkontrolle wurden hierfür Zellen mit control siRNA transfiziert.
Zudem erfolgten Transfektionen mit doppelmutierter Y488, 515F cDNA, bei der zwei Tyrosinreste ersetzt und die in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro(-) kloniert worden war (Kilic et al., 2007).

Die Transfektion der RT4-Zellen erfolgte mittels Lipofektion. Für diese wurden in 6-Well-Kulturschalen je $2x10^5$ RT4-Zellen pro Well in 2 ml geeignetem vollständigen Wachstumsmedium ausplattiert. Diese wurden bis zu einer Konfluenz von ~70-80 % kultiviert.
Pro Well wurde ein Ansatz bestehend aus 1 µg DNA oder RNA, 6 µl PLUS-Reagent und 100 µl OPTI-MEM-Medium hergestellt und bei Raumtemperatur 15 min stehen gelassen. Daraufhin wurden pro Well je 4 µl Lipofectamine in 100 µl OPTI-MEM-Medium gelöst, die beiden Ansätze vereinigt, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit OPTI-MEM-Medium wurde in jedes Well ein Transfektionsansatz zuzüglich 800 µl OPTI-MEM-Medium gegeben.
Nach 3-4-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionslösung entfernt und durch 2 ml Wachstumsmedium ersetzt. Nach 48-72 h wurden die Zellen geerntet, pelletiert und bei -80°C eingefroren.
Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden mit Green fluorescence Proteine (GFP) transfizierte Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.
Die primären Zellen HDMEC und HDLEC sind schwer zu transfizieren. Hierfür wurde die Nukleofektionstechnik mit Hilfe des Amaxa-Nucleofector-Kits verwendet. Pro Ansatz wurden $1x10^6$ Zellen in 100 µl Nucleofector-Lösung gelöst und mit 2 µg entsprechender DNA oder RNA vermischt. Die Suspensionen wurden in speziellen Nucleofector-Küvetten im Nucleofector transfiziert und umgehend mit 500 µl Kulturmedium aufgefüllt. Hierfür wurde das Transfektionsprogramm S005

genutzt. Daraufhin wurden die Suspensionen in 25 cm²-Kulturflaschen überführt und zusätzlich je 5 ml Kulturmedium hinzugegeben. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches ersetzt und 72 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, pelletiert und bei -80°C eingefroren. Auch hier erfolgte die Erfolgskontrolle über eine Transfektion mit GFP. Die Transfektionsbedingungen wurden in dieser Arbeitsgruppe bereits optimiert und erzielten bei o.g. Protokoll eine durchflusszytrometisch gemessene Transfektionseffizienz von 60% (Kilic et al. 2007).

3.2.5. Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von RNA aus Zellpellets erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Zellpellets mit einer Anzahl von etwa $2x10^5$ - $1x10^6$ Zellen wurden in RLT-Puffer plus β-Mercaptoethanol aus oben genanntem Kit resuspendiert und in QIAshredder spin columns für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die Probe zu homogenisieren. Das daraus resultierende Lysat wurde weiter nach Angaben des Herstellers, unter Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien und Puffer, aufgearbeitet. Während der RNA-Isolation wurde zusätzlich ein Verdau mit DNAse durchgeführt, um DNA-Reste zu entfernen.
Die im letzten Schritt aus der silica-gel membrane des RNeasy mini column ausgewaschene RNA war nun in RNAse-freiem Wasser gelöst und eine Konzentrationsbestimmung mittels des Spectrophotometers NanoDrop konnte erfolgen.

3.2.6. cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus der zuvor gewonnenen RNA erfolgte mit Hilfe des Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads-Kits der Firma GE Healthcare. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Enzyms Reverse Transkriptase die zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren.
Pro Reaktionsansatz wurden 2 bzw. 3 µg RNA mit RNAse-freiem Wasser auf ein Volumen von 30 µl gebracht und für 10 min bei 65°C inkubiert, um die Denaturierung der RNA zu erzielen. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurde die RNA-Lösung in ein First-Strand Bead Tube gefüllt, in dem die für die cDNA-Synthese benötigten Reagenzien bereits enthalten waren. Hinzugefügt wurden 3 µl Random Primer (0,06 µg/µl), ein als Matrize dienendes Random Hexamer(-Oligonukleotid). Die Lösung wurde nach 1min bei Raumtemperatur vorsichtig gemischt und folgend für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.2.7. Quantitative RT- PCR

Die Quantifizierung der gewonnenen cDNA erfolgte mit Hilfe des LightCycler®-Systems der Firma Roche unter Verwendung des LightCycler®FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kits.
Der Ansatz für eine Reaktion (20 µl/Kapillare) enthielt:

Primer forward	2 µl
Primer reverse	2 µl
Master Mix	2 µl
DEPC-Wasser	10 µl
cDNA (1:3 verdünnt)	4 µl

Folgende Primer wurden verwendet:

GAPDH	forward	5‘-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3’
	reverse	5‘-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-3‘
hCC1	forward	5‘-TAA GAA CCA AAG CGA CCC C-3‘
	reverse	5‘-CAC TAC TCC AAT CAC AAT GCC-3’
Heparanase	forward	5‘-GCT ACT CCG AGA ACA CTA CC-3‘
	reverse	5‘-GCC AAA GAT CAA GTC CAG TCC -3‘
ID3	forward	5‘-TGA CTT CAC CAA ATC CCT TCC-3‘
	reverse	5‘-CGC TCT GAA GAG ACC TTA GAAC-3‘
PLAU	forward	5‘-CGA ACG ACA ATA GCT TTA CCC-3‘
	reverse	5‘-GCC CTG CCC TTT TTA ACT CC-3‘

Der Master Mix enthielt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der ungebunden nur eine geringfügige Fluoreszenz erzeugt, in gebundener Form jedoch starke Signale sendet. Da die Bindung nur an doppelsträngige DNA erfolgen kann, findet diese in der Annealing- und der Elongationsphase des PCR-Zyklus statt. Die am Ende jeder Elongationsphase gemessene Fluoreszenz gibt folglich Auskunft über die DNA-Menge, die proportional ansteigt.

Nach Aktivierung der FastStard DNA-Polymerase bei 95°C erfolgten jeweils 40 Amplifikationszyklen, die sich folgendermaßen gestalteten:

GAPDH	Denaturierung	95°C	15 sec
	Annealing	61°C	10 sec
	Elongation	72°C	26 sec

CEACAM1, Heparanase, ID3, PLAU	Denaturierung	95°C	15 sec
	Annealing	59°C	10 sec
	Elongation	72°C	26 sec

Nach Ende des Laufes erfolgte die Ermittlung der Cross-points und nach dem letzten Elongationsschritt eine Schmelzkurvenanalyse, um anhand des Schmelzpunktes zu überprüfen, ob nur gewünschte Schmelzprodukte vorhanden waren.
Die Auswertung erfolgte immer in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH.
Die relative Quantifizierung der Real-time PCR-Läufe erfolge basierend auf einer von Pfaffl 2001 veröffentlichten mathematischen Delta-Delta-Ct-Methode:

$$\textbf{fold change} = \frac{E_{Zielgen} \wedge \text{Delta CP}_{Zielgen}(\text{Kontrolle – behandelte Probe})}{E_{Referenzgen} \wedge \text{Delta CP}_{Referenzgen}(\text{Kontrolle – behandelte Probe})}$$

Die Effizienz (E) der jeweiligen PCRs wurde mit Hilfe einer Standartkurve von der LightCycler Software berechnet. Die korrespondierende Real-time PCR Effizienz eines Zyklus in der exponentiellen Phase wird durch die Formel $E = 10^{(-1/slope)}$ definiert.
Bei der zur Effizienzbestimmung verwendeten Standartkurve handelt es sich um eine Kurve, die aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter Menge erstellt wird. Die zur Standartkurvenberechnung erstellten Ansätze enthielten CEACAM1 in bekannter Konzentration in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:10.000.
$E_{Zielgen}$ ist dabei die Real-time PCR efficiency von dem Zielgentranskript, $E_{Referenzgen}$ entspricht der Real-time PCR efficiency von dem Referenzgentranskript.
CP steht für die Crossing Points der Transkripte. Es ist definiert als der Punkt, an dem die Fluoreszenz merkbar über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Zu ermitteln sind diese mit der „Fit-point-Methode“ der LightCycler Software.
Delta $CP_{Zielgen}$ ist die CP-Differenz von Kontrolle und behandelter Probe des Zielgentranskripts. Dementsprechend ist Delta $CP_{Referenzgen}$ die CP-Differenz von Kontrolle und behandelter Probe des Referenzgentranskripts (Pfaffl, 2001).

3.2.8. Lyse von Zellen

Zur Freisetzung der Proteine erfolgte eine Lyse der Zellen mit Hilfe von RIPA-Puffer. Die nach der Transfektion gewonnenen Zellpellets wurden in je 90 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Dieser bestand aus: 1ml RIPA-Grundlösung, 10 µl Natriumorthovanadat (SOV) und 20 µl Protease Inhibitor Cocktail (PI). Nach gründlichem Vortexen wurde die Lösung 30 min auf Eis inkubiert und folgend für 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Das Pellet, bestehend aus Zelltrümmern, wurde verworfen.

3.2.9. Bestimmung der Proteinmenge

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge wurde der Bio-Rad Protein Assay, basierend auf der Methode nach Bradford, verwendet. Zur Erstellung einer Standartkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit destilliertem Wasser auf Konzentrationen zwischen 25 µg/ml und 1500 µg/ml verdünnt. Es wurden nun je 50 µl der Standards bzw. 5 µl Proteinlysat + 45 µl Wasser zusammengegeben. Zusätzlich wurde in jedes Tube 2,5 ml des 1:5 verdünnten Protein Assays gegeben. Der je nach Proteingehalt unterschiedliche Farbton der Lösung konnte photometrisch bestimmt und anhand der Standartkurve eingeordnet werden, um so die Proteinkonzentration des Lysates zu bestimmen. Die photometrische Bestimmung erfolgte durch ein BioPhotometer der Firma Eppendorf.

3.2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines SDS-Systems und anschließender vertikaler Elektrophorese durchgeführt.
Zu den Proteinproben wurden Protein Loading Buffer (5xLP) und Dithiothreitol (DTT) der Firma Fermentas gegeben, um folgend bei 95°C für 10 min eine Denaturierung der Proteine zu erzielen. Der SDS-enthaltende Loading Buffer bindet an hydrophobe Regionen der Proteine und erzielt deren Entfaltung. Das DTT spaltet Disulfidbrücken auf und zerstört noch verbleibende Sekundärstrukturen.
Pipettiert wurde nach folgendem Schema:

Komponente	Volumen
Proteinprobe + RIPA-Puffer	18,75 µl
5xLP	5 µl
20xDTT	1,25 µl

Tabelle 9: Pipettierschema

Nachfolgend wurden je 20 µl der denaturierten Proben in die Geltaschen eines Bis-Tris Mini Gels (8x8 cm, Invitrogen) geladen, das in einer Novex Mini-Cell Elektrophorese-Kammer der Firma Invitrogen eingespannt und von MOPS SDS Running Buffer umgeben war. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1h bei einer konstanten Spannung von 150 V.
Zur Größenbestimmung der Proteine wurde als Referenz stets ein Marker (Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder) mitlaufen gelassen, anhand dessen die später sichtbaren Proteinbanden einem Molekulargewicht zugeordnet werden konnten.

3.2.11. Western Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektroblottings auf eine Nitrocellulose Transfer Membran übertragen. Verwendet wurde die Methode des Tank-Blot-Systems mit Hilfe der Blot-Kammer MINI PROTEAN II™ der Firma BioRad. Hierfür wurde das Gel aus der Gelkammer entnommen und auf ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Auf das Gel wurde eine ebenfalls durch Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulose Transfer Membran platziert und eventuell eingeschlossene Luftblasen mit Hilfe eines Plastikrollers entfernt. Es folgte ein weiteres feuchtes Filterpapier. Das Ganze wurde in eine Blot-Apparatur eingesetzt, von Transferpuffer umgeben und unter Kühlung durch einen Eisblock auf einem Magnetrührer platziert. Die Proteine wurden durch Anlegen einer elektrischen Stromstärke von 350 mA für 1 h auf die Nitrocellulose Transfer Membran geblottet.

Anschließend wurde das Sandwich geöffnet, die Membran entnommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 %iger Milchpulverlösung (5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

Es folgten vier Waschschritte mit einer Gesamtzeit von 60 min in TBS-T, bevor der primäre Antikörper auf die Membran gegeben wurde. Dieser war in TBS-T verdünnt. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken über Nacht bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zunächst 3 x 10 min in TBS-T gewaschen und folgend für 1 h bei Raumtemperatur im sekundären Antikörper inkubiert, der in 10 ml Milchpulverlösung verdünnt war.

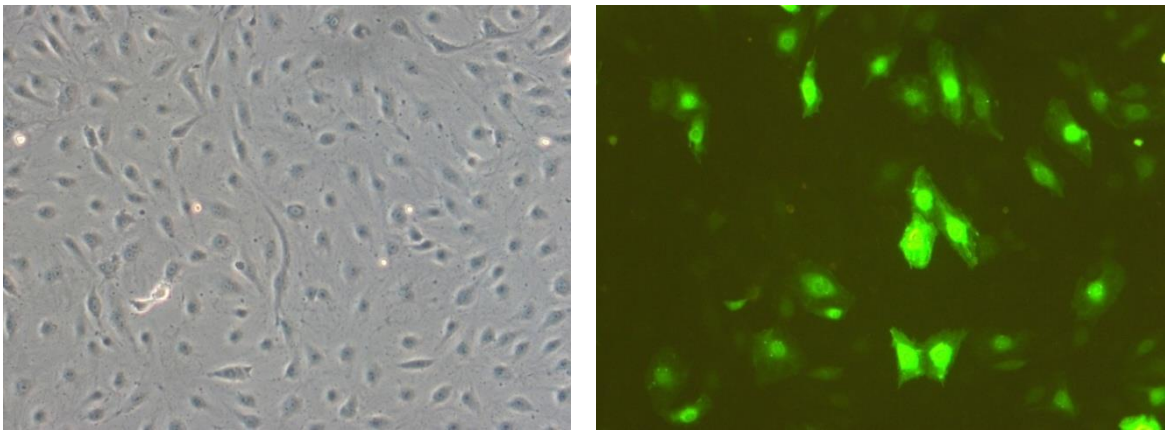
Nach erneutem Waschen (2 x 10 min und 2 x 20 min) in TBS-T wurden Enhanced Chemiluminescence(ECL)-Nachweisreagenzien der Firma Amersham, GE Healthcare auf die Membran gegeben. Die Inkubationszeit war, abhängig von dem verwendeten Antikörper, 2-5 min. Die Belichtung erfolgte in einer Kassette auf Amersham Hyperfilm™ ECL in einer Dunkelkammer durch den Röntgenfilmentwickler Curix 60 der Firma AGFA.

Zur quantitativen Auswertung der sichtbar gewordenen Banden wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit Hilfe des Programms Quantity One® (BioRad) Pixeldichtemessungen durchgeführt. Um eventuell aufgetretene Ungenauigkeiten durch den Pipettiervorgang auszugleichen, erfolgten die Auswertungen jeweils in Bezug auf das Housekeeping-Protein β-Aktin.

4. ERGEBNISSE

4.1. CEACAM1-induzierte mRNA-Expression von Heparanase, PLAU und Id3 in primären Endothelzellen

In Vorarbeiten wurde der Effekt von CEACAM1-Anwesenheit bzw. -Abwesenheit auf die Genexpression relevanter Angiogenesefaktoren in Endothelzellen untersucht. Dabei konnte in HDMEC, die mit dem CEACAM1-Expressionsvektor transfiziert wurden, eine gesteigerte Expression von diversen metastasierungsrelevanten Genen beobachtet werden. Mit CEACAM1-siRNA transfizierte Zellen zeigten hingegen eine verminderte Expression einiger dieser Gene.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von CEACAM1 auf die Regulation von Heparanase, PLAU und Id3 in primären Endothelzellen untersucht. Hierfür wurden HDMEC nach oben beschriebenem Muster mittels Nukleofektion mit einem Expressionsvektor, der CEACAM1-cDNA enthielt und mit einer für CEACAM1 spezifischen siRNA, transient transfiziert. Der Erfolg der Transfektion zeigte sich mittels Fluoreszenzmikroskopie an mit GFP transfizierten Zellen (Abb. 8).



a) b)

Abb. 8: Durch Nukleofektion transfizierte HDMEC

Die Aufnahmen erfolgten am Tag nach der Nukleofektion. In Abbildung **a)** zeigen sich die transfizierten und über einen Tag kultivierten HDMEC. In Abbildung **b)** werden lediglich die mit GFP transfizierten Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Zum quantitativen Erfolg der Transfektionen wurde die Genexpression von CEACAM1 an CEACAM1-überexprimierenden und CEACAM1-gesilencten Zellen, jeweils in Bezug auf die entsprechenden Negativkontrollen, mittels Real-time PCR gezeigt.

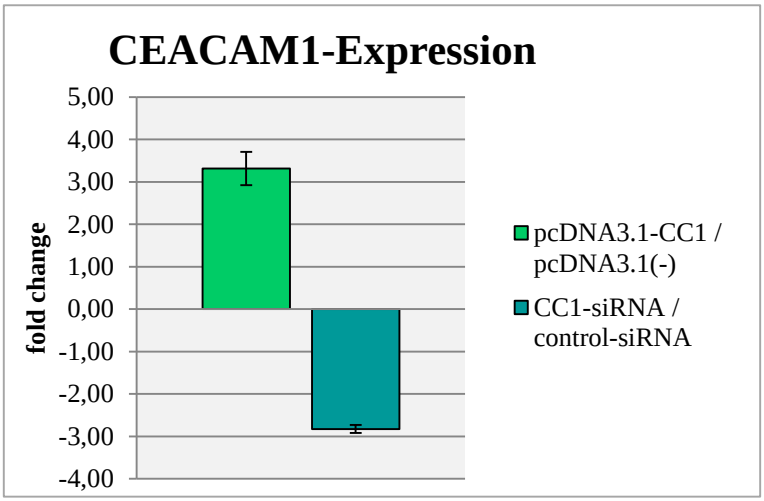


Abb. 9: CEACAM1-Überexpression und CEACAM1-Silencing in HDMEC
HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 72h wurde die CEACAM1-Expression analysiert.
In den mit dem CEACAM1-Expressionsvektor transfizierten Zellen ist ein Anstieg der Expression von CEACAM1 auf mRNA-Ebene zu sehen. CEACAM1 gesilencte Zellen zeigen demgegenüber eine verminderte Expression.

Durch Einbringen des CEACAM1-Expressionsvektors in HDMEC konnte eine Steigerung der CEACAM1-Expression auf mehr als das 3-fache in Bezug auf Zellen mit eingebrachtem leeren Vektor durch quantitative RNA-Analysen gezeigt werden (Abb. 9). Eine Herunterregulierung der CEACAM1-mRNA bei CEACAM1-gesilencten Zellen mittels eingebrachter CEACAM1-siRNA in Bezug auf Zellen mit control-siRNA ergab eine Verminderung der Expression um knapp das 3-fache (Abb. 9).

Um den Effekt des veränderten CEACAM1-RNA-Levels auf oben genannte Faktoren (Heparanase, PLAU und Id3) zu testen, wurden auch deren mRNA-Expressionsmuster quantitativ bestimmt.

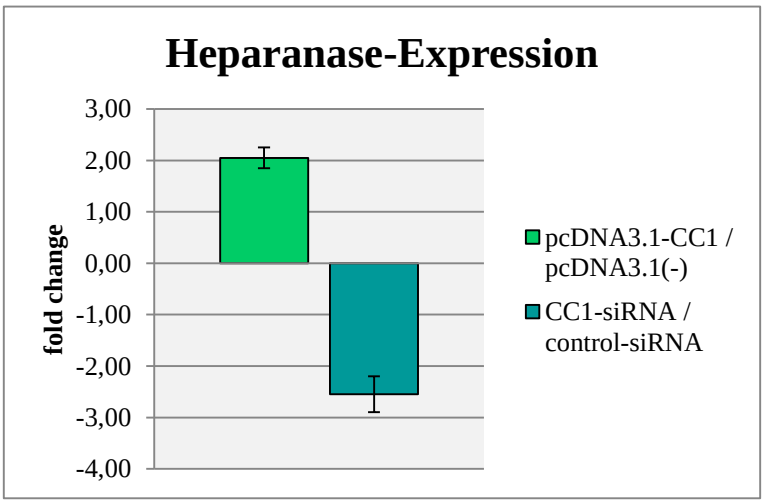


Abb. 10: Expression von Heparanase in transfizierten HDMEC
HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 72h wurde die Heparanase-Expression analysiert.
In den Zellen, die mit CEACAM1-pcDNA transfiziert wurden, zeigt sich eine Erhöhung der Heparanase Expression. In mit CEACAM1-siRNA transfizierten Zellen verringert sich die Heparanase-mRNA-Expression.

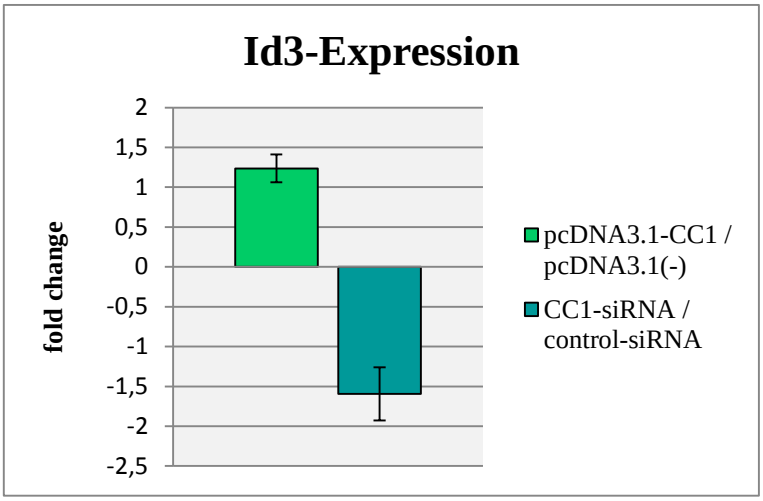


Abb. 11: Expression von Id3 in transfizierten HDMEC
HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 72h wurde die Id3-Expression analysiert.
In Zellen, die mit CEACAM1-pcDNA transfiziert wurden ist eine minimale Erhöhung der Id3-Expression ersichtlich. Eine geringe Erniedrigung der Id3-Expression ist bei Zellen, die mit CEACAM1-siRNA transfiziert wurden, zu sehen.

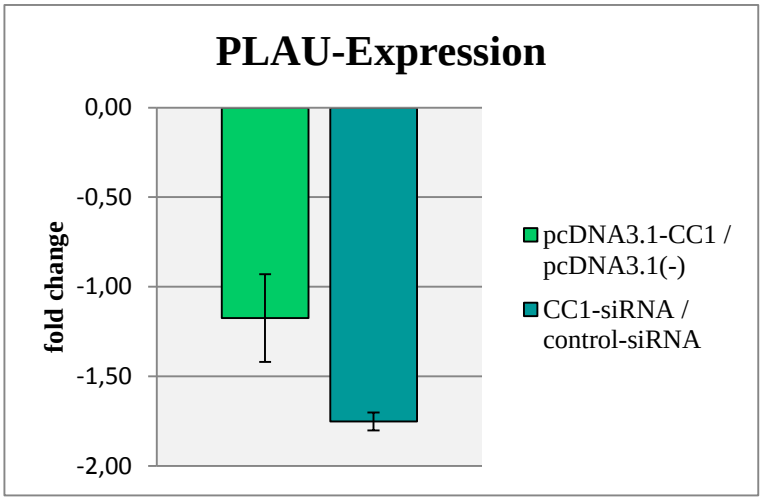


Abb. 12: Expression von PLAU in transfizierten HDMEC
HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 72h wurde die PLAU-Expression analysiert.
Die PLAU-Expression in mit CEACAM1-pcDNA transfizierten Zellen ist kaum verändert. Bei Zellen, die mit CEACAM1-siRNA transfiziert wurden, liegt eine Verringerung der PLAU-Expression vor.

Die ektopische Expression von CEACAM1 in HDMEC mittels Nukleofektion führte zu einer starken Erhöhung des Heparanase-mRNA-Levels. Mittels qRT-PCR konnte eine verzweifachte Expression von Heparanase in CEACAM1 überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen ermittelt werden (Abb. 10). Das Expressionsmuster bei den mit CEACAM-siRNA behandelten Zellen zeigte ebenfalls eine tendenzielle Korrelation des mRNA-Levels von CEACAM1 und Heparanase. War die CEACAM1-Expression um das etwa 3-fache gesunken, so zeigte sich auch ein reduziertes Heparanase-mRNA-Level um ca. -2,5 (Abb. 10).

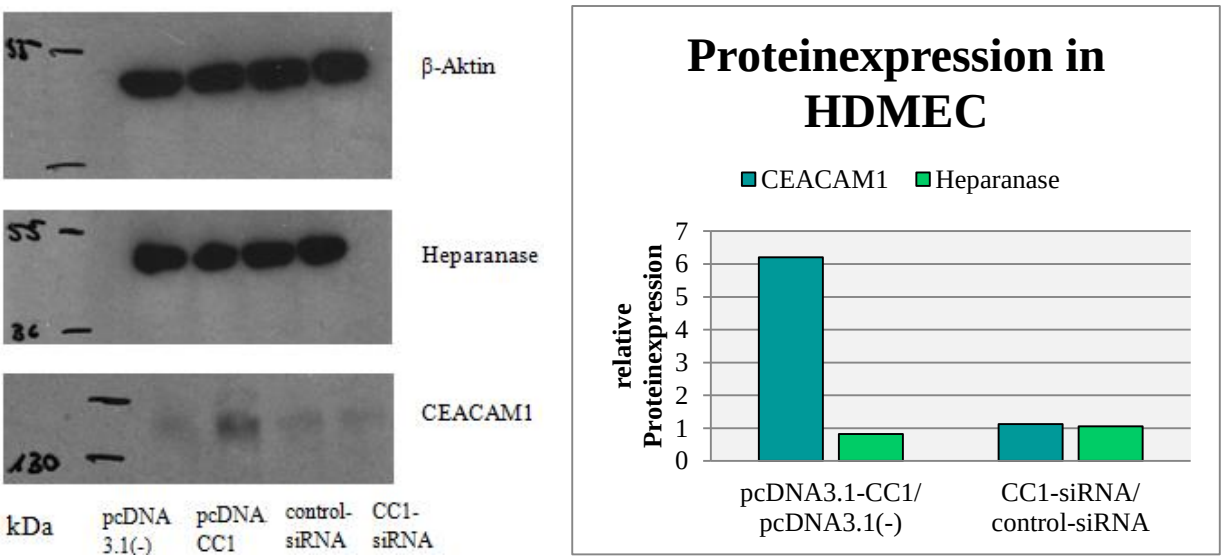
Die Id3-Expression zeigt sich bei CEACAM1-Überexpression minimal beeinflusst. Es konnte eine Erhöhung des Id3-RNA-Levels um den Faktor 1,2 gezeigt werden (Abb. 11). Dagegen bewirkte das zelluläre Ausschalten von CEACAM1 mittels siRNA eine Herunterregulierung von Id3-mRNA um das 1,6-fache (Abb. 11).

Ein ähnliches Muster wie bei Id3 zeigte sich auch bei der Expression von PLAU nach CEACAM1-Überexpression bzw. CEACAM1-Silencing in den Endothelzellen. Die PLAU-Expression wurde durch CEACAM1-Überexpression nicht signifikant beeinflusst (Abb. 12). Es zeigte sich jedoch eine

deutliche Absenkung des PLAU-mRNA-Levels in den mit CEACAM1-siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den control-siRNA- Zellen. Diese lag bei einer Ratio von etwa -1,7 (Abb. 12).

4.2. CEACAM1-induzierte Proteinexpression von Heparanase in primären Endothelzellen

Um den Einfluss von CEACAM1 auf die Expression von Heparanase in Endothelzellen weiter zu untersuchen, wurden folgend die Proteinlevel beider Faktoren bestimmt. Jeweils mit leerem Vektor (pcDNA 3.1(-)), CEACAM1-Expressionsvektor (pcDNA3.1(-)/CC1), control-siRNA und CEACAM1-siRNA (CC1-siRNA) transfizierte HDMEC wurden wie oben in Material und Methoden beschrieben lysiert und die Proteinexpression von CEACAM1 und Heparanase bezogen auf das Housekeeping-Protein β-Aktin mittels Western Blot näher untersucht.



a) b)

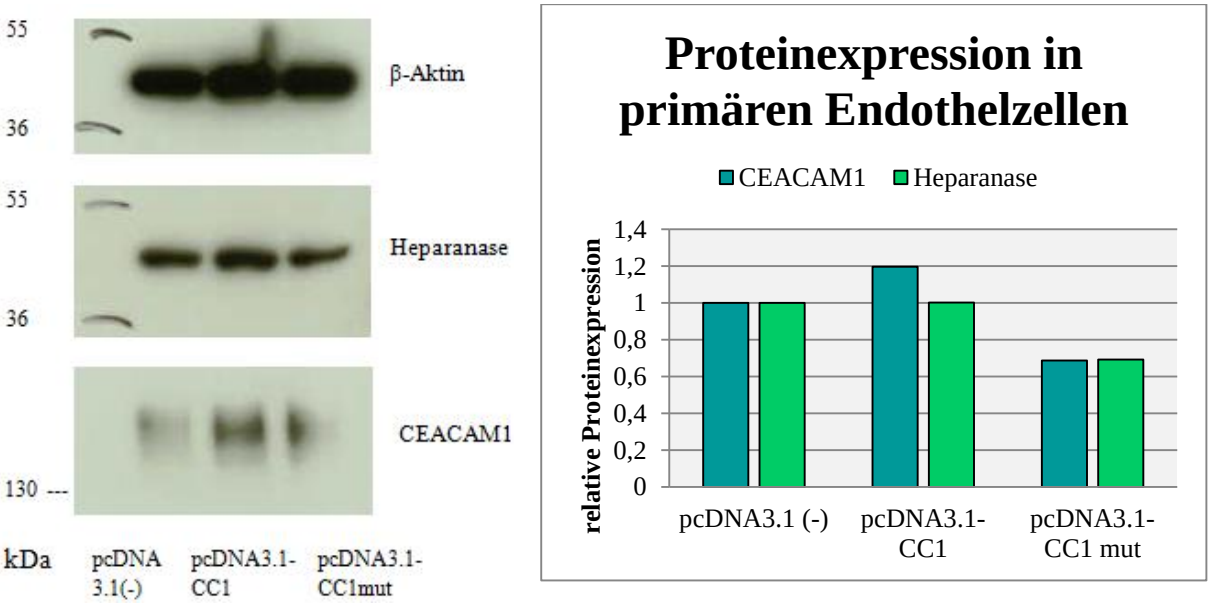
Abb. 13: Proteinexpression von CEACAM1 und Heparanase in transfizierten HDMEC

HDMEC wurden mittels Nukleofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert und nach 72h geerntet. Die transfizierten HDMEC wurden lysiert und das Lysat mittels Western Blot auf die Proteinkonzentration von CEACAM1 und Heparanase hin untersucht **(a)**. Während Hochregulierung von CEACAM1-mRNA zu einer vermehrten CEACAM1-Proteinkonzentration führt, zeigt das Silencing desselben kaum veränderte Proteinlevel. Heparanase zeigt sich kaum durch die veränderte CEACAM-Expression beeinflusst **(b)**.

Im Western Blot konnten durch gezielte Behandlung mit entsprechenden Antikörpern die Banden oben genannter Proteine detektiert werden. Die erfolgreiche Überexpression von CEACAM1 in den Endothelzellen konnte anhand des auf das 6,2-fach gesteigerten Proteinlevels von CEACAM1 in mit

CEACAM1-pcDNA transfizierten HDMEC gegenüber den Kontroll-transfizierten Zellen bestätigt werden. Demgegenüber konnte mittels CEACAM1-Silencing keine Reduktion des CEACAM1-Proteinlevels detektiert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der qRT-PCR konnte mittels Western Blot keine signifikante Veränderung von Heparanase nach CEACAM1-Überexpression in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Überexpression von CEACAM1 führte zu einem auf das 0,8-fach gesenkte Niveau des Ausgangslevels, CEACAM1-Silencing zeigte ein 1,1-faches Heparanase-Level (Abb. 13).

Weitere Western Blot-Analysen erfolgten an primären Endothelzellen, die mittels Lipofectamine mit dem Expressionsvektor (pcDNA3.1(-)/CC1) transfiziert wurden. Ein verminderter CEACAM1-Level sollte durch das Einbringen von einem dominant negativen CEACAM1 (CEACAM1-mut), herbeigeführt werden.



a) b)

Abb. 14: Proteinexpression von CEACAM1 und Heparanase in lipofizierten primären Endothelzellen

Primäre Endothelzellen wurden mittels Lipofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, einem dominant negativen CEACAM1 (CEACAM1-mut) und einer Negativkontrolle transfiziert und nach 48-72h geerntet. Die transfizierten Endothelzellen wurden lysiert und das Lysat mittels Western Blot auf die Proteinkonzentration von CEACAM1 und Heparanase hin untersucht.

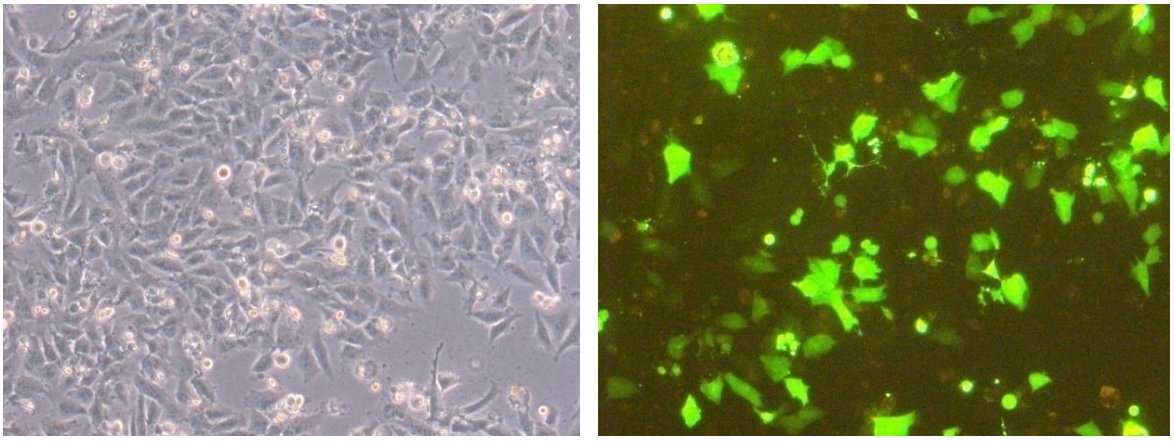
(a) zeigt die im Western Blot sichtbar gewordenen Banden. Die quantitative Auswertung in **b)** zeigt, dass durch CEACAM1-Überexpression keine intrazelluläre Erhöhung des Heparanase-Proteinlevels gegenüber mit pcDNA3.1(-) behandelten Zellen detektierbar ist. Bei verringertem CEACAM1-Proteinlevel ist jedoch auch ein Abfall der Heparanase-Proteinkonzentration erkennbar.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass bei der Überexpression von CEACAM1 in den primären Endothelzellen keine Veränderung der Heparanase-Expression auf Proteinebene gemessen werden

konnte. Das Einbringen mutierter CEACAM1-cDNA in die Zellen führte jedoch zu einer deutlichen Herunterregulierung von Heparanase (Abb. 14).

4.3. CEACAM1-induzierte mRNA-Expression von Heparanase in Tumorepithelzellen

Nachdem an primären Endothelzellen die Auswirkung von CEACAM1 auf die Expression von Heparanase untersucht wurde, sollte dies auch an Tumorepithelzellen geschehen.
RT4-Zellen (Urothelkarzinomzellen) wurden hierfür entsprechend oben beschriebener Verfahren durch Lipofektion transfiziert und mittels qRT-PCR die Genexpression von Heparanase untersucht.
Die qualitative Kontrolle der Transfektion erfolgte erneut mittels mit GFP transfizierten RT4 (Abb. 15).



a) b)

Abb. 15: RT4-Zellen, die durch Lipofektion transfiziert wurden

Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Transfektion. In Abbildung **(a)** zeigen sich die transfizierten und über einen Tag kultivierten RT4-Zellen. In Abbildung **(b)** werden lediglich die mit GFP transfizierten Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Die quantitative Transfektionskontrolle erfolgte wie bereits bei den HDMEC durch Bestimmung der CEACAM1-Genexpression mittels Real-Time-PCR.

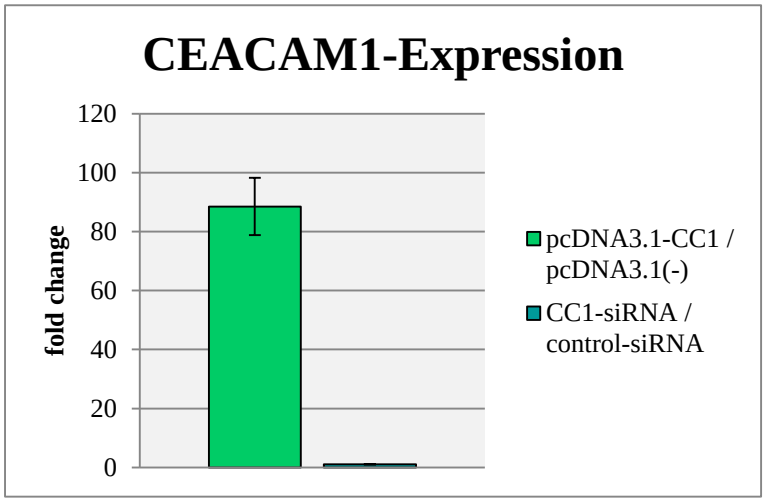


Abb. 16: CEACAM1-Genexpression in transfizierten RT4-Zellen
RT4-Zellen wurden mittels Lipofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 48-72h wurde die CEACAM1-Expression analysiert.
Die Tumorzellen, die mit dem CEACAM-Expressionsvektor transfiziert wurden, zeigen eine deutliche Steigerung der CEACAM1-mRNA-Expession. Durch siRNA behandelte Zellen zeigen nahezu keine Auswirkung.

Die Transfektion der RT4-Zellen mittels Lipofektion zeigte eine Steigerung der CEACAM1-Expression um das 88-fache bei den Zellen, die mit dem CEACAM1-Genexpressionsvektor behandelt wurden gegenüber der Kontrolle (Abb. 16). Die Transfektion mit der für CEACAM1 spezifischen siRNA zeigte hingegen keine Auswirkungen auf die Expression von CEACAM1. Die fold change betrug hierfür 1,02 (Abb. 16).

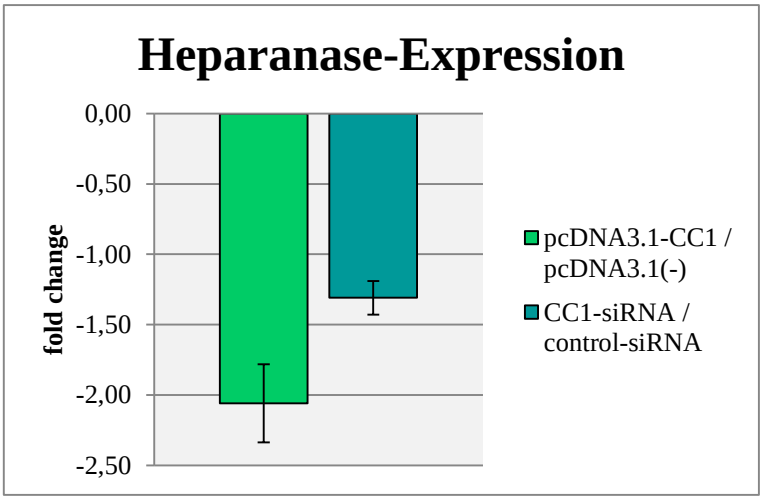
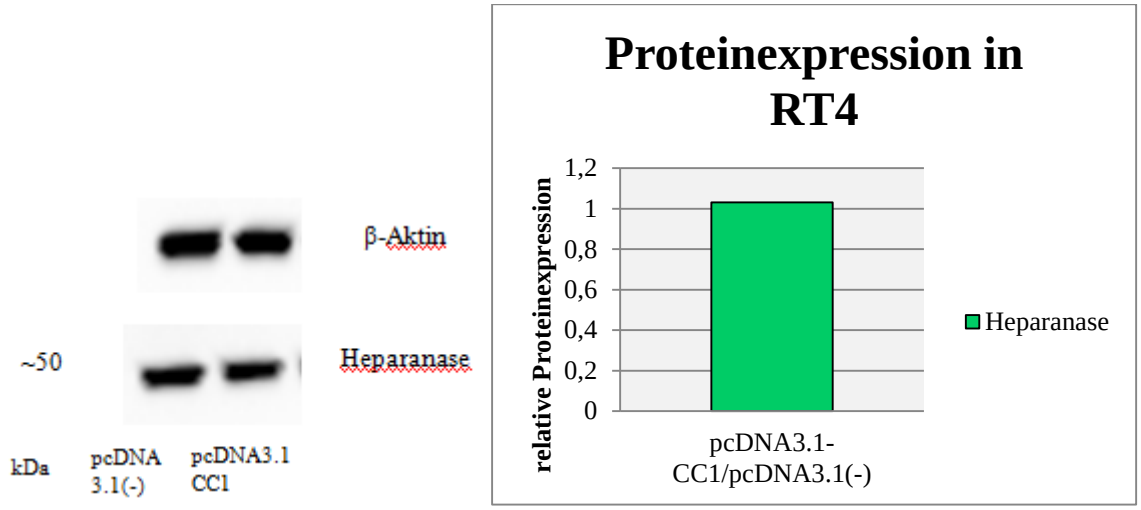


Abb. 17: Heparanase-Expression in transfizierten RT4-Zellen
RT4-Zellen wurden mittels Lipofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1, small interfering RNA (CC1-siRNA) und Negativkontrollen transfiziert. Nach 48-72h wurde die Heparanase-Expression analysiert.
Zellen mit Hochregulation von CEACAM1 zeigen eine verminderte Heparanase-Expression. Mit CEACAM1-siRNA behandelte Zellen zeigen nahezu keine Veränderung.

Eine Überexpression von CEACAM1 führte in den RT4-Zellen zu einer verminderten Genexpression von Heparanase. Bei fast 90-fachem Anstieg des CEACAM1-RNA-Levels sank die Konzentration von Heparanase auf das -2,06-fache (Abb. 17).

4.4. CEACAM1-induzierte Proteinexpression von Heparanase in Tumorepithelzellen

Auch die Urothelkarzinomzellen wurden nach Überexpression mit CEACAM1 bezüglich des Expressionslevels von Heparanase untersucht.



a) b)

Abb. 18: Proteinexpression von Heparanase in transfizierten RT4-Zellen

RT4-Zellen wurden mittels Lipofektion mit dem CEACAM1-Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/CC1 und Negativkontrollen transfiziert und nach 48-72h geerntet. Die transfizierten RT4-Zellen wurden lysiert und das Lysat mittels Western Blot auf die Proteinkonzentration von Heparanase hin untersucht

(a) Banden von β-Aktin und Heparanase im Western Blot. Die quantifizierende Auswertung in **(b)** zeigt bei Hochregulation von CEACAM1 keine Änderung der Heparanase-Konzentration.

Eine Erhöhung der CEACAM1-Konzentration in den Tumorepithelzellen resultierte in einer nahezu unveränderten Konzentration des Heparanase-Proteinlevels. (Abb. 18).

5. DISKUSSION

Tumorerkrankungen gewinnen in unserer Gesellschaft u.a. durch fortschreitendes Alter und schädigende Noxen stets mehr an Bedeutung. Dies trägt dazu bei, dass in großem Umfang Forschung in diesem Bereich betrieben wird. Dies reicht von Untersuchungen über die Entstehung von Tumoren, über ihr Wachstum und ihre Ausbreitung bis hin zu ihrem Endziel entsprechende Therapieoptionen zu entwickeln.

Eine der Therapiestrategien beruht auf der Unterdrückung der Tumorangiogenese, d.h. die von Tumorzellen induzierte Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Solide Tumore, ab einem Volumen von 1 bis 2 mm^3, sind um sich mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen von einem mitwachsenden Kapillarnetz abhängig. Über die neu gebildeten Blutgefäße können die Tumorzellen zudem in die Blutbahn eingeschleust werden und Metastasen bilden (Folkman et al. 1990).

Aus diesem Grund stellt die Angiogenese einen Schlüsselprozess in Tumorwachstum und Metastasierung dar. Demgegenüber hat sie nur eine limitierte Bedeutung beim gesunden Erwachsenen. Dies führt dazu, dass sie ein erstrebenswertes Ziel für die Antitumortherapie darstellt, für die nur relativ wenig Nebenwirkungen und Medikamentresistenzen erwartet werden. In diesem Fall bilden Endothelzellen die Zielzellen der Therapie. Dies hat den Vorteil, dass sie wesentlich zugänglicher für die Zirkulation sind - und damit auch für pharmakologische Behandlung - als die Tumorzellen selber (Cook und Figg 2010). Ein breites Feld an Angiogenesefaktoren und ihrer Rezeptoren wurde in den letzten Jahren untersucht (Al-Husein et al. 2012).

Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wurde in mehreren Studien als Tumorsuppressor in verschiedenen Tumorentitäten bereits beschrieben. Sappino et al. zeigten 2012, dass CEACAM1 während der zellulären Antwort auf Doppelstrangbrüche über eine Aktivierung des p53-pathways stark hochreguliert wird und ist somit der erste beschriebene physiologische Mediator von cellulair senescence douwnstream des p53 pathways. Die Arbeitsgruppe Oliveira untersucht seit längerem das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 in Bezug auf sein Vorkommen in normalem Gewebe und während der Aktivierung der Angiogenese und Lymphangiogenese sowie die CEACAM1-induzierte Regulation von angiogenetisch wirksamen Faktoren. Anhand des Harnblasen- und Prostatakarzinommodells gewonnene Daten wiesen auf eine entscheidende Rolle von CEACAM1 in der Tumorangiogenese hin. Diese Untersuchungen bewiesen, dass in frühen Stadien der Tumorentwicklung eine epitheliale Herunterregulierung aber die endotheliale Hochregulierung von CEACAM1 vorliegt und diese Konstellation mit der Aktivierung der Angiogenese in den Tumor

benachbarten Arealen einhergeht (Oliveira-Ferrer et al. 2004, Tilki et al. 2007). *In vitro* Analysen zeigten, dass die Überexpression von CEACAM1 in Endothelzellen die Hochregulierung von angiogenetisch potenten Faktoren wie VEGF, IL-8, Ang1 und Ang2 induziert (Kilic et al. 2005).

So interessierte uns die Frage, inwiefern CEACAM1-Präsenz in Endothelzellen ebenfalls einen regulatorischen Effekt auf Gene hat, die pro-invasorisch auf die Tumorzellen wirken können und somit während des Metastasierungsprozesses von funktioneller Bedeutung sind. Einige Vorarbeiten unserer Gruppe gaben Hinweise darauf, dass CEACAM1 Einfluss auf die Expression von Heparanase, PLAU und Id3 haben könnte.

Ziel dieser Arbeit sollte es nun sein, eine CEACAM1 induzierte Regulation der genannten metastasierungsrelevanten Gene in Endothelzellen nachzuweisen.

Die *in vitro* Analysen bzgl. der Expression von Heparanase und CEACAM1 auf RNA-Level in CEACAM1-überexprimierenden und CEACAM1-gesilencten Endothelzellen zeigten eine positive Korrelation der Expression beider Gene. Die Überexpression von CEACAM1 in primären Endothelzellen führte zu einem Anstieg der Expression von Heparanase auf das zweifache gegenüber der Kontrolle. Ein Absinken der Expression von CEACAM1 mittels siRNA in HDMEC um in etwa den Faktor drei hatte entsprechend auch eine Herunterregulierung von Heparanase auf etwa 50 % gegenüber der Kontrolle zur Folge. Somit ist davon auszugehen, dass in primären Endothelzellen neben oben genannten pro-angiogenen Faktoren auch Heparanase einer Regulierung durch CEACAM1 unterliegt.

Ebenso gestaltete Versuche wurden mit den angiogenetisch aktiven Faktoren Id3 und PLAU durchgeführt. Hier konnte im Gegensatz zu Heparanase kaum eine eindeutige Korrelation mit CEACAM1 nachvollzogen werden. Die Überexpression von CEACAM1 führte in beiden Fällen nur zu geringfügigen Änderungen der messbaren Genexpression, die am ehesten im Rahmen von Messungenauigkeiten zu werten sind. Sowohl bei Id3 als auch bei PLAU führte die Reduktion der CEACAM1-Genexpression zu einem Absinken der entsprechenden Gene um etwas mehr als den Faktor 1,5.

Aufgrund der nur geringfügigen Änderungen des Genexpressionslevels von Id3 und PLAU wurden weitere Versuche nur mit Heparanase durchgeführt.

Die Expression von Heparanase in den transfizierten Endothelzellen wurde mittels Western Blot-Analysen weiterhin analysiert und quantifiziert. Überexpression von CEACAM1 durch Nukleofektion mit dem Vektor 3.1(-)-CEACAM1 konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Die Quantifizierung der Western Blot-Analysen zeigte eine um das mehr als 6-fach gesteigerte Proteinkonzentration von CEACAM1 gegenüber der Kontrolle. Eine wesentliche Änderung der Heparanase-Expression in den CEACAM1 überexprimierenden Endothelzellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Hingegen zeigte die Überexpression eines dominant negativen CEACAM1 Proteins in Endothelzellen eine Reduktion von 30% des Proteinlevels von Heparanase gegenüber der Kontrolle in Western Blot-Analysen.

Auf Proteinebene konnte folglich nur eine geringfügige Korrelation zwischen CEACAM1- und Heparanase-Expressionslevel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten ein des Öfteren gesehenes Phänomen der Diskrepanz von Konzentrationen auf mRNA- und Proteinebene widerspiegeln. Beispielsweise beeinflussen posttranskriptionelle Mechanismen wie die Bindung von microRNAs an mRNA die Quantität der Proteinexpression (Filipowicz et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ein großer Teil der gebildeten Heparanase-Proteine schnell sezerniert wird, sodass eine Bestimmung der Konzentration in den Überständen der transfizierten Zellen aufschlussreich sein könnte (Yu et al. 2010).

An die Untersuchung der Endothelzellen schlossen sich Versuche mit Epithelzellen an. Es ist bekannt, dass das Vorhandensein von CEACAM1 in Epithelzellen *in vitro* zu einer Unterdrückung proangiogenetischer Faktoren führt. Sein Verschwinden, welches beispielsweise bei tumoröser Entartung zu beobachten ist, führt zu einer Hochregulierung proangiogenetischer Faktoren wie z.B. VEGF-A/-C/-D und Ang-2 (Oliveira-Ferrer et al. 2004, Tilki et al. 2007). Aus diesem Grund sollte auch an Epithelzellen ein möglicher Einfluss von CEACAM1 auf die Heparanase-Expression untersucht werden.

Zunächst wurde erneut die Expression von Heparanase in CEACAM1-überexprimierenden und CEACAM1-gesilencten Zellen der Harnblasenkarzinomzelllinie RT4 untersucht. Aufgrund der geringen endogenen CEACAM1-Expression in RT4-Zellen konnte keine effektive Reduktion der Expression dieses Genes mittels siRNA erzielt werden. Somit konnte der Einfluss auf die Heparanaseexpression nicht analysiert werden. Eine durch Lipofektion herbeigeführte Überexpression von CEACAM1 in den RT4-Zellen resultierte jedoch in einer deutlichen Herunterregulierung der Heparanase-Genexpression auf 50% gegenüber der Kontrolle.

Wie oben bereits beschrieben, wirkt CEACAM1 in Epithelien als Tumorsuppressor. In karzinomatösen Geweben findet sich hingegen eine erniedrigte Expression von CEACAM1 in Epithelzellen. Heparanase wird im Wesentlichen von Tumorzellen (Ilan et al. 2006) gebildet und sekretiert und ist hingegen in normalem Epithel nicht nachweisbar (Vlodavsky et al. 2006). So konnten wir in den von uns verwendeten Harnblasenkarzinomzellen (RT4) ebenfalls eine starke Expression von Heparanase nachweisen. Bei Nachahmung von gesundem Epithel durch vermehrtes Vorhandensein des Tumorsuppressors CEACAM1, wird die Heparanase-Expression hingegen wieder stark reduziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mRNA-Expression von Heparanase sowohl in Endothel- als auch in Tumorepithelzellen durch CEACAM1 reguliert wird. Die vorliegende Arbeit bestätigt weiterhin die früheren Ergebnisse (Oliveira-Ferrer et al. 20004) bezüglich der inversen Rolle

von CEACAM1 in Epithel versus Endothel bei der Regulierung der Angiogenese. Die Überexpression von CEACAM1 in Endothelzellen führt zur Hochregulierung von Heparanase, während in Epithelzellen CEACAM1-Expression mit einer Reduktion von Heparanase einhergeht. Zudem sind die Ergebnisse gut vereinbar mit Daten von Elkin et al. 2001, nach denen Heparanase nur in angiogenetisch aktiven Endothelzellen nachweisbar ist. Eine Hochregulierung von CEACAM1 in tumorassoziierten Gefäßen führt also zu einer erhöhten Sekretion von Heparanase, die wiederum eine proangiogene Wirkung auf die Gefäße hat. Somit handelt es sich hierbei um eine autokrine Stimulation.

Die vermehrte Expression von Heparanase in Tumorzellen korreliert mit gesteigertem metastatischen Potenzial und Tumorwachstum. Durch Spaltung von Heparansulfat durch Heparanase entsteht Spaltbildung in der Basalmembran, welche wiederum die Extravasion von im Blut befindlichen Tumorzellen und somit die Metastasierung fördert (Vlodavsky und Friedmann 2001). Somit führt eine verminderte Sekretion des in Epithel als Tumorsuppressor wirkenden CEACAM1 nicht nur über eine Erhöhung der CEACAM1-Expression in Endothel zu einer Steigerung der Tumorvaskulogenese (Oliveira-Ferrer et al. 2004), sondern zusätzlich über eine Erhöhung des Heparanase-Levels zu einer aktiven Zunahme von Metastasierung und Tumorwachstum.

Weitere Forschung durch funktionelle Untersuchungen wie Invasion Assays und immunzytochemische Färbungen scheint erstrebenswert, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu festigen.

Weltweit wird in verschiedenen Arbeitsgruppen weiterhin Forschung an Heparanase und CEACAM1 betrieben. Beide besitzen eine hohe Assoziation zu Tumorerkrankungen, u.a. in Bezug auf Angiogenese und Metastasierung, was sie zu einem interessanten Ziel für medikamentöse Therapieverfahren macht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Begriff Angiogenese beschreibt den Prozess der Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Sie bildet eine der wichtigsten Voraussetzungen für Wachstum und Metastasierung von Tumoren. An der Angiogenese sind viele verschiedene Faktoren, ihre Rezeptoren, aber auch Adhäsionsmoleküle beteiligt. Ein prominenter Vertreter der Zelladhäsionsmoleküle ist das carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1). Bereits in frühen Tumorstadien findet in einigen Entitäten eine Hochregulierung von CEACAM1 in Endothelien statt, was mit der Aktivierung der Angiogenese einhergeht. Der Zusammenhang zwischen CEACAM1 und einigen angiogenetischen Faktoren konnte bereits nachgewiesen werden. Eine Überexpression von CEACAM1 in primären Endothelzellen resultiert in einer Hochregulierung von vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, Angiopoietin(Ang)-1, Ang-2, Angiogenin und Interleukin (IL)-8. Die Expression des Angiogenese-Inhibitors Kollagen XVIII/Endostatin dagegen wird vermindert. Ein weiterer angiogenetischer Faktor ist Heparanase, eine Endoglycosidase die an der Zelloberfläche, in der extrazellulären Matrix (ECM) und der Basalmembran spezifisch Heparansulfat abbaut und so zu Degradierung und Umbau beiträgt.

In vorliegender Arbeit wurde nun die Abhängigkeit der Heparanase-, urokinase-plasminogen activator (PLAU)- und inhibitor of differentiation 3 (Id3)-Expression von dem Vorhandensein von CEACAM1 untersucht. Auf RNA-Ebene konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Genexpression von CEACAM1 und Heparanase in Endothel- und Tumorepithelzellen gezeigt werden. Passend zu bereits veröffentlichten Daten zur Rolle von CEACAM1 in Endothel versus Epithel konnte hier eine entgegengesetzte Rolle für CEACAM1 bei der Regulierung der Heparanase-Expression in beiden Zelltypen gefunden werden. Eine Überexpression von CEACAM1 führte zu einer Hochregulierung von Heparanase in den Endothelzellen, jedoch zu einer Herunterregulierung in den Epithelzellen. Es ist daher anzunehmen, dass diese Konstellation eine synergistische Wirkung bei der Aktivierung der Angiogenese hat und somit das Tumorwachstum und die Metastasierung begünstigt.

Eine Korrelation zwischen CEACAM1 und den Angiogenesefaktoren Id3 und PLAU konnte nicht ausreichend nachgewiesen werden.

In sich anschließenden Untersuchungen des Verhaltens von Heparanase in Bezug auf CEACAM1 auf Proteinebene konnten vorherige Ergebnisse aufgrund nur geringgradiger Tendenzen nicht eindeutig bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mRNA-Expression von Heparanase sowohl in Endothel- als auch in Tumorepithelzellen durch CEACAM1-Genexpression reguliert wird. Auf Proteinebene konnte aufgrund nur geringgradiger Tendenzen eine eindeutige Aussage nicht getroffen

werden. Weitere Forschung in diese Richtung durch funktionelle Untersuchungen wie Invasion Assays und immmunzytochemische Färbungen scheint jedoch erstrebenswert, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu festigen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, Deremer DL, Somanath PR (2012) Antiangiogenic Therapy for Cancer: An Update. Pharmacotherapy. 32(12):1095-111.

Aguirre-Ghiso JA (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer. 7(11):834-46.

Arvatz G, Shaftat I, Levy-Adam F, Ilan N, Vlodavsky I (2011) The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? Cancer Metastasis Rev. 30(2):253-68.

Baraz L, Haupt Y, Elkin M, Peretz T, Vladovsky I (2006) Tumor suppressor p53 regulates heparanase gene expression. Oncogene. 25(28):3939-47.

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H (1990) The Protein Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. Cell. 61(1):49-59.

Benezra R, Rafii S, Lyden D (2001) The Id proteins and angiogenesis. Oncogene. 20(58):8334-41.

Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 3(6): 401-10.

Bernik MB, Kwaan HC (1969) Plasminogen Activator Activity in Cultures from Human Tissues. An Immunological and Histochemical Study. J Clin Invest. 48(9):1740-53.

Blasi F, Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signaling orchestrator. Nat Rev Mol Cell Biol. 3(12):932-43.

Bos PD, Nguyen DX, Massagué J (2010) Modeling metastasis in the mouse. Curr Opin Pharmacol. 10(5):571-7.

Butler TP, Gullino PM (1975) Quantification of Cell Shedding into Efferent Blood of Mammary Adenocarcinoma. Cancer Res. 35(3):512-6.

Carmeliet P (2000) Mechanisms of anigogenesis and arteriogenesis. Nat Med. 6(4):389-95.

Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 438(7070):932-6.

Cavallaro U, Christofori G (2004) Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nat Rev Cancer. 4(2):118-32.

Chen Bi, Lim RW (1997) Physical and Functional Interactions between the Transcriptional Inhibitor Id3 and ITF-2b. Evidence toward a novel mechanism regulating muscle-specific gene expression. J Biol Chem. 272(4):2459-63.

Chen T, Zimmermann W, Parker J, Chen I, Maeda A, Bolland S (2001) Billary glycoprotein (BGPa, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. J Leukoc Biol. 70(2):335-40.

Coghlin C, Murray GI (2010) Current and emerging concepts in tumour metastasis. J Pathol. 222(1):1-15.

Cohen E, Atzmon R, Vlodavsky I, Ilan N (2005) Heparanase processing by lysosomal/endosomal protein preparation. FEBS Lett. 579(11):2334-8.

Cohen-Kaplan V, Naroditsky I, Zetser A, Ilan N, Vlodavsky I, Doweck I (2008) Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. Int J Cancer. 123(11):2566-73.

Collen D (1999) The plasminogen (fibrinolytic) system. Thromb Haemost. 82(2):259-70.

Condeelis J, Pollard W (2006) Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. Cell. 24(2):263-6.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. 49(3):507-21.

Cook KM, Figg WD (2010) Angiogenesis Inhibitors – Current Strategies and Future Prospects. CA Cancer J Clin 60(4):222-43.

Cui H, Shao C, Liu Q, Yu W, Ali A, Ding K (2011) Heparanase enhances nerve-growth-factor-induces PC12 cell neuritogenesis via the p38 MAPK pathway. Biochem J. 440(2):273-82.

Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL (2000) Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. Trends Biochem Sci. 25(8):349-51.

Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M (2000) Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. Gene. 253(2):171-8.

Doran AC, Lehtinen AB, Meller N, Lipinski MJ, Slayton RP, Oldham SN, Skaflen MD, Yeboah J, Rich SS, Bowden DW, McNamara CA (2010) ID3 is a Novel Atheroprotective Factor Containing a Functionally Significant SNP Associated With IMT in Humans. Circ Res. 106(7): 1303-11.

Dovrak HF, Brown LF, Detmar M, Dorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, mecrovascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol. 146(5): 1029-39.

Edovitsky E, Lerner I, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I, Elkin M (2006) Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity. Blood. 107(9):3609-16.

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. Mol Cell. 4(6):915-24.

Elkin M, Chohen I, Zacharia E, Orgel A, Guatta-Rangini Z, Peretz T, Vlodavsky I, Kleinman HK (2003) Regulation of Heparanase Gene Expression y Estrogen in Breast Cancer. Cancer Res. 63(24):8821-6.

Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I, Vlodavsky I (2001) Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. FASEB J. 15(9):1661-3.

Ellmeier W, Weith A (1995) Expression of the Helix-Loop-Helix Gene Id3 During Murine Embryonic Development. Dev Dyn. 203(2):163-73.

Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, 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(2):311-20.

Fidler IJ, Kripke ML (1977) Metastasis Results from Preexisting Variant Cells Within a Malignant Tumor. Science. 197(4306):893-5.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat rev Genet. 9(2):102-14.

Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Nat Cancer Inst. 82(1):4-6.

Folkman J (1995) Seminars in Medicine in Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med. 333(26):1757-63.

Gale NW, Yancopoulos GD (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and Ephrins in vascular development. Genes Dev. 13(9):1055-66.

Gingis-Velitski S, Zetser A, Flugelman MY, Vlodavsky I, Ilan N (2004) Heparanase Induces Endothelial Cell Migration via Protein Kinase B/Akt Activation. J Biol Chem. 279(22):23536-41.

Gold P, Freedman SO (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med. 121:439-62.

Goldshmidt O, Nadav L, Aingorn H, Irit C, Feinstein N, Ilan N, Zamir E, Geiger B, Voldavsky I, Katz BZ (2002) Human Heparanase Is Loclized within Lysosomes in a Stable Form. Exp Cell Res. 281(1):50-62.

Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I (2003) Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. FASEB J. 17(9):1015-25.

Gray-Owen SD, Blumberg RS (2006) CEACAM1: contact-dependent control of immunity. Nat Rev Immunol. 6(6):433-46.

Gu A, Tsark W, Holmes KV, Shively JE (2009) Role of Ceacam1 in VEGF induced vasculogenesis of murine embryonic stem cell-derived embryoid bodies ind 3D culture. Exp Cell Res. 315(10):1668-82.

Han J, Woytowich AE, Mandal AK, Hiebert LM (2007) Heparanase Upregulation in High Glucose-Treated Endothelial Cells Is Prevented by Insulin and Heparin. Exp Biol Med (Maywood). 232(7):927-34.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995) Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1(2):149-53.

Hulett MD, Hornby JR, Ohms SJ, Zuegg J, Freeman C, Gready JE, Parish CT (2000) Identification of Active-Site Residues of the Pro-Metastatic Endoglycosidase Heparanase. Biochemistry. 39(51):15659-67.

Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA (1994) The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. Genes Dev. 8(11):1270-84.

Ilan N, Elkin M, Vlodyvsky I (2006) Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol. 38(12):2018-39.

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N (1999) cis-Determiants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. Oncogene. 18(40):5563-72.

Jen Y, Manova K, Benezra R (1996) Expression Patterns of Id1, Id2, and Id3 Are Highly Related But Distinct From That of Id4 During Mouse Embryogenesis. Dev Dyn. 207(3):235-52.

Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 9(4):239-52.

Karamysheva AF (2008) Mechanisms of angiogenesis. Biochemistry (Mosc.). 73(7):751-62.

Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007) Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. Science. 317(5836):337.

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

Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Neshat-Vahid S, Irmak S, Obst-Pernberg K, Wurmbach JH, Loges S, Kilic E, Weil J, Lauke H, Tilki D, Singer BB, Ergün S (2007) Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. Blood. 110(13):4223-33.

Kimura H, Esumi H (2003) Reciprocal regulation between nitrit oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. Acta Biochim Pol. 50(1):49-59.

Kinugasa T, Kuroki M, Takeo H, Matsuo J, Ohshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Matsuoka Y (1998) Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. Int J Cancer. 76(1):148-53.

Kjellén L, Lindahl U (1991) Proteglycans: structures and interactions. Annu Rev Biochem. 60:443-75.

Kuespert K, Pils S, Hauck CR (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Curr Opin Cell Biol. 18(5):565-71.

Langley RR, Carlisle R, Ma L, Specian RD, Gerritsen ME, Granger DN (2001) Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. Microcirculation. 8(5):335-45.

Läubli H, Borsig L (2010) Selectins promote tumor metastasis. Semin Caner Biol. 20(3):169-77.

Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, Naroditsky I, Ilan N, Doweck I, Vlodavsky I (2010) Heparanase 2 Interacts with Heparan Sulfate with High Affinity and Inhibits Heparanase Activity. J Biol Chem. 285(36):28010-9.

Levy-Adam F, Miao HQ, Heinrikson RL, Vlodavsky I, Ilan N (2003) Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. Biochem Biophys Res Commun. 308(4).885-91.

Li JP, Vlodavsky I (2009) Heparin, heparin sulfate and heparanase in inflammatory reactions. Thromb Haemost. 102(5):823-8.

Lim RW, Wu JM (2005) Molecular mechanisms regulating expression and function of transcription regulator inhibitor of differentiation 3. Acta Pharmacol Sin. 26(12):1409-20.

Liu W, Wei W, Winter D, Bamberger AM, Bamberger C, Wagener C, Ezzat S, Asa SL (2007) CEACAM1 impedes thyroid cancer growth but promotes invasiveness: a putative mechanism for early metastasis. Oncogene. 26(19):2747-58.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC (1998) Multistep Nature of Metastatic Inefficiency: Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. Am J Pathol. 153(3):865-73.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. Nature. 401(6754):670-7.

Makrilia N, Kollias A, Manopoulos L, Syrigos K (2009) Cell Adhesion Molecules: Role and Clinical Significance in Cancer. Cancer Invest. 27(10):1023-37.

Mareel M, Oliveira MJ, Madani I (2009) Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. Virchows Arch. 454(6):599-622.

Masola V, Gambaro G, Tibaldi E, Onisto M, Abaterusso C, Lupo A (2011) Regulation of heparanase by albumin and advanced glycation end products in proximal tubular cells. Biochim Biophys Acta. 1813(8):1475-82.

Mc Kenzie EA (2007) Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation.Br J Pharmacol. 151(1):1-14.

McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, Hircock M, Patel S, Barry E, Stubberfield C, Terrett J, Page M (2000) Cloning and Expressing Profiling of Hpa2, a Novel Mammalian Heparanase Family Member. Biochem Biophys Res Commun. 276(3):1170-7.

McMahon B, Kwaan HC (2008) The Plasminogen Activator System and Cancer. Pathophysiol Haemost Thromb. 36(3-4):184-94.

Moserle L, Casanovas O (2013) Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance. Journal of internal medicine 273(2):128-37.

Nadav L, Eldor A, Yacoby-Zeevi O, Zamir E, Pecker I, Ilan N, Geiger B, Vlodavsky I, Katz BZ (2002) Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts. J Cell Sci. 115(Pt10):2179-87.

Najjar SM, Philippe N, Suzuki Y, Ignacio GA, Formisano P, Accili D, Taylor SI (1995) Insulin-Stimulated Phosphorylation of Recombinant pp120/HA4, an Endogenous Substrate of the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. Biochemistry. 34(29):9341-9.

Nardella C, Lahm A, Pallaoro M, Brunetti M, Vannini A, Steinkühler C (2004) Mechanisms of Activation of Human Heparanase Investigated by Protein Engineering. Biochemistry. 43(7):1862-73.

Nasser NJ (2008) Heparanase involvement in physiology and disease. Cell Mol Life Sci. 65(11):1706-15.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. J Clin Oncol. 18(5):1135-49.

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer. 9(4):24-84.

Obrink B (2008) On the role of CEACAM1 in cancer. Lung Cancer. 60(3):309-12.

Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M, Ergün S (2004) Dual Role of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 in Angiogenesis and Invasion of Human Urinary Bladder Cancer. Cancer Res. 64(24):8932-8.

Paget S (1889) Distribution of secondary growths in cancer of the breast. The Lancet. 133(3421):571-573.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat Rev Cancer. 3(12):895-902.

Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK (2010) Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. Mol Cell Proteomics. 9(6):1085-99.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29(9):e45.

Pschyrembel (2002) Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl., de Gruyter. Berlin, New York, 1057.

Raghu H, Lakka SS, Gondi CS, Mohanam S, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS (2010) Suppression of uPA and uPAR Attenuates Angiogenin Mediated Angiogenesis in Endothelial and Glioblastoma Cell Lines. PLoS One. 5(8):e12458.

Rajput B, Degen SF, Reich E, Waller EK, Axelrod J, Eddy RL, Shows TB (1985) Chromosomal Locations of Human Tissue Palsminogen Activator and Urokinase Genes. Science. 230(4726):672-4.

Rao G, Liu D, Xing M, Tauler J, Prinz RA, Xu X (2010) Induction of Heparanase-1 Expression by Mutant B-Raf Kinase: Role of GA Binding Protein in Heparanase-1 Promoter Activation. Neoplasia. 12(11):946-56.

Rees-Jones RW, Taylor SI (1985) An Endogenous Substrate for the Insulin Receptor-associated Tyrosine Kinase. J Biol Chem. 260(7):4461-7.

Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kölsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeböller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Müller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Förstl H, Martins RN, Kurz A (2006) A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. Hum Mol Genet. 15(16):2446-56.

Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD (2001) Id Helix-Loop-Helix Proteins Antagonize Pax Transcription Factor Activity by Inhibiting DNA Binding. Mol Cell Biol. 21(2):524-33.

Sandarangani M, Pollard AJ, Gray-Owen SD (2011) Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic Neisseria. FEMS Microbiol Rev. 35(3):498-514.

Sappino AP, Buser R, Seguin Q, Fernet M, Lesne L, Gumy-Pause F, Reith W, Favaudon V, Mandriota SJ (2012) The CEACAM1 tumor suppressor is an ATM and p53-regulated gene required for the induction of cellular senescence by DNA damage. Oncogenesis 1:e7. doi: 10.1038/oncsis.2012.7.

Schmidt und Lang (2007) Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 30. Aufl., Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 658.

Shteper PJ, Zcharia E, Ashhab Y, Peretz T, Vlodavsky I, Ben-Yehuda D (2003) Role of promoter methylation in regulation of the mammalian heparanse gene. Oncogene. 22(49):7737-49.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009) Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer related inflammation. Journal of leukocyte biology. 86(5):1065-73.

Talmadge JE, Fidler IJ (2010) AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. 70(14):5649-69.

Tapiovaara H, Alitalo R, Sthephens R, Myöhänen H, Ruutu T, Vaheri A (1993) Abundant urokinase on the surface of mononuclear cells from blood and bone marrow of acute leukemia patients. Blood. 82(3):914-9.

Tedder TF, Seeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J. 9(10):866-73.

Teoh ML ,Fitzgerald MP, Oberley LW, Domann FE (2009) Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. Cancer Res. 69(15):6355-63.

Tezel E, Kawase Y, Takeda S, Oshima K, Nakao A (2001) Expression of Neural Cell Adhesion Molecule in Pancreatic Cancer. 22(2):122-5.

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002) CEACAM1 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma Predicts the Development of Metastatic Disease. J Clin Oncol. 20(10):2530-6.

Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991) Carcinoembryonic Antigen Gene Family: Molecular Biology and Clinical Perspectives. J Clin Lab Anal. 5(5):344-66.

Tilki D, Irmak S, Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Miethe K, Atakaya H, Hammerer P, Friedrich MG, Schuch G, Galalae R, Stief CG, Kilic E, Huland H, Ergun S (2006) CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. Oncogene. 25(36):4965-4.

Tilki D**,** Oliveira-Ferrer L**,** Kilic N**,** Friedrich MG**,** Stief CG**,** Ergun S (2007) Ein Molekül, zwei Gesichter. Epithelialer Verlust des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 aktiviert Angiogenese beim Harnblasen- und Prostatakarzinom.Urologe. 46(9):1128-34.

Townson JL, Chambers AF (2006) Dormancy of Solitary Metastatic Cells. Cell Cycle. 5(16):1744-50.

Tsukada M, Wakai T, Matsuda Y, Korita PV, Shirai Y, Ajoka Y, Hatakeyama K, Kubota M (2009) Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression predicts metachronous pulmonary metastasis and poor survival in patients with hepatoblastoma. J Pediatr Surg. 44(8):1522-8.

Turbide C, Kunath T, Daniels E, Beauchemin N (1997) Optimal Ratios of Biliary Glycoprotein Isoforms Required for Inhibition of Colonic Tumor Cell Growth. Cancer Res. 57(13):2781-8.

Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J (1999) Tumor Necrosis Factor-α Regulation of the Id Gene Family in Astrocytes and Microglia During CNS Inflammatory Injury. Glia. 26(2):139-52.

Vaughn DE, Bjorkman PJ (1996) The (Greek) Key to Structures of Neural Adhesion Molecules. Neuron. 16(2):261-73.

Vlodavsky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, Levi-Adam F, Fuks L, Shafat I, Ilan N (2008) Heparanase: One Molecule with Multiple Functions in Cancer Progression. Connect Tissue Res. 49(3):207-10.

Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, Ilan N (2006) The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. Pathophysiol Haemost Thromb. 35(1-2):116-27.

Vlodavsky I, Friedmann Y (2001) Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. J Clin Invest. 108(3):341-7.

Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I (1999) Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. Nat Med. 5(7):793-802.

Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Ber-Shavit R, Fuks Z (1990) Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. Cancer Metastasis Rev. 9(3):203-6.

Voges M, Bachmann V, Kammerer R, Gophna U, Hauck CR (2010) CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. BMC Microbiol. 10:117.

Vreys V, Delande N, Zhang Z, Coomans C, Roebroek A, Dürr J, David G (2005) Cellular Uptake of Mammalian Heparanase Precursor Involves Low Density Lipoprotein Receptor-related Proteins, Mannose 6-Phosphate Receptors, and Heparan Sulfate Proteoglycans. J Biol Chem. 280(39):33141-8.

Wagener C, Ergün S (2000) Angiogenic Properties of the Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1. Exp Cell Res. 261(1):19-24.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med. 324(1):1-8.

Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. Annu Rev Immunol. 6:381-405.

Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, Molavi DW, Taylor ME, Teo WW, Griffin C, Fetting J, Davidson NE, De Marzo AM, Hicks JL, Chitale D, Ladanyi M, Sukumar S, Argani P (2008) Heterogeneity of Breast Cancer Metastases: Comparison of Therapeutic target Ecpression and Promoter Methylation Between Primary Tumors and Their Multifocal Metastases. Clin Cancer Res. 14(7):1938-46.

Wu W, Pan C, Meng K, Zhao L, Du L, Liu Q, Lin R (2010) Hypoxia activates heparanase expression in an NF-kappaB dependent manner. Oncol Rep. 23(1):255-61.

Yu SJ, Kang XH, Zhang JN, Wang HM, Xie T, Wang W, Wang SJ (2010) Effects of small interfering RNA targeting heparanase-1 combined with heparin on invasiveness of mouse hepatocellular carcinoma cell lines. Chin J Cancer.29(9):816-23.

Zcharia E, Philp D, Edovitsky E, Aingorn H, Metzger S, Kleinman HK, Vlodavsky I, Elkin M (2005) Heparanase regulates murine hair growth. Am J Pathol. 166(4):999-1008.

Zcharia E, Zilka R, Yaar A, Yacoby-Zeevi O, Zetser A, Metzger S, Sarid R, Naggi A, Casu B, Ilan N, Vlodavsky I, Abramovitch R (2005) Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models. FASEB J. 19(2):211-21.

Zetser A, Bashenko Y, Edovitsky E, Levy-Adam F, Vlodavsky I, Ilan N (2006) Heparanase Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression: Correlation with p38 Phosphorylation Levels and Src Activation. Cancer res. 66(3): 1455-63.

Zetter BR (1998) Angiogenesis and tumor metastasis, Annu Rev Med 49:407-24.

Zhang Q, Yang M, Shen J, Gerhold LM, Hoffman RM, Xing HR (2010) The role of the intravascular microenvironment in spontaneous metastasis development. Int J Cancer. 126(11):2534-41.

Zhang Y, Yeung MN, Liu J, Chau CH, Chan YS, Shum DK (2006) Mapping heparanase expression in the spinal cord of adult rats. J Comp Neurol. 494(2):345-57.

Zimmermann W (2011) the carcinoembryonic antigen homepage. [Online im Internet.] URL: http://www.carcinoembryonic-antigen.de/human/index.html [Stand: 07.09.2011, 21:00].

Zimmermann W, Weber B, Ortlieb B, et al. (1988) Chromosomal Localization of the Carcinoembryonic Antigen Gene Family and Differential Expression in Various Tumors. Cancer Res. 48(9):2550-4.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AS	Aminosäure
bFGF	basic fibroblast growth factor
BGP	biliary glycoprotein
bHLH	basic helix-loop-helix
BRAF	rapidly growing fibrosarcoma B
C-CAM	cell-cell-adhesion molecule
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEA	carcinoembryonic antigen
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CSC	cancer stem cell
CSF-1R	macrophage colony-stimulating factor 1 receptor
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglykan
h	Stunden
HDLEC	human dermal lymphatic endothelial cells
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia-inducible transcription factors
HLH	helix-loop-helix
HSPGs	Heparansulfatproteoglykane
ICAM	intercellular adhesion molecule
Id3	inhibitor of differenciation 3
Ig	immunglobulin
IgCAMs	immunglobulin superfamily of cell adhesion molecules
IgV	immunoglobulin variable-region
IL	Interleukin
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
KGF	keratin growth factor
LP	Protein Loading Buffer
mA	Milliampere
Mad CAM	mucosal addressin cell adhesion molecule
min	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCAM	neural cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factor
NO	Sticktoffmonoxid
Opa	opacity
PAI	plasminogen activator inhibitors
Pax	paired-box
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PI	Protease Inhibitor Cocktail
PI3K	phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAU	urokinase-plasminogen activator
PSG	pregnancy-specific glycoproteins
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RAS	rat sarcoma
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
sec	Sekunden
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SMC	smooth muscle cell
SOV	Natriumorthovanadat
suPAR	soluble uPAR
TAM	tumor-associated macrophages
TF	tissue factor
TGF	transforming growth factor
TIM	triosephosphate isomerase
TIMP	tissue inhibitors of matrix metalloproteases
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase-specific plasminogen activator
V	Volt
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

9. DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter Fiedler, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, mich als Doktorandin von Dr. Schuch zu übernehmen, und Dr. Leticia Oliveira-Ferrer, die mich die ganze Zeit über mit viel Energie und Elan betreut, und den Spaß am Forschen gefördert hat.

Danke auch an Jessica, Marianne, Jasmin, Brigitte und Gabi, die im Labor viele Fragen über Zellen, Lösungen, Färbungen, Geräte und noch viel mehr über sich ergehen lassen mussten und mir eine große Hilfe waren.

Desweiteren ganz herzlichen Dank an meine beiden tapferen Mitstreiterinnen Annette und Janna, die zur gleichen Zeit mit ihren Dissertationen beschäftigt waren. Keiner konnte so gut wie ihr die Frustration über sterbende Zellen, defekte Nucleofektoren und nicht funktionierende Antikörper nachempfinden. Mit euch geteiltes Leid war fast schon halbes Leid…

Auch meiner Schwester Cathi und meinem Freund Tom Danke für die Hilfe und Unterstützung. Ihr habt mich vor so manch einem Nervenzusammenbruch bewahrt, wenn mal wieder auf mysteriöse Weise das ganze Layout verrutscht oder Abbildungen verschwunden waren.

Als letztes, aber dafür ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Doro und Wolfgang bedanken, die es mir überhaupt ermöglicht haben so weit zu kommen. Ihr habt mich von klein auf gefördert, aber nie überfordert, und mich zu einem neugierigen und ehrgeizigen Menschen gemacht.

10. LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Geburtsdatum:	11.06.1985
Geburtsort:	Engelskirchen, Deutschland
Nationalität:	deutsch

AUSBILDUNG

April 2013 - heute	Assistenzärztin für Pathologie, Vrije Universiteit Amsterdam, Niederlande
August 2011 - Juli 2012	Praktisches Jahr, Westküstenklinikum Heide
2008 - 2012	Klinischer Teil des Medizinstudiums, Universität Hamburg Eppendorf
2006 - 2008	Vorklinischer Teil des Medizinstudiums, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
2006	Vorsemesterkurs Medizin am Rheinischen Bildungszentrum Köln
1995 - 2004	Hollenberg-Gymnasium Waldbröl mit Auslandsaufenthalt in Kalamunda, Western Australia
1991 - 1995	Grundschule Hermesdorf

11. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....