

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie

Ceacam1-Defizienz führt zu endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Alexander Heinrich Paus
aus Böblingen
2014

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr.med. S. Ergün
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Levkau

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2015

[Am J Physiol Endocrinol Metab](#). 2013 Aug; 305(4):E519-29. doi: 10.1152/ajpendo.00266.2013. Epub 2013 Jun 25.

Ceacam1 deletion causes vascular alterations in large vessels.

[Naijar SM](#), [Ledford KJ](#), [Abdallah SL](#), [Paus A](#), [Russo L](#), [Kaw MK](#), [Ramakrishnan SK](#), [Muturi HT](#), [Raphael CK](#), [Lester SG](#), [Heinrich G](#), [Pierre SV](#), [Benndorf R](#), [Kleff V](#), [Jaffa AA](#), [Lévy E](#), [Vazquez G](#), [Goldberg IJ](#), [Beauchemin N](#), [Scalia R](#), [Ergün S](#).

Source

Center for Diabetes and Endocrine Research, College of Medicine and life Sciences, University of Toledo, Health Science Campus, Toledo, Ohio.

Abstract

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) promotes hepatic insulin clearance and endothelial survival. However, its role in the morphology of macrovessels remains unknown. Mice lacking Ceacam1 (Cc1(-/-)) exhibit hyperinsulinemia, which causes insulin resistance and fatty liver. With increasing evidence of an association among hyperinsulinemia, fatty liver disease, and atherosclerosis, we investigated whether Cc1(-/-) exhibited vascular lesions in atherogenic-prone aortae. Histological analysis revealed impaired endothelial integrity with restricted fat deposition and aortic plaque-like lesions in Cc1(-/-) aortae, likely owing to their limited lipidemia. Immunohistochemical analysis indicated macrophage deposition, and in vitro studies showed increased leukocyte adhesion to aortic wall, mediated in part by elevation in vascular cell adhesion molecule 1 levels. Basal aortic eNOS protein and NO content were reduced, in parallel with reduced Akt/eNOS and Akt/Foxo1 phosphorylation. Ligand-induced vasorelaxation was compromised in aortic rings. Increased NADPH oxidase activity and plasma 8-isoprostane levels revealed oxidative stress and lipid peroxidation in Cc1(-/-) aortae. siRNA-mediated CEACAM1 knockdown in bovine aortic endothelial cells adversely affected insulin's stimulation of IRS-1/PI 3-kinase/Akt/eNOS activation by increasing IRS-1 binding to SHP2 phosphatase. This demonstrates that CEACAM1 regulates both endothelial cell autonomous and nonautonomous mechanisms involved in vascular morphology and NO production in aortae. Systemic factors such as hyperinsulinemia could contribute to the pathogenesis of these vascular abnormalities. Cc1(-/-) mice provide a first in vivo demonstration of distinct CEACAM1-dependent hepatic insulin clearance linking hepatic to macrovascular abnormalities.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Ceacam1	5
1.2. Das Blutgefäßendothel	9
1.3. Endotheliale Dysfunktion	11
1.4. Atherosklerose	14
1.5. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor-2	21
1.6. Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase	23
1.7. VE-Cadherin	26
1.8. Zielsetzung	29
2. Material und Methoden	
2.1. Laborgeräte	30
2.2. Kommerzielle Laborprodukte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	31
2.3. Versuchstiere	35
2.4. Primärantikörper	35
2.5. Sekundärantikörper	36
2.6. Immunhistochemie	36
2.7. Histologische Färbungen	40
2.8. Westernblotting	41
3. Ergebnisse	
3.1. Expression von Ceacam1 in der Aorta Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse	44
3.2. Histochemische Färbungen atherosklerotischer Plaques aus Aorten alter Ceacam1-Knockout-Mäuse	45
3.3. Expression von VEGFR-2, e-NOS und VE-Cadherin in den Aorten von Ceacam1-Knockout- versus Wildtyp-Mäusen	
3.3.1. VEGFR-2	46
3.3.2. e-NOS	46
3.3.3. VE-Cadherin	47
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Anhang und Abkürzungsverzeichnis	81
8. Danksagung	104
9. Lebenslauf	105

1 Einleitung

1.1. CEACAM1

CEACAM1 steht für das Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 und ist ein hochglykosyliertes, transmembranöses Glykoprotein der CEA-Genfamilie innerhalb der Immunglobulinsuperfamilie (Beauchemin et al., 1999; Obrink, 1997). Ceacam1 wird in Epithelien vieler Organe, wie z.B. der Leber, der Nieren, des Kolons und der Prostata, in angiogenetisch aktivierten Endothelzellen, in Leukozyten und in aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und hat je nach Grad der Glykosylierung ein Molekulargewicht von 120 kDa (Leber), 140 kDa (Endothel) oder 180 kDa (Granulozyten) (Singer and Lucka, 2005). Das Ceacam1-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 19 und bei der Maus auf dem Chromosom 7 lokalisiert und codiert für ein zellmembrangebundenes Molekül mit einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne (Izzi et al., 1999). Bei bisweilen mindestens 11 verschiedenen Spleißvarianten bestehen die beiden am häufigsten exprimierten Isoformen von Ceacam1 in der extrazellulären Domäne aus vier Immunglobulin(Ig)-ähnlichen und entweder einer kurzen aus 10 Aminosäuren (Ceacam1-4S) oder einer langen aus 73 Aminosäuren (Ceacam1-4L) bestehenden zytoplasmatischen Domäne. Die Ig-ähnlichen Domänen lassen sich des Weiteren unterteilen in drei sog. IgC-Domänen bzw. eine am N-Terminus gelegene IgV-Domäne, die Homologien zu den konstanten bzw. den variablen Domänen von Antikörpern aufweisen. Ceacam1 erscheint an der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration als Monomer oder als Dimer (Obrink, 1997). Die Dimerisierung zweier Ceacam1-Moleküle erfolgt vorzugsweise als Homodimer, d.h. Ceacam1-4L mit Ceacam1-4L oder Ceacam1-4S mit Ceacam1-4S, wobei dimerisiertes Ceacam1 für die Rekrutierung intrazellulärer Signalmoleküle von Bedeutung ist (Gray-Owen and Blumberg, 2006). Die Formierung von Heterodimeren, d.h. Ceacam1-4L mit Ceacam1-4S, ist analog zum interzellulären Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM1) der Immunglobulinsuperfamilie potentiell an das Vorhandensein von Glyzinresten in der Transmembrandomäne gebunden (Hunter et al., 1996). Unter Beteiligung des Proteinanteils der IgV-Domäne vermag Ceacam1 als Monomer sowohl homophile als auch heterophile Bindungen zu anderen CEA-Familienmitgliedern auszubilden. N-glykosidisch verknüpfte Sialyl-Lewis^x- oder Lewis^x-Reste der Extrazellulärdomäne auf z.B. Granulozyten vermitteln vermutlich die heterophile Bindung an E-Selektin mit nachfolgender intergrinvermittelter Aggregation der Leukozyten am vaskulären Endothel.

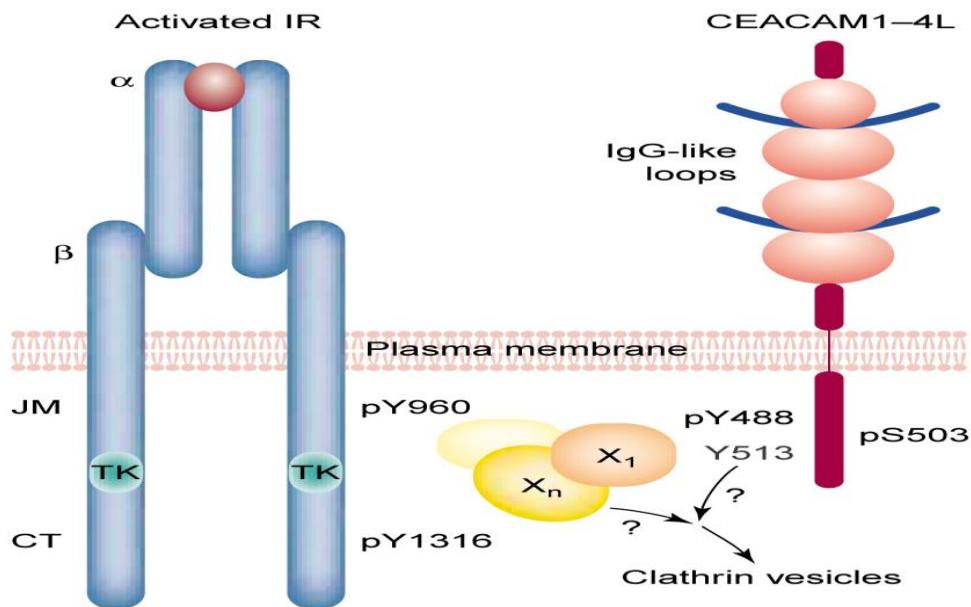
Ceacam1-4S weist an der Position 449 einen Serinrest auf, der von der Proteinkinase-C phosphoryliert werden kann und zu einer Einschränkung der Anlagerung des kalziumbindenden Proteins Calmodulin führt (Edlund et al., 1998). Der zytoplasmatische Abschnitt von Ceacam1-4L hingegen besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen in Form

von Hydroxylgruppen an Serin- und Threoninresten sowie an zwei Tyrosinresten. Das membranproximale Tyrosin an der Position 488 von Ceacam1-4L liegt in einem sog. ITIM und bildet zusammen mit dem membrandistalen Tyrosin an der Position 513 ein sog. ITAM aus. Beim Ceacam1 handelt es sich jedoch um ein modifiziertes ITAM, da der Abstand zwischen den beiden Tyrosinresten mehr als doppelt so groß ist wie es bei einem klassischen ITAM der Fall ist. Nach Phosphorylierung bindet das ITIM Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und das ITAM Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs), deren Aktivierung zur Termination bzw. Stimulation von Signaltransduktionskaskaden führt (Obrink, 1997). So vermag, im Rahmen einer Immunantwort, die MHC-Klasse-II-vermittelte Antigenpräsentation an den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex nicht nur die Aktivierung des Helfer-Lymphozyten, sondern darüber hinaus auch die Translokation von Ceacam1 aus intrazellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche des T-Lymphozyten zu veranlassen (Gray-Owen and Blumberg, 2006). Diese Zellantwort ist abhängig von der CD4-assoziierten Signal-Erkennungs-Tyrosinkinase LCK, die die Phosphorylierung von CD3 und die Anlagerung sowie Aktivierung einer 70kDA-Proteinkinase (ZAP70) zur Folge hat. ZAP70 vermittelt sodann die Rekrutierung von Ceacam1 in Lipidinseln (lipid rafts) der Plasmamembran, einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, die Phosphorylierung von Serinresten des Ceacam1 und die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs). Der Phosphorylierung des ITIM durch die LCK und der homophilen Interaktion mit Ceacam1 der antigenpräsentierenden Zelle schließt sich die Assoziation des Ceacam1 mit dem T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex und die Rekrutierung der SH2-positiven Protein-Tyrosin-Phosphatase-1 (SHP-1) an. SHP-1 bewirkt sodann die Dephosphorylierung von ZAP70 und von Ceacam1. Die verminderte katalytische Aktivität von ZAP70 ist anschließend für die Inhibition der T-Helfer-Zellaktivierung verantwortlich. Dephosphoryliertes Ceacam1 wird vom sog. Adapter-Protein-2 gebunden und in Endosomen aufgenommen, mit konsekutivem Verlust seiner membranständigen inhibitorischen Wirkung (Gray-Owen and Blumberg, 2006).

Durch die Interaktion mit Ceacam1 führen septische Erreger darüberhinaus zu einer Abschwächung der Immunantwort (Slevogt et al., 2008). Mikrobielle Oberflächenproteine von Bakterien der Gattung *Moraxella catarrhalis* oder *Neisseria meningitidis* führen auf humanen Bronchialepithelzellen zu einer Aktivierung des ITIMs von Ceacam1 durch Tyrosinphosphorylierung. Die konsekutive Rekrutierung der SHP-1 mit Hemmung der Phosphorylierung der p85-Untereinheit der PI-3-Kinase führt zu einer Hemmung der TLR-2-vermittelten Expression proinflammatorischer Gene durch Aktivierung des NF- κ B (Slevogt et al., 2008).

Des Weiteren ist die insulinunabhängige Phosphorylierung eines Serinrestes an der Position 503, ebenso wie die insulinabhängige Phosphorylierung des membranproximalen Ty-

rosinrestes 488 von Ceacam1-4L, für die rezeptorvermittelte Endozytose und die Degradation von Insulin in Hepatozyten von Bedeutung (Najjar, 2002). Zudem vermag Ceacam1 bei diesem Vorgang gleichzeitig die durch Insulin stimulierte Fettsäuresynthese durch Bindung und Inhibition der Malonyl-CoA-abhängigen Fettsäuresynthese zu limitieren und somit die Bildung von Lipoproteinen einzuschränken (Najjar et al., 2005).



Insulinabbau der Leber. Aktivierung der zytosolischen Rezeptortyrosinkinase (TK) nach Bindung von Insulin an Hepatozyten führt zur Phosphorylierung u.a. von Tyrosinresten in der Juxtamembrandomäne (Tyr960) und des C-Terminus (Tyr 1316) der β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR). Auf die insulinunabhängige Phosphorylierung des Serinrestes 503 erfolgt die insulinabhängige Phosphorylierung des Tyrosins an der Position 488 des Ceacam1-4L durch das phosphorylierte Tyr 1316 des IR. Nach Anlagerung eines intrazellulären Moleküls (X_1) bzw. Molekülkomplexes (X_n) an das membranproximale Tyrosin von Ceacam1 kann nun unter Beteiligung des Tyr960 des IR, sowie des phosphorylierten distalen Tyrosins von Ceacam1 die Endozytose des Insulinrezeptorkomplexes durch Interaktion mit dem Adapterprotein AP2 eingeleitet werden (Najjar, 2002).

Ebenfalls abhängig von der Phosphorylierung des Serins 503 und des Tyrosins 488 von Ceacam1-4L ist die ATP-abhängige Taurocholsäuresekretion in die von zwei benachbarten Hepatozyten gebildeten Gallenkanalikuli.

Ceacam1 wird bereits während der pränatalen Blutgefäßentwicklung auf Endothelzellen exprimiert (Sawa et al., 1994). Da diese Blutgefäßzellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen, den sog. Angioblasten hervorgehen, wird dieser Prozess unter dem Begriff Vas-

kulogenese zusammengefasst (Carmeliet, 2000). Zudem spielt Ceacam1 eine bedeutende Rolle bei der Angiogenese (Ergun et al., 2000), die definiert ist als das Auswachsen neuer Gefäße aus den bereits existierenden Blutgefäßen (Carmeliet, 2000; Hallmann et al., 2005; Folkman, 2007). Mit der Identifizierung von im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (Asahara et al., 1997), die offensichtlich in die Formierung neuer Blutgefäße, z.B. an den Stellen der aktiven Angiogenese, einbezogen werden, wurde deutlich, dass beim adulten Menschen Gefäßneubildung nicht nur durch klassische Angiogenese herbeigeführt wird, sondern auch durch postnatale Vaskulogenese, nämlich durch endotheliale Progenitorzellen. Später konnte nachgewiesen werden, dass auch in den Wänden adulter menschlicher Arterien und Venen endotheliale Progenitorzellen ansässig sind (Zengin et al., 2006; Ergun et al., 2007), die ebenfalls zur Gefäßneubildung beitragen. Unterschieden wird dabei jedoch grundsätzlich zwischen der physiologischen Blutgefäßneubildung im Rahmen der Wundheilung oder dem weiblichen Reproduktionszyklus und der dysregulierten pathologischen Blutgefäßneubildung, z.B. im Rahmen der Tumorigenese oder der diabetischen Retinopathie. Da die Angiogenese durch Gefäßneubildung eine lokale Erweiterung des systemischen Gefäßsystems herbeiführt, wird sie zwangsläufig von sämtlichen Eigenschaften des Blutkreislaufs, wie z.B. den Blutgaspartialdrücken, dem Blutdruck oder der Blutplasmazusammensetzung beeinflusst. So ist beispielsweise die Hypoxie ein wesentlicher Auslöser für die Angiogenese (Liekens et al., 2001). Die Angiogenese wird u.a. initiiert durch den permeabilitätssteigernden vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) und im unmittelbaren Zusammenhang durch das vasorelaxierende Stickstoffmonoxid (NO). Die Extravasation von Plasmaproteinen, wie z.B. Fibrinogen oder Fibronectin, dient als migratorische Leitstruktur für Endothelzellen. Daraufhin wird die Destabilisierung des Gefäßes, d.h. die Lösung interzellulärer Verbindungen und fokaler Adhäsionen der Endothelzellen, unter Mitbeteiligung des Angiopoetin 2, einen kompetitiven Antagonisten von Angiopoetin 1 an dem Tyrosinkinaserzeptor Tie2, eingeleitet. Weiterhin werden die Extrazellulärmatrix durch proteolytische Enzyme degradiert und Wachstumsfaktoren freigesetzt. Bindung des VEGF-A an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-2 (VEGFR-2) führt zur Expression des Ceacam1 auf Endothelzellen, ein Vorgang, der die endotheliale Motilität reguliert und im Zusammenspiel mit dem VEGF zur Formierung neuer Blutgefäße führt (Ergun et al., 2000; Wagener and Ergun, 2000). In diesem Zusammenhang führt Ceacam1 zu einer Veränderung der Morphologie der Endothelzellen, die an die Aktivität der kleinen GTPasen der Rho-Familie gebunden ist (Muller et al., 2005). Zudem kann Ceacam1 nach Phosphorylierung des Tyrosins 488 das interginassoziierte Adapterprotein Paxillin binden (Ebrahimnejad et al., 2000) und dadurch die Bildung und Stabilisierung fokaler Adhäsionen beeinflussen. Unter Beteiligung des $\alpha v \beta 3$ - und des pro-angiogenetischen $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin sowie in Abhängigkeit

von NO (Goligorsky et al., 1999) migrieren proliferierte Endothelzellen und bilden röhrenförmige Netzwerke aus, die letztlich wieder Anschluss an den Blutkreislauf erlangen.

Balanciert wird dieser Prozess durch diverse endogene Angiogeneseinhibitoren, wie z.B. Thrombospondin (Hynes, 2002) oder proteolytische Fragmente, wie z.B. Angiostatin, Tumstatin, PEX oder Endostatin (Skovseth et al., 2005). Die Interaktion des VEGFR-2 mit β -Catenin und dem vaskulären endothelialen Cadherin (VE-Cadherin) ist dabei für das Überleben der Endothelzellen von Bedeutung. Die Stabilisierung und Reifung dieser kapillären Plexus erfolgt durch Interaktion mit Perizyten, Bildung einer Basalmembran und Rekrutierung glatter Muskelzellen. Auch dieser Prozess scheint durch das Ceacam1 beeinflusst zu werden, wie Untersuchungen der Gefäßneubildung bei Tumormodellen ergaben (Gerstel et al., 2011).

In Epithelzellen vermag Ceacam1 durch Sequestrierung des Adapterproteins Shc die Proliferation zu reprimieren (Poy et al., 2002). Die Expression von Ceacam1 ist vermindert auf frühen Tumorepithelien zahlreicher Organe, wie z.B. des Kolons (Leung et al., 2006), der Prostata (Kleinerman et al., 1995; Tilki et al., 2006) und der Harnblase (Oliveira-Ferrer et al., 2004), wobei die tumorsuppressiven Eigenschaften von Ceacam1 an das Vorhandensein der langen Isoform (Ceacam1-4L) gebunden sind. Dabei spielt jedoch weniger die absolute Menge als das exprimierte Verhältnis zur kurzen Isoform eine wichtige Rolle. Hingegen kann, abhängig von der Konzentration von Ceacam1, das ebenfalls auf Kolon-epithelzellen exprimierte GPI-verankerte Ceacam5 (CEA) zur Apoptose führen (Nittka et al., 2008). Tumore der Prostata werden neben der herabgesetzten epithelialen Expression von einer Neovaskularisation mit Ceacam1-Expression auf angiogenetisch aktivierten Endothelzellen begleitet (Tilki et al., 2006). In humanen Lungenadenokarzinomzellen erfolgte die Ceacam1-4L-Expression abhängig von der Zellkonfluenz und erwies sich durch sein ITIM als Kontaktinhibitor der Proliferation (Singer et al., 2010).

1.2. Das Blutgefäßendothel

Das Blutgefäßendothel ist ein homogener Zellverband mesodermalen Ursprungs. Arterien, Venen und Kapillaren sind blutführende Leitungsbahnen und werden als Blutgefäße bezeichnet. Zusammen mit dem Herz stellen sie einheitlich das Blutkreislaufsystem dar. Kapillaren bestehen aus Endothelrohren, die von Perizyten unvollständig ummantelt und in den Organen an Austauschprozessen zwischen Blut und Gewebe beteiligt sind. Der Bautyp der Kapillaren kann hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit variieren. Arterien und Venen hingegen sind Blutleiter und bestehen aus drei Wandschichten, der Intima, der Media und der Adventitia. Dieser gemeinsame Bauplan jedoch ist in Anpassung an unterschiedliche Aufgaben der verschiedenen Gefäßabschnitte modifiziert. Bei den Arterien lassen sich nach Wandbau, Funktion und Lage herznahe Arterien vom elastischen Typ,

wie beispielsweise die Aorta, und organnahe Arterien vom muskulären Typ unterscheiden. Die Aorta, als größte Arterie vom elastischen Typ wird luminal von einer lückenlosen einlagigen Endothelzellschicht ausgekleidet, die einer rings geschlossenen Basalmembran aufsitzt, an deren Aufbau das Endothel durch Synthese von Proteinen wie z.B. Laminin 8 oder Typ-IV-Kollagen maßgeblich beteiligt ist (Hallmann et al., 2005). In Abgrenzung zur Tunica media folgen ein bindegewebiges Spatium subendotheliale und die Membrana elastica interna. Diese, wie auch die nachfolgenden konzentrischen elastischen Lamellen, besitzen eine porenartige Fensterung für einen erleichterten Stoffaustausch in der Gefäßwand. Transmembranöse Zelladhäsionsmoleküle verbinden die Endothelzellen mit der Basalmembran (z.B. Integrine), bilden interzelluläre Kontakte aus (z.B. Cadherine), vermitteln den Kontakt zu unpolaren Zellen des Blutes (z.B. Selektine) und sind intrazellulär dynamisch mit dem Zytoskelett verbunden (Shyy and Chien, 2002; Mehta and Malik, 2006; Ley, 2003; Yoshida et al., 1996). Somit sind Endothelzellen polare Zellen mit einer definierten apikalen, lateralen und basalen Oberfläche. Die Aorta, als größtes blutleitendes Gefäß, ist dem Herzen unmittelbar nachgeschaltet und durch ihren Reichtum an elastischen Fasern für eine ökonomische Herzarbeit unerlässlich, da sie das systolisch, pulsatil ausgetriebene Blut als eine Art Windkessel „zwischen speichert“ und dem Blutstrom diastolisch wieder zuführt, so dass ein kontinuierlicher Blutfluss gewährleistet wird. Ihre Elastizität bestimmt die Höhe des diastolischen Blutdrucks und ist für die Perfusion des Herzens während der Diastole wichtig. Aortale Endothelzellen sind flache (1-2 µm Dicke), spindelförmige Zellen, die sich parallel zum Blutstrom und zum Herzen hin ausrichten. Die fluide Membranoberfläche ihres Zellverbands sowie der intrazelluläre dynamische Umbau des Zytoskeletts minimieren den Widerstand gegen bzw. die Druckwirkungen durch den Blutstrom. Außerdem synthetisieren Endothelzellen vasoaktive Stoffe, wie z.B. NO, die einen regulatorischen Einfluss auf den Blutdruck, die Blutgerinnung, das Entzündungsgeschehen sowie das Wachstum und Überleben von Zellen ausüben (Cooke and Dzau, 1997; Li and Forstermann, 2000). Des Weiteren hat das aortale Endothel stetigen Kontakt mit allen Blutzellen und dem Blutplasma. Diese Kontaktzone an der endothelialen Oberfläche ist gekennzeichnet durch ein negativ geladenes, gelartiges Netzwerk aus Polysacchariden und Proteoglykanen, der sog. Glykokalyx (Nieuwdorp et al., 2005), sowie Mikroinvaginationen der Zellmembran, die sog. Caveolae (Frank et al., 2003). Diese Strukturen sind u.a. bedeutsam für die Signaltransduktion, die Aufnahme und den Transport von Lipiden in und durch die Endothelzellen, die Regulation der NO-Freisetzung oder die Hämostase. Darüber hinaus stehen für den Glukosestoffwechsel insulinunabhängige, transmembranöse Transportproteine (GLUT-1) zur Verfügung (Galley and Webster, 2004).

1.3. Endotheliale Dysfunktion

Der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ wurde erstmals im Jahre 1990 von Panza (Panza et al., 1990) verwendet. In einer Studie konnte bei Patienten mit essentieller Hypertonie mittels pletysmographischer Messung am Unterarm eine reduzierte Vasorelaxation nach intraarterieller Infusion von Acetylcholin in die Arteria brachialis beobachtet werden. Als Ursache dafür wurde bereits damals eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO durch den Neurotransmitter angenommen. Ursächlich dafür ist der auf molekularer Ebene als oxidativer Stress bezeichnete Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in den Gefäßwandzellen, der zur Inaktivierung des diffusiblen NO führt und seine zellulären Wirkungen aufhebt. In diesem Zusammenhang zählen neben der eingeschränkten Vasodilatation, eine Zunahme der Thromboseneigung, eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität, die Expression inflammatorischer Gene und ein vermehrter Zellumsatz zu den weiteren Charakteristika einer endothelialen Dysfunktion (Esper et al., 2006; Feletou and Vanhoutte, 2006).

Obgleich die endotheliale Dysfunktion eine zunächst reversible Funktionsstörung beschreibt, ist sie hinsichtlich ihrer Genese mit den gleichen kardiovaskulären Risikofaktoren wie der Atherosklerose assoziiert und stellt somit lediglich ein Vorläuferstadium dar. In Abgrenzung dazu stellt die vaskuläre endotheliale Seneszenz einen Zustand dar, der sich durch einen irreversiblen Funktionsverlust und pathomorphologischem Korrelat in Form abgeflachter und vergrößerter Endothelzellen auszeichnet (Erusalimsky, 2009; Minamino et al., 2004). Zu den makroangiopathischen Prädilektionsstellen der endothelialen Dysfunktion gehören in Anlehnung an die Atherosklerose der Aortenbogen, arterielle Gefäßabgänge und –bifurkationen (Davies et al., 1995; Traub and Berk, 1998; Cunningham and Gotlieb, 2005). Die aus der Herzleistung stammende mechanische Energie des Blutflusses wird pulsatil in Form von Reibung in Strömungsrichtung und einem senkrecht dazu gerichteten hydrostatischen Druck auf die durch interzelluläre Zell-Zell-Kontakte verbundene Endothelzellen der Gefäßwand übertragen. Im Falle der Endothelzellen dienen die Integrine (Shyy and Chien, 2002), Caveolae, Glykokalyx, Ionenkanäle und G-Proteine sowie zuweilen ein mechanosensitiver Komplex, bestehend aus dem VEGFR-2, VE-Cadherin und dem thrombozytär-endothelialen Zelladhäsionsmolekül-1 (Pecam1) (Hahn et al., 2009) als physikalische Adaptoren zur Umsetzung in ein biologisches Signal. In jenen prädilektiven Regionen des Gefäßsystems, in denen durch Oszillationen niedrige Gesamtscherspannungen des Blutflusses auftreten, weist das Endothel sämtliche Merkmale der Endothelzeldysfunktion und zytoskelettale Veränderungen auf (Traub and Berk, 1998; Cunningham and Gotlieb, 2005; Gimbrone, 2010).

Unabhängig von dem Einfluss atherosklerotischer Risikofaktoren, wie beispielsweise arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus, ist die Initiierung dieser fokalen vaskulären Funktionsstörung auf die Bioverfügbarkeit des in den Endothelzellen

synthetisierten NO zurückzuführen. Neben der Interaktion mit diversen aktivitätsmodulierenden Proteinen steht die Bildung des NO unter der Kontrolle der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Dissoziation der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (e-NOS) von Caveolin-1, der Phosphorylierung des Enzyms an Serin- und Threoninresten oder auf der Ebene der Transkription und Translation des Enzyms. Ersteres wird durch die Glykokalyx besorgt und ist vom Membranpotenzial der Endothelzelle abhängig (Noble et al., 2008) oder erfolgt z.B. nach Ligandenaktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Inositoltriphosphat. Daneben kann der Elektronenfluss und somit die NO-Produktion durch Übertragung von Phosphatgruppen sowohl gesteigert als auch inhibiert werden. So vermögen die Proteinkinase-A (PKA) und Proteinkinase-B/Akt (PKB/Akt) bei laminaren Wandschubspannungen die e-NOS zu aktivieren. Bei kontinuierlichen Scherspannungen im positiven Bereich ist sowohl der Kalziueinstrom durch Transkription kalziumabhängiger Kaliumkanäle, wie auch der Phosphorylierungsgrad der e-NOS verbessert. In diesem Zusammenhang wird die Genexpression des Enzyms wandschubspannungsabhängig durch einen Signalweg vermittelt, in die die zelluläre Signal-Erkennungs-Tyrosinkinase (c-Src) und die extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) involviert sind (Davis et al., 2004) sowie durch Aktivierung des redoxsensitiven NF- κ B. Im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus führt das in der Folge gebildete NO nicht nur zu einer adaptiven Gefäßwandrelexation, sondern hemmt die Aktivierung des NF- κ B durch vermehrte Genexpression der inhibitorischen Untereinheit I κ B und Nitrosylierung der Untereinheit p50. Folglich wird die Enzymexpression durch die NO-Bioverfügbarkeit limitiert. Obgleich die in atherosklerotischen Prädilektionsstellen auftretenden fluktuerenden Scherkräfte nur schwache Induktoren der e-NOS sind (Malek et al., 1999), ist in jenen Gefäßarealen jedoch zumindest die Proteinexpression durch redoxbedingte Aktivierung des NF- κ B erhöht. In Abhängigkeit vom Ausmaß des „oxidativen Stresses“, der eine durch zunehmende Generierung reaktiver Sauerstoffspezies verursachte Affektion struktureller und funktioneller Zelleigenschaften beschreibt, kommt es zu einer Inaktivierung von NO. Während Wasserstoffperoxid die Transkription der e-NOS durch Aktivierung des NF- κ B steigern kann, hat die rasche Reaktion des NO mit dem Sauerstoffradikal Superoxidanion nicht nur seinen potentiellen Verlust zur Folge, sondern generiert mit Peroxynitrit eine weitere reaktionsfähige Sauerstoffspezies (Patel et al., 2000). Des Weiteren ist die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal in Gegenwart von Eisen- oder Kupferionen möglich, was als Fenton-Reaktion bezeichnet wird. Mit Ausnahme ionisierender Strahlung oder der exogenen Zufuhr durch Inhalation, von z.B. Tabakrauch, entstehen diese Moleküle bei enzymatischen Reaktionen als Haupt- oder Nebenprodukte in den Gefäßwandzellen selbst, wie z.B. den Endothelzellen oder glatten Muskelzellen. Hauptenzyme, die zur Generierung dieser Moleküle beitragen, sind die NADH- bzw. NADPH-Oxidase (Griendling et

al., 2000; Dworakowski et al., 2006), die mitochondrialen Atmungskettenenzymkomplexe, die Cyclooxygenasen oder Cytochrom-P450-Oxidasen. Demgegenüber vermögen zelleigene Enzyme, wie die Superoxiddismutasen, die Katalase, die Glutathionperoxidase oder Thioredoxin sowie externe „Radikalfänger“, wie Ascorbinsäure oder Tocopherole reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren. Erst bei Auslastung dieser protektiven Antioxidantien hat die als „oxidativer Stress“ bezeichnete Redoxdysbalance Auswirkungen auf zelluläre Reaktionen. Diese gasförmigen Moleküle können durch Oxidation zu strukturellen und funktionellen Modifizierungen der DNA (z.B. Telomere), der RNA, der Proteine (z.B. p53) bzw. Enzyme (z.B. Phosphatasen) oder der ungesättigten Fettsäuren (z.B. Membranlipiden) führen. Dies kann entweder den Funktionsverlust bedeuten, wie es bei den Protein-Tyrosin-Phosphatasen der Fall ist, oder aber eine Aktivierung zur Folge haben wie im Fall des Tumorsuppressorproteins p53. Zudem ist die Formierung von Intermediärprodukten, wie z.B. den Isoprostanen aus Arachidonsäure möglich, die durch weitere enzymatische Umsetzung modulierenden Einfluss auf übergeordnete Zellprozesse ausüben (Benndorf et al., 2008). Durch Reaktion mit kritischen Cysteinresten und durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus sind reaktive Sauerstoffspezies in der Lage, das kleine GTP-Bindeprotein Ras, die c-Src oder MAPKs, wie z.B. die stress-aktivierte Serin-/Threonin-Proteinkinase SAPK/JNK zu aktivieren. Darüber hinaus können in analoger Weise redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie der NF- κ B oder das Aktivator-Protein-1 (AP-1), in ihrer Aktivität moduliert werden (Frey et al., 2009; Griendling et al., 2000). Oxidativer Stress mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit führt im Zuge dessen zur Expression inflammatorischer Gene, wie z.B. des Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1), des vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) oder vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Endothelin-1. Die NO-abhängige Synthese des Glutathions wird eingeschränkt, während die Expression der Superoxiddismutasen durch Wasserstoffperoxid gesteigert wird.

Der dynamische Umbau des endothelialen Zytoskeletts erfolgt durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie, zu denen u.a. RhoA, Rac1 und Cdc42 gehören. In ihrem GTP-beladenen aktiven Zustand sind sie u.a. für die Reorientierung des Mikrotubulus-Organisationszentrums mit Ausrichtung des Endothelzellverbands parallel zur Blutströmung, des Weiteren für die Bildung von Aktinstressfasern, die Zellkontraktilität und die Reifung fokaler Adhäsionen zuständig (Schwartz and Shattil, 2000). Endothelzellen in jenen Gefäßregionen mit oszillierenden Niederscherspannungen weisen eine ungeordnete Ausrichtung und eine herabgesetzte mechanische Haftung der Endothelzellen bei verminderter Aktinstressfaserbildung auf. Des Weiteren kommt es zur Ausbildung eines dichten peripheren Aktinbandes (Ogunrinade et al., 2002), das der Restriktion der parazellulären Permeabilität dient, währenddessen die transzelluläre Permeabilität für Makromoleküle, wie z.B. LDL, Albumin und Fibronektin erhöht ist (Fry et al., 1993). Die für die endothe-

liale Dysfunktion charakteristischen zytoskelettalen Veränderungen können insofern durch eine Redoxdysbalance erklärt werden, als dass die Rho-GTPasen einerseits selbst zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen, z.B. durch Rac1 und die NADPH-Oxidase (Tzima et al., 2002; Mehta and Malik, 2006), oder aber ihre Aktivität durch oxidativen Stress reduziert wird, wie z.B. für RhoA durch gesteigerte Phosphorylierungsreaktionen durch die c-src, sowie durch Inhibition redoxsensitiver, niedrigmolekularer Phosphatasen mit konsekutiver Aktivierung des RhoA-Inhibitors p190RhoGAP und des p120-Catenins (Jaffer and Chernoff, 2004). Ferner kommt das kleine GTP-Bindeprotein Ras zum Tragen, da es redoxsensitiv ist und Rac1 zu aktivieren vermag. Durch zeitlich gemittelte Niedrigscherspannungen in Strömungsrichtung und in Abhängigkeit von der subendothelialen Extrazellulärmatrix, wie z.B. Fibronectin, führt auch die konformative Aktivierung der heterodimeren Integrine über Ras und GTP-Rac1 durch Aktivierung der NADPH-Oxidase zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Tzima et al., 2002; Tzima et al., 2005, Shyy and Chien, 2002). Zusammengenommen sprechen die gestörte Endothelzellausrichtung, die Bildung eines dichten peripheren Aktinbandes, die verminderte Maturation fokaler Adhäsionen und Stressfaserbildung für ein Überwiegen der Aktivität von Rac1 gegenüber RhoA und können von dem veränderten Redoxstatus abgeleitet werden. Im arteriellen Hochdrucksystem sind die Blutströmungsprofile in Regionen mit komplexer Gefäßgeometrie ausreichend, um eine endotheliale Dysfunktion zu provozieren. Diese haben die Erhöhung der Permeabilität, die Expression inflammatorischer Gene sowie die Zunahme von Zellproliferation und Apoptose zur Folge. Daneben wird die Blutkoagulation angeregt und extraendothelial der Tonus und das Wachstum glatter Muskelzellen gesteigert.

1.4. Atherosklerose

Die makroangiopathische Atherosklerose ist eine der Haupttodesursachen der westlichen Welt und stellt eine chronische, aseptische Entzündung dar, die primär das arterielle Hochdrucksystem betrifft. Das Endstadium dieser chronischen Erkrankung ist durch eine Ischämie lebensnotwendiger Organe gekennzeichnet. Als Ursachen für die Minderdurchblutung und Infarktierung gelten das kritische Plaquewachstum, die Plaqueruptur, die Thrombusformation, die Verschleppung von Plaque- oder Thrombusmaterial sowie Störungen der Vasomotion im Falle der Arteriosklerose (van der Wald and Becker, 1999; Lutgens et al., 2003; Agius, 2007). Zu den Risikofaktoren in der Genese der Atherosklerose zählen neben Alter und Geschlecht im Wesentlichen die arterielle Hypertonie, die Dyslipoproteinämie, der Diabetes mellitus, das Tabakrauchen und die Hyperhomocysteinämie.

Der arteriellen Hypertonie liegt die weitaus am häufigsten (>90%) vorkommende polyäti-

logische, primär essentielle Hypertonie zugrunde. Damit assoziiert wurden Veränderungen des Angiotensinogen-Gens, der Gene für Adrenorezeptoren und von Signalproteinen wie den G-Proteinen. Daneben existieren die seltenen Formen der sekundären arteriellen Hypertonie bei renoparenchymatösen Schädigungen, endokrinen Störungen oder als Nebenwirkung von Medikamenteneinnahme (Philipp, 1999). Ebenfalls führt jede Atherosklerose nicht-hypertoner Genese sekundär zu einer arteriellen Hypertonie. Die Genese der essentiellen Hypertonie beruht auf Veränderungen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bzw. des sympathischen, vegetativen Nervensystems. Da beide Systeme durch die sympathomimetische Wirkung des Angiotensin-2, als auch mit der katecholaminabhängigen Freisetzung des renalen Renins miteinander verbunden sind, führt die essentielle Hypertonie auch zur Freisetzung des suprarenalen Mineralkortikoids Aldosteron und des neurohypophysären Oktapeptids ADH bzw. Vasopressin. Somit ist die essentielle Hypertonie sowohl ein Widerstands- als auch ein Volumenhochdruck mit arteriöler Vasokonstriktion und Blutvolumenanstieg. Die Abnahme der Windkesselfunktion elastischer Arterien und der pulsatilen Blutströmung sowie die Erhöhung der systolischen Scherkräfte und die Verminderung des diastolischen Blutflusses resultieren in transienten turbulenten Strömungen und vermehrten oszillierenden Wandspannungen an Endothelzellen. Dies hat in atherosklerotischen Prädilektionsstellen eine Aggravierung der endothelialen Dysfunktion zur Folge, da die Abnahme der diastolischen Strömung in Kombination mit einem Anstieg der auf das Endothel einwirkenden physikalischen Kräfte zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität und über gesteigerte intergrinvermittelte Ras-Aktivierung zu vermehrtem oxidativen Stress führt (Shyy and Chien, 2002; Tzima et al., 2002). Jene Endothelzellfunktionsstörungen können u.a. durch zunehmende Störungen im Aufbau des endothelialen Zytoskeletts sowie durch blutströmungsbedingte Abnahme der Stabilität des Transkriptionsfaktor KLF-2 erklärt werden (Atkins and Jain, 2007). Auch hypertonieassoziierte Mediatoren, wie z.B. das vasokonstriktorisches Peptid Angiotensin-2, führen über die Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies-generierenden Enzymen zu vermehrtem oxidativen Stress der Gefäßwand (Griendling et al., 2000). Die verminderte NO-Bioverfügbarkeit bei Erhöhungen des Blutdrucks führt zu einer vermehrten Synthese des Endothelin-1, als auch zu einer Disinhibition des NF- κ B. Obgleich kompensatorisch eine wandschubspannungsabhängige und redoxbedingte Steigerung der e-NOS-Expression erfolgt, führen dauerhaft erhöhte Blutscherkräfte zu einer Abnahme des endothelialen Membranpotenzials und der kalziumabhängigen Aktivierbarkeit der e-NOS, deren Aktivität zunehmend vom Phosphorylierungsgrad abhängig wird. Auch wird das Genexpressionsmuster für Wachstumsfaktoren verändert. Die Bildung des transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ist vermindert und die des Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGF) ist erhöht (Davies, 1995), was die glatte Gefäßmuskulatur zur Proliferation

angeregt.

Unter den Störungen des Lipidstoffwechsels zählt in erster Linie eine Erhöhung des Plasmacholesterinspiegels zu den disponierenden Faktoren für eine Atherosklerose. Da das LDL hauptsächlich für den Transport des Cholesterins zuständig ist, liegt der isolierten primären Hypercholesterinämie eine Dysfunktion des LDL-Rezeptors zugrunde. Wesentlich häufiger aber tritt die Dyslipidämie kombiniert mit einem Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, arterieller Hypertonie und Hyperurikämie im Rahmen des sog. metabolischen Syndroms auf. In diesen Fällen ist der Plasmaspiegel des atheroprotektiven HDL vermindert, während der von triglyzeridreichen Lipoproteinen erhöht ist. Die Atherosklerose wird initiiert durch die subendotheliale Deposition von Cholesterin. Dieser Prozess ist abhängig von der Plasmakonzentration des Steroids, der Permeabilität und dem blutdruckbedingten Filtrationsdruck. Zum einen gelangen LDL-Partikel passiv durch interendotheliale Diffusion dorthin, wo sie durch membrangängige reaktive Sauerstoffspezies, wie protoniertes Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid, chemisch modifiziert werden können. Andererseits werden sie über endotheliale LDL-Rezeptoren an der Membranoberfläche endozytotisch aufgenommen. Letzteres bewirkt die Freisetzung von Arachidonsäure und Aktivierung der Phospholipase A2 mit konsekutiver Produktion von Superoxidanionen durch die NADPH-Oxidase. Superoxidanionen führen nicht nur zu oxidativen Veränderungen des LDL (ox-LDL), sondern provozieren auch die transendotheliale Passage (Meyer and Schmitt, 2000). Ox-LDL, Angiotensin-2 und Endothelin-1 sind darüber hinaus potente Induktoren für den sog. endothelialen, lektinartigen, oxidierten LDL-Rezeptor-1 (LOX-1), der ähnlich den Scavenger-Rezeptoren der Monozyten/Makrophagen nicht einer negativen Rückkopplung unterliegt. Die Aufnahme des ox-LDL führt über diesen Rezeptor zu einer verminderten Expression der e-NOS sowie zu einer vermehrten Expression inflammatorischer Adhäsionsmoleküle. Des Weiteren finden sich im Plasma von Patienten mit Hypercholesterinämie erhöhte Werte des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA), das ein kompetitiver Inhibitor der e-NOS ist (Boger et al., 1998). Eine vermehrte Exposition der Endothelzelle mit LDL-Partikeln steigert sowohl die Akkumulation, als auch die Aktivierung von Ras in den Caveolae, das die Signaltransduktionsfortleitung über MAPKs zur Folge hat, so dass ein Anstieg der LDL-Plasmakonzentration zudem als ein Proliferationssignal verstanden werden kann (Zhu et al., 2000; Frank et al., 2003). Des Weiteren ist ox-LDL in der Lage, die endotheliale Permeabilität durch Verminderung des VE-Cadherins in interendothelialen Junctionen zu erhöhen (Hashimoto et al., 2007).

Diabetes mellitus beschreibt eine Glukosestoffwechselstörung, die an das Peptidhormon Insulin gebunden und in bisweilen drei verschiedene Typen unterteilbar ist. Typ 1 ist durch einen autoimmunologischen Untergang der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas gekennzeichnet, wird auch als juveniler Typ bezeichnet und führt zu einem absoluten In-

sulinmangel. Beim Diabetes Typ 3 kommt es ebenfalls zu einer Reduktion des funktionsfähigen endokrinen Gewebes in der Bauchspeicheldrüse, jedoch nicht primär genetisch bedingt, sondern im Rahmen von Begleiterkrankungen, wie z.B. Entzündungen oder Tumoren des Organs. Im Gegensatz dazu ist bei dem auch als Altersdiabetes bezeichneten Typ 2 Diabetes kein Insulinmangel, sondern eine Hormonresistenz bzw. eine Herunterregulation von Insulinrezeptoren, verbunden mit einer Hyperinsulinämie, ursächlich. Dieser Diabetestyp tritt zudem im Rahmen des metabolischen Syndroms auf und ist mit falscher Ernährung und Bewegungsmangel verknüpft. Obgleich der Diabetes mellitus in erster Linie zu mikroangiopathischen Veränderungen, insbesondere der Nieren und Augen, führt, besteht zugleich ein erhöhtes Risiko für eine beschleunigte Entwicklung der Atherosklerose. Im kardiovaskulären System sind insbesondere diejenigen Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt, die mit insulinunabhängigen Glukosetransportsystemen der Zellmembran ausgestattet sind, wie z.B. Endothelzellen, kapilläre Perizyten oder zirkulierende Blutzellen, wie z.B. die Leukozyten (Böcker et al., 2001). In diesen Zellen bewirkt die überschüssige Glukose über Sorbitol und Fruktose einen Anstieg der intrazellulären Osmolarität und damit der Wasseraufnahme, was mit einer Zellschwellung und Funktionseinschränkung, z.B. von ATPasen, einhergeht. Des Weiteren werden extra- und intrazelluläre Glykoproteine durch nicht-enzymatische Glykosylierung strukturell und funktionell modifiziert. LDL-Partikel in der Intima muskulärer Arterien verbinden sich irreversibel mit derart veränderten Glykoproteinen, was deren Ablagerung und somit die Entwicklung der Atherosklerose beschleunigt. Die persistierende Hyperglykämie ist weiterhin assoziiert mit hoher intrazellulärer Diacylglycerolkonzentration und Aktivität der Proteinkinase-C sowie vermehrter Expression der NADPH-Oxidase. Eine positive Verstärkerschleife für reaktive Sauerstoffspezies kann durch Schädigung mitochondrialer Atmungskettenenzymkomplexe, wie den eisen-schwefelreichen Komplexen I und II, erfolgen, was folglich den Elektronentransport behindert und die Produktion von Sauerstoffradikalen erhöht (Ballinger et al., 2002). Der oxidative Stress mit vermehrter Lipidperoxidation hat die Bildung von sog. fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukten (AGEs) zur Folge. Zum einen sind AGEs in der Lage NO zu inaktivieren, zum anderen binden sie an spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Immunglobulinsuperfamilie (RAGE), was die Aktivierung der MAPKs, des NF- κ B und des AP-1 zur Folge hat (Frey et al., 2009). Eine Hyperinsulinämie, wie sie beim häufigen Diabetes mellitus Typ 2 auftritt, steigert über MAPKs die Expression des Typ1-Rezeptors für Angiotensin 2 an der glatten Gefäßmuskulatur (Samuelsson et al., 2006; Nickenig et al., 1998), was eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, eine erhöhte Zellteilungsrate sowie die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie zur Folge hat. Des Weiteren fördert eine anhaltende Hyperinsulinämie die Lipoproteinsynthese und Glukosefreisetzung der Leber, einhergehend mit einem relativen Überwiegen der kate-

cholaminergen Glykogenolyse und Lipolyse im insulinresistenten Fettgewebe oder in der Skelettmuskulatur. Somit sind sowohl die Hyperglykämie als auch die Hyperinsulinämie proatherogene Faktoren des Diabetes mellitus.

Das Tabakrauchen erhöht nicht nur das Tumorwachstum exponierten Gewebes durch Mutationen im Genom der Zellen, sondern birgt auch, durch chronische Zufuhr von exogenen Radikalen und des Alkaloids Nikotin, Gefahren für das kardiovaskuläre System. Das reversibel an Thiolgruppen, bevorzugt des oxygenierten Hämoglobins der Erythrozyten oder des Albumins, gebundene NO aus pulmonalen Gefäßen kann in die systemische Blutzirkulation transportiert werden und zur dortigen NO-Bioverfügbarkeit beitragen (Cooke and Dzau, 1997; Lima et al., 2010). Durch Inhalation von Tabakrauch wird diese Fraktion inaktiviert und dem nachgeschalteten Gefäßbett entzogen. Zusammen mit der Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark durch Nikotin stellt sich bei chronischem Tabakrauchen eine arterielle Hypertonie ein. Darüber hinaus wird auch die Glykolyse und Lipolyse durch katecholaminerge Aktivierung von β_2 -Adrenorezeptoren gesteigert. Weiterhin steigert Nikotin die endotheliale Permeabilität, führt zu einer Erhöhung der Blutviskosität durch Anstieg des Plasmafibrinogens und wirkt zudem proaggregatorisch auf die Blutgerinnung (Alexander, 1999).

Bei der Hyperhomocysteinämie kommt es vor allem durch hepatische Akkumulation zu abnorm hohen Plasmawerten der nicht-proteinogenen Aminosäure Homocystein. Hintergrund liegen entweder ein genetisch bedingter Enzymmangel oder eine Hypovitaminose vor. Der Enzymmangel kann entweder den Abbau der Aminosäure oder die Wiedereinschleusung in den Methioninstoffwechsel betreffen. Gleiches kann auch durch einen Mangel der Vitamine Folsäure, Pyridoxin oder Cobalamin hervorgerufen werden (Herrmann and Knapp, 2002). Eine Hyperhomocysteinämie führt einerseits zu einer Akkumulation von ADMA und verminderter NO-Synthese, andererseits zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wie z.B. dem Homocystein-Thiolacton. Zudem ist Homocystein mit einer Einschränkung der endothelialen Thrombomodulinsynthese assoziiert. Zusammengenommen trägt diese Stoffwechselstörung insbesondere durch Erhöhung des oxidativen Stresses zur Pathogenese der Atherosklerose bei.

Das aktivierte Endothel fördert mit der Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen und der Sekretion von Zytokinen und chemotaktischen Proteinen die Migration von Monozyten in die Gefäßwand, die das intimal deponierte Cholesterin rezeptorvermittelt internalisieren und über Reesterifizierung zusammen mit Apolipoprotein-E in das Blut sezernieren. Mittels Bindung an HDL kann es dann zur Leber zurücktransportiert werden. Bei Auslastung dieses „reversen Cholesteroltransports“ jedoch transformieren die Monozyten/Makrophagen in sogenannte Schaumzellen, ein Prozess der durch inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interferon- γ aus Th1-Lymphozyten, gefördert wird. Aktivierte Mo-

nozyten/Makrophagen synthetisieren sodann vermehrt vasoaktive Substanzen, reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme. Die Aktivierung jener Leukozyten kann weiterhin bereits nach Bindung von ox-LDL an sog. Toll-like-Rezeptoren oder rezeptorvermittelt durch AGEs erfolgen (Hansson et al., 2006). Die Freisetzung von Zytokinen, wie z.B. des TNF- α , führt zu einer Steigerung der endothelialen Expression inflammatorischer Adhäsionsmoleküle und der endothelialen Permeabilität durch SAPK/JNK-vermittelte Phosphorylierung von VE-Cadherin (Nwariaku et al., 2004; Dworakowski et al., 2006). Außerdem fördert TNF- α extraendothelial die Thrombozytenaggregation und kann in glatten Gefäßmuskelzellen die Expression der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxidsynthase (i-NOS) zur Folge haben. Aktivierte Makrophagen und Thrombozyten sezernieren des Weiteren den PDGF, der eine Induktion der NADH- bzw. NADPH-Oxidase in der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt (Marumo et al., 1997). Die resultierenden Peroxynitrite fördern mit der Formation von Nitrotyrosinen die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Bildung von Matrixmetalloproteinasen und die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in diesen Zellen (Mu et al., 2008). Die Transformation von glatten Muskelzellen in einen sekretorischen Phänotyp erfolgt nach Internalisierung von ox-LDL über Scavenger-Rezeptoren. In der Folge verlieren die Zellen ihr Reaktionsvermögen auf NO durch Herunterregulation der PKG und bilden proinflammatorische Substanzen, wie z.B. MCP-1 sowie vermehrt Extrazellulärmatrix. In Abhängigkeit von blutströmungsbedingten Wandschubspannungen und der Aktivität des RhoA-Inhibitors p190Rho-GAP (Urbich et al., 2003; Abumiya et al., 2002; Liu and Agarwal, 2010), vom Redoxstatus (Nespereira et al., 2003; Gonzalez-Pacheco et al., 2006) sowie dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Giraudo et al., 1998; Hoeben et al., 2004; Atkins and Jain, 2007) steigert das Endothel die Expression des VEGFR-2. Bindung des VEGF an den VEGFR-2 führt zur Expression von Ceacam1 und aktiviert überlebensfördernde, antiapoptotische Signalwege in den Endothelzellen. Zu diesen Signalwegen zählen die Phosphorylierung des Adapterproteins Paxillin und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Zachary and Glikli, 2001; Zachary et al., 2000), mit integrinvermittelter Zellzyklusprogression (Schwartz and Assoian, 2001). In Anwesenheit von VE-Cadherin bewirkt die Ligandenaktivierung des VEGFR-2 zusätzlich durch Aktivierung der PI-3-Kinase eine Hochregulierung des wachstumsspezifischen Gens Gas1 (Wallez et al., 2006), die Phosphorylierung und Inaktivierung der proapoptotischen Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) durch die PKB/Akt (Liu and Agarwal, 2010) sowie die Inhibition des proapoptotischen Bad und der Caspase-9. Auch die gesteigerte NO-Synthese vermag, z.B. durch reversible S-Nitrosylierung der proapoptotischen Caspase-3 überlebensfördernde Wirkung auszuüben (Hoffmann et al., 2003). Die entzündungsbedingte Exsudation von Plasmabestandteilen in die vaskuläre Intima, die Invasion von Leukozyten sowie die Proliferation und Migration von glatten

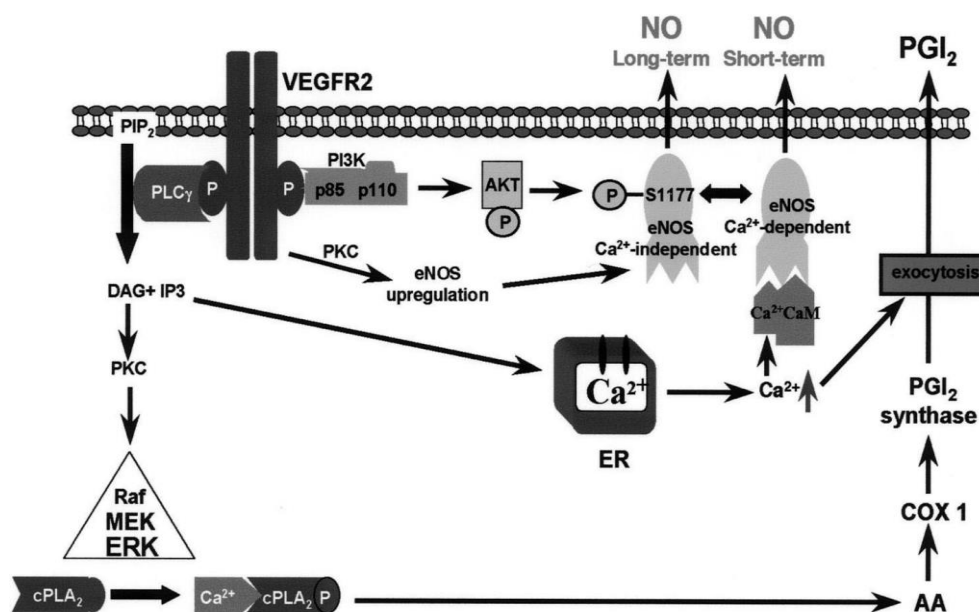
Muskelzellen führt zur Formation einer verbreiterten sog. Neointima. Als pathomorphologisches Korrelat einer Fremdkörperreaktion auf Cholesterin liefern degradierte Schaumzellen das zuweilen reversible pathomorphologische Korrelat in Form von sog. Fettstreifen (fatty streaks). Bei Persistenz der Risikofaktoren besteht die Möglichkeit der Progression dieser Läsionen in atherosklerotische Plaques, wobei neben immunpathologischen Mechanismen, wie z.B. die Bildung von Autoantikörpern gegen ox-LDL oder das Hitzeschockprotein 60 (Hsp60), die Verschlechterung des Redoxstatus ausschlaggebend ist (Hansson et al., 2006). Durch Inaktivierung des Cofaktors Tetrahydrobiopterin führen reaktive Sauerstoffspezies zu einer „Entkopplung“ der e-NOS, was seinerseits zur Folge hat, dass das Enzym dazu beiträgt, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden (Endemann and Schiffrin, 2004). Hinzu kommt der Verlust der antiinflammatorischen, -oxidativen und -apoptotischen Wirkung des NO. Obwohl der immunologischen Reaktion durch Antikörperbildung gegen diverse Antigene die Stimulation von B-Lymphozyten durch CD4-positive T-Helfer-Zellen vom Subtyp 2 (Th2) zu Grunde liegt, ist dennoch der die Aktivität der Makrophagen kontrollierende Subtyp 1 (Th1) dominierend in atherosklerotischen Plaques. Grundsätzlich werden Atherome luminal von Endothelzellen bedeckt. Sie enthalten einen Lipidkern, glatte Muskelzellen und Extrazellulärmatrix sowie in unterschiedlichem Ausmaß Entzündungszellen und kapilläre Blutgefäße. Diese Kriterien erlauben des Weiteren eine grobe Unterteilung hinsichtlich der Stabilität bzw. Rupturgefahr von atherosklerotischen Plaques. Instabile Plaques sind nicht selten kleiner als stabile Plaques, besitzen jedoch einen großen Lipidkern, viele Entzündungszellen und wenig Extrazellulärmatrix (Krone und Müller-Wieland, 1999). Aus dieser fokalen Verbreiterung der Gefäßwand resultiert eine Einengung des Gefäßlumens, die zusammen mit der gestörten Vasorelaxation einen Anstieg der auf das Endothel wirkenden Scherkräfte zur Folge hat. Darüber hinaus geht mit der Entstehung turbulenter Strömungen die induktive Wirkung auf die e-NOS-Expression verloren. Unter dem intensivierten Einfluss von Risikofaktoren unterbleibt die Stabilisierung eines Plaques, der ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort zugrunde liegt. Die verminderte Bildung, u.a. des TGF- β aus regulatorischen T-Zellen und Endothelzellen, sowie die vermehrte Produktion von z.B. Interferon- γ aus Th1-Lymphozyten vermögen eine Reduktion der Extrazellulärmatrix des Plaques zu bewirken. Dies geschieht einerseits durch Hemmung der Matrixsynthese in glatten Muskelzellen oder durch Stimulation des enzymatischen Abbaus durch Matrixmetalloproteinasen, Cystein-Proteasen oder Chymasen. Letzteres wird durch oxidativen Stress begünstigt, da reaktive Sauerstoffspezies die inaktive Sekretionsform, z.B. der Matrixmetalloproteinasen, in die proteolytisch-enzymatische Wirkform überführen. Die Ausdünnung einer aus Kollagen und glatten Muskelzellen bestehenden, den Lipidkern bedeckenden, fibrösen Kappe birgt zusammen mit der Entwicklung kritischer Strömungs-

verhältnisse die Gefahr der Plaqueruptur (van der Wald and Becker, 1999; Lutgens et al., 2003; Agius, 2007), die gewöhnlich im Bereich der sog. „Schulter“ des Plaques auftritt. Der Verlust des protektiven Endothels hat den sofortigen Einsatz der Bluthämostasie, Thrombusformation und Ischämie nachgeschalteter Organe, u.a. des Gehirns oder des Herzens, zur Folge (Hansson et al., 2006).

1.5. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor-2

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-A (VEGF, VEGF-A) ist ein glykosyliertes Polypeptid, von dem durch alternatives „Splicing“ der m-RNA bisweilen fünf verschiedene Isoformen existieren (Zachary and Glick, 2001; Zachary et al., 2000). Das Gen für den VEGF befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 6 und bei der Maus auf dem Chromosom 17. Obgleich alle Isoformen eine homologe Domäne der Cysteinknotenfamilie aufweisen, unterscheiden sie sich hinsichtlich der Anzahl ihrer Aminosäuren (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) sowie der Affinität zu extrazellulären Matrixkomponenten, wie z.B. Heparansulfat-Proteoglykanen (Petrova et al., 1999). Mit Ausnahme der frei löslichen, kleinsten Isoform, dem VEGF₁₂₁, können alle übrigen Isoformen, insbesondere der VEGF₁₈₉ und der VEGF₂₀₆ von extrazellulären Heparinresten gebunden und sequestriert werden (Liekens et al., 2001). Die häufigste Isoform des Menschen ist der VEGF₁₄₅, der ein durch Disulfidbrücken verbundenes, homodimeres Glykopeptid mit einem Molekulargewicht von 46 kDa, darstellt. Der VEGF wird u.a. gebildet in glatten Gefäßmuskelzellen (Stavri et al., 1995), Thrombozyten (Blann, 2004), Makrophagen, Perizyten (Hall, 2006) und Endothelzellen. Dabei wird die Synthese des VEGF in der glatten Gefäßmuskulatur u.a. gesteigert durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. den PDGF und den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) (Stavri et al., 1995), sowie durch vasoaktive Peptide, wie z.B. das Angiotensin 2 (Williams et al., 1995). Weiterhin wird die Produktion des VEGF in Makrophagen durch ox-LDL (Riazy et al., 2009), in Thrombozyten durch Thrombin und in Endothelzellen durch H₂O₂, TNF- α und hypoxie-induzierbare Faktoren erhöht (Gonzalez-Pacheco et al., 2006; Yoshida et al., 1997; Hoeben et al., 2004; Ryu et al., 2008). In die VEGF-Familie eng verwandter Wachstumsfaktoren gehören darüber hinaus der VEGF-B, der plazentare Wachstumsfaktor (PlGF), der VEGF-C, der VEGF-D und der VEGF-E. Für jene Liganden stehen in erster Linie drei Wachstumsfaktorrezeptoren, der VEGFR-1, der VEGFR-2 und der VEGFR-3, zur Verfügung (Zachary and Glick, 2001). Obgleich der VEGF eine höhere Bindungsaffinität zum VEGFR-1 als zum VEGFR-2 besitzt und der VEGFR-1 antagonistisch am VEGFR-2 des Endothels zu wirken scheint, ist im Rahmen der physiologischen und pathologischen Blutgefäßneubildung die Interaktion des VEGF mit dem VEGFR-2 vordergründig (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Veikkola and Alitalo, 1999). In diesem Zusammenhang verbessert die simultane Expression des

transmembranösen Neuropilin-1 die Anlagerung des VEGF an jene Rezeptoren um das Vierfache und erhöht die rezeptorvermittelte, zelluläre Signaltransduktion. Darüber hinaus besitzen der VEGF-C und der VEGF-D eine vergleichsweise geringere Affinität, der vom DNA-Doppelstrang-Virus Orf der Gattung Parapoxviridae codierte VEGF-E hingegen eine ähnlich hohe Affinität zum VEGFR-2 (Lenton, 2002). Aktivierung des VEGFR-2 durch den VEGF hat mitunter die Erhöhung der endothelialen Permeabilität, die Inhibition der Apoptose von Endothelzellen, die Synthese von NO, Prostazyklin und Angiopoeitin-2 sowie die Expression von Ceacam1 zur Folge. Weiterhin wird die Extrazellulärmatrix durch Matrixmetalloproteinasen und Plasminogenaktivatoren degradiert und die Proliferation und Migration der Endothelzellen angeregt (Zachary and Glicki, 2001).



NO- und PGI₂-Produktion durch den VEGFR-2. Bindung des VEGF an seinen Rezeptor steigert die kurz- und langfristige NO-Synthese durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie durch Transkription und Phosphorylierung der e-NOS. Zudem wird durch Phosphorylierung der Phospholipase A₂ und Anstieg des Kalziums die Bildung und Exozytose von PGI₂ gesteigert. NO und PGI₂ sind vaskuloprotektive Mediatoren und weisen antithrombogene, antiinflammatorische, vasorelaxierende und wachstumsmodulierende Eigenschaften auf (Zachary and Glicki, 2001).

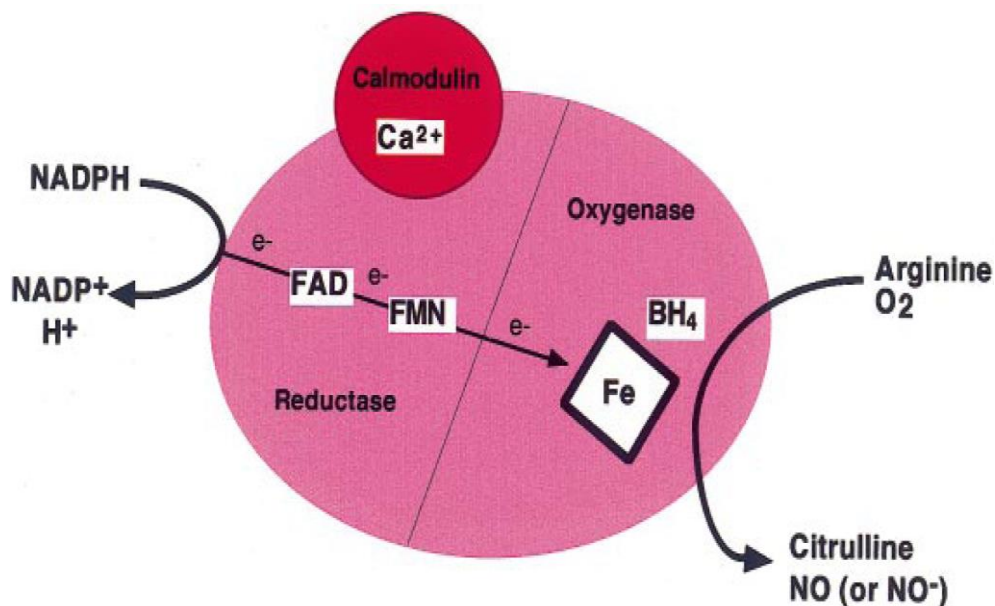
Der VEGFR-2 besitzt eine N-terminale, extrazelluläre Ligandenbindungsregion mit sieben Ig-ähnlichen Domänen, einen transmembranösen Abschnitt und einen intrazellulären C-Terminus für die Bindung von Rezeptortyrosinkinasen und -phosphatasen. Das Gen des VEGFR-2 befindet sich auf dem humanen Chromosom 4 bzw. murinen Chromosom 5, codiert für ein einziges Protein mit einem Molekulargewicht von 230 kDa im voll glykosy-

lierten Zustand (Petrova et al., 1999; Lenton, 2002). Der VEGFR-2 wird bereits pränatal auf Vorläuferzellen mesodermaler Blutinseln und diese umgebenden Angioblasten, dem Endokard, sowie Endothelzellen großer und kleiner Gefäße exprimiert (Lenton, 2002). Postnatal wird der Rezeptor auf vaskulären Endothelzellen sowie auf Thrombozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Megakaryozyten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und pankreatischen Gangepithelzellen exprimiert. Ligandenbindung hat die Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosylreste und Anlagerung von Adapterproteinen mit SH2-Domäne, wie z.B. Shc, Grb2, SHP-1 und SHP-2, der Phospholipase C γ , der PI-3-Kinase oder dem GTPase-aktivierenden Protein zur Folge (Löffler, 2000). In Endothelzellen folgen dieser Initiierung der Rezeptoraktivierung der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Inositoltriphosphat (IP $_3$), die Aktivierung nachgeschalteter Kinasen, wie z.B. der Proteinkinase-C durch Diacylglycerin (DAG), die Phosphorylierung und Aktivierung der ERK, der FAK und der Proteinkinase-B (PKB/Akt), sowie die Phosphorylierung der zytosolischen, kalziumabhängigen Phospholipase A $_2$ durch die ERK. Die endotheliale Aktivierung des Rezeptorgens steht unter dem Einfluss einiger Transkriptionsfaktoren (Meadows et al., 2009). So wird die Expression bzw. die Aktivität des VEGFR-2 u.a. gesteigert durch den bFGF, TNF- α , Hypoxie und Blutscherspannungen bzw. Neuropilin-1 (Urbich et al., 2003; Hoeben et al., 2004; Abumiya et al., 2002; Zachary and Glicki, 2001). Weiterhin ist die Expression des Rezeptors von der Aktivierung des NF- κ B abhängig, da NO und H $_2$ O $_2$ die Transkription gegensinnig zu regulieren vermögen (Shen et al., 1998; Nespereira et al., 2003; Gonzalez-Pacheco et al., 2006). Auch die Anlagerung seines Hauptbindungspartners, dem VEGF, führt zur Expressionssteigerung des VEGFR-2, zum einen durch eine Caveolae-assoziierte und Mikrotubulus-abhängige nukleäre Translokation des Rezeptors mit anschließender Transkriptionssteigerung (Domingues et al., 2011), andererseits durch einen c-Src-abhängigen Transport des VEGFR-2 aus endosomalen Speichervesikeln zur Plasmamembran (Gampel et al., 2006). Hingegen hemmen u.a. der TGF- β und der RhoA-Inhibitor p190Rho-GAP (Liu and Agarwal, 2010) bzw. die Proteintyrosinphosphatase HCPTPA und der VEGFR-1 seine Expression bzw. Signalwirkung.

1.6. Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (e-NOS) ist ein NO-generierendes Enzym, das in Endothel- und endothelialen Progenitorzellen (Qiao et al., 2010), in Thrombozyten, im Myokard, im respiratorischen Epithel der Bronchien und Bronchiolen der Lunge und im Tubulusepithel der Nieren exprimiert wird. Die aktive Form des Enzyms besteht aus einem Dimer zweier e-NOS-Monomere und zwei angelagerten Kalzium-Calmodulin-Komplexen. In Gegenwart der Cofaktoren Flavinadeninucleotid (FAD), Flavinmononu-

cleotid (FMN), Eisen-Protoporphyrin IX (Häm) und Tetrahydrobiopterin (BH₄) katalysiert es, ausgehend von den Substraten L-Arginin, molekularem Sauerstoff und Reduktionsäquivalenten des NADPH, die Bildung von NO, Citrullin und reoxidiertem NADP⁺ (Alderton et al., 2001). Bei dieser Reaktion erfolgen in beiden Monomeren je fünf Elektronentransfers von der C-terminalen Reduktasen- zur N-terminalen Oxygenasendomäne. Die e-NOS ist beim Menschen auf dem Chromosom 7 und bei der Maus auf dem Chromosom 5 lokalisiert und weist ein Molekulargewicht von etwa 130 kDa auf. Die zelluläre Lokalisation des Enzyms wird durch co-translationale, irreversible Acylierung mit Myristinsäure sowie durch posttranslationale, reversible Acylierung mit Palmitinsäure determiniert. Für die Assoziation der e-NOS mit der Zellmembran ist die duale Acylierung notwendig, wohingegen die alleinige Anheftung von Myristinsäure eine bevorzugte Anreicherung der e-NOS in intrazellulären Kompartimenten, wie z.B. dem Golgi-Apparat zur Folge hat (Shaul, 2002; Fulton et al., 2002). Außerdem erfolgt im Gegensatz zu statischen Endothelzellkulturen erst beim Auftreten von laminären Blutscherkräften die Translokation des e-NOS-Inhibitors Caveolin-1 vom Golgi-Komplex in die Caveolae der Plasmamembran, einhergehend mit einer Aktivitätsabnahme der ERK und einer -zunahme der PKB/Akt (Boyd et al., 2003).



Katalytische Gesamtreaktion eines e-NOS-Monomers. Die Bindung von Kalzium-Calmodulin ist erforderlich für den Elektronentransport in der Reduktasendomäne der e-NOS ausgehend von Reduktionsäquivalenten des NADPH. Für die Bildung des NO ist ferner die freie Verfügbarkeit der basischen Aminosäure Arginin von Bedeutung (Alderton et al., 2001).

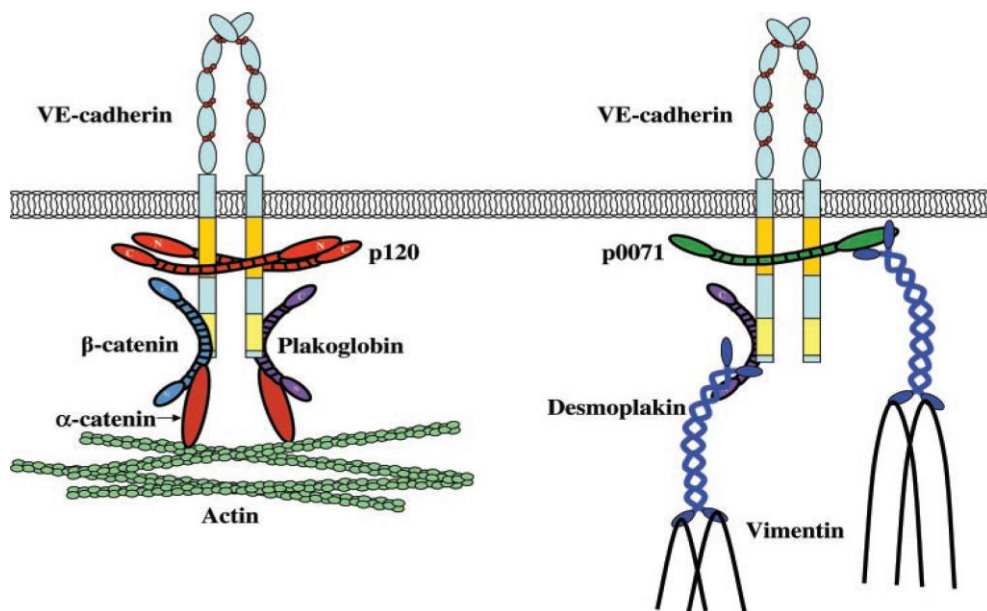
Ogleich NO mit unterschiedlicher Aktivität in beiden e-NOS-Fractionen synthetisiert wird

(Fulton et al., 2004; Qian et al., 2010), stellen blutströmungsbedingte Wandschubspannungen einen wesentlichen Faktor für diese unterschiedliche Verteilung dar. Neben der Regulation der Expression der e-NOS haben Veränderungen der physikalischen Kräfte der Blutströmung nicht nur Einfluss auf die Höhe der Plasmamembranfraktion, sondern auch auf die Konzentration des Golgi-Komplexes in der Zelle. *In vivo* führen ansteigende Blutscherspannungen, wie sie z.B. unmittelbar vor Gefäßstenosen auftreten, ebenso wie oszillierende Strömungsverhältnisse, wie sie z.B. hinter jenen Stenosen auftreten, neben der gesteigerten Enzymexpression auch zu einer relativen Zunahme des Golgi-Komplexes (Cheng et al., 2005). Hohe Blutscherspannungen gehen im Gegensatz zu oszillierenden Strömungsverhältnissen jedoch sowohl mit einem stärkeren Anstieg der e-NOS-Expression als auch mit einer geringfügigeren Zunahme des Golgi-Komplexes und mit der dortigen Assoziation des Enzyms einher. Eine Umverteilung der e-NOS von der Plasmamembran in intrazelluläre Kompartimente kann zudem durch ox-LDL und Depletion caveolären Cholesterols erfolgen (Blair et al., 1999). Als weitere Zellmembranlokalisationen der e-NOS gelten die „lipid rafts“ und die interendothelialen Junctionen, in denen, wie auch im Golgi-Apparat, keine direkte Assoziation mit dem negativen Regulatorprotein Caveolin-1 besteht (Sowa et al., 2001; Heijnen et al., 2004). Lediglich in den Caveolae wird die Oxygenasendomäne des Enzyms unmittelbar durch N- und C-terminale Domänen des Caveolin-1 inhibiert, mit konsekutiver Kalzium-Calmodulin abhängiger NO-Produktion (Ju et al., 1997). Die intraendotheliale Verteilung der e-NOS wird auch von cAMP insofern beeinflusst, als dass erhöhte Konzentrationen dieses „second messenger“ den Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran vermindern. Zudem kann die enzymatische Aktivität, abhängig vom Phosphorylierungsstatus einiger Serin- und Threoninreste, durch Modulation des Elektronenflusses verändert werden. So vermag unter Beteiligung des Chaperons Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) die Phosphorylierung des Serins 1179 durch die PKB/Akt die kalziumabhängige und die Phosphorylierung des Serins 635 durch die PKA die kalziumunabhängige NO-Produktion zu steigern (Boo and Jo, 2003; Boo et al., 2003). Die Biosynthese der e-NOS kann auf transkriptioneller Ebene und durch posttranskriptionelle Prozessierung und Stabilität der e-NOS-mRNA gesteuert werden (Searles, 2006). So kann die Transkription des Enzyms direkt durch Sexualsteroidhormone sowie rezeptorvermittelt durch die Wachstumsfaktoren VEGF-A (via PKC) und den TGF- β oder NF- κ B-vermittelt durch Blutscherspannungen (via ERK) oder durch Wasserstoffperoxid erfolgen. Des Weiteren korreliert die Höhe der zellulären Enzymexpression mit der Konzentration globulären β -Aktins. Die Bindung von ox-LDL and den LOX-1 führt zu einer transkriptionellen Repression des Enzyms und einer Destabilisierung der e-NOS-mRNA (Liao et al., 1995; Mehta et al., 2001). Letzteres kann zudem durch das Zytokin TNF- α (Alonso et al., 1997) und die kleine GTPase RhoA (Yao et al., 2010) erfolgen.

Die Bildung der e-NOS wird zudem durch die Bioverfügbarkeit des NO mit Inhibition des NF- κ B kontrolliert.

1.7. Vaskuläres endotheliales Cadherin

Das vaskuläre endotheliale Cadherin (VE-Cadherin), Cadherin-5 oder CD144 zählt zu den klassischen Cadherinen der Cadherin-Superfamilie und ist ein transmembranöses, inter-endotheliales Zelladhäsionsmolekül. Extrazellulär besteht VE-Cadherin aus fünf repetitiven Domänen, die sich einzig durch die Anzahl der Tryptophanreste am N-Terminus unterscheiden (Vestweber, 2008). VE-Cadherin vermittelt sowohl als Monomer als auch als Dimer unter Beteiligung von Kalziumionen homophile Bindungen zu benachbarten Zellen, wobei auch heterophile Interaktionen mit z.B. N-Cadherin möglich sind (Shapiro and Weis, 2009; Vincent et al., 2004). Einer Transmembrandomäne schließt sich der intrazelluläre C-terminale Rest an, der mit den Cateninen Proteine der Armadillofamilie zu binden vermag. Während β - und γ -Catenin (Plakoglobin) über α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind, kann das p120-Catenin sich an VE-Cadherin anlagern, ohne mit dem Aktinzytoskelett assoziiert zu sein. γ -Catenin und Plakophilin-4 (p0071) ermöglichen des Weiteren über Desmoplakin eine Adaption an das Vimentinzytoskelett (Vincent et al., 2004).



Verbindung des VE-Cadherin mit dem Zytoskelett. VE-Cadherin ist mit β -Catenin bzw. Plakoglobin (γ -Catenin) über α -Catenin mit Mikrofilamenten (Aktin) oder alternativ mit Plakoglobin (γ -Catenin) bzw. p0071 über Desmoplakin mit Intermediärfilamenten (Vimentin) verbunden (Vincent et al., 2004).

Neben der Anbindung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes an das Zytoskelett interagieren die Catenine mit aktinpolymerisierenden Proteinen, Tyrosinkinasen und -phosphatasen oder dem Gerüstprotein IQGAP-1 (IQGAP-1) (Mehta and Malik, 2006). Das Gen für VE-Cadherin befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 18, bei der Maus auf dem Chromosom 8 und weist ein Molekulargewicht von etwa 130 kDa auf. Das interendotheliale Adhäsionsmolekül ist sowohl an der Restriktion des parazellulären Durchtritts für gelöste Blutplasmabestandteile, wie z.B. Albumin, als auch an der Transmigration zirkulierender Blutzellen, wie z.B. Leukozyten, beteiligt. Die interendotheliale Gefäßdurchlässigkeit ist an die kalziumabhängige IQGAP-1-vermittelte Aktivität der kleinen GTPasen der Rho-Familie und den Phosphorylierungsgrad des Cadherin-Catenin-Komplexes gebunden (Vestweber, 2008). So geht die Phosphorylierung des β - und γ -Catenins mit nachfolgender Dissoziation vom α -Catenin und dem Aktinzytoskelett einher mit einer Zunahme der Permeabilität. Ebenso hat die phosphorylierungsabhängige nukleäre Translokation des β -Catenins eine Affektion der Genexpression von Proteinen der sog. „tight junctions“ zur Folge (Gavard and Gutkind, 2008). Die Src-abhängige Phosphorylierung am Serinrest 665 des VE-Cadherins durch die p21-aktivierte Kinase (PAK) hat nach Anlagerung von β -Arrestin-2 die Clathrin-ummantelte Endozytose und Degradation zur Folge. Phosphorylierung des p120-Catenins und des p190Rho-GAP hingegen vermindern die Gefäßpermeabilität durch Inhibition von RhoA, da letzteres durch Aktivierung der Calmodulin-Kinase-2 (CaMK-2) mit Phosphorylierung des Gerüstproteins Filamin A sowie durch Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) mit Steigerung der Aktomyosinkontraktilität die Permeabilität zu erhöhen vermag. In diesem Zusammenhang spielt auch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) eine Rolle in der Regulation der Permeabilität, da es via PKA die Phosphorylierung und Inaktivierung von RhoA bewirkt und des Weiteren über den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Epac1 mit Aktivierung der kleinen GTPase der Ras-Familie Rap1 die Stabilität adhärenter Junctionen verbessert. Zudem ist VE-Cadherin in die Regulation der endothelialen Zellproliferation und Apoptose sowie in die Modulation der Rezeptorfunktionen von Wachstumsfaktoren, wie z.B. des VEGF oder des TGF- β , involviert (Rudini et al., 2008). Indem VE-Cadherin die Signalwirkung des VEGF limitiert und zugleich die des TGF- β amplifiziert, führt es zu einer Einschränkung der endothelialen Proliferation und Migration und somit zu einer Gefäßstabilisierung. Im Falle des VEGF ist beispielsweise die Hemmung des MAPK-Signalwegs durch junctionale Phosphatasen oder die Sequestrierung der C-terminalen Src-Kinasen (Csk), im Falle des TGF- β die vermehrte Phosphorylierung von SMAD-Proteinen von Bedeutung. Daneben konkurriert VE-Cadherin durch Bindung des β -Catenins mit dem sog. kanonischen WNT-Signalweg und hemmt dadurch u.a. die

Zellproliferation. Die Assoziation des VE-Cadherins mit dem VEGFR-2 weist im Zuge der Limitierung des Zellwachstums durch Aktivierung der PI-3-Kinase und der PKB/Akt auch diverse antiapoptotische Wirkungen auf, wie z.B. die Inaktivierung der GSK-3 β oder die Genexpression von Gas1 (Spagnuolo et al., 2004). Die endotheliale Expression des VE-Cadherin wird u.a. kontrolliert durch den kanonischen WNT-Signalweg und den Transkriptionsfaktor KLF-4 (Cowan et al., 2010), die p38-MAPK und den Transkriptionsfaktor Ets-1 (Tanaka et al., 1998; Lelievre et al., 2001) sowie hypoxieunabhängig durch den HIF-2 α (Le Bras et al., 2007). Weiterhin spielt das an VE-Cadherin gebundene p120-Catenin eine wichtige Rolle, da es mit der Expression des ebenfalls zu den klassischen Cadherinen gehörende N-Cadherins im Zusammenhang steht und den endosomal-lysosomalen Abbau von VE-Cadherin verhindert (Luo and Radice, 2005).

1.8. Zielsetzung

Ceacam1-defiziente Mäuse sind überlebensfähig, zeigen eine unauffällige vaskulogenetische Entwicklung und sind fortpflanzungsfähig (Horst et al., 2006). Trotzdem beeinträchtigt das Fehlen von Ceacam1 die Formierung endothelialer Gefäßrohre in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten, die arteriogenetische Kollateralisation *in vivo* nach experimenteller Ischämie (Horst et al., 2006) und die mikrovaskuläre, pulmonale Permeabilität *in vivo* (Nouvion et al., 2010). Eine weitere, hintergründig für diese Arbeit bedeutende Rolle spielt Ceacam1 im Rahmen des Insulinmetabolismus und nimmt demnach eine präventive Stellung in der Ätiologie der Atherosklerose ein. Für die insulinrezeptorvermittelte Internalisierung des pankreatischen Insulins mit nachfolgender lysosomaler Degradation und Rezeptorzyklisierung ist die epitheliale Expression des Ceacam1 in der Leber unerlässlich (Najjar, 2002). Somit war in dem für diese Arbeit verwendeten Maus-Modell mit ubiquitärer Ceacam1-Defizienz eine Störung des hepatischen Insulinabbaus anzunehmen. Konsekutiv entwickelt sich eine Hyperinsulinämie mit extrahepatischer Insulinresistenz im insulinabhängigen Fett- und Muskelgewebe. Weiterhin war auszugehen von einer Steigerung der hepatischen Lipoproteinsynthese, der Entwicklung einer Fettleber und viszeraler Adipositas, einer gestörten Glukosetoleranz sowie von einem Anstieg freier Fettsäuren im Blutplasma (DeAngelis et al., 2008). Ferner kommt es in Ceacam1^{-/-}-Mäusen zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks, u.a. durch vermehrte Reninaktivierung (Huang et al., 2013). Im Zuge dessen geht die persistierende Hyperinsulinämie zudem, wie von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt, einher mit einer Steigerung der Expression vaskulärer Angiotensinrezeptoren (Samuelsson et al., 2006; Nickenig et al., 1998). Folglich kommt es in Ceacam1^{-/-}-Mäusen zur Einstellung systemischer atherosklerotischer Risikofaktoren. Diese Befunde ließen die Arbeitshypothese aufstellen, dass Ceacam1-Defizienz die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen begünstigen könnte. Tatsächlich zeigten erste vorläufige Analysen, dass Ceacam1-Knockout-Mäuse im fortgeschrittenen Alter, ab etwa dem 6. Monat, kleine atherosklerotische Läsionen in ihrer Aorta entwickelten. Ziel dieser Arbeit war daher, die Mechanismen der durch Ceacam1-Defizienz verursachten Atherosklerose zu untersuchen und aufzuklären. Dabei sollte, im Vergleich zu altersbezogenen Wildtypkontrollgruppen, die quantitative und qualitative Expression von pathogenetisch relevanten Endothelzellmarkern, wie z.B. VEGFR-2, e-NOS und VE-Cadherin in den Aorten der Ceacam1-KO-Mäuse bestimmt werden, um Aussagen über den Gefäßstatus bei Ceacam1-Defizienz treffen zu können. Des Weiteren sollte am etablierten ApoE^{-/-}-Atherosklerosemodell die Expression des Ceacam1 in atherosklerotischen Plaques untersucht werden, um seine potentielle Rolle in der Pathogenese der Erkrankung besser verstehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Laborgeräte

- Binokular (Modell M5-81892), Wild - Heerbrugg, Schweiz
- Chemilumineszenz-Detektions-System (LAS-3000mini), FujiFilm Holdings Corporation, Tokyo - Japan
- Dispergiergerät (T10 basic), IKA Werke GmbH & Co. KG - Staufen
- Einbettautomat (Shandon Excelsior ES Tissue Processor), Thermo Fisher Scientific GmbH - Dreieich
- Flockeneisbereiter AF10, Scotsman Ice Systems - Vernon Hills (Illinois), USA
- Fluoreszenzkamera + externe Lichtquelle (DFC340 FX + EL6000), Leica Microsystems AG - Wetzlar
- Gefrierschrank (Premium NoFrost), Liebherr GmbH - Ochsenhausen
- Heizblock (Dry Block Heating System QBD1), Grant Instruments Ltd. - Cambridge, England
- Kleinschüttler (MS2minishaker), IKA Werke GmbH & Co. KG - Staufen
- Kühlschrank (FKS 3600 Profi Line), Liebherr GmbH - Ochsenhausen
- Laborwaage (Galaxy 400), Ohaus Scale Corp. - Florham Park (New Jersey), USA
- Lichtmikroskop + Kamera (DM 4000B + DFC290), Leica Microsystems AG - Wetzlar
- Lichtmikroskop (Eclipse E200), Nikon Instruments Europe B.V - Kingston, England
- Messkolben (Messzylinder Duran), Hirschmann Laborgeräte - Eberstadt
- Mikrotom (Reichert-Jung Biocut 2035), Leica Microsystems AG - Wetzlar
- Mikrowelle (Lifetec LT 8023), MTC Medion Technologie Center - Mühlheim/Ruhr
- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415 D), Eppendorf AG - Hamburg
- Mikrozentrifuge (Mikro 200R), Andreas Hettich GmbH & Co. KG - Tuttlingen
- Netzgerät (Power Pac HC), Bio-Rad Laboratories GmbH - München
- Paraffinausgießstation (Shandon Histocentre2), Thermo Fisher Scientific GmbH - Dreieich
- Pinzetten, A. Dumont & Fils - Montignez, Schweiz
- Protein-Gelelektrophorese-System (mini-Protean Tetra System), Bio-Rad Laboratories GmbH - München
- Scheren, (Aesculap) B. Braun Melsungen AG
- Schüttelgerät (Vortex Genie 2), Scientific Industries Inc. - Bohemia (New York), USA
- Tank-Transfer-System (mini Trans-Blot Cell), Bio-Rad Laboratories GmbH - München
- Taumel-Rollenmischer (RM5-40), Labortechnik Fröbel GmbH - Lindau

- Thermo-Magnetrührer (RCT basic IkaMag), IKA Werke GmbH & Co. KG - Staufen
- Tiefkühlschrank (Revco 1786er Serie), Thermo Electron LED GmbH - Langenselbold
- Wärmeschrank (Heraeus Kelvitron t), Kendro Laboratory Products GmbH - Langenselbold
- Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls HD2070), Bandelin Electronic GmbH & Co. KG - Berlin
- UV-/Vis-Photometer (BioPhotometer), Eppendorf AG - Hamburg
- Wasserbad mit Streckplatte, Medax GmbH & Co. KG - Neumünster

2.2. Kommerzielle Laborprodukte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- 12-Well Kulturschalen (Zellkultur Testplatte 12), Techno Plastics Products AG - Trasdadingen, Schweiz
- β -Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich - Steinheim
- Acrylamid / Bis - Lösung 37,5:1 (30% w/v), Serva Electrophoresis GmbH - Heidelberg
- Aluminiumsulfat-Lösung [5g Aluminiumsulfat-18-Hydrat (Merck KGaA - Darmstadt) in 100ml Aqua dest.]
- Ammoniumchlorid-Lösung [9g Ammoniumchlorid (Merck KGaA - Darmstadt) in 50ml Aqua dest.]
- APS (Ammoniumperoxodisulfat), Merck KGaA - Darmstadt
- Avidin-Biotin-Reagenzkomplex Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories Inc. - Burlingame (Kalifornien), USA
- Azophloxin-Lösung [0,5g Azophloxin (Chroma-Gesellschaft, Köngen) in 100ml Aqua dest. und 0,2ml Essigsäure]
- Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephtalein), Sigma-Aldrich - Steinheim
- BSA (Bovines Serum Albumin), AppliChem GmbH - Darmstadt
- DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat), Sigma-Aldrich - Steinheim
- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole), Serva Electrophoresis GmbH - Heidelberg
- Deckgläser für die Mikroskopie (24x60mm), Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH - Edermünde
- D-Glukose-Lösung 10% [10g D-Glukose-Monohydrat (Merck KGaA - Darmstadt) in 100ml Aqua dest.]
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Carl Roth GmbH & Co. KG - Karlsruhe
- EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure), Sigma-Aldrich - Steinheim
- Eisenhämatoxylin-Gebrauchslösung [1g Hämatoxylin in 100ml 96%iger Ethanol-

Lösung + 1,16g Eisen-III-chlorid (Merck KGaA – Darmstadt) in 98ml Aqua dest. und 1ml 25%iger HCl-Lösung]

- Einbettmedium (Shandon Histomount Xylene Substitute Mountant), Thermo Fisher Scientific GmbH - Dreieich
- Eosin Y, Riedel de Haën (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH) - Seelze
- Essigsäuremin. 99,8%, Riedel de Haën (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH) - Seelze
- Ethanol abs. puriss., Sigma-Aldrich - Steinheim
- FCS (Fetales Kälber Serum), PAA Laboratories GmbH - Pasching, Österreich
- Fluoreszenz-Einbettmedium (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI), Vector Laboratories Inc - Burlingame (Kalifornien), USA
- Fluoreszenz-Einbettmedium (Fluorescent Mounting Medium), Dako North America Inc. - Carpinteria (Kalifornien), USA
- Glukose-Oxidase Typ VII aus Aspergillus niger, Sigma-Aldrich - Steinheim
- Glycerin, AppliChem GmbH - Darmstadt
- Glycin, Carl Roth GmbH & Co. KG - Karlsruhe
- Hämatoxylin nach Shandon (Shandon Instant Hematoxylin), Thermo Fisher Scientific Inc. - Kalamazoo (Michigan), USA
- Handschuhe (Peha-soft), Paul Hartmann AG - Heidenheim
- HCl (Salzsäure), Carl Roth GmbH & Co. KG - Karlsruhe
- Isofluran (Forene 100%), Abbott GmbH & Co. KG - Wiesbaden
- Isopropanol (2'-Propanol 99,5%), Avantor Performance Materials B.V. - Deventer, Niederlande
- Kapillarspitzen (200µl), Biozym Scientific GmbH - Hessisch Oldendorf
- Kernechtrot-Lösung [0,1g Kernechtrot (Merck KGaA - Darmstadt) in erhitzte Aluminiumsulfat-Lösung]
- KH_2PO_4 (Kalium-Dihydrogenphosphat), Merck KGaA - Darmstadt
- Lichtgrünlösung 0,1% [0,1g Lichtgrün, gelblich (Merck KGaA - Darmstadt) in 100ml Aqua dest. + 0,2ml Essigsäure]
- Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika) - Steinheim
- Magermilchpulver (Nonfat dried milk powder), AppliChem GmbH – Darmstadt
- Methanol puriss., Sigma-Aldrich - Steinheim
- Mikrotomklingen (Shandon MX35 Premier+), Richard Allan Scientific (Subsidiary of Thermo Fisher Scientific Inc.) - Kalamazoo (Michigan), USA

- Mowiol-Einbettmedium [12g Mowiol 4-88 (Polysciences GmbH - Eppelheim) in 30 ml Aqua dest. + 100 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) + 30 ml Glycerin]
- Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Dinatrium-hydrogenphosphat-dihydrat), Merck KGaA - Darmstadt
- NaCl (Natriumchlorid), Merck KGaA - Darmstadt
- NaN₃ (Natriumazid), Merck KGaA - Darmstadt
- Naphtol AS-BI phosphate - Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika) - Steinheim
- NaOH (Natriumhydroxid), Carl Roth GmbH & Co. KG - Karlsruhe
- Natriumdeoxycholate, Sigma-Aldrich - Steinheim
- Natriumfluorid, Merck KGaA - Darmstadt
- Natriumnitrit, Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika) - Steinheim
- Neufuchsin-Stammlösung [5g Neufuchsin (Merck KGaA – Darmstadt) in 100ml 2 N HCl]
- Nickelsulfat-Lösung [3,7g Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat (Merck KGaA - Darmstadt) in 100ml Aqua dest.]
- Nitrozellulose-Transfer-Membran (Protran), Whatman GmbH – Dassel
- N,N-Dimethylformamid - Merck KGaA - Darmstadt
- Normales Kaninchen-Serum, Sigma-Aldrich - St. Louis (Missouri), USA
- Normales Schweine-Serum, Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Normales Ziegen-Serum, SouthernBiotech - Birmingham (Alabama), USA
- Objektträger für die Mikroskopie (SuperFrost Plus), R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik - Emmendingen
- Original-Perfusor-Spritze OPS 50ml, B.Braun Melsungen AG
- PAP der Maus (Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex, monoklonal), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- PAP des Kaninchen (Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex, polyklonal), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- PAP der Ziege (Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex, polyklonal), Chemicon International Inc. - Temecula (Kalifornien), USA
- Paraformaldehyd-Lösung 4% [4g Paraformaldehyd zur Synthese (Merck KGaA - Darmstadt) in 100ml Aqua dest., pH 7,4]
- PBS (1M phosphatgepufferte Salzlösung), Biochrom AG - Berlin
- PBS (Gibco DPBS), Invitrogen GmbH - Karlsruhe
- p-Coumarsiure, Sigma-Aldrich - Steinheim
- Petrischalen (Cellstar tissue culture dishes), Greiner Bio-One GmbH - Frickenhausen

- Phosphormolybdän-Orange G-Lösung [4g Molybdätdiphosphorsäure (Merck KGaA - Darmstadt) + 1,5g Orange G (Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika) - Steinheim) in 100ml Aqua dest.]
- Pipetten (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl), Eppendorf AG - Hamburg
- Pipettenspitzen (200µl, 1000µl), Sarstedt AG & Co. - Nümbrecht
- Pipettenspitzen (20µl), Biozym Scientific GmbH - Hessisch Oldendorf
- Plastikfolie, hochtransparent (Spez.-Vernichtungsbeutel), Nerbe Plus GmbH - Winsen
- Ponceau-Säurefuchsin-Lösung [Ponceau de Xylidine (Chroma-Gesellschaft, Köngen) + 0,1g Säurefuchsin (Merck KGaA -Darmstadt) in 300ml Aqua dest. und 0,6ml Essigsäure]
- Proteasen-Inhibitoren (Protease-Inhibitor Cocktail Set III), Merck KGaA - Darmstadt
- Proteinbestimmungs-Kit (Pierce BCA Protein Assay Kit) - Pierce Protein Research Products (Thermo Fisher Scientific Inc.) - Rockford (Illinois), USA
- Protein Standard (Page Ruler, Prestained Protein Ladder), Fermentas GmbH - St. Leon-Rot
- Reaktionsröhrchen (Reaction Tubes, 2ml), Greiner Bio-One - Frickenhausen
- SDS (Natriumdodezylsulfat), approx. 99%, Sigma-Aldrich - Steinheim
- Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine, approx. 99%), Sigma-Aldrich - Steinheim
- Teströhrchen (Test Tubes Cellstar 50ml), Greiner Bio-One - Frickenhausen
- Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), AppliChem GmbH - Darmstadt
- Triton x-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), Sigma-Aldrich - Steinheim
- Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Mono-Laurate), Sigma-Aldrich - Steinheim
- Wasserstoffperoxid 30%, AppliChem GmbH - Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (Perdrogen 30% H₂O₂ puriss.), Riedel de Haën (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH) - Seelze
- VE-H₂O - Vollentsalztes Wasser
- Venepunktionsbesteck (1 Venofix), B.Braun Melsungen AG
- Xylol Isomerengemisch puriss., Sigma-Aldrich - Steinheim
- Xylolersatz-Lösung (Shandon Xylene Substitute), Thermo Fisher Scientific GmbH - Dreieich
- Zellulose-Filterpapier (Chromatography Paper), Whatman GmbH-Dassel
- Zitratpuffer-Lösung (Target Retrieval Solution, pH 6), Dako North America Inc. - Carpinteria (Kalifornien), USA

2.3. Versuchstiere

Verwendet wurden C57Bl/6J-Mäuse (Wildtyp), die aus dem hiesigen zentralen Tierlaboratorium stammten, Ceacam1-Knockout-Mäuse, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. N. Beauchemin (Department of Biochemistry, Rosalind and Morris Goodman Cancer Centre, Montreal (Quebec), Kanada) und Apolipoprotein-E-Knockout-Mäuse, die von Herrn Prof. Dr. med. Hermann (Neurologische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt wurden. Beide Knockout-Stämme hatten einen C57Bl/6J Hintergrund. Innerhalb der Wildtyp- und Ceacam1^{-/-}-Gruppe wurde eine Unterteilung hinsichtlich des Alters der Tiere vorgenommen. Für junge Mäuse wurde ein Lebensalter von 10-25 Wochen, für alte Mäuse 37-90 Wochen festgesetzt.

2.4. Primärantikörper

β-Aktin	Der (Meerrettich-) Peroxidase-gekoppelte monoklonale Antikörper aus der Maus gegen murines β-Aktin wurde käuflich erworben von Sigma Aldrich - St. Louis (Missouri), USA
Ceacam1	Der monoklonale Antikörper aus der Maus gegen das murine Ceacam1 wurde von Kathryn Holmes, Ph. D. (Molecular Biology - University of Colorado School of Medicine, Denver) zur Verfügung gestellt
e-NOS (NOS III)	Der polyklonale Antikörper aus der Ziege gegen die humane endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase wurde käuflich erworben von R&D Systems -Mineapolis (Minesota), USA
VEGFR2 (Flk-1)	Der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen den murinen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (CD309) wurde käuflich erworben von Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz (Kalifornien), USA
Pecam1	Der polyklonale Antikörper aus der Ziege gegen das murine thrombozytär-endotheliale Zelladhäsionsmolekül-1 (CD31) wurde käuflich erworben von Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz (Kalifornien), USA
Pecam1	Der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen das murine und humane thrombozytär-endotheliale Zelladhäsionsmolekül-1 (CD31) wurde käuflich erworben von Abcam plc - Cambridge, UK
VE-Cadherin	Der polyklonale Antikörper aus der Ziege gegen das murine vaskuläre endotheliale Cadherin (CD144) wurde käuflich erworben von Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz (Kalifornien), USA

2.5. Sekundärantikörper

- APAAP (Maus IgG gegen Alkalische Phosphatase vom Kalb, monoklonal), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Esel IgG gegen Ziege (polyklonal, Alexa Fluor 488-gekoppelt), Life Technologies Corp. - Camarillo (Kalifornien), USA
- Kaninchen IgG gegen Maus (polyklonal, biotinyliert), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Kaninchen IgG gegen Ziege (polyklonal, biotinyliert), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Kaninchen IgG gegen Ziege (polyklonal, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt), Pierce Protein Research Products (Thermo Fisher Scientific Inc.) - Rockford (Illinois), USA
- Schwein IgG gegen Kaninchen (polyklonal, biotinyliert), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Ziege IgG gegen Maus (polyklonal, nicht-biotinyliert), Dako Cytomation Denmark A/S - Glostrup, Dänemark
- Ziege IgG gegen Maus (polyklonal, DyLight™488-gekoppelt), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. - West Baltimore Pike West Grove (Pennsylvania), USA
- Ziege IgG gegen Kaninchen (polyklonal, DyLight™549-gekoppelt), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. - West Baltimore Pike West Grove (Pennsylvania), USA
- Ziege IgG gegen Kaninchen (polyklonal, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. - West Baltimore Pike West Grove (Pennsylvania), USA
- Ziege IgG gegen Maus (polyklonal, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. - West Baltimore Pike West Grove (Pennsylvania), USA

2.6. Immunhistochemie

Gewebeisolierung und immunhistochemische Verfahren

Für die immunhistochemischen Analysen der murinen Aorten wurden zwei unterschiedliche Methoden herangezogen. Zum einen wurden Immunfärbungen an Querschnitten der in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke der Aorta beider Knockout-Modelle, nämlich Ceacam1-KO und ApoE-KO, im Vergleich zu WT durchgeführt. Für das Ceacam1^{-/-}-Modell kamen zudem Immunfluoreszenzfärbungen an längs aufgeschnittenen Aorten im

Vergleich zu WT-Aorten zum Einsatz, wobei die Aorten ohne vorherige Sektionierung als Totalpräparat (whole mount) direkt auf Objektträger aufgezo- gen und gefärbt wurden.

Im Anschluss an eine letale Inhalationsnarkotisierung der Tiere mit Isofluran, mussten Herz und Aorta freipräpariert werden. Nach Aufsuchen und Durchtrennen der Vena cava inferior erfolgte ein Einstich in die linke Herzkammer und Spülung der Hauptschlagader mit 10ml PBS. Jetzt konnte die Aorta mit der thorakal absteigenden und abdominellen Aorta mobilisiert werden.

Für die Einbettung in Paraffin wurde unter dem Binokular in Petrischalen und eisgekühltem PBS überschüssiges periadventitielles Fettgewebe gelöst und alle Arterienäste abgetrennt. Sodann wurde die Aorta in Gefäßabschnitte zerteilt und für etwa 12 h in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach maximal 24 h musste das Gewebe in eine 70%ige Ethanol-Lösung überführt werden und diese im zweistündigen Wechsel mehrmals erneuert werden. Danach wurde das Gewebe im Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Nach der Aushärtung des Gewebeblocks auf einer Kühlplatte konnten nun 6µm dicke Querschnitte der Aorta am Mikrotom angefertigt werden. Nach dem Einbringen der Schnitte in ein 37° Celsius warmes Wasserbad, wurden sie auf mikroskopische Objektträger aufgezo- gen und anschließend auf einer Wärmeplatte zum Trocknen gebracht. Um die Haftung der Schnitte an dem Objektträger zu erhöhen, konnten diese wahlweise für einige Stunden in einem Wärmeschrank auf 50-60° Celsius erhitzt werden.

Die Vorbehandlung der Schnitte umfasste zunächst die Deparaffinierung in Xylolersatz-Lösung bzw. Xylol. Während der nachfolgenden Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe und VE-H₂O, wurde die Schnitte in einem Zwischenschritt für 30 min in eine Lösung aus 1,5% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert, um mögliche unspezifischen Hintergrundfärbung durch die endogene Peroxidase, insbesondere bei Benutzung polyklonaler Antikörper, zu unterdrücken. Im Anschluss erfolgte eine 2 x 10-minütige Antigendemaskierung mit erhitzter Zitratpuffer-Lösung. Nach der Waschung mit PBS für 15 min wurden zur Blockierung unspezifischer Antigenbindungsstellen normales Schweine- oder Kaninchenserum (5% in PBS) auf die Schnitte pipettiert und die Ansätze für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Schnitte mit Ausnahme der Negativkontrollen mit den Primärantikörpern in Verdünnungspuffer-Lösung [0,1g NaN₃, 0,2g BSA in 100ml 0,1M PBS (pH 7,4)] über Nacht bei etwa 4° Celsius in Feuchtkammern im Kühlschrank inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte zunächst eine 3 x 10-minütige Waschung mit PBS, ehe die Schnitte mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (1:250 in PBS) für 60 min behandelt wurden. Nach erneutem Waschen für 3 x 10 min in PBS wurden die jeweiligen PAP-Komplexe (1:200 in PBS) für 30 min aufgetragen. Im Gefolge einer weiteren Waschung für 2 x 10 min mit PBS wurden die Schnitte für weitere 30 min mit dem ABC-Komplex inkubiert. Die Überleitung zur Entwicklungsreaktion wurde

durch nochmaliges Waschen mit PBS für 10 min mit nachfolgender 10-minütiger Einwirkung von 0,1M Phosphatpuffer [4,9g KH_2PO_4 , 29,2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 2l VE- H_2O (pH 7,4)] eingeleitet.

Für die Reaktion des farblosen Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat (DAB) in sein bräunlich gefärbtes Produkt durch die Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase (Davidoff and Schulze, 1990) sowie eine modifizierte Signalverstärkung (Shu et al., 1988), mussten die Schnitte in folgenden Ansatz gebracht werden:

180 ml 0,1M Phosphatpuffer

4 ml DAB

0,4 ml Ammoniumchlorid-Lösung

3,6 ml Nickelsulfat-Lösung

3,6 ml D-Glukose-Lösung 10%,

0,6 ml Glukose-Oxidase-Lösung (1,2mg Enzym ad 1ml VE- H_2O)

Die Entwicklung der Immunfärbung durch die Peroxidaseaktivität wurde lichtmikroskopisch abgewartet und nach maximal 30 min durch Aufnahme der Schnitte in PBS abgestoppt. Daraufhin erfolgte eine 20- bis 30-sekündige Färbung des Gewebes durch Einbringen in Kernechtrot-Lösung mit anschließender Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Zuletzt wurden die Schnitte für 3 x 5 min in Xylol bzw. Xylolersatz-Lösung gegeben, bevor sie mit Einbettmedium unter mikroskopischen Deckgläsern eingedeckelt wurden. Von den immungefärbten Gewebeschnitten wurden am Mikroskop mit Hilfe der mitgelieferten Software Leica Application Suite LAS V2.7 digitale Aufnahmen angefertigt.

Für die immunhistochemische Doppelfärbung mit DAB und alkalischer Phosphatase wurden die Gewebeschnitte nach der Entwicklung durch die Peroxidasaktivität und Aufnahme in PBS mit normalem Kaninchenserum (5% in PBS) für 30 min behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper aus der Ziege in Verdünnungspuffer-Lösung über Nacht im Kühlschrank. Am dritten Tag wurde nach einer Waschung mit PBS der entsprechende Sekundärantikörper aus dem Kaninchen (1:250 in PBS) für etwa 60 min aufgetragen. Auf eine erneute Waschung mit PBS für 3 x 5 min wurde nun ein zweiter nicht-biotinylierter Sekundärantikörper aus der Ziege für weitere 60 min auf die Schnitte gegeben. Im Gefolge einer letzten Spülung mit PBS erfolgte nun die Zugabe des APAAP-Antikörpers aus der Maus für eine Stunde. Anschließend wurden die Objektträger für 10-15 min in kaltes Leitungswasser gestellt, ehe die Entwicklung in der Neufuchsin-Gebrauchslösung für 30 min in abgedunkelter Umgebung eingeleitet werden konnte.

Zusammensetzung letztgenannter Lösung:

75 ml Tris-NaCl-Puffer (pH 8,3)

3,75 ml 4% Natriumnitrit (150mg Natriumnitrit + 3,75ml Aqua dest.) + 150µl Neufuchsin-

Stammlösung

375 µl Naphtol AS-BI phosphate-Lösung (10mg Naphtol AS-BI phosphate + 375µl N,N-Dimethylformamid)

Zuletzt wurde die Schnitte nochmals für 10 min in kaltes Leitungswasser eingebracht, bevor sie mit Mowiol unter mikroskopischen Deckgläschen eingebettet wurden.

Die Vorbehandlung von Paraffinquerschnitten für eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung erfolgte in analoger Weise zur Glukose-Peroxidase-Technik durch Deparaffinierung, Rehydratation des Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe und VE- H₂O sowie Antigen-demaskierung in erhitzter Zitratpufferlösung. Im Gefolge einer Waschung mit PBS für 15 min wurde normales Ziegenserum (5% in PBS) auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Hintergrundfärbungen durch den Sekundärantikörper zu minimieren. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Feuchtkammern belassen. Nun wurden die Schnitte mit Ausnahme der Negativkontrollen mit den beiden Primärantikörpern in Verdünnungspuffer-Lösung [0,1g NaN₃, 0,2g BSA in 100ml 0,1M PBS (pH 7,4)] über Nacht bei etwa 4° Celsius im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zunächst einer 3 x 10-minütige Waschung mit PBS unterzogen, ehe die Inkubation mit den beiden entsprechenden Sekundärantikörpern (1:500 in PBS) für 60 min behandelt wurde. Einer nachfolgenden letzten Waschung mit PBS für 3 x 10 min schloss sich das Eindeckeln unter mikroskopischen Deckgläschen mit Fluoreszenz-Einbettmedium an.

Für die fluoreszierende Immunfärbung am Ganzpräparat der Mausaorta (whole mount) wurde zunächst die entnommene Aorta über die gesamte Länge unter dem Binokular in Petrischalen und eisgekühltem PBS schonend bis auf die glatte Muskelschicht (Tunica media) freipräpariert. Jetzt konnte das Gefäß komplett längs aufgeschnitten werden, um den luminalen Endothelverband offen flächig darzustellen. Von der Aorta wurde ein kleines Stück für die Negativkontrolle abgetrennt und dann separat in mit PBS gefüllte 12-Well Kulturschalen eingebracht. Schwache Agitation und Auffrischen des PBS diente der weiteren Aufreinigung, wonach nun die Fixierung für etwa 2 h durch Ersatz mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS eingeleitet werden konnte. Im Anschluss wurde das Gewebe für 2 x 5 min mit frischem PBS gewaschen, bevor es für etwa 90 min mit FCS (4% in PBS) behandelt wurde, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Dann erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern e-NOS und VE-Cadherin (1:100 in Verdünnungspuffer-Lösung) für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank bei etwa 4° Celsius, wobei die Kontrollen getrennt nur mit Verdünnungspuffer-Lösung versetzt wurden. Vor und nach der Behandlung mit dem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper Esel IgG gegen Ziege IgG (1:400 in PBS) für etwa 60 min wurde das Gewebe für jeweils 3 x 5 min mit frischem PBS unter schwacher Agitation gewaschen. Eine Kernfär-

bung wurde mit DAPI (1:200 in PBS) für etwa 5 min vorgenommen, ehe eine letzte Wäscherung mit PBS für 2 x 5 min erfolgte. Nun konnten die Aorten mit der dem Endothel abgewandten Seite auf einen Objektträger aufgebracht werden und mit Fluoreszenz-Einbettmedium eingedeckelt werden. Die digitalisierte Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgte mittels Fluoreszenzkamera und externer Lichtquelle mit dem Softwareprogramm Leica Application Suite V2.7.

2.7. Histologische Färbungen

Histochemische Verfahren

Als konventielle histologische Färbeverfahren kamen die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und die Trichromfärbung nach Masson-Goldner zum Einsatz, für die in analoger Weise zur Immunhistochemie das Gewebe isoliert, in Paraffin eingebettet und für die Färbung vorbereitet wurde. Auf eine 2 x 5-minütige Deparaffinierung in Xylolersatz-Lösung bzw. Xylol folgte die Rehydrierung des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe.

Für die HE-Färbung folgten sodann eine kurzzeitige Spülung mit Isopropanol und das Einbringen der Gewebeschnitte für jeweils 3 min in 96%ige, dann in 70%ige Ethanol-Lösung und zuletzt in VE-H₂O. Anschließend wurde das Gewebe für 3-4 min in eine saure Hämatoxylinlösung mit einem nicht auf Quecksilber basierenden Oxidiermittel gegeben. Danach erfolgte die Differenzierung, d.h. die Entfernung unspezifischer Hintergrundfärbung, durch kurzfristiges Überführen der Schnitte in eine 0,5% HCL enthaltende 70%ige Ethanol-Lösung. Sodann wurden für 5-10 min die Fixierung der Färbung und die Blaufärbung der Zellkerne des Gewebes durch Übertragen in eine alkalisch-wässrige Lösung, d.h. Leitungswasser, eingeleitet. Daran schloss sich für weitere 5 min die Gegenfärbung azidophiler, zytoplasmatischer Proteine in einer Eosin-Lösung an, die sich aus 5 g Eosin Y in 1 Liter 96%iger Ethanol-Lösung und Zusatz von 2ml Essigsäure zusammensetzte. Die Entwässerung der Schnitte wurde für kurze Zeit in 96%iger Ethanol-Lösung und daraufhin für 1 min in Isopropanol durchgeführt, ehe sie für zwei Mal 5 min in Xylolersatz-Lösung bzw. Xylol eingebracht werden konnten. Zuletzt erfolgte die Fixierung des Gewebes in Einbettmedium unter mikroskopischen Deckgläschen.

Bei der Masson-Goldner-Färbung wurden die Schnitte im Anschluss an die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe für 2 min in eine Eisenhämatoxylin-Gebrauchslösung eingebracht. Vor der mikroskopischen Kontrolle der Zellkernanfärbung wurde das Gewebe für 10 min in warmes Leitungswasser eingebracht. Im Gefolge einer kurzen Spülung mit Aqua dest. wurde das Gewebe für die Zytoplasmafärbung für etwa 7 min mit dem Masson-Goldner-Gemisch (10ml Ponceau-Säurefuchsin-Lösung + 2ml Azophloxin-Lösung + 88ml 0,2%ige Essigsäure) inkubiert. Für die Differenzierung der Färbung wur-

den die Schnitte nach kurzzeitiger Behandlung mit 1%iger Essigsäure (1ml Essigsäure in 100ml Aqua dest.) für 10 min in eine Phosphormolybdän-Orange G-Lösung gestellt. Nach erneutem kurzzeitigem Einbringen in 1%iger Essigsäure und mikroskopischer Kontrolle erfolgte eine 8 bis 10-minütige Bindegewebefärbung in Lichtgrün. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder kurz in 1%ige Essigsäure gegeben, mikroskopisch kontrolliert und zuletzt für 3 x 1 min in Isopropanol und 2 x 5 min in Xylol bzw. Xylolersatz-Lösung eingebracht. Abschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes in Einbettmedium unter mikroskopischen Deckgläschen.

2.8. Western Blotting

Proteinanalysen am Aortenlysat durch Chemilumineszens

Für den quantitativen Proteinvergleich am Ceacam1-Knockout- versus Wildtyp-Mausmodell wurden die Mäuse, wie bereits für die immunhistochemischen Methoden beschrieben, getötet. Nach Einschnitt in die untere Hohlvene und Durchspülen der Aorta über den linken Ventrikel mit 10ml PBS wurde diese nun vollständig, d.h. von unmittelbar oberhalb der Aortenklappe bis zur Bifurkation, entnommen. Periadventitielles Fettgewebe, sowie alle Arterienabgänge wurden in eisgekühltem PBS in Petrischalen unter dem Binokular schonend entfernt. Sodann wurde das Gefäß in kleine Abschnitte zerschnitten und in Reaktionsröhrchen mit jeweils 200 µl Ripa-Lysepuffer (1% Triton x-100, 1% Natriumdeoxycholate, 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 2mM EDTA, 50mM Natriumfluorid, 0,01M Phosphatpuffer) und 1-2% Proteasen-Inhibitoren eingebracht. Dieser Ansatz wurde für 30 min in Eiswasser belassen, ehe mit einem Dispergiergerät über 15 min ein Lysat angefertigt wurde. Dieses wurde für weitere 30 min in Eis stehen gelassen, bevor es bei 4° Celsius und 14000 RPM für 30 min zentrifugiert wurde. Im Anschluss konnte der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -80° Celsius eingefroren werden.

Die Messung der Proteinkonzentrationen von Lysaten aus den unterschiedlichen Mausstämmen erfolgte mittels eines Proteinbestimmungs-Kits am UV-/Vis-Photometer.

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit 8%igen SDS-Sammelgelen mussten die Komponenten für einen Ansatz von 20ml zusammengeführt werden:

9,3 ml VE- H₂O

5,3 ml Acrylamid / Bis - Lösung 37,5:1

5,0 ml 1,5M Tris (pH 8,8)

0,2 ml 10% SDS

0,2 ml 10% APS

0,012ml Temed

Mit dem Zusatz von APS und Temed wurde die Polymerisation eingeleitet, so dass nach kurzem Vermischen aller Inhaltsstoffe auf einem Kleinschüttler das noch flüssige Gel bis

zur Grenze des Trenngels zwischen die Glasplatten (Abstand 1 mm) des Protein-Gelelektrophorese-Systems gegossen werden konnten. Nach dem Auffüllen des Gelgemischs mit Aqua dest. musste nun etwa 30 min abgewartet werden. Inzwischen konnte die Komposition des Trenngels erfolgen, das sich, für einen Ansatz von 4ml, wie folgt zusammensetzte:

2,7 ml VE- H₂O

0,67 ml Acrylamid / Bis - Lösung 37,5:1

0,5 ml 1M Tris (pH 6,8)

0,04 ml 10% SDS

0,04 ml 10% APS

0,004ml Temed

Nach der Durchmischung auf einem Kleinschüttler konnte nun, nach Abgiessen des Aqua dest., das Trenngel auf das polymerisierte Sammelgel pipettiert werden. Im Anschluss daran wurde ein 1 mm breiter 10-Taschen-Gel-Kamm eingesetzt und nochmals für ca. 30 min abgewartet.

Um eine vergleichende Beurteilung der vier verschiedenen Aortenlysate anstellen zu können, mussten deren Konzentrationen einander angeglichen werden. Durch Variierung der Volumina der Lysate war es möglich, für alle Mausstämme einheitlich 30µg Protein in die Geltaschen einzubringen. Außerdem musste eine Verdünnung (1:5) mit Lämmli-Puffer (5fach) erfolgen, der folgendermaßen angesetzt wurde:

50% (v/v) Glycerin

10% (w/v) SDS

10% β-Mercaptoethanol

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

312mM Tris ad VE-H₂O (pH 6,8)

Nach dem gründlichen Vermischen der vier Ansätze in Reaktionsröhrchen auf dem Kleinschüttler mussten die Lysate nun für 10 min im Heizblock bei 95° Celsius erhitzt werden. Unterdessen wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammern des Protein-Gelelektrophorese-Systems eingebracht, die Gel-Kämme vorsichtig aus dem Trenngel entnommen und die Behälter mit in Aqua dest. verdünnter Laufpuffer-Lösung (1fach) aufgefüllt.

Laufpuffer (10fach):

1% (w/v) SDS

2M Glycin

250mM Tris ad 1 Liter VE- H₂O (pH 8,8)

Nach dem Zentrifugieren der Proteinansätze konnten diese jetzt über Kapillarspitzen neben dem Protein Standard in die Geltaschen pipettiert werden. Anschließend wurde das System an das Netzgerät angeschlossen. Für das Durchlaufen des Trenngels wurde zu Beginn eine Spannung von etwa 40 Volt gewählt. Im Gefolge konnte diese später dann wahlweise auf 100-120 Volt erhöht werden. Mit dem Erreichen der Migrationsfront des Lysates am Boden des Sammelgels wurde der Elektrophoreselauf durch Unterbrechung der Stromzufuhr gestoppt. Jetzt musste das Gel auf einer Nitrozellulose-Transfer-Membran, beidseits von Zellulose-Filterpapier und außen einem Schwamm bedeckt, luftblasenfrei eingeklemmt und unmittelbar in ein mit Transferpuffer-Lösung (1fach) gefülltes Tank-Transfer-System überführt werden.

Transferpuffer (10fach):

133mM Glycin

12mM Tris ad 1 Liter VE- H₂O (pH 8,4)

Mit Anschluss des Systems an das Netzgerät wurde der Proteintransfer unter Kühlung mit Eis für 60 min bei 135 Volt eingeleitet.

Für die Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen durch den primären bzw. sekundären Antikörper diente die nachfolgende 90-minütige Inkubation der Nitrozellulose-Transfer-Membran in einem Teströhrchen mit 5%iger Magermilchpulver-Lösung in TBS (1fach) auf dem Taumel-Rollenmischer bei Raumtemperatur.

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 10fach):

1,37M NaCl

200mM Tris ad VE- H₂O (pH 7,6)

Daraufhin schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1,25%iger Magermilchpulver-Lösung mit 0,05% Tween 20 in TBS (1fach) in Teströhrchen auf dem Taumel-Rollenmischer bei Raumtemperatur für 3-4 h an. Anschließend wurde die Membran für 3 x 5 min in TBS (1fach) gewaschen. Für die unkonjugierten Primärantikörper sowie isoliert für die Negativkontrollen, erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in 2,5%iger Magermilchpulver-Lösung mit 0,05% Tween 20 in TBS (1fach) in Teströhrchen auf dem Taumel-Rollenmischer bei Raumtemperatur für etwa 1 h. Der nachfolgenden erneuten Waschung für 3 x 5 min in TBS (1fach) schloss sich die Visualisierung der Proteine mittels Chemilumineszenz-Detektion an.

Der hierfür eingesetzte Entwicklungskomplex setzte sich aus der Komposition dreier Lösungen wie folgt zusammen:

15µl von A (6,8mM p-Coumarsäure ad 100ml DMSO)

1ml von B (1,25mM Luminol, 1,5M Tris (pH 8,5) ad 1 Liter VE- H₂O)

3µl von C (10µl Wasserstoffperoxid ad 90µl VE- H₂O)

Nach dem Vermischen der 3 Ansätze in einem Reaktionsröhrchen auf dem Kleinschüttler wurde die Reaktion durch Benetzung der Nitrozellulose-Transfer-Membran in hochtransparenter Plastikfolie eingeleitet. Nach Entwicklung der photochemischen Reaktion an den Blots erfolgte die digitalisierte Bildaufnahme und die anschließende Quantifizierung mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektions-System und der mitgelieferten Software Image Reader LAS-3000 und MultiGauge V3.0.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von Ceacam1 in der Aorta Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse

Dass Ceacam1 in der Endothelzellbiologie und bei der Formierung neuer Blutgefäße durch Angiogenese oder durch Vaskulogenese eine wichtige Rolle spielt, war aus der Literatur ausreichend bekannt (Ergun et al., 2000; Muller et al., 2005; Kilic et al., 2005; Tilki et al., 2006; Horst et al., 2006; Gerstel et al., 2011). Um zu evaluieren, ob und über welche Mechanismen Ceacam1 möglicherweise bei der endothelialen Dysfunktion und somit bei der Initiierung der Atherosklerose eine Rolle spielt, wurden zunächst Immunfärbungen für Ceacam1 an Aortengewebe des bei der Atheroskleroseforschung bereits etablierten Mausmodells der Apolipoprotein-E-Defizienz durchgeführt. Diese Analysen bestätigten die früheren publizierten Ergebnisse dahingehend, dass Ceacam1 in ruhenden Endothelzellen der Aorta nicht nachzuweisen ist (Kilic et al., 2005; Ergun et al., 2000). Demgegenüber waren Endothelzellen, welche die atherosklerotischen Plaques der Aortenwand Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse luminal bedeckten, stark positiv für Ceacam1 (Abb.1A - Seite 75). Höhere Vergrößerungen aus dem Plaquebereich zeigten weiterhin, dass auch einzelne Zellen oder kleine Zellgruppen innerhalb der Plaquearea Ceacam1-Immunfärbung aufwiesen (Abb.1B - Seite 75). Um den endothelialen Charakter dieser Zellen bestätigen zu können, wurde zudem an den gleichen Geweben eine Immunfärbung für Pecam1 durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten eine Pecam1-Färbung sowohl an den Zellen, die das Plaquegewebe luminal bedeckten, als auch an Endothelzellen, die die restlichen Abschnitte des Aortenlumens auskleideten (Abb.1C,1D - Seite 75). Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass die Ceacam1-positiven Zellen, die das Plaquegewebe luminal bedeckten, von endotheliale Charakter sind, nicht jedoch die Ceacam-positiven Zellen innerhalb des Plaquegewebes.

Zudem war es möglich, durch immunhistochemische Doppelfärbungen bzw. Fluoreszenz-doppelfärbungen mit gleichzeitiger Immunfärbung für Ceacam1 und Pecam1 diese Ergebnisse zu bestätigen. Die den atherosklerotischen Plaque von ApoE^{-/-}-Mausarten be-

deckenden Endothelzellen wiesen in beiden Doppelfärbungstechniken sowohl eine positive Immunfärbung für Ceacam1 als auch für Pecam1 auf (Abb.2A, 2C, 2D - Seite 76). Jedoch gingen aus den Doppelfärbungen in Fluoreszenztechnik ferner hervor, dass die Expression von Ceacam1 nicht grundsätzlich als eine geschlossene, den atherosklerotischen Plaque vom Lumen abgrenzende Endothelzellschicht aufgefasst werden konnte, sondern daneben auch fokal akzentuiert war. Des Weiteren bestätigen die immunhistochemischen Doppelfärbungen die Annahme, dass der Großteil der Ceacam1-positiven Zellen innerhalb des Plaques nicht oder nur sehr gering auch gleichzeitig positiv für Pecam1 ist, d.h. nicht oder noch nicht von endotheliale Charakter ist (Abb.2C, 2D - Seite 76).

3.2. Histochemische Färbungen atherosklerotischer Plaques aus Aorten alter Ceacam1-Knockout-Mäuse

Bei histochemischen HE-Anfärbungen von Serienquerschnitten des Aortenbogens zweier 6-9 Monate alter Ceacam1-Knockout-Mäuse (Abb.3A1-3B2 - Seite 77) zeigten sich morphologisch deutlich von der Gefäßwand abzeichnende, zellreiche kleine Plaques. Jene pathologischen Gefäßwandveränderungen waren von arteriellen Gefäßabgängen abzugrenzen. In fünf weiteren Aorten 6-9 Monate alter Ceacam1-Knockout-Mäuse hingegen konnten keine derart ausgeprägten Plaques nachgewiesen werden. Dafür konnten kleine atherosklerotischen Läsionen im Aortenbogen der alten Ceacam1-KO-Mäuse regelhaft auffindig gemacht werden und exemplarisch in der Masson-Goldner-Färbung dargestellt werden (Abb.4A-4C – Seite 78).

3.3. Expression von VEGFR-2, e-NOS und VE-Cadherin in den Aorten von Ceacam1-Knockout- versus Wildtyp-Mäusen

Dem Nachweis der Expression von Ceacam1 im Bereich atherosklerotischer Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen und von atherosklerotischen Plaques in den Aorten alter Ceacam1-Knockout-Mäuse schlossen sich Analysen mit Hilfe geeigneter vaskulärer Marker an, die eine Aussage über den Gefäßstatus in den Ceacam1-Knockout-Mäusen erlaubten. Hierfür sollte untersucht werden, inwiefern die Defizienz von Ceacam1 im Ceacam1-Knockout-Modell Einfluss ausübt auf das Expressionsmuster wichtiger Endothelzellfunktionsmarker, wie z.B. des VEGFR-2, der e-NOS und des VE-Cadherins. Gleichzeitige Analysen an alterskonformen Wildtypstämmen dienten dem relativen Vergleich der erzielten Ergebnisse zu einer Kontrollgruppe.

3.3.1. VEGFR-2

In der Aorta der alten Wildtypmaus (Abb.5A, 5B - Seite 79) war die immunhistochemische Rezeptorexpression weitestgehend am Endothel und stellenweise auf adventitiellen Zellen lokalisiert. In der alten Ceacam1-Knockout-Maus (Abb.5C, 5D - Seite 79) hingegen konnte eine deutlich Abnahme VEGFR-2-positiver Endothelzellen mit einer Zunahme der Anfärbung glatter Muskelzellen der Tunica media beobachtet werden. Zudem war in der Ceacam1^{-/-}-Maus auch eine schwächere Immunfärbung des Rezeptors auf Zellen der Adventitia im Vergleich zur Wildtypmaus erkennbar.

Weiterhin konnte im quantitativen Vergleich der VEGFR-2-Expression durch Western Blotting (Abb.6A-C - Seite 80-82) in allen Aortenlysaten der alten Ceacam1-Knockout-Mäuse eine verminderte Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen herausgestellt werden. Die bereits anhand der Intensität der schwarzen Banden in Relation zur Aktin-Ladekontrolle erkennbaren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konnten darüber hinaus durch Quantifizierungsmessungen absolut in Zahlen sowie als Quotient des VEGFR2 zum Aktin bestätigt und im Säulendiagramm veranschaulicht werden.

3.3.2. e-NOS

Die immunhistochemische Expression der e-NOS zeigte in den Aorten von alten Wildtyp-Mäusen (Abb.7A, 7B - Seite 83) eine in Bezug auf die einzelne Endothelzelle kräftige und für den Endothelzellverband nahezu lückenlose Anfärbung. Hingegen wies das Aortenendothel alter Ceacam1^{-/-}-Mäuse (Abb.7C, 7D - Seite 83) eine insgesamt schwächere und diskontinuierliche Immunfärbung auf.

Eine unterschiedliche Expression für die e-NOS konnte zudem mit quantitativen Messungen auf Proteinebene mittels Western Blotting ermittelt werden (Abb.8A-C - Seite 84-86). In Analogie zum VEGFR-2 war die Gesamtproteinmenge in allen Aortenlysaten von alten Ceacam1-Knockout-Mäusen reduziert gegenüber den Wildtyp-Gruppen.

Bei der Analyse der immunhistochemischen Expression am fluoreszierenden Aortenendothel trat ein uneinheitliches zelluläres Verteilungsmuster der e-NOS zu Tage. In Abgrenzung zu einer diffusen Expression der e-NOS in der äußeren Zellmembran, erwies sich ein ringförmiges Gebilde um den Zellkern als eine u.a. mit dem Golgi-Komplex assoziierte intrazelluläre Fraktion der e-NOS (Sessa et al., 1995; Cheng et al., 2005; Fulton et al., 2004). Die Inkubation des Gewebes mit DAPI diente der Visualisierung der Zellkerne mit gleichzeitiger Zuordnung zu den immungefärbten Strukturen (Abb.9A-C - Seite 87). Für die Untersuchung dieses qualitativen Unterscheidungskriteriums wurden insgesamt jeweils drei Aorten alter Wildtyp- bzw. Ceacam1^{-/-}-Mäuse herangezogen und von jedem Gefäß am Lichtmikroskop insgesamt 8 Aufnahmen in 1000-facher Vergrößerung angefer-

tigt. Anschließend wurde auf allen mikroskopischen Bildern die Anzahl ringförmig-geschlossener, perinukleärer Gebilde bestimmt, die vollständig innerhalb der Aufnahmen erkennbar waren (Abb.10 und Abb.11 - Seite 88). Auf den 24 mikroskopischen Fluoreszenzbildern der alten Wildtyp-Mausarten wurden insgesamt 195 ringartige intrazelluläre Gebilde der Endothelzellen als Immunfärbung der e-NOS ausgezählt. Im Gegensatz dazu konnten in den Aufnahmen der Aorten alter Ceacam1^{-/-}-Mäuse 417 geschlossene Ringformen im Endothel ausgemacht werden (Tab.1 – Seite 88).

3.3.3. VE-Cadherin

In der alten Wildtypmaus war eine positive Immunreaktion für das interzelluläre Adhäsionsmolekül nahezu am gesamten Aortenendothel erkennbar (Abb.12A, 12B - Seite 89). Hingegen konnte dieses kontinuierliche Expressionsmuster in den alterskonformen Ceacam1-Knockout-Mäusen nicht dargestellt werden (Abb. 12C, 12D - Seite 89). In der Aorta jener Mäuse fehlte die endotheliale Anfärbung für VE-Cadherin stellenweise und war in der Gefäßwand fokal akzentuiert.

Die Proteinkonzentrationsmessungen in den Aortenlysaten mittels Western Blotting ergaben eine stetige Erhöhung des VE-Cadherins in den alten Wildtyp-Mäusen gegenüber den Ceacam1^{-/-}-Mäusen (Abb.13A-C - Seite 90-92). Das bereits qualitative Überwiegen der Intensität der schwarzen Banden für VE-Cadherin verdeutlichte sich durch die Relation zur Aktin-Ladkontrolle und wurde ferner durch Quantifizierungsbestimmungen bestätigt.

Die Untersuchung des Expressionsmusters von VE-Cadherin erfolgte analog zur e-NOS, zudem durch Immunfluoreszenzfärbung des Aortenendothels. So wurden von drei Aorten alter Wildtyp- und alter Ceacam1-Knockout-Mäuse jeweils 8 lichtmikroskopische Aufnahmen in 1000-facher Vergrößerung angefertigt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden diejenigen Zellen miteinbezogen, deren Zellgrenzen vollständig innerhalb der mikroskopischen Bilder erkennbar waren (Abb.14 - Seite 93). Auf den Fluoreszenzaufnahmen variierten die Endothelzellgrenzen zwischen einem glattwandigen und einem gezackten bzw. geschlängelten Verlauf. Diese unterschiedliche interendotheliale Immunfärbung für VE-Cadherin erlaubte Rückschlüsse über die Stabilität der adhärenen Junctionen bzw. die phosphorylierungsabhängige Permeabilität des Endothels (Esser et al., 1998). Zur quantitativen Erfassung dieses Unterscheidungskriteriums wurden zahlenmäßig die Zellen bestimmt, die in allen Endothelkontaktzonen eine erkennbare Zick-Zack-Konformation und gleichzeitig keinen glattwandigen Zellkontaktbereich aufwiesen (siehe Abb.15 - Seite 93). Auf den mikroskopischen Aufnahmen der Aorten der alten Wildtyp-Gruppe wurden insgesamt 250 Zellen ausgezählt, bei den alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen hingegen konnten 313 Zellen bestimmt werden. Weiterhin zeigten 88 der insgesamt 250 markierten aortalen En-

endothelzellen der Wildtyp-Mäuse ein in allen Zellkontaktbereichen vorhandenes Zick-Zack-Expressionsmuster für VE-Cadherin auf. Demgegenüber wiesen 145 von 313 Endothelzellen der Ceacam1^{-/-}-Mäuse jenes phänotypische Merkmal auf. Im Verhältnis zur Gesamtzellzahl überwiegte dieser Phänotyp mit prozentual 46% in der Ceacam1^{-/-}- gegenüber 35% in der Wildtyp-Gruppe (Tab.2 – Seite 94).

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten belegen erstmalig, dass Ceacam-Defizienz bei der Maus in einer spontanen Entwicklung von kleinen atherosklerotischen Läsionen resultiert. Dies scheint mit einer erniedrigten Expression des Wachstumsfaktorrezeptors VEGFR-2, des interendothelialen VE-Cadherins und der Stickstoffmonoxidsynthase e-NOS vergesellschaftet zu sein, die für die strukturelle Integrität und normale Funktion des Gefäßendothels von essentieller Bedeutung sind. Die Befunde sprechen eindeutig für eine endotheliale Dysfunktion bei Ceacam1-Defizienz. Ferner konnte in dieser Arbeit illustriert werden, daß die endotheliale Expression von Ceacam1 auf atherosklerotischen Plaques im etablierten Atherosklerosemodell bei Apolipoprotein-E-Defizienz eine duale pathogenetischen Bedeutung für diese Gefäßerkrankung besitzt. Obgleich Ceacam1 einerseits zum Erhalt der funktionellen und strukturellen Endothelzellintegrität beitragen kann, kann es durch Stimulation der Angiogenese auch das Plaquewachstum fördern.

Lipidmetabolische Effekte von Ceacam1 und ihre Bedeutung für Gefäßbiologie

Die hepatische Expression des Ceacam1 nimmt eine protektive Funktion in der Ätiologie der Atherosklerose ein. Im Ceacam1^{-/-}-Modell resultiert aus dem ausbleibenden Insulinabbau eine Hyperinsulinämie, eine vermehrte hepatische Triglyzeridsynthese sowie eine reduzierte Taurin-konjugierte Gallensäuresekretion. Konsekutiv kommt es zur Entwicklung einer Leberverfettung mit Umverteilung von Lipiden zum weißen Fettgewebe und viszeraler Adipositas. Obgleich die Konzentrationen von Plasmatriglyceriden und -cholesterol unverändert bleiben, hat die erhöhte Lipolyse einen Anstieg von im Plasma an Albumin gebundenen unveresterten Fettsäuren zur Folge (Najjar et al., 2013). Sowohl die Hyperinsulinämie mit einer Steigerung der Expression vaskulärer Angiotensinrezeptoren (Samuelsson et al., 2006; Nickenig et al., 1998), als auch die Zunahme jener freier Fettsäuren führt, u.a. durch TLR-2- und TLR-4-vermittelte TNF- α -Transkription (Edirisinghe et al., 2006), zur vermehrten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, zur Inaktivierung von NO und zu einer Einschränkung der e-NOS-Synthese. Das durch die verminderte NO-Konzentration zunehmend sezernierte Endothelin trägt zur Steigerung des oxidativen Stresses noch bei. Weiterhin wird TNF- α neben anderen proinflammatorischen Zytokinen durch die vermehrte Hyperinsulinämie induzierte Fettdeposition in der Leber und im

weißen Fettgewebe mit Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen freigesetzt. Ferner hat bereits das Fehlen von Ceacam1 am Aortenendothel von Ceacam1^{-/-}-Mäusen negative Auswirkungen auf den Redoxstatus. Es stellte sich heraus, dass die Assoziation von Ceacam1 mit dem Insulinrezeptor sowie mit dem VEGFR-2, obligat ist für die ligandeninduzierte PKB/Akt-abhängige Aktivierung der e-NOS durch Phosphorylierung. Die fehlende Interaktion von Ceacam1 mit dem Insulinrezeptor beeinträchtigte zudem die FoxO1 (Forkhead box protein O1)-Phosphorylierung durch die PKB/Akt und somit die Transkription des Enzyms nach Insulinbindung (Nouvion et al., 2010; Najjar et al., 2013). Die Transkriptionsrepression des KLF-2 durch den TNF- α , die PAK-vermittelte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie die ausbleibende Disinhibition des NF- κ B durch NO haben wiederum die Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. des VCAM-1, zur Folge (Atkins and Jain, 2007; Nwariaku et al., 2004), dessen Bindung an Integrine der Leukozyten zu einer Erhöhung der interendothelialen Permeabilität durch Phosphorylierung von VE-Cadherin führt. Dem zugrunde liegt die Rac1-abhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, mit Aktivierung der c-Src und der Pyk-2 (proline-rich tyrosine kinase-2) (Frey et al., 2009). Zudem vermag unphosphoryliertes FoxO1 zusammen mit β -Catenin bei vermehrtem oxidativen Stress die Synthese von Proteinen, der sog. „tight junctions“, zu reprimieren, ein Vorgang, der zur Steigerung der interendothelialen Permeabilität beiträgt (Gavard und Gutkind, 2008). In diesem Zusammenhang vermag auch TNF- α durch Aktivierung der SAPK/JNK direkt die parazelluläre Permeabilität durch Phosphorylierung von VE-Cadherin zu erhöhen (Dworakowski et al., 2006; Nwariaku et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Aorta von Ceacam1^{-/-}-Mäusen auch auf eine gesteigerte Aktivität der endotheliale NADPH-Oxidase (Nox4) zurückzuführen war und mit einer vermehrten Bildung von Markern der Lipidperoxidation, den Isoprostanen aus Arachidonsäure, vergesellschaftet war (Najjar et al., 2013). Die Zunahme des oxidativen Stresses, insbesondere im Bereich der Zytoplasmamembran der Endothelzellen, birgt des Weiteren die Gefahr der Oxidation von LDL-Partikeln bei der rezeptorvermittelten Endozytose. Zum einen fördern Superoxidanionen der Nox4 die transendotheliale Passage für LDL (Meyer and Schmitt, 2000). Ferner trägt ox-LDL zu allen proatherogenen Veränderungen des Endothels bei, indem es die Permeabilität erhöht (Hashimoto et al., 2007) sowie LOX-1-vermittelt die e-NOS-Expression zu unterdrücken und die Bildung von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen zu steigern vermag (Endemann und Schiffrin, 2004). Histologische Analysen in dieser Arbeit konnten illustrieren, dass es in den Aorten von Ceacam1^{-/-}-Mäusen, trotz Fehlens klassischer atherosklerotischer Risikofaktoren, wie z.B. der Hypercholesterinämie, zu einer spontanen Entwicklung von kleinen atherosklerotischen Läsionen kommt. Die hierfür initiale sub-

endotheliale Deposition von Cholesterin wird durch die gleichen pathophysiologischen Mechanismen provoziert, wie sie schon für die endotheliale Dysfunktion beschrieben wurden, nämlich die gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle sowie die Erhöhung der endothelialen Permeabilität. Dem zugrunde liegt der auf molekularer Ebene stattfindende oxidative Stress. Zum einen ist die Ceacam1-Defizienz daran mittelbar durch eine hyperinsulinämiebedingte Entzündungsreaktion in der Leber und im weißen Fettgewebe mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Erhöhung von unveresterten Fettsäuren beteiligt, zum anderen unmittelbar auf Endothelzellebene durch die ausbleibende Interaktion mit ligandenaktivierten Tyrosinkinase Rezeptoren, wie z.B. dem Insulinrezeptor oder dem VEGFR-2, und durch die Repression der Transkription wichtiger vaskulärer Endothelzellfunktionsmarker.

Ceacam1 und endotheliale Dysfunktion

Für die endotheliale Grundfunktion ist sowohl die konstitutive als auch induzierte Expression des VEGFR-2 am Endothel von Bedeutung. Erstere spielt z.B. für die wand Schubspannungsabhängige, integrinvermittelte Mechanotransduktion eine wichtige Rolle (Hahn et al., 2009), letztere vor allem für Interaktion mit seinem Hauptbindungspartner, dem VEGF. Ligandenbindung hat die Aktivierung von Signaltransduktionswegen zur Folge, die sowohl für die Synthese von vaskuloprotektiven Faktoren, das Überleben und die Antiapoptose als auch für die Erneuerung von Endothelzellen und die adaptive Umgestaltung von Blutgefäßen (Remodeling) von Wichtigkeit ist. Durch immunhistochemische Untersuchungen und insbesondere durch quantitative Messungen auf Protein- und DNA-Ebene konnte herausgestellt werden, dass die aortale Expression in den alten Ceacam1-KO-Mäusen deutlich gegenüber der Wildtypkontrollgruppe reduziert war. Als potente Induktoren des VEGFR-2 gelten, in Analogie zum VEGF, die gesteigerte Signalfortleitung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. des TNF- α mit Transkriptionsrepression des KLF-2 sowie der Anstieg des oxidativen Stresses mit Aktivierung des NF- κ B (Atkins and Jain, 2007; Hoeben et al., 2004; Gonzalez-Pacheco et al., 2006; Nespereira et al., 2003). Da in den Aorten der Ceacam1^{-/-}-Mäuse sowohl die NO-Konzentration erniedrigt, die Aktivität der NADPH-Oxidase Nox4 und des NF- κ B-Signalwegs gesteigert sowie die Bildung des TNF- α deutlich erhöht war, sollte es erwartungsgemäß zu einer Zunahme der Expression des VEGFR-2 und des VEGF kommen. In jenem Falle würde die vermehrte Anlagerung des VEGF an den VEGFR-2 im Sinne einer positiven Verstärkerschleife die Rezeptorexpression noch weiter anheben. Dass die in den alten Ceacam1-KO-Mäusen im Vergleich zur Wildtypgruppe exprimierte Konzentration für den VEGFR-2 und für den VEGF nicht erhöht, sondern merklich reduziert war, konnte in diesem Zusammenhang nicht mit den reaktiven Signaltransduktionsprozessen in den Endothelzellen erklärt wer-

den. Vielmehr scheint die Bildung oder der Abbau jener Moleküle unter der Kontrolle von Ceacam1 zu stehen. Da das Fehlen von Ceacam1 Einfluss ausübt auf die Signalfortleitung des ligandenaktivierten VEGFR-2 (Najjar et al., 2013), wäre es im Zuge dessen möglich, dass z.B. die reduzierte Aktivität der PKB/Akt für die Abnahme der Synthese des VEGF und des VEGFR-2 verantwortlich ist. Im Einklang dazu steht, dass die aortale Expression weiterer regulatorischer Angiogenesemarker, wie der Angiopoietine und des VEGFR-1, in den alten Ceacam1-KO-Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen ebenfalls herabgesetzt war (Najjar et al., 2013).

Sowohl die erniedrigte Expression der e-NOS im Aortenendothel alter Ceacam1-defizienter Mäuse, die verminderte NO-Bioverfügbarkeit als auch die offensichtlich veränderte subzelluläre Verteilung des Enzyms im Vergleich zu den Wildtypmäusen legte den Schluss nahe, dass Ceacam1 das e-NOS-NO-System in den Makroarterien, wie der Aorta, und dadurch die endotheliale Funktion zu beeinflussen imstande war. Die konstitutive Bildung des NO durch die e-NOS nimmt im kritischen Ausmaß Einfluss zum einen extraendothelial auf die Hämostase, z.B. die Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten, sowie den Tonus und das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen. Durch cGMP-abhängige Phosphorylierungsreaktionen führt NO zur Einschränkung der endothelialen Permeabilität in großen Arterien (van Hinsbergh and Amerongen, 2002). Weiterhin vermag NO Zellstrukturen vor der Oxidation durch reaktive Sauerstoffradikale zu schützen und z.B. Proteine durch reversible Nitrosylierung funktionell zu modifizieren. In diesem Zusammenhang vermag NO Einfluss auf Signaltransduktionswege auszuüben, die den Zellzyklus regulieren oder das Entzündungsgeschehen kontrollieren. Für das Ceacam1^{-/-}-Modell konnte zunächst demonstriert werden, dass die NO-Konzentration durch gesteigerten oxidativen Stress, wie auch durch verminderte Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung herabgesetzt war. Letzteres war bedingt durch die fehlende Interaktion von Ceacam1 sowohl mit dem Insulinrezeptor als auch mit dem VEGFR-2, da Ceacam1 nach Ligandenaktivierung jener Tyrosinkinase-Rezeptoren deren vorzeitige Terminierung des PKB/Akt-Signalwegs durch Sequestrierung der SHP2 und SHP1 (Src-homology tyrosine phosphatase 2 und 1) zu verhindern vermag (Najjar et al., 2013; Nouvion et al., 2010). Da die Phosphorylierung, z.B. des Serinrestes 1179 der e-NOS durch die PKB/Akt bedeutsam ist für die NO-Bildung und jener Signalweg in den alten Ceacam1-KO-Mäusen abgeschwächt war, konnte dadurch ferner die verminderte NO-Bioverfügbarkeit erklärt werden. Dazu trägt die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen durch gesteigerte β -Oxidation unveresterter Fettsäuren sowie oxidative Phosphorylierung (Edirisinghe et al., 2006) und Aktivität der NADPH-Oxidase Nox4 bei (Najjar et al., 2013). Auf immunhistochemischen Fluoreszenzaufnahmen in "whole mount"-Technik konnte des Weiteren im Aortenendothel der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse im Vergleich

zur Wildtypkontrollgruppe eine deutliche Zunahme der Assoziation der e-NOS mit dem Golgi-Komplex gezeigt werden. Hintergrundig für jenes veränderte subzelluläre Verteilungsmuster sind ansteigende blutströmungsbedingte Wandschubspannungen, oszillierende Strömungsverhältnisse, Depletion caveolären Cholesterols durch ox-LDL und ausbleibende reversible Acylierung des Enzyms mit Palmitinsäure. Obwohl NO durch die e-NOS in beiden Zellkompartimenten, d.h. Plasmamembran und Golgi-Komplex, gebildet werden kann, ist die kalziumabhängige, caveoläre NO-Synthese effektiver als jene kalziumunabhängige in der Golgi-Komplex-Fraktion (Qian et al., 2010). Zum einen könnte die Zunahme des oxidativen Stresses in den Aorten der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse die Umverteilung der e-NOS in den beiden Zellkompartimenten provozieren, andererseits konnte für das Ceacam1^{-/-}-Modell auf DNA-Ebene eine sehr deutlich reduzierte Expression des β -Catenins gegenüber der Wildtypkontrollgruppe gemessen werden (Najjar et al., 2013). Letzteres ist in dem Zusammenhang bedingt durch die reduzierte PKB/Akt-Aktivität in den alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen sowie das potentielle Ausbleiben der Assoziation von Ceacam1 mit β -Catenin (Jin et al., 2008). Da die Aktivität des kanonischen WNT-Signalwegs in ruhenden Endothelzellen im Vergleich zu angiogenetisch aktivierten Endothelzellen verringert ist (Dejana, 2010), könnte die Abnahme der Konzentration jenes Proteins auf die fehlende angiogenetische Potenz des Ceacam1 zurückzuführen sein. Da WNT-Proteine ebenfalls palmitoyliert sind (Cong et al., 2004), könnte im Zuge dessen auch die Palmitoylierung der e-NOS und somit die Plasmamembranfraktion in den Ceacam1^{-/-}-Mäusen verringert sein. Ferner ist jene Acylierungsreaktion für die Assoziation des Enzyms mit den Caveolae notwendig und die dynamische Formierung jener Mikroinvaginationen der äußeren Zellmembran korreliert mit der angiogenetischen Aktivierung der Endothelzellen (Frank et al., 2003). Zusammenfassend kann die verringerte NO-Bioverfügbarkeit in den Aorten der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse zurückgeführt werden auf den vermehrten oxidativen Stress, die erhöhte Assoziation der e-NOS mit dem Golgi-Komplex und die herabgesetzte Phosphorylierung durch die PKB/Akt. Das Fehlen von Ceacam1 könnte ferner mit einer herabgesetzten Aktivität des WNT-Signalwegs einhergehen, assoziiert mit einer reduzierten, palmitoylierungsabhängigen Assoziation der e-NOS mit den Caveolae. Durch immunhistochemische Färbungen und durch Proteinbestimmung mittels Western Blotting konnte eine merklich reprimierte Expression für die e-NOS in den Aorten der alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe bestimmt werden. Die endotheliale Synthese des Enzyms erfolgt konstitutiv und wird in erster Linie durch laminare Scherkräfte der Blutströmung kontrolliert, wobei die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und KLF-2 (Krüppel-like factor-2) von Bedeutung sind (Searles, 2006). Änderungen des zellulären Redoxstatus vermögen des Weiteren die Aktivität des NF- κ B und somit die e-NOS-Synthese zu regulieren. In diesem Zusammenhang sind auch ligandenaktivierte Tyrosin-

kinaserezeptoren, wie z.B. der VEGFR-2 und der Insulinrezeptor, in der Lage, einerseits die Repression der e-NOS durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 zu verhindern (Potente et al., 2005), zudem, wie im Falle des VEGFR-2, über PKC-abhängige Aktivierung des NF- κ B die e-NOS-Synthese zu erhöhen. Auf der anderen Seite wird die Expression der e-NOS durch TNF- α und durch ox-LDL gehemmt. Die in den Aorten der alten Ceacam1-KO-Mäusen gemessene reduzierte NO-Bioverfügbarkeit und die Zunahme des oxidativen Stresses, u.a. durch die NADPH-Oxidase Nox4 im Gegensatz zu den Wildtypmäusen, konnte nicht als Erklärung für die herabgesetzte Expression der e-NOS herangezogen werden, da es über den redoxsensitiven NF- κ B kompensatorisch zu einer Steigerung der e-NOS-Synthese kommen müsste. Allerdings im Einklang zu der verminderten e-NOS-Konzentration in den alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen steht die gegenüber der Wildtypkontrollgruppe reduzierte Signaltransduktion durch den VEGFR-2 sowie die mehr als vierfach erhöhte TNF- α -Konzentration mit Transkriptionsrepression des KLF-2 und der e-NOS. Denkbar wäre auch die verstärkte Bildung von ox-LDL durch reaktive Sauerstoffspezies. Die Erniedrigung der e-NOS-Konzentration in den Ceacam1^{-/-}-Mäusen kann ferner durch die Abwesenheit von Ceacam1 insofern abgeleitet werden, als dass seine fehlende Interaktion mit ligandenaktivierten Tyrosinkinasezeptoren die verminderte Synthese des Enzyms durch den dephosphorylierten Transkriptionsfaktor FoxO1 zur Folge hat (Najjar et al., 2013; Potente et al., 2005).

Ein weiterer für die Endothelzellfunktion geeigneter Marker stellt das VE-Cadherin dar. Als interendotheliales, kalziumabhängiges Adhäsionsmolekül ist es nicht nur an der Restriktion der parazellulären Permeabilität für gelöste Blutbestandteile beteiligt, sondern es kontrolliert zudem im Zusammenspiel mit inflammatorischen Oberflächenadhäsionsmolekülen der Immunglobulinfamilie, wie z.B. ICAM-1 oder VCAM-1, die Transmigration von Leukozyten (Vestweber, 2008). Ferner spielt VE-Cadherin für das Endothel eine wichtige Rolle durch Modulation der Funktionen von Wachstumsfaktoren. So inhibiert es durch Sequestrierung des Adapterproteins Shc und durch junktionale Phosphatasen sowie Inaktivierung der c-Src durch die Csk (C-terminale Src-Kinase) den MAPK-Signalweg des VEGFR-2 (Wallez et al., 2006). Indem es gleichzeitig die Signaltransduktion des TGF- β durch Phosphorylierung von SMAD-Proteinen amplifiziert, führt VE-Cadherin zu einer Gefäßstabilisierung durch Einschränkung der Proliferation und Migration (Rudini et al., 2008). In diesem Zusammenhang hat VE-Cadherin über Interaktion mit dem VEGFR-2 und die Aktivierung der PKB/Akt zudem überlebensfördernde und antiapoptotische Signalwirkung auf die Endothelzellen, z.B. durch Inhibition der GSK-3 β oder durch Expressionssteigerung von Gas-1 (Liu and Agarwal, 2010; Spagnuolo et al., 2004; Wallez et al., 2006). Die zytoplasmatische Konzentration des mit VE-Cadherin assoziiertem β -Catenin hat des

Weiteren regulatorischen Einfluss auf den kanonischen WNT-Signalweg, der wiederum über den Transkriptionsfaktor KLF-4 (Krüppel-like factor-4) die VE-Cadherin-Synthese und damit den endothelialen Zellzyklus reguliert (Cowan et al., 2010; Wallez et al., 2006). Im Komplex mit dem dephosphorylierten Transkriptionsfaktor FoxO1 kann β -Catenin im Zellkern zudem die Transkription von Proteinen der "tight junctions" affektieren (Gavard and Gutkind 2008). Das Catenin p120 schützt nach Anlagerung an VE-Cadherin dessen Internalisierung mit konsekutivem endosomal-lysosomalem bzw. proteasomalem Abbau (Vincent et al., 2004). Ferner hat die c-Src-abhängige Phosphorylierung von p120 eine Hemmung der Aktivität der kleinen GTP-Pase der Rho-Familie RhoA zur Folge. Zusammen mit dem VEGFR-2 und Pecam-1 ist VE-Cadherin letztlich Teil eines mechanosensorischen Komplexes, der blutströmungsbedingte Wandschubspannungen, in Abhängigkeit von der Extrazellulärmatrix, integrinvermittelt in ein zelluläres Signal umzusetzen vermag (Hahn et al., 2009). Für die Beurteilung der Stabilität der adhärenen Junctionen bzw. der permeabilitätsrestringierenden Eigenschaften des VE-Cadherins diente die Quantifizierung hinsichtlich eines qualitativen Merkmals auf immunhistochemischen Fluoreszenzaufnahmen in "whole mount"-Technik. In den Aorten der alten *Ceacam1*^{-/-}-Mäuse konnte im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe ein merklich gesteigertes "Zick-Zack"-Expressionsmuster in der Kontaktzone zwischen den Endothelzellen herausgestellt werden. Jene Anfärbung für VE-Cadherin in Form eines geschlängelten bzw. gezackten Verlauf deutete auf einen Anstieg der parazellulären Permeabilität in erster Linie durch Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin und den Cateninen hin (Esser et al., 1998; Vestweber, 2008). So vermag die Aktivierung des VEGFR-2 durch den VEGF sowohl die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin, β -Catenin, γ -Catenin und p120-Catenin als auch die Serinphosphorylierung an der Position 665 durch die p21-aktivierte Proteinkinase (PAK) mit nachfolgender β -Arrestin-2 bzw. Clathrin vermittelter Endozytose zu veranlassen. Obwohl die in den Aorten der alten *Ceacam1*^{-/-}-Mäuse gemessenen Konzentrationen für den VEGF und den VEGFR-2 gegenüber den Wildtypmäusen deutlich vermindert waren, konnte die daraus resultierende *Ceacam1* bedingte Reduktion der Aktivität der PKB/Akt als Erklärung für die gesteigerte parazelluläre Permeabilität herangezogen werden. Die herabgesetzte Phosphorylierung der GSK-3 β durch die PKB-Akt hat, darüber hinaus auch durch die fehlende Interaktion zwischen *Ceacam1* und dem Insulinrezeptor, einen vermehrten proteasomalen Abbau von β -Catenin zur Folge (Najjar et al., 2013). Da β -Catenin für die Verbindung von VE-Cadherin mit α -Catenin und somit dem Aktinzytoskelett nötig ist, kann die abgeschwächte Aktivität der PKB/Akt zu Einbußen der Stabilität der adhärenen Junctionen wesentlich beitragen und mit der Abwesenheit von *Ceacam1* in den alten *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen erklärt werden. Weiterhin ist denkbar, dass

der in den alten Ceacam1-KO-Mäusen gemessene Anstieg des oxidativen Stresses sowie des TNF- α negative Auswirkungen auf die Reifung der adhärenen Junctionen hat. Reaktive Sauerstoffradikale, wie z.B. H₂O₂, vermögen redox-sensitive Ionenkanäle, wie z.B. den TRPM-2 (transient receptor potential melastatin-2), zu aktivieren, mit der Folge eines prothahiertem Einstroms von Kalziumionen (Hecquet et al., 2008). Die dadurch gesteigerte Aktivität der CaMK-2 mit konsekutiver Phosphorylierung des Gerüstproteins Filamin A sowie der der MLCK mit Verstärkung der Aktomyosinkontraktibilität, können zur Erhöhung der interendothelialen Permeabilität beitragen (Mehta and Malik, 2006). Die Aktivierung des NF- κ B durch oxidativen Stress sowie die Signaltransduktion durch den TNF- α hat die endotheliale Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. dem VCAM-1, zur Folge. Die integrinvermittelte Aggregation von Leukozyten an jenen Molekülen führt über Rac1 und Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer c-Src- und Pyk-2-vermittelten Phosphorylierung an den Tyrosinresten 658 und 731, mit nachfolgender Internalisierung und Degradation von VE-Cadherin (Frey et al., 2009; Vestweber, 2008). Die Stabilität der adhärenen Funktionen von VE-Cadherin kann ferner dadurch affiziert werden, dass TNF- α über eine Aktivierung der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK) und der SAPK/JNK die Phosphorylierung des α -Catenins bewirkt, das über β - und γ -Catenin eine Anbindung von VE-Cadherin an das Aktinzytoskelett ermöglicht (Nwariaku et al., 2004). Letzteres ist auch durch blutströmungsbedingte Wandschubspannungen mit Integrinbindung an Fibronectin oder Fibrinogen möglich (Hahn et al., 2009; Nwariaku et al., 2004). Obgleich das verstärkte "Zick-Zack"-Expressionsmuster in den Aorten der alten Ceacam1-KO-Mäuse keine Aussage über die absolute Konzentration von VE-Cadherin, den Phosphorylierungsgrad oder die Anbindung an das Aktinzytoskelett machen, so können die abgeschwächte Aktivität der PKB/Akt, der Anstieg des oxidativen Stress und die erhöhte Konzentration des TNF- α für die herabgesetzte Reifung und Stabilität der adhärenen Junctionen und somit für die erhöhte endotheliale Permeabilität gegenüber der Wildtypkontrollgruppe als Erklärung herangezogen werden. In Analogie zum VEGFR-2 und zur e-NOS konnte auch für VE-Cadherin in immunhistochemischen Färbungen sowie durch Proteinmessungen durch Western Blotting eine deutlich reduzierte Expression des Adhäsionsmolekül im Aorten-endothel der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse im Gegensatz zu den Wildtypkontrollmäusen herausgestellt werden. In diesem Zusammenhang konnte durch Messungen auf DNA-Ebene auch eine herabgesetzte Konzentration der m-RNA für β -Catenin bestimmt werden (Najjar et al., 2013). Die Synthese des VE-Cadherin steht u.a. unter der Kontrolle der p38-MAPK und des Transkriptionsfaktors Ets-1 (Tanaka et al., 1998; Lelievre et al., 2001) sowie des kanonischen WNT-Signalwegs und des Transkriptionsfaktors KLF-4 (Cowan et al., 2010). So hat die Aktivierung des VEGFR-2 durch den

VEGF über den MAPK-Signalweg, ebenso wie die damit verbundene Signaltransduktion durch die PKB/Akt mit Hemmung der GSK-3 β , eine Steigerung der VE-Cadherin-Expression zur Folge. Obgleich oxidativer Stress und auch der TNF- α die p38-MAPK aktivieren können (Force et al., 1996; Nwariaku et al., 2004), scheint die gleichzeitige Aktivierung des redoxsensitiven NF- κ B mit der Genaktivierung zu interferieren (Dryden et al., 2012). In den alten Ceacam1-KO-Mäusen ist die ligandeninduzierte PKB/Akt-Aktivierung durch Tyrosinkinaserzeptoren, wie z.B. dem VEGFR-2 und dem Insulinrezeptor, durch die Defizienz von Ceacam1 abgeschwächt. Letzteres vermag durch Inhibition der GSK-3 β die zytosolische Konzentration von β -Catenin und letztlich die VE-Cadherin-Neusynthese durch den kanonischen WNT-Signalweg zu beeinträchtigen. Ferner kann die reduzierte Expression des VE-Cadherin in der Aorta der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse mit der herabgesetzten Expression des VEGF und des VEGFR-2 mit konsekutiver Reduktion der Ets-1-Transkription erklärt werden. Ebenfalls vermag die phosphorylierungsabhängige Steigerung der parazellulären Permeabilität zu einer subendothelialen Deposition von Fibronectin oder Fibrinogen führen, mit der Folge der Integrin vermittelten Internalisierung und Degradation von VE-Cadherin als Antwort auf blutströmungsbedingte Scherspannungen. Andererseits sollten sowohl die erhöhte TNF- α -Konzentration als auch der Anstieg des oxidativen Stresses über die PAK und die p38-MAPK auch zur Transkriptionssteigerung des VE-Cadherins führen. Dass jener Signaltransduktionsweg jedoch nicht zum Tragen kommt, liegt offenbar an der parallelen Aktivierung des NF- κ B, der mit der durch die Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie vermittelten VE-Cadherin-Expression interferiert. Dass Ceacam1 zum einen das Entzündungsgeschehen zu beeinflussen vermag, zeigte sich in der Erhöhung der Aktivität des NF- κ B und in der Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen, wenn in Wildtypendothelzellen Ceacam1 durch sog. „silencer-mRNA“ ausgeschaltet wird (Najjar et al., 2013). Die fehlende angiogenetische Potenz des Ceacam1 in den alten Ceacam1^{-/-}-Mäusen spiegelt sich in der verminderten Expression von wichtigen Endothelzellfunktions- bzw. Angiogenesemarker, wie z.B. des VEGFR-2, der e-NOS und des VE-Cadherins, sowie der Angiopoeitine und des VEGFR-1 wider (Najjar et al., 2013). Die gegenüber der Wildtypkontrollgruppe herabgesetzte Konzentration des VEGFR-2 in den Aorten der alten Ceacam1^{-/-}-Mäuse konnte nicht von den pathophysiologischen Einflussfaktoren, wie dem Anstieg des oxidativen Stresses oder den erhöhten Werten für den TNF- α , abgeleitet werden (Gonzalez-Pacheco et al., 2005; Nespereira et al., 2003; Atkins and Jain, 2007; Hoeben et al., 2004). Vielmehr hat offenbar die Defizienz von Ceacam1 Auswirkungen auf Signaltransduktionswege, die das Entzündungsgeschehen und die Zellproliferation regulieren, wie z.B. die Interaktion mit dem kanonischen WNT-Signalweg und dem NF- κ B. Dadurch scheint in erster Linie die Prä-

sens von Ceacam1 sowohl für die Signalweiterleitung als auch für die Expression des VEGFR-2 unabdingbar zu sein. Die konsekutiv verminderte PKB/Akt-Aktivität sowie die abgeschwächte Expression des VEGFR-2 haben letztlich auch die Einschränkung der Synthese von VE-Cadherin und der e-NOS zur Folge (Cowan et al., 2010; Lelievre et al., 2001; Najjar et al., 2013; Zachary and Glikli; 2000). Darüber hinaus könnte Ceacam1 wiederum die Bildung des VE-Cadherins und der e-NOS sowohl durch die Interaktion mit dem NF- κ B (Searles, 2006; Dryden et al., 2012) als auch mit dem kanonischen WNT-Signalweg beeinflussen, da die Transkription der beiden Moleküle unter der Kontrolle der sog. „Krüppel-like factors“ (KLF) steht, die dem kanonischen WNT-Signalweg nachgeschaltet sind und Ceacam1 in jenen Signalweg durch die Aktivität der PKB/Akt und die Assoziation mit β -Catenin involviert ist (Cowan et al., 2010; Atkins and Jain; 2007; Najjar et al., 2013; Jin et al., 2008).

Ceacam1 und ApoE^{-/-}-Modell

Diese Arbeit kann erstmalig zeigen, dass in dem etabliertem Atherosklerosemodell der Maus mit Apolipoprotein-E-Defizienz Ceacam1 fast ausschließlich im Bereich aortaler Plaques, insbesondere in dem plaquebedeckenden Endothel hochreguliert nachzuweisen ist. Dieser Nachweis impliziert eine pathogenetisch relevante Bedeutung des Ceacam1 für diese Gefäßerkrankung. Auf Paraffinquerschnitten der murinen Aorta war das den Plaque vom Blutgefäßlumen abgrenzende Endothel positiv für Ceacam1. Die Tatsache, dass Ceacam1 nicht konstitutiv im Aortenendothel exprimiert wird, sondern auf angiogenetisch aktivierten Endothelzellen, führt zu der Annahme, dass plaqueassoziierte pathologische Verhältnisse hierfür ausschlaggebend sind. So sind zum einen kritische, blutströmungsbedingte Wandschubspannungen sowohl für eine veränderte Endothelzellmorphologie (Burrig, 1991; Walski et al., 2002) als auch für ein verändertes endotheliales Genexpressionsmuster verantwortlich (Hastings et al., 2007). Weiterhin führt die persistierende Dyslipidämie über eine erhöhte konzentrationsbedingte Transsudation triglyzeridreicher Lipoproteine sowie den reduzierten Abtransport von Cholesterin über die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) zu einer Akkumulation von Fettsäuren und Cholesterin am Gefäßendothel. Der Anstieg des oxidativen Stresses geht einher mit der Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen, der Freisetzung von Zytokinen, vasoaktiven Mediatoren und Wachstumsfaktoren sowie einer Zunahme der Proliferationstendenz (Griendling et al., 2000; Griendling et al., 2000; Erusalimsky, 2009; Frey et al., 2009; Borradaile and Pickering, 2010). Auf diesen veränderten Aktivierungszustand folgt langfristig der als Seneszenz bezeichnete, irreversible Wachstumsarrest und Funktionsverlust des Endothels. Neben der replikativen Telomer-abhängigen Alterung kann sich, vor allem bei oxidativem Stress, durch vermehrte Signalfortleitung der PKB/Akt, von Ras und Rac1

bzw. verminderter Aktivität der NO-abhängigen Proteindeacetylase SIRT-1 mit Akkumulation von Zellzyklusinhibitoren eine Telomer-unabhängige, vorzeitige Seneszenz einstellen (Erusalimsky, 2009; Minamino et al., 2004). Die Aufhebung der funktionellen Endothelzellintegrität hat, insbesondere in dem den atherosklerotischen Plaque bedeckenden Endothel, Auswirkungen auf die Stabilität und Rupturgefahr. Ceacam1 vermag in diesem Zusammenhang, z.B. über sein ITAM und ITIM, modulierenden Einfluss auf eine Reihe von Signaltransduktionswegen in Endothelzellen auszuüben. Durch homophile Interaktion ist Ceacam1 in der Lage, in die antigenvermittelte Immunantwort der T-Helfer-Lymphozyten einzugreifen (Gray-Owen and Blumberg, 2006; Kwak et al., 2002). Ceacam1 fördert durch die Expressionssteigerung des VEGFR-2 sowohl die Synthese vaskuloprotektiver Mediatoren, wie NO und Prostazyklin, als auch zusammen mit VE-Cadherin antiapoptotische, überlebensfördernde und proliferationsrestringierende Signalwege. Weiterhin stellt Ceacam1 ein intrazellulär mit dem Aktinzytoskelett verbundenes, transmembranöses Zelladhäsionsmolekül dar, das durch die Assoziation mit β -Catenin, die Regulation der NF-kappaB-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die VE-Cadherin-Synthese an der Restriktion der parazellulären Permeabilität beteiligt ist (Jin et al., 2008; Najjar et al., 2013). Die Interaktion des Ceacam1 mit dem Kalzium bindenden Protein Calmodulin und die Ceacam1-vermittelte NO-abhängige Einschränkung der intrazellulären Kalziumkonzentration können darüber hinaus durch Modulation der Aktivität der CaMK-2 und der MLCK u.a. die Stabilität interendothelialer Junctionen und die endotheliale Permeabilität verbessern. Im Zuge dessen vermag Ceacam1 über die NO-abhängige cGMP-vermittelte Hemmung des Abbaus von cAMP (Van Hinsbergh and Amerongen, 2002) und die potentielle Assoziation mit Calmodulin die Aktivität von Adenylatcyclasen in interendothelialen Junctionen zu beeinflussen (Heijnen et al., 2004; Mehta and Malik, 2006). Der „second messenger“ cAMP kann wiederum zur Stabilisierung des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes beitragen (Vestweber, 2008), des Weiteren die Permeabilität durch Phosphorylierung von Filamin A durch die PKA einschränken und die NO-Produktion durch die PKA steigern (Heijnen et al., 2004; Wang et al., 1996).

Zusammenfassend können der endothelialen Expression des Ceacam1 auf atherosklerotischen Plaques einige pathogenetisch bedeutsame, atheroprotektive Funktionen zugeschrieben werden. Durch die Modulation von Signaltransduktionswegen und die Regulation der Transkription bedeutsamer Endothelzellfunktions- bzw. Angiogenesemarker, wie dem VEGFR-2, dem VE-Cadherin und der e-NOS, hat Ceacam1 entscheidenden Einfluss auf den Erhalt der funktionellen Integrität des Endothels und der Gefäßmorphologie. Durch die Steuerung des Entzündungsgeschehen, des Redoxstatus sowie der endothelialen Permeabilität und Proliferation wirkt Ceacam1 der Entwicklung einer vorzeitigen Seneszenz entgegen und kann dadurch zur Plaquestabilität beitragen. Letztlich könnte

Ceacam1, wie kürzlich für Tumorgefäße gezeigt werden konnte, durch eine verbesserte Integration der Perizyten und glatter Muskelzellen in die Gefäßwand für die Formierung und Stabilität neuer Blutgefäße, z.B. in einem atherosklerotischen Plaque, von Bedeutung sein (Gerstel et al., 2011). Allerdings vermag Ceacam1 unter bestimmten Umständen eine proangiogenetische Wirkung zu entfalten. Die Initiierung der kapillären Blutgefäßbildung ist abhängig vom Ausmaß des Entzündungsgeschehens, der Immunantwort und des Sauerstoffpartialdrucks (Virmani et al., 2005). In diesem Sinne birgt die Formierung noch unreifer und durchlässiger Gefäße zudem die Gefahr von Hämorrhagien, die zum Plaquewachstum und zur Plaqueinstabilität beitragen, insbesondere unter dem protahierten Einfluss von atherosklerotischen Risikofaktoren.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse führen zu der Annahme, dass der endotheliale Expression des Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 (Ceacam1) auf aortalen atherosklerotischen Plaques Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse eine duale pathogenetische Bedeutung zugeschrieben werden kann. Ceacam1 vermag Signaltransduktionswege, wie z.B. die Aktivität der Proteinkinase B (PKB/Akt), zu modulieren und die Transkription bedeutsamer Endothelzellfunktionsmarker, wie z.B. des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (VEGFR-2), der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (e-NOS) und des vaskulären endothelialen Cadherins (VE-Cadherin) zu regulieren. Dadurch erhält Ceacam1 Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose, den Redoxstatus, das Entzündungsgeschehen, die endotheliale Permeabilität und die Immunantwort. Somit kann Ceacam1 einerseits zum zeitweiligen Erhalt der Endothelzellfunktion beitragen und somit der Progression der Atherosklerose entgegenwirken. Andererseits kann das proangiogenetische Ceacam1 unter der fortwährenden Einwirkung atherosklerotischer Risikofaktoren durch die Bildung unreifer und durchlässiger Gefäße das Plaquewachstum und die Plaqueinstabilität provozieren und somit nachteilige Auswirkungen auf die Pathogenese der Gefäßerkrankung haben.

Im Ceacam1-Knockout-Modell bestand hintergründig ein ätiologischer Zusammenhang zur Atherosklerose. Der leberspezifische Ausfall von Ceacam1 führte zur Entstehung einer Hyperinsulinämie, Leberverfettung, vizeraler Adipositas und zu einem Anstieg von freien Fettsäuren und proinflammatorischen Zytokinen im Blut. Das Fehlen von Ceacam1 in der Niere hatte zudem die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie zur Folge. Obgleich es in den Aorten der Ceacam1-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Wildtypgruppe zur Entwicklung kleiner atherosklerotischer Läsionen kam, konnte die hierfür zugrunde liegende endotheliale Dysfunktion nicht alleinig mit den hier auftretenden atherosklerotischen Risikofaktoren, wie z.B. dem Anstieg des oxidativen Stresses und des Tumornekrosefaktors- α , erklärt werden. Die deutlich verminderte Expression der drei endothelialen Funktionsmarker VEGFR-2, e-NOS und VE-Cadherin in den Aorten der Ceacam1-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe, die eine endotheliale Dysfunktion hinreichend charakterisiert, musste auf die potentielle Abwesenheit des regulatorischen Ceacam1 zurückgeführt werden. Das Fehlen von Ceacam1 geht einher mit einer Modulation von Signaltransduktionswegen, wie z.B. einer reduzierten Aktivität der PKB/Akt, die in kritischem Ausmass Einfluss auf die Expression jener Marker und die Kompensation der Endothelzellfunktion ausübt. Welche protektive Rolle Ceacam1 darüberhinaus im Endothel großer Blutgefäße bei der Entstehung der Atherosklerose spielt, muss in zukünftigen Analysen geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abumiya, T, T Sasaguri, Y Taba, Y Miwa and M Miyagi Shear stress induces expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1/KDR through the CT-rich Sp1 binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(6): 907-13.
2. Agius, LM Complicated atheromatous plaque as integral atherogenesis. *J Clin Pathol* 2007; 60(6): 589-92.
3. Alderton, WK, CE Cooper and RG Knowles Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3): 593-615.
4. Alexander, K. (1999): *Angiologie (Grundlagen)*. In: Alexander, K., Daniel, W.G., Diener, H.-C., Freund, M., Köhler, H., Matern, S., Maurer, H.H., Michel, B.A., Nowak, D., Risler, T., Schaffner, A., Scherbaum, W.A., Sybrecht, G.W., Wolfram, G., Zeitz, M. (Hrsg.): *THIEMEs INNERE MEDIZIN TIM*. S.5-9. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
5. Alonso, J, L Sanchez de Miguel, M Monton, S Casado and A Lopez-Farre Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1997; 17(10): 5719-26.
6. Asahara, T, T Murohara, A Sullivan, M Silver, R van der Zee, T Li, B Witzenbichler, G Schatteman and JM Isner Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964-7.
7. Atkins, GB and MK Jain Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* 2007; 100(12): 1686-95.
8. Ballinger, SW, C Patterson, CA Knight-Lozano, DL Burow, CA Conklin, Z Hu, J Reuf, C Horaist, R Lebovitz, GC Hunter, K McIntyre and MS Runge Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002; 106(5): 544-9.

9. Beauchemin, N, P Draber, G Dveksler, P Gold, S Gray-Owen, F Grunert, S Hammarstrom, KV Holmes, A Karlsson, M Kuroki, SH Lin, L Lucka, SM Najjar, M Neumaier, B Obrink, JE Shively, KM Skubitz, CP Stanners, P Thomas, JA Thompson, M Virji, S von Kleist, C Wagener, S Watt and W Zimmermann Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 1999; 252(2): 243-9.
10. Benndorf, RA, E Schwedhelm, A Gnann, R Taheri, G Kom, M Didie, A Steenpass, S Ergun and RH Boger Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ Res* 2008; 103(9): 1037-46.
11. Blair, A, PW Shaul, IS Yuhanna, PA Conrad and EJ Smart Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 1999; 274(45): 32512-9.
12. Blann, AD Angiogenesis and platelets: the clot thickens further. *Cardiovasc Res* 2004; 63(2): 192-3.
13. Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (2001): *PATHOLOGIE*. 2. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer; S.1026-1029.
14. Boger, RH, SM Bode-Boger, A Szuba, PS Tsao, JR Chan, O Tangphao, TF Blaschke and JP Cooke Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98(18): 1842-7.
15. Boo, YC and H Jo Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(3): C499-508.
16. Boo, YC, GP Sorescu, PM Bauer, D Fulton, BE Kemp, DG Harrison, WC Sessa and H Jo Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(7): 729-41.

17. Borradaile, NM and JG Pickering Polyploidy impairs human aortic endothelial cell function and is prevented by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298(1): C66-74.
18. Boyd, NL, H Park, H Yi, YC Boo, GP Sorescu, M Sykes and H Jo Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(3): H1113-22.
19. Burring, KF The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(6): 1678-89.
20. Carmeliet, P Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6(4): 389-95.
21. Cheng, C, R van Haperen, M de Waard, LC van Damme, D Tempel, L Hanemaaijer, GW van Cappellen, J Bos, CJ Slager, DJ Duncker, AF van der Steen, R de Crom and R Krams Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* 2005; 106(12): 3691-8.
22. Cong, F, L Schweizer and H Varmus Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 2004; 131(20): 5103-15.
23. Cooke, JP and VJ Dzau Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48(489-509).
24. Cowan, CE, EE Kohler, TA Dugan, MK Mirza, AB Malik and KK Wary Kruppel-like factor-4 transcriptionally regulates VE-cadherin expression and endothelial barrier function. *Circ Res* 2010; 107(8): 959-66.
25. Cunningham, KS and AI Gotlieb The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005; 85(1): 9-23.
26. Davidoff, M and W Schulze Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. *Histochemistry* 1990; 93(5): 531-6.

27. Davies, PF Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75(3): 519-60.
28. Davis, ME, IM Grumbach, T Fukai, A Cutchins and DG Harrison Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 163-8.
29. DeAngelis, AM, G Heinrich, T Dai, TA Bowman, PR Patel, SJ Lee, EG Hong, DY Jung, A Assmann, RN Kulkarni, JK Kim and SM Najjar Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1: a link between insulin and lipid metabolism. *Diabetes* 2008; 57(9): 2296-303.
30. Dejana, E The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* 2010; 107(8): 943-52.
31. Domingues, I, J Rino, JA Demmers, P de Lanerolle and SC Santos VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 2011; 6(9): e25668.
32. Dryden, NH, A Sperone, S Martin-Almedina, RL Hannah, GM Birdsey, ST Khan, JA Layhadi, JC Mason, DO Haskard, B Gottgens and AM Randi The transcription factor Erg controls endothelial cell quiescence by repressing activity of nuclear factor (NF)-kappaB p65. *J Biol Chem* 2012; 287(15): 12331-42.
33. Dworakowski, R, N Anilkumar, M Zhang and AM Shah Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 5): 960-4.
34. Ebrahimnejad, A, R Flayeh, G Unteregger, C Wagener and J Brummer Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 2000; 260(2): 365-73.
35. Edirisinghe, I, K McCormick Hallam and CT Kappagoda Effect of fatty acids on endothelium-dependent relaxation in the rabbit aorta. *Clin Sci (Lond)* 2006; 111(2): 145-51.

36. Edlund, M, K Wikstrom, R Toomik, P Ek and B Obrink Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS Lett* 1998; 425(1): 166-70.
37. Endemann, DH and EL Schiffrin Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(8): 1983-92.
38. Ergun, S, N Kilik, G Ziegeler, A Hansen, P Nollau, J Gotze, JH Wurbach, A Horst, J Weil, M Fernando and C Wagener CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 2000; 5(2): 311-20.
39. Ergun, S, D Tilki, HP Hohn, U Gehling and N Kilic Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thromb Haemost* 2007; 98(5): 930-9.
40. Erusalimsky, JD Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* (1985) 2009; 106(1): 326-32.
41. Esper, RJ, RA Nordaby, JO Vilarino, A Paragano, JL Cacharron and RA Machado Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5(4).
42. Esser, S, MG Lampugnani, M Corada, E Dejana and W Risau Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 13): 1853-65.
43. Feletou, M and PM Vanhoutte Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(3): H985-1002.
44. Ferrara, N and T Davis-Smyth The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4-25.
45. Folkman, J Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(4): 273-86.

46. Force, T, CM Pombo, JA Avruch, JV Bonventre and JM Kyriakis Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res* 1996; 78(6): 947-53.
47. Frank, PG, SE Woodman, DS Park and MP Lisanti Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(7): 1161-8.
48. Frey, RS, M Ushio-Fukai and AB Malik NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(4): 791-810.
49. Fry, DL, EE Herderick and DK Johnson Local intimal-medial uptakes of 125I-albumin, 125I-LDL, and parenteral Evans blue dye protein complex along the aortas of normocholesterolemicminipigs as predictors of subsequent hypercholesterolemic atherogenesis. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(8): 1193-204.
50. Fulton, D, R Babbitt, S Zoellner, J Fontana, L Acevedo, TJ McCabe, Y Iwakiri and WC Sessa Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30349-57.
51. Fulton, D, J Fontana, G Sowa, JP Gratton, M Lin, KX Li, B Michell, BE Kemp, D Rodman and WC Sessa Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 2002; 277(6): 4277-84.
52. Galley, HF and NR Webster Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004; 93(1): 105-13.
53. Gampel, A, L Moss, MC Jones, V Brunton, JC Norman and H Mellor VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* 2006; 108(8): 2624-31.
54. Gavard, J and JS Gutkind VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 883-5.

55. Gerstel, D, F Wegwitz, K Jannasch, P Ludewig, K Scheike, F Alves, N Beauchemin, W Deppert, C Wagener and AK Horst CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. *Oncogene* 2011; 30(41): 4275-88.
56. Gerstel, D, F Wegwitz, K Jannasch, P Ludewig, K Scheike, F Alves, N Beauchemin, W Deppert, C Wagener and AK Horst CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. *Oncogene* 2011; 30(41): 4275-88.
57. Gimbrone, MA The Gordon Wilson lecture. Understanding vascular endothelium: a pilgrim's progress. Endothelial dysfunction, biomechanical forces and the pathobiology of atherosclerosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2010; 121(115-27); discussion 127.
58. Giraud, E, L Primo, E Audero, HP Gerber, P Koolwijk, S Soker, M Klagsbrun, N Ferrara and F Bussolino Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273(34): 22128-35.
59. Goligorsky, MS, H Abedi, E Noiri, A Takhtajan, S Lense, V Romanov and I Zachary Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 1): C1271-81.
60. Gonzalez-Pacheco, FR, JJ Deudero, MC Castellanos, MA Castilla, MV Alvarez-Arroyo, S Yague and C Caramelo Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(3): H1395-401.
61. Gray-Owen, SD and RS Blumberg CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(6): 433-46.
62. Griending, KK, D Sorescu, B Lassegue and M Ushio-Fukai Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(10): 2175-83.

63. Griendling, KK, D Sorescu and M Ushio-Fukai NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5): 494-501.
64. Hahn, C, AW Orr, JM Sanders, KA Jhaveri and MA Schwartz The subendothelial extracellular matrix modulates JNK activation by flow. *Circ Res* 2009; 104(8): 995-1003.
65. Hall, AP Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol Pathol* 2006; 34(6): 763-75.
66. Hallmann, R, N Horn, M Selg, O Wendler, F Pausch and LM Sorokin Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 979-1000.
67. Hansson, GK, AK Robertson and C Soderberg-Naucler Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1(297-329).
68. Hashimoto, K, N Kataoka, E Nakamura, K Tsujioka and F Kajiyama Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis* 2007; 194(2): e9-17.
69. Hastings, NE, MB Simmers, OG McDonald, BR Wamhoff and BR Blackman Atherosclerosis-prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes pro-inflammatory priming. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(6): C1824-33.
70. Hecquet, CM, GU Ahmmed, SM Vogel and AB Malik Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2008; 102(3): 347-55.
71. Heijnen, HF, S Waaijenborg, JD Crapo, RP Bowler, JW Akkerman and JW Slot Colocalization of eNOS and the catalytic subunit of PKA in endothelial cell junctions: a clue for regulated NO production. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(10): 1277-85.

72. Herrmann, W and JP Knapp Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clin Lab* 2002; 48(9-10): 471-81.
73. Hoeben, A, B Landuyt, MS Highley, H Wildiers, AT Van Oosterom and EA De Bruijn Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56(4): 549-80.
74. Hoffmann, J, S Dimmeler and J Haendeler Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Lett* 2003; 551(1-3): 153-8.
75. Horst, AK, WD Ito, J Dabelstein, U Schumacher, H Sander, C Turbide, J Brummer, T Meinertz, N Beauchemin and C Wagener Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116(6): 1596-605.
76. Huang, J., et al., Targeted deletion of murine CEACAM 1 activates PI3K-Akt signaling and contributes to the expression of (Pro)renin receptor via CREB family and NF-kappaB transcription factors. *Hypertension*, 2013. 62(2): p. 317-23.
77. Hunter, I, H Sawa, M Edlund and B Obrink Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 3)(847-53).
78. Hynes, RO A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 2002; 8(9): 918-21.
79. Izzi, L, C Turbide, C Houde, T Kunath and N Beauchemin cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 1999; 18(40): 5563-72.
80. Jaffer, ZM and J Chernoff The cross-Rho's of cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35123-6.
81. Jin, L, Y Li, CJ Chen, MA Sherman, K Le and JE Shively Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(7): 849-59.

82. Ju, H, R Zou, VJ Venema and RC Venema Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18522-5.
83. Kilic, N, L Oliveira-Ferrer, JH Wurbach, S Loges, F Chalajour, S Neshat-Vahid, J Weil, M Fernando and S Ergun Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2361-9.
84. Kleinerman, DI, P Troncoso, SH Lin, LL Pisters, ER Sherwood, T Brooks, AC von Eschenbach and JT Hsieh Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995; 55(6): 1215-20.
85. Krone, W. und Müller-Wieland, D. (1999): Endokrinologie (Stoffwechselstörungen). In: Alexander, K., Daniel, W.G., Diener, H.-C., Freund, M., Köhler, H., Matern, S., Maurer, H.H., Michel, B.A., Nowak, D., Risler, T., Schaffner, A., Scherbaum, W.A., Sybrecht, G.W., Wolfram, G., Zeitz, M. (Hrsg.): THIEMEs INNERE MEDIZIN TIM. S.322-325. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
86. Kwak, BR, S Myit, F Mulhaupt, N Veillard, N Rufer, E Roosnek and F Mach PPARgamma but not PPARalpha ligands are potent repressors of major histocompatibility complex class II induction in atheroma-associated cells. *Circ Res* 2002; 90(3): 356-62.
87. Le Bras, A, F Lionneton, V Mattot, E Lelievre, B Caetano, N Spruyt and F Soncin HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene* 2007; 26(53): 7480-9.
88. Lelievre, E, F Lionneton, F Soncin and B Vandebunder The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(4): 391-407.
89. Lenton, K VEGFR-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16(3): 227-32.

90. Leung, N, C Turbide, M Olson, V Marcus, S Jothy and N Beauchemin Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene* 2006; 25(40): 5527-36.
91. Ley, K The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9(6): 263-8.
92. Li, H and U Forstermann Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190(3): 244-54.
93. Liao, JK, WS Shin, WY Lee and SL Clark Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270(1): 319-24.
94. Liekens, S, E De Clercq and J Neyts Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(3): 253-70.
95. Lima, B, MT Forrester, DT Hess and JS Stamler S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 2010; 106(4): 633-46.
96. Liu, J and S Agarwal Mechanical signals activate vascular endothelial growth factor receptor-2 to upregulate endothelial cell proliferation during inflammation. *J Immunol* 2010; 185(2): 1215-21.
97. Löffler, G. (2000): BASISWISSEN BIOCHEMIE. 4.Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; S.457-459
98. Luo, Y and GL Radice N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2005; 169(1): 29-34.
99. Lutgens, E, RJ van Suylen, BC Faber, MJ Gijbels, PM Eurlings, AP Bijnens, KB Cleutjens, S Heeneman and MJ Daemen Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(12): 2123-30.
100. Malek, AM, SL Alper and S Izumo Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* 1999; 282(21): 2035-42.

101. Marumo, T, VB Schini-Kerth, B Fisslthaler and R Busse Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 96(7): 2361-7.
102. Meadows, SM, MC Salanga and PA Krieg Kruppel-like factor 2 cooperates with the ETS family protein ERG to activate Flk1 expression during vascular development. *Development* 2009; 136(7): 1115-25.
103. Mehta, D and AB Malik Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86(1): 279-367.
104. Mehta, JL, DY Li, HJ Chen, J Joseph and F Romeo Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(4): 857-61.
105. Meyer, JW and ME Schmitt A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett* 2000; 472(1): 1-4.
106. Minamino, T, H Miyauchi, T Yoshida, K Tateno, T Kunieda and I Komuro Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36(2): 175-83.
107. Mu, H, X Wang, P Lin, Q Yao and C Chen Nitrotyrosine promotes human aortic smooth muscle cell migration through oxidative stress and ERK1/2 activation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(9): 1576-84.
108. Muller, MM, BB Singer, E Klaile, B Obrink and L Lucka Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood* 2005; 105(10): 3925-34.
109. Najjar, SM Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(6): 240-5.

110. Najjar, SM, KJ Ledford, SL Abdallah, A Paus, L Russo, MK Kaw, SK Ramakrishnan, HT Muturi, CK Raphael, SG Lester, G Heinrich, SV Pierre, R Benndorf, V Kleff, AA Jaffa, E Levy, G Vazquez, IJ Goldberg, N Beauchemin, R Scalia and S Ergun Ceacam1 deletion causes vascular alterations in large vessels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305(4): E519-29.
111. Najjar, SM, Y Yang, MA Fernstrom, SJ Lee, AM Deangelis, GA Rjaily, QY Al-Share, T Dai, TA Miller, S Ratnam, RJ Ruch, S Smith, SH Lin, N Beauchemin and AM Oyarce Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 2005; 2(1): 43-53.
112. Nespereira, B, M Perez-Illzarbe, P Fernandez, AM Fuentes, JA Paramo and JA Rodriguez Vitamins C and E downregulate vascular VEGF and VEGFR-2 expression in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 171(1): 67-73.
113. Nickenig, G, J Røling, K Strehlow, P Schnabel and M Böhm Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 1998; 98(22): 2453-60.
114. Nieuwdorp, M, MC Meuwese, H Vink, JB Hoekstra, JJ Kastelein and ES Stroes The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(5): 507-11.
115. Nittka, S, C Böhm, H Zentgraf and M Neumaier The CEACAM1-mediated apoptosis pathway is activated by CEA and triggers dual cleavage of CEACAM1. *Oncogene* 2008; 27(26): 3721-8.
116. Noble, MI, AJ Drake-Holland and H Vink Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *Qjm* 2008; 101(7): 513-8.
117. Nouvion, AL, M Oubaha, S Leblanc, EC Davis, H Jastrow, R Kammerer, V Breton, C Turbide, S Ergun, JP Gratton and N Beauchemin CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 24): 4221-30.

118. Nwariaku, FE, Z Liu, X Zhu, D Nahari, C Ingle, RF Wu, Y Gu, G Sarosi and LS Terada NADPH oxidase mediates vascular endothelial cadherin phosphorylation and endothelial dysfunction. *Blood* 2004; 104(10): 3214-20.
119. Obrink, B CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(5): 616-26.
120. Ogunrinade, O, GT Kameya and GA Truskey Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium. *Ann Biomed Eng* 2002; 30(4): 430-46.
121. Oliveira-Ferrer, L, D Tilki, G Ziegeler, J Hauschild, S Loges, S Irmak, E Kilic, H Huland, M Friedrich and S Ergun Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res* 2004; 64(24): 8932-8.
122. Panza, JA, AA Quyyumi, JE Brush, Jr. and SE Epstein Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323(1): 22-7.
123. Patel, RP, A Levonen, JH Crawford and VM Darley-Usmar Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2000; 47(3): 465-74.
124. Petrova, TV, T Makinen and K Alitalo Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 117-30.
125. Philipp, T. (1999): Nephrologie (Essentielle Hypertonie). In: Alexander, K., Daniel, W.G., Diener, H.-C., Freund, M., Köhler, H., Matern, S., Maurer, H.H., Michel, B.A., Nowak, D., Risler, T., Schaffner, A., Scherbaum, W.A., Sybrecht, G.W., Wolfram, G., Zeitz, M. (Hrsg.): THIEMEs INNERE MEDIZIN TIM. S.1445-1455. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
126. Potente, M, C Urbich, K Sasaki, WK Hofmann, C Heeschen, A Aicher, R Kollipara, RA DePinho, AM Zeiher and S Dimmeler Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2005; 115(9): 2382-92.

127. Poy, MN, RJ Ruch, MA Fernstrom, Y Okabayashi and SM Najjar Shc and CEACAM1 interact to regulate the mitogenic action of insulin. *J Biol Chem* 2002; 277(2): 1076-84.
128. Qian, J, Q Zhang, JE Church, DW Stepp, RD Rudic and DJ Fulton Role of local production of endothelium-derived nitric oxide on cGMP signaling and S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(1): H112-8.
129. Qiao, W, L Niu, Z Liu, T Qiao and C Liu Endothelial nitric oxide synthase as a marker for human endothelial progenitor cells. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221(1): 19-27.
130. Riazzy, M, JH Chen and UP Steinbrecher VEGF secretion by macrophages is stimulated by lipid and protein components of OxLDL via PI3-kinase and PKCzeta activation and is independent of OxLDL uptake. *Atherosclerosis* 2009; 204(1): 47-54.
131. Rudini, N, A Felici, C Giampietro, M Lampugnani, M Corada, K Swirsding, M Garre, S Liebner, M Letarte, P ten Dijke and E Dejana VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *Embo J* 2008; 27(7): 993-1004.
132. Ryu, J, CW Lee, KH Hong, JA Shin, SH Lim, CS Park, J Shim, KB Nam, KJ Choi, YH Kim and KH Han Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2): 333-40.
133. Samuelsson, AM, E Bollano, R Mobini, BM Larsson, E Omerovic, M Fu, F Waagstein and A Holmang Hyperinsulinemia: effect on cardiac mass/function, angiotensin II receptor expression, and insulin signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(2): H787-96.
134. Sawa, H, K Kamada, H Sato, S Sendo, A Kondo, I Saito, M Edlund and B Obrink C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 78(1): 35-43.

135. Schwartz, MA and RK Assoian Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 14): 2553-60.
136. Schwartz, MA and SJ Shattil Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(8): 388-91.
137. Searles, CD Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(5): C803-16.
138. Sessa, WC, G Garcia-Cardena, J Liu, A Keh, JS Pollock, J Bradley, S Thiru, IM Braverman and KM Desai The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1995; 270(30): 17641-4.
139. Shapiro, L and WI Weis Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(3): a003053.
140. Shaul, PW Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64(749-74).
141. Shen, BQ, DY Lee, HP Gerber, BA Keyt, N Ferrara and TF Zioncheck Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273(45): 29979-85.
142. Shu, SY, G Ju and LZ Fan The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988; 85(2): 169-71.
143. Shyy, JY and S Chien Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 2002; 91(9): 769-75.
144. Singer, BB, L Lucka. 2005. CEACAM1. UCSD Nature Molecule. <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A003597>. doi: 10.1038/mp.a003597.01

145. Singer, BB, I Scheffrahn, R Kammerer, N Suttorp, S Ergun and H Slevogt Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One* 2010; 5(1): e8747.
146. Skovseth, DK, MJ Veuger, DR Sorensen, PM De Angelis and G Haraldsen Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo. *Blood* 2005; 105(3): 1044-51.
147. Slevogt, H, S Zabel, B Opitz, A Hocke, J Eitel, D N'Guessan P, L Lucka, K Riesbeck, W Zimmermann, J Zweigner, B Temmesfeld-Wollbrueck, N Suttorp and BB Singer CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1270-8.
148. Sowa, G, M Pypaert and WC Sessa Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 14072-7.
149. Spagnuolo, R, M Corada, F Orsenigo, L Zanetta, U Deuschle, P Sandy, C Schneider, CJ Drake, F Breviario and E Dejana Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood* 2004; 103(8): 3005-12.
150. Stavri, GT, IC Zachary, PA Baskerville, JF Martin and JD Erusalimsky Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 1995; 92(1): 11-4.
151. Tanaka, K, N Oda, C Iwasaka, M Abe and Y Sato Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* 1998; 176(2): 235-44.
152. Tilki, D, S Irmak, L Oliveira-Ferrer, J Hauschild, K Miethe, H Atakaya, P Hammerer, MG Friedrich, G Schuch, R Galalae, CG Stief, E Kilic, H Huland and S Ergun CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene* 2006; 25(36): 4965-74.

153. Traub, O and BC Berk Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(5): 677-85.
154. Tzima, E, MA Del Pozo, WB Kiosses, SA Mohamed, S Li, S Chien and MA Schwartz Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *Embo J* 2002; 21(24): 6791-800.
155. Tzima, E, M Irani-Tehrani, WB Kiosses, E Dejana, DA Schultz, B Engelhardt, G Cao, H DeLisser and MA Schwartz A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005; 437(7057): 426-31.
156. Urbich, C, M Stein, K Reisinger, R Kaufmann, S Dimmeler and J Gille Fluid shear stress-induced transcriptional activation of the vascular endothelial growth factor receptor-2 gene requires Sp1-dependent DNA binding. *FEBS Lett* 2003; 535(1-3): 87-93.
157. Van der Wal, AC and AE Becker Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41(2): 334-44.
158. Van Hinsbergh, VW and GP van Nieuw Amerongen Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat* 2002; 200(6): 549-60.
159. Veikkola, T and K Alitalo VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9(3): 211-20.
160. Vestweber, D VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(2): 223-32.
161. Vincent, PA, K Xiao, KM Buckley and AP Kowalczyk VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(5): C987-97.

162. Virmani, R, FD Kolodgie, AP Burke, AV Finn, HK Gold, TN Tulenko, SP Wrenn and J Narula Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(10): 2054-61.
163. Wagener, C and S Ergun Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res* 2000; 261(1): 19-24.
164. Wallez, Y, I Vilgrain and P Huber Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(2): 55-9.
165. Walski, M, S Chlopicki, R Celary-Walska and M Frontczak-Baniewicz Ultrastructural alterations of endothelium covering advanced atherosclerotic plaque in human carotid artery visualised by scanning electron microscope. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(4 Pt 1): 713-23.
166. Wang, Q, WF Patton, ET Chiang, HB Hechtman and D Shepro Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases. *J Cell Biochem* 1996; 62(3): 383-96.
167. Williams, B, AQ Baker, B Gallacher and D Lodwick Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 25(5): 913-7.
168. Yao, L, MJ Romero, HA Toque, G Yang, RB Caldwell and RW Caldwell The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res* 2010; 1(4): 165-70.
169. Yoshida, M, WF Westlin, N Wang, DE Ingber, A Rosenzweig, N Resnick and MA Gimbrone, Jr. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 1996; 133(2): 445-55.
170. Yoshida, S., et al., Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(7): p. 4015-23.

171. Zachary, I and G Gliko Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49(3): 568-81.
172. Zachary, I, A Mathur, S Yla-Herttuala and J Martin Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6): 1512-20.
173. Zengin, E, F Chalajour, UM Gehling, WD Ito, H Treede, H Lauke, J Weil, H Reichenspurner, N Kilic and S Ergun Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006; 133(8): 1543-51.
174. Zhu, Y, HL Liao, N Wang, Y Yuan, KS Ma, L Verna and MB Stemerman Lipoprotein promotes caveolin-1 and Ras translocation to caveolae: role of cholesterol in endothelial signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(11): 2465-70.

7. Anhang und Abkürzungsverzeichnis

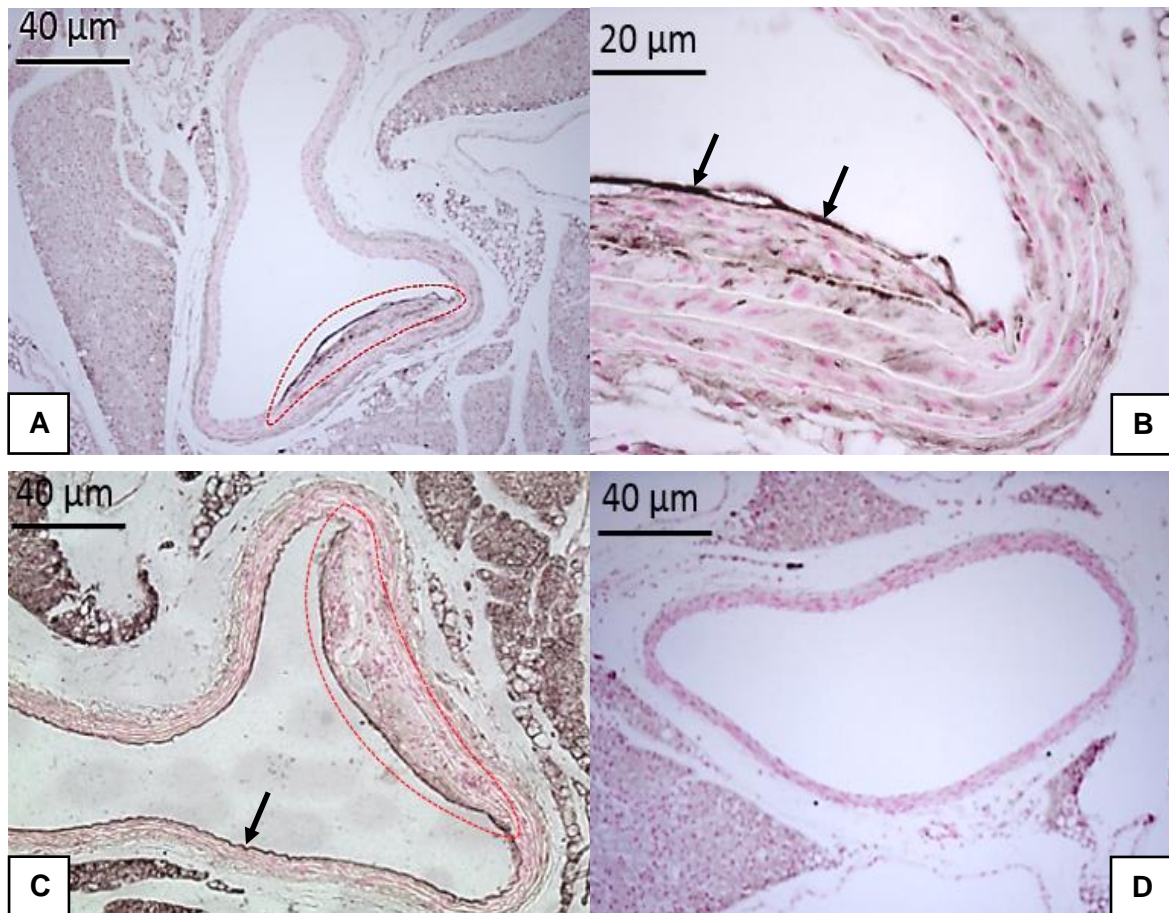


Abb.1A-D: Immunfärbungen (braun-schwarz) mit Ceacam1 (A, B) und Pecam1 (C) an Folgeschnitten der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen mit einem atherosklerotischen Plaquebereich (markiert durch eine rote gestrichelte Linie) sowie eine Negativkontrolle (D). Der der Gefäßwand aufsitzende Plaque (rot-gestrichelte Umrandung) wird von einer kontinuierlichen Schicht Ceacam1- und Pecam1-positiver Zellen bedeckt (A, C). Die schwarzen Pfeile markieren das plaquededeckende Ceacam1-gefärbte Endothel (B). Die positive Endothelfärbung für Pecam1 besteht darüber hinaus auch für das übrige Aortenendothel (schwarzer Pfeil, C). Hingegen erscheinen Ceacam1-positive, nicht jedoch Pecam1-positive Zellen auch innerhalb des Plaquegewebes (B). n=3, Vergrößerung: 100x (A, C und D), 200x (B).

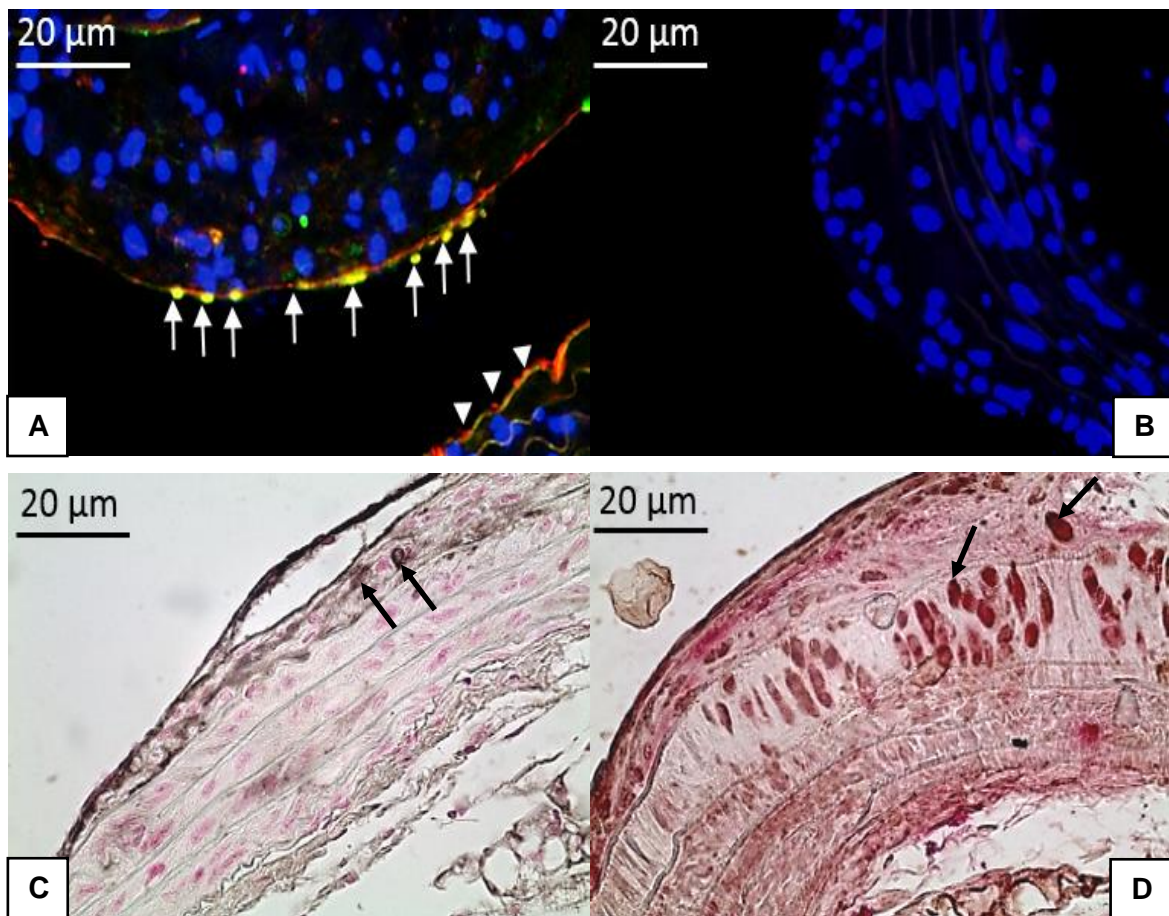


Abb.2A-D: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Ceacam1 (grün) und Pecam1 (rot) (A) mit dazugehöriger Negativkontrolle (B) sowie immunhistochemische Doppelfärbungen mit Ceacam1 (braun-schwarz) und Pecam1 (rot) (C) und Pecam1 (braun-schwarz) und Ceacam1 (rot) (D) an aortalen Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen. Die weißen Pfeile illustrieren die gleichzeitige Anfärbung des den Plaque bedeckenden Endothels mit Ceacam1 und Pecam1 (gelb), während die weißen Pfeilspitzen die alleinige Färbung des übrigen Aortenendothels nur mit Pecam1 zeigen (rot) (A). Während sich das Aortenendothel in beiden Abbildungen (C, D) für Ceacam1 und Pecam1 positiv färbt, erweisen sich die Zellen innerhalb des Plaques überwiegend positiv nur für Ceacam1, lediglich einige wenige (schwarze Pfeile) sind gleichzeitig positiv für Pecam1 (C, D). n=3, Vergrößerung: 200x (A-D).

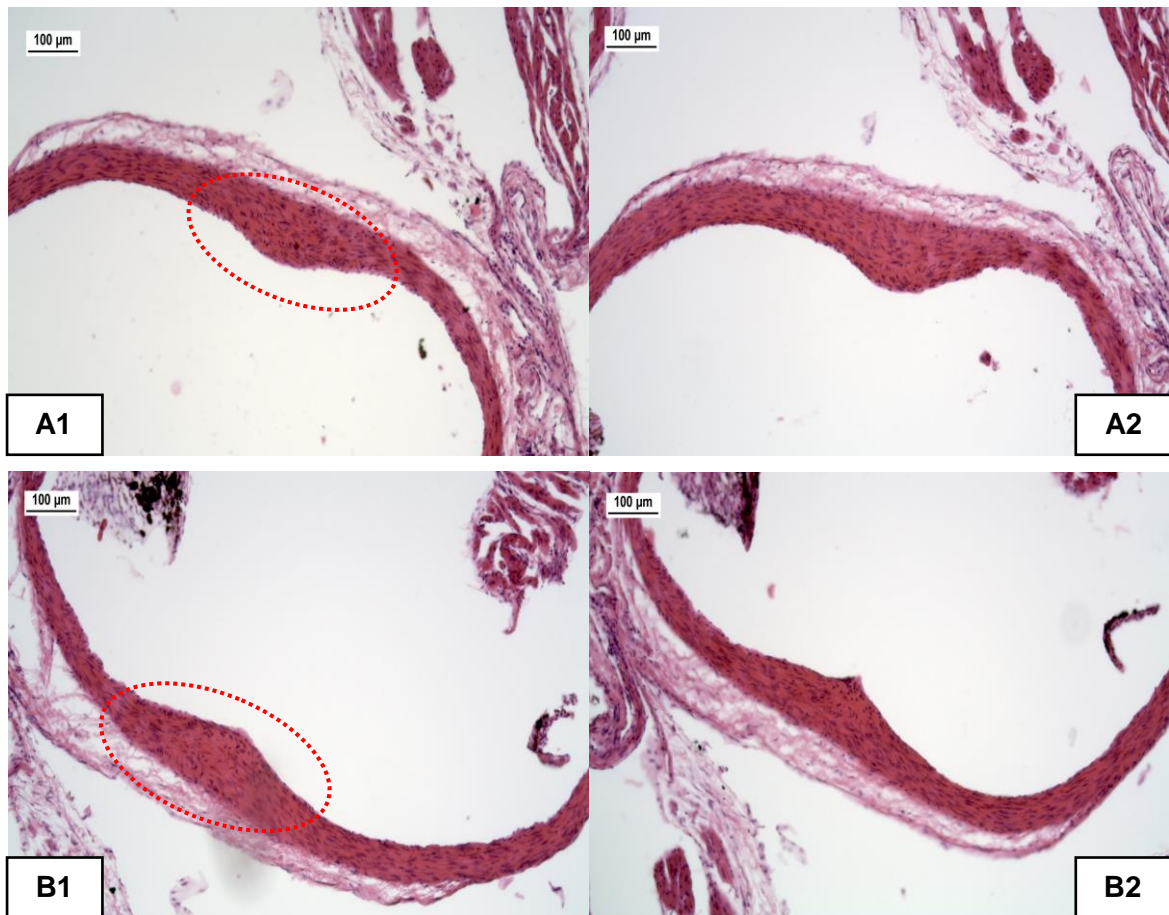


Abb.3A1-B2: Histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von jeweils zwei Serienschnitten zweier atherosklerotischer Plaques (A, B) aus Aorten alter Ceacam1-Knockout-Mäuse. Rot-gestrichelte Umrandung der Plaques in den Abbildungen A1 und B1. n=7, Vergrößerung: 100x.

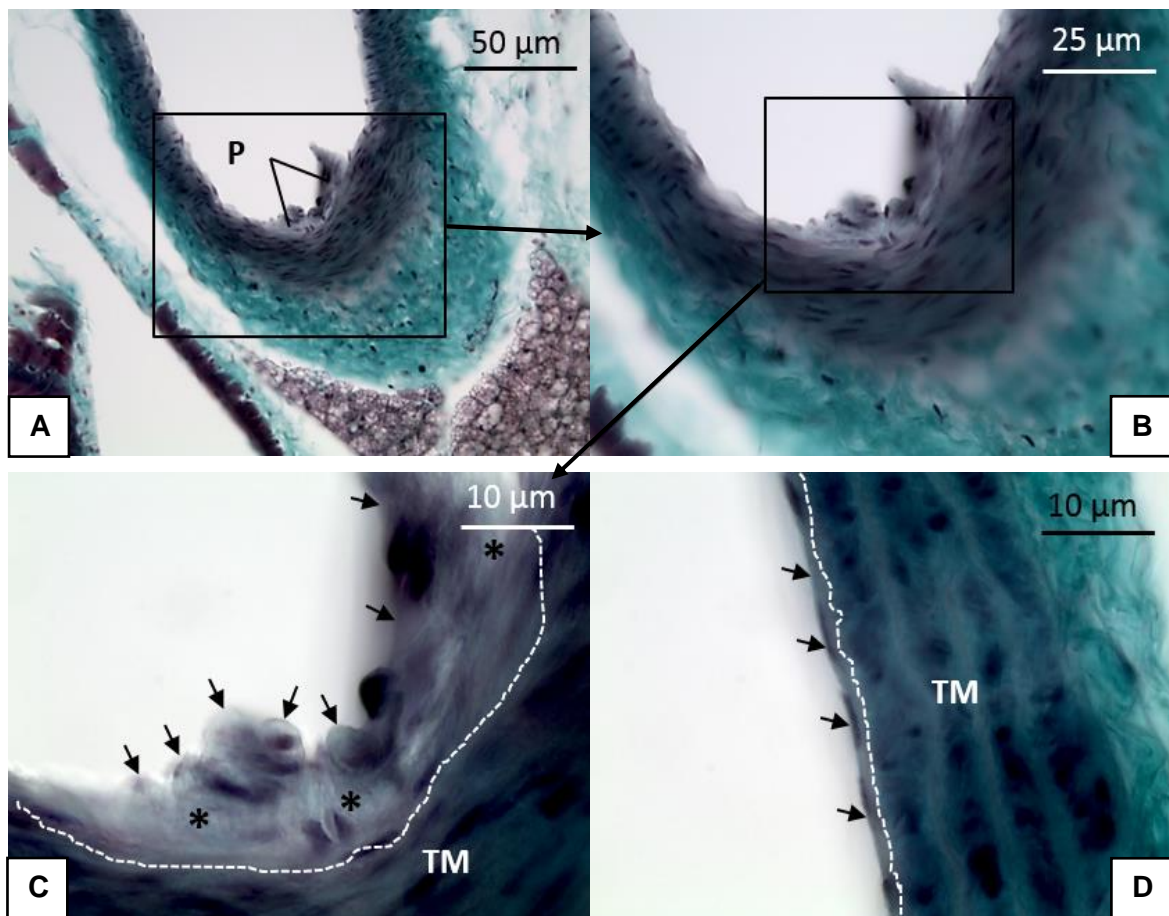


Abb.4A-D: Histologische Masson-Goldner-Färbung einer *Ceacam1^{-/-}*-Aorta. Kleiner atherosklerotischer Plaque (P) in der Aortenwand (A und B). Subendotheliale Ablagerung fibrotischen Materials (*) in der höheren mikroskopischen Auflösung erkennbar (C). Keine solche Ablagerung sichtbar in den plaquefreien Arealen der Aortenwand (D). TM: Tunica media. Weiße gestrichelte Linie: Grenze zwischen der Tunica intima und der Tunica media. Pfeile: Markierung des Endothels. n=7.

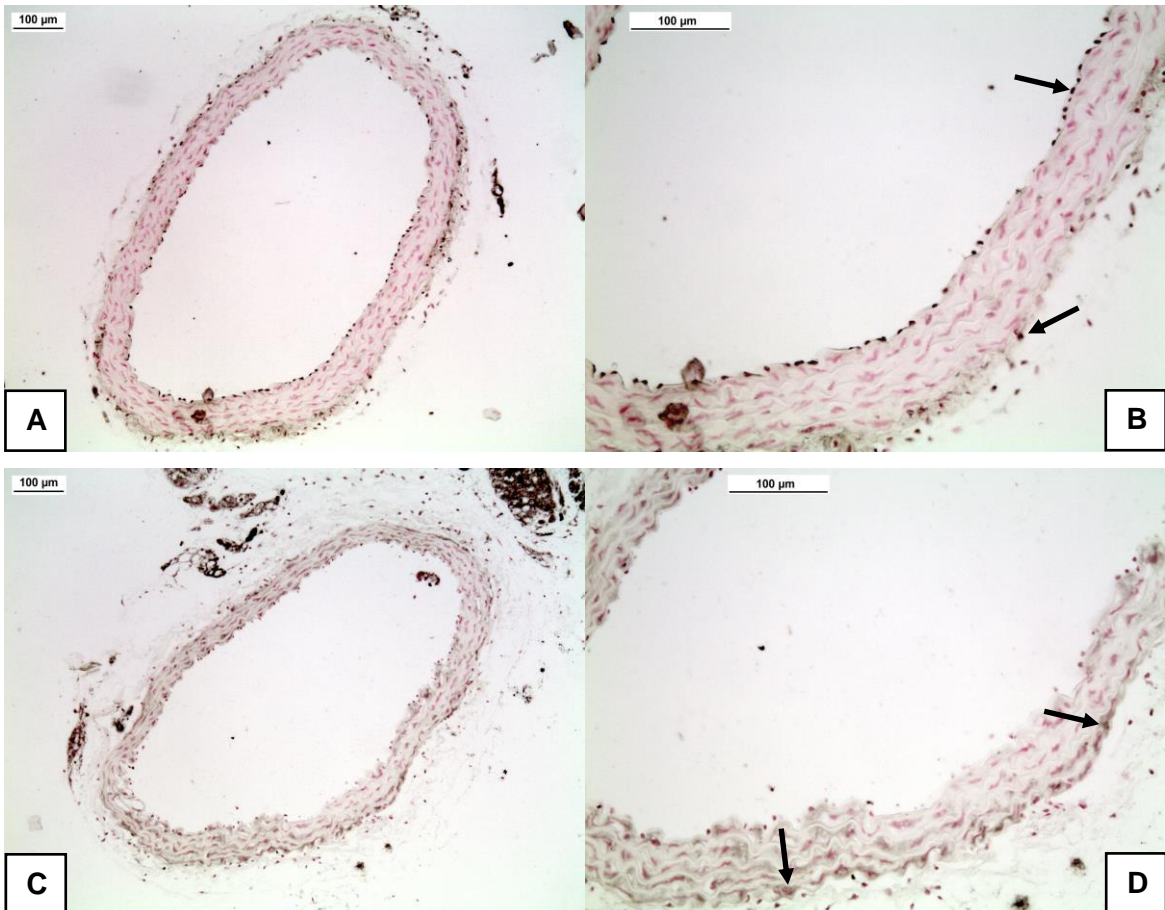
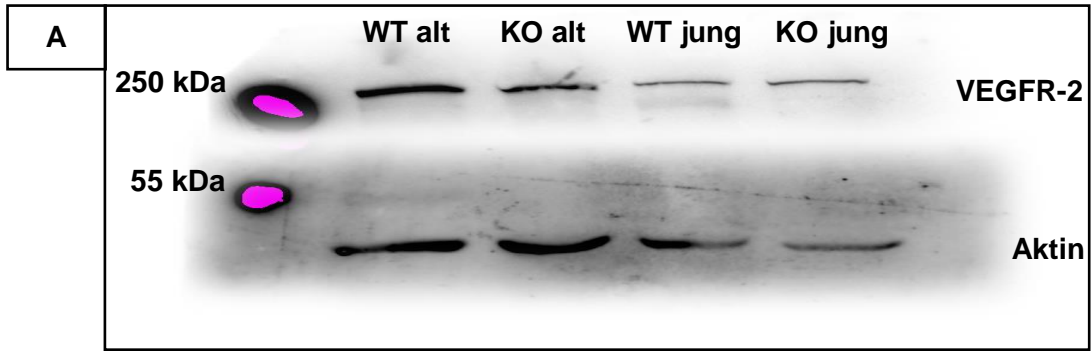
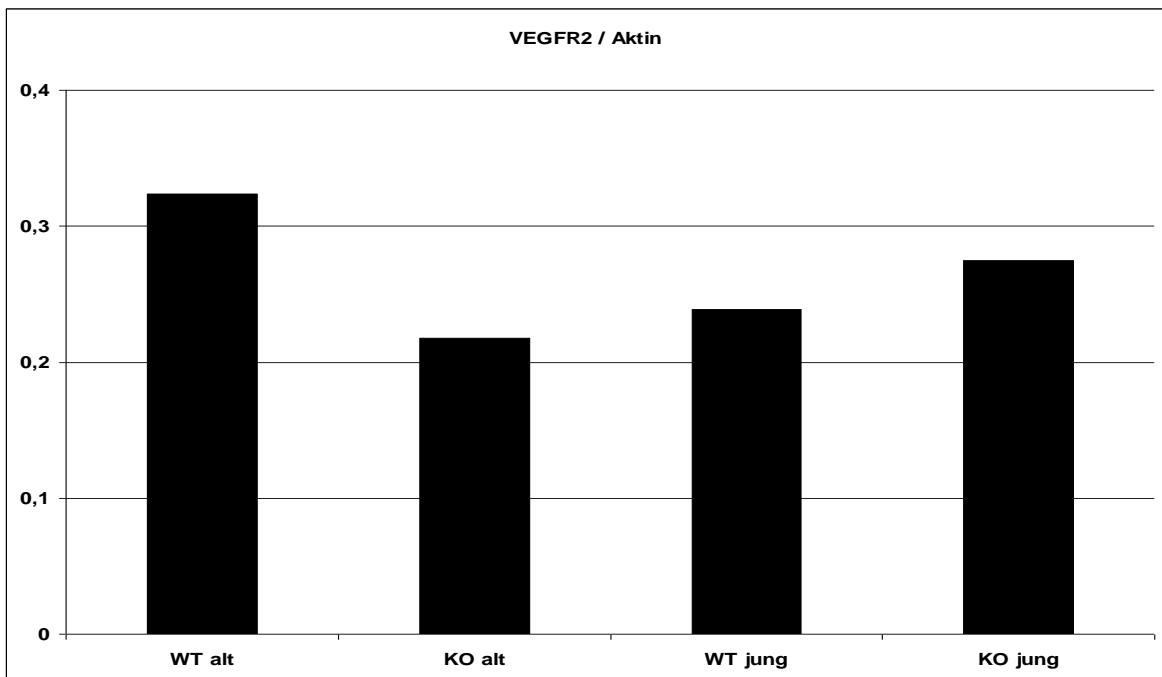
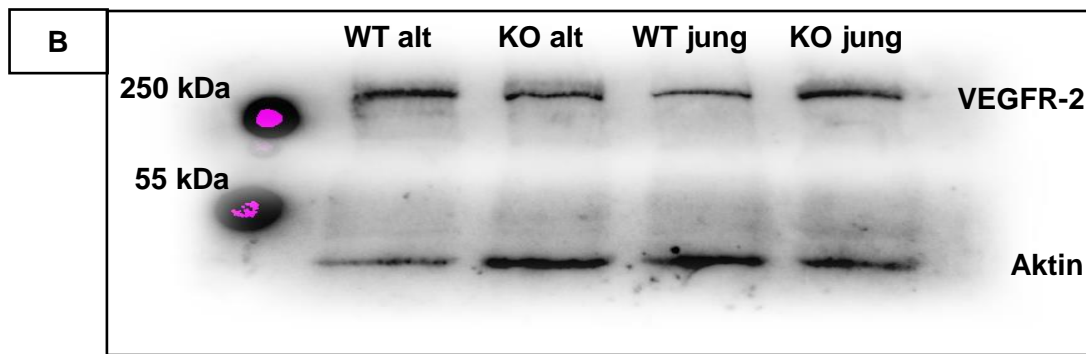


Abb.5A-D: Immunfärbungen (braun-schwarz) mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-2 (VEGFR-2) an Paraffinquerschnitten von Aorten aus alten Wildtyp- (A, B) und alten Ceacam1-Knockout-Mäusen (C, D). In der Wildtypmaus weisen bevorzugt das Endothel und adventitielle Zellen eine positive Immunfärbung auf (Pfeile), während dies in der Knockout-Maus für glatte Muskelzellen der Tunica media zutrifft (Pfeile). n=3, Vergrößerung: 100x (A, C), 200x (B, D).

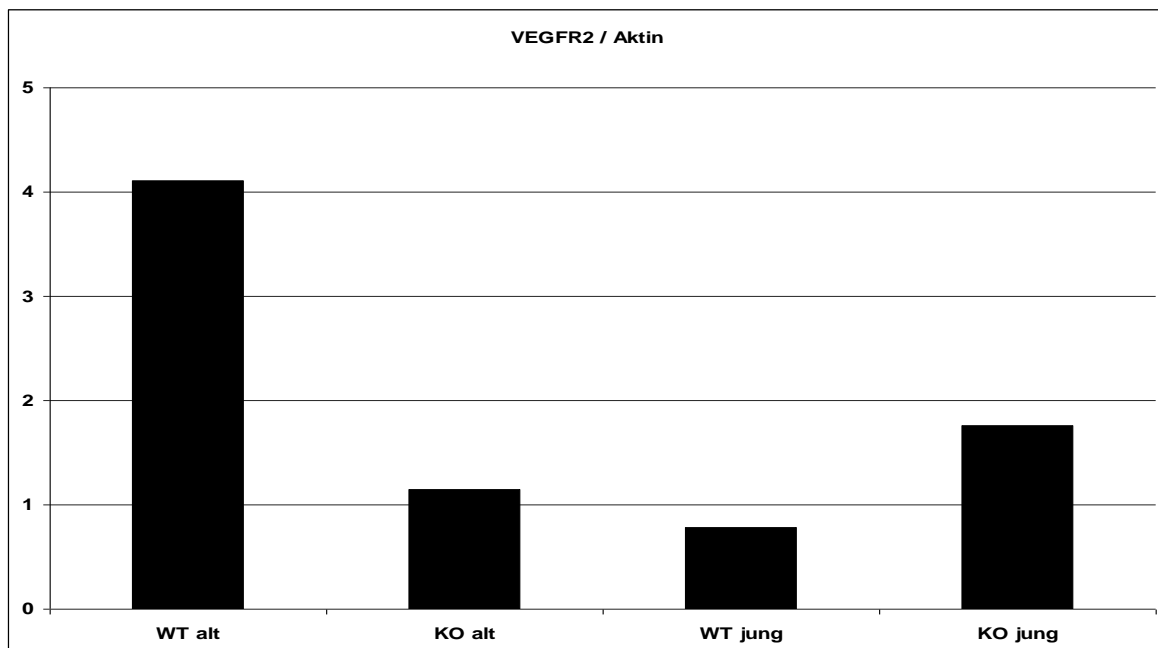


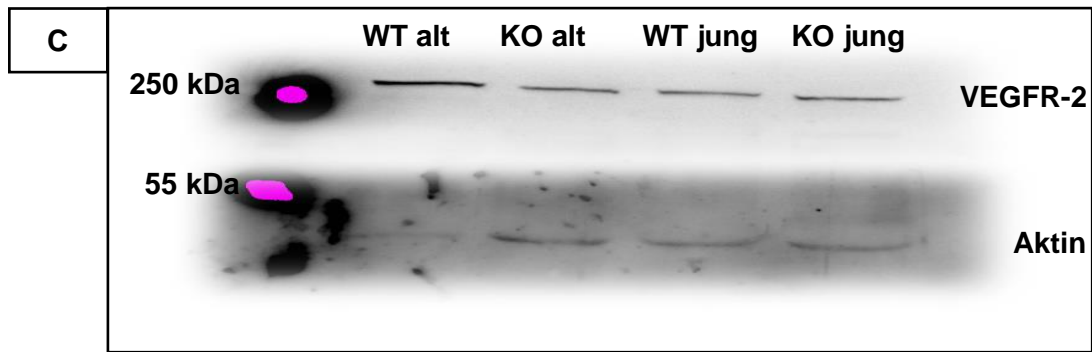
	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VEGFR-2	19514363	14363994	10743108	10269391
Aktin	60266201	65991493	44951476	37391905
VEGFR-2 / Aktin	~ 0,32	~ 0,22	~ 0,24	~ 0,28





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VEGFR-2	7939415	6439690	4200016	7127780
Aktin	1933611	5607692	5366320	4056892
VEGFR-2 / Aktin	~ 4,11	~ 1,15	~ 0,78	~ 1,76





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VEGFR-2	2759439	1465806	1277545	1259755
Aktin	2782786	2691796	2009810	2374097
VEGFR-2 / Aktin	~ 0,99	~ 0,55	~ 0,64	~ 0,53

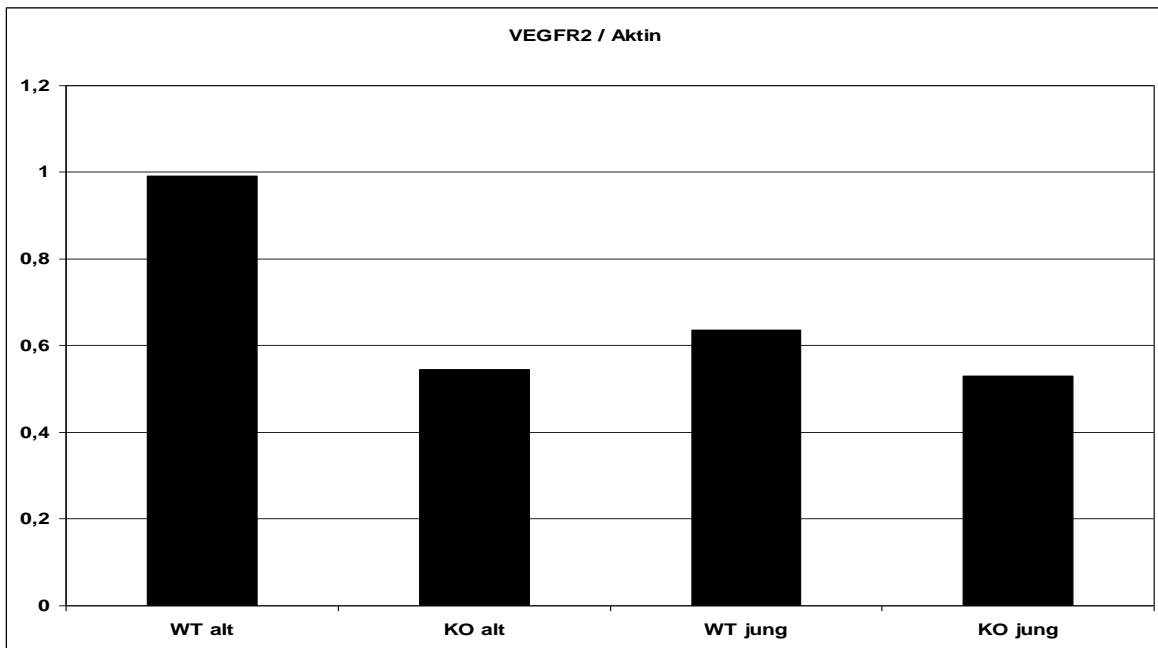


Abb.6A-C: Quantitative Verteilung des VEGFR-2 innerhalb der vier Mausgruppen und in Relation zur Ladekontrolle (Aktin). Von oben nach unten die relativen Intensitäten der schwarzen Banden mit tabellarischer Übersicht in Zahlen und Quotientenbildung beider Werte sowie die Visualisierung jener Quotienten im Säulendiagramm. n=4 (WT=Wildtyp; KO=Knockout).

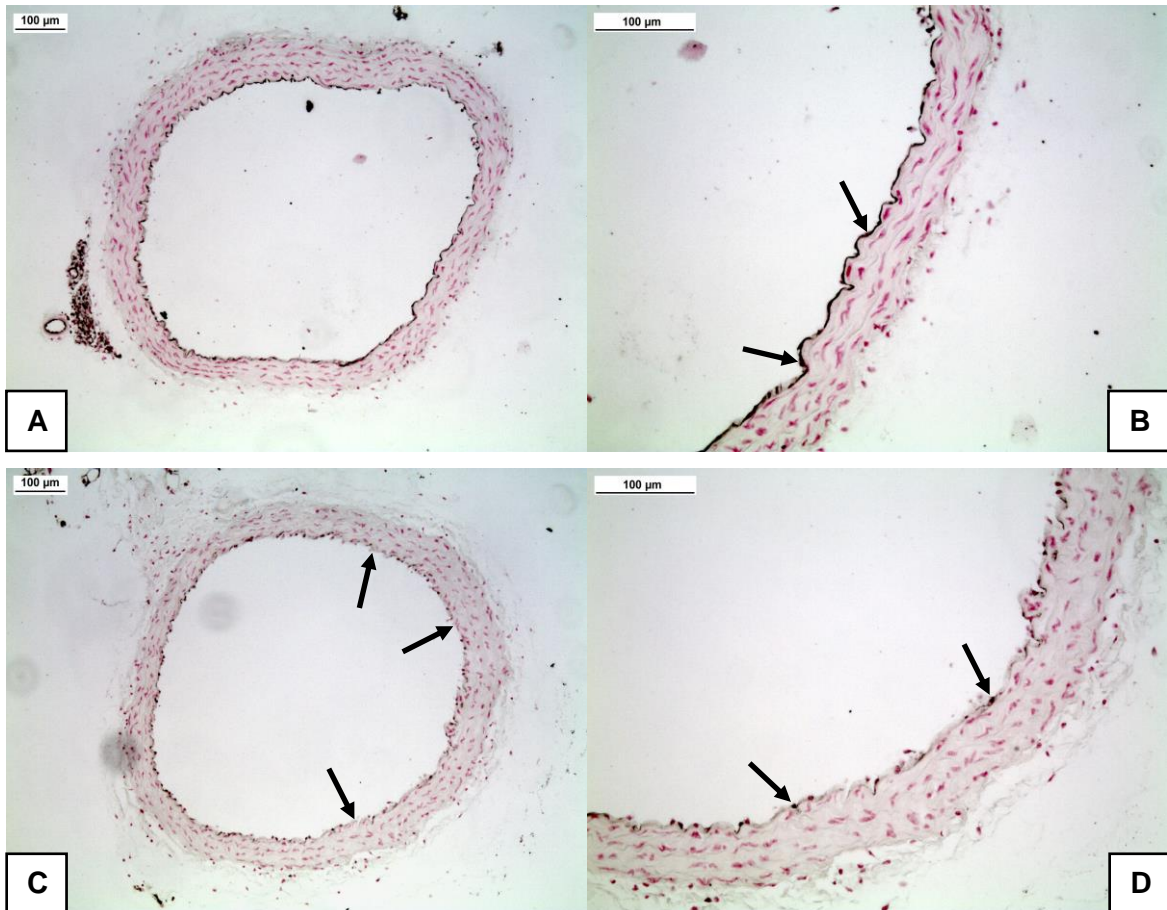
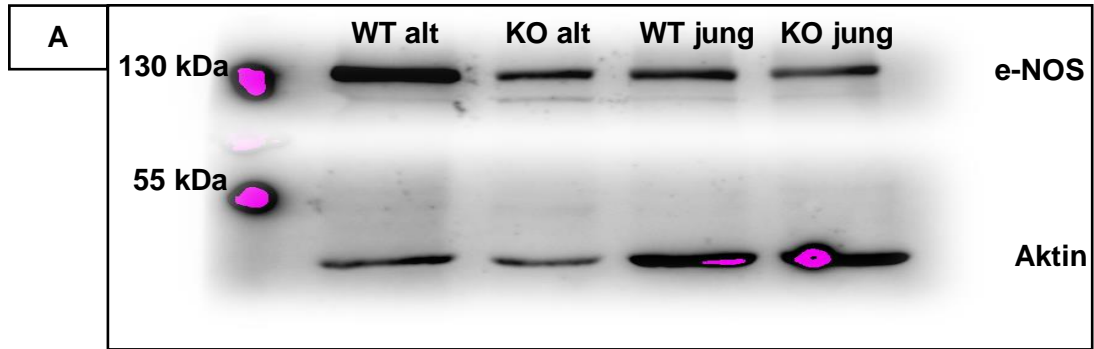
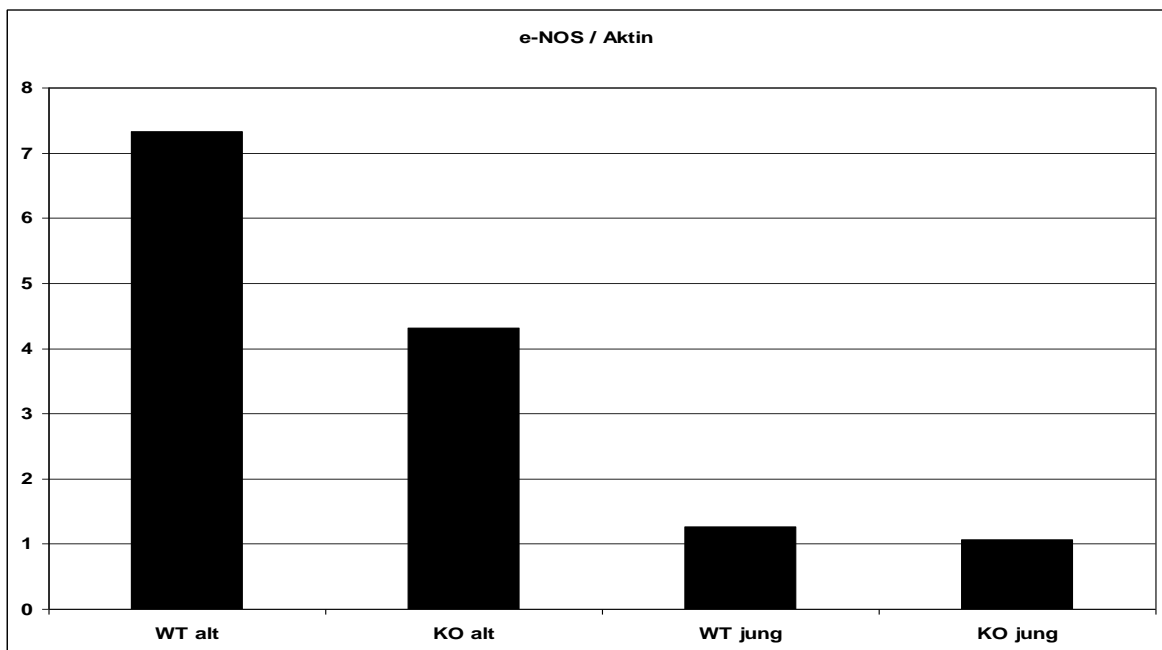
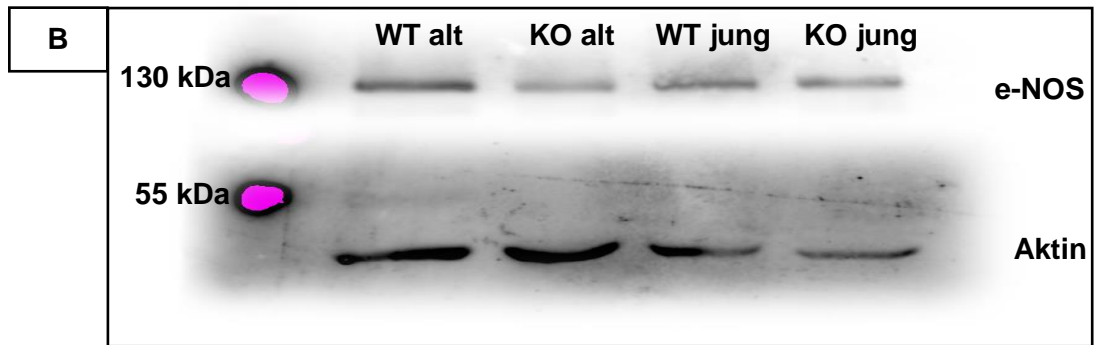


Abb.7A-D: Immunhistochemische Färbungen (braun-schwarz) mit der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (e-NOS) an Paraffinquerschnitten von Aorten alter Wildtypmäuse (A, B) und alter Ceacam1-Knockout-Mäuse (C, D). Die Blockpfeile deuten auf die intensive Immunfärbung der Endothelzellen in der Wildtypmaus. Hingegen ist das Endothel in der Knockout-Maus nur stellenhaft und nicht über die gesamte Zelloberfläche positiv (Pfeile). n=3, Vergrößerung: 100x (A, C), 200x (B, D).

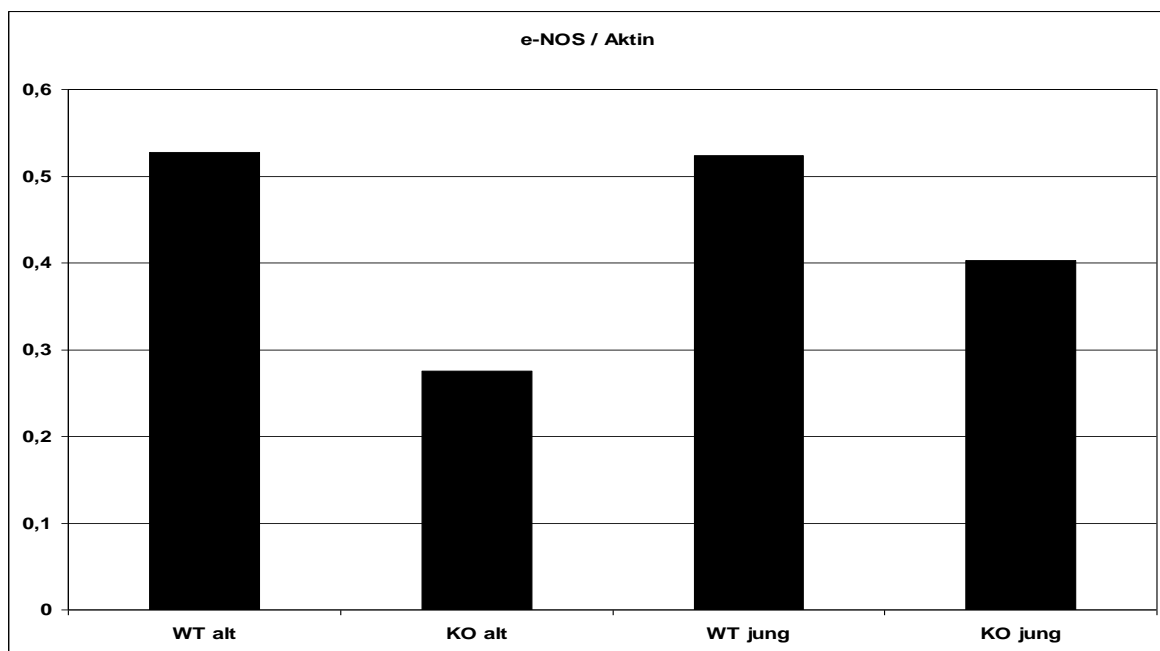


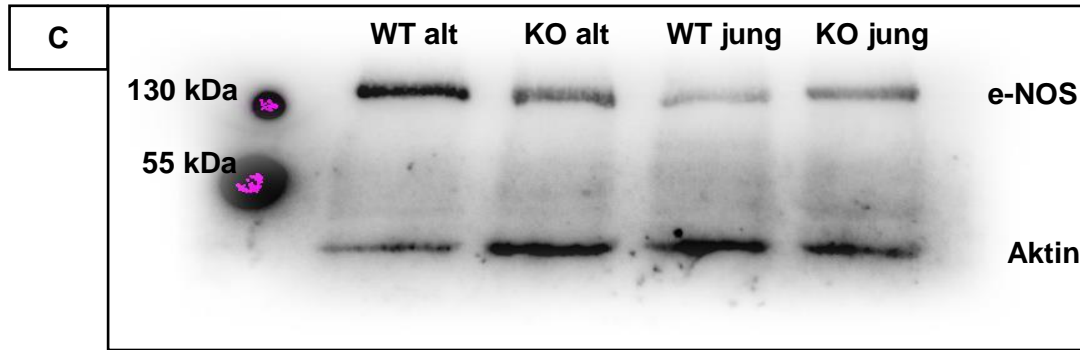
	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
e-NOS	79713312	31919504	36475280	33696323
Aktin	10871552	7385213	28830641	31674232
e-NOS / Aktin	~ 7,33	~ 4,32	~ 1,27	~ 1,06





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
e-NOS	31792473	18176206	23532253	15064171
Aktin	60266201	65991493	44951476	37391905
e-NOS / Aktin	~ 0,53	~ 0,28	~ 0,52	~ 0,40





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
e-NOS	46100716	26128637	11350903	19694570
Aktin	1933611	5607692	5366320	4056892
e-NOS / Aktin	~ 23,84	~ 4,66	~ 2,12	~ 4,86

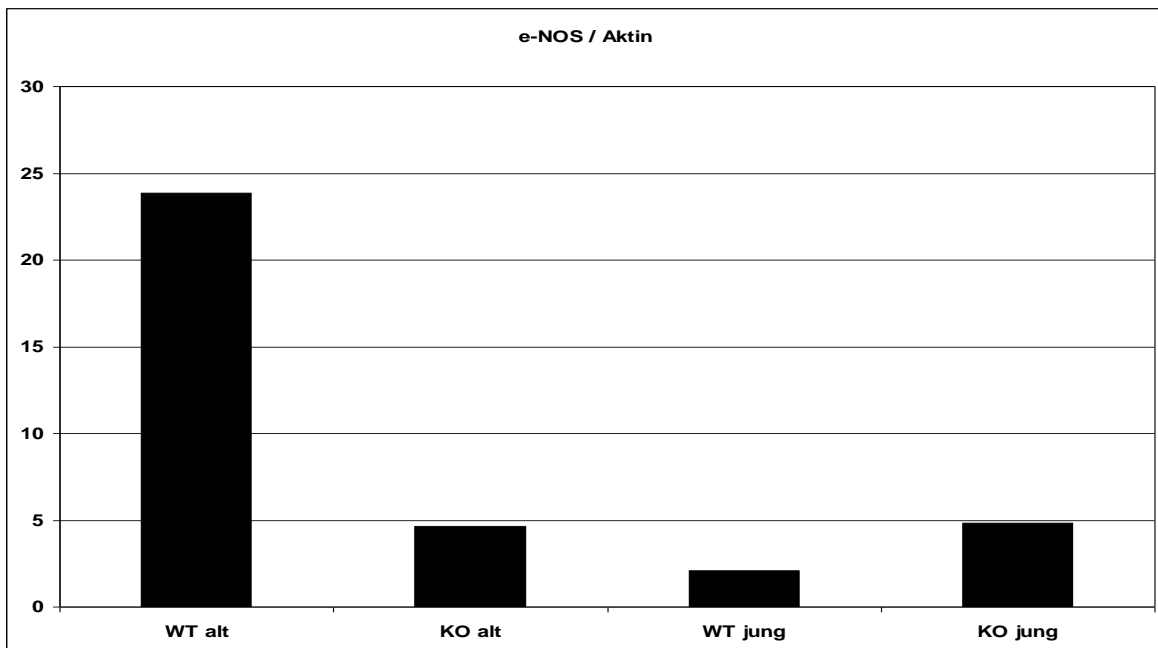


Abb.8A-C: Quantitative Verteilung der e-NOS innerhalb der vier Mausgruppen und in Relation zur Ladekontrolle (Aktin). Von oben nach unten die relativen Intensitäten der schwarzen Banden mit tabellarischer Übersicht in Zahlen und Quotientenbildung beider Werte sowie die Visualisierung jener Quotienten im Säulendiagramm. n=4 (WT=Wildtyp; KO=Knockout).

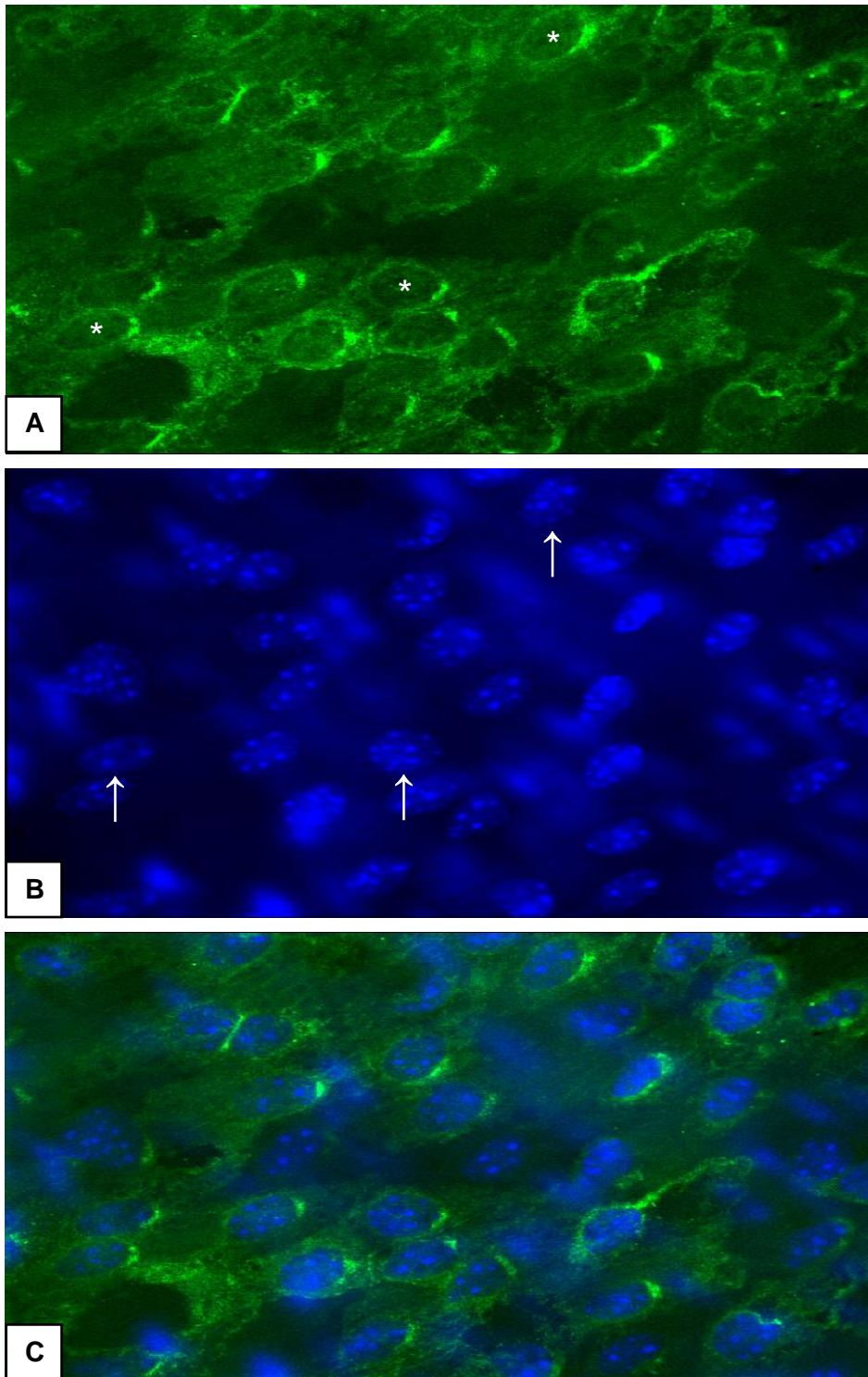


Abb.9A-C: Aufsicht auf das murine Aortenendothel nach Immunfluoreszenzfärbung mit e-NOS (A) und DAPI (B) sowie einer Überlagerung der Aufnahmen A und B (C). Die ringförmigen Gebilde mit weißem Sternchen (*) stellen eine zytoplasmatische Fraktion der e-NOS (A) um die mit weißen Pfeilen markierten Endothelzellkerne (B) dar. Die Überlagerung beider mikroskopischen Bilder (C) illustriert jene Immunfärbung als perinukleäre Anreicherung des Enzyms.

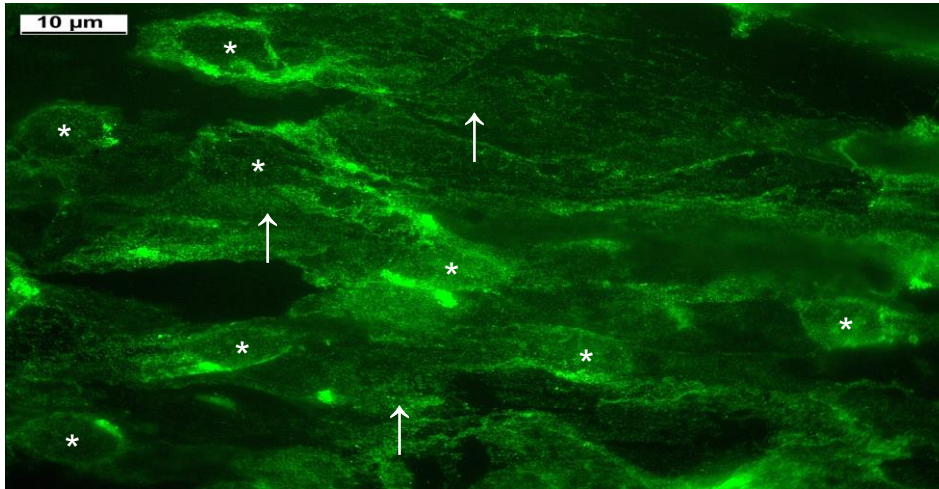


Abb.10: E-NOS-Immunfluoreszenzfärbung einer alten Wildtyp-Mausaorta. Betonung der zellmembrangebundenen Fraktion der e-NOS (weiße Pfeile), während intrazelluläres e-NOS in perinukleärer Ringform nur stellenhaft und teils andeutungsweise ausgeprägt ist (8 weiße Sternchen (*)).

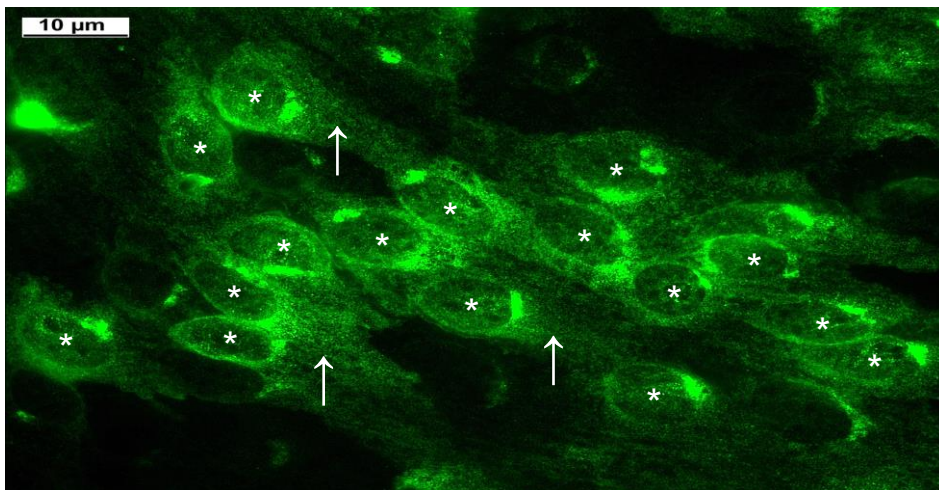


Abb.11: E-NOS-Immunfluoreszenzfärbung einer alten Ceacam1-Knockout-Mausaorta. Deutliche zytoplasmatische Anreicherung der e-NOS um die Zellkerne (16 weiße Sternchen (*)).

Tab.1: Quantitative Gegenüberstellung des Immunfärbemusters der e-NOS von Wildtyp- und Ceacam1-Knockout-Mäusen.

	Wildtyp (n=3)	Knockout (n=3)
Anzahl der mikroskopischen Aufnahmen	24	24
ringförmig-perinukleäre Gebilde	195	417

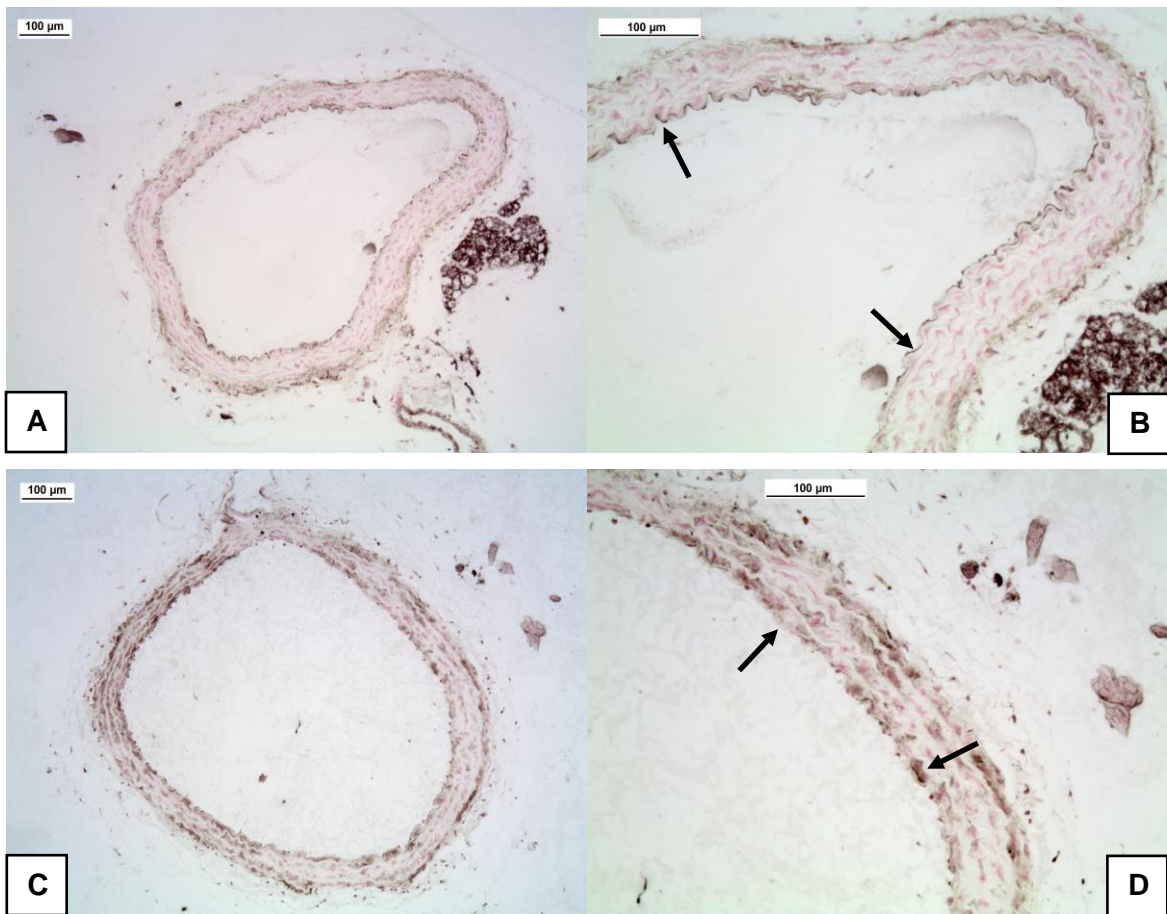
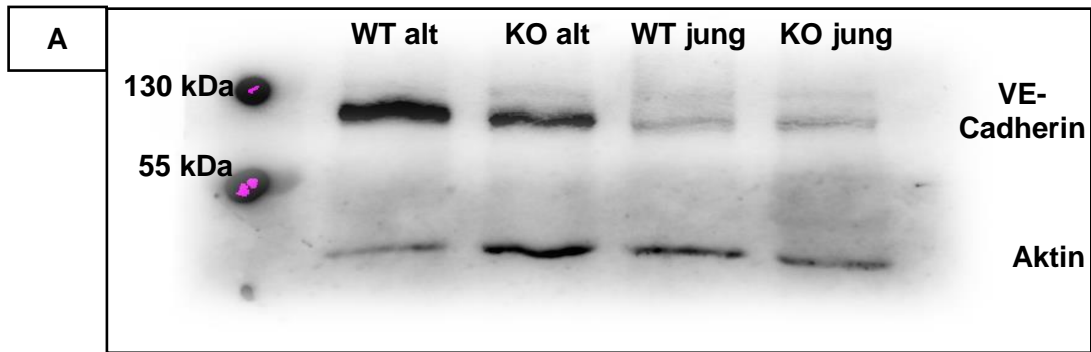
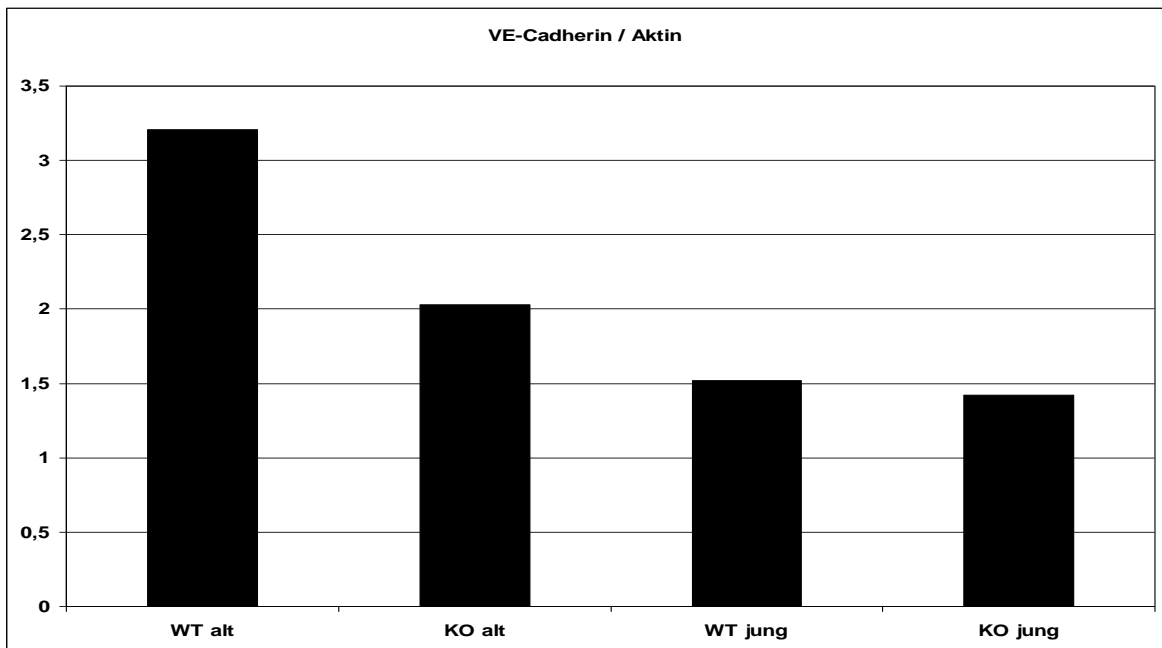
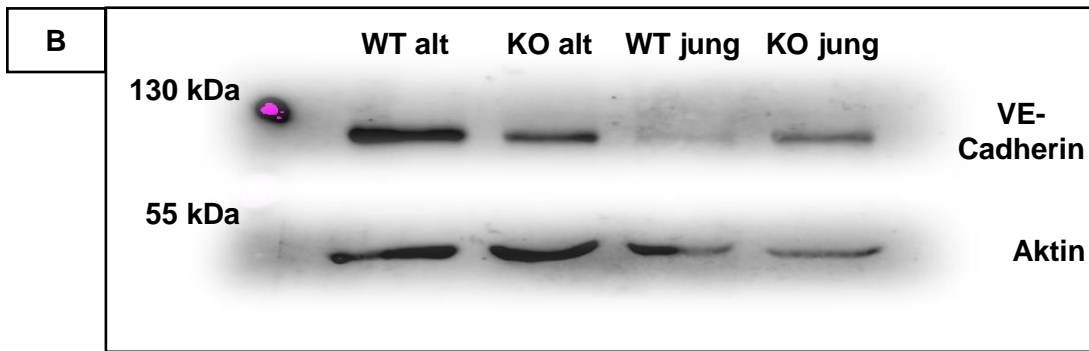


Abb.12 A-D: Immungefärbte (braun-schwarz) Paraffinquerschnitte von Aorten alter Wildtypmäuse (A, B) und alter Ceacam1-Knockout-Mäuse (C, D) mit dem vaskulären endothelialen Cadherin (VE-Cadherin). Die Pfeile markieren exemplarisch positiv gefärbte Endothelzellen der Wildtypmausaorta. In der Knockout-Maus dagegen ist die Immunfärbung unregelmäßig und teils subendothelial vorhanden (Pfeile). n=3, Vergrößerung: 100x (A, C), 200x (B, D).

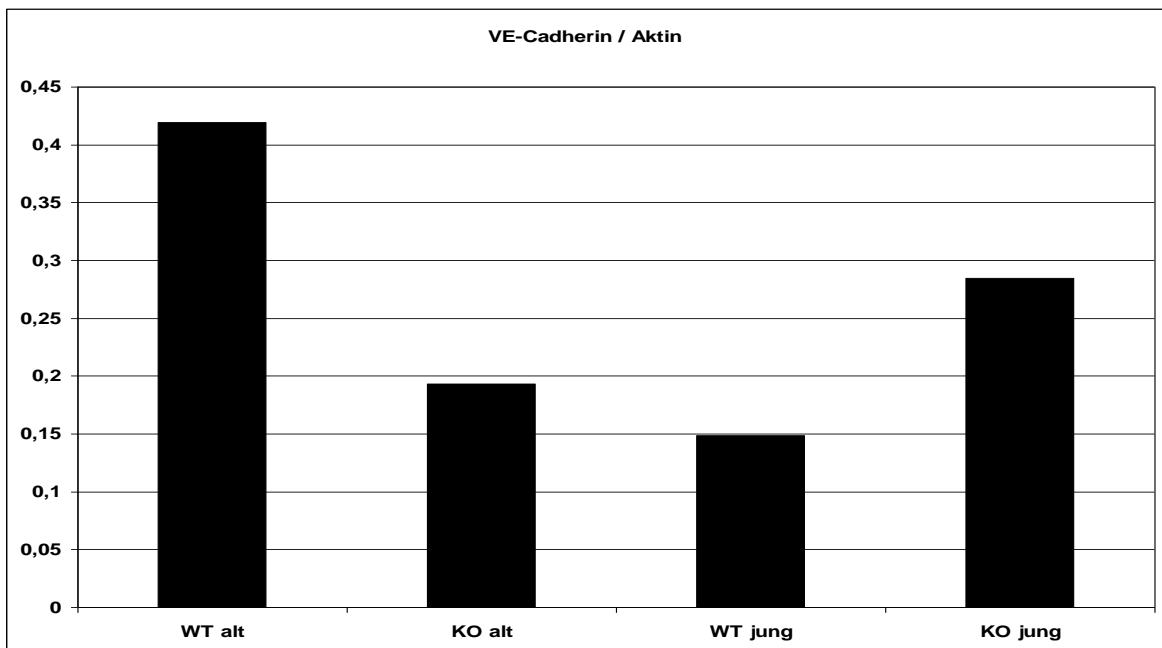


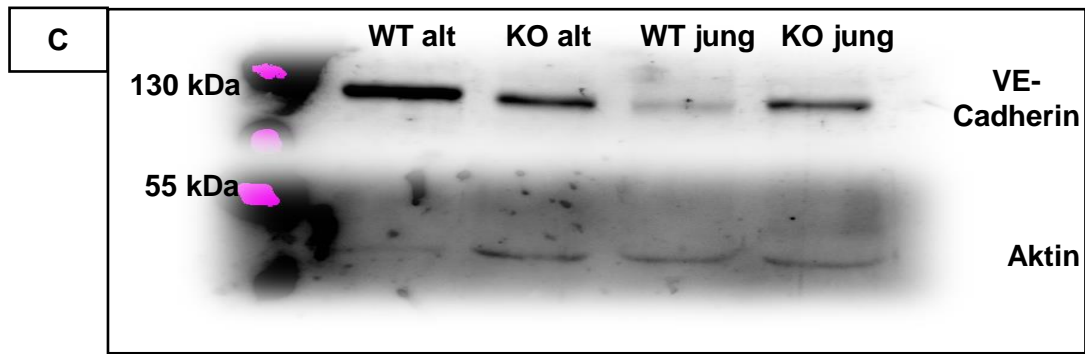
	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VE-Cadherin	91551714	74563446	47779604	46090086
Aktin	28539171	36722155	31464975	32407555
VE-Cadherin / Aktin	~ 3,21	~ 2,01	~ 1,52	~ 1,42





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VE-Cadherin	25257837	12766368	6692250	10647825
Aktin	60266201	65991493	44951476	37391905
VE-Cadherin / Aktin	~ 0,42	~ 0,19	~ 0,15	~ 0,29





	WT alt	KO alt	WT jung	KO jung
VE-Cadherin	75671119	40983210	23753080	33024333
Aktin	2782786	2691796	2009810	2374097
VE-Cadherin / Aktin	~ 27,19	~ 15,23	~ 11,82	~ 13,91

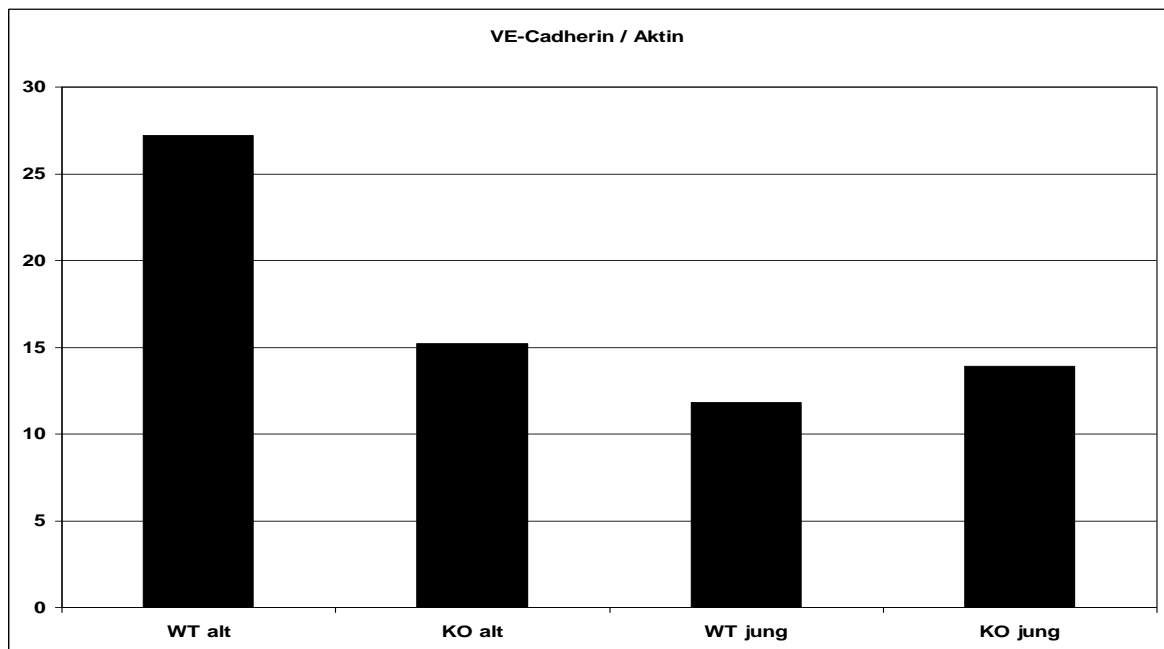


Abb.13A-C: Quantitative Verteilung des VE-Cadherin innerhalb der vier Mausgruppen und in Relation zur Ladekontrolle (Aktin). Von oben nach unten die relativen Intensitäten der schwarzen Banden mit tabellarischer Übersicht in Zahlen und Quotientenbildung beider Werte sowie die Visualisierung jener Quotienten im Säulendiagramm. n=4 (WT=Wildtyp; KO=Knockout).

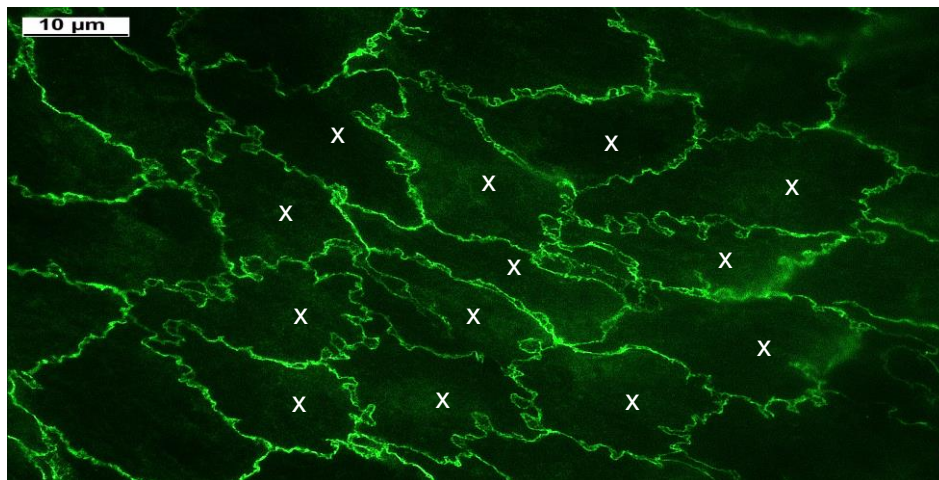


Abb.14: Ansicht auf die aortale Endothelzellschicht einer alten Ceacam1-Knockout-Maus. Die grün fluoreszierende Anfärbung entspricht der Kontaktzone zwischen den Endothelzellen und stellt gleichzeitig die Expression des VE-Cadherins dar. Auf dieser Aufnahme sind insgesamt 13 Endothelzellen mit ihren Zellgrenzen vollständig erkennbar und mit einem weißen „x“ markiert.

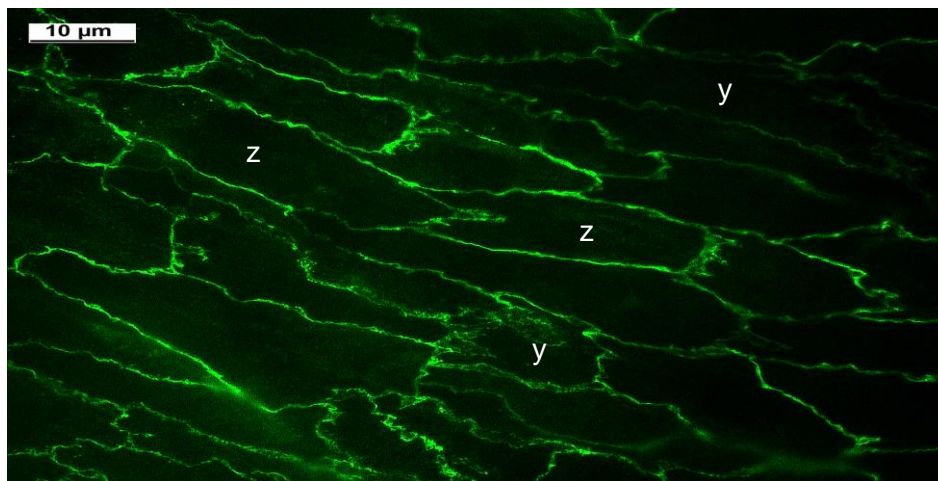


Abb.15: Ansicht auf das aortale Endothel einer alten Wildtyp-Maus. Die beiden mit einem weißen „y“ markierten Zellen weisen in allen Zellkontaktbereichen eine VE-Cadherin-Expression in Form eines geschlängelten bzw. gezackten Verlaufs. Demgegenüber besitzen die beiden mit einem weißen „z“ markierten Zellen auch glattwandige Junctionen.

Tab.2: Quantitative Gegenüberstellung des Immunfärbemusters von VE-Cadherin in Wildtyp- und Ceacam1-Knockout-Mäusen.

	Wildtyp (n=3)	Knockout (n=3)
Anzahl der mikroskopische Aufnahmen	24	24
Zellzahl	250	313
Zellzahl mit Zick-Zack-Expressionsmuster	88/250 = 0.35	145/313 = 0.46

Abkürzungen

ADH	Antidiuretisches Hormon
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGEs	Fortgeschrittene Glykosylierungsendprodukte
AP-1	Aktivator-Protein-1
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein-E-Knockout
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
CaMK-2	Calmodulin-Kinase-2
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of Differentiation)
CEA	Carcinoembryonales Antigen (Ceacam5)
Ceacam1	Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1
Ceacam1 ^{-/-}	Ceacam1-Knockout
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanodinmonophosphat
c-Src	Zelluläre Signal-Erkennungs-Tyrosinkinase
CoA	Coenzym-A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e-NOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	Extrazellulär-signalregulierte Kinase
Ets-1	Transformationsspezifische Sequenz des Vogelerythroblastosevirus E26
FAK	Fokale Adhäsionskinase
Gas1	Wachstumsarrest-spezifisches Gen 1
G(i)-Protein	inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2
GSK-3 β	Glykogensynthase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HCPTPA	Humane zelluläre Proteintyrosinphosphatase-A
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxieinduzierbarer Faktor
IgG	Immunglobulin G
IQGAP-1	IQRas GTPase-aktivierendes Protein-1
ITAM	Tyrosinbasiertes Immunrezeptor-Aktivierungsmotiv
ITIM	Tyrosinbasiertes Immunrezeptor-Inhibitionsmotiv

KLF	Krüppelprotein-ähnlicher Faktor
KO	Knockout
LCK	CD4-assoziierte Signal-Erkennungs-Tyrosinkinase
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LOX-1	Lektinartiger, oxidiertes LDL-Rezeptor-1
MAPK(s)	Mitogenaktivierte Proteinkinase(n)
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
ox-LDL	Oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor
Pecam1	Thrombozytär-endotheliales Zelladhäsionsmolekül-1
PKA	Proteinkinase-A
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase-B/Akt
PKC	Proteinkinase-C
PKG	Proteinkinase-G
PTK(s)	Proteintyrosinkinase(n)
PTP(s)	Proteintyrosinphosphatase(n)
RNA	Ribonukleinsäure
SAPK/JNK	Stressaktivierte Proteinkinase/c-Jun N-terminale Kinase
SH2	Src-Homologie-2
Shc	Adapterprotein mit SH2- und Phosphotyrosinbindungsdomäne
SHP-1/-2	SH2-positive Proteintyrosinphosphatase-1/-2
SIRT-1	NAD-abhängige Deacetylase Sirtuin 1
SMAD	Humanes Protein homolog der Genprodukte Mad (Drosophila) und Sma (C. elegans)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
Tie2	Angiopoietin-1-Rezeptor
TLR	Signaltransduktions-vermittelnder PRR (Pattern-Recognition Receptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales Cadherin
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

VEGFR-1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-1
VEGFR-2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte
WNT	Gengruppierung des Wg-Gens (Drosophila) und des murinen Int1-Gen
WT	Wildtyp
ZAP70	70 kDa-Proteinkinase

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, für das Konzept dieser Dissertation, die flexible, fachliche Anleitung sowie seine geduldige und individuelle Betreuung.

Frau Dr. rer. nat. Veronika Kleff danke ich für die freundliche Betreuung und Hilfsbereitschaft sowie insbesondere die tatkräftige Unterstützung bei tierexperimentellen Aufgaben und das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich gleichermaßen Herrn PD Dr. rer. nat. Bernard Singer, Herrn PD Dr. med. Holger Jastrow, Frau Dr. rer. nat. Diana Klein, Herrn PD Dr. rer. nat. Hans Peter Hohn und Herrn Dr. rer. medic David Diaz-Carballo für die Anleitungen zur Durchführung und Interpretation wissenschaftlicher Methoden und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Mohammed Benchellal, Frau Ulrike Tlolka, Frau Birgit Maranca-Hüvel, Frau Ulrike Trottenberg und Frau Georgia Rauter danke ich ebenso für die Unterstützung bei den Arbeiten in den Laboratorien des Instituts.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.