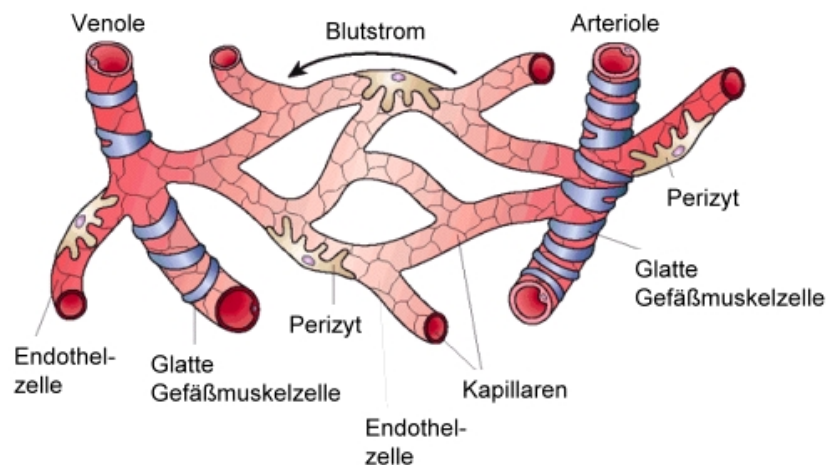


## Einleitung

### Blutgefäßsystem, Vaskulogenese und Angiogenese

Das Blutgefäßsystem bildet das erste vollständig ausgebildete Organ des sich entwickelnden Embryos und formiert das größte in sich geschlossene Netzwerk unseres Körpers. Während kleine Gefäße, die Kapillaren, nur aus einem Zelltyp, den Endothelzellen, aufgebaut sind, sind größere Gefäße von Perizyten sowie glatten Gefäßmuskelzellen umgeben, die die Gefäßwand stabilisieren. Mit Abschluß der embryonalen Entwicklungsphase ist die *de novo*-Gefäßentstehung, die sog. Vaskulogenese, vollendet (Risau und Flamme, 1995) und jede Zelle des menschlichen Körpers hat in einem Umkreis von ca. 50-110 µm eine Kapillare zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie zum Abtransport von Stoffwechselprodukten in ihrer räumlichen Nähe.



**Abb. 1: Schematischer Aufbau von Kapillaren, Arteriolen und Venolen.** Endothelzellen, Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen sind am Aufbau und bei der Aufrechterhaltung des Blutgefäßsystems beteiligt. (Verändert nach Cleaver und Melton, 2003).

Nur in seltenen Fällen kommt es auch im adulten Körper zu einer Neubildung von Blutgefäßen (Carmeliet, 2003), durch sog. Angiogenese. Die Angiogenese im adulten Organismus lässt sich mechanistisch von der Vaskulogenese im heranwachsenden Embryo abgrenzen: während in der Emryonalentwicklung die Blutgefäße hauptsächlich durch von Mesoderm-abstammenden Vorläuferzellen, den Angioblasten, durch Proliferation und Differenzierung gebildet werden, und erst in späteren Entwicklungsstadien ein Aussprossen neuer Gefäße aus bereits existierenden Kapillaren beobachtet wird, ist dieses Aussprossen aus bereits

bestehenden Kapillaren, die Angiogenese, die vorherrschende Form der Neovaskularisierung im adulten Körper. Neuere Untersuchungen belegen jedoch auch während angiogenetischer Vorgänge im Adulten eine Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen, den sog. Mesoangioblasten oder multipotenten, adulten Hämangioblasten (Carmeliet, 2003). Endotheliale Vorläuferzellen zeigen daher eine große phänotypische Plastizität, die den speziellen, gewebetypischen Anforderungen und Funktionen im ausdifferenzierten Stadium gerecht werden. So können Endothel-Vorläuferzellen in arterielle wie auch in venöse Endothelzellen differenzieren, die sich auf Grund ihres spezifischen Genexpressionsmusters im ausdifferenzierten Zustand stark zu unterscheiden vermögen.

Beispiele für physiologisches Gefäßwachstum sind die zyklischen Veränderungen in weiblichen Reproduktionsorganen sowie Veränderungen während der Gravidität: Aufbau der Plazenta und Differenzierung von Brustepithelzellen in Milch-produzierende Drüsen.

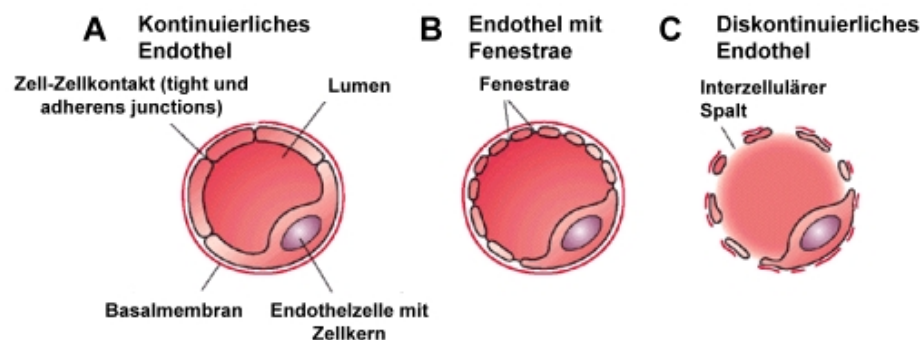
Fehlgesteuerte Regulierung der Neovaskularisierung beeinflusst elementar unsere Gesundheit und trägt zu den pathologischen Veränderungen einer Vielzahl von Krankheiten bei. So wird lokal verstärkte Angiogenese während des Tumorwachstums, nach ischämischen Verletzungen und während entzündlicher Erkrankungen beobachtet. Aber auch angeborene oder vererbte Krankheiten können begleitet sein von unkontrolliertem Gefäßwachstum. Ein ineffizientes Gefäßwachstum oder unregulierter Abbau bestehender Gefäße kann ebenfalls pathologisch werden und zu Krankheitsbildern wie neurodegenerativen Erkrankungen, erhöhtem Blutdruck, dem respiratorischen Stresssyndrom oder Osteoporose beitragen (Carmeliet, 2003; Folkman, 1995).

Aufgrund dieser Vielfalt pathologischer Verwicklungen bietet die Aufklärung von molekularen, genetischen und zellulären Mechanismen angiogenetischer Prozesse mögliche Ansatzmöglichkeiten für therapeutische Konzepte zur Behandlung von Erkrankungen.

## **Endothelzellen und Angiogenese**

Die schätzungsweise 40 Milliarden Kapillaren des menschlichen Körpers bilden eine aktive Austauschfläche, die zum Lumen gewandte Endotheloberfläche von ca. 1000 m<sup>2</sup>, was ca. 1,5 m<sup>2</sup> Endothelzelloberfläche pro 100 g Gewebe entspricht. Jedoch sind nicht alle Organe gleichmäßig stark von Kapillaren durchzogen, und auch morphologische Unterschiede im Aufbau von Kapillaren werden beobachtet. Das Endothel bildet die innerste Auskleidung aller Blutge-

fäße und ist organisiert in einem dünnen einschichtigen Plattenepithel, das mindestens durch eine Basalmembran (Kapillaren) oder zusätzlich auch von anderen Zellen (Perizyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten) von der Umgebung abgetrennt ist. Als innerste Schicht sind die Endothelzellen mit ihrer apikalen Oberfläche im direkten Kontakt zum Blutstrom und kontrollieren den Übertritt von gelösten Substanzen in und aus dem Blut, aber auch das Auswandern von Leukozyten in das darunter liegende Gewebe. Kapillar-auskleidende Endothelzellen der Skelettmuskeln, des Herzens, der Lunge und des Gehirns zeigen eine kontinuierliche Endothelzelloberfläche mit engen, gut ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten, während das Kapillarendothel exokriner und endokriner Gewebe sowie der Darmzotten und  $\beta$ -Zellen von kleinen Öffnungen von ca. 80-100 nm Dicke, sog. Fenestrae, mit dünnen, nicht-membranartigen permeablen Diaphragmen verschlossen ist, die den raschen Austausch von Makromolekülen in das umliegende Gewebe erlauben. Auch diskontinuierliches Kapillarendothel mit vielen Fenestrae, ohne Diaphragmen und großen Lumina und diskontinuierlicher oder fehlender Basalmembran sind beschrieben worden, so z.B. in den stark durchbluteten Lebersinusoiden.

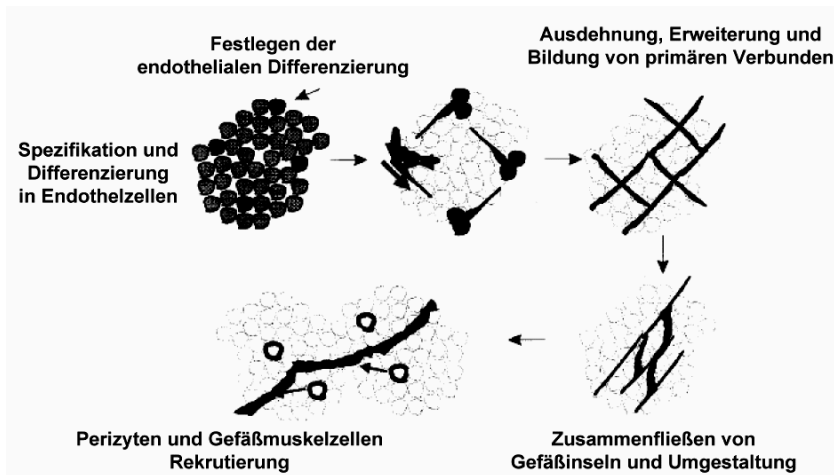


**Abb. 2: Schematischer Aufbau der Kapillarwand.** Kapillarendothel verschiedener Gewebe zeigt unterschiedliche Zellmorphologien. **(A)** Gefäßendothel vom kontinuierlichen Typ mit geschlossener Endothelschicht und ununterbrochener Basalmembran. **(B)** Endothel mit Fenestrae zeigt kleine Öffnungen in der Zellwand, die mit Diaphragmen verschlossen sind und eine ununterbrochene Basalmembran. **(C)** Diskontinuierliches Endothel mit interzellulären Lücken, Fenestrae ohne Diaphragmen und unterbrochener Basalmembran. (Verändert nach Cleaver und Melton, 2003).

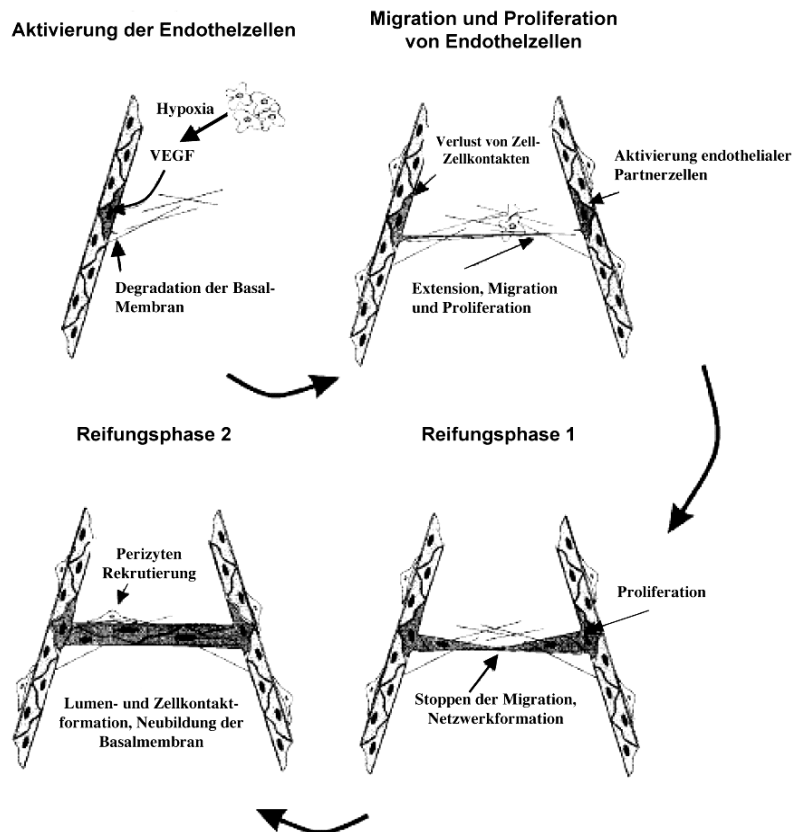
Im ruhenden Zustand sind Endothelzellen vollständig differenziert, wachstumsinhibiert und haben eine lange durchschnittliche Lebensdauer von mehreren Jahren. Sie behalten aber die Fähigkeit zur Zellteilung (Proliferation) und auch zur Zellwanderung (Migration) sowie zur Selbstorganisation in Netzwerken und zur Luminausbildung. Diese Funktionen müssen aber erst durch externe Stimuli wie Verwundung benachbarter Zellen oder Wachstumsfaktor-ver-

mittelter Aktivierung des Gefäßendothels induziert werden, erzeugen dann aber erhebliche morphologische und funktionelle Veränderungen.

**A**



**B**



**Abb. 3: Schematische Darstellung der (A) Vaskulogenese und (B) der Angiogenese.** (Verändert nach Daniel und Abrahamson, 2000) Nähere Beschreibung der einzelnen Stadien siehe Text.

Die gleichen Signale und morphologischen Veränderungen von Endothelzellen leiten schließlich die Angiogenese ein. Dieser Vorgang lässt sich grob in zwei Phasen einteilen (Daniel und Abrahamson, 2000): 1. die Aktivierungsphase und 2. die Reifungsphase von Endothelzellen.

Während der Aktivierungsphase kommt es durch pro-angiogenetische Stimuli zur Aktivierung des zuvor ruhenden Endothels. Die miteinander durch Zell-Zell-Kontakte verbundenen Endothelzellen verringern die Adhäsivität ihrer Kontakte, was ihnen erlaubt, migratorisch aktiv zu werden und nach Degradation der Basalmembran invasiv in die Peripherie auszuwandern. Durch Proliferation kommt es danach zu einer Ansammlung von miteinander locker verbundenen Endothelzellen im angiogenetisch-aktiven Gewebe, die sich schließlich durch Lumenbildung zu gefäßartigen Strukturen selbst zu organisieren vermögen. In der Reifungsphase stellen die Zellen ihre Wanderung vollständig ein, es kommt zur Ausbildung von neuen, abdichtenden Zell-Zell-Kontakten, zur Hemmung der Endothelzellproliferation sowie zum Wiederaufbau der Basalmembran. Schließlich können auch Perizyten oder glatte Gefäßmuskulzellen zu den frisch formierten Kapillaren rekrutiert werden, die durch parakrin-wirkende Wachstumsstoffe die Enddifferenzierung der Kapillaren einleiten und mit beeinflussen können (Folkman und D'Amore, 1996).

### **Lösliche Faktoren kontrollieren die Angiogenese**

Die Angiogenese ist durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderen Signalen positiv wie auch negativ reguliert, d.h., das System befindet sich im Ruhezustand oder im Gleichgewicht (Hanahan, 1997). Eine Reihe löslicher Faktoren wurde in den letzten Jahren pro-angiogenetische Wirkungen in *in vitro*- und *in vivo*-Studien zugeschrieben (Gale und Yancopoulos, 1999). Darunter fallen Wachstumsfaktoren mit breiten Wirkungsspektren wie die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (aFGF und bFGF), der transformierende Wachstumsfaktor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Scatter Faktor (HGF/SF), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Chemokine wie Interleukin-8. Aber auch Endothel-spezifische Wachstumsfaktoren wie Angiogenin und Angiopoietine sowie die wohl am besten untersuchte Gruppe der stark pro-angiogenen, vaskulär-endothelialen-Wachstumsfaktoren (VEGFs) wurden beschrieben und deren Wirkungsmechanismen analysiert (Daniel und Abrahamson, 2000). Endogene Angiogenese-Inhibitoren wie Angiostatin, Endostatin oder Thrombostatin sind die natürlichen Gegenspieler der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und pharmakologische Angiogenese-Inhibitoren wie Avastin (humanisierter Antikörper gegen VEGF) sind gute Kandidaten zur Therapie von pathologischem Gefäßwachstum (Kerbel und Folkman, 2002). Tabelle 1 zeigt eine Auswahl wichtiger pro-angiogenetischer

Wachstumsfaktoren sowie die wichtigsten Auswirkungen eines genetischen Knock-out einzelner Faktoren oder deren Rezeptoren in der Maus.

<b>Tabelle 1: Spezifische pro-angiogenetische Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren mit vaskulären Defekten des Null-Phänotyps in der Maus</b>		
<b>Faktor</b>	<b>Null-Phänotyp</b>	<b>Zeitpunkt des Todes</b>
VEGF	Schwere vaskuläre Defekte wie fehlende dorsale Aorta (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996)	E10,5(-/-) E11,5 (+/-)
VEGFR1 (flk1)	Endothelzellen- und Hämangioblasten-Differenzierung gestört, verringerte Migration (Shalaby et al., 1997; Shalaby et al., 1995)	E8,5-9,5
VEGFR2 (flk2)	Endothelzellen-Differenzierung normal, vaskuläres Netzwerk desorganisiert mit zu vielen Hämangioblasten (Fong et al., 1995)	E8,5-9,5
VEGFR3	Vaskulogenese und Angiogenese normal, Lumenformation und Organisation großer Gefäße gestört (Dumont et al., 1998)	E9,5
Angiopoietin 1	Defekte während der Gefäßorganisation und des Gefäßumbaus (Davies et al. 1996; Suri et al., 1996)	E10,5
Tie1	Vaskuläre Integrität und Überleben von Endothelzellen gestört, mit Ödemen und schweren Blutungen (Sato et al., 1995)	E13,5-14,5
Tie2	Defekte in der Organisation und im Umbau der Gefäße, fehlerhaftes Aussprossen (Dumont et al., 1994)	E10,5
TGF-β 1	Keine Umorganisation des primären Plexus während der Vaskularisierung des Dotterbläschens (Dickson et al., 1995)	E10,5
PDGF-BB	Gestörte Gefäßentwicklung durch mangelnde Perizytenrekrutierung	P1

### **Adhäsive Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen und deren Funktionen**

Adhäsive Rezeptoren sind für die endotheliale Homöostase grundsätzlich erforderlich. Sie vermitteln den Kontakt zur extrazellulären Matrix und Nachbarzellen, wodurch Zug- und Scheerkräfte im Gewebe verteilt werden können und die Gefäße gegenüber dem Blutstrom abgedichtet werden (Bazzoni und Dejana, 2004). Neben den löslichen Wachstumsfaktoren, die das morphogenetische Programm zur Vaskularisierung und Angiogenese auslösen und steuern können, zeigt sich immer stärker, dass auch extrazelluläre Interaktionen von Adhäsionsrezeptoren die Morphogenese während der Neovaskularisierung beeinflussen und auch regulieren können (Bazzoni et al., 1999). So besitzen Adhäsionsrezeptoren essentielle Funk-

tionen u.a. während der Endothelzellen-Migration, der Proliferationsregulation sowie der Wegfindung und der Reorganisation von Zell-Zell-Kontakten während der Lumenformation (Dejana et al., 2001; Juliano, 2002). Im Folgenden wird auf die Funktion einzelner Adhäsionsrezeptoren näher eingegangen.

## **Die Zell-Matrix-Adhäsion**

### **Basalmembran und extrazelluläre Matrix**

Die vaskuläre Basalmembran ist eine faserartige, sich selbst organisierende Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, die durch Endothelzellen, Perizyten oder glatte Muskelzellen synthetisiert und sekretiert wird. Typ IV-Kollagen, Laminin, Fibronectin, Nidogen (Entactin) sowie Heparansulfat und Perlecan sind unter den zahlreichen Bestandteilen die mit Abstand häufigsten Vertreter. Die extrazelluläre Matrix bildet dabei eine Anheftungsgrundlage für Endothelzellen, die über spezifische Rezeptoren, z.B. über Integrine (siehe unten), vermittelt wird. Neben der rein mechanischen Funktion, dem Gewebe Festigkeit zu verleihen, bestimmt die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix auch die Gewebearchitektur sowie die Morphologie und Funktion von Endothelzellen (Bix und Iozzo, 2005). Während angiogenetischer Prozesse unterliegt die extrazelluläre Matrix großer struktureller Veränderungen: durch Protein-Neusynthese oder proteolytische Degradation, vermittelt durch Matrix-Metalloproteasen, verändert sich die Zusammensetzung der Komponenten oder es werden neue gebildet (Rundhaug, 2005). So haben Endothelzellen während des Aussprossens nach Gefäßschädigung Kontakt zu einer Vitronektin- und Fibrin-reichen Matrix (Clark et al., 1996). Matrixproteine vermögen aber auch aktiv Signale in Zellen zu vermitteln, die über die Integrine (siehe unten) in das Zellinnere weitergeleitet werden. Dort können sie Signalkaskaden auslösen, die Differenzierungsprogramme, Migration, Proliferation oder Zelltod steuern können. Zusätzlich bestimmt die extrazelluläre Matrix die lokale Verfügbarkeit von verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, die an einzelne Komponenten der Matrix zu binden vermögen (Schönherr und Hausser, 2000).

Von Matrixproteinen abgeleitete Peptide bilden desweiteren eine Untergruppe der endogenen Angiogenese-Inhibitoren. Zu diesen gehören z.B. Endostatin, Arresten, Kollagen-Fragmente, Endorepellin, Fibronectin-Fragmente, Tumstatin und Thrombospondin-1 und -2 (Nyberg et al., 2005). Eine Zusammenfassung über die an der Vaskularisierung beteiligten extrazellulä-

ren Proteasen und deren Funktionen während der Angiogenese bieten die Übersichtsartikel von Luttun et al. und Pepper (Luttun et al., 2000; Pepper, 2001).

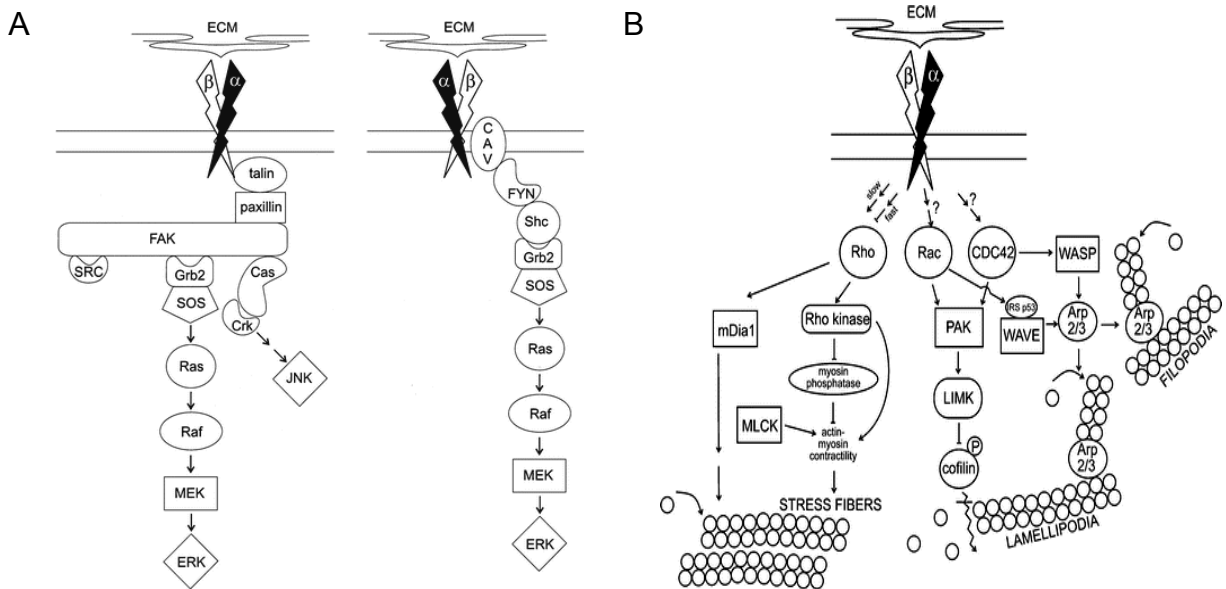
## Integrine

Die Adhäsion endothelialer Zellen sowie die Adhäsion anderer Zelltypen auf Komponenten der extrazellulären Matrix und die Migration von Zellen wird hauptsächlich durch Mitglieder der Integrin-Familie vermittelt. Integrine sind Typ 1-transmembranäre heterodimere Rezeptoren aus nicht-kovalent verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die den Zusammenhalt und die Architektur von Geweben bestimmen (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Von den acht Unterfamilien der Integrine, die sich durch ihre verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten definieren lassen, sind auf endothelialen Zellen  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3-,  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-Integrine exprimiert beschrieben worden. Es besteht jedoch eine hohe Heterogenität in den beschriebenen Integrin-Expressionsmustern von Endothelzellen, die bedingt ist durch die Verschiedenheit von Kulturbedingungen der untersuchten Spezies oder des vaskulären Ursprungs der untersuchten Zellen. Die Kombination von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestimmt die Spezifität der Ligandenbindung, die zum Teil Redundanz aufweist, jedoch unterschiedliche Effekte auf das Zellschicksal ausüben kann.

Eine Beteiligung von Integrinen bei der Vaskulogenese oder der Angiogenese stützt sich auf mehrere Beobachtungen: 1.) Die Integrin-Expression auf Endothelzellen wird durch lösliche pro-angiogenetische Faktoren wie VEGF, TGF- $\beta$  oder bFGF (Enaida et al., 1998) moduliert. 2.) Integrine vermitteln pro-angiogenetische Zellfunktionen wie Migration, Matrix-abhängige Proliferation und Regulation der Matrixdegradation (Stupack und Cheresch, 2004). 3.) Antikörper- oder Peptid-vermittelte Blockade Integrin-abhängiger Adhäsions- und Migrationsvorgänge verhindert experimentell ausgelöste Angiogenese *in vitro* und *in vivo* (Bazzoni et al., 1999). 4.) Integrine können mit Wachstumsfaktorrezeptoren funktionell interagieren: so induziert die Bindung von VEGF und PDGF an ihre kognaten Rezeptoren deren Assoziation mit dem  $\alpha$ V/ $\beta$ 3-Integrin und reguliert dessen pro-migratorische Funktion (Borges et al., 2000). 5.) Zielgerichtete Zerstörung der Gene von Integrin-Untereinheiten in Knock-out-Mäusen führte zu vielfältigen vaskulären Entwicklungsstörungen (Hynes und Bader, 1997) (siehe auch Tabelle 2). 6.) Morphologische Veränderungen von sich selbstständig reorganisierenden Epithelzellen während der Lumenformation (z.B. Nephron-Bildung) sind substantiell



abhängig von der Funktion der Integrine  $\alpha 2/\beta 1$ ,  $\alpha 3/\beta 1$  und  $\alpha 8/\beta 1$  (Stuart et al., 1995). Integrine besitzen keine intrinsische Enzymaktivität, unterziehen sich aber struktureller Konformationsveränderungen nach extrazellulärer Ligandenbindung und rekrutieren nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl von Signalmolekülen und strukturenbenden Proteinen durch ihre zyttoplasmatischen Domänen oder durch ihre transmembranären Domänen (siehe Abb. 4A).



**Abb. 4: Direkte Signalwege der Integrine.** (A) Zwei Modelle für die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Integrine. Das linke Modell zeigt, dass Ligandenbindung zur Rekrutierung von Paxillin und Talin sowie zur Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung von FAK führt. Dadurch und durch Einbeziehung weiterer Adaptormoleküle (Grb2, Crk und Cas) kommt es zur Aktivierung kleiner GTPasen (ras und raf), die direkt in die Regulation von MAPK (MEK, Erk) eingreifen. Im rechten Modell ist die Anbindung der Tyrosinkinase Fyn über den lateralen Integrin-Bindungspartner Caveolin ausschlaggebend, wodurch es über Tyrosinphosphorylierungen an Proteinen durch Adaptorprotein-Rekrutierung kommt (Shc, Grb2 und Sos) und dadurch zur Aktivierung kleiner GTPasen (ras, raf). (B) Modulation des Aktin-Zytoskeletts durch Integrine über kleine GTPasen der Rho-Familie. Integrine vermögen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42) indirekt über nicht genau charakterisierte Signalwege zu aktivieren und zu modulieren. Über den Cdc42-Wasp-Signalweg kommt es zur Aktivierung des Aktin-Polymerisationskomplexes Arp2/3 und zur Ausbildung von kleinen Zellfortsätzen, den Filopodien. Über Rac-Aktivierung können die Serin-Kinasen PAK und LIMK aktiviert werden, wodurch Cofilin phosphoryliert und deaktiviert wird, was an der Depolymerisation von Filamenten beteiligt ist. Dies führt überwiegend zur Ausbildung von Lamaellipodien. Über den Rho-Weg kommt es zur Aktivierung von Rho-Effektorkinasen (ROCK, MLCK), die im Zusammenspiel mit anderen Proteinen (mDia) die Ausbildung von Aktin-Stressfasern begünstigen. (Nach Juliano, 2002).

Durch diese Akquise intrazellulärer Proteine sind Integrine direkt an der Initiation von Signalkaskaden beteiligt oder können regulatorisch in Signalkaskaden anderer Rezeptoren eingreifen. Integrin-abhängig kann die intrazelluläre lokale  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Zellen erhöht, Ty-

rosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen induziert oder der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst werden. Schließlich kommt es durch veränderte Aktivitäten kleiner GTPasen der Rho-Familie zur Reorganisation des Zytoskeletts oder durch gesteigerte Aktivität von MAP-Kinasen zur Beeinflussung der Zellproliferation (Arthur et al., 2002; Danen und Yamada, 2001; Giancotti und Ruoslahti, 1999; Schwartz, 2001).

Die Affinität der Integrine zu ihren Liganden ist nicht sehr hoch. Durch Clustern vieler Integrinmoleküle oder multivalente Liganden kann die Bindungsstärke jedoch erhöht werden (Steigerung der Avidität). Ferner können Integrine in einem als "inside-out signaling" genannten Prozess durch Signale aus dem Inneren der Zelle aktiviert werden, wodurch sie ihre Affinität zum Liganden im extrazellulären Bereich erst entwickeln oder erhöhen (Kim et al., 2003; Kinashi, 2005). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Bindung von Talin an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta$ -Integrinuntereinheiten eine Konformationsänderung in deren extrazellulären Domänen induzieren kann, die durch aktivitäts-spezifische Antikörper oder Strukturuntersuchungen dargestellt werden konnte und für die Integrinfunktion essentiell war (Calderwood et al., 2004; Tadokoro et al., 2003).

Integrin-blockierende Pharmaka befinden sich zur Zeit bereits in klinischen Phasen für anti-Tumor-Therapien (z.B. Vitaxin, ein humanisierter Antikörper gegen das  $\alpha V/\beta 3$ -Integrin (Posey et al., 2001).

Tabelle 2 zeigt die Auswirkung von genetischen Knock-outs von Integrinuntereinheiten in Mäusen mit besonderem Interesse hinsichtlich der Vaskularisierung und Angiogenese des sich entwickelnden Embryos.

<b>Rezeptor</b>	<b>Null-Phänotyp</b>	<b>Zeitpunkt des Todes</b>
Integrin $\alpha 3$	reduzierte Verzweigungen von Kapillaren (Kreidberg et al., 1996)	perinatal
Integrin $\alpha 4$	Herz-Defekte und abnormale Koronargefäße (Yang et al., 1995)	embryonal
Integrin $\alpha 5$	Keine Fusion von endothelialen Gefäßinseln zu Gefäßen im Dottersack (Yang et al., 1993)	embryonal
Integrin $\alpha V$	Vaskulogenese und frühe Angiogenese intakt, aber intracerebrale und intestinale Blutungen (Bader et al., 1998)	E10,5-P1
Integrin $\beta 3$	Normales Gefäßsystem, aber spontane Blutungen	lebensfähig

## **Zell-Zell-Adhäsion**

Da Endothelzellen als innerste Schicht der Blutgefäße in direktem Kontakt zum Blutstrom stehen, müssen sie eine undurchlässige Zellschicht darstellen, die selektiv die Passage von Leukozyten und im Blut gelösten Stoffen, durch vesikuläre Transzytose oder durch koordiniertes Öffnen und Schließen der Zell-Zell-Kontaktstellen, ermöglicht (Vestweber, 2000). Zellkontakte von Endothelzellen müssen aber nicht nur eine undurchlässige Verbindung erzeugen, sie müssen auch Ankerverbindungen für das Zytoskelett darstellen, um mechanischen Belastungen zu widerstehen und diese auf die Umgebung verteilen zu können. Zunehmend in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses sind in den letzten Jahren aber die kommunizierenden Eigenschaften der Zell-Zell-Kontakte geraten, die durch Initiation, Regulation oder Inhibition von Signalkaskaden die Funktion von Zellen maßgeblich mitbestimmen können (Dejana et al., 2000). Ganz entscheidend regulieren endotheliale Zellkontakte die Morphologie und Verhaltensweise von Endothelzellen während des Übergangs vom ruhenden zum pro-angiogenen Phänotyp. Während Endothelzellen im ruhenden, konfluenten Zustand einen typisch epithelartigen, pflastersteinartigen Phänotyp zeigen, erscheinen sie eher langgestreckt, fibroblastoid, wenn Zellkontakte im spärlich ausgesähten Zustand nicht ausgebildet werden können oder wenn Endothelzellen ihre Zell-Zell-Kontakte verlieren und in angiogenetisch aktives Gewebe auswandern. Im konfluenten, ruhenden Zustand mit ausgeprägten, stabilen Zell-Zell-Kontakten sind endotheliale Zellen ferner kontaktinhibiert, d.h., nicht proliferativ aktiv, besitzen eine besondere Aktinfilament-Organisation, sind vor pro-apoptotischen Signalen geschützt und zeigen eine apikale/basolaterale Polarität (Dejana, 2004). Durch den Übergang vom ruhenden in den angiogenetisch aktiven fibroblastoiden Zustand machen die Zellen eine EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*)-ähnliche Umwandlung durch, bei der dem Verlust der Zellkontakte eine tragende Funktion zukommt.

## **Endotheliale Zell-Junctions**

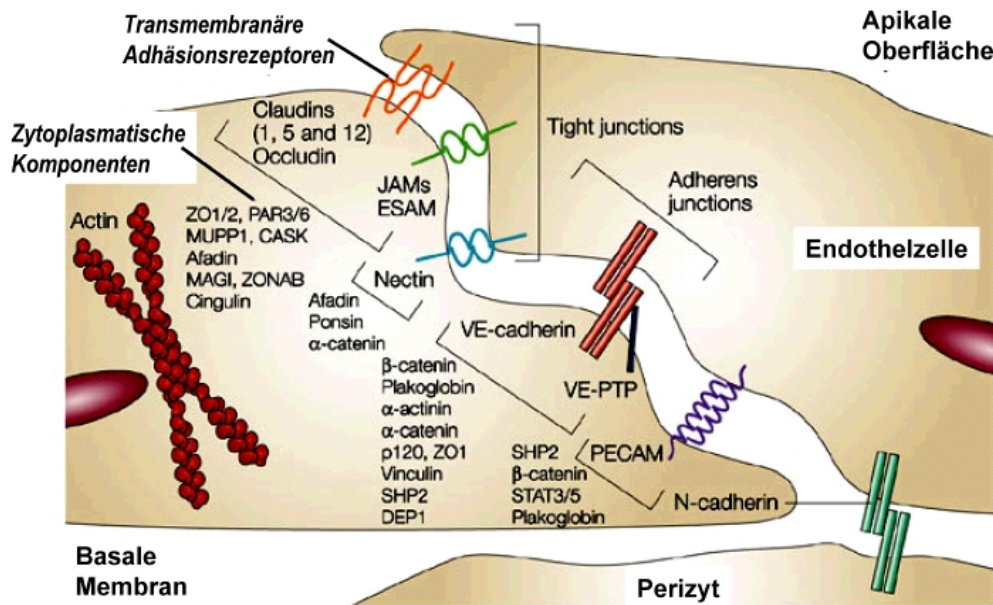
Im Unterschied zu epithelialen Zellkontakten sind die Kontaktzonen von Endothelzellen weniger rigide organisiert und zeigen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen durchaus überlappende Areale. Wie Epithelzellen besitzen auch Endothelzellen spezialisierte Kontaktregionen, wie Tight-Junctions und Adherens-Junctions, die in endothelialen Kontaktbereichen

aber weniger stringent organisiert erscheinen. So ist eine Vermischung von Tight-Junctions und Adherens-Junctions über die gesamte Kontaktfläche von Endothelzellen zu beobachten, während in epithelialen Strukturen die Tight-Junctions die am weitesten apikal-gelegene Verbindungsstruktur der Zellkontaktspalte bilden. Trotz der veränderten Lokalisation wird den endothelialen Tight-Junctions und Adherens-Junctions eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung der terminalen Zellmorphologie und der Zellpolarität zugeschrieben (Bazzoni und Dejana, 2004). Weiterhin besitzen Endothelzellen im Unterschied zu Epithelzellen keine Desmosomen. Nur in wenigen, spezialisierten Endothelzelltypen des lymphatischen Systems und einiger Venen konnten desmosomale Strukturen beobachtet werden, die Complexus-Adhaerentes. Diese besitzen jedoch keine desmosomalen Cadherine, sondern VE-Cadherin als Ankerprotein (Schmelz et al., 1994).

VE-Cadherin ist als zentrales Zell-Zell-Adhäsionsmolekül der Adherens-Junctions in allen endothelialen Zellen anzutreffen. Cadherine sind homophile Adhäsionsrezeptoren, die Kalzium-abhängig stark adhäsiv wirken. Intrazellulär ist VE-Cadherin über zytoplasmatische Proteine, den Cateninen, mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Weiterhin interagiert VE-Cadherin mit anderen Endothel-spezifischen Rezeptoren, wie z.B. dem VEGF-Rezeptor-2 und der membranständigen Protein-Tyrosin-Phosphatase VE-PTP (Nawroth et al., 2005; Zanetti et al., 2002). Die adhäsive Wirkung von VE-Cadherin wird reguliert. So ist gezeigt worden, dass die Dephosphorylierung von VE-Cadherin im zytoplasmatischen Anteil zu einer verstärkten homophilen Adhäsion führt. Für die Ausbildung des Gefäßsystems ist VE-Cadherin essentiell: VE-Cadherin-defiziente Mäuse sterben *in utero* auf Grund von schwerwiegenden Defekten des vaskulären Systems am Tag 9,5 (Carmeliet et al., 1999). Auch  $\beta$ -Catenin-Knock-out-Mäuse sind embryonal lethal und sterben am Tag 11,5 nach der Befruchtung. Mit N-Cadherin wird ein weiteres Mitglied der Cadherine auf Endothelzellen exprimiert. N-Cadherin findet sich im ruhenden Zustand, aber nicht in den endothelialen Zell-Zell-Kontaktbereichen, sondern eher über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Analysen zur Funktion dieses Proteins haben jüngst eine Assoziation mit FGF-Rezeptoren und eine Beteiligung bei der Zellkontaktformation von Endothelzellen aufgezeigt (Navarro et al., 1998). Zu späteren Zeitpunkten der Gefäßneubildung wird es dagegen in Kontaktbereichen von Endothelzellen mit Perizyten gefunden (Gerhardt et al., 2000).

Occludin und Claudine sind wesentlich Bestandteile der Tight-Junctions. Sie sind Membranproteine der Tetraspanin-Familie, die die Plasmamembran viermal durchspannen und binden mit ihren zytoplasmatischen Domänen intrazellulär an Proteine der Zona-Occludens, den ZO-

Proteinen und auch an das Aktinzytoskelett. Claudin-5 ist als einziges Mitglied dieser Proteinfamilie nur in Endothelzellen exprimiert. Claudin-5-defiziente-Mäuse zeigen keine Veränderungen während der Vaskulogenese, sie sterben jedoch wenige Stunden nach der Geburt an funktionellen Störungen der Blut-Hirn-Schranke (Nitta et al., 2003).



**Abb. 5: Schema der molekularen Organisation adhäsiver endothelialer Zell-Zell-Kontakte.** Endotheliale Zell-Zellverbindungen werden durch adhäsive transmembranäre Proteine und deren zytosmatischen Bindungspartnern gebildet. Sie können in hochmolekularen Komplexen organisiert sein (Tight und Adhärenz-Junctions), die mit dem Aktinzytoskelett assoziiert vorliegen oder über das gesamte Zellkontaktareal verteilt (PECAM) auftreten. Teilweise sind adhäsive Rezeptoren nur während dynamischer Vorgänge in endothelialen Zellkontakten zu finden, während in ruhenden Zellen eine zufällige Verteilung oder eine Akkumulation an endothelialen Kontaktstellen und Kontakten zu Perizyten gefunden wird (N-Cadherin). (Schema verändert nach Dejana, 2004).

Das *Junctional-Adhesion-Molecule* (JAM)1 repräsentiert eine weitere Komponente der Tight-Junctions. JAM1 wurde als erstes adhäsives Familienmitglied der Immunoglobulin-ähnlichen Superfamilie (IgSF) zwischen endothelialen und auch epithelialen Zell-Zell-Kontakten lokalisiert beschrieben. Inzwischen sind mit JAM1, JAM2 und JAM3 weitere Vertreter dieser Gruppe kloniert und als auf Endothelzellen exprimiert beschrieben worden. JAMs vermitteln schwache homophile Interaktionen zwischen den Zellen und tragen regulierend zur transepithelialen und endothelialen Permeabilität bei. Intrazellulär wird ihnen durch die Assoziation zu PAR3 eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung und Ausbildung der Zellpolarität zugeschrieben. Eine heterophile Bindung von JAM1 an das Leukozyten-Integrin LFA-1 zeigt ferner, dass die junctionalen Adhäsionsmoleküle auch eine Funktion bei der Leukozyten-Extravasation haben können (Mandell und Parkos, 2005). Antikörper-vermittelte Blockade

von JAM1 vermag die durch bFGF-induzierte Angiogenese durch eine verringerte Migration auf Vitronektin zu inhibieren (Parise, 2003). Antikörper gegen JAM3 konnten dagegen auch *in vivo* die Angiogenese in durch Hypoxie-induzierter Neovaskularisierung der Retina sowie der Angiogenese in einem Tumor-Transplantationsmodell reduzieren (Lamagna et al., 2005).

Auch Nectin wird dem Tight-Junction-Komplex zugeschrieben. Nectin bindet intrazellulär Afadin und Ponsin und ist über  $\alpha$ -Catenin und Vinculin mit Aktinfilamenten assoziiert. Nectin scheint an der Organisation von Tight-Junctions beteiligt zu sein, spezielle Funktionen in Endothelzellen sind bisher jedoch nicht bekannt (Sakisaka und Takai, 2004).

### **Adhäsionsmoleküle außerhalb der Junctions**

Das *Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule* (PECAM)1 ist ein weiteres Mitglied der IgSF. Im konfluenten, ruhenden Zustand von Endothelzellen ist es *in vitro* wie *in vivo* konzentriert an inter-endothelialen Kontaktbereichen zu finden, kolokalisiert aber nicht mit Tight- oder Adherens-Junctions. PECAM1 ist ein homophil adhäsives Transmembranprotein, das intrazellulär mit Signalmolekülen wie Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen sowie  $\beta$ -Catenin interagieren kann (Newman und Newman, 2003). Antikörper gegen PECAM1 können angiogenetische Prozesse *in vitro* und *in vivo* blockieren (DeLisser et al., 1997). PECAM1-Knock-out-Mäuse zeigen dagegen keinen vaskulären Defekt und auch während der Neo-Vaskulogenese oder angiogenetischen Prozessen zeigen PECAM1-Null-Mäuse nur geringe Komplikationen (Duncan et al., 1999).

E-Selektin, ein Vertreter der Zuckerstrukturen-erkennenden Selektinfamilie, wird auf Endothelzellen exprimiert und vermittelt durch seine schwach adhäsiven Eigenschaften das Rollen von Leukozyten auf dem Gefäßendothel während Entzündungsvorgängen (Tedder et al., 1995). E-Selektin vermittelt keine Adhäsion zwischen Endothelzellen, jedoch wirken lösliche Isoformen dieses Moleküls chemotaktisch und können Angiogenese in der Hornhaut des Auges von Ratten induzieren (Kumar et al., 2003).

### **Andere Zell-Zell-Erkennungssysteme**

Während die oben beschriebenen Proteine deutlich adhäsive Eigenschaften besitzen, gibt es zelluläre Erkennungssysteme, die nach Bindung von membranständigen Liganden an die jeweiligen transmembranären Rezeptoren *in trans* Signale in das Zellinnere vermitteln

können, ohne dass zusätzlich die Adhäsivität der Zellen beeinflusst wird. Ein solches Ligand-Rezeptor-Paar, exprimiert auf endothelialen Zellen und lokalisiert an Zellkontakten, stellen u.a. die Ephrine und Eph-Rezeptoren dar. Sie vermitteln Signale in beide Richtungen und regulieren durch extrazelluläre Bindung die Morphogenese von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* (Adams et al., 1999). Ephrin-B1 und -B2 sind an der Aussprossung und der Unterscheidung von Arteriolen und Venolen direkt beteiligt (Adams et al., 1999); Ephrin-A1 wirkt angiogen, Ephrin-B2-Null-Mäuse bzw. Ephrin-B2 und -B3 doppelt-defiziente-Mäuse zeigen einen lethalen Phänotyp mit schweren vaskulären Defekten (Wang et al., 1998).

Ein weiteres Zell-Zell-Erkennungssystem mit nur geringer adhäsiver Wirkung ist die heterophile Bindung von Notch-Rezeptoren an membranständige Liganden, wie Jagged-Proteine. Während der Angiogenese wird Jagged auf Endothelzellen exprimiert und moduliert als möglicher Ligand von Notch-4-Molekülen *in trans* auf der Oberfläche von Endothelzellen die Signalwirkung von bFGF (Uyttendaele et al., 1996; Zimrin et al., 1996). Notch-Rezeptoren sind während der Embryonalentwicklung an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt, mit verschiedenartigen Auswirkungen auf das vaskuläre System (Limbourg et al., 2005).

Endoglin ist eine akzessorische Komponente des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes auf Endothelzellen und auch in Zell-Zell-Kontaktregionen lokalisiert. Die funktionelle Rolle von Endoglin während der vaskulären Entwicklung ist zur Zeit nur wenig verstanden, es gibt aber Berichte hinsichtlich modulierender Eigenschaften auf TGF- $\beta$ -induzierte Signalkaskaden (Lebrin et al., 2005). Mutationen im Endoglin-Gen und Endoglin-Knock-out-Mäuse bzw. ALK-1 (TGF- $\beta$ -Rezeptor-Typ-1)-Knock-outs verursachen einen vaskulären Phänotyp, sog. Telangiektasien vom Typ 1 und 2 mit bleibenden Erweiterungen oberflächlicher Blutgefäße (*hereditary hemorrhagic telangiectasia typ 1*) (Larsson et al., 2001; McAllister et al., 1994).

Auch die interzelluläre Kommunikation über Gap-Junctions ist für die Gefäßformation und –Aufrechterhaltung von Bedeutung. So zeigen z.B. Connexin-37- und Connexin-40-defiziente Mäuse kavernöse Hämangiome und Connexin-43-defiziente Mäuse eine fehlgeleitete Koronararterienformation (Sohl und Willecke, 2004).

<b>Rezeptor / Protein</b>	<b>Null-Phänotyp</b>	<b>Zeitpunkt des Todes</b>
VE-Cadherin	Zusammenbruch des frühen Gefäßsystems, starke Blutungen (Carmeliet et al., 1999)	E9,5
N-Cadherin	Gestörte Entwicklung des Herzens, verändertes Gefäßnetzwerk im Dottersack (Radice et al., 1997)	E10,5

<b>Tabelle 3 (Fortsetzung):</b>		
Claudin-5	Vaskulatur normal, gestörte Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (Nitta et al., 2003)	P1
Occludin	kein Phänotyp bis dato (Saitou et al., 1998)	lebensfähig
PECAM	Keine Störung während der vaskulären Entwicklung, reduzierte Angiogenese während inflammatorischer Prozesse (Duncan et al., 1999; Solowiej et al., 2003)	lebensfähig
$\beta$ -Catenin	Vaskulogenese nicht gestört, aber Veränderungen am Gefäßsystem mit Kavitäten und schweren Blutungen an Verzweigungen (Cattelino et al., 2003)	E11,5
Desmoplakin	Reduzierte Anzahl an Kapillaren (Gallicano et al., 2001)	in utero
<i>Density-enhanced protein</i> (Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase)	Vaskuläres Netzwerk verändert, gesteigerte Proliferation der Endothelzellen und vergrößerte Gefäßlumina (Takahashi et al., 2003)	E11,5
Ephrin-B2	Defekte während der Reorganisation des Gefäßsystems und beim Ausprossern (Wang et al., 1998)	E10,5
Eph-B4	Defekte während vaskulärer Umbauten (Wang et al., 1998)	E10,5
Endoglin	Normale Vaskulogenese, Defekte während Umbauvorgängen und bei der Rekrutierung von glatten Muskelzellen (Arthur et al., 2000)	E10-11
Notch-1	Normale Vaskulogenese, aber Defekte beim Umbauen des primären Gefäßsystems im Dottersack und im Embryo (Limbourg et al., 2005)	E10,5
Jagged-1	Normale Vaskulogenese, aber Defekte beim Umbauen des primären Gefäßsystems im Dottersack und im Embryo (McCright et al., 2001)	E10,5
Connexin-37 / -40 Doppel-Knock-out	Vaskuläre Entwicklung gestört, häufig mit auftretenden kavernösen Hämangiomen (Simon und McWhorter, 2002)	P1 Einzel-Knock-out: lebensfähig
Connexin-43 Endothel-spezifisch	Gestörte Koronargefäßformation (Li et al., 2002)	nach der Geburt

## CEA-Familie

Bisher unerwähnt geblieben sind die auf Endothelzellen exprimierten Mitglieder der Zelladhäsionsmoleküle der *Carcinoembryonalen Antigen* (CEA)-Familie. Diese Protein-Familie, eine Untergruppe der IgSF, besteht aus mehreren transmembranären, GPI-verankerten oder sekretierten Glykoproteinen (Öbrink, 1997). Sie kann weiter aufgeteilt werden in die CEA-ähnlichen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (*CEA-related Cell Adhesion Molecules*, CEACAMs) und die Schwangerschafts-spezifischen Glykoproteine (*Pregnancy-Specific Glycoproteins*,



PSGs), die ausschließlich in Trophoblasten transient exprimiert werden (Zimmermann et al., 1989). Die CEA-Familie expandiert auch noch in der Post-Genom-Sequenzierungs-Ära, da aufgrund der nur geringen Sequenzhomologien der Moleküle sowie der extrem variablen Domänenanordnung als auch dem Fehlen von orthologen Genen im humanen oder Nagersystem die Auffindung von Familienmitgliedern erschwert ist. Zur Zeit lassen sich infolge der Sequenzähnlichkeit der N-terminalen Ig-Domänen, der N-Domänen, 20 Glykoproteine der CEA-Familie zuordnen, CEACAM1 bis CEACAM20 (Zebhauser et al., 2005). Die Expressionsprofile der einzelnen Mitglieder dieser Familie sind sehr heterogen. Während z.B. CEACAM1 in verschiedenen Epithelien diverser Organe oder Leukozyten-Subpopulationen zu detektieren ist, werden andere CEACAMs Gewebe-spezifisch exprimiert (z.B. CEACAM17 nur im Hoden, CEACAM8 nur auf neutrophilen Granulozyten) oder nur kurzzeitig, transient während der Schwangerschaft (z.B. CEACAM9, -10, -15, -16) (Hammarström, 1999; Zebhauser et al., 2005).

Für die GPI-verankerten CEACAM-Gene des humanen Systems (CEACAM5, -6, -7 und -8) sowie für die transmembranären humanen CEACAM3-, und -4-Gene konnten bisher keine orthologen Gene in Nagern gefunden werden. Ferner konnten für die Nager-spezifischen Gene CEACAM9, -10, -11, -12, -13, 14, -15 und -17 keine orthologen Gene im humanen System aufgefunden werden (Zebhauser et al., 2005), und das CEACAM2 der Maus ist allein für diese Spezies spezifisch (Nedellec et al., 1994). Dies zeigt eine hohe genetische Drift innerhalb der CEA-Familie während der Spezies-Evolution an, die bisher aber nicht erklärt werden konnte.

Für die membranständigen Mitglieder der CEA-Familie CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 konnte gezeigt werden, dass sie *in trans* homophil sich selbst oder heterophil an andere CEA-Familienmitglieder binden können und infolgedessen als Adhäsionsmoleküle Zell-Zellverbindung vermitteln können (Kuroki et al., 2001; Lucka et al., 1995; Ocklind und Öbrink, 1982; Williams und Barclay, 1988). Das Epitop für diese Bindungseigenschaft ist in der N-terminalen Ig-Domäne, der N-Domäne, lokalisiert, aber auch andere extrazelluläre Ig-Domänen können die homophile Bindung beeinflussen (Zhou et al., 1993). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der N-Domänen verschiedener CEACAMs werden adhäsive Eigenschaften auch für die anderen Mitglieder der CEA-Familie postuliert, jedoch wurde mit dem CEACAM2 der Maus ein CEACAM ohne adhäsive Bindungseigenschaft beschrieben (Robitaille et al., 1999).

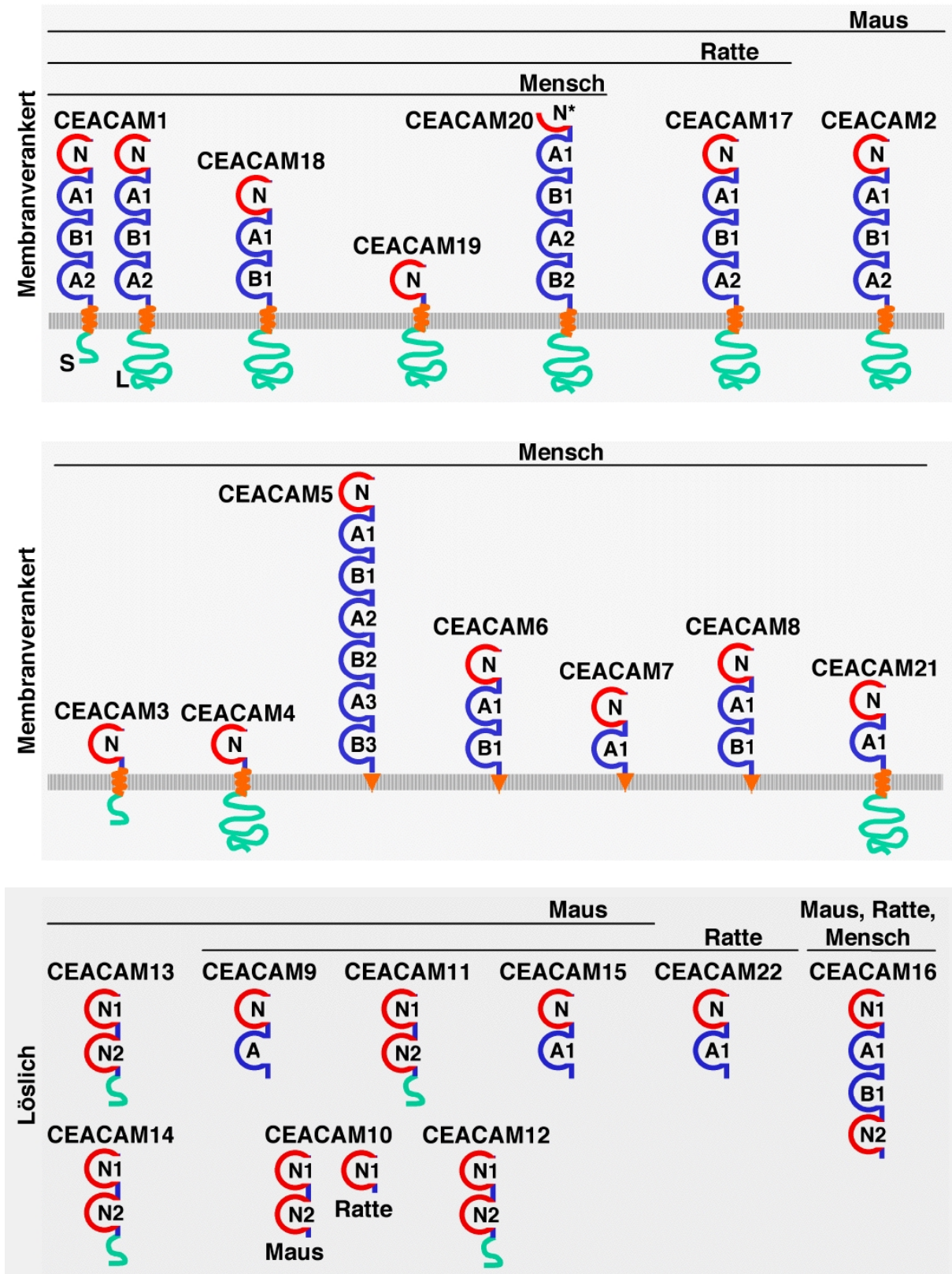


Abb. 6: Schematische Darstellung der Proteine der CEA-Familie in Mensch, Maus und Ratte. N-Do-mänen: Ig-artige Domänen vom V-Typ. A/B-Do-mänen: Ig-artige Domänen vom C1-, oder C2-Typ. Spiralen/Pfeilspitzen: Transmembrandomänen oder GPI-Anker. Schlangenlinien: Zytoplasmatische Domänen, (Verändert nach Zebhauser et al., 2005).

In den Fokus der biomedizinischen Forschung gerieten die CEACAMs, als sich eine veränderte, deregulierte Proteinexpression in humanen Tumoren unterschiedlicher Gewebe abzeichnete (Gold und Freedman, 1965). So wird noch heute die Konzentration von löslichem CEA-Protein im Serum von Patienten mit Kolon- oder Brusttumoren post-operativ beobachtet, um ein Wiederauftreten des Tumors möglichst früh zu detektieren (Thompson et al., 1991). CEA (CEACAM5) ist in diesen Tumoren häufig überexprimiert, während andere CEACAMs weniger exprimiert oder gar nicht mehr exprimiert werden. Auch in anderen Karzinomen, Leukämien oder Melanomen zeigen sich CEACAMs in der Proteinexpression dereguliert (Hammarström, S., 1999). Aufgrund der unterschiedlichen Regulation der Expression einzelner CEACAMs ist eine direkte Beteiligung dieser Proteine an der Entstehung von Tumoren oder der Tumorgenese zur Zeit nicht eindeutig nachweisbar. Einzelne Befunde deuten jedoch darauf hin, dass CEACAMs außer die Zell-Zell-Adhäsion auch das Zellwachstum, die Apoptose, die Zellmigration und Invasion sowie Anoikis-Resistenz und Chemoresistenz beeinflussen können und immunmodulatorisch wirken (Blumenthal et al., 2005; Boulton und Gray-Owen, 2002; Duxbury et al., 2003; Ebrahimnejad et al., 2004; Nittka et al., 2004; Öbrink, 1997; Ordonez et al., 2000; Singer et al., 2005).

Einige Vertreter der CEA-Familie dienen zusätzlich human-pathogenen Bakterien als Rezeptoren zur Anheftung oder auch zur Internalisierung. So können *E. coli* und *Salmonella typhimurium* über Typ-1-Fimbrien komplexe Mannose-Strukturen des Glykananteils von CEACAMs binden (Berger et al., 2004; Leusch et al., 1991). Andere pathogene Bakterien benutzen zur Anheftung an CEACAMs spezifische Oberflächenproteine und binden über Protein-Protein-Wechselwirkungen. *Neisseria spec.* exprimieren hierzu sog. Opa-Proteine auf der Außenhülle, die mit den N-Domänen der CEACAMs interagieren können (Chen et al., 1997). Verschiedene Opa-Varianten zeigen dabei eine geringe Spezifität bezüglich der Interaktion mit CEACAM-Molekülen, während andere Opa-Proteine hoch spezifisch CEACAM5 oder nur CEACAM1 binden (Billker et al., 2000; Virji et al., 1999). Die extrazellulären Domänen der CEACAMs können weiterhin von *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* zur Anheftung und Gewebeinvasion benutzt werden (Hill et al., 2001; Hill und Virji, 2003; Virji et al., 2000). Auch das Maus-pathogene Hepatitis-Virus (MHV) missbraucht CEACAMs zur Anbindung (Dveksler et al., 1993) und Infiltration der Gewebe (Miura et al., 2004). CEACAM1<sup>a</sup>-Knock-out-Mäuse zeigten sich daher nur noch schwach empfänglich gegenüber einer Infektion mit diesen Coronaviren (Blau et al., 2001).

## CEACAM1

Neben CEA wird vor allem CEACAM1 auf humanem Gefäßendothel exprimiert und ist aufgrund des Fehlens GPI-verankerter CEA-Familienmitglieder im Nagersystem der einzige Vertreter auf Ratten-Endothelzellen. CEACAM1 wird exprimiert in Mensch, Maus und Ratte, aber auch in anderen Primaten und Rindern wurden orthologe Gene gefunden (Kammerer et al., 2004; Öbrink, 1991; Zhou et al., 2001). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass CEACAM1 der ancestrale Vertreter der CEA-Familie ist, aus dem sich die weiteren Mitglieder durch Genduplikation und -diversifikation in unterschiedlichen Spezies unabhängig entwickelten (Zimmermann, 1992). Vom CEACAM1 sind mehrere Spleißvarianten bekannt: so gibt es im humanen System 12, in der Ratte 5 und in der Maus noch 4 verschiedene Isoformen, die bereits auf Proteinebene oder zumindest auf mRNA-Ebene detektiert wurden (Öbrink, 1997). Während viele dieser Spleißvarianten unterschiedlich große, lösliche Isoformen (Barnett et al., 1993; Budt et al., 2002b) darstellen, wird CEACAM1 in allen Spezies als transmembranäres Protein vom Typ 1 in zwei Hauptvarianten exprimiert, die sich nur in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Gemäß der seit 1999 geltenden Nomenklatur für CEA-Familienmitglieder (Beauchemin et al., 1999) werden diese CEACAM1-4L (4L = vier extrazelluläre Ig-artige Domänen, Transmembrandomäne plus langer zytoplasmatischer Anteil) und CEACAM1-4S (4S = vier extrazelluläre Ig-artige Domänen, Transmembrandomäne plus kurzer (short) zytoplasmatischer Anteil) genannt. Im Bovinen-, Ratten- und Maussystem ist ferner die Verbreitung zweier CEACAM1-Allele bekannt: *Ceacam1<sup>a</sup>* und *Ceacam1<sup>b</sup>*, die sich in der Sequenz ihrer N-terminalen Domänen voneinander unterscheiden (Edlund et al., 1993; Kammerer et al., 2004). In den meisten Untersuchungen zur Funktionalität oder Struktur des CEACAM1 der Ratte wurde bisher die *Ceacam1<sup>a</sup>*-Variante verwendet, so auch in der vorliegenden Arbeit. Die extrazelluläre N-terminale Domäne zeigt Charakteristika einer variablen, V-ähnlichen Ig-Domäne, während die anderen drei extrazellulären Ig-Domänen (A1-, B1- und A2-Domäne) strukturelle Ähnlichkeit mit konstanten Ig-Domänen vom Typ C2 aufweisen (Tan et al., 2002).

In allen untersuchten Zelltypen und Geweben ist CEACAM1 hochglykosyliert. Im Rattenmodell können bis zu 15 verschiedene N-Glykosylierungsstellen aufgrund von Sequenzdaten potentiell verwendet werden, während eine mögliche O-Glykosylierung bisher nicht beschrieben wurde. Aufgrund dieser posttranslationalen Modifikationen kommt es zu einer deutlichen Zunahme des in der SDS-Gelelektrophorese detektierbaren, scheinbaren Mo-

lekulargewichts von CEACAM1, dass in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes oder Zelltyps zwischen 105 kD und 160 kD (humaner neutrophiler Granulozyt) schwanken kann (Becker, 1989). Zum Vergleich: das theoretische Molekulargewicht des Proteinanteils von CEACAM1-4L der Ratte beträgt lediglich 48 kD. Die Bedeutung dieser starken Glykosylierung von CEACAM1 ist weitgehend unverstanden, jedoch konnte ein Einfluss der Zuckerstrukturen auf die Halblebenszeit des Proteinanteils gezeigt werden (Horstkorte et al., 2001). Auf humanen Granulozyten ist CEACAM1 Träger von High-Mannose-Strukturen (Mahrenholz et al., 1993) und Lewis<sup>X</sup>-Strukturen (Lucka et al., 2005; Stocks und Kerr, 1993), die an Zell-Zellinteraktionen beteiligt sein können. In der Rattenleber ist CEACAM1 weiterhin als deutlich übersialyliert beschrieben worden (Kannicht et al., 1999). Zuckerepitop-spezifisch interagiert das auf dendritischen Zellen exprimierte Lektin DC-SIGN mit Zuckerstrukturen von CEACAM1 (van Gisbergen et al., 2005b, Bogovska et al., 2005) und CEA (van Gisbergen et al., 2005a), und  $\beta$ -glykosidisch verbundene Galaktosestrukturen von CEACAM1 auf neutrophilen Granulozyten werden spezifisch von Galectin-3 Zuckerstruktur-abhängig erkannt (Feuk-Lagerstedt et al., 1999).

Für die homophile Bindung von CEACAM1-Molekülen *in trans* sind die Zuckerstrukturen jedoch nicht erforderlich, die adhäsive Interaktion wird allein vom Proteinanteil der N-terminalen Ig-Domäne vermittelt (Teixeira et al., 1994; Watt et al., 2001). Das Bindungsepitop konnte dabei auf das GFCC'C''-Oberflächenareal eingeschränkt werden (Tan et al., 2002).

Im adulten Organismus ist CEACAM1 auf verschiedenen Epithelien unterschiedlicher Organe (z.B. Gastrointestinaltrakt, Niere, Cervix, Endometrium, Prostata, Brust- und Schweißdrüsen, Leber, Blase und Mundhöhle) exprimiert (Becker et al., 1989; Godfraind et al., 1995; Odin et al., 1988; Prall et al., 1996). Die subzelluläre Lokalisation beschränkt sich dabei in einfachen Epithelien hauptsächlich auf die apikale Oberfläche, und analog dazu auf die Gallencanaliculi der adulten Leber. Vereinzelt wurden auch schwache laterale und basale immun-histochemische CEACAM1-Lokalisationen beschrieben. Aber auch auf Zellen der myeloischen Reihe wird CEACAM1 exprimiert: in B- und T-Zellen wird die CEACAM1-Expression nach Aktivierung der Zellen induziert (Greicius et al., 2003; Kammerer et al., 1998) bzw. hochreguliert, in neutrophilen Granulozyten ist CEACAM1 in Granula gespeichert und wird nach Aktivierung der Zellen durch Degranulierung auf die Oberfläche gebracht (Kuroki et al., 1995; Singer et al., 2002). Auch dendritische Zellen (Kammerer et al., 2001) und NK-Zell-Subtypen wurden als CEACAM1-positiv beschrieben (Moller et al., 1996). Zusätzlich wird CEACAM1 auf Gefäßendothel verschiedener Organe gefunden (siehe unten). In den meisten

Organen sind die kurze und lange Isoform von CEACAM1 koexprimiert, wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander. Üblicherweise dominiert die Expression der kurzen Isoform deutlich gegenüber der langen Isoform, jedoch konnte in Milz, Thymus und im Knochenmark von Mäusen eine Dominanz der langen Isoform auf RNA-Ebene gezeigt werden (Zebhauser et al., 2005).

### Signaltransduktion von CEACAM1

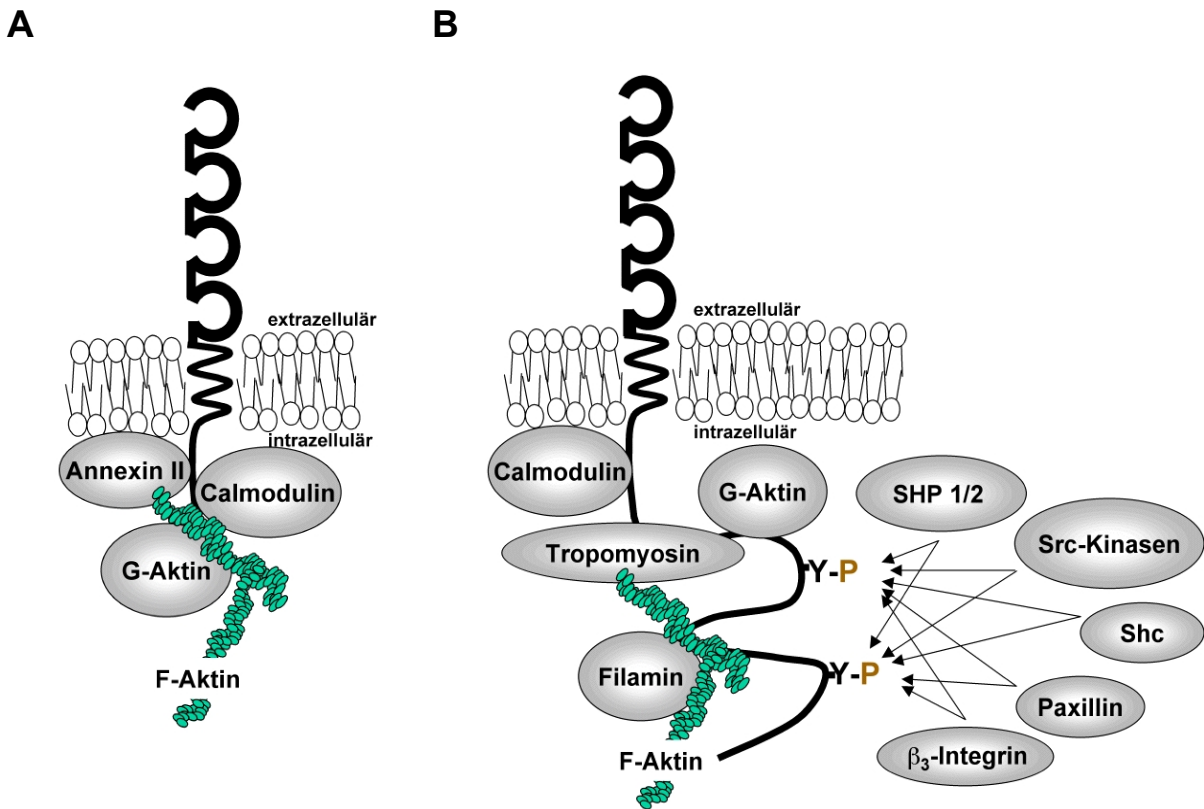
Die Funktion von Zell-Adhäsionsmolekülen ist nicht allein auf adhäsive Eigenschaften beschränkt, vielmehr vermitteln sie als Rezeptoren extrazelluläre Signale in das Zellinnere, wodurch sie aktiv das Schicksal von Zellen und deren Funktion mitbestimmen können. Im Unterschied zu vielen Wachstumsfaktor-Rezeptoren fehlt Adhäsionsrezeptoren aber zumeist eine intrinsische Enzymaktivität. Die Signalweiterleitung durch Adhäsionsrezeptoren kann daher nur durch koordinierte Rekrutierung intrazellulärer Liganden erfolgen. Konformationsänderungen oder Clustereffekte nach extrazellulärer Bindung der Liganden führen zu Änderungen in der Zugänglichkeit einzelner Aminosäuren in den zytoplasmatischen Domänen, die Voraussetzung für koordinierte Interaktionen sind. Aber auch induzierte, reversible kovalente Modifikationen von Aminosäuren des Proteingerüsts können Signale über die Membran übermitteln. Die am besten untersuchte Art der Modifikation ist dabei die reversible Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten, aber auch andere Modifikationen, wie Sumoylierung (Johnson, 2004), Mono-Ubiquitinylierung (Sigismund et al., 2004) und Modifizierung von freien OH-Gruppen mit N-Acetyl-Glukosamin (Wells et al., 2001) analog zur Phosphorylierung, sind zur Zeit stark bearbeitete Forschungsgebiete der Signalweiterleitung.

CEACAM1-short und -long besitzen in der zytoplasmatischen Domäne mehrere phosphorylierbare Aminosäurereste, von denen aber bislang

nur wenige tatsächlich als phosphoryliert beschrieben wurden. Die kurze CEACAM1-Isoform besitzt mit Serin-457 und Threonin-459 des humanen Systems zwei Aminosäuren, die durch die *Proteinkinase C* (PKC) phosphoryliert werden. Im Rattensystem steht jedoch nur noch ein phosphorylierbarer Rest, das Serin-457 zur Verfügung, da Threonin-459 in ein Glycin mutiert ist. Diese Aminosäuren kontrollieren die Interaktion von CEACAM1-short mit Annexin-II (Kirshner et al., 2003b) und tragen zur Morphogenese von MCF-7-Brustkrebszellen bei, die in 3-dimensionalen Kulturen einen CEACAM1-short-abhängig

differenzierten Phänotyp mit Lumenausbildung durch Regulation apoptotischer Prozesse zeigen (Kirshner et al., 2003a). Das membranproximale Serin-449 wurde sowohl in der langen als auch in der kurzen Isoform PKC-vermittelt phosphoryliert gefunden (Edlund et al., 1998); funktionelle Studien fehlen hierzu aber bisher. Die lange Isoform kann zusätzlich zu Threonin- und Serinresten auch an Tyrosinen phosphoryliert werden (Skubitz et al., 1992; Skubitz et al., 1993). Eine regulatorische Funktion auf die Tyrosinphosphorylierung der langen Isoform besitzt dabei das Serin-503, dessen Phosphorylierbarkeit für die Tyr-488-Phosphorylierung essentiell ist und dadurch auch für die Tyrosin-abhängige CEACAM1-long-vermittelte Wachstumsinhibierung verschiedener Zelltypen, Tumorsuppression und Insulinrezeptor-Internalisierung verantwortlich ist (Estrera et al., 2001; Fournes et al., 2001; Poy et al., 2002). Entscheidend für die Tumor-supprimierende Wirkung sind jedoch die Tyrosinreste Tyr-488 und Tyr-515 (Tyr-513 in der Ratte) (Izzi et al., 1999). Diese liegen innerhalb einer konservierten Aminosäureabfolge, die als ITIM (*Immunreceptor-Tyrosine-based Inhibition Motif*)-Sequenz bekannt ist, wobei das distal gelegene Tyr-513 diese Sequenz-Voraussetzung nur bedingt erfüllt. Zusammen bilden beide Tyrosinreste ein imperfektes ITAM (*Immunreceptor-Tyrosine-based Activation Motif*), bzw. ein sog. ITSM (*Immunreceptor-tyrosine-based Switch-Motif*) (Isakov, 1997; Shlapatska et al., 2001). Nach Phosphorylierung der Tyrosinreste durch Kinasen der src-Familie (Brümmer et al., 1995), aber auch durch Rezeptortyrosinkinasen, wie dem EGF-Rezeptor (Abou-Rjaily et al., 2004) oder dem Insulinrezeptor (Najjar et al., 1997), bilden diese Bindungsstellen für weitere Proteine, die speziell phosphorylierte Tyrosine erkennen. Phospho-Tyrosin-abhängig binden die Tyrosinkinasen der src-Familie c-src, Lyn und Hck, aber auch die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 sowie die Adaptormoleküle Shc und Paxillin oder auch die  $\beta$ 3-Untereinheit der Integrine an die lange zytoplasmatische Domäne des CEACAM1 (Brümmer et al., 1995; Ebrahimnejad et al., 2000; Huber et al., 1999; Poy et al., 2002; Skubitz et al., 1995; Brümmer et al., 2001). Die Phosphorylierbarkeit von Tyr-488 ist weiterhin für die CEACAM1-long-vermittelte verstärkte Zellmigration von Melanozyten und Melanomzellen unabdingbar (Ebrahimnejad et al., 2004). Die Interaktion von SHP-1 und tyrosinphosphoryliertem CEACAM1 ist ferner während der anti-CEACAM1-Antikörper-vermittelten Verzögerung der spontanen Apoptose von Granulozyten in Zellkultur beobachtet worden (Singer et al., 2005). Antikörper-induzierte Stimulation von CEACAM1 auf der Oberfläche von Granulozyten beeinflusste ferner die Integrin-abhängigen Zellfunktionen wie Zell-Matrix-Adhäsion, Leukozyten-Endothel-Interaktion oder Leukozyten-Migration (Nair und Zingde, 2001; Ruchaud-Sparagano et al., 1997; Skubitz et al., 2000).

Beide Isoformen können ferner an globuläres Aktin binden (Schumann et al., 2001). Auch eine direkte oder indirekte Interaktion (Da Silva-Azevedo und Reutter, 1999; Sadekova et al., 2000) mit Aktinfilamenten, vermittelt durch Tropomyosin (Schumann et al., 2001) oder Filamin (Klaile et al., 2005) ist für beide Isoformen beschrieben worden.



**Abb. 7: Schematische Darstellung bekannter intrazellulärer Bindungspartner von (A) CEACAM1-short und (B) CEACAM1-long.** Y-P = Tyrosinphosphorylierung an ITIM-Konsensussequenzen der langen zytoplasmatischen Domäne. Die Pfeile zeigen eine phospho-Tyrosin-abhängige Bindung an. (Für Abkürzungen: siehe Text).

Auch eine Interaktion mit Calmodulin ist sowohl für CEACAM1-short, als auch CEACAM1-long im membranproximalen Bereich gezeigt worden (Edlund und Öbrink, 1993). Diese Interaktion bewirkte in *in vitro*-Bindungsversuchen eine verringerte Assoziation von CEACAM1-Molekülen (Edlund et al., 1996). Es ist jedoch nicht gesichert, ob dies durch Reduktion der homophilen Bindung *in trans* oder durch Inhibierung einer möglichen Dimerisierung von CEACAM1-Molekülen *in cis* erzielt wurde. Eine Veränderung der homophilen Bindungseigenschaft konnte außerdem nach proteolytischer Abspaltung der zytoplasmatischen Domäne durch Caspase-3 nach Induktion der Apoptose gezeigt werden (Houde et al., 2003).



## **CEACAM1 auf dem Gefäßendothel**

CEACAM1 wird auf dem Gefäßendothel verschiedener Organe und Gewebe gefunden. Bereits 1989 zeigten Becker et al. die CEACAM1-Expression (damals noch gp110 genannt) in Ratten-Endothelzellen von Venen, Arterien und Kapillaren adulter Tiere auf Proteinebene (Becker et al., 1989). Die stärkste Immunreaktivität wurde damals im Kapillarendothel der Lunge und dem peritubulären Kapillarendothel der Nierenrinde beobachtet, aber auch das Endothel von Pankreas, der Samendrüsen, der Milz und des Gastrointestinaltraktes waren deutlich positiv. Sawa et al. konnten zeigen, dass CEACAM1 auch auf Gefäßendothel des sich entwickelnden zentralen Nervensystems gefunden wird (Sawa et al., 1994). Dabei zeigte sich nicht nur eine streng apikale Lokalisation von CEACAM1, sondern zusätzlich eine Akkumulation an Kontaktstellen zu Perizyten. Auch in der Maus wurde eine Expression von CEACAM1 auf Gefäßendothel gefunden (Godfraind et al., 1995). Im humanen System konnte neben der Expression von CEACAM5 (CEA) ebenfalls die Expression von CEACAM1 auf Gefäßen der Plazenta und Granulomgewebe sowie in Kapillarendothel vieler Tumoren detektiert werden (Bamberger et al., 2000; Ergün et al., 2000; Prall et al., 1996). Auch auf Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen wurde CEACAM1 exprimiert, wenn diese zusammen mit Tumorzellen in Nacktmäuse transplantiert wurden (Gehling et al., 2000). Humane Endothelzellen zeigten eine verstärkte Expression von CEACAM1 nach VEGF-Stimulation (Ergün et al., 2000) und im Tiermodell nach Hypoxie-induziertem Gefäßwachstum (Chen et al., 2005).

Diese Befunde der exklusiven Expression von CEACAM1 in sich regenerierenden oder sich entwickelnden Geweben sowie die Expression auf Gefäßendothel von Tumoren ließen eine mögliche aktive Beteiligung von CEACAM1 bei der Angiogenese vermuten. Tatsächlich zeigte lösliches rekombinantes oder gereinigtes CEACAM1 angiogenetische Wirkungen in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen. In HDMECs (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*) hemmte es außerdem die Proliferation, verstärkte die chemotaktische Zellwanderung und förderte die Lumenformation in Kollagen-1-Gelen (Ergün et al., 2000). Diese stimulatorische Wirkung war additiv zu VEGF-induzierten Effekten und blockierbar durch anti-CEACAM1-Antikörper. Da anti-CEACAM1-Antikörper zusätzlich VEGF-induzierte, morphogenetische Veränderungen in Kollagengelen blockierten, wurde CEACAM1 als Effektor-Protein von VEGF vorgeschlagen (Ergün et al., 2000). Kürzlich zeigte die Gruppe um S. Ergün, dass Überexpression von CEACAM1 in HDMECs die Expression von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren erhöhen kann (Kilic et al., 2005). Über die molekulare Funktion und der

Signaltransduktion transmembranärer CEACAM1-Isoformen, exprimiert auf Endothelzellen, ist dagegen bis her nichts bekannt.