



Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Funktion

-

Influence of CEACAM1 on endothelial function

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Vorgelegt von

Florian Kleefeldt

aus

Bad Mergentheim

Würzburg 2019

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r:

1. Betreuer: Prof. Dr. Süleyman Ergün

2. Betreuer: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

3. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Frantz

4. Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Gefäßsystem	1
1.2	Arteriosklerose	2
1.2.1	Definition und klinische Bedeutung	2
1.2.2	Initiation – Endotheliale Dysfunktion	3
1.2.3	Progression der endothelialen Barrierschädigung – Schaumzellbildung	7
1.3	Mausmodelle der Atherosklerose	9
1.4	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	10
1.4.1	Struktur	10
1.4.2	Biologische Bedeutung von CEACAM1	12
1.5	Zielsetzungen der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Tiermodelle	15
2.1.1	C57BL/6 und 129/SvImJ	15
2.1.2	<i>Cc1^{-/-}</i> , <i>Cc1^{endo+}</i> und <i>Cc1^{-/-ER}</i>	15
2.1.3	<i>ApoE^{-/-}</i> und <i>Ldlr^{-/-}</i>	15
2.1.4	Haltung und Diäten	16
2.2	Antikörper	16
2.3	Reagenzien	17
2.4	Lösungen	19
2.5	Zellkultur	20
2.5.1	Endothelzellen	20
2.5.2	Monozyten	20
2.6	Gewebeaufbereitung für Histologie	21
2.7	Immunfluoreszenz	22

2.8	Histologische Färbungen	24
2.8.1	Kernechtrotfärbung	24
2.8.2	Oil Red O-Färbung	25
2.9	Real-time Polymerasekettenreaktion	25
2.10	Co-Immunpräzipitation	28
2.11	Western Blot	30
2.12	Palmitoylierungsassay	33
2.13	Adhäsionsassay	33
2.14	Permeabilitätsassays	34
2.14.1	Evans Blue für <i>in situ</i> Permeabilitätsmessung	34
2.14.2	Fluoreszenzmarkiertes Dextran und Monozytenmigration	36
2.14.3	Transendotheliale elektrische Impendanzmessung	37
2.15	Statistische Analysen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	CEACAM1-Expression in murinen Arteriosklerosemodellen	38
3.2	Morphologische Charakterisierung von Wildtyp und <i>Cc1^{-/-}</i> Endothelzellen	39
3.3	Einfluss von CEACAM1 auf die sub-zelluläre eNOS Lokalisation	40
3.4	Einfluss von CEACAM1 auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion	42
3.5	Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere	44
3.5.1	Einfluss von CEACAM1 auf die basale endotheliale Permeabilität <i>in vitro</i>	44
3.5.2	Evans Blue zur quantitativen Bestimmung der endothelialen Barrierestörung <i>in situ</i>	44
3.5.3	Permeabilitätsmessungen an Aortenringen aus WT und <i>Cc1^{-/-}</i> Mäusen	47
3.5.4	Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere im Alter	47
3.5.5	Einfluss von CEACAM1 auf die altersbedingte vaskuläre TNF- α Expression	47
3.5.6	Modulation der TNF- α -induzierten Barrieredysfunktion durch CEACAM1	49
3.6	Einfluss von CEACAM1 auf die Stabilität von Adherens Junctions	49

3.6.1	Expression und Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1	50
3.6.2	TNF- α -induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Adherens Junction Proteinen	50
4	Diskussion	53
4.1	CEACAM1 stabilisiert Morphologie und Integrität des Endothels – „Notfallhelfer“ bei endotheliale Stress?	53
4.2	CEACAM1 unterstützt die membranäre Lokalisation von eNOS über direkte und indirekte Mechanismen	54
4.3	CEACAM1 reduziert LEI – Einfluss auf Expression und Zugänglichkeit endothelialer Adhäsionsmoleküle	56
4.4	CEACAM1 beeinflusst die endotheliale Barriere – altersspezifische Effekte durch cross-talk mit TNF- α	57
4.5	CEACAM1 moduliert die Integrität von Adherens Junctions – Adapterprotein für Src-Kinase	59
5	Zusammenfassung	63
6	Summary	65
7	Literaturverzeichnis	68
8	Abbildungsverzeichnis	89
9	Eidesstattliche Erklärung	91
10	Veröffentlichungen	92
11	Lebenslauf	93
12	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Das Gefäßsystem

Das Gefäßsystem des Menschen gliedert sich in den arteriellen Abschnitt, das Kapillarsystem und den venösen Abschnitt. Die Wand der Kapillaren wird durch eine einlagige luminale Endothelzellschicht und Perizyten gebildet, welche die endotheliale Schicht von außen ummanteln (Attwell et al. 2016; Khennouf et al. 2018). Dagegen besteht die Gefäßwand von Arterien und Venen aus drei Schichten (Abb.1). Vom Gefäßlumen aus betrachtet sind dies die Tunica intima (Intima), die Tunica media (Media) und die Tunica externa (Adventitia) (Dashty et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017). Dieser dreischichtige Aufbau ist bei Arterien vom muskulären Typ am deutlichsten ausgeprägt, wohingegen bei Arterien vom elastischen Typ und Venen diese Schichten zum Teil nicht klar gegeneinander abgrenzbar sind (Shirwany und Zou 2010; Zhang et al. 2013).

Die innerste Zellschicht der Intima wird von Endothelzellen gebildet, welche die innere Gefäßoberfläche auskleiden und in direktem Kontakt zum Blut stehen (Martinez-Quinones et al. 2018). Die Endothelzellen sitzen ihrerseits der Basalmembran auf, an die sich das Stratum sub-endotheliale anschließt, welches unter anderem glatte Muskelzellen beinhaltet und durch die Membrana elastica interna zur Media hin

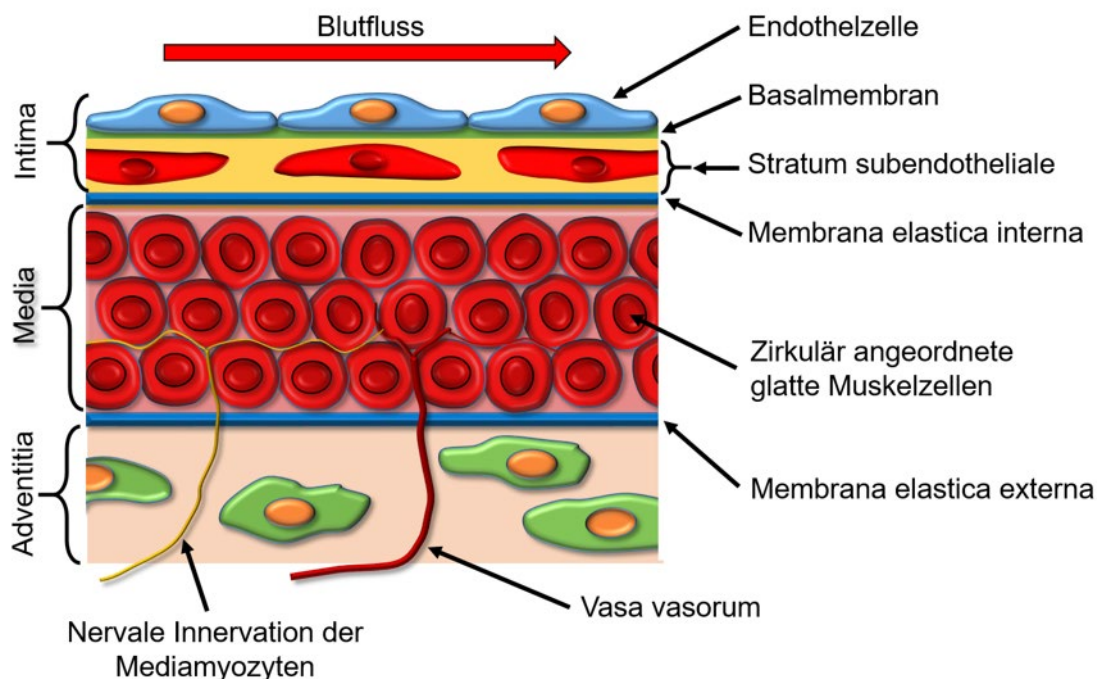


Abb.1: Schematische Darstellung des Gefäßwandbaus.

(Abbildung modifiziert nach Drenckhahn et al. (2004), Schünke et al. (2014) und Waschke et al. (2015))

abgegrenzt wird (Burke et al. 2002; Wagenseil und Mecham 2009; Seidelmann et al. 2014; Orekhov et al. 2014).

Zirkulär angeordnete glatte Muskelzellen bilden den Hauptbestandteil der Media. Daneben finden sich elastische Fasern und Kollagenfasern, sowie Proteoglykane (Ross 1979; Wagenseil und Mecham 2009). Großkalibrige arterielle Gefäße können eine Membrana elastica externa aufweisen, welche die Media von der Adventitia abgrenzt (Dashty et al. 2012).

Die Adventitia bildet die äußerste Schicht der Gefäßwand und integriert das Gefäß in das umliegende Gewebe. Innerhalb dieser bindegewebigen Schicht verlaufen vegetative Nerven, welche die äußersten Zellschichten von glatten Muskelzellen der Media innervieren, sowie Blutgefäße, sogenannte Vasa vasorum, welche zur Blutversorgung der Gefäßwand beitragen (Wagenseil und Mecham 2009; Seidelmann et al. 2014). Zudem befinden sich in der Adventitia verschiedene Stamm- und Progenitorzellen (Zengin et al. 2006; Klein et al. 2011; Worsdorfer et al. 2017).

Ein wesentlicher Teil der kardiovaskulären Erkrankungen geht primär von einer vaskulären Pathologie hervor und die Arteriosklerose macht dabei den bei weitem größten Anteil der Gefäßerkrankungen aus.

1.2 Arteriosklerose

1.2.1 Definition und klinische Bedeutung

Arteriosklerose (von altgriechisch ἀρτηρία artería „Ader“ und σκληρός sklerós „hart“) bezeichnet eine „chronisch progrediente Systemerkrankung des arteriellen Gefäßabschnittes multifaktorieller Genese“ (Fishbein und Fishbein 2009). Die WHO definiert die Arteriosklerose als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (WHO 1958). Hierbei kommt es zu einer zunehmenden Verdickung der Blutgefäßwand durch Einlagerung von Cholesterin, Fettsäuren sowie Calciumphosphat bei gleichzeitiger Zunahme des Kollagengehalts verbunden mit einem konsekutivem Elastizitätsverlust (Tabas et al. 2015; Gisterå und Hansson 2017).

Bei der Arteriosklerose können drei Formen unterschieden werden: Atherosklerose, Mückeberg-Mediasklerose und Arteriolsklerose (Fishbein und Fishbein 2009). Die Atherosklerose als klinisch bedeutendste Form betrifft primär die Intima der mittleren

und großen Arterien und kann in der Folge auf die Media übergreifen. Die Mückeberg-Mediasklerose stellt eine mediabetonte, nicht stenosierende Gefäßpathologie durch spangenförmige Degenerationsverkalkungen dar (Lanzer et al. 2014). Die Arteriosklerose manifestiert sich im Gegensatz zur Atherosklerose nicht an den großkalibrigen Arterien, sondern an den deutlich kleineren Arteriolen.

Durch Arteriosklerose verursachte Folgeerkrankungen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Schlaganfall und Herzinfarkt stellen die häufigsten Todesursachen weltweit dar (Weber und Noels 2011; Libby et al. 2011; Tabas et al. 2015; Gisterå und Hansson 2017). Auslöser dieser Folgeerkrankungen ist die Ruptur der Deckplatte arteriosklerotischer Plaques. Die dadurch induzierte Thrombusbildung kann einen lokalen Gefäßverschluss oder eine Okklusion im nachgeschalteten Gefäßbett verursachen. Aufgrund der Minderperfusion kommt es zu einem akuten Sauerstoffmangel im abhängigen Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes mit konsekutivem Funktionsverlust.

Zur Entstehung der Arteriosklerose wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Die „response to injury“-Hypothese liefert eine hinreichende Erklärung der pathologischen Vorgänge während der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen. Sie wurde 1856 von Rudolf Virchow (1821-1902) vorgeschlagen und fortlaufend dem aktuellen Kenntnisstand der Medizin angepasst (Ross 1986; Eckardstein 2005). Aufgrund ihrer allgemeinen Akzeptanz soll die „response to injury“-Hypothese im Folgenden genauer vorgestellt werden.

1.2.2 Initiation – Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist für die physiologische Gefäßfunktion von entscheidender Bedeutung. Neben der essentiellen Barrierefunktion zwischen dem vorbeifließenden Blut und dem Rest der Gefäßwand sowie den umgebenden Geweben ist es unter anderem durch Steuerung der Vasomotorik an der Regulation des Blutdruckes beteiligt. Es reguliert zudem die Adhäsivität der Gefäßwand gegenüber im Blut zirkulierenden Immunzellen und erfüllt eine Barrierefunktion für die Transmigration dieser Zellen durch die Gefäßwand. Beeinträchtigungen dieser Funktionen fasst man als endotheliale Dysfunktion zusammen (Gimbrone und García-Cardena 2016; Storch et al. 2017). In den letzten Jahren rückte die endotheliale Dysfunktion immer stärker in den Fokus der kardiovaskulären Forschung, da gezeigt werden konnte, dass die Integrität des Endothels bereits Jahre vor Auftreten arteriosklerotischer Läsionen beeinträchtigt ist

(Sitia et al. 2010; Higashi et al. 2012; Tabas et al. 2015). Außerdem belegten klinische Studien, dass die endotheliale Dysfunktion einen unabhängigen Prädiktor für Auftreten und „Outcome“ kardiovaskulärer Ereignisse darstellt (Schachinger et al. 2000; Suwaidi et al. 2000; Perticone et al. 2001; Halcox et al. 2002; Gokce et al. 2002; Heitzer et al. 2005; Gutierrez et al. 2013).

Die „response to injury“-Hypothese besagt, dass durch mechanische Einflüsse bzw. Risikofaktoren im Bereich des Endothels Schädigungen auftreten. An diesen Stellen kommt es zur Aggregation von Thrombozyten mit Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Weber und Noels 2011). Diese Mediatoren kreieren ein pro-inflammatorisches Milieu, welches die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten stimuliert (Mestas und Ley 2008) und die endotheliale Funktion beeinträchtigt. Ein Zytokin, das nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielt, ist Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Bränen et al. 2004).

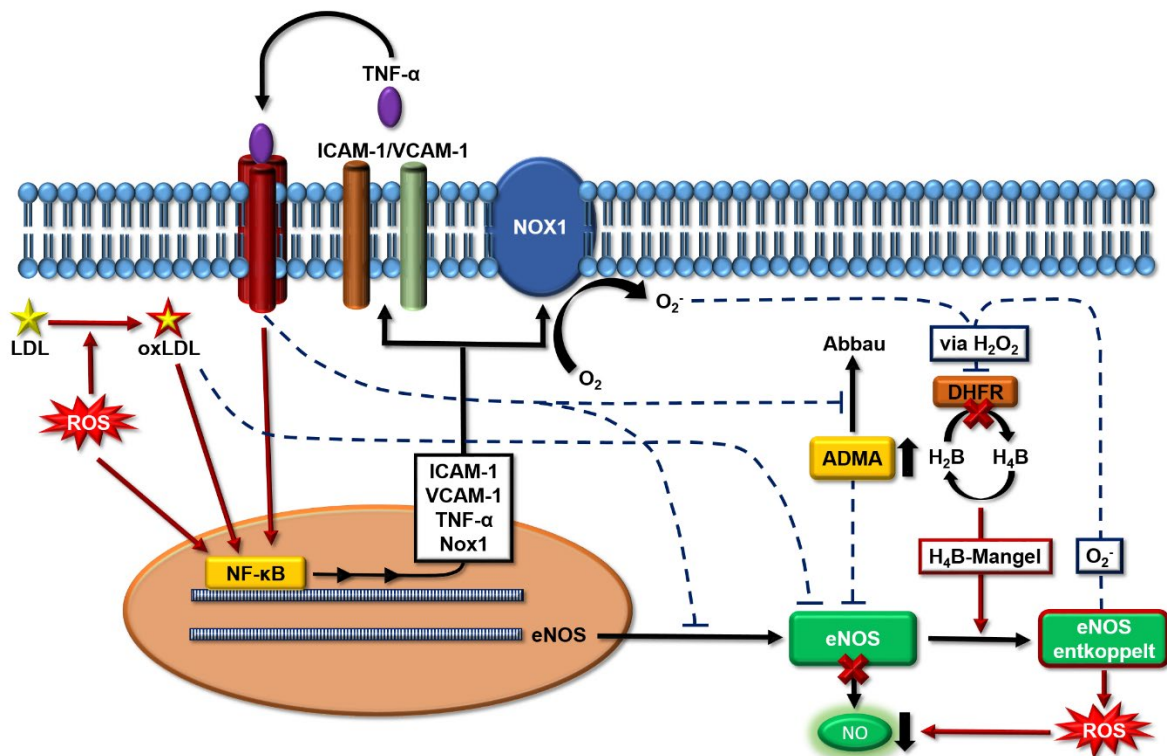


Abb.2: Molekulare Mechanismen der endothelialen Dysfunktion.

(Abbildung modifiziert nach Chalupsky und Cai (2005) und Steyers und Miller (2014))

Klassischerweise wird die endotheliale Dysfunktion über eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) definiert (Sitia et al. 2010; Liao 2013; Ganz und Hsue 2013). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) stellt einen Schlüsselfaktor in der Produktion von NO im Endothel dar. Ihre Aktivität wird vom Phosphorylierungsstatus (Ser¹¹⁷⁷) und der sub-zellulären Lokalisation bestimmt (Dimmeler et al. 1999; Dimmeler et al. 2000; Zhang et al. 2006; Liu et al. 2014). Stickstoffmonoxid wirkt vasodilatatorisch und damit blutdrucksenkend. Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen und der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle sind weitere anti-arteriosklerotische Effekte von NO (Sena et al. 2013).

Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit kann einerseits auf einer verminderten Expression und damit Aktivität von eNOS beruhen, andererseits durch beschleunigte Inaktivierung von NO verursacht sein. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α hemmt die Expression von eNOS und induziert NADPH-Oxidasen, die reaktive Sauerstoffspezies bilden, welche wiederum NO inaktivieren (Neumann et al. 2004; Wautier und Schmidt 2004; Ray und Shah 2005; Li et al. 2006; Dikalova et al. 2010; Kleinbongard et al. 2010). Dadurch vermindert TNF- α die anti-arteriosklerotische Wirksamkeit von NO (siehe Abb.2).

TNF- α beeinträchtigt auch die anti-adhäsiven Eigenschaften des Endothels. Direkt oder durch Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit induziert TNF- α die Expression und Präsentation von Selektinen (u.a. E- und P-Selektin) und Adhäsionsmolekülen wie dem intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und dem vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) auf der Oberfläche von Endothelzellen (Abb.2). P-Selektin interagiert mit PSGL-1 von Monozyten. Hierdurch kommt es zum sogenannten „Rollen“ der Monozyten auf dem Endothel. Durch Bindung monozytärer Integrine an endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 erfolgt dann eine festere Adhäsion der Monozyten an das Endothel und ermöglicht nachfolgend eine trans- oder parazelluläre Transmigration der Monozyten in die Intima (Ley et al. 2007; Gerhardt und Ley 2015; Shihata et al. 2016).

Das Einwandern von Monozyten in die Intima erfordert die Überwindung der endothelialen Barriere. Diese Barriere gewährleistet die Trennung von Blut und Gewebe und dient unter anderem dem geregelten Stoffaustausch (Chistiakov et al. 2015). Zu diesem Zweck bilden benachbarte Endothelzellen Adhäsionskontakte aus – Tight und Adherens Junctions (siehe Abb.3).

Tight Junctions bestehen aus Claudinen und Occludin, die über Tight Junction-Proteine (TJPs) mit dem Aktinzytoskelett der Zelle gekoppelt sind. Endotheliale Adherens Junctions bestehen aus VE-Cadherin, welches zwei benachbarte Endothelzellen verbindet und über Catenine (α -, β -, γ -, p120-Catenin) und Aktinbindende Proteine (α -Actinin, Vinculin) ebenfalls an das Aktinzytoskelett gebunden ist. Für die endotheliale Barrierefunktion scheint insbesondere die Integrität von Adherens Junctions von Bedeutung zu sein (Dejana et al. 2008; Giannotta et al. 2013). Unter physiologischen Bedingungen kann die Stabilität von Adherens Junction-Kontakten dynamisch über Tyrosin-Phosphorylierung der beteiligten Proteine reguliert werden (Bertocchi et al. 2012; Adam 2015).

Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion wird die endotheliale Barriere auch durch pro-inflammatorische Zytokine beeinträchtigt (Chistiakov et al. 2015). So führt TNF α ebenfalls über eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin zu einer gesteigerten endothelialen Permeabilität (Angelini et al. 2006; Dejana et al. 2008), welche als ein initialer Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose angesehen wird (Ichiki et al. 2013; Roth Flach et al. 2015; Gimbrone und García-Cardeña 2016).

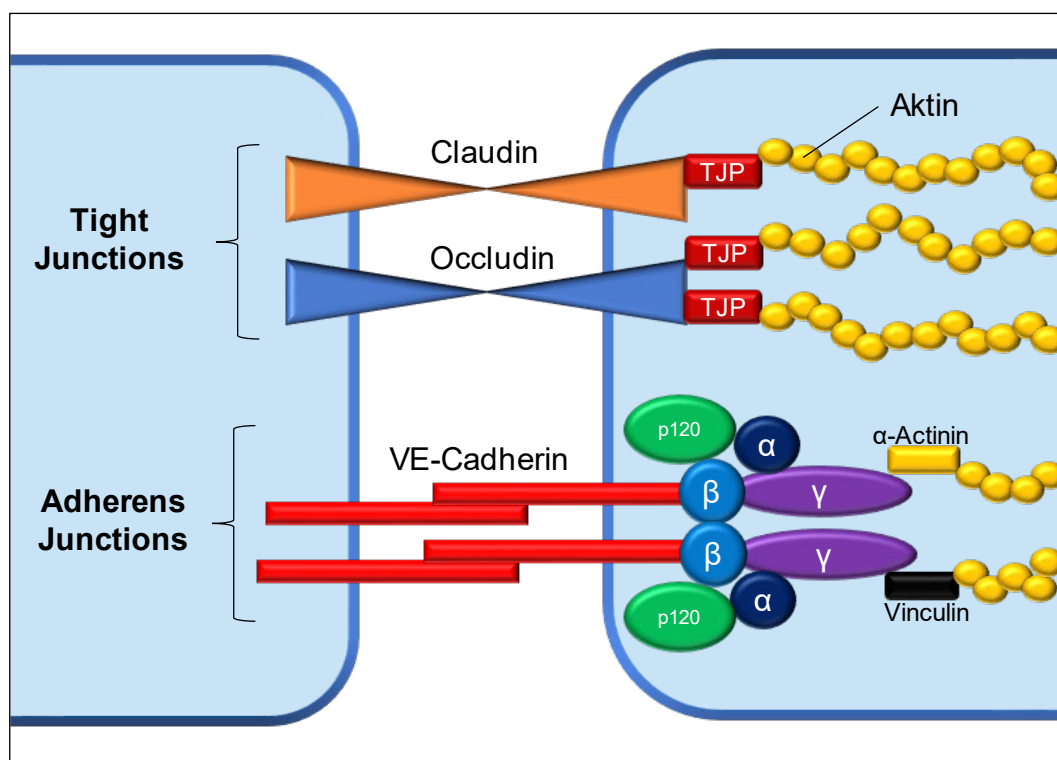


Abb.3: Schematische Darstellung von Tight Junctions und Adherens Junctions zwischen Endothelzellen.

1.2.3 Progression der endothelialen Barrierschädigung – Schaumzellbildung

Die endotheliale Dysfunktion mit erhöhter Adhäsivität gegenüber Immunzellen und gesteigerter Permeabilität ist die Grundlage für weitere pro-arteriosklerotische Veränderungen in der Gefäßwand. Die erhöhte Durchlässigkeit des Endothels und eine vermehrte Expression Lipoprotein-bindender Moleküle führt zu einer Anreicherung von Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine in der Intima von Arterien (Abb.4A; Tabas et al. 2007; Moore und Tabas 2011). Dadurch wird ein chronischer Entzündungsprozess initiiert, der über eine weiter gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1, ICAM-1), sowie Chemokinen (z.B. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) die Einwanderung von dem Knochenmark entstammenden Monozyten in die Tunica intima begünstigt.

Unter dem Einfluss von M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) differenzieren diese zu Makrophagen (Moore und Tabas 2011; Weber und Noels 2011; Bentzon et al. 2014). Der Entzündungsprozess fördert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die die infiltrierten Lipoproteine oxidativ modifizieren. Makrophagen nehmen dieses oxidierte LDL (low density lipoprotein) über Scavenger receptor A und CD36 dysreguliert auf und werden dadurch zu sogenannten Schaumzellen (Abb.4B; Kunjathoor et al. 2002). Morphologisch zeigen sich die Läsionen in diesem Stadium als sogenannte „fatty streaks“, die makroskopisch als streifenförmige, gelbliche Fettakkumulationen im sub-endothelialen Bereich der Intima imponieren.

Die dysregulierte Aufnahme modifizierter Lipoproteine führt schließlich zum Untergang von Schaumzellen. Es entsteht ein extrazellulärer nekrotischer Kern (necrotic core) in der Intima (Abb.4C). Zudem wandern modifizierte glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima, die zu einer vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix zwischen Endothel und nekrotischem Kern beitragen. Es entsteht eine fibröse Kappe (Abb.4C). Eine Stenosierung des Gefäßlumens durch den in der Intima befindlichen Plaque erfolgt in der Regel erst, wenn der Plaque mehr als 40% der Intima einnimmt (Glagov et al. 1987; Arastéh 2013). Die instabile Deckplatte der Plaques kann rupturieren und der sich bildende Thrombus direkt lokal oder in nachgeschalteten Gefäßbetten zu einem Verschluss des Gefäßes führen (Abb.4D).

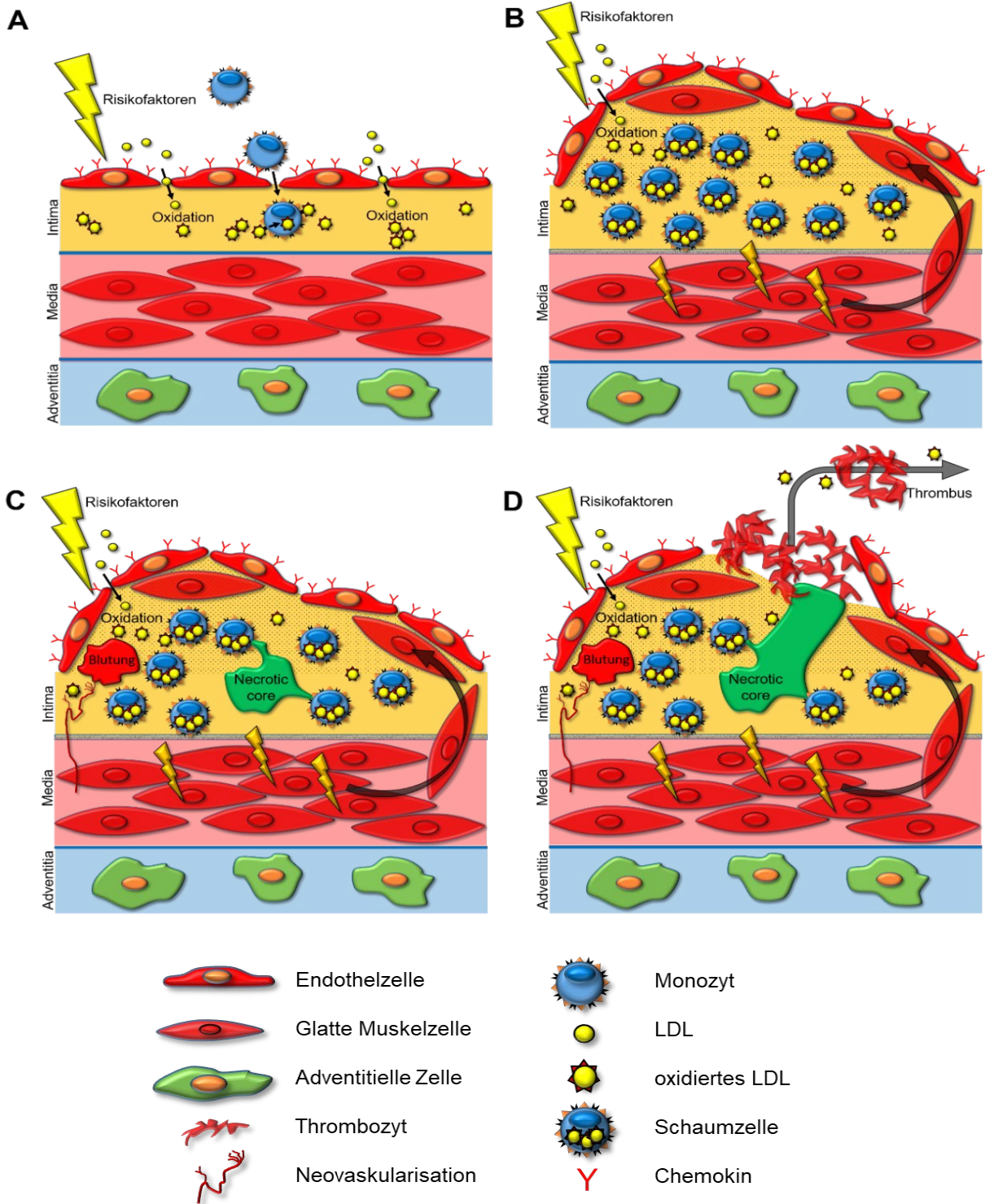


Abb.4: Pathogenese der Arteriosklerose („Response to injury“-Hypothese).
 (Abbildung modifiziert nach Libby et al. (2011), sowie Skeoch und Bruce (2015))

1.3 Mausmodelle der Atherosklerose

Zur Untersuchung der pathologischen Vorgänge bei der arteriosklerotischen Plaqueentwicklung wurden verschiedene Tierarten eingesetzt (Getz und Reardon 2006; Fuster et al. 2012; Kapourchali et al. 2014; Dorado und Andrés 2015). Die Maus hat sich unter anderem aufgrund ihrer relativ kurzen Generationszeit und kostengünstigen Haltung, sowie den vielfältigen Möglichkeiten der genetischen Manipulation als wichtigstes Tiermodell etabliert. Im Menschen entstehen arteriosklerotische Läsionen über Jahre. Durch genetische Manipulation kann dieser Zeitraum in Mäusen erheblich verkürzt werden (Dorado und Andrés 2015). In der Arteriosklerose-Forschung haben sich vor allem zwei Mausmodelle etabliert: die *ApoE*^{-/-} (Plump et al. 1992; Zhang et al. 1992) und die *Ldlr*^{-/-} (Ishibashi et al. 1994) Maus.

Apolipoprotein E (ApoE) besitzt große Bedeutung für die Reduktion von Cholesterin im Plasma. So vermittelt ApoE die Aufnahme von nicht-HDL-Lipoproteinen in der Leber (Phillips 2014). *ApoE*^{-/-} Mäuse entwickeln spontane arteriosklerotische Läsionen unter normokalorischer Ernährung (normal diet, ND). Diese Entwicklung kann durch eine hochkalorische, fett- und cholesterinreiche Ernährung (western diet, WD) deutlich verstärkt werden (Nakashima et al. 1994; Davignon 2005; Getz und Reardon 2006). Arteriosklerotische Plaques finden sich bei der *ApoE*^{-/-} Maus im Bereich der Aortenwurzel, dem Aortenbogen, dem Truncus brachiocephalicus, sowie an den Karotiden. Andere Lokalisationen sind abhängig von der Dauer und Art der Ernährung (Nakashima et al. 1994). Die Koronararterien sind von diesen Veränderungen nicht betroffen, allerdings führt ein kombinierter Knockout mit dem scavenger receptor Typ B1 zu arteriosklerotischen Plaques in diesem Gefäßgebiet (Braun et al. 2002).

Der LDL-Rezeptor befindet sich in der Plasmamembran vieler Zelltypen. In der Leber ist dieser vor allem für die Elimination von ApoB100- und ApoE-haltigen Lipoproteinen zuständig und reduziert dadurch die Serumcholesterinwerte (Milasan et al. 2016). Im Gegensatz zu *ApoE*^{-/-} Mäusen entwickeln *Ldlr*^{-/-} Mäuse unter ND nur sehr langsam arteriosklerotische Plaques (Getz und Reardon 2006). Dies ist auf kompensatorische Mechanismen in der Leber zurückzuführen, sodass sich lediglich eine moderate Hypercholesterinämie einstellt (Teupser et al. 2003). Unter WD entwickeln aber auch *Ldlr*^{-/-} Mäuse deutliche arteriosklerotische Plaques.

Allerdings weisen diese Mausmodelle auch Limitationen auf. Murine Arteriosklerose-Modelle entwickeln regelhaft keine Läsionen, welche in morphologischer Hinsicht

fortgeschrittenen humanen arteriosklerotischen Plaques entsprechen. Dies beeinträchtigt die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf die humane Situation, da viele der klinisch auffälligen arteriosklerotischen Folgeerkrankungen auf diese fortgeschrittenen Läsionen zurückzuführen sind (Rosenfeld et al. 2008). Daneben unterscheidet sich die Lokalisation arteriosklerotischer Plaques in Maus und Mensch. Mausmodelle der Arteriosklerose entwickeln zu Beginn arteriosklerotische Plaques vorwiegend in der Aortenwurzel, welche beim Menschen meist ausgespart bleibt. Im Gegensatz zum Menschen entwickeln sich im Mausmodell nur in seltenen Fällen arteriosklerotische Läsionen in den Koronararterien (VanderLaan et al. 2004; Dorado und Andrés 2015). Zudem unterscheidet sich der Lipoprotein-Metabolismus zwischen Mensch und Maus. In der Maus findet sich Cholesterin vorwiegend in HDL (high density lipoprotein) -Partikeln, beim Menschen dagegen überwiegend in LDL-Partikeln. Ursache dafür ist die fehlende Expression des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) in der Maus (Kapourchali et al. 2014).

1.4 Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1

1.4.1 Struktur

Das membranäre Typ 1 Glykoprotein Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1, früher auch bekannt als BGP, C-CAM und CD66a) gehört als Mitglied der Carcinoembryonic antigen-related Faktorengruppe zur Immunglobulin-Superfamilie. Die CEA-Familie besteht aus transmembranären oder membrangebundenen G-Protein gekoppelten Molekülen, die in 19 Genen auf dem humanen Chromosom 19q13.2 kodiert sind. Eine weitere Unterteilung erfolgt in CEA-related cell-adhesion molecules (CEACAMs) und pregnancy specific glycoproteins (PSGs, Abb.5).

Durch alternatives Spleißen wird die Vielfalt der Familienmitglieder weiter erhöht. So können 11 verschiedene Isoformen von CEACAM1 gebildet werden (Kuroki et al. 1991; Barnett et al. 1993; Gray-Owen und Blumberg 2006). Diese Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen und ihrem zytoplasmatischen Anteil. Auf die Anzahl der Ig-Domänen innerhalb des Extrazellulärabschnitts des Moleküls bezieht sich die Nummerierung 1-4 in der Abkürzung, wohingegen die Buchstaben „L“ oder „S“ in der Abkürzung auf die zytoplasmatische Domäne in long- (L) oder short (S)-Version hinweisen. Von den insgesamt 11 humanen CEACAM1-Isoformen konnten lediglich CEACAM1-2L,

CEACAM1-2S, CEACAM1-4L und CEACAM1-4S in der Maus nachgewiesen werden (Beauchemin et al. 1999).

Die beiden Hauptisoformen CEACAM1-4L und CEACAM1-4S unterscheiden sich lediglich in ihrer zytoplasmatischen Domäne, welche in der L (long)-Isoform länger ist, als in der S (short)-Isoform. Beide Isoformen werden häufig co-exprimiert, wobei das Verhältnis zueinander in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert. Die Signaltransduktion beider Isoformen ist jedoch verschieden, da CEACAM1-4L im längeren zytoplasmatischen Anteil über zwei phosphorylierbare Tyrosinreste verfügt, durch die CEACAM1L sowohl Phosphotyrosinphosphatasen (SHP-1/SHP-2), als auch Tyrosinkinasen (Src-Kinase-Familie) binden und somit in seinen Signalwege modifiziert werden kann, aber auch Signalkaskaden anderer Tyrosinkinase-

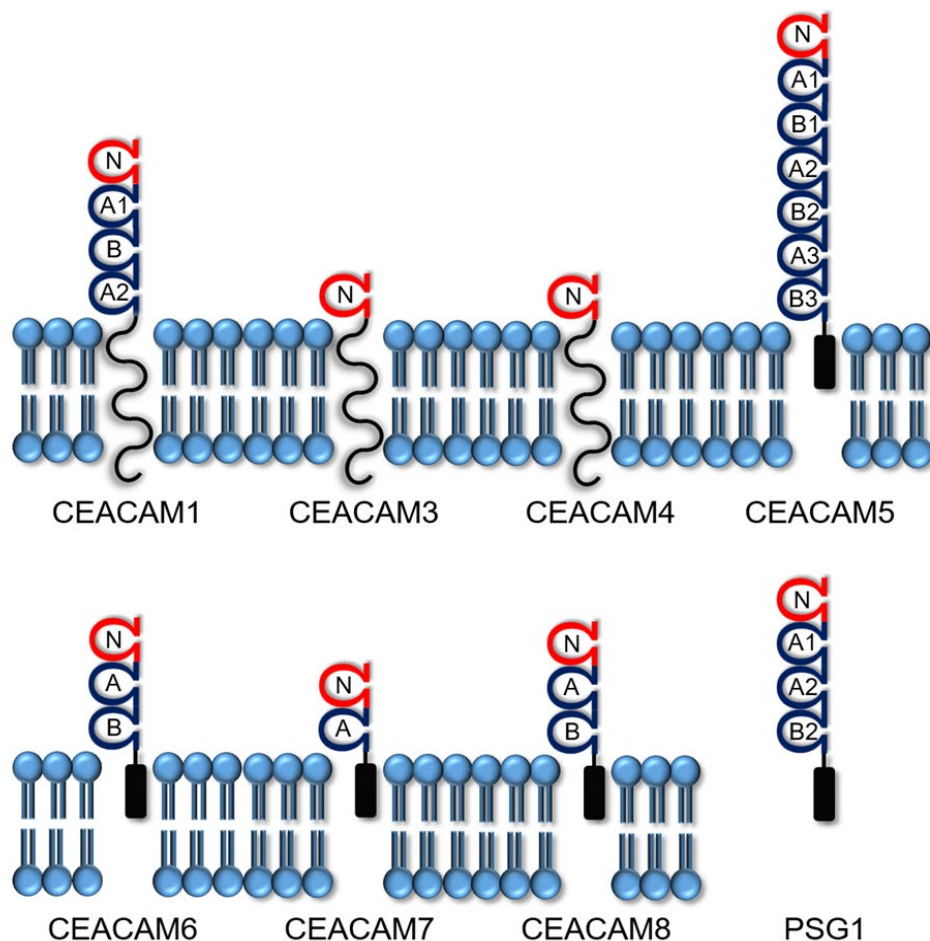


Abb.5: Verschiedene Mitglieder der CEA-Familie.

Der extrazelluläre Teil besteht aus einer N-Domäne (IgV-ähnlich) und einer variablen Anzahl A- bzw. B-Domänen (IgC2-ähnlich). Die Membranlokalisierung wird entweder durch eine Transmembrandomäne (CEACAM1, 3, 4) oder einen Membrananker vermittelt. Homophile und heterophile Interaktionen mit anderen CEA-Proteinen erfolgen über die N-Domäne. (Abbildung modifiziert nach Rueckschloss et al. (2016))

Rezeptoren modulieren kann. Des Weiteren können die Tyrosinkinase bzw. Phosphotyrosinphosphatasen wiederum selbst in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Brummer et al. 1995; Huber et al. 1999; Muller et al. 2009).

Die extrazellulären Domänen der CEACAM1-Isoformen sind stark glykosyliert. Über diese kann CEACAM1 sowohl trans-homophile (Watt et al. 2001) als auch trans-heterophile Interaktionen mit CEACAM5 (Stern et al. 2005), CEACAM6 (Oikawa et al. 1992) und CEACAM8 (Singer et al. 2014) eingehen.

1.4.2 Biologische Bedeutung von CEACAM1

CEACAM1 wird in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Organen wie z.B. Prostata (Tilki et al. 2006), Darm (Nollau et al. 1997; Leung et al. 2006), Immunzellen (Gray-Owen und Blumberg 2006; Huang et al. 2015; Khairnar et al. 2015), Hepatozyten (Poy et al. 2002), glandulären Zellen (Brummer et al. 2001) sowie angiogenetisch aktivierten Endothelzellen (Ergun et al. 2000; Kilic et al. 2005; Tilki et al. 2006; Nouvion und Beauchemin 2009) exprimiert.

CEACAM1 ist an verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie z.B. der Tumorangio-genese und der Inflammation sowie als Pathogen-Rezeptor an bakteriellen und viralen Erkrankungen beteiligt (Voges et al. 2010; Gerstel et al. 2011; Beauchemin und Arabzadeh 2013; Vitenshtein et al. 2016; Dankner et al. 2017; Klaile et al. 2017; Khairnar et al. 2018). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll jedoch insbesondere auf die Rolle von CEACAM1 für die vaskuläre Physiologie und Pathologie fokussiert werden.

CEACAM1 fördert die Bildung neuer Blutgefäße sowohl durch Vaskulogenese (Zengin et al. 2006; Gu et al. 2009) als auch durch Angiogenese (Ergun et al. 2000; Kilic et al. 2005). Es ist an der Stabilisierung entstehender Blutgefäße beteiligt (Gerstel et al. 2011). Darüber hinaus beeinflusst CEACAM1 aber auch die endotheliale Permeabilität (Nouvion et al. 2010; Najjar et al. 2013) und ist in vaskuläre Umbauprozesse involviert (Horst et al. 2006). Dies legt den Schluss nahe, dass CEACAM1 nicht nur für sich entwickelnde Gefäße von Bedeutung ist, sondern auch in der Homöostase ausgereifter Gefäße eine Rolle spielt.

Diese Hypothese wurde von Najjar et al. (2013) durch Untersuchungen an CEACAM1-defizienten (*Cc1^{-/-}*) Mäusen weiter untermauert. CEACAM1-Defizienz führte zur Ausprägung einer endothelialen Dysfunktion. *Cc1^{-/-}* Mäuse zeigten im Alter von 6 Monaten eine verminderte vaskuläre Expression von eNOS. Im Vergleich zum Wildtyp

resultierte daraus eine um 60% verminderte endotheliale NO-Bildung, sowie eine reduzierte NO-abhängige Vasorelaxation (Najjar et al. 2013). Dazu könnte auch der in *Cc1^{-/-}* Mäusen nachgewiesene erhöhte oxidative Stress durch NO-Inaktivierung beitragen (Najjar et al. 2013).

Als weiteres Charakteristikum einer endothelialen Dysfunktion zeigten *Cc1^{-/-}* Mäuse eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel der Aorta. Dies wurde auf eine erhöhte vaskuläre Expression von VCAM1 infolge der Aktivierung des pro-inflammatorischen TNF- α / NF- κ B-Signalweges zurückgeführt (Najjar et al. 2013).

Diese pro-inflammatorische Aktivität könnte auch zur in *Cc1^{-/-}* Mäusen festgestellten endothelialen Barrierestörung beitragen. Im Gegensatz zu den elongierten Endothelzellen in der Aorta des Wildtyps, zeigten die aortalen Endothelzellen von *Cc1^{-/-}* Mäuse eine eher rundliche Morphologie mit meanderförmigen Zellgrenzen (Najjar et al. 2013). Ursache dafür könnte die reduzierte Expression von β -Catenin in *Cc1^{-/-}* Mäusen sein (Najjar et al. 2013), da dieses Adherens Junction-Komplexe zwischen den Endothelzellen stabilisiert (Waschke et al. 2005; Noda et al. 2010; Huveneers et al. 2012).

Zusammenfassend weisen *Cc1^{-/-}* Mäuse eine gesteigerte vaskuläre Inflammation auf, welche die endotheliale Dysfunktion in diesen Mäusen bedingt. Im Ergebnis entwickeln CEACAM1-defiziente Mäuse in der Aortenwurzel kleine Arteriosklerose-ähnliche Läsionen. Mittels Oil Red O-Färbung konnten Lipidakkumulationen in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Dies ist insofern überraschend, als *Cc1^{-/-}* Mäuse im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhten Werte für Gesamt- und LDL-Cholesterin, HDL sowie Gesamt- und VLDL-Triglyceride aufweisen (Najjar et al. 2013).

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

CEACAM1 beeinflusst die Bildung und Ausreifung neuer Blutgefäße. Allerdings führte CEACAM1-Defizienz zu kleinen Arteriosklerose-ähnlichen Läsionen in der Aortenwurzel (Najjar et al. 2013). Das weist auf eine mögliche Rolle von CEACAM1 auch in der Homöostase ausgereifter Blutgefäße hin. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch größtenteils noch unbekannt.

Da dem Endothel eine zentrale Rolle für die Gefäßhomöostase zukommt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von CEACAM1 auf zentrale endotheliale Funktionen wie:

- a) die eNOS vermittelte NO-Bildung,
- b) die Adhäsivität des Endothels gegenüber Immunzellen und
- c) die endotheliale Barrierefunktion untersucht werden.

Die aus diesen Analysen gewonnen Erkenntnisse könnten für Prävention und Behandlung von Gefäßerkrankungen, insbesondere im Rahmen der Atherosklerose, von großer Bedeutung sein.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodelle

2.1.1 C57BL/6 und 129/SvImJ

Der C57BL/6-Mausstamm (auch B6, B6J, Black 6, C57 Black) stellt einen der am häufigsten in der biologischen Forschung verwendeten murinen Inzuchtstämme zur Generierung transgener Mäuse dar (Tang et al. 2008). Die C57BL/6 Maus wurde als Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet, da alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle in diesem genetischen Hintergrund generiert wurden.

MyEnds aus Herzen von 129S1/SvImJ (auch: 129S1; Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) Mäusen wurden aufgrund ihrer starken CEACAM1-Expression als Positivkontrollen und für qualitative Versuche genutzt.

2.1.2 $Cc1^{-/-}$, $Cc1^{endo+}$ und $Cc1^{-/-ER}$

Die verwendeten $Cc1^{-/-}$ Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Sonia Najjar (Endocrine and Diabetes Care Center; Toledo, OH, USA) zur Verfügung gestellt. Durch Deletion der ersten beiden Exone des CEACAM1-Gens wurde die Expression eines funktionsfähigen Proteins unterbunden (Leung et al. 2006; Xu et al. 2009).

$Cc1^{endo+}$ Mäuse überexprimieren CEACAM1 unter der Kontrolle des Tie-2-Promotors spezifisch im Endothel und vermutlich in einigen hämatopoietischen Zellen (Horst et al. 2006). Dieses Mausmodell wurde von Frau PD Dr. Andrea Horst (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Immunologie und Hepatologie, Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. $Cc1^{-/-ER}$ Mäuse exprimieren CEACAM1 ausschließlich im Endothel. Diese Mauslinie wurde durch Kreuzung von $Cc1^{-/-}$ und $Cc1^{endo+}$ Mäusen generiert.

2.1.3 $ApoE^{-/-}$ und $Ldlr^{-/-}$

$ApoE^{-/-}$ (B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J) Mäuse exprimieren kein Apolipoprotein E und wurden von Prof. Dr. Alma Zernecke-Madsen (Universität Würzburg, Institut für Experimentelle Biomedizin, Lehrstuhl II; Würzburg) zur Verfügung gestellt.

$Ldlr^{-/-}$ (B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J) Mäuse exprimieren keinen LDL-Rezeptor und wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

2.1.4 Haltung und Diäten

Die Mäuse wurden in einem 12h:12h Dunkel/Hell-Zyklus unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen gehalten.

Ab Geburt wurde zur Fütterung aller Mäuse im Rahmen der regulären Standarddiät (normal diet, ND) ein Futter verwendet, welches eine balancierte Nährstoffkonzentration bei gleichzeitig niedrigem Energiegehalt aufweist (12,8 MJ/Kg metabolisierbarer Energiegehalt, sehr niedrigen Nitrosamingehalt, 10 mm Pelletgröße). Der verwertbare Teil der Nahrung bestand aus 58% Kohlenhydraten, 33% Protein und 9% Fett (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany; Diät V1534). Zur Induktion arteriosklerotischer Plaques wurde eine hochkalorische Diät (western diet, WD) auf Butterfettbasis mit einem erhöhten Cholesteringehalt von 1,25% eingesetzt. Hierbei war der verwertbare Energiegehalt (19,2 MJ/Kg) deutlich höher als bei ND. Der verwertbare Teil der Nahrung bestand aus 43% Kohlenhydraten, 14% Protein und 42% Fett (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany; Diät TD.88137 mod. 1,25 Cholesterol). Diese WD wurde den Mäusen ab einem Alter von 8 Wochen bis zum Versuchsende gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin durchgehend ND.

2.2 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tab.1 zusammengefasst. Die folgenden Sekundärantikörper wurden alle von DIANOVA (Hamburg, Deutschland) bezogen: Esel-anti-Ziege, Ziege-anti-Maus, Ziege-anti-Kaninchen, Ziege-anti-Ratte. Für die Immunpräzipitationsversuche wurden unkonjugierte Sekundärantikörper verwendet. In den Immunoblotanalysen wurden Peroxidase- und in der Immunhistologie Cy2/Cy3-konjugierte Sekundärantikörper eingesetzt.

Tab.1: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Zielstruktur	Hersteller	ArtikelNr.
anti-Caveolin-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-894
anti-CD31	Dako	M0823
anti-CEACAM1 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology	14771
anti-CEACAM1 (Maus)	K. Holmes (University of Colorado, CO, USA)	-
anti-eNOS	R&D Systems	AF950
anti-phospho-eNOS (Ser ¹¹⁷⁷)	Cell Signaling Technology	9571

anti-phospho-Tyrosin	Merck Millipore	05-1050
anti-SHP-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-280
anti-Src	Cell Signaling Technology	2110
anti-TNF- α	Santa Cruz Biotechnology	sc-52746
anti-VE-Cadherin	hybridoma 11D4.1 (Gotsch et al. 1997)	-
anti- β -Catenin	BD Transduction Laboratories	610153

2.3 Reagenzien

Tab.2: Liste der verwendeten Reagenzien.

Reagenz	Hersteller	Artikelnr.
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Roche	10236276001
Albumin from bovine serum, Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich	A9647
Aluminiumsulfat-18-hydrat, reinst	Sigma-Aldrich	11044
Ammoniumchlorid	Fluka	09700
Ammoniumpersulfat	Roth	9592.3
Aprotinin	neoFroxx GmbH	1278MG010
Bromphenolblau	Roth	A512
Zitronensäure	AppliChem	A1350,1000
D (+) – Glucose, wasserfrei	AppliChem	A1422,0500
DePeX	Serva	18243.02
Dextran, Alexa Fluor™ 647; 10,000 MW, Anionic, Fixable	Sigma-Aldrich	D22914
di-Natriumhydrogenphosphat – Dihydrat	AppliChem	A3905,1000
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	AppliChem	131679.1211
Dithiothreitol	Roth	6908.2
Ethanol 96%, vergällt mit 1% MEK	Firma Nordbrand, Nordhausen	Sorte 641
Ethanol mind. 99%, vergällt mit 1% MEK	Firma Nordbrand, Nordhausen	Sorte 642
Glycerin	Roth	3783.1
Glycin	Roth	3908.3

Histosec Pastillen	Merck Millipore	1.11609.2504
Kaliumchlorid	Roth	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	A3620
Kernechtrot	Merck Millipore	5189
Leupeptin	neoFroxx GmbH	1273MG010
Luminol	AppliChem	A2185,0025
Methanol	AppliChem	A2954
Milchpulver	AppliChem	A0830
Natriumchlorid	Roth	3957.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	CN30.2
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Merck Millipore	1.06727.0100
Paraformaldehyd, reinst	Roth	0335.3
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Pepstatin	neoFroxx GmbH	1274MG010
PP2 (CAS 172889-27-9)	Merck Millipore	529573
Protein A/G Agarose	Thermo Fisher	20421
Rotiphoresegel 30	Roth	3029.1
Salzsäure	Sigma-Aldrich	30721
Serum Esel	Sigma-Aldrich	D9663
Serum Ziege	Sigma-Aldrich	G9023
Serum Pferd	Sigma-Aldrich	H1270
TEMED	Roth	2367.3
TNF α , recombinant, human	Thermo Fisher	10602HNAE250
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem	A1351,1000
Tris	AppliChem	1086
Tris ultrapure	AppliChem	A1086,5000
Tween 20	Roth	9127.1
Xylol, redestilliert, 99,9%	über Universität Würzburg bezogen	

2.4 Lösungen

Tab.3: Liste der verwendeten Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
3fach Probenpuffer	0,454 g Tris 7,56 g Glycerin 1,2 g SDS 30 mg Bromphenolblau 1 mg Dithiothreitol in 20 ml A. dest.
Citratpuffer: (Demaskierung für histologische Färbungen)	18 ml 0,1M Zitronensäure 82 ml 0,1M Tri-Natriumcitrat 900 ml A. dest. → pH 6,0
ECL-1	5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 500 µl Luminol (Stammlösung 250 mM in DMSO) 220 µl p-Cumarsäure (Stammlösung 90 mM in DMSO) Auffüllen auf 50 ml mit A. dest
ECL-2	5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 32 µl 30% H ₂ O ₂ Auffüllen auf 50 ml mit A. dest.
Kernechtrot-Lösung 0,1% (Kernfärbung IHC)	50 g Aluminiumsulfat-18-hydrat, reinst in 1 Liter A. dest. 1 g Kernechtrot unter Erhitzen darin lösen
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,68 mM Kaliumchlorid 9,58 mM di-Natriumhydrogenphosphat 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphatpuffer 0,1M pH 7,4 (PB-Puffer für DAB)	4,9 g Kaliumdihydrogenphosphat 23,3 g Natriumdihydrogenphosphat in 2 Liter A. dest. → pH 7,4
SDS-Gelelektrophoresepuffer	3 g Tris 14,5 g Glycin 0,1% SDS in 1 Liter A. dest.
TBS-T	2,42 g Tris 8 g NaCl 0,05% Tween-20 in 1 Liter A. dest. → pH 7,5
Transfer-Puffer	3 g Tris 14,5 g Glycin 20% Methanol in 1 Liter A. dest.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Endothelzellen

Murine myokardiale Endothelzelllinien wurden, wie von Golenhofen et al. beschrieben, hergestellt (Golenhofen et al. 2002). Hierfür wurde das Herz neugeborener Mäuse mechanisch zerkleinert und die Gewebestruktur mittels 0,05% Trypsin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 0,02% Kollagenase Typ 2 (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland) enzymatisch aufgelöst. Die freigesetzten myokardialen Zellen wurden auf gelatinierte Zellkulturplatten in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10%FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 50U/ml Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte die Transformation der Zellen mittels Polyoma Virus middle T Antigen. Dies vermittelt Endothelzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen (z.B. Fibroblasten), sodass vier Wochen nach Isolation ein homogener Endothelzellrasen resultierte.

Jede Endothelzellisolation wurde auf die endothelialen Markerproteine CD31 und VE-Cadherin getestet (Radeva et al. 2014). Die myokardialen Endothelzellen (MyEnds) wurden in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 10% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C/ 5% CO₂ kultiviert. Um Endothelzellen verschiedener Genotypen zu erhalten, wurde das Myokard verschiedener Mauslinien verwendet: WT MyEnds (C57BL/6J Mäuse), *Cc1^{-/-}* MyEnds (*Cc1^{-/-}* Mäuse), *Cc1^{-/-ER}* MyEnds (*Cc1^{-/-ER}* Mäuse), WT¹²⁹ MyEnds (129S1/SvImJ).

WT¹²⁹ MyEnds wurden aufgrund ihrer starken CEACAM1 Expression in einigen Fällen als Positivkontrolle verwendet. Wegen des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds wurden aber keine Vergleiche mit *Cc1^{-/-}* MyEnds durchgeführt.

Vor Stimulation mit TNF- α (50 ng/ml; Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurden MyEnds für 1 h ohne Serum kultiviert.

2.5.2 Monozyten

Die humane Monozytenzelllinie THP-1 (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland; ACC 16) wurde in RPMI 1640 plus l-glutamine, 3,5 g Glucose/l (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 10%FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C/ 5% CO₂ kultiviert.

Die murine Monozytenzelllinie P388D1 (IL-1) (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig,

Deutschland; ACC 288) wurde in RPMI 1640 plus l-glutamine, 3,5 g Glucose/l (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 20% Pferdeserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA;) bei 37°C/ 5% CO₂ kultiviert.

2.6 Gewebeaufbereitung für Histologie

Zur histologischen Aufarbeitung muriner Aorten wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und in Rückenlage mittels Kanülen auf einem mit Alufolie bezogenen Korkbrett fixiert. Nach Anfeuchten des Fells mittels 70% Ethanol wurden Abdomen und Thorax durch mediane Laparo- und Thorakotomie eröffnet und die vordere Brustwand abgetrennt um das Herz zugänglich zu machen. Das rechte Herzohr wurde eröffnet und der linke Herzventrikel mittels einer Flügelkanüle und daran angeschlossener 20 ml-Spritze punktiert. Um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen wurde der große Kreislauf über die Flügelkanüle mit 20 ml PBS gespült. Eine Entlüftung der Flügelkanüle und Spritze wurde zur Vorbeugung von Gasembolien vor der Injektion durchgeführt, da diese die Perfusion beeinträchtigen könnten.

Mittels feiner Pinzetten und Federschere wurde das perivaskuläre Fettgewebe der Aorta vorsichtig entfernt ohne die Adventitia zu verletzen. Im Anschluss wurde die Aorta nahe dem Herz und der abdominalen Bifurkation abgetrennt und in die drei Anteile Bogen, thorakale und abdominale Aorta aufgeteilt. Nach der Fixation mit 4% PFA für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Aortenanteile für 3x 15 min mit PBS gewaschen, um das restliche PFA zu entfernen und nachfolgend in TissueTek® O.C.T Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) eingefroren. Mittels eines Kryostats (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland; LM3050S) wurden Gefrierschnitte (10 µm) angefertigt. Die Aorten für Western Blot-Untersuchungen wurden unfixiert in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Lagerung bei -80°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Für die Paraffineinbettung der Aorten wurden diese wie oben beschrieben präpariert und mit 4% PFA/PBS über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in Einbettkassetten überführt. Die Fixierungslösung wurde durch dreimaliges Waschen mit 70% Ethanol über insgesamt 2-3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler entfernt. Anschließend wurden die Kassetten mit den Aorten mit dem Programm 1 des Einbettungsautomaten TP1020 (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) 15 Stunden behandelt. Das Programm setzte sich wie in Tab.4 beschrieben zusammen.

Tab.4: Teilschritte bei der Paraffineinbettung.

Schritt	Reagenz	Dauer
1	70% Ethanol	30 min
2	70% Ethanol	30 min
3	80% Ethanol	1 h
4	96% Ethanol	1 h
5	100% Ethanol	1 h
6	100% Ethanol	1 h
7	100% Ethanol	1 h
8	Xylol	1 h
9	Xylol	1 h
10	Xylol	1 h
11	Paraffin	3 h
12	Paraffin	3 h

Anschließend wurden die Aorten in Paraffinblöcke (Paraffingießstation Modell 2080/K, BAVIMED, Birkenau) gegossen. Aus den Paraffinblöcken wurden mittels Schlittenmikrotom (SM2010 R, Leica) 6µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, diese im Wasserbad gestreckt (1052, GFL, Burgwedel), im Anschluss auf Objektträger aufgezogen (SuperFrost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen) und bei 37°C über Nacht im Ofen (Memmert, Schwabach) getrocknet. Anschließend erfolgte die immunhistologische Färbung mittels Antikörpern.

2.7 Immunfluoreszenz

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden Fluorochrome genutzt. Diese absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren hiervon wiederum einen Teil als länger wellige Strahlung. Durch Verwendung geeigneter Filterkombination können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe parallel eingesetzt werden (Oliver und Jamur 2010).

Für die indirekte Immunfluoreszenz bindet ein unmarkierter Primärantikörper spezifisch an das Zielepitop. Der den Primärantikörper bindende Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom gekoppelt. Dieses Fluoreszenzsignal kann anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopen sichtbar gemacht werden (Abb.6). Bei der direkten

Immunfluoreszenz entfällt der Sekundärantikörper, da das Fluorochrom direkt an den Primärantikörper gebunden ist (Oliver und Jamur 2010).

Vor Färbung von Gewebeschnitten der Aorta wurde diese auf den Objektträgern mittels eines Diamantstifts markiert, sodass diese später beim Mikroskopieren leichter auffindbar waren. Die Entparaffinierung der Proben erfolgte für 2x 10 min in 100% Xylol. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 5 min in 2x 100%, 96%, 80% und 70% mit anschließendem Waschschrift in A. dest. für 5 Min gewässert. Zur Freilegung des Antigens erfolgte eine Demaskierung. Dazu wurden die Objektträger in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in einer Mikrowelle 2x 10 s im Abstand von 30 s zum Kochen gebracht und anschließend 30 min bei 95°C inkubiert. Nach 15 Minuten in diesem Ofen wurde durch Schwenken einer Gasbildung auf den Objektträgern entgegengewirkt. Nach Abkühlung der Objektträger wurde der Citratpuffer über 5 min durch fließendes A. dest. ersetzt und die Objektträger auf einem Schüttler für 3x 5 min mit PBS gewaschen. In einer feuchten Kammer erfolgte anschließend die Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf den Schnitten mit 5% normalem Ziegenserum/ PBS für 2 h bei Raumtemperatur.

Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung in 1% normalem Ziegenserum/ 0,2% BSA/ PBS über Nacht aufgetragen. Nach Entfernen überschüssiger Primärantikörper durch 3x 5 min Waschen mit PBS, wurden die Sekundärantikörper in 1% normalem Ziegenserum/ 0,2% BSA /PBS für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Der nicht gebundene Anteil wurde ebenfalls durch 3x 5

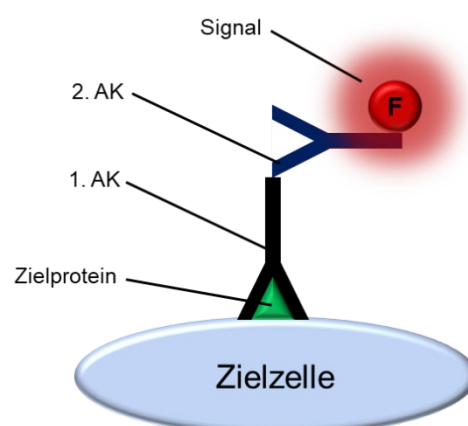


Abb.6: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.

AK=Antikörper (Abbildung modifiziert nach Oliver und Jamur (2010))

min Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; 1µg/ml) für 10 min. Im Anschluss an 6x 2 min Waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte kurz in A. dest. getaucht um Salze zu entfernen. Nach Eindecken mit 1%igem Propylgallat (Propyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 60% Glycerin in PBS wurden sie bis zur Analyse bei 4°C dunkel gelagert.

Für immunzytologische Untersuchungen wurden Zellen auf gelatinierten Deckgläschen (12 mm) in 6-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und nach Behandlung fixiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellkulturplatten 3 min mit PBS gewaschen und die Zellen für 10 min mit 2% PFA/ PBS fixiert. Nach 3x 3 min Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3% BSA/ 1% NGS/ PBS für 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBS über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer aufgetragen. Ungebundener Primärantikörper wurde durch 3x 5 min Waschen mit PBS entfernt. Die Deckgläschen wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:600 (Cy3-gekoppelt) bzw. 1:300 (Cy2-gekoppelt) in PBS inkubiert. Die Kerne wurden mit DAPI (1µg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt und die Deckgläschen anschließend für 3x 5 min mit PBS gewaschen. Das Eindecken erfolgte mit 5 µl 1%igem Propylgallat (Propyl-3,4,5-trihydroxybenzoat, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 60% Glycerin in PBS.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Keyence BZ9000 Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan) und der dazugehörigen Software BZ-II Analyser (Version 1.42), beziehungsweise mittels eines inversen Konfokalmikroskops (NIKON Eclipse TI-E, ausgestattet mit „Coherent sapphire Lasern“ (405, 488, 561, 647 nm)) und NIS-Elements Advanced Research Software (Nikon, Tokio, Japan).

2.8 Histologische Färbungen

2.8.1 Kernechtrotfärbung

Kernechtrot, ein saurer Antrachinonfarbstoff (Lang 2013), wird zur Gegenfärbung genutzt, um Zellkerne darzustellen. Hierbei handelt es sich um Färbungen mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat. Dieses färbt im Gegensatz zu Kernechtrot nicht das Zytoplasma, sondern die Zellkerne rötlich (Mulisch et al. 2015).

Die Gewebeschnitte wurden nach 3x 5 min Waschen mit PBS kurz in A. dest. geschwenkt und anschließend 3 min in 0,1% Kernechtrotlösung gefärbt. Anschließend

wurde überschüssiges Kernechtrot mit A. dest. entfernt und der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Hierzu wurden die Objektträger für jeweils 1 min in 70%, 80% und 90% Ethanol und anschließend 2x 3 min in 100% Ethanol verbracht. Nach 2x 5 min in 100% Xylol wurde der Schnitt mit DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

2.8.2 Oil Red O-Färbung

Die Färbung von Gewebegefrierschnitten mit dem fettlöslichen Azofarbstoff Oil Red O (Solvent Red 27, Sudan Red 5B, C.I. 26125) zur Detektion von Triglyceriden ist eine gut etablierte Methode für die Darstellung arteriosklerotischer Plaques in murinen Aorten (Lin et al. 2015).

Für die Herstellung der Oil Red O-Stammlösung wurden 0,5 g Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 100 ml Isopropanol bei 56°C im Wasserbad gelöst und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Zum Herstellen der Färbelösung wurde die Stammlösung 3:2 mit A. dest. verdünnt und anschließend mittels Vakuums zweifach durch einen Whatman®-Filter filtriert. Die Gefrierschnitte wurden auf einer Wärmeplatte für 1 h bei 37°C getrocknet und für 3 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 4% PFA für 5 min fixiert, für 3x 3 min mit PBS gewaschen und kurz in A. dest. getaucht. Nach 8 min in 60% Isopropanol wurden die Schnitte für 1 h mit Oil Red O bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in 60% Isopropanol differenziert und wie weiter oben beschrieben eingedeckt.

2.9 Real-time Polymerasekettenreaktion

Die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels Reverser Transkriptase erlaubt deren Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Hierzu wird zunächst die RNA isoliert, eventuell vorhandene kontaminierende genomische DNA durch DNase-Behandlung entfernt und die enthaltene RNA im Anschluss mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch Einsatz spezifischer Primerpaare erfolgt die Amplifikation der cDNA bestimmter RNAs in der PCR. Die synthetisierten Amplifikationsprodukte können über DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. SYBR Green I) detektiert und quantifiziert werden. Somit erlaubt diese Methode Rückschlüsse auf die Menge der Ausgangs-RNA und im Falle der Analyse von mRNA auf die Transkriptionsaktivität des jeweiligen Zielgenes in der Probe (Jansohn und Rothhämel 2012; Biassoni und Raso 2014).

Zur RNA-Isolation wurde je ein Well einer 6-Well-Platte mit 800 µl Qiazol Lyse-Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) für 5 min bei Raumtemperatur behandelt. Das Zellysate wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, nach Zugabe von 160 µl Chloroform für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (15 min; 10000 g; 4°C). Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, die RNA mit 400 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend zentrifugiert (10 min; 10000 g; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 2 min; 14000 g; 4°C). Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in RNase-freiem DEPC-Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat in A. dest.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelöst und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde mittels Thermo Scientific™ NanoDrop™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) analysiert.

Zur Beseitigung kontaminierender genomischer DNA in den RNA-Proben wurden 2 µg RNA mit DEPC-Wasser auf 8 µl adjustiert, jeweils 1 µl 10x Reaktionspuffer und RQ1 DNase zugegeben (Promega, Madison, WI, USA) und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl RQ1 DNase Stopp (Promega, Madison, Wisconsin, USA) und 10 min Inkubation bei 75°C beendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde mit DEPC-Wasser auf 12 µl erhöht. Hiervon wurden 9 µl für die Dreifachbestimmung der (+)RT (entspricht 1,5 µg RNA) und 3 µl für die (-)RT (entspricht 0,5 µg RNA) verwendet.

Für die Umschreibung der RNA in DNA wurde SuperScript™ II Reverse Transcriptase sowie RNaseOUT™, ein recombinanter Ribonucleaseinhibitor verwendet. (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Tab.5 zeigt die Zusammensetzung der Ansätze für die cDNA-Synthese.

Die Proben wurden für 10 min bei 25°C (Anlagerung der random primer), für 50 min bei 42°C (Umschreibung der RNA in cDNA) und abschließend für 5 min bei 95°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase) inkubiert. Anschließend wurden (+)RT bzw. (-)RT mit dH₂O auf 150 µl bzw. 50 µl aufgefüllt. Somit enthielt 1 µl der verdünnten RT-Reaktionen cDNA, die einem RNA-Äquivalent von 10ng entsprach.

Ein real-time PCR-Ansatz bestand aus 1 µl RT-Reaktion, 10 µl 2x GoTaq® qPCR MasterMix (Promega, Madison, WI, USA) und jeweils 1 µl Upstream- und Downstream-Primer (10 µM). Die Reaktionsansätze wurden mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die PCR wurde in einem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

Nach initialer Denaturierung der cDNA und Aktivierung der DNA-Polymerase (95°C für 2 min) wurde folgendes Programm für die Amplifikation verwendet: Denaturierung 95°C für 30 s, Annealing 60°C (außer für Chondroitinase: 63°C) für 30 s, sowie Synthese der DNA 72°C für 30 s. Es wurden 50 Zyklen gefahren.

Nach Abschluss der Amplifikation wurde die Spezifität der Reaktion durch eine Schmelzkurve überprüft (65°C - 95°C in 0,3°C-Inkrementen für jeweils 10 s). Die Sequenzen der verwendeten PCR-Primer sind in Tab.6 zusammengestellt.

Für die Auswertung wurde für jeden PCR-Lauf eine Probe als Kalibrator definiert und die Expression in den anderen Proben auf diese normalisiert. Nach Normalisierung auf das „housekeeping gene“ GAPDH konnte die relative Genexpression zwischen den analysierten Proben verglichen werden.

Tab.5: Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese (RT-Reaktion).

dNTPs und random primer wurden von Promega (Madison, WI, USA), first Strand buffer und DTT von Invitrogen (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) bezogen.

Reagenz	(+)RT	(-)RT
RNA aus DNase-Reaktion.	9 µl	3 µl
DEPC-Wasser	6 µl	2,25 µl
First strand buffer	6 µl	2 µl
DTT (100 mM)	3 µl	1 µl
Random primer (0,1 µg/µl)	3 µl	1 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,5 µl	0,5 µl
RNaseOut (40 U/µl)	0,75 µl	0,25 µl
SuperScript II (200 U/µl)	0,75 µl	-

Tab.6: Liste der verwendeten Primer.

UP bezeichnet den upstream primer, DP den downstream primer.

GenBank Nr.	Proteinname	Sequenzen (5' - 3')
GU214026.1	GAPDH; glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	UP: CCAGGTTGTCTCCTGCGACT DP: ATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG
NM_013599.4	MMP-9; matrix metallo- peptidase 9	UP: ACGACATAGACGGCATCCAG DP: GCTGTGGTTCAGTTGTGGTG
NM_001193645.1	Chondroitinase; galactosamine (N- acetyl)-6-sulfate sulfatase	UP: CCCGCCCTACAGTCCAAAAGGA DP: GCATCCCTTCTGCAGCCATCC
NM_010489.2	Hyaluronidase-2; hyaluronoglucos- aminidase 2	UP: TCACGCGTCCCACATACACC DP: ACTGCAATACTGGGTGGCCC
NM_010493.3	ICAM-1; intracellular adhesion molecule 1	UP: CCAAGCCCACGCTACCTCTG DP: GTCCTCCCCGATCTCGCTCA
NM_008866.2	APT1; acyl-protein thioesterase 1	UP: CAGGCAGCAGAAACCGTAAAAGC DP: AGCCCGAAGTGGAAGCCAGC

2.10 Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wird unter anderem genutzt, um *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Ein Antikörper bindet spezifisch an ein Antigen des Zielproteins im Zellsat. Der so entstandene Antigen-Antikörper-Komplex kann mittels Protein A/G beschichteter Agarose-Kügelchen gebunden, und über Zentrifugations- und Waschschrte präzipitiert und damit angereichert werden. Dabei werden auch Interaktionspartner des Zielproteins co-präzipitiert (Abb.7). Durch Analyse des Präzipitats mittels Western Blot können diese Interaktionspartner des Zielproteins detektiert werden (Jansohn und Rothhämel 2012; Luttmann et al. 2014).

Analog kann durch Verwendung von Antikörpern, die spezifisch an phosphorylierte Tyrosinreste in Proteinen binden, nach Immunpräzipitation im anschließenden Western Blot das Ausmaß der Tyrosinphosphorylierung spezifischer Antigene untersucht werden (Jansohn und Rothhämel 2012).

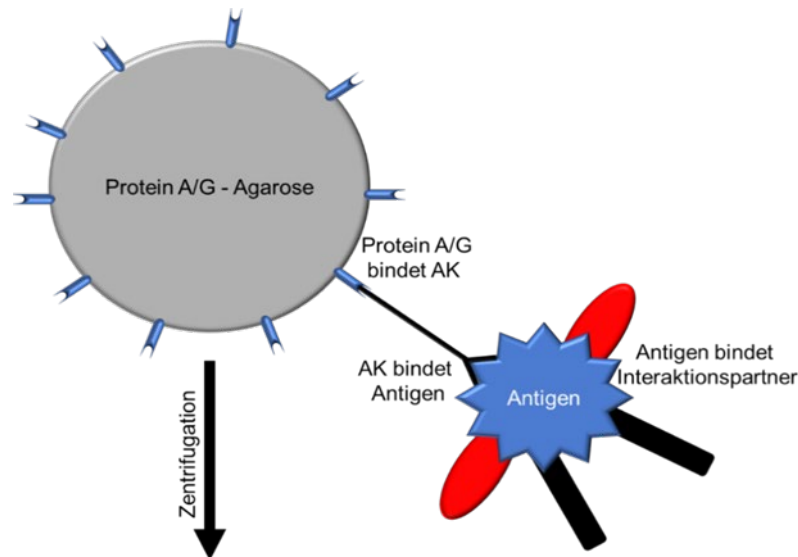


Abb.7: Schematische Darstellung des Prinzips der Co-Immunopräzipitation. (Abbildung verändert nach Luttmann et al. (2014), sowie Jansohn und Rothhämel 2012))

Für jede Probe wurde eine konfluente T75-Zellkulturflasche zunächst kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysepuffer (10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1% TritonX100, 60 mM Octylglucoside, 50 mM NaF, 1 mM Na₃OV₄, 1 mM PMSF, Proteaseinhibitoren: Aprotinin (in H₂O) 1:1000, Leupeptin (in DMSO) 1:1400, Pepstatin (in H₂O) 1:2000; Stammlösungen je 1 mg/ml) für 5 min bei 37°C versetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Dies wurde zentrifugiert (20 min; 18000 g; 4°C) und der Überstand als Lysat in ein neues Mikroreaktionsgefäß transferiert.

Für jede Probe wurde mittels Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Dabei findet der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 Verwendung, dessen Absorptionsmaximum sich nach Bindung an basische und aromatische Proteine von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford 1976; Ernst und Zor 2010). Durch Vergleich mit einer Standardkurve kann auf die Proteinkonzentration in den Versuchsproben geschlossen werden (Bradford 1976; Luttmann et al. 2014). Die Standardkurve wurde mittels in PBS gelöstem BSA in den Konzentrationen 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, und 0,1 mg/ml erstellt. PBS diente als Leerwert. Je 10 µl des Leerwertes, der Standardreihe und der Versuchsproben wurden mit 1 ml Bradfordreagenz (Roti®-Quant 5x; 1:5 in A. dest.; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messungen erfolgten im SmartSpec Plus Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Für jede Probe wurde 35 µl Pierce™ Protein A/G Agarose (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 3x mit 200 µl PBS gewaschen (Zentrifugation: 5 min; 6000 g; 4°C). Anschließend wurde die Agarose mit 200 µl 1% BSA/ PBS für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad blockiert und erneut 3x mit 200 µl PBS gewaschen. Je Immunpräzipitationsansatz wurden 1 mg Protein mit 5 µg Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexe wurden durch Zugabe der vorbereiteten Agarose (2 h bei 4°C auf dem Drehrad) gebunden. Nach 4x Waschen mit 200 µl PBS (Zentrifugation: 5 min; 6000 g; Raumtemperatur) wurde die zentrifugierte Agarose mit 30 µl DTT-haltigem 3fach Probenpuffer (Zusammensetzung siehe 2.4 Lösungen) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 18000 g wurde der Überstand abgenommen und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.11 Western Blot

Der Western Blot ist eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung, Größenbestimmung und Quantifizierung von Proteinen (Jansohn und Rothhämel 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinlysate aus murinen Aorten und Endothelzellen gewonnen, im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels Antikörper vermittelter enzymatischer Chemilumineszenz analysiert.

Die Herstellung der Zellysate für Western Blot-Analysen und die Proteinbestimmung erfolgte wie für die Co-Immunpräzipitation beschrieben (Kap.2.10).

Für die Herstellung der Lysate aus murinen Aorten wurden zunächst Mörser und Pistill mit flüssigem Stickstoff für wenige Minuten gekühlt. Hierbei wurde für jede Aorta ein separates Set an Mörser und Pistill verwendet, um Kreuz-Kontaminationen zu vermeiden. Wegen der zu erwartenden geringen Proteinmenge wurde die gesamte Aorta verwendet. Eine Unterteilung in Bogen, thorakalen und abdominellen Teil war daher nicht möglich.

Die bei -80°C gelagerte Aorta wurde in den gekühlten Mörser überführt und nach Zugabe von 150 µl Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA-Puffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), der mit Protease-Inhibitoren supplementiert war (Aprotinin (in H₂O) 1:1000, Leupeptin (in DMSO) 1:1400, Pepstatin (in H₂O) 1:2000; Stammlösungen je 1mg/ml), mittels Pistill zerrieben.

Das Lysat wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 18000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Herstellung der Lysate erfolgte soweit möglich auf Eis, um eine Degradation der Proteine in den Proben weitgehend zu vermeiden.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird der optimale Trennbereich maßgeblich durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt. Falls nicht anders angegeben, fand ein 7,5%iges Trenngel Verwendung.

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt (Tab.7), mit einer Pipette in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten des Gelhalters eingebracht und mit A. dest. überschichtet, um es vor Austrocknung zu schützen. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel (Tab.7) auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min bei Raumtemperatur war das Trenngel polymerisiert.

Von den Co-Immunopräzipitationsansätzen wurde der gesamte Überstand auf das Gel aufgetragen. Von den anderen Proteinlysaten wurden jeweils 30 µg mit DTT-haltigem 3fach Probenpuffer (Tab.3) auf 20 µl aufgefüllt. Alle Proben wurden vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C denaturiert.

Die elektrophoretische Trennung (SDS-Gelelektrophorese-Puffer siehe 2.4 Lösungen) erfolgte bei 80 V, bis anhand des mitgeführten vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) eine ausreichende Auftrennung der Proben erkennbar war.

Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0.45 NC Nitrocellulose Western blotting Membran, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), sowie Whatman® Zellulosefilterpapier (0,45 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Transfer-Puffer (siehe 2.4 Lösungen) äquilibriert. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel aus der Halterung entnommen und zusammen mit der Nitrozellulosemembran zwischen jeweils 2 Lagen des Filterpapiers platziert. Dieser Stapel wurde mit der entsprechenden Halterung in die mit Transfer-Puffer gefüllte Blotkammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt. Der Proteintransfer erfolgte bei 200 mA für 70 min.

Tab.7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für Western Blot.

Reagenzien	Sammelgel	Trenngel (7,5%)
A. dest	6,2 ml	9,8 ml
Acrylamid 30%	1,2 ml	5,0 ml
Tris 0,4 M (pH 6,8)	2,5 ml	-
Tris 1,5 M (pH 8,8)	-	5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml
10% Ammoniumperoxidsulfat	45 µl	85 µl
TEMED	23 µl	50 µl

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit 5% Magermilchpulver/ TBS-T (siehe 2.4 Lösungen) blockiert. Der Primärantikörper wurde mit der gleichen Lösung auf die geeignete Konzentration verdünnt. Für die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern wurden je 2 ml Antikörperlösung verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde mit der vorbereiteten Primärantikörperlösung in eine Folientasche (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert.

Nach 2x Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min wurde die Nitrozellulosemembran mit dem in 5% Magermilchpulver/ TBS-T verdünnten, Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen.

Die Detektion und Auswertung der Signale erfolgte mit einem Chemilumineszenzdetektionssystem (Fusion solo und CAPT-Software; Vilber, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland). Dazu wurde Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung aus den Lösungen ECL 1 und 2 im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt (siehe 2.4 Lösungen). Die Nitrozellulosemembran wurde unter Schwenken für 1 min in 10 ml ECL-Lösung inkubiert. Die Membran wurde danach blasenfrei unter Saranfolie (Saropack AG, Rorschach, Schweiz) auf das Probenblech gelegt und densitometrisch analysiert. Als Proteinladekontrolle wurde auf der Membran anschließend nach der gleichen Prozedur ein „housekeeping gene“ (β-Aktin) detektiert.

2.12 Palmitoylierungsassay

In eukaryotischen Organismen liegen 25-40% der zellulären Proteine membrangebunden vor (Stevens und Arkin 2000). Die Membranbindung dieser Proteine kann über lipophile Transmembrandomänen oder auch durch Lipidanker vermittelt werden. Palmitoylierung gehört neben Isoprenylierung und Myristoylierung zu den posttranslationalen Modifikationen, die als Lipidanker fungieren können.

Mittels CAPTUREome™ S-Palmitoylated Protein Kit von Badrilla (Badrilla Ltd, Leeds, UK) wurde der Palmitoylierungsstatus von eNOS und Caveolin-1 entsprechend den Herstellerhinweisen untersucht. Das Prinzip des Assays besteht darin, in einem ersten Schritt alle freien Thiolgruppen zu blockieren. Anschließend werden spezifisch die vorhandenen Palmitoyl-Thioester-Bindungen hydrolysiert. Die dadurch neu generierten Thiolgruppen binden an CAPTUREome™ capture resin und können präzipitiert werden.

Das Präzipitat, das alle ehemals palmitoylierten Proteine enthält wurde dann im Western Blot auf die Präsenz von eNOS und Caveolin-1 analysiert. Die Analysen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.13 Adhäsionsassay

Zur Analyse der Adhäsion von Monozyten an Aortenexplantate beziehungsweise MyEnd-Zellen wurden humane (THP-1) und murine (P388D1) Monozyten zunächst mit 10 µM Calcein-AM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in PBS bei 37°C/ 5% CO₂ für 1 h markiert. Die markierten Monozyten wurden im Anschluss für 1 h auf Aortenexplantate beziehungsweise für 30 min auf kultivierte MyEnds gegeben. Durch Waschen mit PBS wurden nicht adhärenente Monozyten entfernt und die gebundenen Monozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt (Keyence BZ-9000, BZ-II analyzer Software, KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland; λ_{Em} 535 nm).

Für Analysen mit Aorten wurde die Anzahl adhärenenter Monozyten auf die Gesamtoberfläche normalisiert. Für Analysen mit MyEnds wurden die Werte in % des Wildtyps ausgewertet.

2.14 Permeabilitätsassays

2.14.1 Evans Blue für *in situ* Permeabilitätsmessung

Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion kommt es initial zu einer Permeabilitätserhöhung des Endothels sowie einer vaskulären Entzündungsreaktion. Diese erhöhte Permeabilität kann als funktioneller Marker der endothelialen Dysfunktion durch eine selbst etablierte Methode gemessen und sichtbar gemacht werden (Bömmel und Kleefeldt et al. 2017). Dabei wird die endotheliale Permeabilität für den blauen Azofarbstoff Evans Blue (auch T-1824; Colour Index Number 23860 (Saunders et al. 2015)) gemessen (Abb.8).

Für diese Analysen wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und in Rückenlage an den Extremitäten fixiert. Abdomen und Thorax wurden durch mediane Laparotomie und Thorakotomie eröffnet, um das Herz darzustellen. Das rechte Herzohr wurde mit einer feinen Präparationsschere eröffnet. Der linke Ventrikel wurde mit einer Flügelkanüle punktiert, an die eine Spritze mit 20 ml blasenfreier Ringerlösung angeschlossen wurde. Die verwendeten Lösungen wurden vor Injektion auf 37°C erwärmt, da Kälte zu Vasokonstriktion und damit mangelnder Perfusion führen kann (Teixeira und Webb 2004).

Anschließend wurde die Ringerlösung langsam in den linken Ventrikel des Herzens injiziert, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu spülen. Danach erfolgte die Infusion von 10 ml 0,03% Evans Blue-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Ringerlösung in den linken Ventrikel. Eine erfolgreiche Evans Blue-Injektion zeigte sich bereits während der Infusion an einer Blaufärbung verschiedener Organe (z.B. Darm und Leber, Abb.8). Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Evans Blue-Lösung durch Injektion von 20 ml PBS in den linken Herzventrikel entfernt.

Nach Explantation wurde die Aorta mit 4% PFA für 1 h fixiert, 3x mit PBS für jeweils 5 min gewaschen und in Bogen, thorakalen und abdominalen Anteil geteilt. Die Aortenabschnitte wurden in Tissue Tek® (Sakura Finetek Europe B.W., NL) eingefroren und bei -80°C bis zur Anfertigung der Gewebeschnitte gelagert. Mittels eines Kryostats (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland; LM3050S) wurden Seriengefrierschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Diese wurden mit Kernechtrot gefärbt.

Um die sub-endotheliale Farbstoffeinlagerung zu quantifizieren, wurden je Versuchstier 10 zufällig ausgewählte Aortenringe bei 10-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (Keyence BZ9000 microscope; Keyence, Japan) aufgenommen und ausgewertet (ImageJ, Version 1.46r, Wayne Rasband, NIH; USA). Dazu wurde die Länge der sub-endothelialen Evans Blue-Einlagerung bestimmt und auf die Gesamtlänge des Endothels normiert. Anschließend wurden die 10 Einzelwerte je Versuchstier gemittelt.

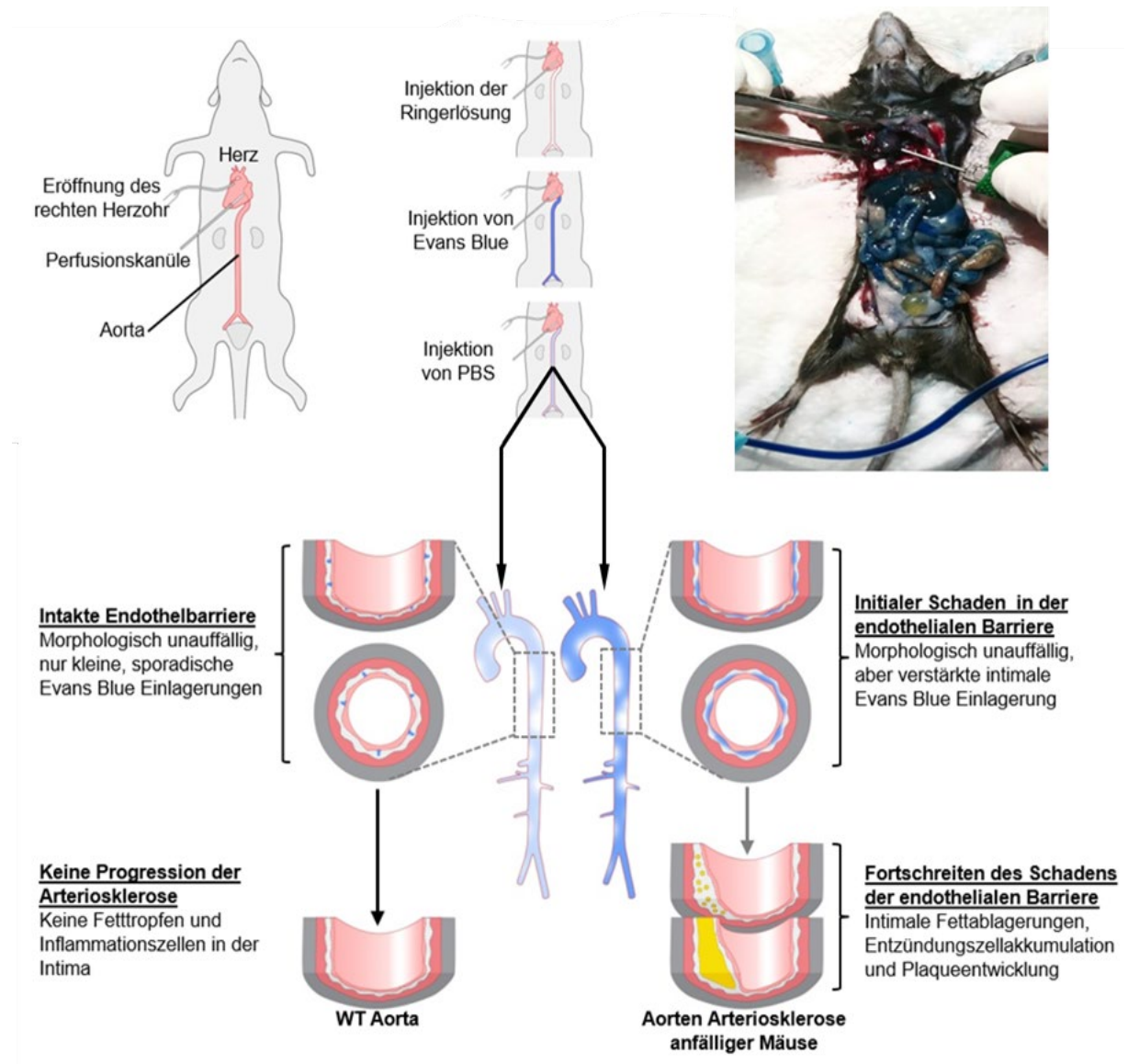


Abb.8: Schematische Darstellung der Permeabilitätsmessung mit Evans Blue.

Nach Spülen des großen Kreislaufs wurde Evans Blue in das Gefäßsystem injiziert. In Abhängigkeit von der endothelialen Barrierefunktion diffundiert Evans Blue in den sub-endothelialen Bereich der Gefäßwand. Damit kann die endotheliale Dysfunktion bereits vor Auftreten morphologischer Veränderungen untersucht werden. (Abbildung modifiziert nach Bömmel und Kleefeldt et al. (2017), Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

2.14.2 Fluoreszenzmarkiertes Dextran und Monozytenmigration

Die Permeabilität und die Transmigration von Leukozyten kann *in vitro* durch Transwell® Assays untersucht werden. Hierbei wird durch einen Einsatz die Zellkulturschale in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Der Filter im Transwelleinsatz reguliert durch seine Porengröße die Diffusion von Molekülen beziehungsweise Transmigration von Zellen, z.B. Monozyten. Um die endotheliale Barriere *in vitro* zu simulieren, wurden Endothelzellen als Monolayer auf dem Filter kultiviert. In Abhängigkeit von der Permeabilität der endothelialen Barriere können Moleküle diese überwinden. Für die Transmigration von Monozyten durch die Barriere spielt auch die Expression von Adhäsionsmolekülen eine Rolle (Muller und Luscinkas 2008; English et al. 2017). Abb.9 zeigt den funktionellen Aufbau des Transwell® Assays.

MyEnds wurden auf gelatinisierten Transwell® Einsätzen der Porengröße 0,8 µm (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in DMEM/ 10% FCS kultiviert. THP-1-Zellen wurden wie für den Adhäsionsassay mit 10 µM Calcein-AM in PBS für 1 h bei 37°C/ 5% CO₂ markiert. 10⁵ Calcein-markierte THP-1-Zellen wurden in Rhodamine B-Dextran haltigem Medium (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland; 1 mg/ml, 70 kDa) in das obere Kompartiment der Transwell® Einsätze gegeben. Nach 1h wurden die über die endotheliale Barriere migrierten Monozyten ausgezählt, sowie der Anteil des diffundierten Dextrans mittels eines Spektrophotometer (λ_{Ex} 485 nm; λ_{Em} 535 nm) im unteren Kompartiment bestimmt.

Versuche zur endothelialen Permeabilität in Aorten wurden auch mit fluoreszenzmarkiertem Dextran durchgeführt. Dazu wurden Aorten explantiert und auf einer Glasplatte in Ringsegmente von 3 mm Länge geschnitten. Diese Ringe wurden für 2 h mit 10 µM Alexa647-Dextran/ 0.2% BSA/ DMEM (alle: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden Negativkontrollen mit 0.2% BSA/ DMEM ohne Alexa647-Dextran inkubiert. Die

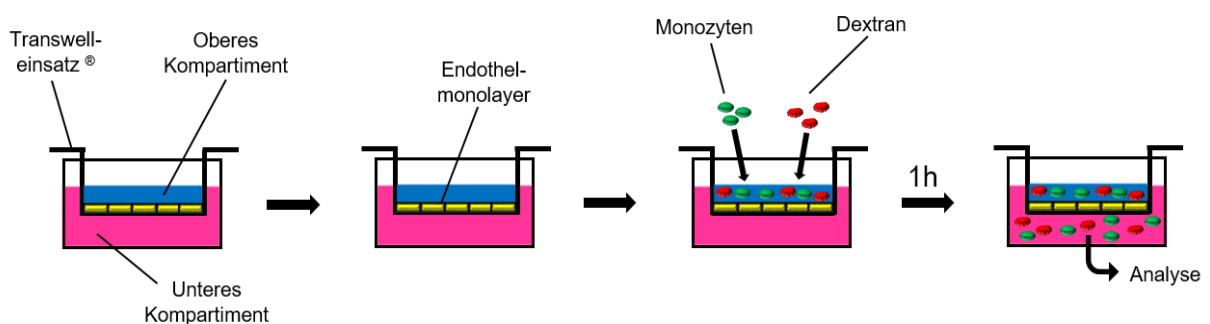


Abb.9: Schematische Darstellung des Transwell® Assays.

Aortenringe wurden im Anschluss 15 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert, mit einer feinen Schere eröffnet und mit dem Endothel nach oben auf einem Objektträger platziert. Der Erhalt der endothelialen Integrität nach der Präparation der Ringsegmente wurde mittels Texas Red-X-konjugiertem wheat germ Agglutinin (WGA) (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurden konfokale Aufnahmen der Ringsegmente mit einem NIKON Eclipse TI-E Mikroskop (Coherent Sapphire Laser, mbp communication visible fiber laser; Wellenlängen: 405, 488, 561, 647 nm; NIS-Elements Advanced Research Software; Nikon, Tokio, Japan) angefertigt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals von mindestens 10 Aufnahmen pro Aortenring wurde mittels ImageJ (1.47v, NIH, USA) bestimmt.

2.14.3 Transendotheliale elektrische Impedanzmessung

Durch „Electric Cell-substrate Impedance Sensing“ kann der Widerstand der endothelialen Barriere gemessen werden (Szulcek et al. 2014; Kho et al. 2017). Dazu wird die elektrische Impedanz mittels Wechselstroms bei 4000 Hz gemessen. Eine Abnahme des elektrischen Widerstand entspricht dabei einer Zunahme der endothelialen Permeabilität (Szulcek et al. 2014).

Für diese Untersuchungen wurden MyEnds in speziellen, mit Goldelektroden bestückten Zellkulturplatten zur Konfluenz kultiviert (ECIS, Applied Biophysics Inc., Troy, NY, USA). Zunächst wurden für 15 min die basalen Widerstandswerte der Endothelzellmonolayer bestimmt. Durch Zugabe von 50 ng/ml TNF- α allein oder in Präsenz des Src-Kinase-Inhibitors PP2 (10 μ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurde der Einfluss von TNF- α und Src-Kinase auf die endotheliale Barrierefunktion untersucht.

2.15 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen für Mittelwerte, SEM und Signifikanz erfolgten mittels Statistica 13.1 von Dell (Round Rock, TX, USA). Zeigten die Einzelwerte innerhalb der Gruppen eine Normalverteilung, wurde ein zweiseitiger Student's *t*-Test angewendet. Bei Nicht-Normalverteilung kam der Whitney Rank Sum-Test zur Anwendung. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde ein einseitiger Analysis of Variance-Test (ANOVA) durchgeführt. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikant (*) und $p < 0.001$ als hochsignifikant (***) definiert.

3 Ergebnisse

3.1 CEACAM1-Expression in murinen Arteriosklerosemodellen

Najjar et al. (2013) konnten zeigen, dass es in *Cc1^{-/-}* Mäusen auch ohne Fütterung einer hochkalorischen Diät spontan zur Ausbildung kleiner Arteriosklerose-ähnlicher Läsionen kommt. Ob umgekehrt Arteriosklerose die Expression von CEACAM1 beeinflusst, war bisher unbekannt. Deshalb wurden immunhistologische Untersuchungen zur Expression von CEACAM1 in zwei murinen Arteriosklerosemodellen durchgeführt. In Gefrierschnitten von Aortenbögen aus *ApoE^{-/-}* Mäusen, die für 3 Monate mit WD gefüttert worden waren, wurde CEACAM1 hauptsächlich in der Intima im Bereich arteriosklerotischer Plaques exprimiert (Abb.10A). Zudem zeigten adventitielle Zellen und einige Zellen am Intima-Media-Übergang ebenfalls CEACAM1-Expression. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der immunhistologischen Analyse von Aorten aus *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach dreimonatiger WD erhalten (Abb.10B). Allerdings war in diesem Arteriosklerosemodell CEACAM1 auch verstärkt außerhalb von Plauebereichen exprimiert. Unter ND war keine Expression von CEACAM1 in Aorten von *Ldlr^{-/-}* Mäusen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

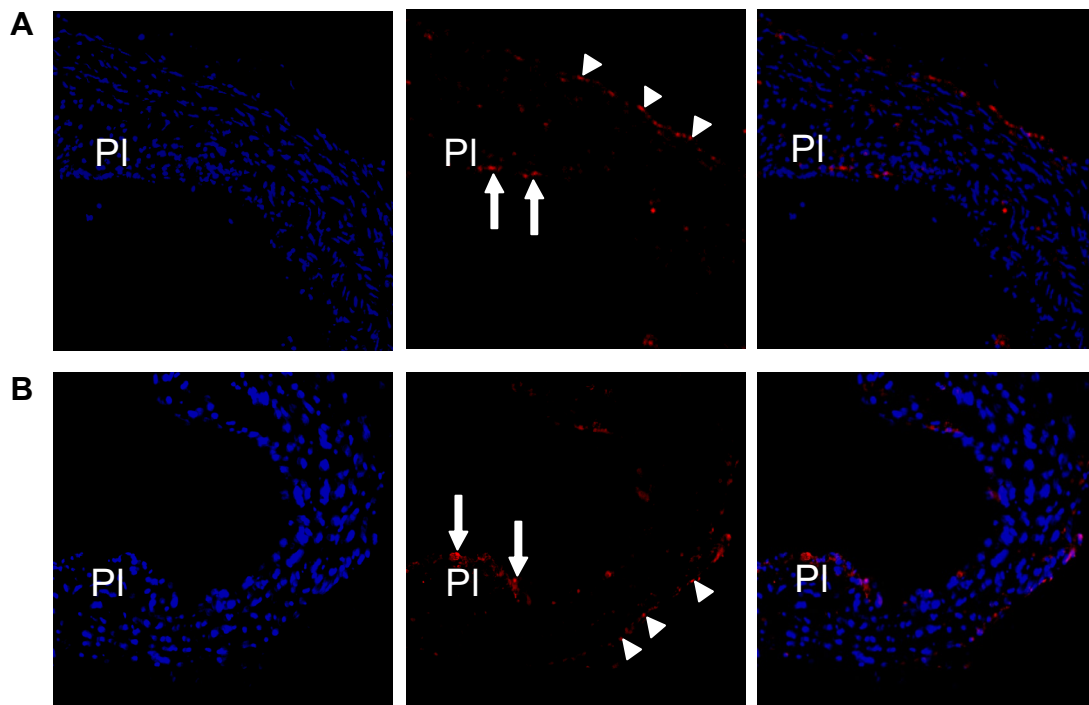


Abb.10: Expression von CEACAM1 in Aorten muriner Arteriosklerosemodelle. In Gefrierschnitten von Aorten aus *ApoE^{-/-}* Mäusen (A) und *Ldlr^{-/-}* Mäusen (B) wurden Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die immunhistologische Analyse zeigt eine Expression von CEACAM1 fast ausschließlich in Plauebereichen (PI, Pfeile) und innerhalb der Adventitia (Pfeilspitzen).

Diese Daten belegen eine stressabhängige differentielle Expression von CEACAM1 in Gefäßabschnitten mit atherosklerotischer Plaqueentwicklung. So stellte sich die Frage, inwieweit sich die endotheliale Expression unter diesen pathologischen Bedingungen protektiv oder aber eher verschlechternd auf die endotheliale Barriere auswirkt.

3.2 Morphologische Charakterisierung von Wildtyp und *Cc1^{-/-}* Endothelzellen

Die endotheliale Barriere spielt für die Initiation der Plaqueentwicklung eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Funktion besser untersuchen zu können, wurden Endothelzelllinien aus dem Myokard (MyEnds) von Wildtyp (WT) und *Cc1^{-/-}* Mäusen generiert.

In immunhistologischen Analysen beider Genotypen zeigten sich Unterschiede in der Zellmorphologie: Im Gegensatz zu den eher länglichen WT MyEnd-Zellen, wiesen *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen eine eher rundliche Morphologie auf (Abb.11). Die Färbung für VE-Cadherin zeigte darüber hinaus interzelluläre Lücken zwischen benachbarten *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen, welche im WT nicht nachweisbar waren. Weiterhin deutete die immunhistologische Darstellung von VE-Cadherin auf einen meanderförmigen Verlauf der Zellmembran von *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen hin (Abb.11). Damit gleicht der morphologische Phänotyp der *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen dem der aortalen Endothelzellen von *Cc1^{-/-}* Mäusen (Najjar et al. 2013).

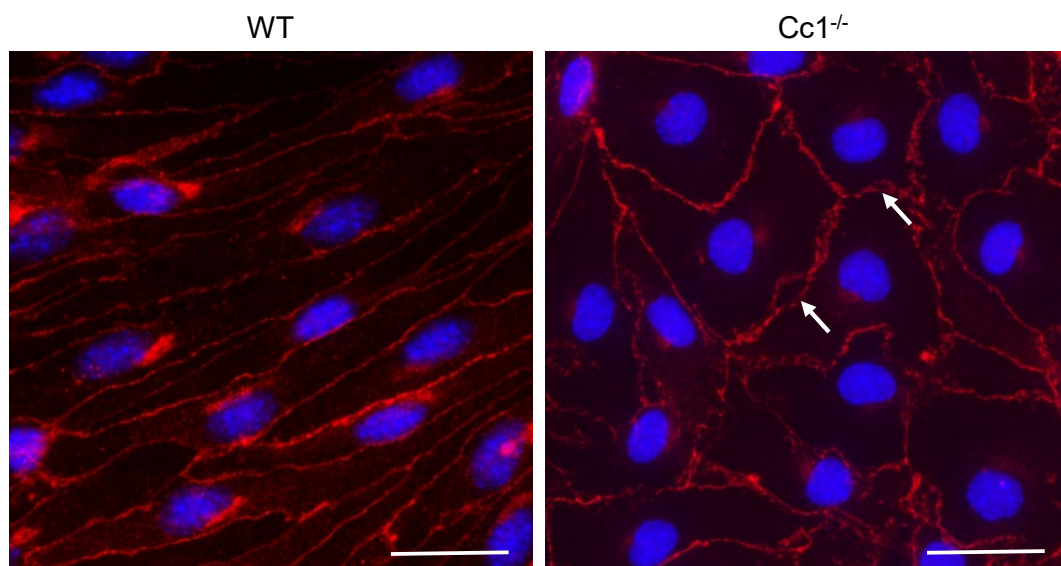


Abb.11: Zellmorphologische Unterschiede zwischen WT und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen
Färbungen für VE-Cadherin zeigen in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen im Gegensatz zum WT eine rundlichere Morphologie mit interzellulären Lücken (Pfeile) sowie einen eher meanderförmigen Verlauf der Zellmembran. Maßstabsbalken 25µm.

Aufgrund dieser Befunde stellen die generierten Endothelzelllinien ein geeignetes *in vitro* Modell für die Analyse des Einflusses von CEACAM1 auf die endotheliale Funktion dar.

3.3 Einfluss von CEACAM1 auf die sub-zelluläre eNOS Lokalisation

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) spielt für die Homöostase des Endothels eine wichtige Rolle (Heiss et al. 2014). Da die sub-zelluläre Lokalisation von eNOS dabei maßgeblich die Enzymaktivität beeinflusst (Tran et al. 2016), wurde der Einfluss von CEACAM1 darauf hin untersucht. In immunhistochemischen Analysen von WT MyEnd-Zellen zeigte eNOS eine überwiegende Membranlokalisierung (Abb.12). Demgegenüber war eNOS in CEACAM1-defizienten MyEnd-Zellen verstärkt perinukleär lokalisiert (Abb.12). Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden aus *Cc1^{-/-}* Aortenexplantaten überein (Najjar et al. 2013).

CEACAM1 ist, ähnlich wie eNOS, vorwiegend an der Zellmembran der Endothelzellen lokalisiert. Daher wurde mittels Co-Immunopräzipitationsanalysen die räumliche Nähe zwischen CEACAM1 und eNOS überprüft. In Lysaten von WT MyEnd-Zellen wurden unter Verwendung eines anti-CEACAM1 Antikörpers auch eNOS und das ebenfalls mit eNOS interagierende Molekül Caveolin-1 co-präzipitiert (Abb.13A). Damit wurde eine Komplexbildung zwischen allen drei Proteinen nachgewiesen. CEACAM1 könnte damit durch Interaktion zur Membranlokalisierung von eNOS beitragen.

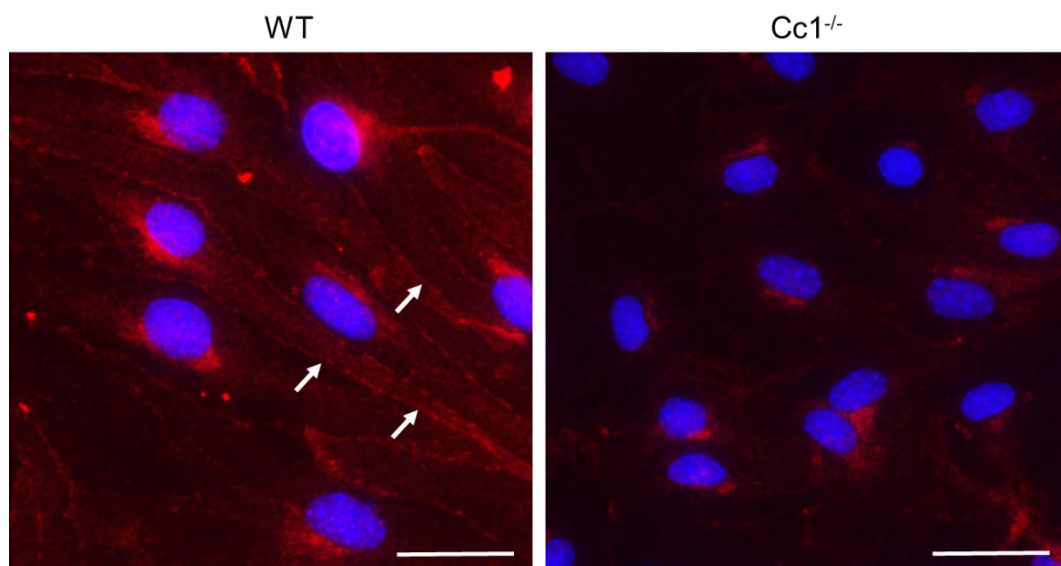


Abb.12: Einfluss von CEACAM1 auf die sub-zelluläre Lokalisation von eNOS. Immunfluoreszenzanalysen an WT und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen zeigen eine verstärkte Membranlokalisierung von eNOS im WT (Pfeile) im Gegensatz zum verstärkt perinukleären Verteilungsmuster im *Cc1^{-/-}*. Maßstabsbalken 25µm.

Da auch die Interaktion von eNOS mit Caveolin-1 zur Membranlokalisation beitragen kann, wurde untersucht, ob CEACAM1-Defizienz diese Interaktion beeinflusst. Dazu wurde nach Präzipitation mit einem anti-eNOS Antikörper das Präzipitat auf die Präsenz von Caveolin-1 untersucht. Dabei wurde eine verminderte Interaktion von Caveolin-1 mit eNOS in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen festgestellt (Abb.13B). Außerdem zeigte sich ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von eNOS am Serin¹¹⁷⁷.

Zur Membranverankerung von eNOS trägt auch Palmitoylierung des Proteins bei (Tran et al. 2016). Deshalb wurde die Palmitoylierung von eNOS in CEACAM1-exprimierenden und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen verglichen. Es zeigte sich eine deutlich verminderte Palmitoylierung von eNOS in Abwesenheit von CEACAM1 (Abb.14A). Der Palmitylrest kann durch Acyl-Protein Thioesterase-1 (APT1) auch wieder von eNOS abgespalten werden (Yeh et al. 1999). Mittels quantitativer real-time-PCR wurde in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen eine erhöhte Expression von APT1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abb.14B).

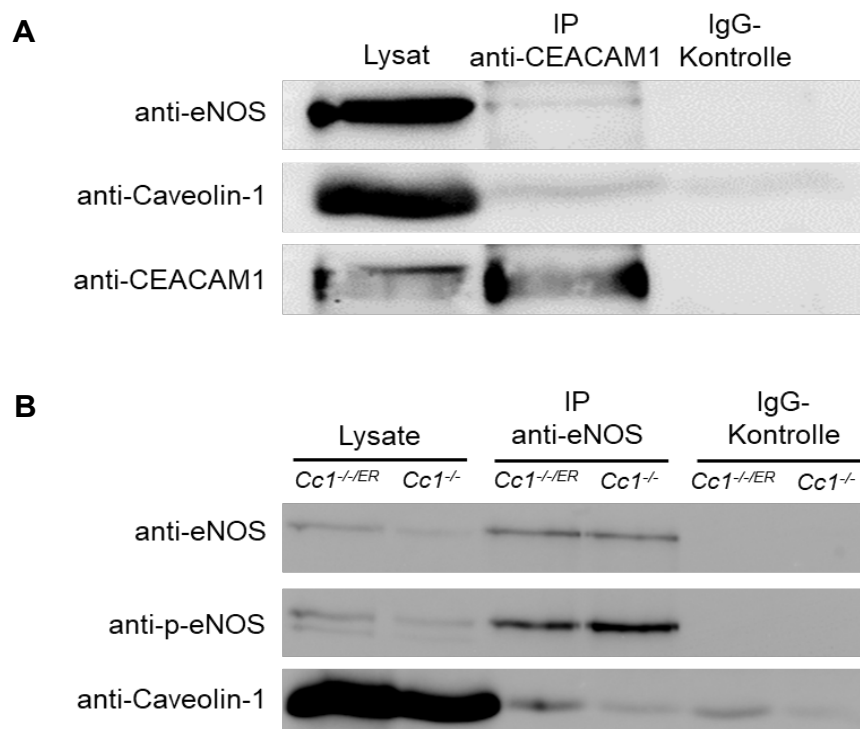


Abb.13: CEACAM1 bildet Komplexe mit eNOS und Caveolin-1.

Nach Präzipitation mit einem anti-CEACAM1 Antikörper waren im Präzipitat eNOS und Caveolin-1 detektierbar (A). In *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen war die Interaktion von eNOS mit Caveolin-1 vermindert. Dies könnte auf den verstärkten Ser¹¹⁷⁷ Phosphorylierungsgrad von eNOS zurückzuführen sein (B).

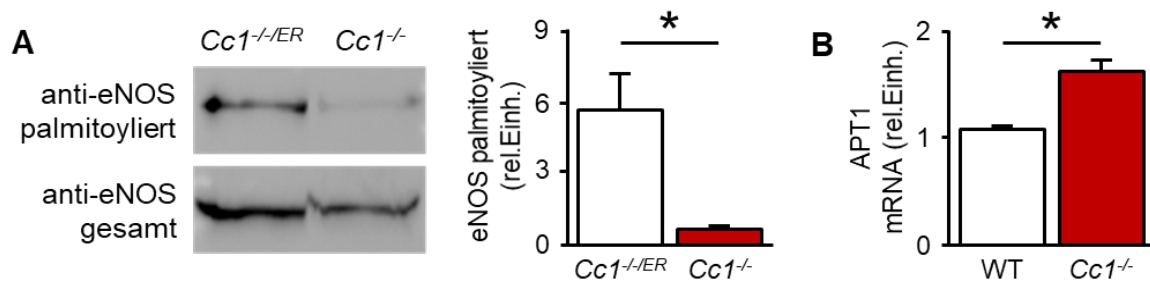


Abb.14: CEACAM1 beeinflusst die Palmytoylierung von eNOS via APT1.

Cc1^{-/-} MyEnd-Zellen weisen eine signifikant verminderte Palmitoylierung von eNOS auf (A). RT-PCR-Analysen belegen eine erhöhte mRNA-Expression der eNOS-depalmitoylierenden Acyl-Protein Thioesterase 1 (APT1) in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen (B).

3.4 Einfluss von CEACAM1 auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion

Najjar et al. (2013) konnten eine im Vergleich zum WT verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) in Aorten von *Cc1^{-/-}* Mäusen zeigen. Dieser Befund wurde durch eigene Versuche bestätigt (Abb.15A). Um zu überprüfen, ob die erhöhte LEI auf endothelialen Veränderungen beruht, wurden Zellen der humanen Monozytenzelllinie THP-1 bzw. der murinen Monozytenzelllinie P388D1(IL-1) mit Calcein markiert und die Adhäsion dieser Zellen an WT bzw. *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen quantifiziert. Dabei zeigten *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen eine erhöhte Adhäsivität gegenüber Monozyten beider Zelllinien (Abb.15B).

Die Adhäsion von Monozyten wird über Adhäsionsmoleküle wie das intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) vermittelt (Kevil et al. 2001). Mittels quantitativer real-time PCR wurde in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abb.15B).

Die Glykokalyx von Endothelzellen schränkt die Erreichbarkeit endothelialer Adhäsionsmoleküle und damit die Adhäsion von Immunzellen an das Endothel erheblich ein (Lipowsky 2011; McDonald et al. 2016). Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen erstmalig zeigen, dass die Glykokalyx des Aortenendothels in *Cc1^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen deutlich reduziert ist (Ghavampour et al. 2018). Die Analyse der Expression Glykokalyx abbauender Enzyme mittels quantitativer real-time PCR zeigte eine verstärkte Transkription von Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), Chondroitinase, sowie Hyaluronidase-2 in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen (Abb.16).

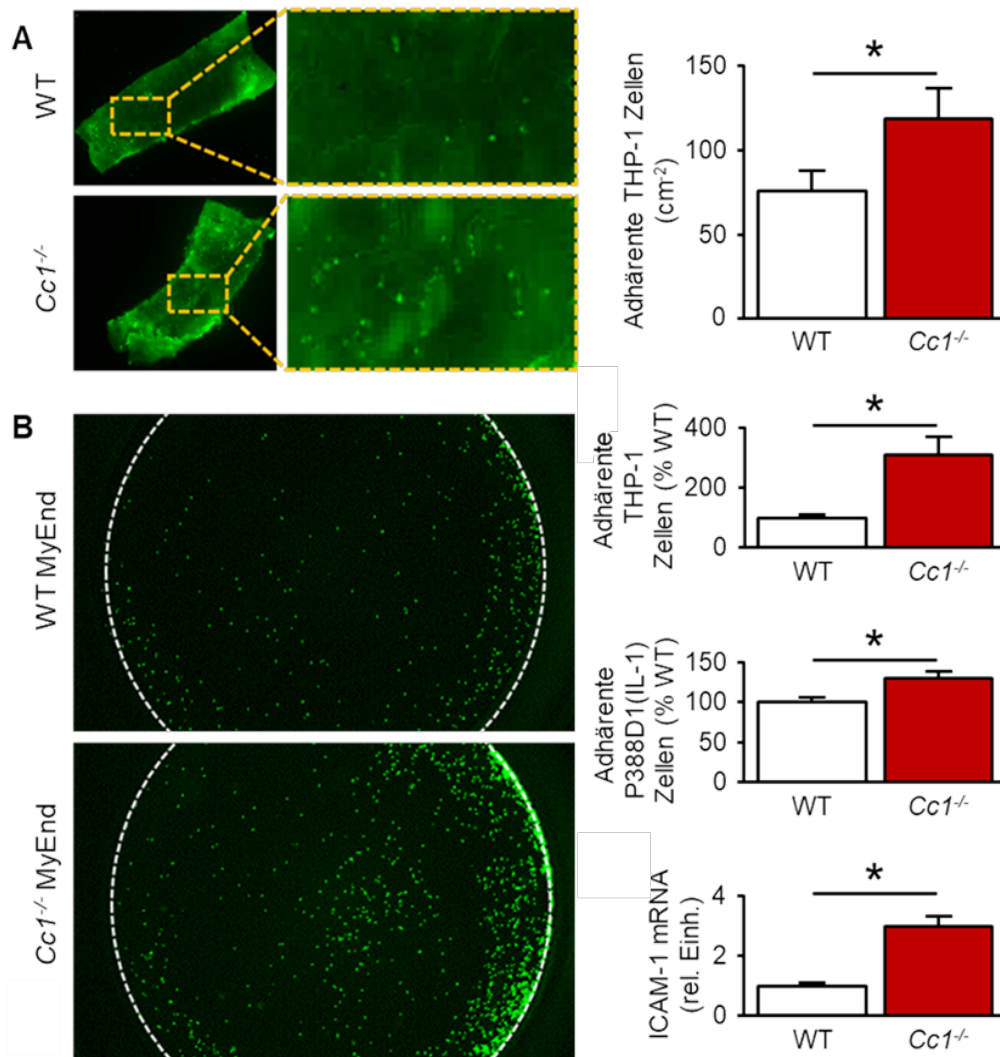


Abb.15: Verstärkte Monozyten-Endothel-Interaktion bei CEACAM1-Defizienz.

Calcein-markierte THP-1 Monozyten (grün) wiesen eine signifikant erhöhte Adhäsion an Aortenexplantate von *Cc1*^{-/-} Mäusen auf (A). Adhäsion von THP-1 und P388D1 (IL-1) Monozyten an WT und *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen. Die statistische Auswertung zeigte für beide Monozytenzelllinien eine stärkere Adhäsion an *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen. Die mRNA-Expression von ICAM-1 war in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen erhöht (B).

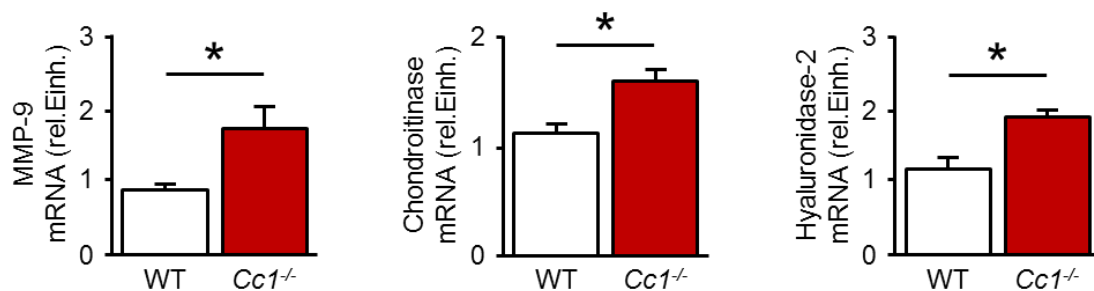


Abb.16 CEACAM1-abhängige Expression Glykokalyx-degradierender Enzyme in Endothelzellen.

Quantitative real-time PCR-Analysen zeigten eine verstärkte Transkription der Glykokalyx-degradierenden Enzyme MMP-9, Chondroitinase und Hyaluronidase-2 in *Cc1*^{-/-} MyEnds.

3.5 Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere

3.5.1 Einfluss von CEACAM1 auf die basale endotheliale Permeabilität *in vitro*

Aufgrund der histomorphologischen Unterschiede zwischen WT und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen (Abb.11) wurde der Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere untersucht. Hierfür wurde zunächst *in vitro* mittels Messung des trans-endothelialen Widerstandes (trans-endothelial electrical resistance, TEER) untersucht, ob CEACAM1 die Barrierefunktion beeinflusst. Hierbei zeigte sich basal ein deutlich verminderter elektrischer Widerstand in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellkulturen, was einer erhöhten Permeabilität entspricht (Abb.17A). Die erhöhte basale Permeabilität von *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellkulturen wurde durch Diffusionsexperimente mit Fluoreszenz-markiertem Dextran sowie durch Transmigrationsexperimente mit THP-1 Zellen bestätigt (Abb.17B,C).

3.5.2 Evans Blue zur quantitativen Bestimmung der endothelialen Barrierestörung *in situ*

Eine Störung der endothelialen Barriere stellt einen initialen Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose dar. Deshalb ist es von Interesse die endotheliale Barrierefunktion vor Entstehung arteriosklerotischer Plaques auch *in situ* messen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein bisher als Miles-Assay verwendetes Verfahren modifiziert und für die Permeabilität der großen Gefäße etabliert – der Evans Blue-Assay.

Basierend auf Literaturangaben wurden Mäuse im Alter von 3 Monaten nach weiterer einmonatiger ND bzw. WD analysiert (Whitman 2004). Um auszuschließen, dass es unter den gewählten Bedingungen bereits zu einer Plaquentwicklung kommt, wurden

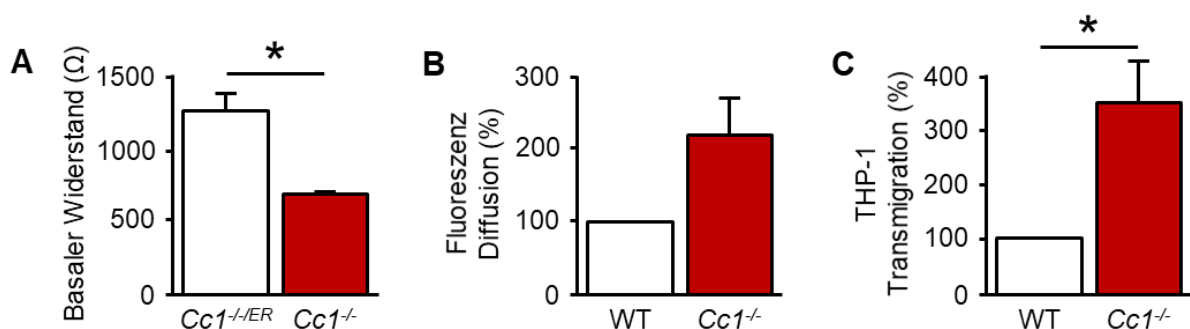


Abb.17 Einfluss von CEACAM1 auf die Permeabilität von MyEnd-Zellkulturen unter Basalbedingungen.

Der trans-endotheliale Widerstand von *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellkulturen ist basal vermindert (A). Die Diffusion von Fluoreszenz-markiertem Dextran (B), als auch die Transmigration von THP-1 Monozyten (C) durch einen Endothelzellmonolayer ist bei CEACAM1-Defizienz erhöht.

Aorten dieser Mäuse zunächst auf arteriosklerotische Plaques hin untersucht. Oil Red O-Färbungen stellen eine etablierte Methode zum Nachweis arteriosklerotischer Plaques dar (Andres-Manzano et al. 2015). Diese Analysen ergaben, dass nur *ApoE*^{-/-} Mäuse unter ND eine deutliche Plaqueentwicklung zeigten. Dagegen waren Aorten von *Ldlr*^{-/-} Mäusen (unter ND und WD), sowie WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen (beide unter ND) frei von arteriosklerotischen Plaques (Abb.18).

Für die murinen Arteriosklerosemodelle *ApoE*^{-/-} und *Ldlr*^{-/-} wurde eine deutlich stärkere intimale Evans Blue Deposition nach einmonatiger WD nachgewiesen (Abb.19A,B). Da beide Modelle nach längerer Fütterung von WD verstärkt arteriosklerotische Plaques bilden, spricht dieser Befund für eine verlässliche und frühzeitige Detektion einer endothelialen Barrierestörung durch den Evans Blue Assay. Darüber hinaus zeigten *ApoE*^{-/-} Mäuse auch unter ND eine stärkere intimale Färbung in allen drei Aortenabschnitten. Dies stimmt mit der Beobachtung einer spontanen Plaquebildung in diesem Tiermodell auch unter ND überein (Abb.18). Nach Verifizierung der Eignung des Evans Blue Assays wurde damit die endotheliale Barrierefunktion von WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen vergleichend analysiert (Abb.19C). In 3 Monate alten Tieren unter ND resultierte CEACAM1-Defizienz in einer verstärkten intimalen Evans Blue Deposition, die auf eine endotheliale Barrierestörung in jungen *Cc1*^{-/-} Mäusen hinweist.

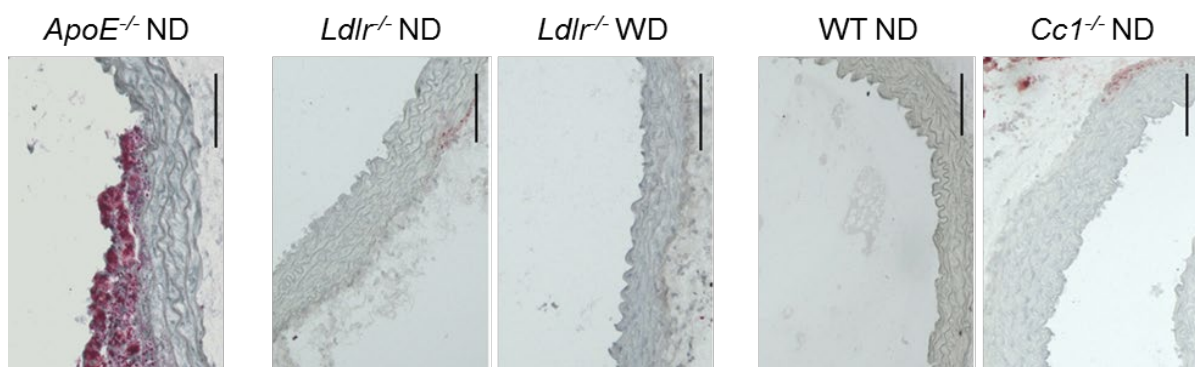


Abb.18: Plaqueentwicklung in verschiedenen Mausmodellen.

Mäuse verschiedener Genotypen wurden im Alter von 3 Monaten für einen weiteren Monat normokalorisch (ND) bzw. hochkalorisch (WD) ernährt. Gefrierschnitte von Aortenbögen dieser Mäuse wurden mittels Oil Red O gefärbt, um die Ausprägung arteriosklerotischer Plaques zu untersuchen. Nur in *ApoE*^{-/-} Mäusen war eine deutliche Plaqueentwicklung nachweisbar. Maßstabsbalken 100μm.

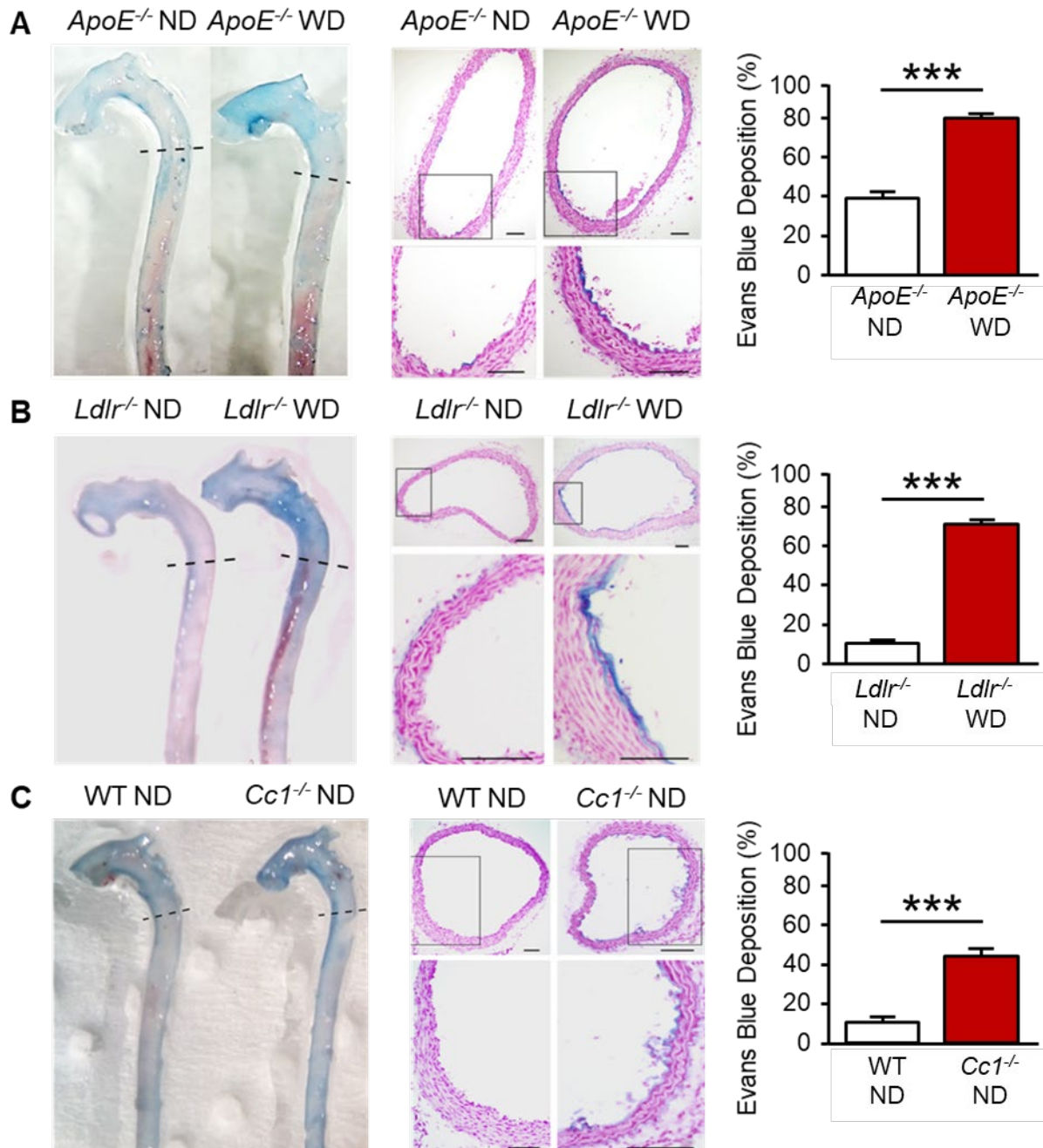


Abb.19: Nachweis verminderter endothelialer Barrierefunktion mittels Evans Blue Assay.

Dargestellt sind gesamte Aorten (links), Aortenschnitte (Mitte) und die statistische Auswertung der intimalen Evans Blue Deposition (rechts) in Aortenbögen. Die Analysen der murinen Arteriosklerosemodelle *ApoE*^{-/-} (A) und *Ldlr*^{-/-} (B) belegen die Zuverlässigkeit des Evans Blue Assays bei der Detektion von Barrierestörungen. Auch in *Cc1*^{-/-} Mäusen ist eine verstärkte intimale Evans Blue Deposition in der Intima von Aortenbögen nachweisbar (C). Maßstabsbalken 100µm. (Abbildung modifiziert nach Bömmel und Kleefeldt et al. (2017), Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

3.5.3 Permeabilitätsmessungen an Aortenringen aus WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen

Die unter Verwendung des neu etablierten Evans Blue Assays erhaltenen Daten sollten mittels eines weiteren Permeabilitätsassays überprüft werden. Dafür wurden Aortenringe von 3 Monate alten WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen mit Fluoreszenz-markiertem Dextran für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen der Aortenringe wurden Gewebeschnitte angefertigt und das intimal deponierte Dextran detektiert und quantifiziert. Für WT und *Cc1*^{-/-} Aorten war die Autofluoreszenz des Gewebes vernachlässigbar gering. Analog zu den Evans Blue Analysen zeigte sich eine verstärkte Einlagerung Fluoreszenz-markierten Dextrans in Aortenringe aus *Cc1*^{-/-} Mäusen (Abb.20).

3.5.4 Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere im Alter

Alter stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung von Arteriosklerose dar (Head et al. 2017). Deshalb wurde auch die endotheliale Barrierefunktion von Mäusen im Alter von 9 Monaten mittels Evans Blue Assay untersucht. Im Gegensatz zu 3 Monate alten Mäusen war dabei die endotheliale Permeabilität im WT deutlich höher als in *Cc1*^{-/-} Mäusen. Im WT stieg die intimale Evans Blue Deposition im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren sehr stark an, während sie in gealterten *Cc1*^{-/-} Mäusen abnahm (Abb.21).

3.5.5 Einfluss von CEACAM1 auf die altersbedingte vaskuläre TNF- α Expression

Aus der Literatur ist bekannt, dass es im Rahmen des Alterungsprozesses zu einer erhöhten vaskulären Expression des pro-inflammatorischen TNF- α kommt (Royall et al. 1989; Angelini et al. 2006; Marcos-Ramiro et al. 2014). In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die vaskuläre Expression von TNF- α in 9 Monate alten WT Mäusen deutlich höher ist, als in Aorten gleichaltriger *Cc1*^{-/-} Mäuse (Abb.22).

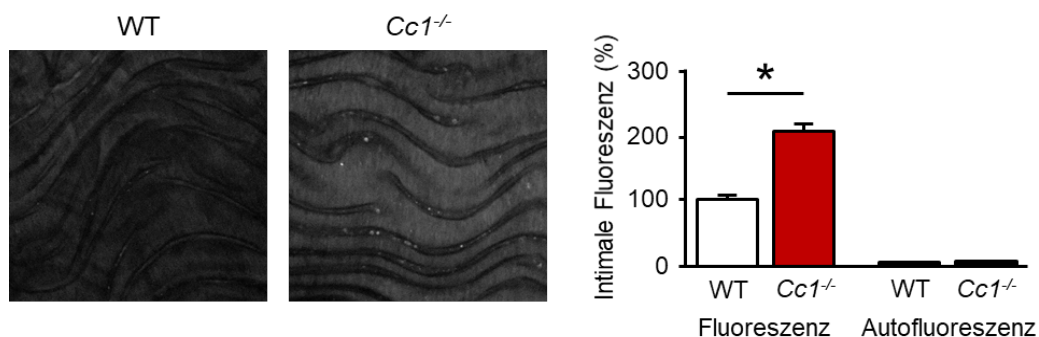


Abb.20: Permeabilitätsmessungen an Aortenringen aus WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen.

Nach Inkubation von Aortenringen mit Fluoreszenz-markiertem Dextran wurde die im Gewebe verbliebene Fluoreszenz quantifiziert. Die erhöhte basale Fluoreszenzdeposition bei CEACAM1-Defizienz bestätigt die Ergebnisse des Evans Blue Assays.

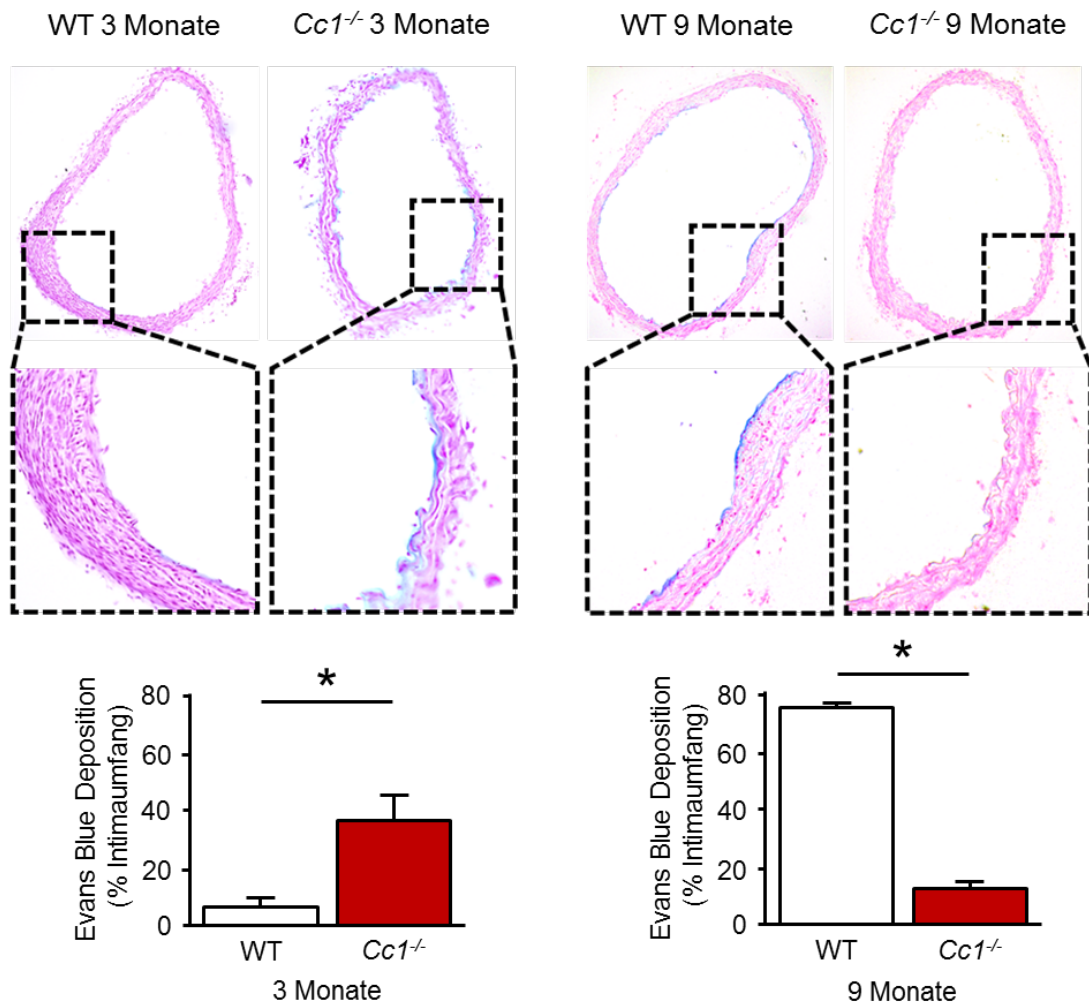


Abb.21: Altersabhängiger Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere. Im Alter von 3 Monaten (jung) weisen *Cc1*^{-/-} Mäuse eine stärkere endotheliale Permeabilität für Evans Blue im Vergleich zu WT Mäusen auf. Dagegen zeigt sich im Alter von 9 Monaten (gealtert) eine verstärkte Permeabilität in Aorten von WT Mäusen, wogegen *Cc1*^{-/-} Mäuse eine verminderte endotheliale Permeabilität aufweisen.

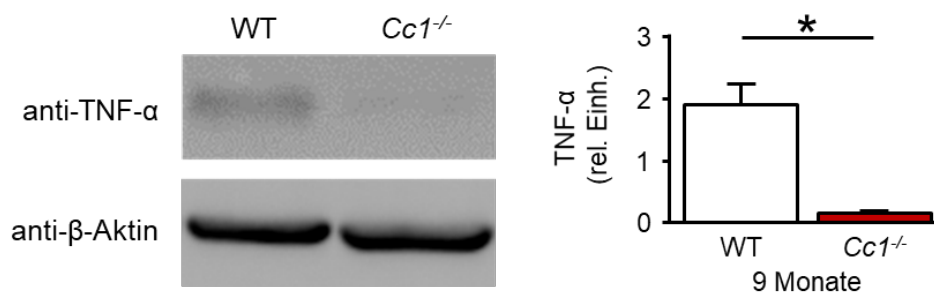


Abb.22: Einfluss von CEACAM1 auf die vaskuläre Expression von TNF-α. Im Alter von 9 Monaten ist in Aorten von WT Mäusen eine deutlich stärkere Expression von TNF-α nachweisbar.

3.5.6 Modulation der TNF- α -induzierten Barrieredysfunktion durch CEACAM1

Neben der Analyse des Einflusses von CEACAM1 auf die vaskuläre TNF- α Expression sollte auch ein möglicher Effekt auf die Wirkung von TNF- α untersucht werden. Dazu wurden Aortenringe aus WT und *Cc1*^{-/-} Mäusen mit TNF- α inkubiert bzw. unbehandelt gelassen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Dextran und die endotheliale Permeabilität wurde anhand der intimalen Fluoreszenz bestimmt. In Aortenringen aus WT Mäusen erhöhte TNF- α die endotheliale Permeabilität tendenziell. In Aortenringen aus *Cc1*^{-/-} Mäusen wurde die Permeabilität durch TNF- α dagegen vermindert (Abb.23A). Der Einfluss von CEACAM1 auf die TNF- α -vermittelte Modulation der endothelialen Barriere wurde ebenfalls mittels TEER-Analysen an MyEnd-Zellkulturen untersucht (Abb.23B). Analog zu den Analysen an Aortenringen führte die Zugabe von TNF- α zu einer verstärkten Permeabilität (geringerer Widerstand) bei CEACAM1-exprimierenden MyEnd-Zellen, wohingegen TNF- α bei *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellkulturen die Permeabilität verminderte (erhöhter Widerstand).

3.6 Einfluss von CEACAM1 auf die Stabilität von Adherens Junctions

Adherens Junctions spielen eine zentrale Rolle für die endotheliale Barrierefunktion (Giannotta et al. 2013). Die Stabilität dieser Kontakte wird durch phosphoryliertes Caveolin-1 (Sun et al. 2009; Kronstein et al. 2012) und den Phosphorylierungsstatus der beteiligten AJ-Proteine (Bertocchi et al. 2012) moduliert. Aufgrund der Unterschiede in der Permeabilität zwischen WT und *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen, wurde der Einfluss von CEACAM1 auf Caveolin-1 und AJ-Proteine untersucht.

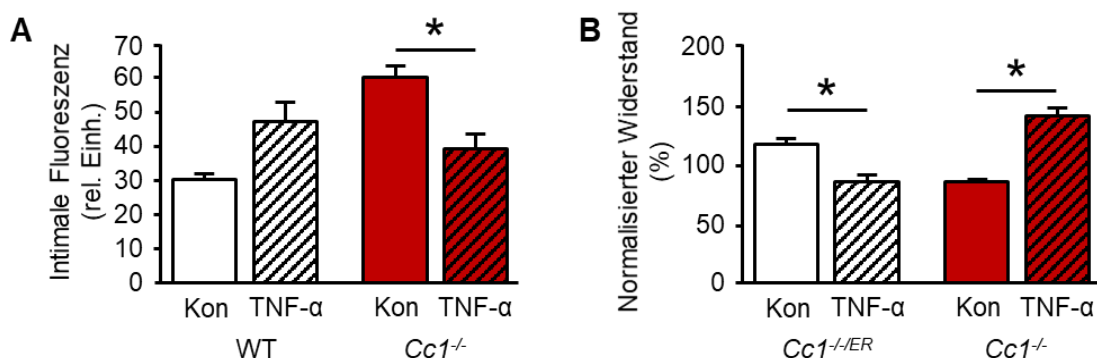


Abb.23: Einfluss von CEACAM1 auf die TNF- α -abhängige Regulation der endothelialen Permeabilität.

Intimale Einlagerung von Fluoreszenz-markiertem Dextran in unbehandelte und TNF- α -vorinkubierte Aortenringe (A). TEER-Analysen an MyEnd-Zellkulturen ohne und mit TNF- α -Stimulation (B). In CEACAM1-exprimierenden MyEnd-Zellkulturen erhöht TNF- α die Permeabilität, während sie bei CEACAM1-Defizienz durch TNF- α vermindert wird.

3.6.1 Expression und Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1

Cc1^{-/-} MyEnd-Zellen weisen eine verstärkte basale Expression von Caveolin-1 auf (Abb.24). Darüber hinaus ist auch die Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1 unter Basalbedingungen in *Cc1*^{-/-} im Vergleich zu WT MyEnd-Zellen erhöht (Abb.24). Nach Stimulation mit TNF- α ändert sich die Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1 in WT MyEnd-Zellen nicht. Dagegen kommt es in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen zu einer Tyrosin-Dephosphorylierung von Caveolin-1 nach TNF- α -Stimulation (Abb.24).

3.6.2 TNF- α -induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Adherens Junction Proteinen

Unter Basalbedingungen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression oder Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin bzw. VE-Cadherin zwischen WT und *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen (Abb.25).

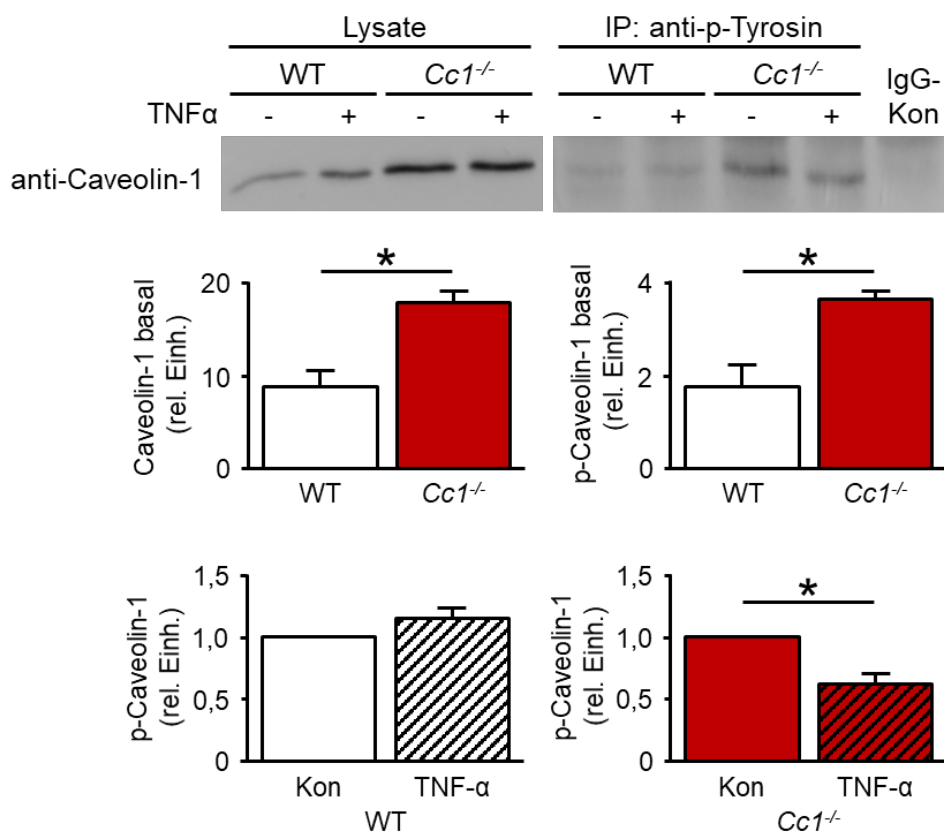


Abb.24: Einfluss von CEACAM1 auf die Expression und Phosphorylierung von Caveolin-1.

In *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen ist Caveolin-1 unter Basalbedingungen stärker exprimiert und auch am Tyrosinrest phosphoryliert als im WT (obere Reihe). TNF- α ändert die Tyrosin-Phosphorylierung in WT MyEnd-Zellen nicht, führt aber in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen zu einer reduzierten Phosphorylierung (untere Reihe).

Nach Inkubation von WT MyEnd-Zellen mit TNF- α war die Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin signifikant und die von VE-Cadherin tendenziell erhöht (Abb.25). Im Gegensatz dazu induzierte TNF- α in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen eine Dephosphorylierung von β -Catenin (Abb.25). Die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin wies in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen nach Behandlung mit TNF- α keine signifikante Änderung auf (Abb.25).

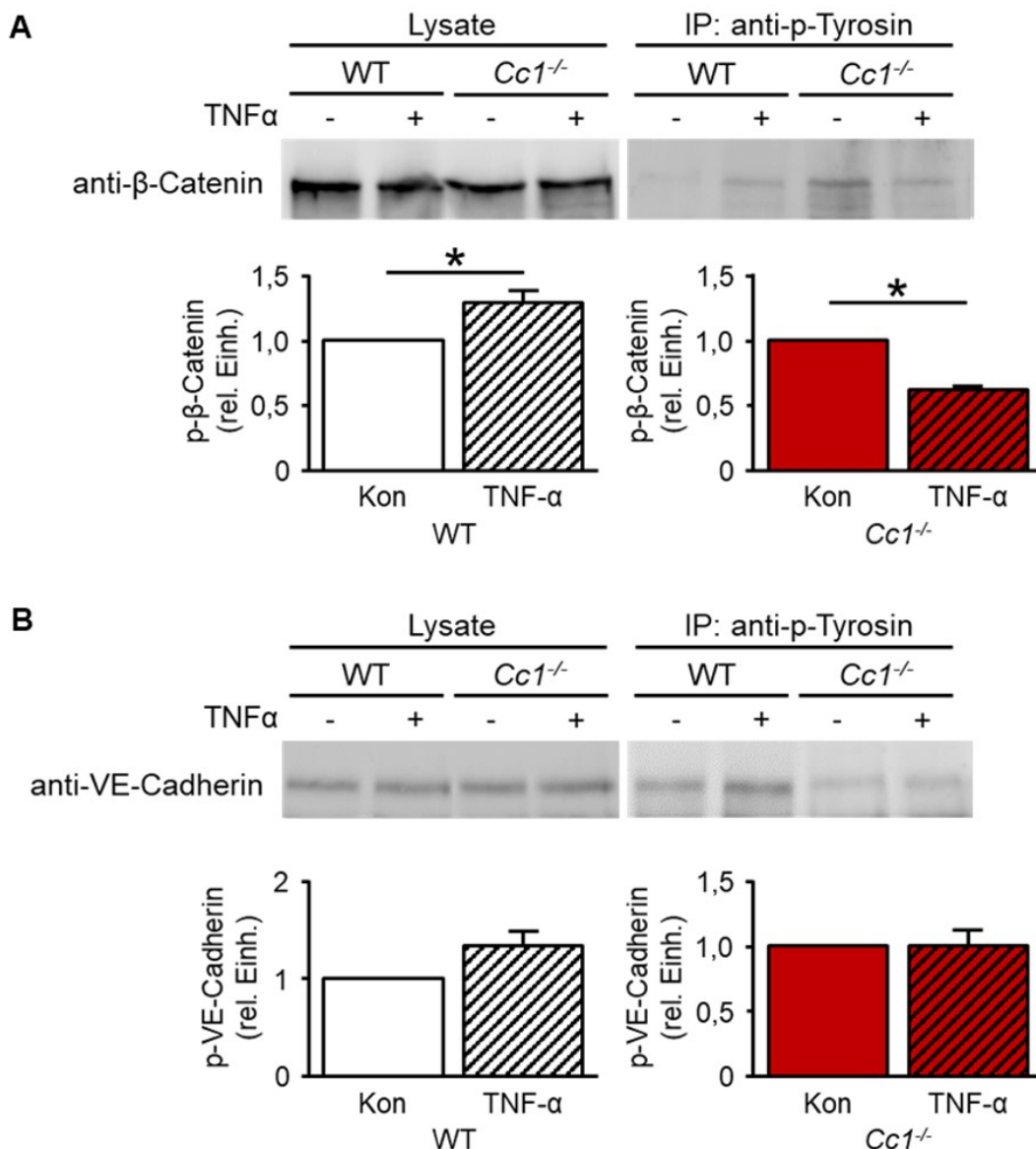


Abb.25: Einfluss von CEACAM1 auf die Phosphorylierung von AJ-Proteinen.

Nach TNF- α -Inkubation nimmt in WT MyEnd-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin zu, während sie in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen durch TNF- α vermindert wird (A). Dagegen wird die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin durch TNF- α weder in WT, noch in *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen signifikant beeinflusst (B).

Um zu untersuchen, wie CEACAM1 die TNF- α -induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin beeinflusst, wurden Co-Immunopräzipitationsexperimenten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in WT MyEnd-Zellen nach TNF- α -Inkubation VE-Cadherin und Src-Kinase verstärkt mit CEACAM1 co-präzipitiert werden konnten (Abb.26A). Darüber hinaus war nur in WT MyEnd-Zellen eine verstärkte Co-Präzipitation von Src-Kinase mit β -Catenin nach TNF- α -Inkubation nachweisbar (Abb.26B).

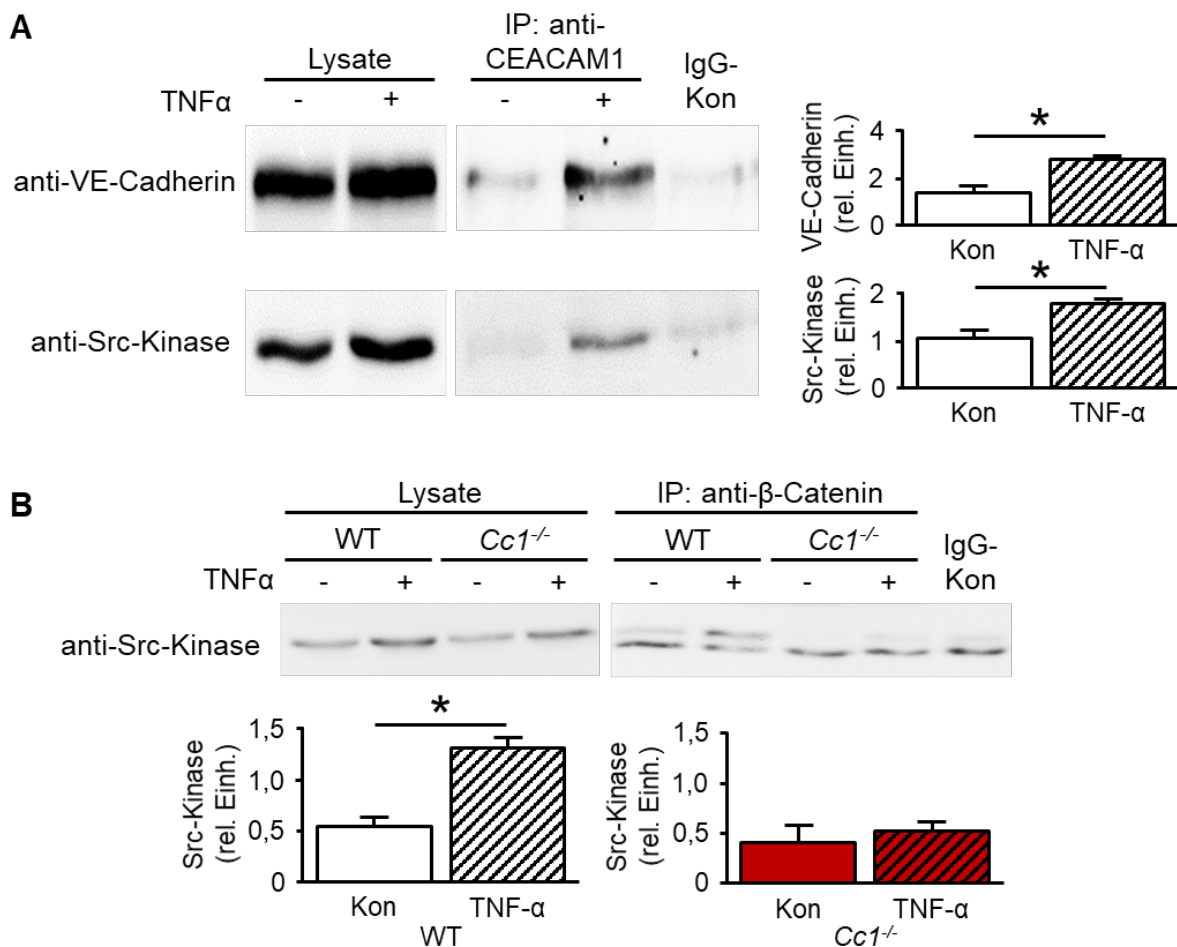


Abb.26: Verstärkte Komplexbildung von CEACAM1 mit AJ-Proteinen und Src-Kinase nach TNF- α -Inkubation.

Co-Immunpräzipitationsanalysen mit einem anti-CEACAM1-Antikörper zeigen eine verstärkte Komplexbildung von CEACAM1 mit VE-Cadherin und Src-Kinase in WT MyEnd-Zellen nach TNF- α -Inkubation (A). Nur in WT MyEnd-Zellen induziert TNF- α eine verstärkte Interaktion von β -Catenin mit Src-Kinase (B).

4 Diskussion

4.1 CEACAM1 stabilisiert Morphologie und Integrität des Endothels – „Notfallhelfer“ bei endotheliale Stress?

Es ist seit längerem bekannt, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle bei Gefäßneubildungen, d.h. bei Vaskulogenese und Angiogenese spielt (Ergun et al. 2000; Kilic et al. 2005). So ist CEACAM1 ein wesentlicher Faktor für die Reifung neu gebildeter Gefäße, z.B. im Rahmen von Tumor-Neovaskularisierung (Nouvion et al. 2010; Gerstel et al. 2011).

Najjar et al. (2013) konnten zum ersten Mal zeigen, dass CEACAM1 auch in die Homöostase reifer Gefäße involviert ist. Sechs Monate alte CEACAM1-defiziente Mäuse entwickelten ohne hochkalorische Fütterung spontan kleine Arteriosklerose-ähnliche Läsionen im Bereich der Aortenwurzel. Dies ging einher mit einer gestörten Integrität des Endothels, verminderter vaskulärer Expression von eNOS, sowie verstärkter endothelialer Adhäsivität gegenüber Leukozyten (Najjar et al. 2013). Dies deutete darauf hin, dass CEACAM1 eine atheroprotektive Rolle in ausgereiften Gefäßen spielen könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte an CEACAM1-exprimierenden (WT) und -defizienten (*Cc1^{-/-}*) MyEnd-Zellen *in vitro* verifiziert werden, dass CEACAM1 die endotheliale Morphologie und Integrität unterstützt. So wiesen WT MyEnd-Zellen eine längliche Morphologie auf, während *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen eher rundlich erschienen. Noch wesentlicher war aber der Befund, dass *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen *in vitro*, ganz ähnlich zum Aortenendothel in *Cc1^{-/-}* Mäusen *in vivo* (Najjar et al. 2013), inter-zelluläre Lücken zeigten, die auf eine gestörte Barrierefunktion bei CEACAM1-Defizienz hinwiesen. Daraus kann abgeleitet werden, dass diese morphologisch-funktionellen Veränderungen Endothelzell-autonome Effekte der CEACAM1-Defizienz darstellen.

Während diese Befunde eine atheroprotektive Rolle von CEACAM1 weiter stützen, blieb es unklar, inwieweit Arteriosklerose Einfluss auf die Expression von CEACAM1 nimmt. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst Aorten von *ApoE^{-/-}* sowie *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach dreimonatiger hochkalorischer Ernährung immunhistologisch auf eine Expression von CEACAM1 untersucht. Dabei zeigte sich eine Expression von CEACAM1 hauptsächlich im Bereich arteriosklerotischer Plaques, sowohl in der Intima als auch in Zellen der Adventitia. Dagegen war CEACAM1 in makroskopisch nicht veränderten Gefäßabschnitten nur sehr gering oder nicht exprimiert. Darüber hinaus war CEACAM1 in Aorten normokalorisch ernährter

Ldlr^{-/-} und WT Mäuse nicht nachweisbar. Da WT und *Ldlr*^{-/-} Mäuse unter normokalorischer Ernährung keine arteriosklerotischen Plaques entwickeln (Whitman 2004; Getz und Reardon 2012), stützen auch diese Befunde eine Ko-Inzidenz von arteriosklerotischer Plaque-Entwicklung und Hochregulation der CEACAM1-Expression in den damit assoziierten Endothelzellen. Da vaskuläre CEACAM1-Expression atheroprotektiv zu sein scheint und Endothel, welches arteriosklerotische Plaques bedeckt, einer Vielzahl von Stressoren ausgesetzt ist, z.B. inflammatorischen Mediatoren, könnte man die im Plaqueareal induzierte endotheliale CEACAM1-Expression als eine Art „Notfallmaßnahme“ des Endothels interpretieren, um die vaskuläre Homöostase wiederherzustellen.

4.2 CEACAM1 unterstützt die membranäre Lokalisation von eNOS über direkte und indirekte Mechanismen

Eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) kennzeichnet eine beginnende endotheliale Dysfunktion (Sitia et al. 2010; Ganz und Hsue 2013; Liao 2013). Diese gilt als initialer Schritt bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques (Ichiki et al. 2013; Chistiakov et al. 2015; Roth Flach et al. 2015; Gimbrone und García-Cardena 2016). NO vermittelt nicht nur Vasorelaxation, sondern verringert darüber hinaus auch die Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen und vermindert die Oxidation von LDL (Gauthier et al. 1995; Carreau et al. 2011; Ponnuswamy et al. 2011; Sena et al. 2013).

Najjar et al. (2013) konnten bereits zeigen, dass CEACAM1-Defizienz über eine verringerte vaskuläre Expression von eNOS zu verringerter NO-Bioverfügbarkeit führt. Die Aktivität von eNOS wird aber nicht nur durch das Expressionsniveau bestimmt. Auch die sub-zelluläre eNOS-Lokalisation beeinflusst die Bildung von NO. An der Plasmamembran lokalisierte eNOS zeigt eine stärkere NO-Bildung als peri-nukleär-zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym (Govers und Rabelink 2001; Zhang et al. 2006). Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss von CEACAM1 auf die sub-zelluläre Lokalisation von eNOS untersucht. In immunhistologischen Analysen war eNOS in WT MyEnd-Zellen deutlich an der Zellmembran lokalisierbar. Dagegen war bei CEACAM1-Defizienz die Membranlokalisierung deutlich vermindert und eNOS eher peri-nukleären-zytoplasmatisch detektierbar. Diese sub-zelluläre Translokation von eNOS bei CEACAM1-Defizienz trägt sehr wahrscheinlich zur verminderten NO-Bioverfügbarkeit in *Cc1*^{-/-} Mäusen bei.

Da CEACAM1 ein transmembranäres Protein ist (Rueckschloss et al. 2016), könnte CEACAM1 als Ankerprotein für eNOS an der Zellmembran dienen. Unsere Gruppe konnte in immunelektronenmikroskopischen Analysen zum ersten Mal zeigen, dass CEACAM1 in Endothelzellen auch in Caveolen lokalisiert ist (Ghavampour et al. 2018). Caveolen sind Cholesterin-reiche Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran (Fielding und Fielding 2000), in denen auch eNOS zu finden ist. Die durchgeführten Co-Immunopräzipitationsexperimente deuten auf eine Komplexbildung von CEACAM1 mit eNOS und Caveolin-1 hin. Da Feron et. al (1996) zeigen konnten, dass eNOS mit Caveolin-1 interagiert, könnte die Interaktion zwischen CEACAM1 und eNOS auch über Caveoline vermittelt sein. Insgesamt stützen diese Befunde eine Rolle für CEACAM1 als Membrananker für eNOS.

Die Verankerung von Proteinen an der Zellmembran wird auch durch Palmitoylierung vermittelt (Aicart-Ramos et al. 2011). Sowa et al. (1999) beobachteten in Zellen, die eine palmitoylierungs-defiziente eNOS-Mutante exprimierten, eine sub-zelluläre Umverteilung von der Zellmembran in das peri-nukleäre Kompartiment. Da die beobachtete Translokation von eNOS bei CEACAM1-Defizienz diesem Befund sehr ähnelt, wurde die Palmitoylierung von eNOS in WT und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen untersucht. Die Analysen ergaben eine deutlich verminderte Palmitoylierung von eNOS bei CEACAM1-Defizienz. Palmitoylierung stellt, im Gegensatz zu anderen Lipidmodifikationen von Proteinen, einen dynamischen, d.h. reversiblen Prozess dar. Durch Depalmitoylierung kann die Membranbindung von Proteinen wieder aufgehoben werden (Conibear und Davis 2010). Für eNOS spielt dabei die Acyl-Protein Thioesterase-1 (APT1) eine wesentliche Rolle (Yeh et al. 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression von APT1 in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen nachgewiesen, die sehr wahrscheinlich zur verminderten Palmitoylierung und somit zur verringerten Membranlokalisation von eNOS beiträgt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass CEACAM1 über verschiedene Mechanismen, direkt als Membrananker und indirekt durch Hemmung der APT1-Expression, zur Membranlokalisation von eNOS und damit zu einer adäquaten NO-Bildung in Endothelzellen beiträgt.

4.3 CEACAM1 reduziert LEI – Einfluss auf Expression und Zugänglichkeit endothelialer Adhäsionsmoleküle

Neben der Relaxation von Gefäßen vermittelt eNOS über NO anti-adhäsive Eigenschaften des Endothels. NO hemmt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie dem vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und dem intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), die die Transmigration von Leukozyten vermitteln (Biffi et al. 1996; Khan et al. 1996, Ley et al. 2007; Gerhardt und Ley 2015; Shihata et al. 2016). Deshalb resultieren Beeinträchtigungen der NO-Bildung in einer verstärkten LEI (Gauthier et al. 1995; Carreau et al. 2011; Ponnuswamy et al. 2011).

Diesen Befunden entsprechend zeigen Aorten von *Cc1^{-/-}* Mäusen, die eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit aufweisen, eine verstärkte Expression von VCAM-1, sowie eine verstärkte LEI (Najjar et al. 2013). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst an Aortenexplantaten aus WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen verifiziert werden. Darüber hinaus wurden ähnliche Befunde auch für WT und *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen erhoben: sowohl murine P388D1(IL-1) Monozyten als auch humane THP-1 Leukozyten adhärten verstärkt an *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen. Zudem wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen nachgewiesen. Auch hier deuten die vorgelegten Befunde auf einen Endothel-autonomen Mechanismus der CEACAM1-vermittelten Modulation der LEI hin. Diese beruht zumindest teilweise auf der erhöhten Expression von ICAM-1.

Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen spielt deren Zugänglichkeit an der luminalen Endotheloberfläche eine wichtige Rolle. Diese wird durch eine dichte Glykokalyx, die aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen aufgebaut ist und Zellmembran-verankerte Proteine überlagert, stark eingeschränkt (Lipowsky 2011; McDonald et al. 2016). Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass Adhäsionsmoleküle lediglich 20-30 nm aus der Zellmembran herausragen, wohingegen die Glykokalyx eine Dicke von 2-10 µm aufweisen kann (Springer 1990; van den Berg et al. 2009; Ebong et al. 2011). Elektronenmikroskopische Analysen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die endotheliale Glykokalyx in Aorten aus *Cc1^{-/-}* Mäusen in ihrer Dichte und ihrer Höhe im Vergleich zum WT deutlich reduziert ist (Ghavampour et al. 2018). Dies würde ebenfalls über eine verbesserte Zugänglichkeit endothelialer Adhäsionsmoleküle die LEI fördern.

An der Degradierung der Glykokalyx sind eine ganze Reihe von Enzymen beteiligt. So spielen für den Abbau der Proteinanteile Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), z.B.

MMP-9 eine wichtige Rolle (Lipowsky 2011; Ramnath et al. 2014). Aber auch Enzyme, die Nicht-Protein-Bestandteile abbauen, z.B. Chondroitinasen und Hyaluronidasen tragen zur Degradation der Glykokalyx bei (Pahakis et al. 2007; Gao und Lipowsky 2010). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von CEACAM1 auf die Expression dieser Enzyme in Endothelzellen untersucht. Dabei wurde eine erhöhte Expression von MMP-9, sowie Chondroitinase und Hyaluronidase-2 in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen nachgewiesen, was die reduzierte Glykokalyx bei CEACAM1-Defizienz erklärt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass CEACAM1 durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie deren Zugänglichkeit durch Schutz der Glykokalyx wesentlich zu den anti-adhäsiven Eigenschaften des Endothels beiträgt.

4.4 CEACAM1 beeinflusst die endotheliale Barriere – altersspezifische Effekte durch cross-talk mit TNF- α

Cc1^{-/-} Mäuse entwickeln spontan, ohne hochkalorische Ernährung kleine Arteriosklerose-ähnliche Läsionen im Bereich der Aortenwurzel (Najjar et al. 2013). Dies deutet auf eine Störung der endothelialen Barriere in den Gefäßen dieser Mäuse hin. Um die Barrierestörung sichtbar zu machen und anschließend quantifizieren zu können, wurde ein neuer Assay entwickelt. Hierbei wurde die von der endothelialen Permeabilität abhängende intimale Deposition von Evans Blue als Marker für den Grad der Schädigung der endothelialen Barriere verwendet (Bommel et al. 2017). Zur Etablierung des Assays wurden Aorten von *Ldlr^{-/-}* und *ApoE^{-/-}* Mäusen mit gesicherter Barrierestörung untersucht. In diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Evans Blue Assay zuverlässig Barrierestörungen bereits bevor morphologische Veränderungen an den Gefäßen auftreten detektiert.

Eine verstärkte endotheliale Permeabilität in *Cc1^{-/-}* Mäusen konnte bereits für Lunge, Haut und Niere nachgewiesen werden (Nouvion et al. 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels Evans Blue Assay eine erhöhte endotheliale Permeabilität auch für die Aorta in 3 Monate alten *Cc1^{-/-}* Mäusen, und damit 3 Monate vor Auftreten morphologischer Veränderungen (Najjar et al. 2013), nachgewiesen. Im Vergleich zu *ApoE^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen unter WD war die in *Cc1^{-/-}* Mäusen detektierte Barrierestörung aber weniger stark ausgeprägt. Ungeachtet dessen ist aber davon auszugehen, dass die Barrierestörung in 3 Monate alten *Cc1^{-/-}* Mäusen zu den detektierten Gefäßveränderungen im Alter von 6 Monaten beiträgt.

Die erhöhte endotheliale Permeabilität bei CEACAM1-Defizienz konnte auch im Zellkulturmodell bestätigt werden. Unter Verwendung verschiedener Assays (TEER, Farbstoffdiffusion, Monozyten-Transmigration) ließ sich eine Barrierestörung auch für *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellkulturen belegen. Deshalb ist auch für die Barrierestörung bei CEACAM1-Defizienz ein Endothelzell-autonomer Mechanismus anzunehmen.

Die Prävalenz der Arteriosklerose nimmt mit dem Alter zu (Libby et al. 2011; Otsuka et al. 2015). Alter stellt dabei einen unabhängigen Risikofaktor dar (Wang und Bennett 2012). Daher stellte sich die Frage, ob sich das Ausmaß der Barrierestörung bei CEACAM1-Defizienz altersabhängig weiter verstärkt. Interessanter Weise zeigte sich in 9 Monate alten Mäusen aber ein ganz anderes Bild. Während im WT ein deutlicher Permeabilitätsanstieg im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen feststellbar war, verminderte sich die in jungen *Cc1^{-/-}* Mäusen erhöhte Permeabilität im Alter von 9 Monaten annähernd auf das Niveau von 3 Monate alten WT Mäusen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Barriere-aktiver Faktor, der altersabhängig reguliert ist, in WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen unterschiedlich wirksam wird.

In diesem Zusammenhang ist der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) von besonderer Bedeutung. TNF- α führt zu einer Barrierestörung des Endothels (Royall et al. 1989; Marcos-Ramiro et al. 2014) und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose (Boesten et al. 2005; Ohta et al. 2005). Außerdem kommt es im Alter bei Menschen und Maus zu einem Anstieg der TNF- α -Werte im Serum und zu einer verstärkten TNF- α -Expression in verschiedenen Geweben einschließlich des Gefäßsystems (Spaulding et al. 1997; Csiszar et al. 2003; Puchta et al. 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich ein Einfluss von CEACAM1 auf die vaskuläre TNF- α -Expression nachgewiesen werden. TNF- α war in Aorten 9 Monate alter WT Mäuse deutlich höher exprimiert, als in Aorten gleich alter *Cc1^{-/-}* Mäuse. Die unterschiedliche vaskuläre Verfügbarkeit von TNF- α in 9 Monate alten WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen könnte die gegenläufigen Veränderungen der endothelialen Permeabilität beider Genotypen im Alterungsprozess erklären.

Daneben könnte aber auch eine unterschiedliche Wirksamkeit von TNF- α in Abhängigkeit von der CEACAM1-Präsenz zu den beobachteten altersabhängigen Effekten beitragen. Deshalb wurde der Effekt von TNF- α auf die Barrierefunktion von MyEnd-Zellkulturen mittels TEER *in vitro* analysiert. Dabei zeigten WT Zellkulturen die aufgrund früherer Studien erwartete Zunahme der Permeabilität (Royall et al. 1989;

Marcos-Ramiro et al. 2014). Im Gegensatz dazu reagierten *Cc1^{-/-}* Zellkulturen überraschender Weise mit einer Abnahme der Permeabilität.

Zusammenfassend scheint CEACAM1 die endotheliale Barriere altersabhängig unterschiedlich zu beeinflussen. In der Entwicklungsphase und im jüngeren Alter fördert CEACAM1 die Ausreifung des Gefäßes und stabilisiert dadurch die endotheliale Barriere. Demgegenüber begünstigt CEACAM1 im Alter die Ausbildung einer endothelialen Barriestörung, indem es einerseits zur altersbedingt erhöhten vaskulären Expression von TNF- α beiträgt und andererseits als Mediator an der TNF- α -vermittelten Permeabilitätssteigerung beteiligt ist.

4.5 CEACAM1 moduliert die Integrität von Adherens Junctions – Adapterprotein für Src-Kinase

Die endotheliale Barrierefunktion wird vorwiegend von Tight Junctions (TJs) und Adherens Junctions (AJs) gebildet (Wallez und Huber 2008). Allerdings scheinen AJs dabei eine dominante Rolle zuzukommen, denn eine Beeinträchtigung der Integrität der AJs führt auch zu einer Desorganisation der TJs und zu erhöhter vaskulärer Permeabilität (Bazzoni und Dejana 2004; Aghajanian et al. 2008; Dejana et al. 2008; Schulte et al. 2011; Giannotta et al. 2013).

Aus diesem Grund wurden zur Erklärung der Befunde der CEACAM1-abhängigen Regulation der Permeabilität AJ-Komplexe detaillierter analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb.27 schematisch zusammengefasst.

Bereits in immunhistologischen Untersuchungen konnte eine veränderte Lokalisation von VE-Cadherin mit interzellulären Lücken in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen gezeigt werden, welche auf eine Störung der Integrität von AJ-Komplexen hinweist. Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden aus Aorten von *Cc1^{-/-}* Mäusen (Najjar et al. 2013). VE-Cadherin stellt die Hauptkomponente von AJs dar. Über eine homophile Bindung vermittelt VE-Cadherin die Verbindung benachbarter Endothelzellen. VE-Cadherin wird seinerseits über Catenine am Aktin-Zytoskelett der Endothelzelle verankert (Giannotta et al. 2013; Cao et al. 2017). Diese Verbindung zum Zytoskelett stabilisiert den gesamten Komplex. Die Integrität der AJs wird auch durch den Phosphorylierungsstatus reguliert. Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin oder Cateninen vermindert deren Interaktion miteinander und führt dadurch zur Destabilisierung von AJs und somit zu verstärkter Gefäßpermeabilität (Angelini et al. 2006; Bertocchi et al. 2012; Giannotta et al. 2013; Adam 2015). Darüber hinaus kann

Tyrosin-phosphoryliertes Caveolin-1 an AJs binden und durch eine Destabilisierung der Proteinwechselwirkungen innerhalb der Komplexe ebenfalls die Permeabilität erhöhen (Sun et al. 2009; Kronstein et al. 2012). Unter Basalbedingungen wurden keine Unterschiede in der Phosphorylierung von VE-Cadherin oder β -Catenin zwischen WT und *Cc1*^{-/-} MyEnd-Zellen festgestellt. Allerdings zeigte sich in *Cc1*^{-/-}

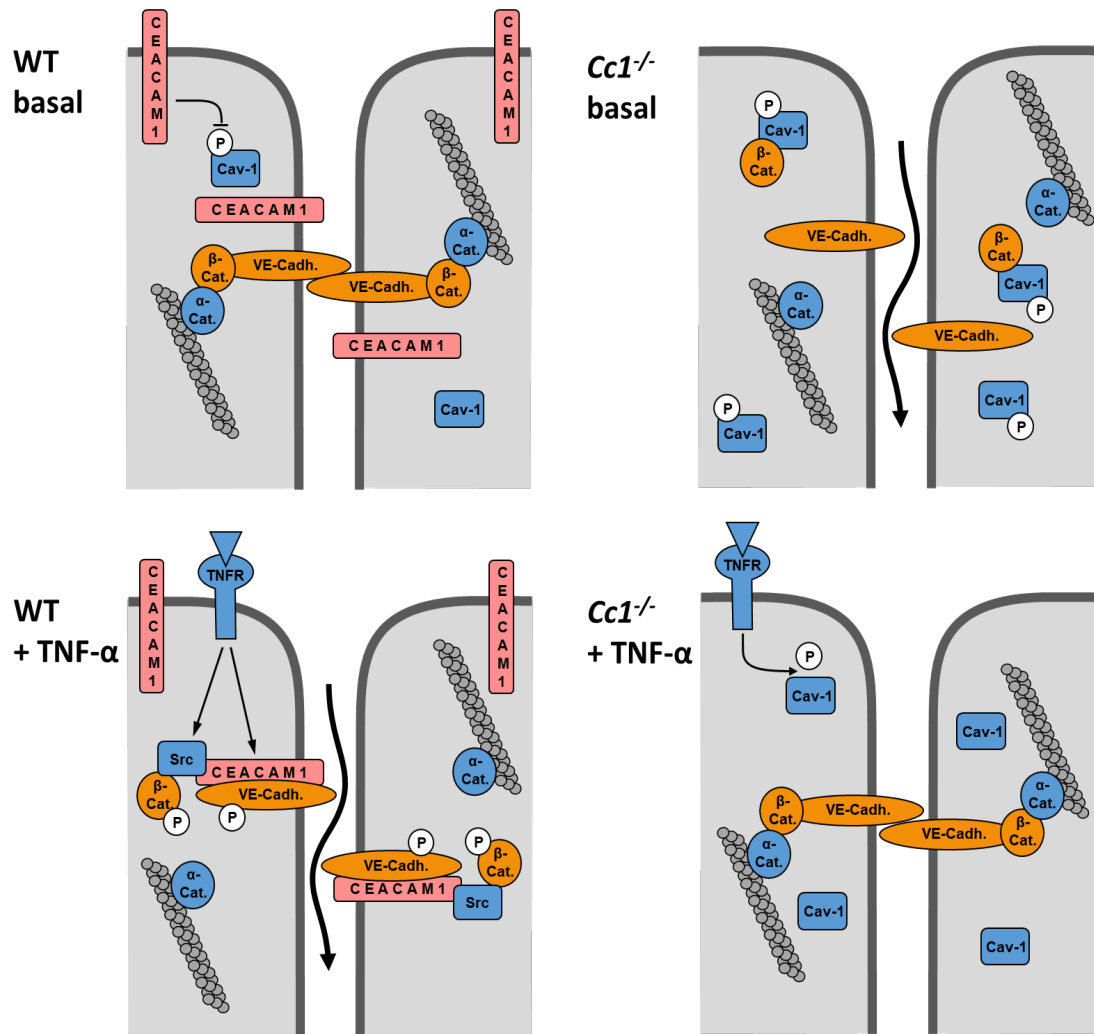


Abb.27: Einfluss von CEACAM1 auf die TNF- α -vermittelte Modulation der endothelialen Barriere.

Im WT stabilisiert CEACAM1 unter Basalbedingungen die endotheliale Barriere durch Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1 (oben links). Dagegen führt CEACAM1-Defizienz durch eine verstärkte Phosphorylierung von Caveolin-1 zu einer Störung der VE-Cadherin-Catenin-Interaktion und damit zu einer Destabilisierung der Adherens Junctions (oben rechts). In Anwesenheit von TNF- α , z.B. im Rahmen inflammatorischer Prozesse, transloziert CEACAM1 an die AJ-Komplexe und rekrutiert Src-Kinase, die dann VE-Cadherin und β -Catenin phosphoryliert. Dies führt zu einer Destabilisierung der Adherens Junctions und damit zu verstärkter endothelialer Permeabilität (unten links). Bei CEACAM1-Defizienz stimuliert TNF- α dagegen die Dephosphorylierung von Caveolin-1 und trägt damit zu einer Stabilisierung der Barriere bei (unten rechts). Abb. mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Uwe Rückschloss, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg.

MyEnd-Zellen eine stärkere Expression und auch Tyrosin-Phosphorylierung von Caveolin-1. Dies könnte, wie oben erläutert, die Ursache für die erhöhte Permeabilität in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen und in 3 Monate alten *Cc1^{-/-}* Mäusen sein.

Es ist bekannt, dass TNF- α über eine Src-Kinase-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von AJ-Proteinen zu einer Beeinträchtigung von AJ-Komplexen beiträgt. Dies resultiert in einer verstärkten endothelialen Permeabilität (Angelini et al. 2006; Dejana et al. 2008; Marcos-Ramiro et al. 2014; Adam 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies auch für TNF- α -behandelte WT MyEnd-Zellen bestätigt werden. In *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen dagegen wurde keine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von AJ-Proteinen nach TNF- α -Inkubation festgestellt. Im Gegensatz zum WT induzierte TNF- α bei CEACAM1-Defizienz eine Dephosphorylierung von β -Catenin und Caveolin-1. Beide Veränderungen deuten auf eine Stabilisierung von AJ-Komplexen durch TNF- α hin und sind damit geeignet, die TNF- α -induzierte Stabilisierung der endothelialen Barriere in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen und Aortenringen aus *Cc1^{-/-}* Mäusen zu erklären.

Zur Aufklärung der Rolle von CEACAM1 bei der TNF- α -abhängigen Modulation der Stabilität von AJ-Komplexen wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 unter TNF- α -Einfluss verstärkt Komplexe mit VE-Cadherin bildet, in denen sich auch Src-Kinase befindet. Darüber hinaus wurde nach TNF- α -Inkubation eine verstärkte Assoziation von Src-Kinase mit β -Catenin in WT, nicht aber in *Cc1^{-/-}* MyEnd-Zellen nachgewiesen. Aus diesen Befunden lässt sich schlussfolgern, dass CEACAM1 in Endothelzellen als Adapterprotein fungiert: unter Einfluss von TNF- α transloziert CEACAM1 an die AJ-Komplexe und rekrutiert dort Src-Kinase. Diese phosphoryliert nachfolgend AJ-Proteine und vermittelt dadurch die Destabilisierung der Komplexe. Zum Mechanismus der TNF- α -induzierten Dephosphorylierung von β -Catenin und Caveolin-1 bei CEACAM1-Defizienz liegen bislang keine Daten vor. Dies sollte aber Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Abb.28 fasst die diskutierten Ergebnisse schematisch zusammen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass CEACAM1 eine wesentliche Rolle für die basale und TNF- α -vermittelte Regulation der Stabilität von endothelialen AJs spielt. Letzteres könnte nicht nur für die Durchlässigkeit der endothelialen Barriere für lösliche Komponenten des Blutes wichtig sein, sondern auch für die Extravasation von Immunzellen unter inflammatorischen Bedingungen von großer Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Dem Endothel, welches die luminalen Oberfläche aller Blutgefäße auskleidet, kommt eine wichtige Barrierefunktion zwischen Blut und Gewebe zu. Nur durch eine bedarfsgerechte Justierung dieser Barriere, die den Durchtritt von Molekülen und Zellen reguliert, kann die Gewebemhomöostase aufrechterhalten werden. Dabei ist das Endothel nicht nur passive Barriere, sondern auch an dieser dynamischen Regulation aktiv beteiligt. Störungen oder Fehlregulationen dieser Prozesse führen zu Pathologien, z.B. Arteriosklerose.

Es ist seit längerem bekannt, dass Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, die Bildung und Morphogenese neuer Blutgefäße beeinflusst. Die spontane Entwicklung kleiner Arteriosklerose-ähnlicher Läsionen in CEACAM1 knockout (*Cc1^{-/-}*) Mäusen zeigt, dass CEACAM1 auch für die Homöostase ausgereifter Blutgefäße von Bedeutung ist. Ziel dieser Dissertationsarbeit war daher, den Einfluss von CEACAM1 auf wesentliche Aspekte der Endothelfunktion in Aorten *in situ* bzw. in Endothelzellkulturen *in vitro* zu analysieren.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass CEACAM1-defiziente Endothelzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Endothelzellen eine rundlichere Zellmorphologie mit meanderförmigen Zellgrenzen und interzellulären Lücken aufweisen. Diese morphologischen Unterschiede stimmen mit Befunden *in situ* an Aorten von WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen überein.

Weiterhin wurde eine Translokation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) von der Zellmembran in den peri-nukleären Bereich bei CEACAM1-Defizienz festgestellt. Die erhobenen Daten bieten zwei mögliche Erklärungen dafür. Einerseits könnte CEACAM1 durch Interaktion mit eNOS als Membrananker fungieren. Daneben wiesen CEACAM1-defiziente Endothelzellen eine erhöhte Expression des Enzyms APT1 auf, welches eNOS depalmitoyliert. Die daraus resultierende, ebenfalls nachgewiesene geringere Palmitoylierung könnte auch zur verminderten Membran-lokalisierung von eNOS beitragen.

Zur endothelialen Funktion gehört, die Adhäsion von Blutzellen an die Gefäßwand weitestgehend zu beschränken. CEACAM1-defiziente Endothelzellen zeigten im Vergleich zu WT Endothelzellen eine verstärkte Adhäsivität gegenüber murinen und humanen Monozyten. Ähnliche Unterschiede wurden für Aortenexplantate aus WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen festgestellt. Dies ist einerseits mit einer verstärkten Expression des

Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 bei CEACAM1-Defizienz erklärbar. Darüber hinaus vermittelt die Glykokalyx anti-adhäsive Eigenschaften. Aus Vorbefunden war bekannt, dass die endotheliale Glykokalyx in der Aorta von *Cc1^{-/-}* Mäuse reduziert ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies auf eine verstärkte Expression der Glykokalyx-degradierenden Enzyme MMP9, Chondroitinase sowie Hyaluronidase-2 in *Cc1^{-/-}* Endothelzellen zurückgeführt werden.

Eine erhöhte Permeabilität stellt einen Indikator für ein dysfunktionales Endothel, eines der initialen Schritte in der Pathogenese der Arteriosklerose, dar. Zur Analyse der aortalen Permeabilität wurde ein modifizierter Miles-Assay etabliert. Unter Verwendung etablierter muriner Arteriosklerosemodelle konnte gezeigt werden, dass dieser Assay eine Störung der vaskulären Permeabilität bereits vor Auftreten makroskopischer Veränderungen zuverlässig detektiert.

Im Rahmen der folgenden Analysen an WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen zeigte sich ein altersabhängiger Effekt von CEACAM1 auf die Gefäßpermeabilität: Aorten von 3 Monate alten *Cc1^{-/-}* Mäuse wiesen eine im Vergleich zum WT erhöhte Gefäßpermeabilität auf, welche wahrscheinlich Folge einer verzögerten Gefäßreifung ist. Im Alter von 9 Monaten zeigte sich dagegen ein entgegengesetztes Bild. Dies wurde auf eine verstärkte Expression des die Barriere schädigenden Inflammationsmediators TNF- α in 9 Monate alten WT Mäusen zurückgeführt.

Außerdem modulierte CEACAM1 die TNF- α -vermittelte Lockerung der endothelialen Barriere, indem es die Phosphorylierung von Adherens Junction Proteinen beeinflusste. Basal stabilisierte CEACAM1 die endotheliale Barriere durch Hemmung der Phosphorylierung von Caveolin-1, welches Adherens Junctions destabilisiert. Unter Einfluss von TNF- α war CEACAM1 verstärkt im Bereich von Adherens Junctions lokalisiert und rekrutierte dort Src-Kinase. Src-Kinase wiederum destabilisierte Adherens Junctions durch Phosphorylierung von β -Catenin, was in verstärkter Gefäßpermeabilität resultierte. Dagegen führte TNF- α in CEACAM1-defizienten Endothelzellen zu einer Dephosphorylierung von Caveolin-1 und β -Catenin, wodurch Adherens Junctions und damit die endotheliale Barriere stabilisiert wurden. Diese CEACAM1-abhängige differenzielle Regulation der Stabilität von Adherens Junctions unter TNF- α trägt wahrscheinlich maßgeblich zu den Unterschieden der vaskulären Permeabilität in 3 bzw. 9 Monate alten WT und *Cc1^{-/-}* Mäusen bei.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass CEACAM1 zentrale Funktionen des Endothels und hierüber die Homöostase reifer Gefäße beeinflusst. Da eine Expression von CEACAM1 auch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnte, soll in weiteren Untersuchungen auch der Beitrag von CEACAM1 zur arteriosklerotischen Plaquebildung analysiert werden.

6 Summary

The endothelium forms the inner surface of blood vessels and therefore is critically involved in forming a barrier between the intraluminal blood and the surrounding tissue. Adequate regulation of this barrier regarding extravasation of molecules and cells is mandatory to maintain tissue homeostasis. Thereby the endothelium is not only a passive barrier but regulates barrier function in an active and dynamic manner. Malfunction and dysregulation of these processes promote pathologies, i.e. atherosclerosis.

It is known, that Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1), a member of the immunoglobulin superfamily, modulates the formation and morphogenesis of new blood vessels. In addition, spontaneous development of small atherosclerosis-like lesions within the aorta of CEACAM1-deficient (*Cc1^{-/-}*) mice indicates the involvement of CEACAM1 in homeostasis of mature blood vessels. Therefore, the aim of this study was to analyze the effect of CEACAM1 on central aspects of endothelial function *in situ* (aortic tissue) and *in vitro* (endothelial cell cultures).

First it was shown, that CEACAM1-deficient endothelial cells display a rather round cellular morphology with meandering cell boundaries and inter-cellular gaps compared to CEACAM1-expressing cells. These morphologic differences are in agreement with *in situ* observations in WT and *Cc1^{-/-}* mice. Furthermore, CEACAM1 deficiency resulted in translocation of endothelial NO-Synthase (eNOS) from the cell membrane towards the peri-nuclear compartment within endothelial cells. Analysis of the underlying mechanisms suggests two scenarios. On the one hand, CEACAM1 might serve as a membrane anchor due to physical interaction with eNOS. On the other hand, expression of the de-palmitoylating enzyme APT1 is upregulated and eNOS palmitoylation is reduced in CEACAM1-deficient endothelial cells. This might also contribute to its reduced location at the cell membrane.

Under physiological conditions the endothelium limits adhesion of blood cells to the vascular wall. However, adhesion of murine and human monocytes to cultured endothelial cells was increased when endothelial CEACAM1 was absent. Similar results were obtained using aortic explants of WT and *Cc1^{-/-}* mice. This was attributed to the increased expression of cell adhesion molecule ICAM-1 in *Cc1^{-/-}* endothelial cells. Furthermore, the glycocalyx of endothelial cells greatly contributes to anti-adhesive properties. Based on preliminary results which showed a reduced endothelial glycocalyx in aortae from *Cc1^{-/-}* mice compared to WT mice, we found a higher expression of the glycocalyx-degrading enzymes MMP-9, chondroitinase and hyaluronidase-2 in *Cc1^{-/-}* compared to WT endothelial cells.

Enhanced vascular permeability indicates a dysfunctional endothelium, which is the initial step in the pathogenesis of atherosclerosis. To analyze aortic permeability a modified Miles-assay was established. Using well-characterized murine atherosclerosis models, it was shown that this assay reliably detects alterations in vascular permeability prior to macroscopically visible morphological alterations. CEACAM1 had an age-dependent effect on vascular permeability: aortae from 3 months old *Cc1^{-/-}* mice showed increased vascular permeability for Evans blue compared to aortae from age-matched WT mice most likely due to delayed vascular maturation. Interestingly, this situation was completely reversed at the age of 9 months. This was attributed to enhanced aortic expression of the permeability promoting inflammatory mediator TNF- α in 9 month old WT mice compared to age-matched *Cc1^{-/-}* mice. Moreover, CEACAM1 modulated the TNF- α -dependent increase in vascular permeability by affecting adherens junction phosphorylation. Under basal conditions CEACAM1 stabilizes endothelial barrier by inhibition of caveolin-1 phosphorylation known to destabilize adherens junctions. In the presence of TNF- α , CEACAM1 translocate to endothelial adherens junctions and recruits Src kinase which destabilizes adherens junctions by phosphorylation of β -catenin resulting in enhanced vascular permeability. In contrast, in CEACAM1-deficient endothelial cells TNF- α promotes dephosphorylation of caveolin-1 and β -catenin thus stabilizing adherens junction complexes and endothelial barrier. This CEACAM1-dependent differential regulation of adherens junction complex stability presumably contributes substantially to the differences in vascular permeability observed in WT and *Cc1^{-/-}* mice at the age of 3 and 9 months, respectively.

In summary, this study shows that CEACAM1 influences central aspects of endothelial functions and thereby affects homeostasis of mature blood vessels. Since expression of CEACAM1 was observed in endothelium covering atherosclerotic plaques, further studies will investigate the contribution of CEACAM1 to atherosclerotic plaque formation.

7 Literaturverzeichnis

Adam, Alejandro Pablo (2015): Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. In: *Mediators of Inflammation* 2015, S. 272858. DOI: 10.1155/2015/272858.

Aghajanian, A.; Wittchen, E. S.; Allingham, M. J.; Garrett, T. A.; Burrige, K. (2008): Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6 (9), S. 1453–1460. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03087.x.

Aicart-Ramos, Clara; Valero, Ruth Ana; Rodriguez-Crespo, Ignacio (2011): Protein palmitoylation and subcellular trafficking. In: *Biochimica et biophysica acta* 1808 (12), S. 2981–2994. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.07.009.

Andres-Manzano, M. Jesus; Andres, Vicente; Dorado, Beatriz (2015): Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1339, S. 85–99. DOI: 10.1007/978-1-4939-2929-0_5.

Angelini, Daniel J.; Hyun, Sang-Won; Grigoryev, Dmitry N.; Garg, Pallavi; Gong, Ping; Singh, Ishwar S. et al. (2006): TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 291 (6), L1232-L1245. DOI: 10.1152/ajplung.00109.2006.

Arastéh, Keikawus (2013): Innere Medizin. 3., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Attwell, David; Mishra, Anusha; Hall, Catherine N.; O'Farrell, Fergus M.; Dalkara, Turgay (2016): What is a pericyte? In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (2), S. 451–455. DOI: 10.1177/0271678X15610340.

Barnett, T. R.; Drake, L.; Pickle, W. (1993): Human biliary glycoprotein gene. Characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (2), S. 1273–1282. DOI: 10.1128/MCB.13.2.1273.

- Bazzoni, Gianfranco; Dejana, Elisabetta (2004): Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. In: *Physiological reviews* 84 (3), S. 869–901. DOI: 10.1152/physrev.00035.2003.
- Beauchemin, N.; Draber, P.; Dveksler, G.; Gold, P.; Gray-Owen, S.; Grunert, F. et al. (1999): Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. In: *Experimental cell research* 252 (2), S. 243–249.
- Beauchemin, Nicole; Arabzadeh, Azadeh (2013): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. In: *Cancer metastasis reviews* 32 (3-4), S. 643–671. DOI: 10.1007/s10555-013-9444-6.
- Bentzon, Jacob Fog; Otsuka, Fumiyuki; Virmani, Renu; Falk, Erling (2014): Mechanisms of plaque formation and rupture. In: *Circulation research* 114 (12), S. 1852–1866. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- Bertocchi, Cristina; Vaman Rao, Megha; Zaidel-Bar, Ronen (2012): Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. In: *Journal of signal transduction* 2012, S. 125295. DOI: 10.1155/2012/125295.
- Biassoni, Roberto; Raso, Alessandro (Hg.) (2014): Quantitative real-time pcr. Methods and protocols. New York: Humana Pr (Springer protocols, 1160).
- Biffi, W. L.; Moore, E. E.; Moore, F. A.; Barnett, C. (1996): Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. In: *The Journal of surgical research* 63 (1), S. 328–332.
- Boesten, Lianne S. M.; Zadelaar, A. Susanne M.; van Nieuwkoop, Anita; Gijbels, Marion J. J.; Winther, Menno P. J. de; Havekes, Louis M.; van Vlijmen, Bart J. M. (2005): Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. In: *Cardiovascular research* 66 (1), S. 179–185. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.01.001.
- Bommel, Heike; Kleefeldt, Florian; Zerneck, Alma; Ghavampour, Sharang; Wagner, Nicole; Kuerten, Stefanie; Ergun, Suleyman (2017): Visualization of endothelial barrier damage prior to formation of atherosclerotic plaques. In: *Histochemistry and cell biology*. DOI: 10.1007/s00418-017-1562-8.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.

Brånen L., Hovgaard L., Nitulescu M., Bengtsson E., Nilsson J., Jovinge S. (2004): Inhibition of Tumor Necrosis Factor- Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (11), S. 2137–2142. DOI: 10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b.

Braun, Anne; Trigatti, Bernardo L.; Post, Mark J.; Sato, Kaori; Simons, Michael; Edelberg, Jay M. et al. (2002): Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. In: *Circulation research* 90 (3), S. 270–276.

Brummer, J.; Ebrahimnejad, A.; Flayeh, R.; Schumacher, U.; Loning, T.; Bamberger, A. M.; Wagener, C. (2001): cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). In: *The American journal of pathology* 159 (2), S. 537–546.

Brummer, J.; Neumaier, M.; Gopfert, C.; Wagener, C. (1995): Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. In: *Oncogene* 11 (8), S. 1649–1655.

Burke, Allen P.; Kolodgie, Frank D.; Farb, Andrew; Weber, Deena; Virmani, Renu (2002): Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. In: *Circulation* 105 (3), S. 297–303.

Cao, Jiahui; Ehling, Manuel; März, Sigrid; Seebach, Jochen; Tarbashevich, Katsiaryna; Sixta, Tomas et al. (2017): Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. In: *Nature communications* 8 (1), S. 2210. DOI: 10.1038/s41467-017-02373-8.

Carreau, Aude; Kieda, Claudine; Grillon, Catherine (2011): Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. In: *Experimental cell research* 317 (1), S. 29–41. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.08.011.

Chistiakov, Dimitry A.; Orekhov, Alexander N.; Bobryshev, Yuri V. (2015): Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. In: *Frontiers in Physiology* 6, S. 365. DOI: 10.3389/fphys.2015.00365.

- Conibear, Elizabeth; Davis, Nicholas G. (2010): Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 23), S. 4007–4010. DOI: 10.1242/jcs.059287.
- Csiszar, Anna; Ungvari, Zoltan; Koller, Akos; Edwards, John G.; Kaley, Gabor (2003): Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (9), S. 1183–1185. DOI: 10.1096/fj.02-1049fje.
- Dankner, Matthew; Gray-Owen, Scott D.; Huang, Yu-Hwa; Blumberg, Richard S.; Beauchemin, Nicole (2017): CEACAM1 as a multi-purpose target for cancer immunotherapy. In: *Oncoimmunology* 6 (7), e1328336. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1328336.
- Dashty, Monireh; Akbarkhanzadeh, Vishtaseb; Zeebregts, Clark J.; Spek, C. Arnold; Sijbrands, Eric J.; Peppelenbosch, Maikel P.; Rezaee, Farhad (2012): Characterization of coagulation factor synthesis in nine human primary cell types. In: *Scientific reports* 2, 787 EP -.
- Davignon, Jean (2005): Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (2), S. 267–269. DOI: 10.1161/01.ATV.0000154570.50696.2c.
- Dejana, Elisabetta; Orsenigo, Fabrizio; Lampugnani, Maria Grazia (2008): The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. In: *J. Cell Sci.* 121 (13), S. 2115. DOI: 10.1242/jcs.017897.
- Dikalova, Anna E.; Gongora, Maria Carolina; Harrison, David G.; Lambeth, J. David; Dikalov, Sergey; Griendling, Kathy K. (2010): Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299 (3), H673-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00242.2010.
- Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A. M. (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. In: *Nature* 399 (6736), S. 601–605. DOI: 10.1038/21224.
- Dimmeler, Stefanie; Dernbach, Elisabeth; Zeiher, Andreas M. (2000): Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced

endothelial cell migration. In: *FEBS Letters* 477 (3), S. 258–262. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01657-4.

Dorado, Beatriz; Andrés, Vicente (2015): *Methods in mouse atherosclerosis*. New York: Humana Press; Springer (Springer protocols, 1339).

Drenckhahn, Detlev; Asan, Esther; Benninghoff, Alfred; Benninghoff-Drenckhahn (Hg.) (2004): *Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 2).

Ebong, Eno E.; Macaluso, Frank P.; Spray, David C.; Tarbell, John M. (2011): Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (8), S. 1908–1915. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.225268.

Eckardstein, Arnold (Hg.) (2005): *Atherosclerosis: Diet and Drugs*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology, 170). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-27661-0>.

English, William R.; Siviter, Richard J.; Hansen, Martin; Murphy, Gillian (2017): ADAM9 is present at endothelial cell - cell junctions and regulates monocyte – endothelial transmigration. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493 (2), S. 1057–1062. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.089.

Ergun, S.; Kilik, N.; Ziegeler, G.; Hansen, A.; Nollau, P.; Gotze, J. et al. (2000): CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. In: *Molecular cell* 5 (2), S. 311–320.

Ernst, Orna; Zor, Tsaffrir (2010): Linearization of the Bradford protein assay. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (38). DOI: 10.3791/1918.

Feron, O.; Belhassen, L.; Kobzik, L.; Smith, T. W.; Kelly, R. A.; Michel, T. (1996): Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (37), S. 22810–22814.

Fielding, C. J.; Fielding, P. E. (2000): Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. In: *Biochimica et biophysica acta* 1529 (1-3), S. 210–222.

- Fishbein, Gregory A.; Fishbein, Michael C. (2009): Arteriosclerosis: rethinking the current classification. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 133 (8), S. 1309–1316. DOI: 10.1043/1543-2165-133.8.1309.
- Fuster, Jose J.; Castillo, Ana I.; Zaragoza, Carlos; Ibanez, Borja; Andres, Vicente (2012): Animal models of atherosclerosis. In: *Progress in molecular biology and translational science* 105, S. 1–23. DOI: 10.1016/B978-0-12-394596-9.00001-9.
- Ganz, Peter; Hsue, Priscilla Y. (2013): Endothelial dysfunction in coronary heart disease is more than a systemic process. In: *European heart journal* 34 (27), S. 2025–2027. DOI: 10.1093/eurheartj/eh199.
- Gao, Lujia; Lipowsky, Herbert H. (2010): Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. In: *Microvascular research* 80 (3), S. 394–401. DOI: 10.1016/j.mvr.2010.06.005.
- Gauthier, T. W.; Scalia, R.; Murohara, T.; Guo, J.-p.; Lefer, A. M. (1995): Nitric Oxide Protects Against Leukocyte-Endothelium Interactions in the Early Stages of Hypercholesterolemia. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (10), S. 1652–1659. DOI: 10.1161/01.ATV.15.10.1652.
- Gerhardt, Teresa; Ley, Klaus (2015): Monocyte trafficking across the vessel wall. In: *Cardiovascular research* 107 (3), S. 321–330. DOI: 10.1093/cvr/cvv147.
- Gerstel, D.; Wegwitz, F.; Jannasch, K.; Ludewig, P.; Scheike, K.; Alves, F. et al. (2011): CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. In: *Oncogene* 30 (41), S. 4275–4288. DOI: 10.1038/onc.2011.146.
- Getz, Godfrey S.; Reardon, Catherine A. (2006): Diet and murine atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (2), S. 242–249. DOI: 10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17.
- Getz, Godfrey S.; Reardon, Catherine A. (2012): Animal models of atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (5), S. 1104–1115. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.
- Ghavampour, Sharang; Kleefeldt, Florian; Bömmel, Heike; Volland, Julian; Paus, Alexander; Horst, Andrea et al. (2018): Endothelial barrier function is differentially regulated by CEACAM1-mediated signaling. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201800331R. DOI: 10.1096/fj.201800331R.

Giannotta, Monica; Trani, Marianna; Dejana, Elisabetta (2013): VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. In: *Developmental Cell* 26 (5), S. 441–454. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.

Gimbrone, Michael A.; García-Cardeña, Guillermo (2016): Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. In: *Circulation research* 118 (4), S. 620–636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

Gisterå, Anton; Hansson, Göran K. (2017): The immunology of atherosclerosis. In: *Nature Reviews Nephrology* 13, 368 EP -.

Glagov, S.; Weisenberg, E.; Zarins, C. K.; Stankunavicius, R.; Kolettis, G. J. (1987): Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. In: *The New England journal of medicine* 316 (22), S. 1371–1375. DOI: 10.1056/NEJM198705283162204.

Gokce, Noyan; Keaney, John F., JR; Hunter, Liza M.; Watkins, Michael T.; Menzoian, James O.; Vita, Joseph A. (2002): Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. In: *Circulation* 105 (13), S. 1567–1572.

Golenhofen, Nikola; Ness, Winfried; Wawrousek, Eric F.; Drenckhahn, Detlev (2002): Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells. In: *Histochemistry and cell biology* 117 (3), S. 203–209. DOI: 10.1007/s00418-001-0378-7.

Gotsch, U.; Borges, E.; Bosse, R.; Boggemeyer, E.; Simon, M.; Mossmann, H.; Vestweber, D. (1997): VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. In: *Journal of cell science* 110 (Pt 5), S. 583–588.

Govers, R.; Rabelink, T. J. (2001): Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 280 (2), F193-206. DOI: 10.1152/ajprenal.2001.280.2.F193.

Gray-Owen, Scott D.; Blumberg, Richard S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (6), S. 433–446. DOI: 10.1038/nri1864.

Greenwood, Christina; Ruff, David; Kirvell, Sara; Johnson, Gemma; Dhillon, Harvinder S.; Bustin, Stephen A. (2015): Proximity assays for sensitive quantification of proteins.

In: *Biomolecular detection and quantification* 4, S. 10–16. DOI: 10.1016/j.bdq.2015.04.002.

Gu, Angel; Tsark, Walter; Holmes, Kathryn V.; Shively, John E. (2009): Role of Ceacam1 in VEGF induced vasculogenesis of murine embryonic stem cell-derived embryoid bodies in 3D culture. In: *Experimental cell research* 315 (10), S. 1668–1682. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.02.026.

Gutierrez, Enrique; Flammer, Andreas J.; Lerman, Lilach O.; Elizaga, Jaime; Lerman, Amir; Fernandez-Aviles, Francisco (2013): Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. In: *European heart journal* 34 (41), S. 3175–3181. DOI: 10.1093/eurheartj/eh351.

Halcox, J. P. J.; Schenke, W. H.; Zalos, G.; Mincemoyer, R.; Prasad, A.; Waclawiw, M. A. et al. (2002): Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. In: *Circulation* 106 (6), S. 653–658. DOI: 10.1161/01.CIR.0000025404.78001.D8.

Head, Trajen; Daunert, Sylvia; Goldschmidt-Clermont, Pascal J. (2017): The Aging Risk and Atherosclerosis: A Fresh Look at Arterial Homeostasis. In: *Frontiers in Genetics* 8, S. 216. DOI: 10.3389/fgene.2017.00216.

Heiss, Christian; Rodriguez-Mateos, Ana; Kelm, Malte (2014): Central Role of eNOS in the Maintenance of Endothelial Homeostasis. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 22 (14), S. 1230–1242. DOI: 10.1089/ars.2014.6158.

Heitzer, Thomas; Baldus, Stephan; Kodolitsch, Yskert von; Rudolph, Volker; Meinertz, Thomas (2005): Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (6), S. 1174–1179. DOI: 10.1161/01.ATV.0000166516.52477.81.

Higashi, Yukihiro; Kihara, Yasuki; Noma, Kensuke (2012): Endothelial dysfunction and hypertension in aging. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 35 (11), S. 1039–1047. DOI: 10.1038/hr.2012.138.

Horst, Andrea Kristina; Ito, Wulf D.; Dabelstein, Joachim; Schumacher, Udo; Sander, Heike; Turbide, Claire et al. (2006): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (6), S. 1596–1605. DOI: 10.1172/JCI24340.

- Huang, Yu-Hwa; Zhu, Chen; Kondo, Yasuyuki; Anderson, Ana C.; Gandhi, Amit; Russell, Andrew et al. (2015): CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. In: *Nature* 517 (7534), S. 386–390. DOI: 10.1038/nature13848.
- Huber, M.; Izzi, L.; Grondin, P.; Houde, C.; Kunath, T.; Veillette, A.; Beauchemin, N. (1999): The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (1), S. 335–344.
- Huveneers, Stephan; Oldenburg, Joppe; Spanjaard, Emma; van der Krogt, Gerard; Grigoriev, Ilya; Akhmanova, Anna et al. (2012): Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. In: *The Journal of cell biology* 196 (5), S. 641–652. DOI: 10.1083/jcb.201108120.
- Ichiki, Tomoko; Izumi, Ririko; Cataliotti, Alessandro; Larsen, Amy M.; Sandberg, Sharon M.; Burnett, John C., JR (2013): Endothelial permeability in vitro and in vivo: protective actions of ANP and omapatrilat in experimental atherosclerosis. In: *Peptides* 48, S. 21–26. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.07.020.
- Ishibashi, S.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Herz, J.; Burns, D. K. (1994): Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. In: *The Journal of clinical investigation* 93 (5), S. 1885–1893. DOI: 10.1172/JCI117179.
- Jansohn, Monika; Rothhämel, Sophie (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3>.
- Kapourchali, Fatemeh Ramezani; Surendiran, Gangadaran; Chen, Li; Uitz, Elisabeth; Bahadori, Babak; Moghadasian, Mohammed H. (2014): Animal models of atherosclerosis. In: *World journal of clinical cases* 2 (5), S. 126–132. DOI: 10.12998/wjcc.v2.i5.126.
- Kevil, C. G.; Patel, R. P.; Bullard, D. C. (2001): Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 281 (5), C1442-7. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1442.
- Khairnar, Vishal; Duhan, Vikas; Maney, Sathish Kumar; Honke, Nadine; Shaabani, Namir; Pandyra, Aleksandra A. et al. (2015): CEACAM1 induces B-cell survival and is

essential for protective antiviral antibody production. In: *Nature communications* 6, S. 6217. DOI: 10.1038/ncomms7217.

Khairnar, Vishal; Duhan, Vikas; Patil, Ashwini M.; Zhou, Fan; Bhat, Hilal; Thoens, Christine et al. (2018): CEACAM1 promotes CD8⁺ T cell responses and improves control of a chronic viral infection. In: *Nature communications* 9 (1), S. 2561. DOI: 10.1038/s41467-018-04832-2.

Khan, B. V.; Harrison, D. G.; Olbrych, M. T.; Alexander, R. W.; Medford, R. M. (1996): Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (17), S. 9114–9119.

Khenouf, Lila; Gesslein, Bodil; Brazhe, Alexey; Oceau, J. Christopher; Kutuzov, Nikolay; Khakh, Baljit S.; Lauritzen, Martin (2018): Active role of capillary pericytes during stimulation-induced activity and spreading depolarization. In: *Brain : a journal of neurology* 141 (7), S. 2032–2046. DOI: 10.1093/brain/awy143.

Kho, Dan Ting; Johnson, Rebecca; Robilliard, Laverne; Du Mez, Elyce; McIntosh, Julie; O'Carroll, Simon J. et al. (2017): ECIS technology reveals that monocytes isolated by CD14(+ve) selection mediate greater loss of BBB integrity than untouched monocytes, which occurs to a greater extent with IL-1 β activated endothelium in comparison to TNF α . In: *PloS one* 12 (7), e0180267. DOI: 10.1371/journal.pone.0180267.

Kilic, Nerbil; Oliveira-Ferrer, Leticia; Wurmbach, Jan-Henner; Loges, Sonja; Chalajour, Fariba; Neshat-Vahid, Samira et al. (2005): Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (3), S. 2361–2369. DOI: 10.1074/jbc.M409407200.

Klaile, Esther; Müller, Mario M.; Schäfer, Miriam R.; Clauder, Ann-Katrin; Feer, Sabina; Heyl, Kerstin A. et al. (2017): Binding of *Candida albicans* to Human CEACAM1 and CEACAM6 Modulates the Inflammatory Response of Intestinal Epithelial Cells. In: *mBio* 8 (2). DOI: 10.1128/mBio.02142-16.

Klein, Diana; Weisshardt, Philip; Kleff, Veronika; Jastrow, Holger; Jakob, Heinz Gunther; Ergun, Suleyman (2011): Vascular wall-resident CD44⁺ multipotent stem

cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. In: *PloS one* 6 (5), e20540. DOI: 10.1371/journal.pone.0020540.

Kleinbongard, Petra; Heusch, Gerd; Schulz, Rainer (2010): TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. In: *Pharmacology & therapeutics* 127 (3), S. 295–314. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.05.002.

Kronstein, Romy; Seebach, Jochen; Grossklaus, Sylvia; Minten, Carsten; Engelhardt, Britta; Drab, Marek et al. (2012): Caveolin-1 opens endothelial cell junctions by targeting catenins. In: *Cardiovascular research* 93 (1), S. 130–140. DOI: 10.1093/cvr/cvr256.

Kunjathoor, Vidya V.; Febbraio, Maria; Podrez, Eugene A.; Moore, Kathryn J.; Andersson, Lorna; Koehn, Stephanie et al. (2002): Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (51), S. 49982–49988. DOI: 10.1074/jbc.M209649200.

Kuroki, Motomu; Arakawa, Fumiko; Matsuo, Yoshino; Oikawa, Shinzo; Nakazato, Hiroshi; Matsuoka, Yuji (1991): Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176 (2), S. 578–585. DOI: 10.1016/S0006-291X(05)80223-2.

Lang, Gudrun (2013): Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2., überarb. und aktualisierte Aufl. Wien u.a.: Springer.

Lanzer, Peter; Boehm, Manfred; Sorribas, Victor; Thiriet, Marc; Janzen, Jan; Zeller, Thomas et al. (2014): Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. In: *European heart journal* 35 (23), S. 1515–1525. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu163.

Leung, N.; Turbide, C.; Olson, M.; Marcus, V.; Jothy, S.; Beauchemin, N. (2006): Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. In: *Oncogene* 25 (40), S. 5527–5536. DOI: 10.1038/sj.onc.1209541.

Ley, Klaus; Laudanna, Carlo; Cybulsky, Myron I.; Nourshargh, Sussan (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature Reviews Immunology* 7, 678 EP -.

- Li, Huige; Witte, Klaus; August, Michael; Brausch, Isolde; Godtel-Armbrust, Ute; Habermeier, Alice et al. (2006): Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. In: *Journal of the American College of Cardiology* 47 (12), S. 2536–2544. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.01.071.
- Liao, James K. (2013): Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (2), S. 540–541. DOI: 10.1172/JCI66843.
- Libby, Peter; Ridker, Paul M.; Hansson, Goran K. (2011): Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. In: *Nature* 473 (7347), S. 317–325. DOI: 10.1038/nature10146.
- Lin, Yan; Bai, Liang; Chen, Yulong; Zhu, Ninghong; Bai, Yanping; Li, Qianwei et al. (2015): Practical assessment of the quantification of atherosclerotic lesions in apoE(-)/(-) mice. In: *Molecular medicine reports* 12 (4), S. 5298–5306. DOI: 10.3892/mmr.2015.4084.
- Lipowsky, Herbert H. (2011): The Endothelial Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte Adhesion and its Mediation by Extracellular Proteases. In: *Annals of Biomedical Engineering* 40 (4), S. 840–848. DOI: 10.1007/s10439-011-0427-x.
- Liu, Songling; Premont, Richard T.; Rockey, Don C. (2014): Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Is Activated through G-protein-coupled Receptor Kinase-interacting Protein 1 (GIT1) Tyrosine Phosphorylation and Src Protein. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (26), S. 18163–18174. DOI: 10.1074/jbc.M113.521203.
- Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2014): *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum (Experimentator). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
- Marcos-Ramiro, B.; Garcia-Weber, D.; Millan, J. (2014): TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. In: *Thrombosis and haemostasis* 112 (6), S. 1088–1102. DOI: 10.1160/TH14-04-0299.
- Martinez-Quinones, Patricia; McCarthy, Cameron G.; Watts, Stephanie W.; Klee, Nicole S.; Komic, Amel; Calmasini, Fabiano B. et al. (2018): Hypertension Induced Morphological and Physiological Changes in Cells of the Arterial Wall. In: *American journal of hypertension* 31 (10), S. 1067–1078. DOI: 10.1093/ajh/hpy083.

- McDonald, Karli K.; Cooper, Scott; Danielzak, Lisa; Leask, Richard L.; Sperandio, Markus (2016): Glycocalyx Degradation Induces a Proinflammatory Phenotype and Increased Leukocyte Adhesion in Cultured Endothelial Cells under Flow. In: *PLoS one* 11 (12), e0167576. DOI: 10.1371/journal.pone.0167576.
- Milasan, Andreea; Dallaire, Francois; Mayer, Gaetan; Martel, Catherine (2016): Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. In: *Scientific reports* 6, S. 27862. DOI: 10.1038/srep27862.
- Moore, Kathryn J.; Tabas, Ira (2011): Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Cell* 145 (3), S. 341–355. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Mulisch, Maria; Welsch, Ulrich; Romeis, Benno; Aescht, Erna (Hg.) (2015): Romeis mikroskopische Technik. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Muller, Mario M.; Klaile, Esther; Vorontsova, Olga; Singer, Bernhard B.; Obrink, Bjorn (2009): Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. In: *The Journal of cell biology* 187 (4), S. 569–581. DOI: 10.1083/jcb.200904150.
- Muller, William A.; Lusinskas, F. William (2008): Assays of Transendothelial Migration in vitro. In: *Methods in enzymology* 443, S. 155–176. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02009-0.
- Najjar, Sonia M.; Ledford, Kelly J.; Abdallah, Simon L.; Paus, Alexander; Russo, Lucia; Kaw, Meenakshi K. et al. (2013): Ceacam1 deletion causes vascular alterations in large vessels. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 305 (4), E519-29. DOI: 10.1152/ajpendo.00266.2013.
- Nakashima, Y.; Plump, A. S.; Raines, E. W.; Breslow, J. L.; Ross, R. (1994): ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. In: *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 14 (1), S. 133–140.
- Neumann, Paul; Gertzberg, Nancy; Johnson, Arnold (2004): TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286 (2), L452-9. DOI: 10.1152/ajplung.00378.2002.
- Noda, Kazuomi; Zhang, Jianghui; Fukuhara, Shigetomo; Kunimoto, Satoshi; Yoshimura, Michihiro; Mochizuki, Naoki (2010): Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through

alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. In: *Molecular biology of the cell* 21 (4), S. 584–596. DOI: 10.1091/mbc.E09-07-0580.

Nollau, P.; Scheller, H.; Kona-Horstmann, M.; Rohde, S.; Hagenmuller, F.; Wagener, C.; Neumaier, M. (1997): Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. In: *Cancer research* 57 (12), S. 2354–2357.

Nouvion, Anne-Laure; Beauchemin, Nicole (2009): CEACAM1: modulateur central du métabolisme, de la progression tumorale, de l'angiogenèse et de l'immunité. In: *Medecine sciences : M/S* 25 (3), S. 247–252. DOI: 10.1051/medsci/2009253247.

Nouvion, Anne-Laure; Oubaha, Malika; Leblanc, Sarah; Davis, Elaine C.; Jastrow, Holger; Kammerer, Robert et al. (2010): CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 24), S. 4221–4230. DOI: 10.1242/jcs.073635.

Ohta, Hirotohi; Wada, Hisayasu; Niwa, Tamikazu; Kirii, Hirokazu; Iwamoto, Naoki; Fujii, Hidehiko et al. (2005): Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. In: *Atherosclerosis* 180 (1), S. 11–17. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.016.

Oikawa, S.; Kuroki, M.; Matsuoka, Y.; Kosaki, G.; Nakazato, H. (1992): Homotypic and heterotypic Ca⁺⁺-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186 (2), S. 881–887.

Oliver, Constance; Jamur, Maria Célia (Hg.) (2010): Immunocytochemical methods and protocols. 3. ed. New York, NY: Humana Press (Springer protocols, 588).

Orekhov, Alexander N.; Bobryshev, Yuri V.; Chistiakov, Dimitry A. (2014): The complexity of cell composition of the intima of large arteries: focus on pericyte-like cells. In: *Cardiovascular research* 103 (4), S. 438–451. DOI: 10.1093/cvr/cvu168.

Otsuka, Fumiuyuki; Kramer, Miranda C. A.; Woudstra, Pier; Yahagi, Kazuyuki; Ladich, Elena; Finn, Alope V. et al. (2015): Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. In: *Atherosclerosis* 241 (2), S. 772–782. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.011.

- Pahakis, Manolis Y.; Kosky, Jason R.; Dull, Randal O.; Tarbell, John M. (2007): The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355 (1), S. 228–233. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.01.137.
- Perticone, F.; Ceravolo, R.; Pujia, A.; Ventura, G.; Iacopino, S.; Scozzafava, A. et al. (2001): Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. In: *Circulation* 104 (2), S. 191–196. DOI: 10.1161/01.CIR.104.2.191.
- Phillips, Michael C. (2014): Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. In: *IUBMB life* 66 (9), S. 616–623. DOI: 10.1002/iub.1314.
- Plump, A. S.; Smith, J. D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A.; Verstuyft, J. G. et al. (1992): Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. In: *Cell* 71 (2), S. 343–353.
- Ponnuswamy, Padmapriya; Schrötte, Angelika; Ostermeier, Eva; Grüner, Sabine; Huang, Paul L.; Ertl, Georg et al. (2011): eNOS Protects from Atherosclerosis Despite Relevant Superoxide Production by the Enzyme in apoE(–/–) Mice. In: *PloS one* 7 (1), e30193. DOI: 10.1371/journal.pone.0030193.
- Poy, Matthew N.; Yang, Yan; Rezaei, Khadijeh; Fernstrom, Mats A.; Lee, Abraham D.; Kido, Yoshiaki et al. (2002): CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. In: *Nature genetics* 30 (3), S. 270–276. DOI: 10.1038/ng840.
- Puchta, Alicja; Naidoo, Avee; Verschoor, Chris P.; Loukov, Dessi; Thevaranjan, Netusha; Mandur, Talveer S. et al. (2016): TNF Drives Monocyte Dysfunction with Age and Results in Impaired Anti-pneumococcal Immunity. In: *PLoS pathogens* 12 (1), e1005368. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005368.
- Radeva, Mariya Y.; Kugelmann, Daniela; Spindler, Volker; Waschke, Jens (2014): PKA compartmentalization via AKAP220 and AKAP12 contributes to endothelial barrier regulation. In: *PloS one* 9 (9), e106733. DOI: 10.1371/journal.pone.0106733.
- Ramnath, Raina; Foster, Rebecca R.; Qiu, Yan; Cope, George; Butler, Matthew J.; Salmon, Andrew H. et al. (2014): Matrix metalloproteinase 9-mediated shedding of syndecan 4 in response to tumor necrosis factor alpha: a contributor to endothelial cell glycocalyx dysfunction. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (11), S. 4686–4699. DOI: 10.1096/fj.14-252221.

- Ray, Robin; Shah, Ajay M. (2005): NADPH oxidase and endothelial cell function. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 109 (3), S. 217–226. DOI: 10.1042/CS20050067.
- Rosenfeld, Michael E.; Averill, Michelle M.; Bennett, Brian J.; Schwartz, Stephen M. (2008): Progression and disruption of advanced atherosclerotic plaques in murine models. In: *Current drug targets* 9 (3), S. 210–216.
- Ross, R. (1979): The arterial wall and atherosclerosis. In: *Annual review of medicine* 30, S. 1–15. DOI: 10.1146/annurev.me.30.020179.000245.
- Ross, R. (1986): The pathogenesis of atherosclerosis--an update. In: *The New England journal of medicine* 314 (8), S. 488–500. DOI: 10.1056/NEJM198602203140806.
- Roth Flach, Rachel J.; Skoura, Athanasia; Matevossian, Anouch; Danai, Laura V.; Zheng, Wei; Cortes, Christian et al. (2015): Endothelial protein kinase MAP4K4 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. In: *Nature communications* 6, 8995 EP -.
- Royall, J. A.; Berkow, R. L.; Beckman, J. S.; Cunningham, M. K.; Matalon, S.; Freeman, B. A. (1989): Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability. In: *The American journal of physiology* 257 (6 Pt 1), L399-410. DOI: 10.1152/ajplung.1989.257.6.L399.
- Rueckschloss, Uwe; Kuerten, Stefanie; Ergun, Suleyman (2016): The role of CEA-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in vascular homeostasis. In: *Histochemistry and cell biology* 146 (6), S. 657–671. DOI: 10.1007/s00418-016-1505-9.
- Saunders, Norman R.; Dziegielewska, Katarzyna M.; Mollgard, Kjeld; Habgood, Mark D. (2015): Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 385. DOI: 10.3389/fnins.2015.00385.
- Schachinger, V.; Britten, M. B.; Zeiher, A. M. (2000): Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. In: *Circulation* 101 (16), S. 1899–1906. DOI: 10.1161/01.CIR.101.16.1899.
- Schulte, Dorte; Kuppens, Verena; Dartsch, Nina; Broermann, Andre; Li, Hang; Zarbock, Alexander et al. (2011): Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte

extravasation and vascular permeability. In: *The EMBO journal* 30 (20), S. 4157–4170. DOI: 10.1038/emboj.2011.304.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo (2014): Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Band 1, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-004-129726>.

Seidemann, Sara B.; Lighthouse, Janet K.; Greif, Daniel M. (2014): Development and pathologies of the arterial wall. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (11), S. 1977–1999. DOI: 10.1007/s00018-013-1478-y.

Sena, Cristina M.; Pereira, Ana M.; Seica, Raquel (2013): Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (12), S. 2216–2231. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.08.006.

Shihata, Waled A.; Michell, Danielle L.; Andrews, Karen L.; Chin-Dusting, Jaye P. F. (2016): Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? In: *Frontiers in Physiology* 7, S. 628. DOI: 10.3389/fphys.2016.00628.

Shirwany, Najeeb A.; Zou, Ming-hui (2010): Arterial stiffness: a brief review. In: *Acta pharmacologica Sinica* 31 (10), S. 1267–1276. DOI: 10.1038/aps.2010.123.

Singer, Bernhard B.; Opp, Lena; Heinrich, Annina; Schreiber, Frauke; Binding-Liermann, Ramona; Berrocal-Almanza, Luis Carlos et al. (2014): Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. In: *PloS one* 9 (4), e94106. DOI: 10.1371/journal.pone.0094106.

Sitia, S.; Tomasoni, L.; Atzeni, F.; Ambrosio, G.; Cordiano, C.; Catapano, A. et al. (2010): From endothelial dysfunction to atherosclerosis. In: *Autoimmunity reviews* 9 (12), S. 830–834. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.07.016.

Söderberg, Ola; Leuchowius, Karl-Johan; Gullberg, Mats; Jarvius, Malin; Weibrecht, Irene; Larsson, Lars-Gunnar; Landegren, Ulf (2008): Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 45 (3), S. 227–232. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.06.014.

Sowa, G.; Liu, J.; Papapetropoulos, A.; Rex-Haffner, M.; Hughes, T. E.; Sessa, W. C. (1999): Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (32), S. 22524–22531.

Spaulding, C. C.; Walford, R. L.; Effros, R. B. (1997): Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice. In: *Mechanisms of ageing and development* 93 (1-3), S. 87–94.

Springer, T. A. (1990): Adhesion receptors of the immune system. In: *Nature* 346 (6283), S. 425–434. DOI: 10.1038/346425a0.

Stern, Noam; Markel, Gal; Arnon, Tal I.; Gruda, Raizy; Wong, Henry; Gray-Owen, Scott D.; Mandelboim, Ofer (2005): Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (11), S. 6692–6701.

Stevens, T. J.; Arkin, I. T. (2000): Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? In: *Proteins* 39 (4), S. 417–420.

Storch, Amanda Sampaio; Mattos, João Dario de; Alves, Renata; Galdino, Iuri dos Santos; Rocha, Helena Naly Miguens (2017): Methods of Endothelial Function Assessment. Description and Applications. In: *International Journal of Cardiovascular Sciences*. DOI: 10.5935/2359-4802.20170034.

Sun, Yu; Hu, Guochang; Zhang, Xiumei; Minshall, Richard D. (2009): Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. In: *Circulation research* 105 (7), 676-85, 15 p following 685. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201673.

Suwaidi, J. A.; Hamasaki, S.; Higano, S. T.; Nishimura, R. A.; Holmes, D. R., JR; Lerman, A. (2000): Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. In: *Circulation* 101 (9), S. 948–954.

Szulcek, Robert; Bogaard, Harm Jan; van Nieuw Amerongen, Geerten P. (2014): Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (85), S. 51300. DOI: 10.3791/51300.

Tabas, Ira; Garcia-Cardena, Guillermo; Owens, Gary K. (2015): Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. In: *The Journal of cell biology* 209 (1), S. 13–22. DOI: 10.1083/jcb.201412052.

Tabas, Ira; Williams, Kevin Jon; Boren, Jan (2007): Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic

implications. In: *Circulation* 116 (16), S. 1832–1844. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.

Tang, Hua; Araki, Kimi; Li, Zhenghua; Yamamura, Kenichi (2008): Characterization of Ayu17-449 gene expression and resultant kidney pathology in a knockout mouse model. In: *Transgenic research* 17 (4), S. 599–608. DOI: 10.1007/s11248-008-9170-y.

Teixeira, Cleber E.; Webb, R. Clinton (2004): Cold-induced vasoconstriction: a Waltz pairing Rho-kinase signaling and alpha2-adrenergic receptor translocation. In: *Circulation research* 94 (10), S. 1273–1275. DOI: 10.1161/01.RES.0000131755.49084.04.

Teupser, Daniel; Persky, Adam D.; Breslow, Jan L. (2003): Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (10), S. 1907–1913. DOI: 10.1161/01.ATV.0000090126.34881.B1.

Tilki, D.; Irmak, S.; Oliveira-Ferrer, L.; Hauschild, J.; Miethe, K.; Atakaya, H. et al. (2006): CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. In: *Oncogene* 25 (36), S. 4965–4974. DOI: 10.1038/sj.onc.1209514.

Tran, Jason; Magenau, Astrid; Rodriguez, Macarena; Rentero, Carles; Royo, Teresa; Enrich, Carlos et al. (2016): Activation of Endothelial Nitric Oxide (eNOS) Occurs through Different Membrane Domains in Endothelial Cells. In: *PloS one* 11 (3), e0151556. DOI: 10.1371/journal.pone.0151556.

van den Berg, Bernard M.; Spaan, Jos A. E.; Vink, Hans (2009): Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457 (6), S. 1199–1206. DOI: 10.1007/s00424-008-0590-6.

VanderLaan, Paul A.; Reardon, Catherine A.; Getz, Godfrey S. (2004): Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (1), S. 12–22. DOI: 10.1161/01.ATV.0000105054.43931.f0.

- Vitenshtein, Alon; Weisblum, Yiska; Hauka, Sebastian; Halenius, Anne; Oiknine-Djian, Esther; Tsukerman, Pinchas et al. (2016): CEACAM1-Mediated Inhibition of Virus Production. In: *Cell reports* 15 (11), S. 2331–2339. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.036.
- Voges, Maïke; Bachmann, Verena; Kammerer, Robert; Gophna, Uri; Hauck, Christof R. (2010): CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. In: *BMC microbiology* 10, S. 117. DOI: 10.1186/1471-2180-10-117.
- Wagenseil, Jessica E.; Mecham, Robert P. (2009): Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. In: *Physiological reviews* 89 (3), S. 957–989. DOI: 10.1152/physrev.00041.2008.
- Wallez, Yann; Huber, Philippe (2008): Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (3), S. 794–809. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.09.003.
- Wang, Julie C.; Bennett, Martin (2012): Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. In: *Circulation research* 111 (2), S. 245–259. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261388.
- Waschke, J.; Curry, F. E.; Adamson, R. H.; Drenckhahn, D. (2005): Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (3), H1296-305. DOI: 10.1152/ajpheart.00687.2004.
- Waschke, Jens; Böckers, Tobias M.; Paulsen, Friedrich (Hg.) (2015): Anatomie. Das Lehrbuch : Sobotta. Unter Mitarbeit von Wolfgang H. Arnold und Johannes Sobotta. 1. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Watt, S. M.; Teixeira, A. M.; Zhou, G. Q.; Doyonnas, R.; Zhang, Y.; Grunert, F. et al. (2001): Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. In: *Blood* 98 (5), S. 1469–1479.
- Wautier, Jean-Luc; Schmidt, Ann Marie (2004): Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. In: *Circulation research* 95 (3), S. 233–238. DOI: 10.1161/01.RES.0000137876.28454.64.
- Weber, Christian; Noels, Heidi (2011): Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. In: *Nature medicine* 17 (11), S. 1410–1422. DOI: 10.1038/nm.2538.

Whitman, Stewart C. (2004): A practical approach to using mice in atherosclerosis research. In: *The Clinical biochemist. Reviews* 25 (1), S. 81–93.

WHO (1958): CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group. In: *World Health Organization technical report series* 57 (143), S. 1–20.

Worsdorfer, Philipp; Mekala, Subba Rao; Bauer, Jochen; Edenhofer, Frank; Kuerten, Stefanie; Ergun, Suleyman (2017): The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. In: *Pharmacology & therapeutics* 171, S. 13–29. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.017.

Xu, Elaine; Dubois, Marie-Julie; Leung, Nelly; Charbonneau, Alexandre; Turbide, Claire; Avramoglu, Rita Kohen et al. (2009): Targeted Disruption of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Promotes Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. In: *Endocrinology* 150 (8), S. 3503–3512. DOI: 10.1210/en.2008-1439.

Yeh, D. C.; Duncan, J. A.; Yamashita, S.; Michel, T. (1999): Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (46), S. 33148–33154.

Zengin, Elvin; Chalajour, Fariba; Gehling, Ursula M.; Ito, Wulf D.; Treede, Hendrik; Lauke, Heidrun et al. (2006): Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 133 (8), S. 1543–1551. DOI: 10.1242/dev.02315.

Zhang, Qian; Church, Jarrod E.; Jagnandan, Davin; Catravas, John D.; Sessa, William C.; Fulton, David (2006): Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (5), S. 1015–1021. DOI: 10.1161/01.ATV.0000216044.49494.c4.

Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Piedrahita, J. A.; Maeda, N. (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5081), S. 468–471.

Zhang, Yi; Agnoletti, Davide; Protogerou, Athanase D.; Topouchian, Jirar; Wang, Ji-Guang; Xu, Yawei et al. (2013): Characteristics of pulse wave velocity in elastic and muscular arteries: a mismatch beyond age. In: *Journal of hypertension* 31 (3), 554-9; discussion 559. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32835d4aec.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schematische Darstellung des Gefäßwandaufbaus.....	1
Abb.2: Molekulare Mechanismen der endothelialen Dysfunktion.	4
Abb.3: Schematische Darstellung von Tight Junctions und Adherens Junctions zwischen Endothelzellen.	6
Abb.4: Pathogenese der Arteriosklerose („Response to injury“-Hypothese).	8
Abb.5: Verschiedene Mitglieder der CEA-Familie.....	11
Abb.6: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.	23
Abb.7: Schematische Darstellung des Prinzips der Co-Immunopräzipitation.	29
Abb.8: Schematische Darstellung der Permeabilitätsmessung mit Evans Blue.....	35
Abb.9: Schematische Darstellung des Transwell® Assays.	36
Abb.10: Expression von CEACAM1 in Aorten muriner Arteriosklerosemodelle.....	38
Abb.11: Zellmorphologische Unterschiede zwischen WT und Cc1 ^{-/-} MyEnd-Zellen .	39
Abb.12: Einfluss von CEACAM1 auf die sub-zelluläre Lokalisation von eNOS.	40
Abb.13: CEACAM1 bildet Komplexe mit eNOS und Caveolin-1.....	41
Abb.14: CEACAM1 beeinflusst die Palmytoylierung von eNOS via APT1.....	42
Abb.15: Verstärkte Monozyten-Endothel-Interaktion bei CEACAM1-Defizienz.	43
Abb.16 Einfluss von CEACAM1 auf die Expression Glykokalyx-degradierender Enzyme.....	43
Abb.17 Einfluss von CEACAM1 auf die Permeabilität von MyEnd-Zellkulturen unter Basalbedingungen.....	44
Abb.18: Plaqueentwicklung in verschiedenen Mausmodellen.	45
Abb.19: Nachweis verminderter endothelialer Barrierefunktion mittels Evans Blue Assay.....	46
Abb.20: Permeabilitätsmessungen an Aortenringen aus WT und Cc1 ^{-/-} Mäusen.	47
Abb.21: Altersabhängiger Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Barriere.....	48
Abb.22: Einfluss von CEACAM1 auf die vaskuläre Expression von TNF-α.	48
Abb.23: Einfluss von CEACAM1 auf die TNF-α-abhängige Regulation der endothelialen Permeabilität.	49
Abb.24: Einfluss von CEACAM1 auf die Expression und Phosphorylierung von Caveolin-1.	50
Abb.25: Einfluss von CEACAM1 auf die Phosphorylierung von AJ-Proteinen.....	51
Abb.26: Verstärkte Komplexbildung von CEACAM1 mit AJ-Proteinen und Src-Kinase nach TNF-α-Inkubation.....	52

Abb.27: Einfluss von CEACAM1 auf die TNF- α -vermittelte Modulation der endothelialen Barriere.....	60
Abb.28: Einfluss von CEACAM1 auf verschiedene Aspekte der endothelialen Homöostase.	62

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Funktion“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Florian Kleefeldt

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entiteled “Influence of CEACAM1 on endothelial function” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and /or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not been submitted as a part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Florian Kleefeldt

10 Veröffentlichungen

Erstautorenschaften:

- Visualization of endothelial barrier damage prior to formation of atherosclerotic plaques.
Bömmel H*, **Kleefeldt F***, Zerneck A, Ghavampour S, Wagner N, Kuerten S, Ergün S Histochem Cell Biol. 2017 Aug;148(2):117-127. doi: 10.1007/s00418-017-1562-8 * geteilte Erstautorenschaft
- Endothelial barrier function is differentially regulated by CEACAM1-mediated signaling.
Ghavampour S*, **Kleefeldt F***, Bömmel H, Volland J, Paus A, Horst A, Pfeiffer V, Hübner S, Wagner N, Rueckschloss U, Ergün S FASEB J. 2018 May 10:fj201800331R. doi: 10.1096/fj.201800331R * geteilte Erstautorenschaft
- Aging-related CEACAM1 signaling promotes vascular dysfunction.
Kleefeldt F, Bömmel H, Broede B, Thomsen M, Pfeiffer V, Wörsdörfer P, Karnati S, Wagner N, Rueckschloss U, Ergün S. Manuskript in Revision.

Preise und Auszeichnungen:

- Posterpreis Kategorie: Grundlagenforschung
 - Deutsches Zentrum für Herzinsuffizienz Würzburg (DZHI) Retreat 2018
Endothelial barrier function is differentially regulated by CEACAM1-mediated signaling.
F. Kleefeldt, S. Ghavampour, H. Bömmel, J. Volland, A. Paus, S. Hübner, A. Horst, N. Wagner, U. Rueckschloss, S. Ergün
- Paper of the Month May 2018 der Anatomischen Gesellschaft
 - Endothelial barrier function is differentially regulated by CEACAM1-mediated signaling.
Ghavampour S, **Kleefeldt F**, Bömmel H, Volland J, Paus A, Horst A, Pfeiffer V, Hübner S, Wagner N, Rueckschloss U, Ergün S FASEB J. 2018 May 10:fj201800331R. doi: 10.1096/fj.201800331R

11 Lebenslauf

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Anatomie und Zellbiologie Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün erstellt.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, für die Überlassung des interessanten Themas, sein unermüdliches Engagement und seine hervorragende Unterstützung und Förderung bedanken. Darüber hinaus konnte er mein Interesse an medizinisch-wissenschaftlichen Fragestellungen wecken und mich für die Forschungsarbeit begeistern.

Im Laufe der Entstehung dieser Doktorarbeit haben mich zahlreiche Personen mit Rat und Tat unterstützt. Ohne diese Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heike Bömmel, Frau Dr. rer. nat. Sharang Ghavampour und Herrn PD Dr. rer. nat. Uwe Rückschloss für die sehr gute Betreuung und Förderung dieser Arbeit und die tolle Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt den technischen Mitarbeitern der kardiovaskulären Forschungsgruppe in der Anatomie, insbesondere Nadja Höhn und Lisa Berberich für die exzellente Unterstützung in technischen Fragen und die schöne Zeit, in der auch immer wieder kräftig gelacht wurde. Zudem möchte ich Erna Kleinschroth für ihre hervorragende Unterstützung im Histologielabor danken. Vor allem zu Beginn meiner Promotion war ich viel in der Histologie und lernte dank Erna Kleinschroth die Grundlagen der histologischen Färbetechniken kennen. Durch ihr Fachwissen und Engagement konnte manch diffizile Färbung und Einbettung, die zunächst unmöglich erschien, realisiert werden und ich für Histologie begeistert werden. Mein Dank gilt auch den weiteren Mitarbeiterinnen des Histologielabors: Doris Dettelbacher-Weber und Elke Varin. Zudem möchte ich Tatjana Metzger für ihre technische Unterstützung bei der Durchführung der Evans Blue-Versuche danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, auf die ich mich zu jeder Zeit verlassen konnte und die mich in meinem Leben stets tatkräftig unterstützt hatte. Ohne sie wäre mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen, daher widme ich diese Arbeit meinen Eltern.