

Aus dem Gefäßzentrum Oberallgäu-Kempton
der Klinik Immenstadt
Lehrkrankenhaus der Universität Ulm
Chefarzt PD Dr. Wulf Ito

**Untersuchungen zur Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls Ceacam-1
(CEA-related cell adhesion molecule-1) für das Kollateralwachstum
anhand eines Maus-Femoralarterienokklusionsmodells**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Joachim Dabelstein

aus Hamburg

Ulm 2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wulf Ito

2. Berichterstatter: PD Dr. Barbara Möpps

Tag der Promotion: 21.10.2016

„Die Entdeckung, dass es so einfach nicht ist, wie man gedacht hat, ist als Gewinn
anzusehen.“

Carl Friedrich von Weizsäcker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.1.1. Koronare Herzerkrankung.....	1
1.1.2. Akuter Myokardinfarkt	1
1.1.3. Arterielle Verschlusskrankheit.....	2
1.1.4. Heutige Therapiemöglichkeiten.....	3
1.2. Formen der Neovaskularisierung	5
1.2.1. Vaskulogenese	5
1.2.2. Angiogenese.....	5
1.2.3. Arteriogenese	5
1.2.4. Adultes Gefäßwachstum und therapeutischer Ansatz.....	6
1.3. Ceacam.....	8
1.3.1. Das Adhäsionsmolekül	8
1.3.2. Nomenklatur.....	8
1.3.3. Expression.....	10
1.3.4. Struktur.....	10
1.3.5. Signaltransduktion	11
1.3.6. Ceacam-1 und das Gefäßwachstum	12
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Das Tiermodell.....	15
2.2. Operationsvorbereitungen	16
2.2.1. Verwendete Substanzen	16
2.2.2. Füllung der osmotischen Minipumpen	17
2.3. Erste Operation der Tiere	17
2.3.1. Narkose der Tiere.....	17
2.3.2. Induktion der Arteriogenese.....	18
2.3.3. Implantation der BrdU-Pumpen.....	18

2.4. Zweite Operation der Tiere	19
2.4.1. Messung der kollateralen Konduktanz.....	19
2.4.2. Injektion der Mikrosphären.....	21
2.4.3. Gewebepräparation	22
2.5. Weiterführende Untersuchungen	23
2.5.1. Immunhistologische Aufarbeitung.....	23
2.5.2. Mikrosphärenzählung.....	26
2.6. Statistik.....	26
3. Ergebnisse	28
3.1. Vergleich der Durchblutungskapazität von Kollateralarterien	28
3.1.1. Vergleich der Durchblutungskapazität mithilfe der Mikrosphären	28
3.1.2. Vergleich der Durchblutungskapazität mithilfe der Flowprobe	30
3.2. Analyse der Zellproliferation	32
3.2.1. Vergleich der ligierten Beine	32
3.2.2. Vergleich der nicht-ligierten Beine.....	34
4. Diskussion.....	37
5. Zusammenfassung.....	42
6. Literaturverzeichnis	43
7. Danksagung.....	53
8. Lebenslauf.....	54
9. Erklärung.....	56

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Aqua dest.	destilliertes Wasser
A.	Arteria
ASS	Acetylsalicylsäure
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
β	Beta
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CEA	carcinoembryonic antigen
Ceacam	CEA related cell adhesion molecule
CI	Claudicatio Intermittens
cm	Zentimeter
COOH	Carboxygruppe
Cy2	fluoreszierendes Carbocyanin
DNA	deoxyribonucleic acid
et al.	et alii
g	Gramm
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure

HIF-1	hypoxia inductable factor-1
IGSF	immunoglobulin superfamily
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	knock-out
m	Meter
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight
n	Anzahl der in einem Versuch verwendeten Tiere
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH_2	Aminogruppe
O_2	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit/Signifikanz
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
Pecam	platelet endothelial cell adhesion molecule
pH	pondus hydrogenii

PPD	1,2 Phenylendiamine
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s	Sekunde
SHP	SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase
src	Akronym (cellular / sarcoma)
Tie2	Akronym (tyrosine kinase / Ig / EGF)
u.a.	unter anderem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
VE	vascular endothelial
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtiere

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Horst AK, Wulf I, Dabelstein J, Schumacher U, Sander H, Turbide C, Brümmer J, Meinertz T, Beauchemin N, Wagener C. Carcinoembryonic antigen–related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 116:1596-1605 (2006)

1. Einleitung

1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Unter dem Begriff der kardiovaskulären Erkrankungen findet sich eine sehr heterogene Gruppe von Krankheitsbildern, die aufgrund ihrer Häufigkeit von besonderem, medizinischem Interesse sind. Von den 893.825 Personen, die im Jahr 2013 in der Bundesrepublik verstarben, erlagen allein 354.493 Menschen Erkrankungen des Kreislaufsystems. 125.220 Menschen starben entweder an der chronisch ischämischen Herzerkrankung oder durch einen akuten Herzinfarkt. Darüber hinaus verursachten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahre 2008 Kosten in Höhe von 37 Milliarden Euro. Dies entspricht einem Anteil von 14,5 % an den Gesamtkrankheitskosten [88]. Die Erkrankungen kardiovaskulärer Genese stellen somit ein bedeutendes medizinisches wie auch volkswirtschaftliches Problem dar, welches mit dem fortschreitenden demografischen Wandel in den westlichen Industrienationen immer mehr an Bedeutung gewinnt und für die heutige Medizin eine große Herausforderung darstellt.

1.1.1. Koronare Herzerkrankung

Die KHK ist die Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien. Es handelt sich um einen multifaktoriellen Prozess, bei dem es durch aus Kalk, Bindegewebe und Lipiden bestehenden Gefäßwandablagerungen zu einer Lumeneinengung in den Herzkranzgefäßen kommt. Das Missverhältnis zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf führt zur Ischämie, die sich klinisch in Krankheitsbildern wie der Angina Pectoris, dem Myokardinfarkt, der Linksherzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen äußert. Bezüglich der Entstehung einer KHK sind eine Reihe von Risikofaktoren bekannt. Hierzu gehören u.a.: familiäre vorzeitige Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, starkes Übergewicht, Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, männliches Geschlecht sowie bei Frauen die Einnahme von Kontrazeptiva [24].

1.1.2. Akuter Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt wird definiert als der Tod von Herzmuskelzellen infolge einer langandauernden Ischämie [83]. Die häufigste Ursache des Myokardinfarktes stellt dabei

ein Thrombus in den Herzkranzgefäßen nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque dar [62]. Das Ausmaß der myokardialen Ischämie wird durch das Ausmaß des Gefäßverschlusses, die Größe des infarzierten Areals, die Dauer bis zu einer eventuellen Reperfusion, den Grad der vorbestehenden Kollateralversorgung und die Intensität der Reperfusion bestimmt [37]. Die Größe der entstehenden myokardialen Nekrose ist ein entscheidender Faktor für die Langzeitprognose [39].

1.1.3. Arterielle Verschlusskrankheit

Bei der AVK kommt es zu stenosierenden und/oder okkludierenden Prozessen der Aorta bzw. in den herzfernen Arterien. Auch diese Veränderungen sind zu 95 % arteriosklerotisch bedingt. Meist sind die versorgenden Arterien der unteren Extremitäten betroffen. Die Gesamtprävalenz liegt bei 3-10 %. Ab einem Alter von 70 Jahren steigt die Prävalenz auf 15-20 % [27, 28]. Die AVK wird nach Fontaine in 4 Stadien unterteilt. Im ersten Stadium ist der Patient trotz nachweisbarer Gefäßpathologie asymptomatisch. Diese Form der AVK kommt in allen Altersklassen vor. Im Stadium 2 beklagen die Patienten belastungsabhängige Schmerzen vor allem im Bereich der Wadenmuskulatur. Liegt die asymptomatische Gehstrecke über 200 m, spricht man vom Stadium 2a, liegt diese unter 200 m vom Stadium 2b. Im Stadium 3 liegt bereits ein Ruheschmerz vor, und das Stadium 4 ist gekennzeichnet durch einen ischämisch bedingten Gewebsuntergang mit Nekrose oder Gangrän. Wurde eine chronische pAVK diagnostiziert, so unterscheidet man hier zwischen dem Stadium der Claudicatio intermittens (CI) mit belastungsabhängigen Schmerzen sowie dem Stadium der kritischen Ischämie mit Ischämie und Ulzerationen.

Von besonderer klinischer Relevanz ist die Koinzidenz der AVK mit den kardialen und zerebralen Durchblutungsstörungen. Ist das Stadium der kritischen Ischämie erreicht, besteht eine signifikant erhöhte Mortalität vornehmlich bedingt durch Myokardinfarkt und Schlaganfall. Liegt eine manifeste pAVK vor, ist das Risiko eines Myokardinfarktes um das Vierfache und das Risiko eines Schlaganfalles um das Zwei- bis Dreifache erhöht [58, 62]. Zudem besteht ein stark erhöhtes Risiko für Majoramputationen der betroffenen Extremität.

1.1.4. Heutige Therapiemöglichkeiten

Die Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit sollte entsprechend den S3-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Angiologie erfolgen. Im Stadium 1 nach Fontaine steht die Behandlung und Reduktion von Risikofaktoren im Vordergrund. Ein Nikotinstopp ist dringend erforderlich. Außerdem wird bei Bewegungsmangel und Fehlernährung eine Lebensstiländerung empfohlen. Bereits in diesem Stadium ist die Aufnahme einer medikamentösen Therapie indiziert. Hier kommen heutzutage insbesondere Thrombozytenfunktionshemmer wie ASS oder Clopidogrel zum Einsatz. Diese beiden Medikamente verhindern nachweislich das Auftreten von Herzinfarkten und Schlaganfällen [5, 64].

Im Stadium 2 tritt als Ziel die Verbesserung von Mobilität und Gehstrecke hinzu. In diesem Stadium ist die alleinige Therapie mit Thrombozytenfunktionshemmern unzureichend, denn sie haben keinen Einfluss auf eine Verbesserung der Gehstrecke. Die einzige medikamentöse Alternative stellt hier Cilostazol, ein Phosphodiesterase-3-Hemmer, dar. Oft muss dieses Medikament jedoch aufgrund seiner Nebenwirkungen wieder abgesetzt werden, da es unter Cilostazol zu Kopfschmerzen, Diarrhoen und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten kommen kann. Zudem ist es bei instabiler KHK und nach stattgehabtem Myokardinfarkt kontraindiziert [13, 77].

Neben dem Cilostazol ist das gezielte Gehtraining eine wesentliche Therapieoption in diesem Stadium. Das Training sollte mindestens 3 x wöchentlich in Übungseinheiten von 30-60 Minuten über einen Zeitraum von 3 Monaten angeboten werden. Ziel dieses strukturierten Gehtrainings ist eine Verbesserung der Kollateralisierung in den betroffenen Gefäßabschnitten. Aufgrund der Medikamentenunverträglichkeit stellt das Gehtraining für viele Patienten die einzige konservative Therapieoption dar.

Ist das Stadium der kritischen Ischämie erreicht, stehen Schmerzfreiheit, Extremitätenerhalt und Wiedererlangung der Gehfähigkeit im Vordergrund.

In diesem Stadium spielen operative revaskularisierende Maßnahmen die wichtigste Rolle. Hier sind insbesondere die intervenzielle Stentversorgung und die chirurgische Bypassversorgung zu nennen. Die Nachteile dieser gängigen revaskularisierenden Techniken liegen langfristig in den hohen Restenoseraten. Kurzfristig liegt bei den

interventionellen Verfahren die klinische Erfolgsrate noch bei bis zu 95 %. Bereits nach 5 Jahren liegt nur noch eine Offenheitsrate von 42-55 % vor [30, 36, 63, 91].

Zudem ist anzumerken, dass viele Patienten, insbesondere solche mit langstreckigen Verschlüssen der Unterschenkelgefäße, für derartige revaskularisierende Maßnahmen gar nicht in Betracht kommen. Für Patienten mit fortgeschrittener pAVK 4 wird zudem die Gabe von Prostaglandinen empfohlen. Aktuelle Studien haben jedoch bezüglich dieser Therapie keinen Vorteil gegenüber Placebo gezeigt, sodass am Ende oft nur die Amputation der Gliedmaße bleibt [61].

Aufgrund der hier dargelegten Problematik muss man davon ausgehen, dass die bisherigen Ansätze in der Therapie okkludierender Durchblutungsstörungen noch nicht zielführend und suffizient genug sind und verstärkt nach Möglichkeiten einer biologischen und damit natürlichen Revaskularisierung gesucht werden muss [81].

Ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt könnte so aussehen:

Bei Verschluss oder Stenose eines Gefäßes versucht man die Entstehung eines Kollateralkreislaufes zu stimulieren, damit binnen kürzester Zeit die Sauerstoffversorgung des unterversorgten Gewebes wieder gewährleistet wird. Eine derartige Stimulation wäre durch eine einmalige Injektion oder die dauerhafte Verabreichung wachstumsfördernder Substanzen vorstellbar. Bereits seit den Achtzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts können viele Wachstumsfaktoren gentechnisch hergestellt werden und stehen der medizinischen Forschung zur Verfügung [20]. Untersuchungen mittels rekombinanter Wachstumsfaktoren haben bereits gezeigt, dass es möglich ist, in ischämischen Tiermodellen neues Gefäßwachstum bzw. die Weiterentwicklung bereits bestehender Gefäße zu induzieren [38, 90, 94].

In klinischen Studien konnte dies bisher nicht reproduziert werden. Bei der Suche nach neuen Ansatzpunkten der sogenannten „therapeutischen Arteriogenese“ ist es wichtig, sich der grundlegenden Pathophysiologie des Gefäßwachstums klar zu werden.

1.2. Formen der Neovaskularisierung

Bei der Entstehung neuer Gefäße gibt es grundsätzlich 3 Wachstumsformen, die voneinander abgegrenzt werden müssen: die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese.

1.2.1. Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Differenzierung, Expansion und die Vereinigung von endothelialen Vorläuferzellen zu einem vaskulären Netzwerk. Der Begriff beschreibt hier die früheste Phase der menschlichen Gefäßentwicklung. In der initialen Phase differenzieren sich mesenchymale Zellen zu Hämangioblasten und lagern sich in Zellaggregaten sogenannten Blutinseln zusammen. Aus deren innerer Schicht entwickeln sich dann hämangiopotetische Vorläuferzellen (Hämozytoblasten), wohingegen sich erste primitive Endothelzellen aus der äußeren Schicht rekrutieren. Im weiteren Verlauf entsteht dann durch Invaginationsvorgänge ein komplexes, miteinander kommunizierendes Netzwerk: der fetale Blutkreislauf [8, 9, 31, 57, 75, 98].

1.2.2. Angiogenese

Der Begriff Angiogenese bezeichnet das Aussprossen neuer Gefäße aus bereits existierenden Gefäßstrukturen, die in der Vaskulogenese angelegt wurden [20, 74]. Der Hauptstimulus der Angiogenese ist die Ischämie und die damit einhergehende Hypoxie [29, 54]. Durch mangelnde Sauerstoffversorgung kommt es in den Gewebszellen zu einer vermehrten Expression des hypoxia inducible factor-1. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Synthese des angiogenen Faktors VEGF, der ein starkes Endothelzellmitogen darstellt [51].

1.2.3. Arteriogenese

Der menschliche Organismus ist in der Lage bei Gefäßverschlüssen sogenannte Umgehungs- oder auch Kollateralkreisläufe auszubilden. Diesen Prozess kann man sich wie die Bildung natürlicher Bypasse vorstellen. Hierbei kommt es nicht zur Aussprossung neuer Gefäße, stattdessen entwickeln sich präexistente arterioläre Anastomosen zu funktionell bedeutsamen Kollateralarterien [84]. Der Begriff der Arteriogenese wurde in den Neunzigerjahren von Schaper, Ito und ihren Kollegen eingeführt, da es oft zu

Verwechslungen zwischen dem Kollateralarterienwachstum (Arteriogenese) und der Angiogenese gekommen war. Mittlerweile ist der Terminus der Arteriogenese international akzeptiert und mehrfach zitiert worden.

1.2.4. Adultes Gefäßwachstum und therapeutischer Ansatz

Die ersten experimentellen Versuche auf dem Gebiet des Gefäßwachstums reichen über 30 Jahre zurück und entstammen der Tumorforschung [40, 41]. Im adulten Organismus lässt sich das Aussprossen neuer Gefäße bei inflammatorischen Prozessen wie der Arthritis, Vaskulitis oder anderen rheumatischen Erkrankungen nachweisen. Unter physiologischen Bedingungen findet die Angiogenese vor allem bei der Wundheilung sowie in den Organen des Reproduktionstraktes statt [42]. Lange Zeit nahm man an, dass die Angiogenese der beste therapeutische Ansatzpunkt ist, um stenosierende Prozesse durch neu gebildete Gefäße zu ersetzen. Aus unterschiedlichen Gründen ist dies jedoch nicht der Fall: Die Morphologie der Kapillaren zeigt, dass sie für den funktionellen Ersatz einer Arterie ungeeignet sind. Ihre Wand besteht ausschließlich aus Endothelzellen, die nicht von einer Schicht glatter Muskelzellen umgeben wird. Sie sind relativ instabil, rupturgefährdet und können sich neu auftretenden Kreislaufverhältnissen nur bedingt anpassen [19]. Aus therapeutischer Sicht bietet demgegenüber das Kollateralwachstum (Arteriogenese) einige entscheidende Vorteile: Zum einen findet Kollateralarterienwachstum in normoxischen Gewebe statt und zum anderen können diese Kollateralarterien ein Vielfaches ihres ursprünglichen Diameters erreichen, weisen eine erhöhte Zahl an glatten Muskelzellschichten auf und sind damit potentiell in der Lage arterielle Gefäße zu ersetzen [79, 99].

Um den proliferativen Prozess des Kollateralwachstums zu erklären und der Tatsache Rechnung zu tragen, dass dieses Wachstum auch in nicht-ischämischen Gebieten stattfindet, wurde von Schaper et Ito vor einigen Jahren folgendes Grundkonzept erarbeitet:

Nach dem Verschluss einer großen versorgenden Arterie umgeht das fließende Blut die bestehende Stenose durch präexistierende arterioläre Anastomosen. Hierbei steigen die Flussgeschwindigkeit und die damit einhergehenden Scherkräfte (shear stress) innerhalb dieser Gefäße dramatisch an. Um sich den wechselnden hämodynamischen Bedingungen

anzupassen, kommt es in der Folge zum vaskulären Umbauprozess (Remodeling) des Kollateralgefäßes. Dieser setzt sich aus dem „outward-remodeling“, bei dem es zur Dehnung des Gefäßes durch die Proliferation endothelialer und glatter Muskelzellen kommt, und dem „inward-remodeling“, der durch die Formation einer neuen Neointima gekennzeichnet ist, zusammen. Der Anpassungsprozess der Kollateralen hängt dabei stets von den lokalen hämodynamischen Kräften ab und wird so lange aufrechterhalten, bis die auf das Endothel wirkenden Scherkräfte wieder auf ihr Ausgangsniveau reduziert werden [80].

Bei diesem Kollateralwachstum scheint die Gegenwart monozytärer Zellen eine wesentliche Rolle zu spielen. So konnten zahlreiche Studien zeigen, dass das Kollateralwachstum stets mit der Akkumulation zahlreicher Makrophagen assoziiert ist und sich deren Anzahl positiv auf das Wachstum auswirkt [3, 45, 55, 71].

Bezüglich der Funktion der Monozyten wird angenommen, dass sie ein entsprechendes Milieu für das Gefäßwachstum schaffen, damit die beteiligten Zellen wachsen, migrieren und sich differenzieren können. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Monozyten angiogene, arteriogen und vaskulogene Zytokine produzieren [82]. Es wurde dabei ein direkter Zusammenhang zwischen den erhöhten Scherkräften innerhalb des Kollateralgefäßes und der Rekrutierung der zirkulierenden Zellen hergestellt. Man ging davon aus, dass es durch die erhöhten Scherkräfte zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen kommt und so den zirkulierenden Zellen der Übertritt in den subintimalen Raum erleichtert wird [8, 28].

1.3. Ceacam

1.3.1. Das Adhäsionsmolekül

Allgemein wird die große Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle in 4 große Klassen eingeteilt. Hierzu gehören: die Cadherine, die Integrine, die Selektine sowie die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie [2]. Alle Adhäsionsmoleküle sind transmembranöse Glykoproteine, die eine wichtige Rolle sowohl bei Zell-Zell- als auch Zell-Matrixverbindungen spielen [33]. Anders als der Name Adhäsionsmolekül nahe legt, sorgen diese Proteine nicht nur für die Adhäsion von Zellen, sondern sind teilweise auch in der Lage, Signale aus der äußeren Umgebung aufzunehmen, zu verarbeiten und in das Zellinnere weiterzuleiten. Diese Signale nehmen dann Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Genexpression, die Apoptose oder den Zellzyklus [52].

Ceacam ist ein Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie. Zu dieser Familie gehören weitere prominente Moleküle, u.a. der B-Zell-Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor und dessen Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 sowie die MHC-Moleküle der Klasse 1 und 2 [32].

1.3.2. Nomenklatur

Der Name des karzinoembryonalen Antigens (CEA) leitet sich von der Erstbeschreibung des Proteins als ein onkofetales Antigen ab. Man ging früher davon aus, dass das Protein nur im Embryo bzw. während eines Tumorleidens nicht jedoch im gesunden Erwachsenen exprimiert wird [44]. Heute weiß man, dass CEA auch im gesunden Organismus auf zahlreichen Zellen vorzufinden ist. Die Zuordnung des karzinoembryonalen Antigens zur Gruppe der Immunglobuline erfolgte 1987, als dessen cDNA entschlüsselt wurde [10, 69]. Das Zelladhäsionsmolekül Ceacam-1 selbst wurde 1982 zum ersten Mal als C-CAM (cell-cell adhesion molecule) in Rattenhepatozyten beschrieben [67]. Unabhängig davon wurde in den humanen Gallengangsepithelien ein Glykoprotein isoliert, welches den Namen BGP (biliäres Glykoprotein) erhielt [89]. Basierend auf der Aminosäuresequenz von BGP konnte die dazugehörige cDNA identifiziert werden [7, 47]. Als die C-CAM cDNA der Ratte kloniert wurde, war es offensichtlich, dass das BGP-Gen das menschliche Äquivalent des C-CAM-Gens ist [4].

Die CEA-Familie ist heute am besten in den Organismen Mensch, Ratte und Maus charakterisiert. Im Jahre 1997 wurde eine vereinheitlichte Nomenklatur für die karzinoembryonalen Antigene verabschiedet [12]. Dieser Nomenklatur zur Folge besteht die humane Ceacam-Gruppe aus 7 Genen und ihren Translationsprodukten. Hierzu gehören die Vertreter Ceacam-1, -3 und -4, die allesamt über eine Transmembrandomäne verfügen, sowie die Proteine Ceacam-5, -6, -7 und -8 (siehe hierzu Tabelle 1), deren Verbindung mit dem Zellinneren über ein Glykophosphatidylinositol (GPI)-Molekül realisiert ist [69]. In der Maus findet sich neben Ceacam-1 das Ceacam-2 Gen [65], welches ebenfalls für ein Transmembranprotein codiert, sowie die Gene Ceacam-9 und -10 (siehe hierzu Tabelle 2), aus denen sekretierte Proteine entstehen [59]. Da Ceacam-1 das einzige Mitglied der CEA-Familie ist, dass sich beim Menschen, der Maus und der Ratte nachweisen lässt [66], ist es am besten geeignet, eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen Spezies herzustellen und daher die Grundlage dieser Dissertation.

Tabelle 1: Neue Nomenklatur der humanen Ceacam-Genfamilie und ihrer Expressionsprodukte

Quelle: modifiziert nach Beauchemin N, Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. Exp Cell Res. 252:243-9 (1999) [12]

Altes Gen	Neues Gen
Humanes biliäres Glykoprotein, BGP1, TM-CEA, CD66a	Ceacam-1
CEA Genfamilienmitglied 1, CGM1, CD66d	Ceacam-3
CEA Genfamilienmitglied 7, CGM7	Ceacam-4
Karzinoembryonales Antigen, CEA, CD66e	Ceacam-5
Nonspecific cross-reacting Antigen, NCA, NCA-50/90 CD66c	Ceacam-6
CEA Genfamilienmitglied 2, CGM2	Ceacam-7
CEA Genfamilienmitglied 6, CGM6, CD66b	Ceacam-8

Tabelle 2: Neue Nomenklatur der Ceacam-Genfamilie der Maus und ihrer Expressionsprodukte

Quelle: modifiziert nach Keck U, Nedellec P, Beauchemin N, Thompson J, Zimmermann W. The cea10 gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow. Eur J Biochem. 229:455-64 (1995) [59]

Altes Gen	Neues Gen
BGP1, mCEA1, mmCGM1a, MHVR, bb-1	Ceacam-1
BGP2	Ceacam-2
CEA 5, mmCGM8	Ceacam-9
CEA 10, BGP 3	Ceacam-10

1.3.3. Expression

Ceacam-1 ist das phylogenetisch am stärksten konservierte Mitglied der CEA-Familie und weist auch das breiteste Expressionsspektrum dieser Proteinfamilie auf. In seiner Rolle als Zelladhäsionsmolekül wird es im menschlichen Organismus vorrangig auf epithelialen und endothelialen Zellen sowie auf Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Es wurde in Geweben der Prostata, des Pankreas, des Kolons, der Niere, der Mamma, des Endometriums und der Leber nachgewiesen [72]. Öbrink et al. konnten 1994 den ersten Nachweis erbringen, dass Ceacam-1 von Endothelzellen der Ratte exprimiert wird [78]. In den Folgejahren konnte Ceacam-1 auch auf ortsständigen vaskulären Vorläuferzellen sowie auf endothelialen und myeloischen Zellen der Maus nachgewiesen werden [43].

1.3.4. Struktur

Ceacam-1 ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein und verfügt über einen extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Molekülteil [12]. Der glykolisierte extrazelluläre NH₂-terminale Molekülteil von Ceacam-1 besteht aus 4 immunglobulinartigen Domänen mit einer Länge von 389 Aminosäuren, die in ihrer Zusammensetzung variieren [23]. Drei der Domänen weisen dabei den Charakter eines Immunglobulins des c-Typs auf und werden mit den Buchstaben A1, A2 bzw. B bezeichnet [12]. Die erste extrazelluläre Domäne ist ein V-Typ-Immunglobulin, wird mit dem Buchstaben N gekennzeichnet und macht den variablen Teil des Ceacam-1 aus (siehe

Abbildung 1) [97]. Betrachtet man den intrazellulären Teil von Ceacam-1, so existieren in Abhängigkeit von der COOH-terminalen zytoplasmatischen Domäne zwei Isoformen: die lange Ceacam-1-4L sowie die kürzere Ceacam-1-4S Form [12, 26]. Die zytoplasmatische Domäne der L-Form weist dabei 71-73 Aminosäuren, die der S-Form nur 10-14 Aminosäuren auf [12, 23, 66].

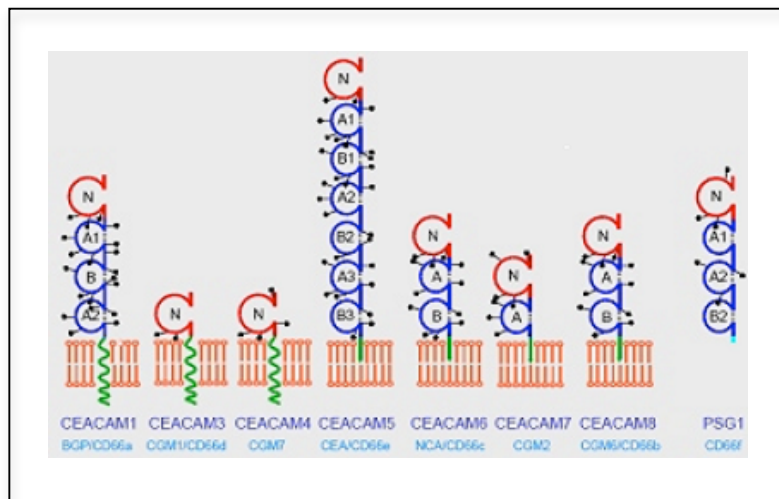


Abbildung 1: Schematische Struktur der humanen Ceacam-Familie

grün: intra- bzw. transmembranöse Domäne, blau: extrazelluläre Domäne vom c-Typ

rot: extrazelluläre, variable Domäne vom v-Typ

Mit freundlicher Genehmigung der Firma antibodies-online GmbH, Schloss-Rahe-Straße 15,
52072 Aachen, Deutschland, Quelle: <http://www.antibodies-online.com/antibody/108729/anti-CEACAM1-3-5-6+CEACAM1-3-5-6/> [1]

1.3.5. Signaltransduktion

Generell gilt für alle Zelladhäsionsmoleküle, dass die Weiterleitung extrazellulärer Signale von 2 wichtigen Komponenten abhängt: Hierzu gehört zum einen die reversible Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne und zum anderen die anschließende Interaktion mit intrazellulären Proteinen. Ceacam-1 verfügt über einen zytoplasmatischen Anker, der über Tyrosin- und Serinphosphorylierung in zentrale Signaltransduktionskaskaden eingebunden ist. An Ceacam-1 bindende Adaptermoleküle sind zum Beispiel Kinasen der src-Familie [16, 87] oder SHP-Phosphatasen [11,50]. Darüber hinaus verfügt die zytoplasmatische Domäne von Ceacam-1 über Bindungsstellen für Calmodulin [34] sowie Actin und Tropomyosin [86].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich über die Verbindung zu Integrinen, den Kinasen der src-Familie und Teilen des Zytoskeletts eine deutliche Nähe zu zellulären Komponenten ergibt, die für die Mechanotransduktion verantwortlich gemacht werden.

1.3.6. Ceacam-1 und das Gefäßwachstum

Im Jahre 2000 konnten Ergün et al. wichtige Hinweise auf die angiogenetische Potenz von Ceacam-1 erarbeiten. Um Ceacam-1 zu gewinnen, wurde dieses in einer Untersuchungsreihe von Endothelzellen und Granulozyten isoliert. Des Weiteren wurde rekombinantes Ceacam-1 aus einer menschlichen Zelllinie der Niere gewonnen. Anschließend wurden die humanen Endothelzellen in Gegenwart dieser Ceacam-Formen kultiviert. Es zeigte sich, dass Ceacam-1 die Proliferation und die Chemotaxis von Endothelzellen sowie deren Differenzierung zu pseudokapillären Strukturen, sogenannten „Endothelzelltubes“ stimuliert. Die angiogenen Eigenschaften von Ceacam-1 scheinen dabei direkt mit dem VEGF zusammenzuhängen. Die Kombination von Ceacam-1 und VEGF führt zu additiven Effekten. So erhöht die Kombination beider den chemotaktischen Effekt auf Endothelzellen um 25-30 %. Ferner ist die VEGF-induzierte Endothelzelltubenformation in Versuchen mit dem monoklonalen anti-Ceacam-1-Antikörper 4D1/C2 vollständig inhibierbar. Darüber hinaus ist VEGF in der Lage, die Expression von Ceacam-1 sowohl auf mRNA als auch auf der Proteinebene zu erhöhen [35]. Auch beim regenerativen Gefäßwachstum scheint Ceacam eine wichtige Rolle zu spielen. Untersuchungen der Genexpression in hypoxisch präkonditionierten Tieren nach akutem Herzinfarkt zeigten Ceacam-1 neben VEGF als eines der am stärksten hochregulierten Moleküle im hypoxischen Myokard [22].

Es ergeben sich also deutliche Hinweise darauf, dass Ceacam-1 bei der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen eine wichtige Rolle spielt. Inwieweit diese Beobachtungen in einem komplexen Organismus wie dem der Maus reproduzierbar sind und ob sich dabei Konsequenzen für das Kollateralarterienwachstum ergeben, soll im Folgenden erörtert werden.

Da Ceacam-1 ein homophiles Zelladhäsionsmolekül ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es zelluläre Zell-Zell-Interaktionen moduliert. Studien zeigen, dass Ceacam mit Integrinen

und Rezeptor-Kinasen beim carcinoma in situ interagiert. An Untersuchungen des invasiven Hautmelanomes konnte gezeigt werden, dass Ceacam-1 sich insbesondere mit $\beta 3$ -Integrinen verbindet [6, 17].

Fragestellung

Bisher ist weder bekannt, ob das Zelladhäsionsmolekül Ceacam-1 für die Arteriogenese notwendig ist, noch wissen wir, ob seine Gegenwart ausreicht, um die Entstehung von Kollateralarterien ausreichend zu induzieren. Zudem wurde in bisherigen Studien nur die Angiogenese und nicht das Kollateralarterienwachstum untersucht. Die vorgelegte Arbeit soll deshalb anhand eines Kollateralarterienwachstumsmodells der Maus zeigen, ob

- 1.) Ceacam-1 für das Kollateralwachstum der Maus notwendig ist. Hierzu wurden der Kollateralfluss und die Zellteilungsrate der Kollateralarterie nach Ligatur in Ceacam-1-defizienten KO-Mäusen mit Ceacam-1-kompetenten Kontrolltieren verglichen.
- 2.) Ceacam-1 für das Kollateralwachstum der Maus ausreichend ist. Hierzu wurden der Kollateralfluss und die Zellteilungsrate der Kollateralarterie nach Ligatur in Ceacam-1-überexprimierenden Ceacam1^{endo+}-Mäusen mit Ceacam-1-kompetenten Kontrolltieren verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Das Tiermodell

Um dem Studium eines so komplexen Mechanismus wie dem des Kollateralarterienwachstums gerecht zu werden, benötigt man ein geeignetes Modell. Da an der Kollateralbildung mehrere Zelltypen sowie extrazelluläre Matrix beteiligt sind, lässt sich diese nicht in einer Zellkultur simulieren. Für die Untersuchungen des Kollateralwachstums in-vivo verwendeten wir deshalb 2 unterschiedlich genetisch manipulierte Mausmodelle. Wir verwendeten Ceacam-1^{endo+}-Mäuse (Tie2-Ceacam-1) mit zusätzlicher Ceacam-L-Expression (FVB/N, unter der Kontrolle der endothelspezifischen Promoterregion der Tie2-Rezeptor-Kinase generiert von Frau Dr. Andrea Horst, Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Um die funktionellen Konsequenzen eines endothelialen Ceacam-1-Verlustes zu beobachten, verwendeten wir Ceacam-1-KO-Mäuse (Ceacam-1^{-/-}) mit einer systemischen Deletion des Ceacam-1-Gens (C57B1/6, generiert und erhalten von Frau Dr. Nicole Beauchemin, McGill Universität, Montreal, Kanada). Sowohl transgene als auch knock-out-Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert. Um die Überexpression von Ceacam-1 in den transgenen Ceacam-1^{endo+}-Mäusen zu überprüfen, wurden Endothelzellen, die von den Lungen der Mäuse gewonnen wurden, mit Anti-Pecam-1 und Anti-Ceacam-1-Antikörpern markiert. Ferner wurde die Überexpression von Ceacam-1 auf den Endothelzellen in adulten Tieren durch Western-Blotting und RT-PCR bestätigt. In makroskopischen Kontrollen konnten unter physiologischen Bedingungen keine Veränderungen oder Beschädigungen an den Gefäßen der genmanipulierten Tiere festgestellt werden.

Die Tierexperimente sind entsprechend der Tierschutzverordnungen durchgeführt worden (Antrag vom 5.8.2003, Antragsnummer 90/04, Behörde für Umwelt und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg).

Gruppenzusammensetzung

Sowohl den Ceacam-1^{endo+}- als auch den Ceacam-1-KO-Mäusen wurde eine nicht-genetisch manipulierte Kontrollgruppe, nachfolgend Wildtiere genannt, gegenübergestellt (balb/c, generiert und erhalten von Charles River Laboratories, USA).

Die zwei genmanipulierten Gruppen und deren zwei Kontrollgruppen bestanden aus jeweils 6 Tieren (siehe hierzu Tabelle 3). Alle 24 Tiere wurden zweifach operiert und die Ergebnisse anschließend zusammengetragen und ausgewertet. Leider konnten teilweise nicht alle Parameter eines Tieres verwendet werden: Bei einem Tier der Ceacam-1^{endo+}-Gruppe und bei einem Tier der Kontrollgruppe schlug die Injektion der Mikrosphären fehl. Bei zwei Tieren der Ceacam-1-KO-Kontrollgruppe und bei zwei Tieren der Ceacam-1^{endo+}-Gruppe konnte kein Blutfluss durch die Flowprobe ermittelt werden. Zwei Tiere der Ceacam-1-KO-Kontrollgruppe wiesen eine unzureichende BrdU-Färbung auf.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der Versuchstiere (n =Anzahl der Tiere)

Mikrosphärenzählung, BrdU-Färbung, hämodynamische Messung	n
Ceacam-1 ^{endo+}	6
Kontrollgruppe	6
Ceacam-1 ^{-/-}	6
Kontrollgruppe	6

2.2. Operationsvorbereitungen

2.2.1. Verwendete Substanzen

BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridine)

BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridine, Sigma, B 9285-1G) diente als Proliferationsmarker der Endothel- und glatten Muskelzellen. Diese Substanz ist in der Lage, analog zu Tymidin, sich in die teilende DNA proliferierender Zellen zu inkorporieren. 68 mg BrdU-Pulver wurden in 3,0 ml eines 0,5 molaren NaHCO₃-Puffers (pH 9,8) gelöst. Anschließend wurde eine Minipumpe mit der entsprechenden Lösung gefüllt.

Inhaltsstoffe des 0,5 molaren BrdU-Puffers (200 ml, pH 9,8):

8,2 g NaHCO₃ wurden in 170 ml Aqua dest. gelöst, mit NaOH auf den pH-Wert 9,8 eingestellt und mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt.

2.2.2. Füllung der osmotischen Minipumpen

Der Zusammenbau und die Füllung der osmotischen Minipumpen erforderten steriles Arbeiten mit keimfreien bzw. keimreduzierten Materialien. Die Füllung erfolgte luftblasenfrei mithilfe einer vorgesehenen Metallnadel und einer 3-ml-Spritze, welche die genannte Substanz BrdU enthielt. Nach der Füllung der Pumpen wurden diese in ein mit steriler isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, 154 Berlin-Chemie) gefülltes Falkonröhrchen (50 ml) überführt und für 6 Stunden im Wasserbad bei +37 °C inkubiert. Um eine dauerhafte Verabreichung des Proliferationsmarkers BrdU zu gewährleisten, wurde er über die subkutan implantierte Minipumpe (alzet, Osmotic Pump, Model 2ML1, Durect Corporation, USA) für die Dauer von 7 Tagen Fördermenge (10 µl/h) infundiert.

Die osmotischen Minipumpen funktionieren dabei nach folgendem Wirkungsprinzip: Durch das Quellen der Gelantinmembran im Inneren der Pumpe kommt es zum kontinuierlichen Verdrängen des Pumpeninhalts. Die verdrängte Flüssigkeit wird an das umliegende Gewebe abgegeben und resorbiert.

2.3. Erste Operation der Tiere

Bei der Erstoperation wurde bei allen Tieren die linke Arteria femoralis ligiert, und jedes Tier erhielt eine mit BrdU gefüllte Minipumpe subkutan im Nackenfell.

2.3.1. Narkose der Tiere

Zur Narkoseeinleitung wurde jede Maus in einen ca. 40 x 10 x 10 cm messenden hermetisch abschließbaren Plexiglaskasten überführt. Der Kasten wurde mit einem in Isofluran getränkten Wattebausch versehen und anschließend verschlossen. Dies führte zu einer nach etwa 20 Sekunden eintretenden und etwa 1 Minute andauernden Kurznarkose des Tieres. Diese Zeit konnte dazu genutzt werden, das Tier auf einer vorgewärmten Wärmeplatte (IOW-3703 Tierbewärmungssystem für Maus und Ratte, FMI GmbH, Germany) zu platzieren und in stabiler Rückenlage an allen vier Pfoten mit Leukoplast zu fixieren. Zur Narkosefortführung wurde ein Tischnarkosegerät für Kleintiere (the univentor 400 anaesthesia unit, TSE systems, Germany) verwendet. Die sedierte Maus wurde mit

4,5 % Isofluran (Forene®, Abott GmbH) in absteigender Konzentration und 65 ml/min O₂ in ansteigender Konzentration über eine Maske (Größe 1 für Ratte, Maus und Vögel, TSE systems, Germany) begast. Dann wurde die linke Kniefalte und der Nackenbereich mit einem Einmalrasierer (TMP Premium Einmalrasierer, 02102) großzügig geschoren und das Operationsfeld anschließend mit Cutasept (Cutasept® F, 382, Bode) desinfiziert.

Das verwendete chirurgische Instrumentarium wurde von der Firma Aesculap, Tuttlingen bezogen und beinhaltete:

2 chirurgische Pinzetten, 2 anatomische Pinzetten, 1 chirurgische Schere (spitz-stumpf, gebogen), 1 chirurgische Schere (stumpf-stumpf, gerade), 4 Arterienklemmen nach Pean (gerade), 1 Nadelhalter nach Matthieux, 1 Hautklammer und -abnahmegerät, sowie Wundklammern nach Michel und diverse Skalpelle (cutifix, 200806).

2.3.2. Induktion der Arteriogenese

Der Hautschnitt an der fixierten Maus erfolgte mittels Skalpell auf der medialen Seite des linken Oberschenkels und verlief parallel zur Arteria und Vena femoralis. Durch stumpfes Präparieren im inguinalen Fettgewebe wurde der die Arteria femoralis und Arteria iliaca interna verbindende Hautast zunächst dargestellt, dann doppelt ligiert und anschließend durchtrennt (Faden, Firma Ethicon, Ethilon 5-0 1666H). Anschließend wurde die Arteria femoralis vorsichtig von Vene und Nerv isoliert, doppelt ligiert und mit der chirurgischen Schere durchtrennt. Die Hautnaht erfolgte mit 4-5 Einzelknopfnähten (Faden, Firma Ethicon, Ethilon 5-0 1666H), die anschließende Desinfizierung mit Cutasept (anatomische Darstellung des Situs siehe Abbildung 3).

2.3.3. Implantation der BrdU-Pumpen

Das Tier wurde von der Rücken- in die Bauchlage überführt und die Haut mit der chirurgischen Schere im Bereich des Nackens eröffnet. Mithilfe der Schere wurde im subkutanen Bindegewebe eine Tasche mit einer Länge von ca. 3 cm und einer Breite von ca. 1 cm nach kaudal präpariert. Die bereitliegende Pumpe wurde in diese Tasche eingeschoben. Der Flussregler zeigte hierbei vom Hautschnitt weg, um eventuelle spätere Narbenreizungen zu verhindern. Auch dieser Hautschnitt wurde durch 4-5

Einzelknopfnähte (Faden, Ethicon Ethilon 5-0 1666H) verschlossen und anschließend mit Cutasept desinfiziert.

Der zeitliche Aufwand für diese Operation betrug etwa 20 Minuten.

Schmerzbehandlung

Postoperativ erhielten die Tiere zur Schmerzbehandlung einige Tropfen Metamizol (Novalgin), welche den Tieren oral durch das Trinkwasser zugeführt wurden. Die Verabreichung wurde kontinuierlich bis zum Tage der Endbehandlung fortgeführt.

2.4. Zweite Operation der Tiere

Bei allen Tieren wurde nach siebentägiger Behandlung eine Blutflussmessung an der linken Arteria iliaca communis durchgeführt. Des Weiteren wurde allen Tieren während der Operation ein Mikrosphärenbolus in den linken Ventrikel injiziert sowie Gewebeproben, die zur Mikrosphärenzählung bzw. BrdU-Färbung dienten, entnommen. Die Einleitung und Durchführung der Narkose entsprachen der Erstoperation.

2.4.1. Messung der kollateralen Konduktanz

Nachdem das Tier für die Untersuchung wieder in stabiler Rückenlage an allen vier Pfoten mit Leukoplast fixiert war, wurde das Abdomen des Tieres mit dem Skalpell in der Linea alba eröffnet. Durch stumpfes Lösen der serösen Häute und des Darmkonvoluts wurde die A. iliaca communis vom Leistenspalt bis zur Bifurkation der Aorta abdominalis dargestellt und vorsichtig von der Vene isoliert. Das Gefäß wurde mit einem Faden angeschlungen und in eine Doppler-Flowprobe (Transonic Flowprobe, V-Series, Style: 0,7 mm, Probe: 0,5 PSB 263, Transonic Systems inc, NY, USA - siehe hierzu Abbildung 2) luftblasenfrei eingehängt. Mithilfe der Flowprobe lassen sich Blutflüsse in Gefäßen bis zu einem Durchmesser von 250 µm darstellen. Das Gefäß wurde dabei in den V-förmigen Haken der Probe eingehängt, an dessen Grund sich ein Reflektor befand. Der Reflektor fing das gestreute Signal ein und leitete es als gebündelten Strahl zum Messfühler, dem Transducer (Transducer Ts 420 transit-time perivascular flowmeter Transonic Systems Inc., NY, USA). Zur Fortleitung der Ultraschallwelle wurden akustische Kopplungssignale verwendet. Als Kontaktmedium diente ein Gel (ZC 507, HR-Jelly, Transonic Systems Inc.,

NY, USA). Das Gerät wurde durch einen Mikromanipulator fixiert. Der korrekte Sitz wurde über das empfangene Signal auf dem Bildschirm überprüft. Um während der Messungen eine maximale Vasodilatation der Gefäße und somit einen maximalen Blutfluss zu erhalten, wurde in regelmäßigen Abständen Nitrospray auf das Operationsgebiet gesprüht.

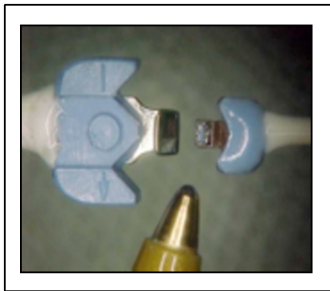


Abbildung 2: Transonic Flowprobe V-Serie 0,7 mm rechts

Mit freundlicher Genehmigung der Firma ADInstruments Ltd, Transport Way,

Oxford OX4 6HD, England, Quelle: <http://www.adinstruments.com/products/transonic-flowprobes> [93]

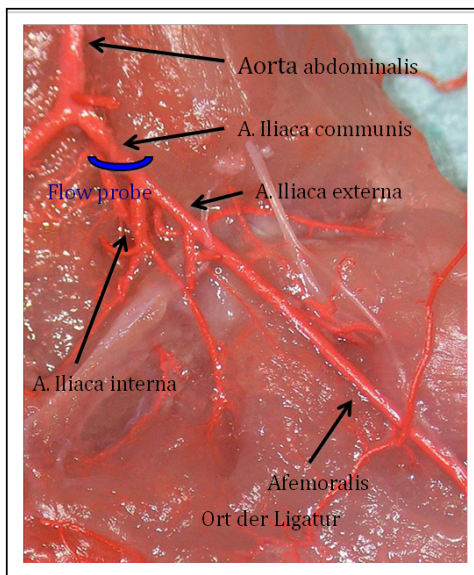


Abbildung 3: Anatomischer Situs, Übersicht über das operierte Gefäßgebiet

Das Urheberrecht für dieses Bild liegt bei den Autoren Kochi T, Imai Y, Takeda A, Watanabe Y, Mori S, Tachi M und Kodama T und entstammt der Publikation “Characterization of the Arterial Anatomy of the Murine Hindlimb: Functional Role in the Design and Understanding of Ischemia Models” in der Public Library of Science. Zur besseren Illustration wurde die Beschriftung des Bildes teilweise verändert. Die Darstellung und Veränderung des Bildes entspricht den Nutzungsbedingungen bzw. dem gültigen Lizenzvertrag. Einsehbar unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Quelle: https://www.researchgate.net/figure/259567707_fig8_A-Schema-of-anatomical-variations-in-the-deep-femoral-artery-The-deep-femoral-artery [73]

Auswertung

Alle Daten wurden auf einem Computer (Power Macintosh 7200/90) unter Vorschaltung des bereits genannten Transducers sowie eines Messverstärkers (MVU-0600, Typ: Interface, Nr: ALF 24299, Alfos AG) und kommerzieller Software (MacLab, Macintosh, Chart & Scope für Powerlab) visualisiert und gespeichert.

Die maximale kollateralabhängige Konduktanz (Conductance = CC) wurde aus den Parametern: systemischer Druck (SP), venöser Druck (PP) und Blutfluss an der A. iliaca communis (Q) bei maximaler Vasodilatation durch die folgende Formel rechnerisch ermittelt:

$$CC \text{ (ml/min per 100 mmHg)} = Q \text{ (ml/min)} / (SP - PP)$$

Da der systemische und venöse Blutdruck aufgrund der anatomischen Verhältnisse der Maus unter den experimentellen Bedingungen nicht erfolgreich und damit reproduzierbar ermittelt werden konnten, wurden für diese Parameter Durchschnittswerte zugrunde gelegt.

2.4.2. Injektion der Mikrosphären

Nach der abdominalen Eröffnung zur Blutflussmessung wurde der Schnitt nach cranial erweitert. Hierzu wurde mit der chirurgischen Schere der Brustkorb der Maus entlang des Brustbeins eröffnet, sodass das schlagende Herz gut einsehbar war. Mit einer 1-ml-Spritze (BD Plastikpak), die mit einer kurzen Nadel versehen war, wurden dann 0,5 ml der Mikrosphärenlösung in den linken Ventrikel injiziert. Die injizierte Menge entsprach einer Anzahl von ca. 40.000 Mikrosphären. Nach einminütiger Zirkulation der Mikrosphären im Körperkreislauf wurde die Maus durch Genickbruch getötet.

Durch arterielle Injektion von Latexpartikeln sogenannten Mikrosphären, die einen Durchmesser von 7-50 µm haben, kann der Blutfluss in den Kapillaren innerhalb eines Gewebes oder Organs erfasst werden. Die zirkulierenden Mikrosphären neigen dazu, im Kapillarbett in Abhängigkeit von der Durchblutung hängen zu bleiben [70].

Injiziert man sie in den linken Ventrikel oder in das rechte Atrium, so gewährleistet die dortige turbulente Strömung, dass sich die Mikrosphären gleichmäßig im Blut verteilen.

Die Anzahl der gefundenen Mikrosphären in der untersuchten Organregion ist dabei direkt proportional zum Anteil am Herzzeitvolumen.

Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{BF}_{\text{reg}} = \text{HZV} * C_{\text{reg}} / C_{\text{inj}}$$

Dabei ist BF_{reg} der regionale Blutfluss, HZV das Herzzeitvolumen, C_{reg} die Anzahl der Mikrosphären im Organ und C_{inj} die Gesamtheit aller injizierten Mikrosphären. Ist der Blutfluss bekannt, können so Aussagen über die Konduktanz jeder Organregion getroffen werden [95]. Für unsere Messungen verwendeten wir Mikrosphären mit einem Gesamtdurchmesser von 15 μm . Bei diesem Durchmesser ist der Anteil der tatsächlich im Kapillarbett gefangenen Mikrosphären am größten [96]. Wichtig für exakte und zuverlässige Angaben bei Perfusiosmessungen sind weiterhin die Gesamtzahl der injizierten Mikrosphären sowie deren Anzahl in der untersuchten Gewebeprobe. Um zuverlässige Messungen zu gewährleisten, sollte eine Mindestanzahl von 400 Mikrosphären in der Gewebeprobe detektiert werden [18]. Die Anzahl unserer injizierten Partikel basiert auf Empfehlungen des Fluorescent Microsphere Resource Centers der Universität von Washington.

2.4.3. Gewebepreparation

Direkt nach der Tötung der Maus wurde die Haut der unteren beiden Extremitäten vom Muskelgewebe abpräpariert. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Adduktoren auf Höhe des Femur- und Beckenknochens und auf Kniegelenksebene abgetrennt und entnommen. Um Material für die Mikrosphärenzählung zu gewinnen, wurden auf beiden Seiten der musculus gastrocnemius sowie beide Nieren als Kontrollorgane entnommen. Das distale Segment aller Gewebeproben wurde dann auf einem centgroßen Korkplättchen mit Tissue Tec (O.C.T.TM Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Netherland) zuerst fixiert, dann komplett bedeckt. Tissue Tec dient der Fixierung des Muskelgewebes und ermöglicht die Anfertigung artefaktfreier Gefrierschnitte. Um die Gewebeproben auszuhärten, wurden sie in N-Hexan (ICN,

Biomedicals, USA) tiefgefroren, welches durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff auf die nötige Temperatur herunterkühlte. Das Probenmaterial wurde in isolierten Stickstoffbehältern (Isotherm KGV) schockgefroren und im Tiefkühlschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

2.5. Weiterführende Untersuchungen

2.5.1. Immunhistologische Aufarbeitung

Anfertigung und Fixierung der Gefrierschnitte

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte an einem Frigocut-Gerät (Frigocut N 2800) bei $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für die immunhistologische BrdU-Färbung wurde das Gewebe der Adduktoren verwendet (Schnittdicke: $7\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$) und für die Mikrosphärenzählung das Gewebe der gastrocnemii bzw. der Niere (Schnittdicke: $50\text{ }\mu\text{m}$). Alle Schnitte wurden auf Objektträger (Super Frost Plus, 041300) aufgebracht und unter dem Mikroskop (Olympus BH-2) bei 100facher Vergrößerung auf ihre Qualität kontrolliert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte in einer Ethanol/Glycin-Lösung für 30 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Die Lösung bestand aus 70 ml Ethanol und 30 ml Glycinlösung, die mit HCl auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt wurde. Bis zur darauf folgenden Färbung lagerten die fixierten Gefrierschnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank.

Färbung

Verwendete Materialien

PBS-Lösung (phosphate buffered saline)

PBS 10 x: 1000 ml

NaCl (MW 58,44)	80 g	Merck 106404
KCl (MW 74,56)	2 g	Merck 104936
KH_2PO_4 (MW 136,09)	2 g	Merck 4873
Na_2HPO_4 (MW 177,99) x 2 H_2O	7,6 g	Merck 6580

Die Lösung hatte zunächst einen pH-Wert von 7,3, der nach einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 auf den pH-Wert 7,6 angestiegen war.

Glycin (Sigma)

1 % iges BSA (bovine serum albumin, Fluka Chemie GmbH, Switzerland)

Erstantikörper BrdU-Proliferationsfärbung

Zur Untersuchung der Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in der Gefäßwand der Kollateralarterien wurde ein Anti-BrdU-Antikörper (5-Bromo-2-desoxyuridine Labeling and Detection Kit II, 1 299 964, Roche Diagnostics GmbH, Germany, Flasche 2 und 4) als Proliferationsmarker in einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 verwendet. Als Verdünnungsmedium diente die mitgelieferte Verdünnungspufferlösung.

Zweitantikörper BrdU-Proliferationsfärbung

Als Zweitantikörper wurde ein Cy2 konjugierter Goat-anti-mouse-Antikörper (Lot No. 41110, Jackson Immuno Research Laboratories, Dianowa, Germany) in der Konzentration 1:200 genutzt. Das Verdünnungsmedium enthielt 1 % iges BSA/PBS.

Kernfärbung

Für eine bessere Quantifizierung der Zellzahl wurden die Zellkerne zusätzlich für 5 Minuten mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (1:2500, Sigma B2261) angefärbt.

Sonstige Materialien

Mowiol (Calbiochem, USA)

PPD (1,2-Phenylenediamine, Merck, Germany)

Deckgläser (Marienfeld)

Färbeprotokoll Immunhistologiefärbung

Die Gefrierschnitte wurden in 0,5 % iger PBS/Glycin-Pufferlösung dreimal hintereinander für 5 Minuten rehydriert und anschließend mit 1 % iger BSA-Lösung für 30 Minuten bei +37 °C in einer feuchten Kammer geblockt. Nach der erfolgten Waschung in der bereits genannten Pufferlösung erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 60 Minuten bei +37 °C. Nach wiederholter Rehydrierung wurde der Zweitantikörper aufgetragen und

inkubierte ebenfalls 60 Minuten bei +37 °C. Dem anschließenden Waschgang folgte die Kernfärbung für 5 Minuten bei +37 °C. Ein erneuter Waschgang war nicht erforderlich. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit einem Gemisch aus Mowiol und PPD unter Deckgläsern eingedeckelt. Zum Trocknen wurden die Präparate vor Lichteinfluss geschützt, bei +4 °C gelagert und sofort danach bzw. innerhalb der nächsten 12 Stunden ausgewertet. Jeder Färbedurchgang wurde von einer Negativkontrolle begleitet. Bei diesem Kontrollschnitt fehlte die Behandlung mit dem Erstantikörper. Von jeder Gewebeprobe wurden 2 Objektträger gefärbt. Auf einem Objektträger befanden sich je 2 histologische Schnitte. Die aussagekräftigen Schnitte, jedoch mindestens 3 Schnitte, wurden ausgewertet und daraus die arithmetischen Mittelwerte gebildet.

Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Mikroskop Hersteller Leica) abwechselnd mit dem roten und grünen Filter in 100- und 400facher Vergrößerung. Mit einer im Mikroskop integrierten Digitalkamera (Q-Imaging, Retiga 1300), die mit einem Computer (Apple Macintosh) verbunden war und mithilfe der Software (IP Lap Alias), wurden die Gewebeschnitte entweder mit dem Grün- oder Rotfilter nacheinander fotografiert. Anschließend erfolgte das Übereinanderlegen der passenden Bilder mit der Programmfunktion „Math → Merge Color Channel“ und das Brennen der Daten auf CDs (Programm: Toast Lite). Zur Zählung der fluoreszierenden Kerne wurde bei 400facher Vergrößerung jeweils das prominenteste Kollateralgefäß des jeweiligen Präparates herangezogen. Der Proliferationsindex wurde aus der Anzahl der BrdU-angefärbten grünen Kerne und der Anzahl aller blau fluoreszierenden Kerne errechnet.

2.5.2. Mikrosphärenzählung

Bei 100facher Vergrößerung konnten anhand der angefertigten 50 µm-Schnitte der muscoli gastrocnemii beider Hinterläufe und der Nieren die Mikrosphären ausgezählt werden. Die Auszählung beschränkte sich hierbei nicht auf ein Gesichtsfeld, stattdessen wurden alle Mikrosphären des Präparates gezählt und deren Anzahl dokumentiert.

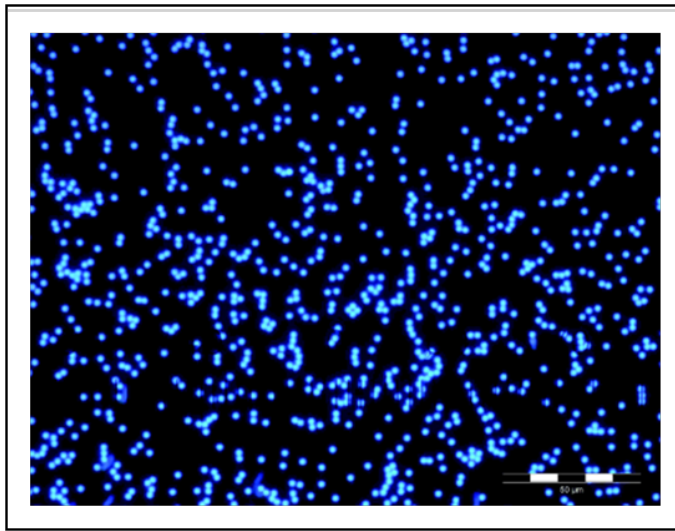


Abbildung 4: Foto zur Illustration der mikroskopischen Darstellung von fluoreszierenden Mikrosphären im Gesichtsfeld, Maßstab unten rechts: ein schwarzer Balken entspricht 50 µm
Mit freundlicher Genehmigung der Firma Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 129 B, 64293 Darmstadt, Deutschland

Quelle: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/CDD/CDD Product Images/Particle Technology/Fluorescent and Dyed Particles/F70238~p.eps/jcr:content/renditions/cq5dam.thumbnail.450.450.png> [92]

2.6. Statistik

Bei allen Versuchsreihen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und dementsprechend dargestellt. Zur Signifikanztestung verwendeten wir das Programm SigmaStat (Jandel Scientific). Aufgrund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe der Mäuse konnten stets nur 2 Gruppen miteinander verglichen werden. Da die ermittelten Werte eine Normalverteilung mit gleichen Varianzen aufzeigten, konnte der T-Test angewandt werden.

Die Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit durchgeführt und $p < 0,05$ galt als signifikant.

Für die Signifikanzangaben im Text gilt:

n.s.	= nicht signifikant
$p < 0,05$	= schwach signifikant
$p < 0,01$	= signifikant
$p < 0,001$	= hoch signifikant

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der Durchblutungskapazität von Kollateralarterien

3.1.1. Vergleich der Durchblutungskapazität mithilfe der Mikrosphären

7 Tage nach operativer Induktion der Ischämie durch unilataterale Femoralarterienokklusion ermittelten wir den kollateralen Blutfluss durch die etablierte Methode der Mikrosphäreninjektion und darauffolgende Mikrosphärenzählung. Die Angabe der wiedererlangten Perfusion ist hier eine Prozentangabe und beschreibt den Anteil der Perfusion des ligierten Beines gegenüber dem unligierten Bein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die relative Durchblutung des ischämischen Beines 7 Tage nach dem Eingriff bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht ist (siehe hierzu Abbildung 5). So beträgt bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen der Kollateralfluss des ligierten linken Beines durchschnittlich 75 % ($\pm$ 13 %) des unligierten rechten Beines, wohingegen bei den Ceacam-Kontrollmäusen der Kollateralfluss des ligierten linken Beines nur durchschnittlich 54 % ($\pm$ 14 %) des unligierten rechten Beines aufweist.

Darüber hinaus war die Perfusion der ischämischen Hinterläufe bei den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen gegenüber ihrer Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (siehe hierzu Abbildung 6). Hier beträgt der Kollateralfluss des ligierten linken Beines durchschnittlich 45 % ($\pm$ 9 %) des unligierten rechten Beines. Bei der Kontrollgruppe beträgt der Kollateralfluss des ligierten linken Beines durchschnittlich 62 % ($\pm$ 9 %) des unligierten rechten Beines.

Die grafische Darstellung dieser Ergebnisse ergibt:

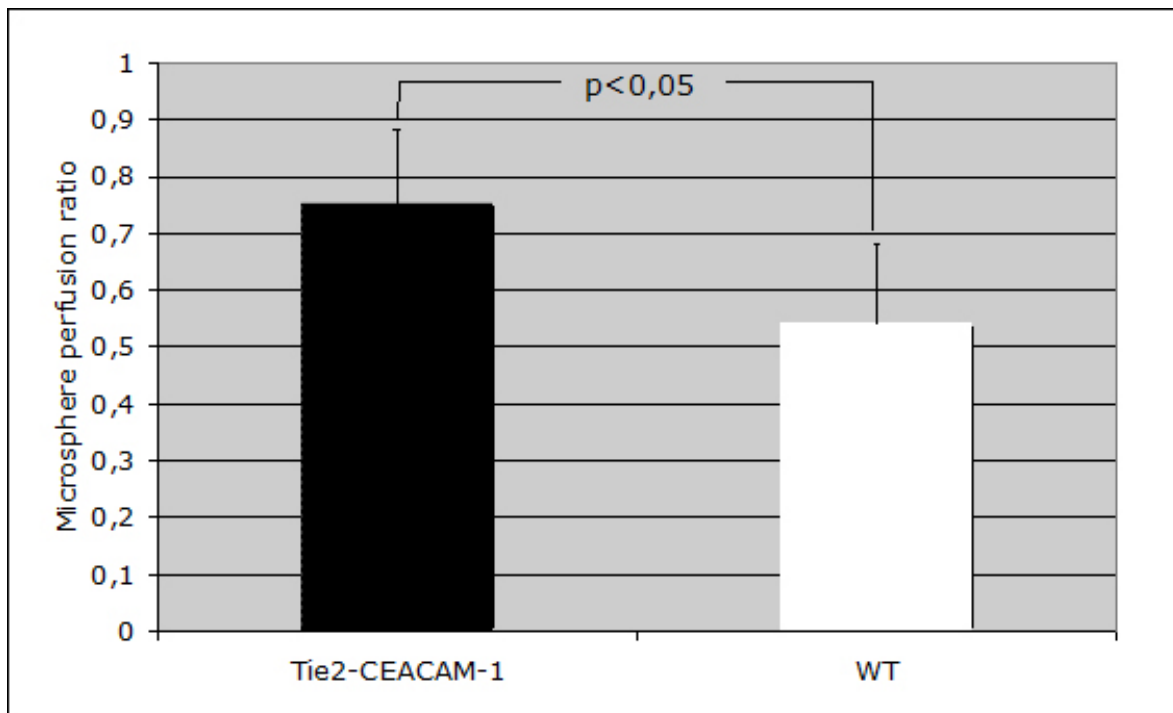


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Ceacam-1^{endo+}-Mäuse versus Wildtiere (WT), n= 5 pro Gruppe, Kollateralfluss in Prozent (ligiertes Bein/unligiertes Bein multipliziert mit 100) + Standardabweichung [49]

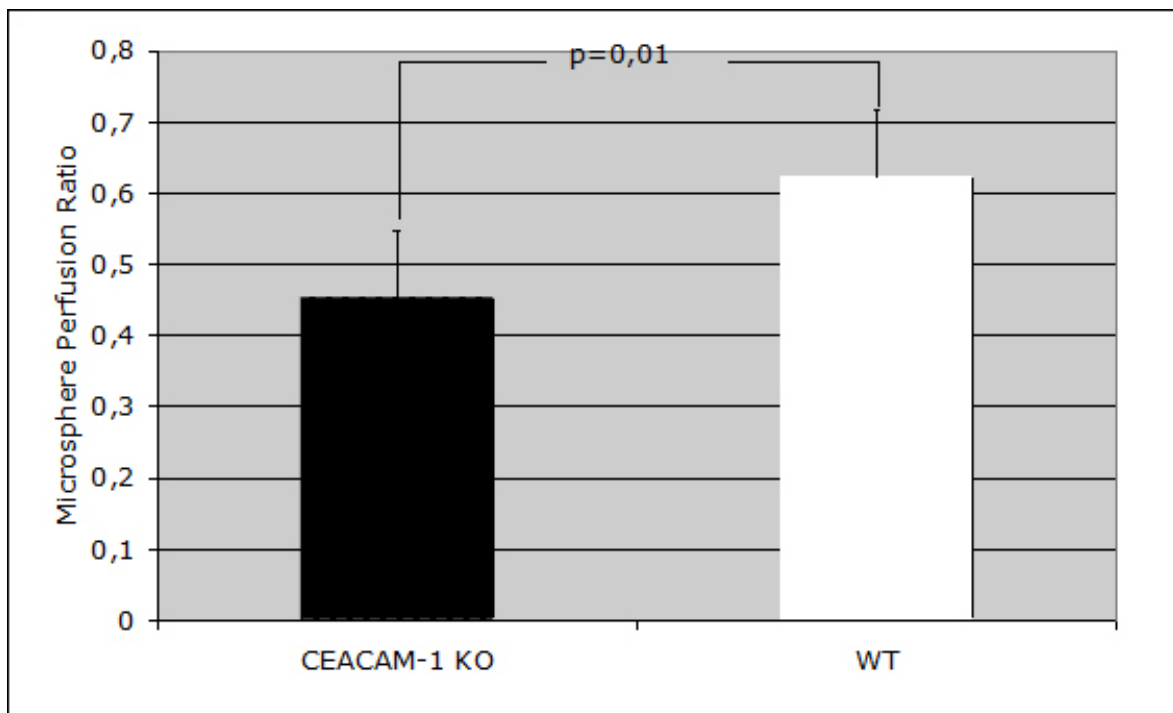


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Ceacam-1^{-/-}-Mäuse versus Wildtiere (WT), n= 6 pro Gruppe, Kollateralfluss in Prozent (ligiertes Bein/unligiertes Bein multipliziert mit 100) + Standardabweichung [49]

3.1.2. Vergleich der Durchblutungskapazität mithilfe der Flowprobe

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass sich bei den Untersuchungen mittels der Flowprobe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen ergeben. Aufgrund der methodisch bedingten großen Variabilität der Ergebnisse konnten hier keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden. Die methodischen Limitationen ergaben sich hierbei aus mehreren Störfaktoren. So kann zu viel oder zu wenig aufgetragenes Kontaktgel zu Fehlmessungen im Bereich des Messfühlers führen. Zudem unterliegt die Maus während der Operation erheblichen Stressfaktoren. Diskrete Schwankungen der Narkosetiefe können aufgrund des angewandten Verfahrens nicht ausgeschlossen werden und beeinträchtigen somit u.a. die Herzfrequenz der Tiere. Darüber hinaus kann es aufgrund der Manipulationen im Operationsgebiet zu kurzzeitigen Gefäßspasmen kommen, die wiederum zu erniedrigten oder nicht-messbaren Blutflüssen führen.

Es zeigt sich jedoch auch hier, dass tendenziell der Kollateralfluss bei den KO-Tieren geringer ist.

So beträgt der Kollateralfluss des ligierten Beines bei den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen durchschnittlich 0,14 µl/min, bei der Kontrollgruppe 0,27 µl/min (siehe hierzu Abbildung 7).

Bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen fällt der Unterschied noch geringer aus. Hier beträgt der Blutfluss des ligierten linken Beines durchschnittlich 0,18 µl/min, der Blutfluss bei der Kontrollgruppe 0,14 µl/min (siehe hierzu Abbildung 8).

Die grafische Darstellung dieser Ergebnisse ergibt:

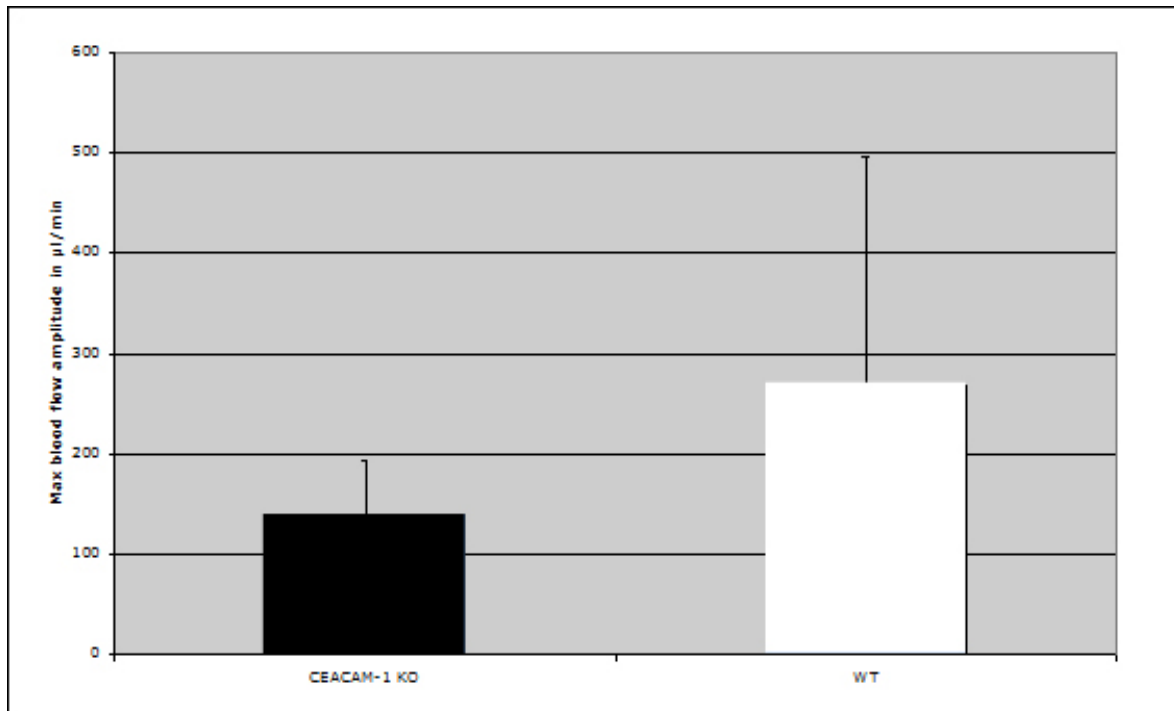


Abbildung 7: Gemessener Blutfluss mittels Flowprobe Ceacam-1^{-/-}-Mäuse (n= 6) versus Wildtiere (WT, n= 4), mittlerer Blutfluss in $\mu\text{l/min}$ + Standardabweichung

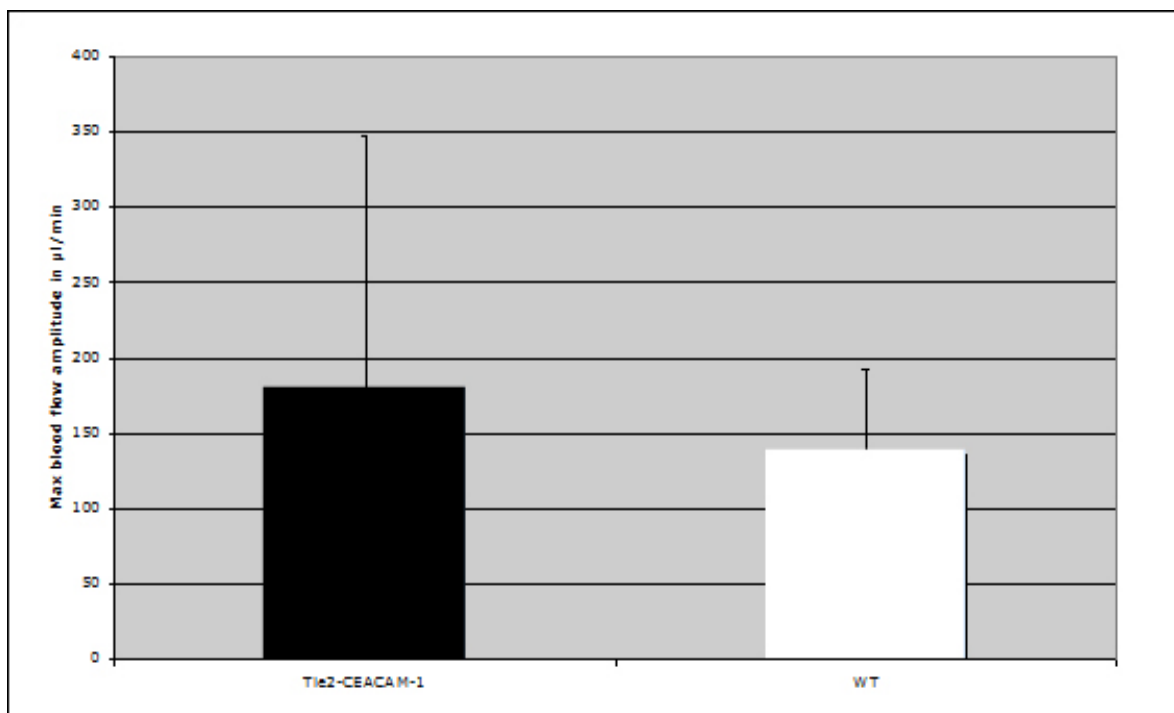


Abbildung 8: Gemessener Blutfluss mittels Flowprobe Ceacam-1^{endo+}-Mäuse (n= 4) versus Wildtiere (WT, n= 6), mittlerer Blutfluss in $\mu\text{l/min}$ + Standardabweichung

3.2. Analyse der Zellproliferation

Wie bereits in anderen Modellen beschrieben, kommt es nach Femoralarterienligatur zu einem deutlichen Anstieg der Proliferation (BrdU-Einbau) im Rahmen der Arteriogenese bzw. des Kollateralarterienwachstums im Bereich des Oberschenkels und im Rahmen der Angiogenese im Bereich des Unterschenkels [54].

Zur Visualisierung werden im Folgenden grafische Darstellungen mit dazugehörigen mikroskopischen Abbildungen kombiniert.

3.2.1. Vergleich der ligierten Beine

Im Gegensatz zu den funktionellen Parametern (Blutfluss) unterscheidet sich das Ausmaß der Gefäßproliferation im ligierten Bein nicht wesentlich zwischen Ceacam-1^{endo+}-Mäusen, Ceacam-1^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. So betrug der Proliferationsindex bei den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen 0,29 bei den Kontrolltieren 0,33 (siehe hierzu Abbildung 9). Bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen lag der Proliferationsindex bei 0,4, die Kontrolltiere wiesen ebenfalls einen Wert von 0,35 auf (siehe hierzu Abbildung 12).

Die grafische Darstellung hinsichtlich der ligierten Beine ergibt:

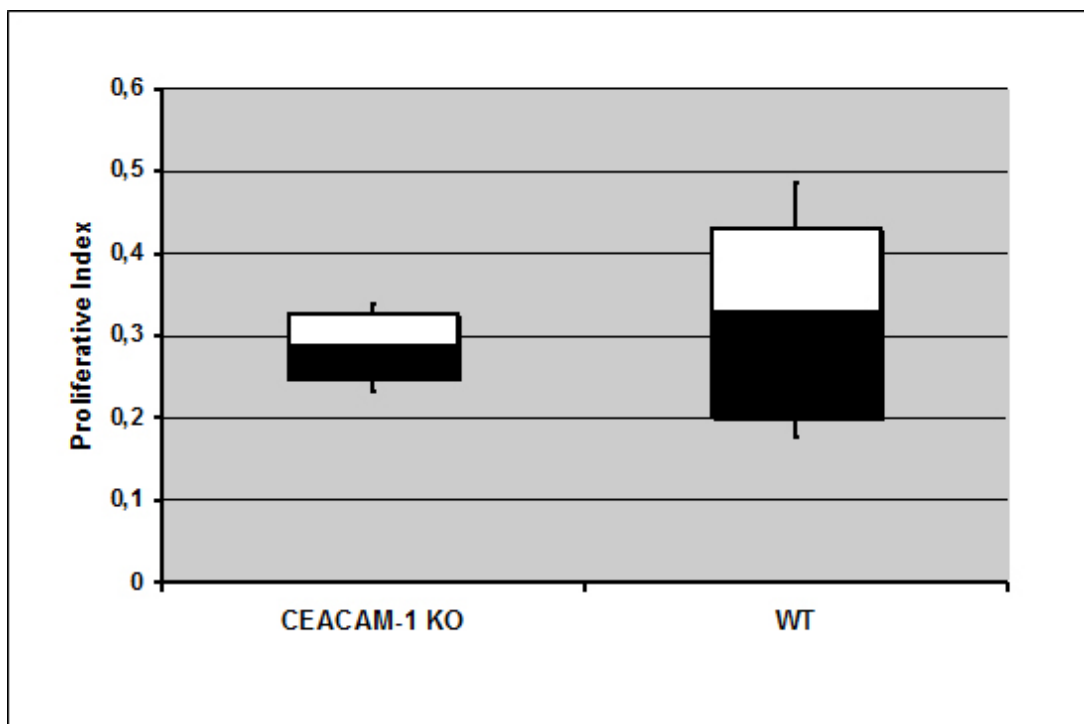


Abbildung 9: Vergleich des proliferativen Index (fluoreszierende Kerne/Gesamtheit aller Kerne) Ceacam-1^{-/-}-Mäuse (n= 6) versus Wildtiere (WT, n= 4), + Standardabweichung

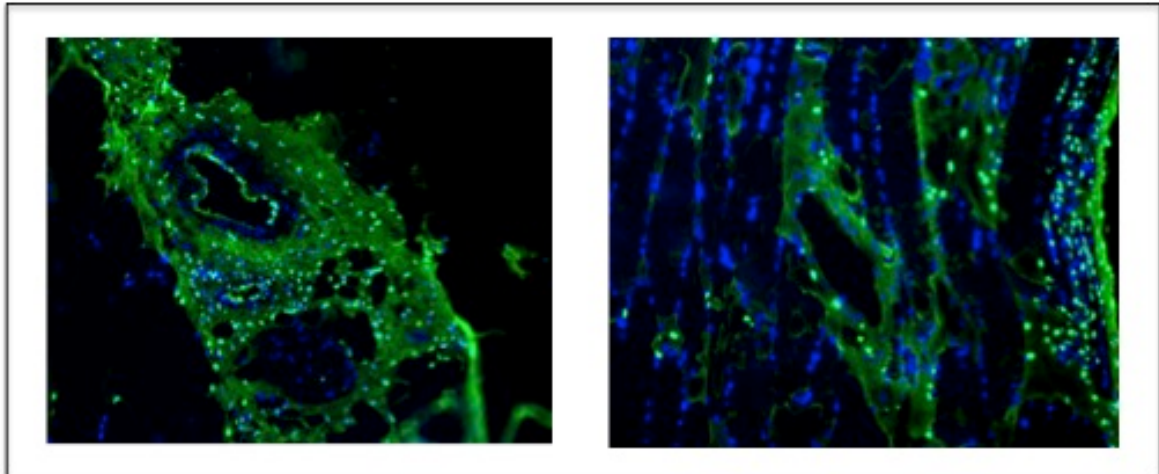


Abbildung 10: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein
Kollateralgefäß einer Ceacam-1^{-/-}-Maus,
7 Tage nach Femoralarterienligatur,
Kernfärbung (blau), BrdU-
Proliferationsfärbung (grün) 100-fache
Vergrößerung

Abbildung 11: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein
Kollateralgefäß einer Wildtier-Maus (WT),
7 Tage nach Femoralarterienligatur,
Kernfärbung (blau), BrdU-
Proliferationsfärbung (grün) 100-fache
Vergrößerung

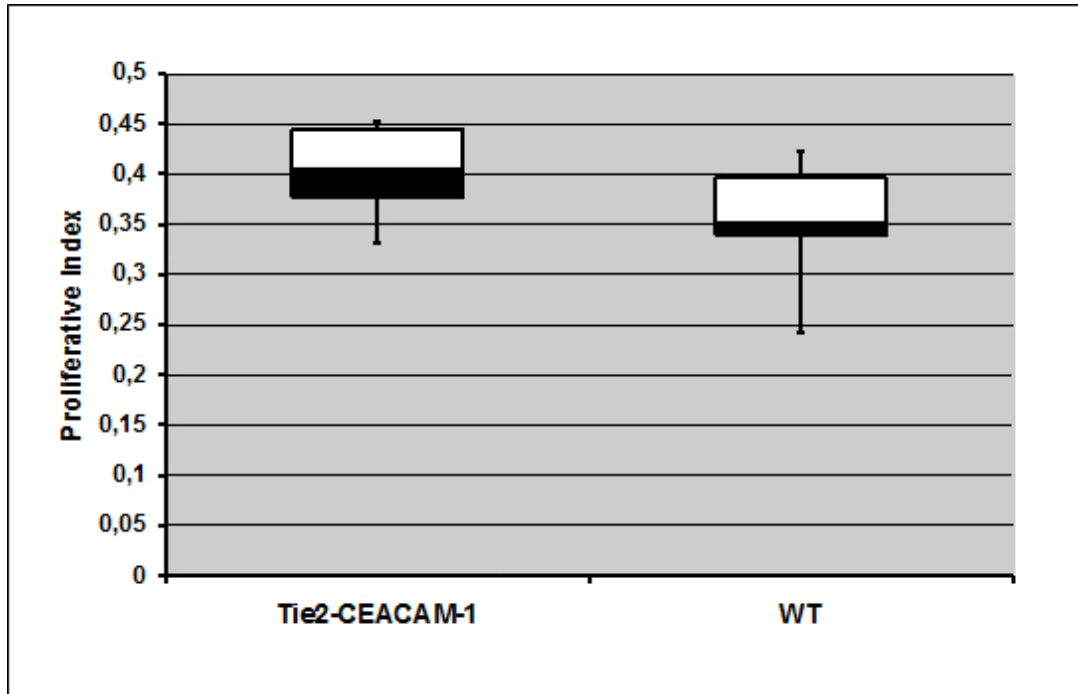


Abbildung 12: Vergleich des proliferativen Index (fluoreszierende Kerne/Gesamtheit aller Kerne)
Ceacam-1^{endo+}-Mäuse (n= 6) versus Wildtiere (WT, n= 6), + Standardabweichung

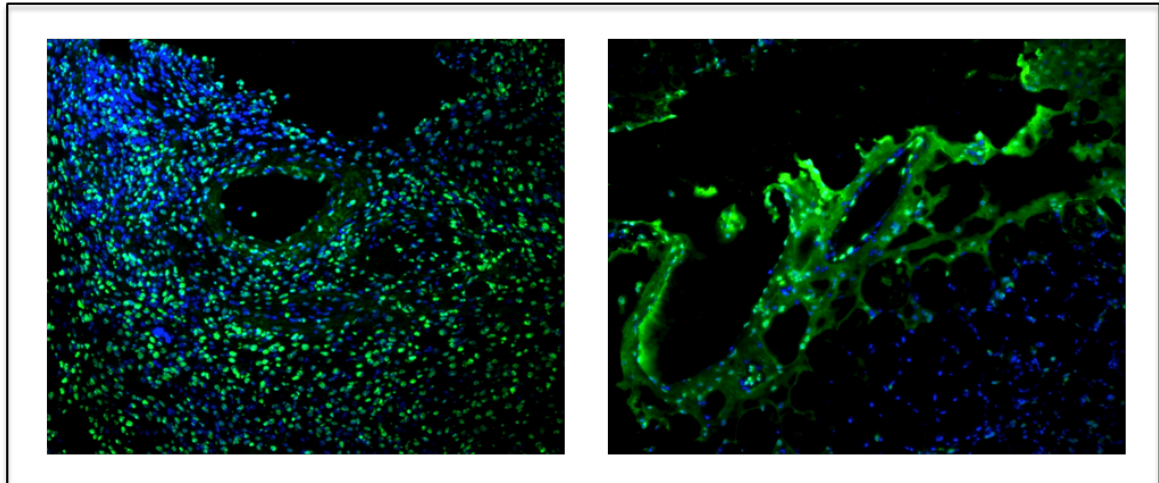


Abbildung 13: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein
Kollateralgefäß einer Ceacam-1^{endo+}-Maus,
7 Tage nach Femoralarterienligatur,
Kernfärbung (blau), BrdU-
Proliferationsfärbung (grün) 100-fache
Vergrößerung

Abbildung 14: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein
Kollateralgefäß einer Wildtier-Maus (WT),
7 Tage nach Femoralarterienligatur,
Kernfärbung (blau), BrdU-
Proliferationsfärbung (grün) 100-fache
Vergrößerung

3.2.2. Vergleich der nicht-ligierten Beine

Bei der Betrachtung der nicht-ligierten Beine fand sich im Gegensatz dazu in Ceacam-1^{-/-}-Mäusen eine herabgesetzte basale Gefäßproliferation und in Ceacam-1^{endo+}-Mäusen eine signifikant erhöhte basale Gefäßproliferation im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Hinsichtlich der Proliferationsindices zeigte sich bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen ein Wert von 0,17, eine signifikante Proliferation im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe hierzu Abbildung 18). Bei den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen lag der Proliferationsindex bei 0,05, die Kontrolltiere wiesen einen Wert von 0,06 auf (siehe hierzu Abbildung 15).

Die grafische Darstellung hinsichtlich der nicht-ligierten Beine ergibt:

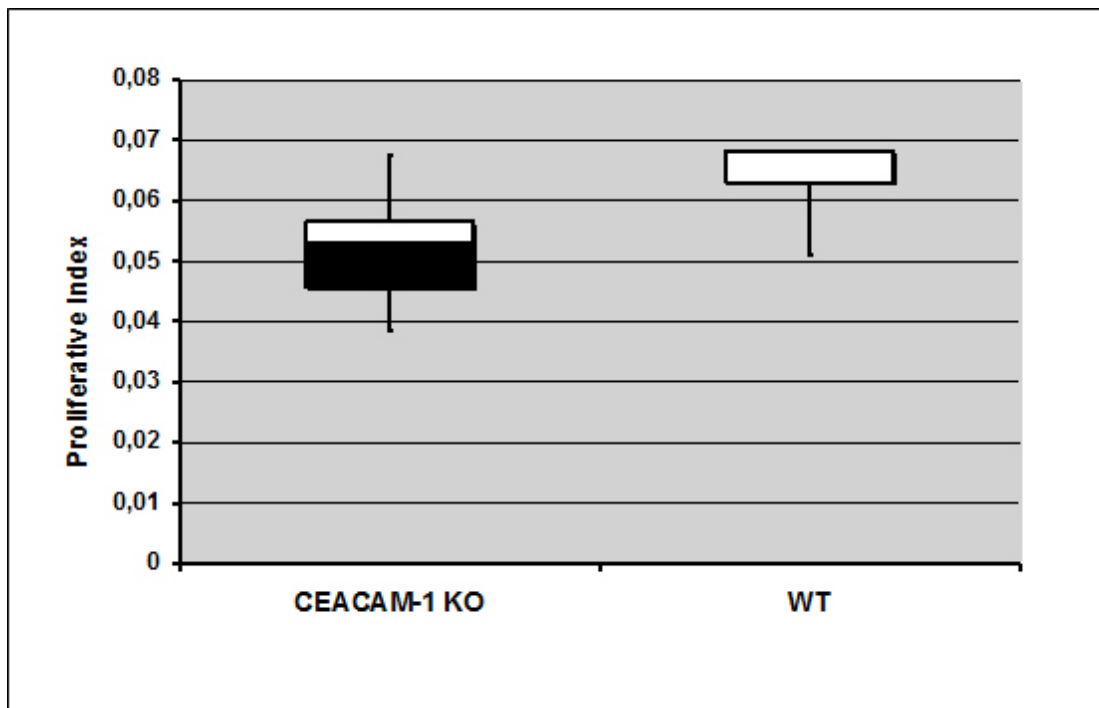


Abbildung 15: Vergleich des proliferativen Index (fluoreszierende Kerne/Gesamtheit aller Kerne) Ceacam-1^{-/-}-Mäuse (n= 6) versus Wildtiere (WT, n= 4), + Standardabweichung

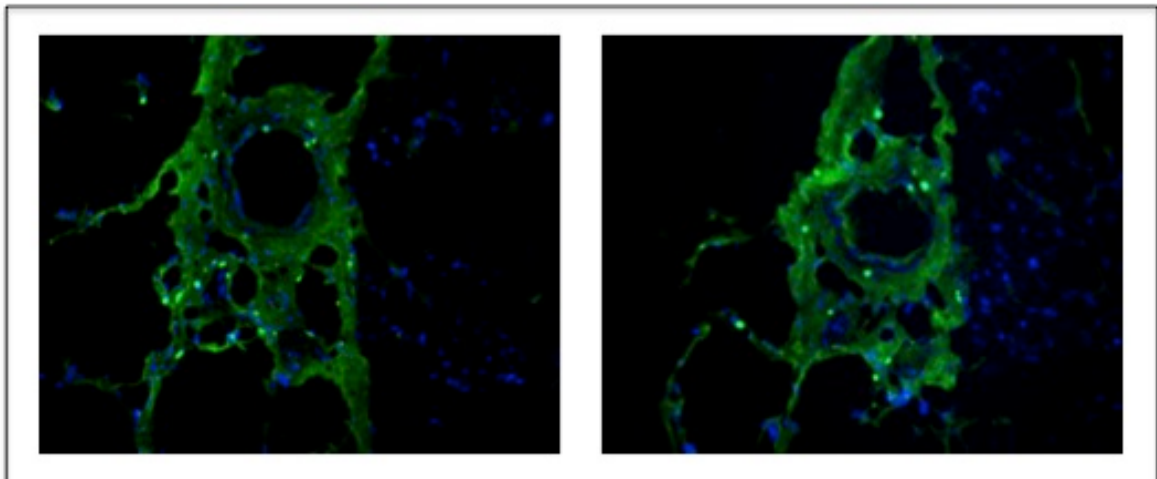


Abbildung 16: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein Kollateralgefäß einer Ceacam-1^{-/-}-Maus, nach 7 Tagen ohne Femoralarterienligatur, Kernfärbung (blau), BrdU-Proliferationsfärbung (grün) 100-fache Vergrößerung

Abbildung 17: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein Kollateralgefäß einer Wildtier-Maus (WT), nach 7 Tagen ohne Femoralarterienligatur, Kernfärbung (blau), BrdU-Proliferationsfärbung (grün) 100-fache Vergrößerung

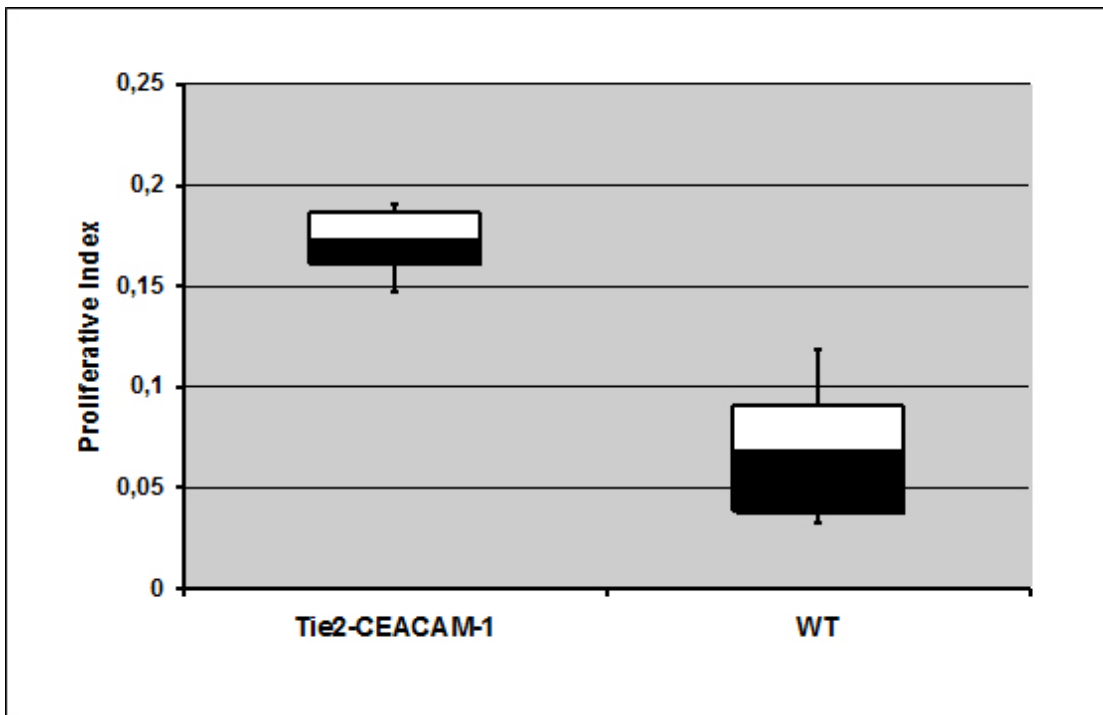


Abbildung 18: Vergleich des proliferativen Index (fluoreszierende Kerne/Gesamtheit aller Kerne) Ceacam-1^{endo+}-Mäuse (n= 6) versus Wildtiere (WT, n= 6), + Standardabweichung

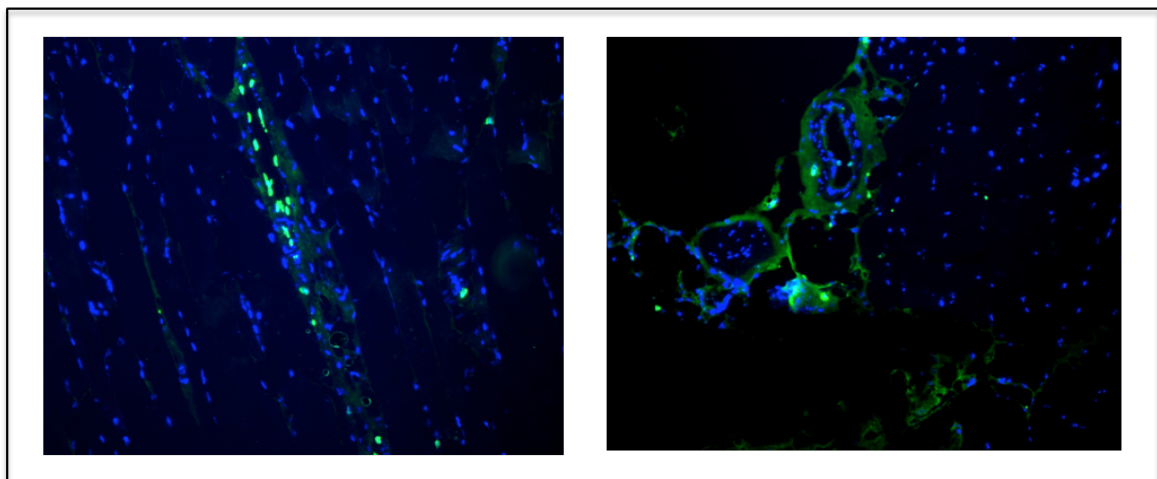


Abbildung 19: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein Kollateralgefäß einer Ceacam-1^{endo+}-Maus, nach 7 Tagen ohne Femoralarterienligatur, Kernfärbung (blau), BrdU-Proliferationsfärbung (grün) 100-fache Vergrößerung

Abbildung 20: Eigene Aufnahme:
Repräsentativer Schnitt durch ein Kollateralgefäß einer Wildtier-Maus (WT), nach 7 Tagen ohne Femoralarterienligatur, Kernfärbung (blau), BrdU-Proliferationsfärbung (grün) 100-fache Vergrößerung

4. Diskussion

Diese Arbeit zeigt auf funktioneller Ebene, dass Ceacam-1 sowohl hinreichend als auch notwendig zur Ausbildung eines relevanten Kollateralflusses ist. Somit wird ein weiteres an der Arteriogenese beteiligtes Molekül identifiziert. Die Arbeit ergänzt frühere in-vitro-Untersuchungen, die zeigten, dass die Ceacam-1-Expression gemeinsam mit anderen angiogenetischen Faktoren während des Tumorgefäßwachstums deutlich hochreguliert wird [22, 68]. Es konnte außerdem in-vitro gezeigt werden, dass Ceacam die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen reguliert [35]. Bis zur Erstellung dieser Arbeit gab es jedoch kein in-vivo-Modell, welches die angiogenetische, geschweige denn die arteriogenetische Bedeutung von Ceacam-1 dezidiert untersuchte. Ziel dieser Arbeit war es daher zu überprüfen, ob das Zelladhäsionsmolekül Ceacam-1 auch für die Arteriogenese von Bedeutung ist. Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Experimente untersuchten die Bedeutung von Ceacam-1 bei der Angiogenese in in-vitro- und in-vivo-Modellen.

Für die Untersuchungen wurde ein etabliertes Femoralarterienokklusionsmodell der Maus gewählt. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass bei diesem Modell das Kollateralwachstum nach 7 Tagen so gut wie abgeschlossen ist, sodass dieser Zeitraum ausreichend erschien [56]. Das Mausmodell erlaubte uns die Nutzung von knock-out- und transgenen Tieren zur Untersuchung der Bedeutung von Ceacam-1 für die Arteriogenese. Wir verwendeten Ceacam-1-KO-Mäuse mit einer systemischen Deletion des Ceacam-1-Gens (C57B1/6), um zu untersuchen, ob dieses Molekül notwendig für die Entstehung der Kollateralzirkulation ist. Weiterhin wurden Ceacam-1^{endo+}-Mäuse generiert, die Ceacam-1 gezielt im Endothel überexprimieren (FVB/N).

Ratio dieses Ansatzes waren frühere Untersuchungen, die eine Hochregulierung von Ceacam-1 im Endothel von sprossenden Gefäßen zeigten [35, 72]. Wir gingen deshalb von der Hypothese aus, dass insbesondere dieses endotheliale Ceacam-1 hinreichend für das Kollateralwachstum ist. Sowohl den Ceacam-1^{endo+}- als auch den Ceacam-1-KO-Mäusen wurde jeweils eine nicht-genetisch manipulierte Kontrollgruppe gegenübergestellt (balb/c).

Als einen funktionellen Parameter untersuchten wir den kollateralen Blutfluss eine Woche nach Femoralarterienokklusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Die Mikrosphärenzählung ist eine etablierte Methode zur Bestimmung des Blutflusses bei Mäusen. Mit unseren Zählungen konnten wir in der Tat zeigen, dass die relative Perfusion von ischämischen verglichen mit nicht-ischämischen Hinterläufen bei Ceacam-1^{endo+}-Mäusen gegenüber ihrer Kontrolltiergruppe signifikant erhöht ist. Zudem war die Perfusion an ischämischen Hinterläufen bei Ceacam-1^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt gegenüber ihrer Kontrolltiergruppe.

Zur Stützung der Ergebnisse dieser Untersuchungen führten wir Messungen des maximalen Blutflusses mit einer Doppler-Flowprobe durch, um einen indirekten Parameter der kollateralen Konduktanz zu erhalten. Diese Messungen zeigten eine klare Tendenz hinsichtlich höherer Blutflussraten bei Ceacam-1^{endo+}-Mäusen gegenüber den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen, wenngleich hier keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

Der Grund für diese fehlende Signifikanz liegt aus unserer Sicht an den vorliegenden Abweichungen des Blutflusses bei unterschiedlichen Mausstämmen. Wie in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte, unterscheidet sich die arteriogenetische Antwort erheblich in verschiedenen Mausstämmen [46, 85].

Es ist ferner zu berücksichtigen, dass die Doppler-Flowprobe-Messung einigen Störfaktoren unterliegt: Da der systemische und venöse Blutdruck aufgrund der anatomischen Verhältnisse der Maus unter den experimentellen Bedingungen nicht erfolgreich und damit reproduzierbar ermittelt werden konnten, wurden für diese Parameter Durchschnittswerte zugrunde gelegt. Die unterschiedlichen Narkosezeiten der Mäuse, plötzlich auftretende Gefäßspasmen und ein unzureichender Kontaktgelfilm könnten sich ebenfalls negativ auf exakte Studienergebnisse ausgewirkt haben.

Angesichts der nachgewiesenen signifikanten Unterschiede im Kollateralfluss, wie er durch die Mikrosphärenmethode ermittelt wurde, gehen wir davon aus, dass diesem eine unterschiedliche Gefäßproliferation zugrunde liegt. Die über die etablierte BrdU-Einbaumethode ermittelten Proliferationsindices der kleinen Gefäße im Unterschenkel (Angiogenese) und der Arteriolen im Oberschenkel (Arteriogenese) zeigten ebenfalls eine deutliche Korrelation zwischen den erniedrigten Blutflussraten der Ceacam-1^{-/-}-Mäuse und verminderter Zellproliferation. Außerdem zeigte sich auch bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen

einhergehend mit den erhöhten Blutflussraten ein starker Anstieg bei der Zellproliferation. Wie bei den Doppler-Flowprobe-Messungen konnten hier keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Limitierungen bei der Ermittlung der Proliferationsindices liegen insbesondere in den zu beurteilenden Präparaten. In den vorliegenden Schnitten wurde jeweils das prominenteste Kollateralgefäß herangezogen. Unser Mausmodell lässt aufgrund der kleinen Anatomie die exakte und reproduzierbare Identifizierung einzelner Gefäße nicht zu.

Auch wenn die Tendenz zu vermehrter Zellteilung und damit erhöhter Arteriogenese in den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen und verminderter Zellteilung und damit verminderter Arteriogenese bei den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen erkennbar war, erklärt dieses nicht alleine den signifikanten Unterschied in den Kollateralflüssen.

Dabei ist wichtig zu bemerken, dass der Prozess der Arteriogenese nicht nur eine Proliferation von Gefäßzellen umfasst, sondern auch ein extensives Remodeling. Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen konnten zeigen, dass Ceacam-1 einen erheblichen Einfluss auf Remodelingprozesse hat [15]. Eine weitere Frage war, ob tatsächlich das auf ortsständigen Endothel- bzw. Gefäßzellen exprimierte Ceacam-1 entscheidend für den arteriogenetischen Effekt von Ceacam-1 ist oder ob es nicht doch einwandernde Zellen sind, die wie in der Einleitung beschrieben ebenfalls eine entscheidende Rolle beim Kollateralwachstum spielen. Dieser Fragestellung wurde in dieser Arbeit folgenden Studien nachgegangen.

In histologischen Präparaten von hypoxischem Gewebe wurden Zellen der myeloischen Reihe wie zum Beispiel Neutrophile, Monozyten sowie Makrophagen nachgewiesen [14, 48, 60].

Diese Zellen verlassen bei vorliegender Hypoxie den Intravasalraum, akkumulieren in der Adventitia bzw. im perivasalen Raum und triggern das Kollateralarterienwachstum durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteinasen. In neueren Studien wird vermehrt diskutiert, dass Ceacam-1 durch seine Interaktionen mit Integrinen vor allem die erleichterte Invasion nicht ortsständiger Zellen forciert. In einer 2012 von T. Bickert veröffentlichten Studie wurde hier insbesondere die Bedeutung der myeloischen Zellen herausgearbeitet. Bickert verwendete das gleiche Femoralarterienokklusionsmodell

der Maus, welches auch dieser Dissertation zugrunde liegt. Er konnte zeigen, dass Ceacam-1-positive myeloische Zellen essenziell sind für eine adäquate Arteriogenese und dass die Gegenwart dieser myeloischen Zellen die Anzahl und den Durchmesser von Kollateralgefäßen deutlich erhöht [15]. Insofern konnten wir zwar zeigen, dass eine endotheliale Überexpression von Ceacam-1 den Kollateralfluss verstärkt, dies scheint jedoch im physiologischen Prozess der Arteriogenese eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Schließlich stellt sich noch die Frage, ob unser Mausmodell für eine derartige Untersuchungsreihe überhaupt geeignet ist. Bezugnehmend auf die bisherigen Angaben zu den Formen des Gefäßwachstums wäre es doch denkbar, dass die Ceacam-1^{-/-}-Mäuse ohnehin mit einem insuffizienten Gefäßsystem ausgestattet sind und damit Untersuchungen zur Angiogenese bzw. Arteriogenese unzulässig sind.

Erstaunlicherweise zeigten diese Tiere jedoch keine Beeinträchtigungen hinsichtlich ihrer Vaskulogenese. Wie eingangs erwähnt, ist die Vaskulogenese die früheste Phase der Gefäßentwicklung, bei der es zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes kommt. Alle von uns verwendeten Mausstämme, und hier insbesondere die Ceacam-1^{-/-}-Mäuse, waren gesund und fertil. Dieser Umstand mag durch die Existenz eines weiteren Ceacam-Gens (Ceacam-2) erklärt werden, welches die fehlende Funktion von Ceacam-1 kompensiert. Die Rolle und Funktionsweise weiterer Ceacam-Subtypen wurde jedoch bisher nicht weiter untersucht [76].

Im Allgemeinen scheinen die Mitglieder der IGSF-Zelladhäsionsmoleküle wie zum Beispiel Ceacam-1 ihre angiogenetische Potenz nur im erwachsenen Organismus zu entfalten, für die embryonale Vaskulogenese aber entbehrlich zu sein. So führt die Deaktivierung dieser Zelladhäsionsmoleküle zwar zu reduzierter Gefäßneubildung in-vitro und vermindert das Tumorstadium von transplantierten Tumoren, die Vaskulogenese bleibt jedoch unberührt [53].

Diese Eigenschaft unterscheidet die IGSF-Zelladhäsionsmoleküle von den anderen Mitgliedern der Zelladhäsionsmoleküle wie zum Beispiel Cadherinen oder Integrinen. So führt die gezielte Inaktivierung von VE-Cadherin-Genen in Embryonen bedingt durch vaskuläre Defekte zum Tode der Tiere [21].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit anhand von Ceacam-knock-out-Tieren gezeigt werden, dass dieses Molekül eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Kollateralflusses hat, was nur zum geringen Teil durch eine Veränderung der Gefäßproliferation zu erklären ist. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass eine Überexpression von Ceacam im Endothel in der Lage ist, den Kollateralfluss zu verstärken. Auf diese Ergebnisse aufbauende Arbeiten konnten schließlich nachweisen, dass insbesondere das auf einwandernden myeloischen Zellen exprimierte Ceacam während der Arteriogenese eine entscheidende Rolle spielt [15].

5. Zusammenfassung

Die positiven Effekte des Zelladhäsionsmoleküls Ceacam-1 auf die Angiogenese konnten in in-vitro-Studien bereits mehrfach bestätigt werden. Ziel dieser Dissertation war es, anhand eines etablierten Femoralarterienokklusionsmodells der Maus auch die arteriogenetische Potenz von Ceacam-1 und damit den Einfluss auf neues Kollateralarterienwachstum in-vivo zu untersuchen.

Wir konnten mit unseren Untersuchungen zeigen, dass Ceacam sowohl hinreichend als auch notwendig zur Ausbildung eines relevanten Kollateralflusses ist. Durch unsere Versuche mit der etablierten Mikrosphärenzählung konnten wir zeigen, dass die relative Durchblutung des ischämischen, ligierten Beines 7 Tage nach dem Eingriff bei den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht ist.

Im Gegensatz dazu war die relative Durchblutung an ischämischen Hinterläufen bei Ceacam-1^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt gegenüber ihrer Kontrollgruppe. Ergänzende Untersuchungen mittels Flowprobe sowie die Überprüfung der Zellproliferation zeigten zwar keine signifikanten Unterschiede, aber eine klare Tendenz hinsichtlich der ausgeprägten Bedeutung von Ceacam für das Kollateralarterienwachstum.

Kritisch anzumerken ist hier, dass die Tendenz zu vermehrter Zellteilung und damit erhöhter Arteriogenese in den Ceacam-1^{endo+}-Mäusen gegenüber den Ceacam-1^{-/-}-Mäusen erkennbar ist, den signifikanten Unterschied in den Kollateralflüssen jedoch nicht vollständig erklärt.

Unsere Schlussfolgerung ist, dass Ceacam zum einen durch seine Präsenz auf lokalen Endothelzellen in Zusammenarbeit mit anderen Wachstumsfaktoren in hypoxischem Gewebe die lokale Gefäßproliferation stimuliert. Zum anderen, und dies konnte in einer dieser Arbeit folgenden Studie gezeigt werden, hat Ceacam einen erheblichen Einfluss auf das Remodeling, das heißt den vaskulären Umbauprozess, der dafür sorgt, dass sich das Gefäß den neuen hämodynamischen Bedingungen anpasst. In seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül erleichtert Ceacam-1 es, zirkulierenden myeloischen Zellen in den subintimalen Raum überzutreten und somit deren Anzahl und folglich auch den Durchmesser von Kollateralgefäßen deutlich zu erhöhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Antikörper-online
<http://antibody/108728/anti---3-5-8+CEACAM1-3-5-8/> (24.07.2015 MEZ 14:11 Uhr)
2. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50:197-263 (1998)
3. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest.* 101:40-50 (1998)
4. Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MB, Bock E, Obrink B. The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett.* 264:267-9 (1990)
5. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 373:1849-60 (2009)
6. Bamberger AM, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A. The adhesion molecule CEACAM-1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol.* 156:1165-70 (2000)
7. Barnett TR, Kretschmer A, Austen DA, Goebel SJ, Hart JT, Elting JJ, Kamarck ME. Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol.* 108:267-76 (1989)
8. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 7:569-74. (2001)
9. Bautch VL, Redick SD, Scalia A, Harmaty M, Carmeliet P, Rapoport R. Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A. *Blood.* 95:1979-87 (2000)

10. Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, Fuks A, Stanners CP. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol.* 7:3221-30 (1987)
11. Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene.* 14:783-90 (1997)
12. Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarström S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M, Lin SH, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Obrink B, Shively JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watt S, Zimmermann W. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res.* 252:243-9 (1999)
13. Bedenis R, Stewart M, Cleanthis M, Robless P, Mikhailidis DP, Stansby G. Cilostazol for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev.* 10:CD003748 (2014)
14. Bergmann CE, Hoefer IE, Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR. Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol.* 80:59-65 (2006)
15. Bickert T, Marshall RP, Zhang Z, Ludewig P, Binder M, Klinke A, Rottbauer W, Amling M, Wagener C, Ito WD, Horst AK. Acceleration of collateral development by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression on CD11b/(+)Gr-1(+) myeloid cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:2566-8 (2012)
16. Brummer J, Neumaier M, Gopfert C, Wagener C. Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene.* 11:1649-55 (1995)
17. Brummer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Loning T, Bamberger AM, Wagener C. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol.* 159:537-46 (2001)
18. Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J Appl Physiol.* 31:598-604 (1971)
19. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 190:338-42 (2000)

20. Buschmann I, Katzer E, Bode C. Arteriogenesis - is this terminology necessary? *Basic Res Cardiol.* 98:1-5 (2003)
21. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98:147-57 (1999)
22. Chen WJ, Chen HW, Yu SL, Huang CH, Wang TD, Chen JJ, Chen HY, Yang PC, LEE YT. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Shock.* 24:124-31 (2005)
23. Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K, Milliron P, Hwa Lin S. Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 268:24303-10 (1993)
24. Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Innere Medizin 4.Edition, Urban & Schwarzenberg, S. 1115,1116,1124,1126,1130 (1998)
25. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation.* 71:510-5 (1985)
26. Culic O, Huang QH, Flanagan D, Hixson D, Lin SH. Molecular cloning and expression of a new rat liver cell-CAM105 isoform. Differential phosphorylation of isoforms. *Biochem J.* 285: 47-53 (1992)
27. Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, Pittrow D, von Stritzky B, Tepohl G, Trampisch HJ. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis.* 172:95-105 (2004)
28. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 477:258-62 (2000)
29. Dor Y, Keshet E. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 7:289-94 (1997)
30. Dorros G, Jaff MR, Dorros AM, Mathiak LM, He T. Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up. *Circulation.* 104:2057-62 (2001)

31. Dvorak HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol.* 24:75-8 (2000)
32. Edelman GM. CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev.* 100:11-45 (1987)
33. Edelman GM. Morphoregulatory molecules. *Biochemistry.* 27:3533-43 (1988)
34. Edlund M, Blikstad I, Obrink B. Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J Biol Chem.* 271:1393-9 (1996)
35. Ergun S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell.* 5:311-20 (2000)
36. Faglia E, Mantero M, Caminiti M, Caravaggi C, De Giglio R, Pritelli C, Clerici G, Fratino P, De Cata P, Dalla Paola L, Mariani G, Poli M, Settembrini PG, Sciangula L, Morabito A, Graziani L. Extensive use of peripheral angioplasty, particularly infrapopliteal, in the treatment of ischaemic diabetic foot ulcers: clinical results of a multicentric study of 221 consecutive diabetic subjects. *J Intern Med.* 252:225-32 (2002)
37. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 92:657-71 (1995)
38. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med. (Berl).* 77:527-43 (1999)
39. Ferreira R. The reduction of infarct size--forty years of research. *Rev Port Cardiol.* 29:1037-53 (2010)
40. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-6 (1971)
41. Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med.* 82:96-100 (1975)
42. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1:27-31 (1995)
43. Godfraind C, Langreth SG, Cardellicchio CB, Knobler R, Coutelier JP, Dubois-Dalcq M, Holmes KV. Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest.* 73:615-27 (1995)

44. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med.* 122:467-81 (1965)
45. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H2411-9 (2002)
46. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:520-6 (2006)
47. Hinoda Y, Neumaier M, Hefta SA, Drzeniek Z, Wagener C, Shively L, Hefta LJ, Shively JE, Paxton RJ. Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6959-63 (1988)
48. Hoefer IE, Grundmann S, van Royen N, Voskuil M, Schirmer SH, Ulusans S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis.* 181:285-93 (2005)
49. Horst AK, Wulf I, Dabelstein J, Schumacher U, Sander H, Turbide C, Brümmer J, Meinertz T, Beauchemin N, Wagener C. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 116:1602 (2006)
50. Huber M, Izzi L, Grondin P, Houde C, Kunath T, Veillette A, Beauchemin N. 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. *J Biol Chem.* 274:335-44 (1999)
51. Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G, Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J.* 16:1453-5 (2002)
52. Immunopharmacology, Roy Goldie, Clive Page, WCDAmTho, Academic Press p: 1-57, 90-102, 111-133, 164-177 (1994)
53. Ishida T, Kundu RK, Yang E, Hirata K, Ho YD, Quertermous T. Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 278:34598-604 (2003)

54. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 273(3 Pt 2):H1255-65 (1992)
55. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 80:829-37 (1997)
56. Jacobi J, Tam BY, Wu G, Hoffman J, Cooke JP, Kuo CJ. Adenoviral gene transfer with soluble vascular endothelial growth factor receptors impairs angiogenesis and perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. *Circulation.* 110:2424-9 (2004)
57. Jargiello DM, Caplan AI. The fluid flow dynamics in the developing chick wing. *Prog Clin Biol Res.* 110 Pt A:143-54 (1983)
58. Kannel WB. Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. *J Cardiovasc Risk.* 1:333-9 (1994)
59. Keck U, Nedellec P, Beauchemin N, Thompson J, Zimmermann W. The cea10 gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow. *Eur J Biochem.* 229:455-64 (1995)
60. Khmelewski E, Becker A, Meinertz T, Ito WD. Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circ Res.* 95:E56-64 (2004)
61. Lawall H DC, Pittrow (Hrsg.). Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschußkrankheit (pAVK) (2009)
62. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 111:3481-8 (2005)
63. Lofberg AM, Karacagil S, Ljungman C, Westman B, Bostrom A, Hellberg A, Ostholm G. Percutaneous transluminal angioplasty of the femoropopliteal arteries in limbs with chronic critical lower limb ischemia. *J Vasc Surg.* 34:114-21 (2001)
64. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 358:527-33 (2001)

65. Nedellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes K, Beauchemin N. Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol.* 68:4525-37 (1994)
66. Obrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol.* 9:616-26 (1997)
67. Ocklind C, Obrink B. Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *J Biol Chem.* 257:6788-95 (1982)
68. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature.* 429:629-35 (2004)
69. Olsen A, Teglund S, Nelson D, Gordon L, Copeland A, Georgescu A, Carrano A, Hammarstrom S. Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics.* 23:659-68 (1994)
70. Phibbs RH, Wyler F, Neutze J. Rheology of microspheres injected into circulation of rabbits. *Nature.* 216:1339-40 (1976)
71. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 269:804-6 (1977)
72. Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Loning T, Wagener C. CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 44:35-41 (1996)
73. Researchgate
https://www.researchgate.net/figure/259567707_fig8_A-Schema-of-anatomical-variations-in-the-deep-femoral-artery-The-deep-femoral-artery (24.05.2016 MEZ 19:15 Uhr)
74. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386:671-4 (1997)
75. Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl.* 67:S3-6 (1998)

76. Robitaille J, Izzi L, Daniels E, Zelus B, Holmes KV, Beauchemin N. Comparison of expression patterns and cell adhesion properties of the mouse biliary glycoproteins Bbgp1 and Bbgp2. *Eur J Biochem.* 264:534-44 (1999)
77. Rogers KC, Oliphant CS, Finks SW. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. *Drugs.* 75:377-95 (2015)
78. Sawa H, Kamada K, Sato H, Sendo S, Kondo A, Saito I, Obrink B. C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 78:35-43 (1994)
79. Schaper W, Schaper J. Pathophysiology of myocardial perfusion. *Pathobiol Annu.* 6:317-63 (1976)
80. Schaper W, Piek JJ, Munoz-Chapuli R, Wolf C, Ito W. Collateral Circulation of the Heart. In: Ware JA, Simons M, editors. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*. New York, NY, Oxford: Oxford University Press; p. 159-98 (1999)
81. Schaper W. Quo vadis collateral blood flow? A commentary on a highly cited paper. *Cardiovasc Res.* 45:220-3 (2000)
82. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1143-51 (2003)
83. Schmailzl KJ, Holschermann F, Schwalm T, Wilke E. [Acute coronary syndrome: ST-segment elevation infarct]. *Wien Med Wochenschr.* 153:434-49 (2003)
84. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 436:257-70 (2000)
85. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 34:775-87 (2002)
86. Schumann D, Chen CJ, Kaplan B, Shively JE. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J Biol Chem.* 276:47421-33 (2001)
87. Skubitz KM, Campbell KD, Ahmed K, Skubitz AP. CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol.* 155:5382-90 (1995)

88. Statistisches Bundesamt
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>,
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten.html> - Tabellen (24.07.15 MEZ 16:11 Uhr)
89. Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer*. 17:588-96 (1976)
90. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 93:662-70 (1994)
91. Tefera G, Turnipseed W, Tanke T. Limb salvage angioplasty in poor surgical candidates. *Vasc Endovascular Surg*. 37:99-104 (2003)
92. Thermoscientific
http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/CDD/CDD_Product_Images/Particle_Technology/Fluorescent_and_Dyed_Particles/F70238~p.eps/jcr:content/renditions/cq5dam.thumbnail.450.450.png (24.07.15 MEZ 16:18 Uhr)
93. Transonic
<http://www.adinstruments.com/products/transonic-flowprobes> (24.05.2016 MEZ 19:15 Uhr)
94. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, Chew EY, Trapnell CB, Cannon RO, 3rd, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 85:1414-9 (2000)
95. Wagner HN, Jr., Rhodes BA, Sasaki Y, Ryan JP. Studies of the circulation with radioactive microspheres. *Invest Radiol*. 4:374-86 (1969)
96. Warren DJ, Ledingham JG. Measurement of intrarenal blood-flow distribution in the rabbit using radioactive microspheres. *Clin Sci Mol Med*. 48:51-60 (1975)
97. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*. 6:381-405 (1988)
98. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 93:661-4 (1998)

99. Yang HT, Deschenes MR, Ogilvie RW, Terjung RL. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circ Res.* 79:62-9 (1996)

7. Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9. Erklärung

Ich versichere hiermit,

- dass ich die Arbeit selbständig gemäß der Richtlinien des Senats der Universität Ulm zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe,
- die Arbeit bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form für ein Promotionsverfahren vorgelegt habe,
- dass ich zur Zeit zu keinem anderen Promotionsverfahren zugelassen bin oder ein solches beantragt habe,
- dass die Daten nicht im Zusammenhang mit anderen Promotionsverfahren veröffentlicht wurden,
- dass keine Strafverfahren gegen mich laufen.

28.09.2016

.....
Datum, Unterschrift